

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**OPREDELITEV MEHANIZMA IN SOODVISNOSTI
DELOVANJA DVEH BELJAKOVIN IZ
MODRASOVEGA STRUPA, SEKRETORNE
FOSFOLIPAZE A₂ IN ZAVIRALCA KIMOTRIPSINA**

**DESCRIPTION OF THE MECHANISM AND
INTERDEPENDENCE OF THE ACTION OF TWO
NOSE-HORNED VIPER VENOM PROTEINS,
SECRETORY PHOSPHOLIPASE A₂ AND
CHYMOTRYPSIN INHIBITOR**

Sabina Drofenik

Ljubljana, 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK: 577.15:615.919:547.993:598.1(043.2)

**OPREDELITEV MEHANIZMA IN SOODVISNOSTI
DELOVANJA DVEH BELJAKOVIN IZ MODRASOVEGA
STRUPA, SEKRETORNE FOSFOLIPAZE A₂ IN ZAVIRALCA
KIMOTRIPSINA**

**DESCRIPTION OF THE MECHANISM AND
INTERDEPENDENCE OF THE ACTION OF TWO
NOSE-HORNED VIPER VENOM PROTEINS, SECRETORY
PHOSPHOLIPASE A₂ AND CHYMOTRYPSIN INHIBITOR**

Sabina Drofenik

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvom prof. dr. Roberta Frangeža in somentorstvom prof. dr. Igorja Križaja v Enoti za fiziologijo in patofiziologijo Inštituta za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani v okviru raziskovalnega programa P4-0053 ter v Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti Instituta Jožef Stefan v okviru raziskovalnega programa P1-0207.

Ljubljana, 2020

IZVLEČEK

Ključne besede: strupi družine gadov; serinskoproteazni zaviralec; fosfolipaze A₂; kalijev kanal, zaviralci; mišična kontrakcija; membranski potenciali; živčno-mišični stik; motorična ploščica; elektrofiziologija.

Živalski strupi so bogate mešanice različnih farmakološko aktivnih beljakovin, ki v številnih primerih delujejo vzajemno (sinergistično). Tako so bili sinergijski učinki že opisani v primeru proteinov s strukturo sekretorne fosfolipaze A₂ (sPLA₂) in zaviralcev serinskih proteaz iz proteinske družine Kunitz/BPTI. V modrasovem strupu (*Vipera ammodytes ammodytes*; *Vaa*) sta obe vrsti molekul, presinaptično nevrotoksični amoditoksin A (AtxA) in kimotripsinski zaviralec (VaaChi). Preverili smo, ali ti komponenti strupa tvorita kompleks in delujeta sinergistično. Iz strupa smo s kombinacijo kromatografskih postopkov izolirali štiri frakcije, ki so vsebovale šest različnih, aktivnih izoblik VaaChi. Pripravili smo rekombinantni AtxA (rAtxA), ki se v aktivnosti ni razlikoval od naravnega. VaaChi ni vplival na encimsko aktivnost rAtxA. Elektrofiziološke poskuse smo izvajali na živčno-mišičnem preparatu mišje hemidiafragme, vse meritve pa z mešanico vseh šestih izoblik VaaChi in rAtxA. Določali smo vpliv rAtxA oziroma VaaChi in predinkubirane mešanice obeh na amplitudo posredno in neposredno izzvanih enostavnih in tetaničnih mišičnih kontrakcij, mirovni membranski potencial (rV_m), amplitudo potenciala motorične ploščice (PMP) in amplitudo miniaturnih potencialov motorične ploščice (MPMP). Učinki rAtxA se niso razlikovali od učinkov mešanice rAtxA in VaaChi, zato sklepamo, da AtxA in VaaChi ne delujeta sinergistično. Zanimivo je, da je VaaChi statistično značilno povečal amplitudo posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije mišje hemidiafragme ter amplitudi PMP in MPMP. VaaChi je strukturni homolog α-dendrotoksina, zaviralca napetostno odvisnih K⁺ kanalov iz strupa zelene mambe (*Dendroaspis angusticeps*), zato predlagamo, da deluje enako kot α-dendrotoksin, torej zavira delovanje napetostno odvisnih K⁺ kanalov v presinaptični membrani živčno-mišičnega stika. VaaChi je tako verjetno sploh prvi primer proteina Kunitzovega tipa iz strupa viperidnih kač, ki zavira serinske proteaze in napetostno odvisne K⁺ kanale.

ABSTRACT

Key words: Viper venoms – analysis – chemistry; serine proteinase inhibitors; phospholipases A₂; potassium channel blockers; muscle contraction; membrane potentials; neuromuscular junction; motor endplate; electrophysiology.

Animal poisons are rich mixtures of various pharmacologically active proteins that in many cases interact synergistically. Synergistic effects have already been described in the case of proteins with the structure of secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) and the Kunitz/BPTI serine protease inhibitor protein family. Both types of molecules, presynaptic neurotoxic ammodytoxin A (AtxA) and chymotrypsin inhibitor (VaaChi), are present in nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*; *Vaa*) venom. We tested whether these two components of the poison form a complex and act synergistically. Four fractions containing six VaaChi isoforms were isolated from the poison by a combination of chromatographic methods. We also prepared recombinant AtxA (rAtxA), which did not differ in activity from natural AtxA. VaaChi did not affect the enzymatic activity of rAtxA. Electrophysiological experiments were performed on a neuromuscular preparation of a mouse hemidiaphragm, and all measurements were performed with a mixture of all six VaaChi isoforms and with rAtxA. We determined the effects of rAtxA, VaaChi and a preincubated mixture of both on the amplitude of indirectly and directly evoked simple and tetanic muscle contractions, resting membrane potential (rV_m), the amplitude of the end-plate potential (EPP) and the amplitude of the miniature end-plate potential (MEPP). The effects of rAtxA did not differ from the effects of the mixture of rAtxA and VaaChi; therefore, we concluded that AtxA and VaaChi do not act synergistically. It is interesting to note that VaaChi significantly increased the amplitude of the indirectly evoked simple muscle contraction of the hemidiaphragm and the amplitudes of EPP and MEPP. VaaChi is a structural homologue of α -dendrotoxin, a blocker of voltage-dependent K⁺ channels from green mamba (*Dendroaspis angusticeps*) venom; therefore, we suggest that VaaChi acts in the same way as α -dendrotoxin, i.e., inhibits the action of voltage-dependent K⁺ channels in the presynaptic membrane of neuromuscular junctions. VaaChi is probably the first example of a Kunitz-type protein from viperid snake venom that inhibits both serine proteases and voltage-dependent K⁺ channels.

KAZALO VSEBINE

| | |
|--|----|
| 1 UVOD..... | 1 |
| 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA | 1 |
| 1.2 CILJ RAZISKOVANJA | 2 |
| 1.3 DELOVNE HIPOTEZE | 3 |
| 2 PREGLED LITERATURE | 4 |
| 2.1 ZGRADBA IN FUNKCIJA ŽIVČNO-MIŠIČNEGA STIKA | 4 |
| 2.2 ZAVIRALCI SERINSKIH PROTEAZ V STRUPU MODRASA | 6 |
| 2.3 FOSFOLIPAZE (PL) | 10 |
| 2.3.1 Sekretorne fosfolipaze A ₂ (sPLA ₂)..... | 11 |
| 2.3.2 Amoditoksini (Atx) | 11 |
| 2.3.3 Kompleksi med sPLA ₂ in drugimi proteini v kačjih strupih | 16 |
| 2.4 MEHANIZEM VSTOPA Atx in VaaChi V ŽIVČNI KONČIČ..... | 18 |
| 2.5 DENDROTOKSINI (DTx) | 18 |
| 2.5.1 α-dendrotoksin (αDTx)..... | 19 |
| 2.5.2 Učinki αDTx na živčno-mišični preparat | 21 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 24 |
| 3.1 MATERIALI..... | 24 |
| 3.1.1 Kemikalije in drobna oprema | 24 |
| 3.1.2 Laboratorijska oprema..... | 26 |
| 3.1.3 Uporabljeni pufri in raztopine | 28 |
| 3.2 METODE | 29 |
| 3.2.1 Metode izolacije in karakterizacije VaaChi | 29 |
| 3.2.2 Metode čiščenja in karakterizacija rekombinantnega AtxA (rAtxA)..... | 34 |
| 3.2.3 Masna spektrometrija (MS)..... | 36 |
| 3.2.4 Preverjanje nastanka kompleksov z nativno elektroforezo | 38 |
| 3.2.5 Metode dela na živčno-mišičnem preparatu..... | 39 |
| 3.2.6 Analiza podatkov in statistika | 43 |
| 4 REZULTATI | 45 |
| 4.1 IZOLACIJA VaaChi IZ STRUPA MODRASA | 45 |

| | |
|--|----|
| 4.2 ČIŠČENJE IN KARAKTERIZACIJA rAtxA | 55 |
| 4.3 DOLOČITEV MOLEKULSKE MASE IN DELNEGA AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA IZOLIRANIM ZAVIRALCEM SERINSKIH PROTEAZ..... | 57 |
| 4.4 ZAVIRANJE KIMOTRIPSINSKE AKTIVNOSTI z VaaChi | 61 |
| 4.5 VPLIV VaaChi NA ENCIMSKO AKTIVNOST AtxA | 62 |
| 4.6 MERJENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI rAtxA | 63 |
| 4.7. PREVERJANJE NASTANKA KOMPLEKSOV MED rAtxA in VaaChi | 64 |
| 4.8 VPLIV VaaChi TER MEŠANICE rAtxA IN VaaChi NA IZOMETRIČNO MIŠIČNO KONTRAKCIJO IZOLIRANIH HEMIDIAFRAGEM MIŠI | 64 |
| 4.8.1 Vpliv VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na posredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo | 66 |
| 4.8.2 Vpliv VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na neposredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo..... | 68 |
| 4.8.3 Vpliv VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na posredno izzvano tetanično mišično kontrakcijo | 69 |
| 4.8.4 Vpliv VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na neposredno izzvano tetanično mišično kontrakcijo..... | 70 |
| 4.9 VPLIV VaaChi NA ELEKTROFIZIOLOŠKE PARAMETRE MIŠIČNIH VLAKEN.. | 72 |
| 4.9.1 Vpliv VaaChi na rVm..... | 72 |
| 4.9.2 Vpliv VaaChi na amplitudo PMP | 73 |
| 4.9.3 Vpliv VaaChi na razpolovni čas padajoče faze PMP | 74 |
| 4.9.4 Vpliv VaaChi na amplitudo MPMP | 75 |
| 4.9.5 Vpliv VaaChi na razpolovni čas padajoče faze MPMP | 76 |
| 4.9.6 Vpliv VaaChi na frekvenco MPMP | 77 |
| 5 RAZPRAVA..... | 79 |
| 6 SKLEPI..... | 85 |
| 7 POVZETEK | 86 |
| 8 SUMMARY | 88 |
| 9 ZAHVALA..... | 90 |
| 10 LITERATURA | 91 |

KAZALO SLIK

| | |
|---|----|
| Slika 1: Strukturne lastnosti zaviralcev iz družine Kunitz/BPTI..... | 7 |
| Slika 2: Primerjava aminokislinskega zaporedja VaaTi-I in VaaChi z zaporedjem zaviralcev iz strupov drugih kač in z BPTI. | 9 |
| Slika 3: Razvrstitev PL glede na mesto delovanja na molekuli fosfoglicerida. | 10 |
| Slika 4: Tridimenzionalna struktura AtxA. | 12 |
| Slika 5: Trifazni odziv živčno-mišičnega preparata mišje hemidiafragme pri posredno izzvani mišični kontrakciji po aplikaciji Atx. | 14 |
| Slika 6: Primerjava primarne strukture αDTx z VaaChi in BPTI. | 19 |
| Slika 7: Kristalna struktura αDTx (PDB: 1DTX). | 20 |
| Slika 8: Učinki αDTx (4,2 µM) na posredno izzvano stimulacijo živčno-mišičnega preparata mišje hemidiafragme. | 21 |
| Slika 9: Ionska izmenjevalna kromatografija 1 modrasovega strupa. | 45 |
| Slika 10: Zaviranje tripsinske aktivnosti frakcij. | 46 |
| Slika 11: Analiza vzorcev IIK-1-A in IIK-1-B z metodo RP-HPLC. | 47 |
| Slika 12: Analiza N-končnega aminokislinskega zaporedja vzorca HPLC-2-A1. | 49 |
| Slika 13: Gelska filtracija vzorca VaaChi po IIK-1. | 50 |
| Slika 14: Analiza RP-HPLC vzorca GF-E. | 51 |
| Slika 15: Ionska izmenjevalna kromatografija 2. | 52 |
| Slika 16: Analiza RP-HPLC vzorcev IIK-2-A in IIK-2-B. | 53 |
| Slika 17: Preverjanje čistosti različnih frakcij z VaaChi z NaDS-PAGE. | 54 |
| Slika 18: Čiščenje rAtxA. | 55 |
| Slika 19: Preverjanje mase in čistosti rAtxA z MS. | 57 |
| Slika 20: Preverjanje mase in čistosti VaaChi z MS. | 58 |
| Slika 21: Aminokislinska poravnava določenih kimotripsinskih zaviralcev. | 60 |
| Slika 22: Zaviranje aktivnosti kimotripsina. | 61 |
| Slika 23: Vpliv VaaChi na encimsko aktivnost naravnega AtxA. | 62 |
| Slika 24: Meritve encimske aktivnosti očiščenega rAtxA. | 63 |
| Slika 25: Učinek rAtxA, VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na izometrično mišično kontrakcijo mišje hemidiafragme v odvisnosti od časa. | 65 |
| Slika 26: Učinek VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na amplitudo posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši. | 67 |

| | |
|--|----|
| Slika 27: Učinek VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na amplitudo neposredno izvvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši..... | 68 |
| Slika 28: Učinek VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na amplitudo posredno izvvane tetanične mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši. | 70 |
| Slika 29: Učinek VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na amplitudo neposredno izvvane tetanične mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši. | 71 |
| Slika 30: Vpliv VaaChi na rV_m skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. | 72 |
| Slika 31: Vpliv VaaChi na amplitudo PMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši... <td>73</td> | 73 |
| Slika 32: Vpliv VaaChi na razpolovni čas padajoče faze PMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. | 74 |
| Slika 33: Vpliv VaaChi na amplitudo MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. | 75 |
| Slika 34: Vpliv VaaChi na razpolovni čas padajoče faze MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. | 76 |
| Slika 35: Vpliv VaaChi na frekvenco MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. | 77 |

KAZALO TABEL

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Kemikalije in drobna oprema | 24 |
| Tabela 2: Laboratorijska oprema..... | 26 |
| Tabela 3: Uporabljeni pufri in raztopine | 28 |
| Tabela 4: Potek izpiranja RP-HPLC kolone C4 | 30 |
| Tabela 5: Sestava 4-odstotnega koncentracijskega gela..... | 33 |
| Tabela 6: Sestava 15-odstotnega ločevalnega gela..... | 33 |
| Tabela 7: Sestava redukcijskega pufra | 33 |
| Tabela 8: Potek izpiranja RP-HPLC kolone C3 | 35 |
| Tabela 9: Potek izpiranja RP-HPLC kolone C18 | 35 |
| Tabela 10. Sestava 12,5-odstotnega ločevalnega gela..... | 38 |
| Tabela 11. Sestava 4-kratnega nanašalnega pufra | 38 |
| Tabela 12: Struktturna karakterizacija VaaChi..... | 60 |
| Tabela 13: Vpliv VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na elektrofiziološke parametre motorične ploščice | 84 |

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

| | |
|-------------------|---|
| α DTx | α -dendrotoksin |
| ACh | acetilholin |
| AChE | acetilholinesteraza |
| ACN | acetonitril |
| AP | akcijski potencial |
| APS | amonijev persulfat |
| Atx | amoditoksini |
| AtxA | amoditoksin A |
| BPTI | goveji pankreasni tripsinski zaviralec |
| BSA | goveji serumski albumin |
| CAA | kloroacetamid |
| cVaaChi | kimotripsinski zaviralec, odkrit na ravni genoma |
| dH ₂ O | destilirana voda |
| dTC | d-tubokurarin |
| DTT | ditiotreitol |
| DTx | dendrotoksin |
| EPP | end-plate potential |
| ESI-MS | masna spektrometrija z ionizacijo z elektrorazprševanjem |
| EtOH | etanol |
| F | fluorescenca |
| HEPES | 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfonska kislina |
| HPLC | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti |
| K _d | ravnotežna disociacijska konstanta |
| K _i | disociacijska konstanta |
| K-R | Krebs-Ringer |
| LD ₅₀ | odmerek snovi, ki povzroči smrt 50 % poskusnih živali |
| MEPP | miniature end-plate potential |
| min | minuta |
| MPMP | miniaturni potencial motorične ploščice |
| MS | masna spektrometrija |
| MS/MS | tandemska masna spektrometrija |

| | |
|-------------------|--|
| MT | mišična tenzija v mirovanju |
| nAChR | nikotinski acetilholinski receptorji |
| NaDS | natrijev dodecilsulfat |
| NaDS-PAGE | poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS |
| pI | izoelektrična točka |
| PMP | potencial motorične ploščice |
| PyrPG | 1-heksadekanoil-2-(1-pirendecanoil)-sn-glicero-3-fosfoglicerol |
| Q-TOF | masni analizator na osnovi časa preleta ionov s kvadrupolnim predanalizatorjem |
| rAtxA | rekombinantno pridobljen AtxA |
| RP-HPLC | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjenima fazama |
| rV _m | mirovni membranski potencial |
| sPLA ₂ | sekretorne fosfolipaze A ₂ |
| t | čas |
| TCEP | tris(2-karboksietil)fosfin hidroklorid |
| TEMED | tetrametiletilendiamin |
| TFA | trifluoroacetna kislina |
| Tris | 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol |
| Vaa | <i>Vipera ammodytes ammodytes</i> |
| VaaChi | kimotripsinski zaviralec iz strupa modrasa (<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>) |
| VaaTi | tripsinski zaviralec iz strupa modrasa (<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>) |

TRIČRKOVNE IN ENOČRKOVNE OZNAKE ZA AMINOKISLINE

| Aminokislina | Okrajšava | Enočrkovna oznaka |
|----------------------|-----------|-------------------|
| alanin | Ala | A |
| cistein | Cys | C |
| asparaginska kislina | Asp | D |
| glutaminska kislina | Glu | E |
| fenilalanin | Phe | F |
| glicin | Gly | G |
| histidin | His | H |
| izolevcin | Ile | I |
| lizin | Lys | K |
| levcin | Leu | L |
| metionin | Met | M |
| asparagin | Asn | N |
| prolin | Pro | P |
| glutamin | Gln | Q |
| arginin | Arg | R |
| serin | Ser | S |
| treonin | Thr | T |
| valin | Val | V |
| triptofan | Trp | W |
| tirozin | Tyr | Y |

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Podvrsta modrasa (*Vipera ammodytes ammodytes; Vaa*) je najpogosteša in najnevarnejša kača na Balkanskem polotoku, njegov strup pa vsebuje več kot 50 različnih proteinov. Patofiziološki mehanizmi delovanja posameznih proteinov so zelo različni. Nekateri med seboj tvorijo komplekse, posledice tega pa so lahko njihovo spremenjeno delovanje, učinek in tudi toksičnost. Amoditoksin A (AtxA), nevrotoksična sekretorna fosfolipaza A₂ (sPLA₂) v strupu modrasa, je pretežno odgovoren za nevrotoksične učinke. Dokazano je bilo, da AtxA in kimotripsinski zaviralec (VaaChi) iz družine Kunitz/BPTI tvorita kompleks, ki je v poskusih *in vivo* na miših bolj toksičen kot AtxA. Učinki in mehanizem delovanja VaaChi ter kompleksov AtxA in VaaChi na živčno-mišični prenos do danes še niso bili opisani, razumevanje in poznavanje mehanizmov njunega delovanja pa lahko prispeva k razvoju terapije po ugrizu modrasa.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Cilji naloge so bili izolirati in očistiti VaaChi iz strupa modrasa ter z elektrofiziološkimi metodami (meritve izometrične kontrakcije skeletne mišice in membranskih potencialov mišičnih vlaken) proučiti fiziološke, farmakološke in morebitne toksične vplive VaaChi ter kompleksov VaaChi in AtxA na živčno-mišični prenos na izoliranih živčno-mišičnih preparatih hemidiafragem miši. Na podlagi analize vseh pridobljenih rezultatov smo sledili temeljnemu cilju raziskave, to je opredelitvi mehanizma in soodvisnosti delovanja dveh beljakovin iz modrasovega strupa.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

1. VaaChi in AtxA delujeta sinergistično.
2. Kompleks AtxA-VaaChi je bolj nevrotoksičen kot AtxA.
3. Glede na strukturno podobnost VaaChi in α -dendrotoksina pričakujemo, da VaaChi prav tako poveča amplitudo enostavne mišične kontrakcije.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 ZGRADBA IN FUNKCIJA ŽIVČNO-MIŠIČNEGA STIKA

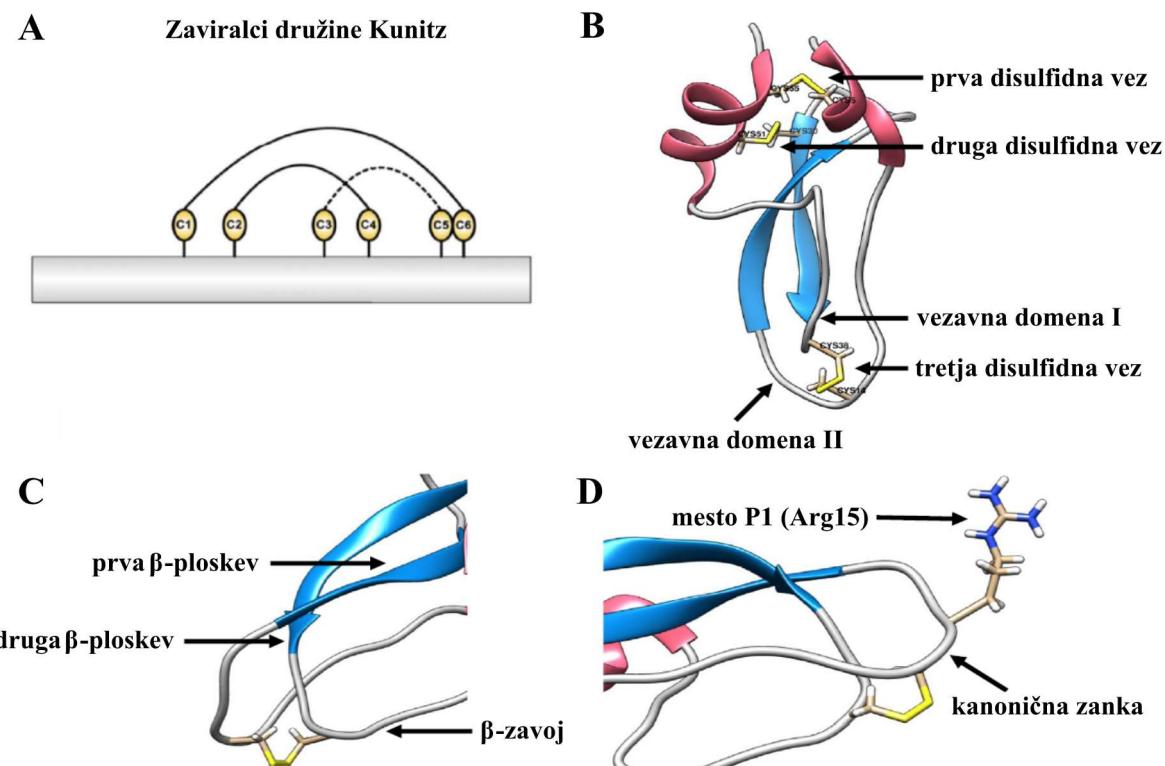
Živčno-mišični stik ali motorična ploščica je specializirano oblikovana holinergična sinapsa med končnim delom α -motoričnega nevrona in skeletnim mišičnim vlaknom (Eguchi in sod., 2020). Končni del motoričnega nevrona brez mielina omejuje Schwannova celica, za katero se je najprej predvidevalo, da ima le podporno funkcijo, danes pa je znano, da ima pomembno vlogo pri prenosu signala. Dolg mieliniziran akson motoričnega nevrona sega od ventralnega roga hrbtnega stika do živčno-mišičnega stika. Ko se približa ciljni mišici, se mieliniziran akson razdeli na 20–100 nemieliniziranih vlaken, od katerih vsako oživčuje eno mišično vlakno. Zgradbo in funkcijo motorične ploščice je mogoče preprosto morfološko razdeliti na presinaptični del, postsinaptični del in sinaptično špranjo s širino približno 50 nm. V sinaptični špranji se nahajajo različne makromolekule, ki modulirajo živčno-mišično signalizacijo. Te molekule vključujejo acetilholinesterazo (AChE), α in β -laminin ter kolagen (Bittner in Martyn, 2018). V živčni celici se sintetizira živčni prenašalec acetilholin (ACh), ki se skladišči v majhnih, približno enako velikih sinaptičnih mešičkih (Bittner in Martyn, 2018). Sinaptični mešički, nastali v telesu motoričnega nevrona, s hitrim aksonalnim transportom potujejo v živčni končič, kjer encim holin-acetyltransferaza katalizira sintezo ACh iz holina in acetil koencima A. ACh se v sinaptične mešičke transportira s pomočjo vezikularnega prenašalca za ACh. Posamezen mešiček vsebuje en kvant nevrotransmiterja ali približno 6.000 do 10.000 ACh molekul (Juel, 2019). Pri sproščanju ACh sodelujeta dve zalogi mešičkov. Ena je na voljo takoj, druga pa je rezervna. Zaloga, ki je na voljo takoj, je manjša in omejena na območje, na katerem so mešički vezani na aktivne cone na membrani in na katerem pride do povratnega odpiranja in zapiranja fuzijske pore (prehodna fuzija) ter sproščanja ACh (Guček, 2015; Bittner in Martyn, 2018). Na ta način mešiček ohrani obliko in funkcijo ter zadrži del vsebine (Guček, 2015). Rezervna zaloga vsebuje večino sinaptičnih mešičkov, ki so vezani na citoskelet iz aktina, sinapsina, sinaptotagmina in spektrina (Bittner in Martyn, 2018). Membrana mešička se v tem primeru v celoti zlije z membrano plazmaleme (popolna fuzija) (Guček, 2015). Med akcijskim potencialom zunajcelični Na^+ ioni prehajajo membrano aksona, posledična depolarizacija živčnega končiča pa povzroči odpiranje od napetosti odvisnih Ca^{2+} kanalov, zato se v živčnem končiču hitro poveča koncentracija Ca^{2+} ionov (Bittner in Martyn, 2018). Do zdaj je bilo odkritih pet različnih napetostno odvisnih Ca^{2+} kanalov (T-, L-, N-, P- in Q-kanali), med

katerimi so za kvantno sproščanje ACh odgovorni P-kanali. V končnem delu motoričnega nevrona so tudi L- in N-kanali, povezani s presinaptičnimi α_1 - oz. β_1 -adrenoreceptorji, ki olajšajo sproščanje ACh, vendar za njegovo sproščanje niso nujno potrebni (Wessler in sod., 1995; Wessler, 1996). Visoka koncentracija Ca^{2+} ionov v živčnem končiču povzroči zlivanje sinaptičnih mešičkov s presinaptično membrano in sproščanje ACh v sinaptično špranjo, ki zajema prostor med živčnim končičem in postsinaptično membrano plazmaleme mišične celice na območju živčno-mišičnega stika (Bittner in Martyn, 2018). Sledi repolarizacija motoričnega nevrona, ki jo povzroči tok K^+ ionov skozi napetostno odvisne K^+ kanale (Hawgood in Bon, 1991). ACh se nato veže na nikotinske acetilholinske receptorje (nAChR) mišičnega tipa, ki so pri vretenčarjih glavni heteropentamerni od ligandov odvisni kationski kanali, njegova vezava na receptorje pa povzroči priliv Na^+ ionov v mišično celico. Posledica tega je depolarizacija postsinaptične membrane in aktivacija od napetosti odvisnih Na^+ kanalov, nastanek akcijskega potenciala (AP) in kontrakcija mišičnega vlakna (Bittner in Martyn, 2018; Rüdiger in Straka, 2019). Ob vsakem živčnem impulzu se sprosti 100–200 kvantov ACh, ki aktivira približno 500.000 nAChR, ki so sestavljeni iz petih podenot. Vsaka podenota je povezana s štirimi transmembranskimi segmenti, ki obdajajo kanal, segmenti pa so zgrajeni iz približno 400–500 aminokislin. nAChR sintetizirajo mišične celice, na membrano postsinaptične celice pa so receptorji pritrjeni s proteinom rapsinom (Bittner in Martyn, 2018). Taka funkcionalna organizacija motorične ploščice omogoča hiter sinaptični prenos vzdraženja z zelo kratkim zamikom (manj kot 0,7 ms) (Wessler, 1996).

AChE je encim, ki je v visoki koncentraciji prisoten v sinaptični špranji. Vanjo ga izločajo mišične celice, na bazalno lamino mišičnih celic pa je pritrjen s pomočjo kolagena. Molekule ACh, ki se niso takoj vezale na nikotinski receptor in molekule ACh, ki se sprostijo z receptorja, AChE hidrolizira na holin in acetat v manj kot 1 ms. Približno 50 % sproščenega ACh je hidroliziranega na holin in acetat, preden doseže receptor. Presežek nevrotransmiterja tako zagotavlja uspešen živčno-mišični prenos. Poseben transporter prevzame holin v presinaptični živčni končič za ponovno sintezo ACh (Bittner in Martyn, 2018). Na postsinaptični membrani mišične celice lahko zaznamo tudi vsako majhno spontano depolarizacijo amplitude 0,5–1,5 mV. Ti miniaturni potenciali motorične ploščice (MPMP) so posledica spontanega zlivanja sinaptičnih mešičkov s presinaptično membrano in sproščanja enega kvanta ACh. Njihova amplituda torej predstavlja približno 1 % amplitude potenciala motorične ploščice (PMP) ob stimulaciji živca (Bittner in Martyn, 2018).

2.2 ZAVIRALCI SERINSKIH PROTEAZ V STRUPU MODRASA

Proteinski zaviralci serinskih proteaz so velika skupina večinoma relativno majhnih proteinov (Thakur in Mukherjee, 2017). Razvrščeni so v 48 družin na podlagi podobnosti aminokislinskega zaporedja, glede na tridimenzionalne strukture pa je 31 družin razvrščenih v 26 klanov. Klan sestavlja skupina družin, ki kažejo evolucijsko podobnost kljub pomanjkanju statistično pomembnih podobnosti v aminokislinskem zaporedju. Znaki daljne povezave izhajajo primarno iz linearEGA zaporedja aminokislinskih ostankov katalitičnega mesta ali terciarne strukture, občasno pa se upoštevajo tudi posebni vidiki katalitične aktivnosti, kot sta specifičnost in občutljivost zaviralca (Rawlings in Barrett, 1993). Družina govejih pankreasnih tripsinskih zaviralcev je pogosto poimenovana tudi z imenom družina Kunitz oz. BPTI, po prvem zaviralcu, ki so mu določili kristalno strukturo, govejem pankreasnem tripsinskem zaviralcu (ang. bovine pancreatic trypsin inhibitor, BPTI) (Laskowski in Kato, 1980). Družine so danes po spremembi klasifikacije peptidaznih zaviralcev poimenovane z veliko tiskano črko I, ki ji sledi zaporedna številka družine. Družino Kunitz/BPTI danes poznamo kot družino I2, ki spada skupaj z družino I52 v klan IB (Rawlings in sod., 2004). Zaviralci serinskih proteaz iz družine Kunitz/BPTI so molekule, ki najpogosteje vsebujejo 58–60 aminokislinskih ostankov, vključno s tremi disulfidnimi mostički in antiproteaznim mestom P1, ki je odgovorno za specifično zaviranje ustreznegra encima. Mesto P1 tripsinskega zaviralca zaseda pozitivno nabit aminokislinski ostanek (Arg ali Lys), pri kimotripsinskem zaviralcu pa najdemo na tem mestu velik hidrofobni aminokislinski ostanek (Leu, Phe ali Tyr), zato je ostanek na mestu P1 ključen dejavnik specifičnosti zaviralca glede na specifičen substrat serinske proteaze (Thakur in Mukherjee, 2017). Struktura zaviralcev družine Kunitz/BPTI je prikazana na sliki 1.



Slika 1: **Strukturne lastnosti zaviralcev iz družine Kunitz/BPTI.** (A) Shematski linearni prikaz zaviralca iz družine Kunitz/BPTI s tremi disulfidnimi mostički. Prva sta ključna za ohranitev izvirne konformacije, tretji (prekinjena črta) pa je odgovoren za stabiliziranje dveh vezavnih domen v zankah, ki vsebujejo reaktivno mesto. (B) Klasično zvitje zaviralca iz družine Kunitz/BPTI (krstalna struktura BPTI mutanta A16V, PDB: 1LD5). α -vijačnici sta prikazani z rdečimi trakovi, antiparalelni β -ploskvi pa z modrimi. Cys oz. tri disulfidne vezi so prikazane z rumeno barvo. (C) Vezavna domena, ki jo tvorijo končni del prve β -ploskve, β -zavoj in začetek druge β -ploskve, stabilizirana z disulfidom C3–C5. (D) Mesto P1 (Arg15), stabilizirano v kanonični zanki, ki vključuje reaktivno mesto. Slika je povzeta po de Magalhães et al., 2018.

Figure 1: **Structure of Kunitz/BPTI family inhibitors.** (A) Schematic linear representation of a Kunitz/BPTI inhibitor with three disulfide bridges. The first two are crucial for maintaining the original conformation, and the third (broken line) is responsible for stabilizing the two binding domains in loops containing the reactive site. (B) Classic Kunitz/BPTI inhibitor twist (crystal structure of BPTI mutant A16V, PDB: 1LD5). α -Helices are shown as red bars, and antiparallel β -sheets are shown as blue bars. (C) The binding domain formed by the end portion of the first β -sheet, the β -turn and the onset of the second β -sheet, stabilized by the C3–C5 disulfide bond. (D) Position P1 (Arg15) stabilized in the canonical loop involving a reactive site. The figure is adapted from de Magalhães et al., 2018.

Zaviralci serinskih proteaz so najpogosteje prisotni v strupih kač iz družine strupenih gožev (*Elapidae*) in gadov (*Viperidae*). Iz modrasovega (*Vipera ammodytes ammodytes*, *Vaa*) strupa so bili do zdaj izolirani trije proteini, ki delujejo kot zaviralci serinskih proteaz in niso

nevrotoksični. Dva sta zaviralca tripsina, VaaTi-I in VaaTi-II, tretji pa je kimotripsinski zaviralec VaaChi (Ritonja in sod., 1983c). Pozneje so iz cDNA knjižnice modrasove strupne žlez izolirali in sekvenirali tudi nukleotidne zapise novih izoblik VaaChi (Župunski in sod., 2003). Količina zaviralcev v modrasovem strupu je relativno majhna. VaaTi-I in VaaTi-II predstavlja 0,1 %, VaaChi pa 0,25 % celotnega strupa. Vsi trije zaviralci so zelo odporni na denaturacijo. Inkubacija v 8 M urei za 30 minut (min) pri temperaturi 37 °C in v območju pH 3–11 ni spremenila njihove zaviralne aktivnosti. Prav tako brez večje izgube aktivnosti prenesejo segrevanje pri 90 °C za 10 min v območju pH 3–7, vendar pa se njihova aktivnost zmanjša za 50 % v območju pH 8–11. V nevtralnem pH in raztopinah zmerne ionske jakosti oblikujejo dimere, podobno kot BPTI (Ritonja in sod., 1983c).

Aminokislinska sestava vseh treh zaviralcev iz strupa modrasa je podobna, zato so podobne tudi molekulske mase, približno 7000 Da, in izoelektrične točke (pI), pri obeh VaaTi 9,8 in pri VaaChi 10,0 (Ritonja in sod., 1983a; Ritonja in sod., 1983c). Vsi zaviralci imajo šest Cys in le en Trp, le VaaChi pa vsebuje Val. Tripsinska zaviralca lahko med seboj ločimo po vsebnosti Met, ker ga vsebuje le VaaTi-I. VaaTi imata blokirano N-končno aminokislino, medtem ko ima VaaChi na N-koncu Arg (Ritonja in sod., 1983c). Ujemanje aminokislinskega zaporedja VaaTi-I in VaaChi je približno 80-odstotno (Ritonja in sod., 1983b). Izmed 61 aminokislinskih ostankov, ki se prekrivajo med VaaTi in VaaChi, jih je različnih 12 (Ritonja in sod., 1983a). Štiri najdemo v vezavni zanki zaviralca, ki ga predstavljajo aminokislinski ostanki 11–18, in le enega na mestu 39, v vezavni domeni II, ki obsega ostanke 34–39. Različna specifičnost zaviralcev iz modrasovega strupa naj bi bila tako posledica razlike v le dveh aminokislinskih ostankih. Prva je zamenjava Lys na položaju P₁ v VaaTi z Leu v VaaChi (Ritonja in sod., 1983a). Sintetični derivat BPTI, v katerem je na položaju P₁ prav tako Leu, šibkeje zavira tripsin (Wenzel in Tschesche, 1981). Druga pomembna zamenjava je na mestu P_{2'}, kjer je v VaaChi Tyr zamenjan s His (Ritonja in sod., 1983b). V skladu s tem je disociacijska konstanta (K_i) VaaChi za tripsin ($K_i = 5,1 \times 10^{-6}$) približno tisočkrat višja kot za α-kimotripsin ($K_i = 4,3 \times 10^{-9}$ M) (Ritonja in sod., 1983a; Ritonja in sod., 1983c). VaaTi-I in VaaTi-II močno zavirata tripsin ($K_i = 3,4 \times 10^{-10}$ M oz. $K_i = 5,6 \times 10^{-10}$ M), v nasprotju z VaaChi, ki močno zavira kimotripsin ($K_i = 4,3 \times 10^{-9}$ M) (Ritonja in sod., 1983c). Poleg tega VaaTi zavirata, čeprav šibkeje, tudi α-kimotripsin, plazmin, človeški plazemski kalikrein in prašičji kalikrein trebušne slinavke. VaaChi ima ožjo specifičnost in poleg močnega zaviranja α-kimotripsina šibko zavira le tripsin in človeški plazemski kalikrein (Ritonja in sod., 1983b). Primerjava aminokislinskega

zaporedja VaaTi-I in VaaChi z zaporedji zaviralcev iz strupov drugih kač in BPTI je prikazana na sliki 2. Med VaaChi in zaviralci iz strupa pljuvajoče ovratničarke (*Hemachatus haemachatus*), Russelovega gada (*Vipera russelli*), kapske kobre (*Naja nivea*) in črne mambe (*Dendroaspis polylepis polylepis*) je identičnih 56–63 % aminokislinskih ostankov. Ujemanje aminokislinskega zaporedja med VaaChi oz. VaaTi-I in BPTI je približno 43-odstotno (Ritonja in sod., 1983b). Primerjava aminokislinskih ostankov VaaChi z BPTI znotraj vezavne domene I kaže ujemanje le treh ostankov, v vezavni domeni II pa jih je enakih kar pet od šestih (Ritonja in sod., 1983a). Nezmožnost VaaChi, da zavira prašičji kalikrein trebušne slinavke, je v skladu z odsotnostjo bazičnih aminokislinskih ostankov v njegovem zaporedju na ključnih mestih, nujnih za interakcijo z encimom. Potreben je bazičen aminokislinski ostanek na mestu 15 in dva (izjemoma eden na mestu 17) bazična aminokislinska ostanka na mestu 17, 19 ali 39 (Wachter in sod., 1980). Kot lahko vidimo na sliki 2, je v VaaChi prisoten le bazični ostanek (Arg) na mestu 15.

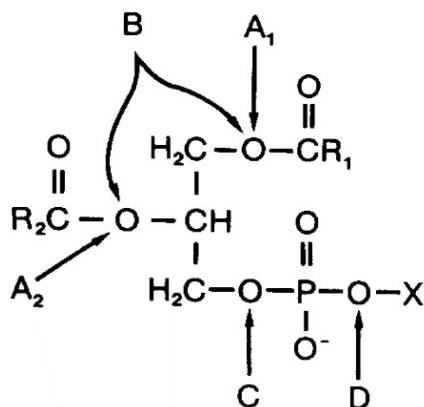
| | P ₂ P ₁ P ₁ 'P ₂ ' | |
|------------|--|----|
| a) VaaTi-I | QDHPKFCYLPADPGRCKAHI PRFYYDSASNKCNKFIYGGCPGNANNFKTWDECRCQTCGASA--- | 61 |
| b) NNV-II | --RPRFCELPATGLCKARI RFSFHYNRAAQOCLEFIYGGCGGNANRFKTIDECHRTCVG----- | 57 |
| c) HHV-II | --RPDFCELPATGLCKAYI RFSFHYNLAQQCLQFIYGGCGGNANRFKTIDECRRTCVG----- | 57 |
| d) BF-IX | KNRPTFCNLLPETGRCNALI PAFYYNSHLHKCQKFNYGGCGGNANNFKTIDEQORTCAAKYGRSS | 65 |
| e) VaaChi | RDRPKFCYLPADPGRCLAYMPRFYYNPASNKCEKFIFIYGGCRGNANNFKTWDECRCRTCVASG1QPR | 65 |
| f) RS-II | HDRPTFCNLAPESGRCRGHLRRIYYNLESNKCKVFFYGGCGGNANNFETRDECRCETCGGK----- | 60 |
| g) DPP-E | LQHRTFCKLPAEPGPCKASI PAFYYNWAAKKCQLFHYGGCKGNANRFSTIEKCRHACVG----- | 59 |
| h) BPTI | --RPDFCLEPYTGPCKARI IRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTC CGGA----- | 58 |
| | : * * * * . : .*: * * * * * . : *.*.: :.* . :* . | |

Slika 2: Primerjava aminokislinskega zaporedja VaaTi-I in VaaChi z zaporedjem zaviralcev iz strupov drugih kač in z BPTI. a) VaaTi-I, *Vipera ammodytes ammodytes* (P00991); b) NNV-II, *Naja nivea* (P00986); c) HHV-II, *Hemachatus haemachatus* (P00985); d) BF-IX, *Bungarus fasciatus* (P25660); e) VaaChi, *Vipera ammodytes ammodytes* (0909196A); f) RS-II, *Vipera russelli* (P00990); g) DPP-E, *Dendroaspis polylepis polylepis* (P00984); in h) BPTI, *Bos taurus* (P00974). Slika je povzeta po Ritonja in sod., 1983b.

Figure 2: Comparison of the amino acid sequences of VaaTi-I and VaaChi with the sequences of other snake venom inhibitors and BPTI. a) VaaTi-I, *Vipera ammodytes ammodytes* (P00991); b) NNV-II, *Naja nivea* (P00986); c) HHV-II, *Hemachatus haemachatus* (P00985); d) BF-IX, *Bungarus fasciatus* (P25660); e) VaaChi, *Vipera ammodytes ammodytes* (0909196A); f) RS-II, *Vipera russelli* (P00990); g) DPP-E, *Dendroaspis polylepis polylepis* (P00984); and h) BPTI, *Bos taurus* (P00974). The figure is adapted from Ritonja et al., 1983b.

2.3 FOSFOLIPAZE (PL)

Beljakovine v strupu številnih kač povzročajo pri živalih nevrotoksične učinke. Nevrotoksične beljakovine iz modrasovega strupa pripadajo encimski družini fosfolipaz (PL) (Križaj, 2011). PL hidrolizirajo estrske vezi v fosfolipidih. Skoraj vse imajo tudi drugo lastnost, in sicer so aktivnejše na agregiranem substratu nad kritično micelarno koncentracijo fosfolipidov. PL se razlikujejo glede na mesto delovanja na fosfolipidu, glede na način in tudi regulacijo delovanja. PL glede na mesto delovanja delimo na fosfolipaze: A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂), B (PLB), C (PLC) in D (PLD), kar je prikazano na sliki 3. PL iz modrasovega strupa uvrščamo med sekretorne PLA₂ (sPLA₂) (Wilton in Waite, 2002).



Slika 3: **Razvrstitev PL glede na mesto delovanja na molekuli fosfoglicerida.** Fosfolipaze A (PLA) so acilne hidrolaze, razvrščene glede na hidrolizo 1-acil estra (PLA₁) ali 2-acil estra (PLA₂). PL, ki lahko katalizirajo hidrolizo obeh acilnih skupin se imenujejo fosfolipaze B (PLB). Cepitev glicerofosfatne vezi katalizirajo fosfolipaze C (PLC), odstranitev bazne skupine pa katalizirajo fosfolipaze D (PLD). PLC in PLD so torej fosfodiesteraze. S puščico so označene vezi, ki jih cepijo različni tipi PL. Slika je povzeta po Wilton in Waite, 2002.

Figure 3: **Classification of PL according to the site of action on the phosphoglyceride molecule.** Phospholipases A (PLA) are acyl hydrolases classified according to their hydrolysis of the 1-acyl ester (PLA₁) or the 2-acyl ester (PLA₂). The PL that catalyse the hydrolysis of both acyl groups are called phospholipases B (PLB). Cleavage of the glycerophosphate bond is catalysed by phospholipases C (PLC), while removal of the base group is catalysed by phospholipases D (PLD). PLC and PLD are therefore phosphodiesterases. The arrows indicate the bonds cleaved by different types of PL. The figure is adapted from Wilton and Waite, 2002.

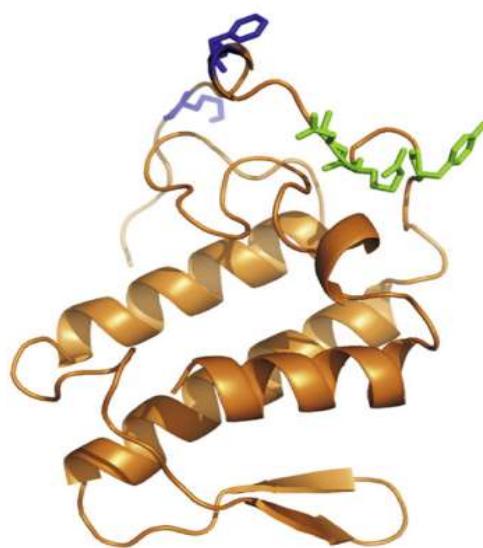
2.3.1 Sekretorne fosfolipaze A₂ (sPLA₂)

sPLA₂ najdemo v strupu različnih vrst kač, škorpijonov, pankreasnem soku, sinovialni tekočini artritičnih sklepov in številnih drugih tkivih sesalcev. Zanje je značilna nizka molekulska masa (13–15 kDa), diada His/Asp v katalitičnem mestu encima, Ca²⁺ vezavna zanka in tudi od šest do osem ohranjenih disulfidnih vezi. Katalizirajo hidrolizo prek mehanizma odvzema protona iz molekule vode, ki mu sledi nukleofilni napad vezi *sn*-2. Molekulo vode aktivira katalitična diada v odvisnosti Ca²⁺ ionov (Burke in Dennis, 2009). Za encimsko katalizo so torej nujno potrebni Ca²⁺ ioni v mikromolarni koncentraciji, hidroliza substrata pa je učinkovita le v območju pH 7–9. Na podlagi strukturnih značilnosti sPLA₂ razdelimo v skupine I–XI (Wilton in Waite, 2002). sPLA₂ iz kačjih strupov spadajo v skupino II, ki se prav tako deli na manjše skupine IIA–F. Za skupino IIA sPLA₂ je značilno podaljšanje C-končnega dela proteina in sedem disulfidnih mostičkov. V to skupino spadajo tudi sPLA₂ iz strupov različnih kač, tudi modrasovega (Wilton in Waite, 2002). Kodirajo jih večgenske družine, kar razloži prisotnost številnih izoencimov sPLA₂ z različnimi farmakološkimi aktivnostmi. sPLA₂ v skupini II imajo skupen evolucijski izvor, kar je razvidno iz strukture njihovih genov, saj kažejo obsežno ohranitev nekodirajočih delov genov, vključno z vsemi zaporedji intronov. V nasprotju z nekodirajočimi regijami so zreli eksoni, ki kodirajo beljakovine, zelo raznovrstni. Do raznovrstnosti med večgenskimi družinami sPLA₂ je najverjetneje prišlo zaradi hitre prilagoditve kač za obrambo in plenjenje širokega spektra različnega plena, ki vključuje tako žuželke, ribe, dvoživke in plazilce kot tudi sesalce. Njihov evolucijski razvoj je mogoče razložiti s procesom ponavljanja se podvajanja genov od prednike enotne prebavne sPLA₂ do njenih številnih vse raznovrstnejših miotoksičnih in nevrotoksičnih oblik (Križaj, 2011).

2.3.2 Amoditoksini (Atx)

Atx so nevrotoksične sPLA₂, ki vsebujejo vse strukturne elemente, značilne za skupino IIA (Križaj, 2011). V strupu modrasa najdemo tri izoblike, sestavljene iz 122 aminokislin: AtxA, AtxB in AtxC. Doza AtxA, ki povzroči smrt pri polovici miši (LD₅₀), je 20 µg/kg oz. ~0,4 µg/povprečno težo miši. Druga dva Atx sta 17- oz. 28-krat manj toksična kot AtxA (Prijatelj in sod., 2006; Pungerčar in sod., 2011). V primarni strukturi se med seboj razlikujejo le v dveh oz. treh aminokislinah. AtxC je tako dvojna mutanta (F124I/K128E), AtxB pa trojna mutanta (Y115H/R118M/N119Y) izoblike AtxA. Tridimensionalna struktura AtxA je prikazana na

sliki 4. Razlika v dveh aminokislina med AtxA in AtxC ne povzroči pomembnih strukturnih sprememb, kar kaže, da so razlike v toksičnosti obeh izooblik posledica spremembe v površinskem ujemanju toksina in njegovega receptorja (Saul in sod., 2010). Atx so zelo bazični proteini s pI 10,2 (AtxA), 10,0 (AtxB) in 9,17 (AtxC) (Pungerčar in sod., 2011;). Poleg Atx sta v strupu modrasa tudi netoksični sPLA₂, imenovani amoditin I₁ in I₂ (AtnI₁/I₂), z 68-odstotnim ujemanjem aminokislinskega zaporedja z Atx. Prisoten je tudi miotoksičen encimsko neaktivnen homolog sPLA₂, imenovan amoditin L (AtnL), s 74-odstotnim ujemanjem aminokislinskega zaporedja z Atx (Brgles in sod., 2014).



Slika 4: **Tridimenzionalna struktura AtxA.** Z zeleno so obarvane tri aminokisline, ki ločijo AtxB od AtxA (Y115H/R118M/N119Y), z modro pa sta obarvani aminokislini, ki ločita AtxC od AtxA (F124I/K128E). Slika je povzeta po Križaj, 2011.

Figure 4: **The three-dimensional structure of AtxA.** The three amino acid residues displayed in green differentiate AtxB from AtxA (Y115H/R118M/N119Y) and the two amino acid residues displayed in blue differentiate AtxC from AtxA (F124I/K128E). The figure is adapted from Križaj, 2011.

Atx lahko pridobimo na dva načina: iz kačjega strupa in s sintezo s pomočjo metode rekombinantne DNA. Poleg modrasovega strupa so Atx našli tudi v strupu laškega gada (*Vipera aspis aspis*) v jugovzhodni Franciji in pri drugi podvrsti modrasa (*Vipera ammodytes meridionalis*) (Križaj, 2011). Količina proteinov, ki jo lahko pridobimo iz strupa odraslega modrasa pri enkratnem odvzemu, je 15–45 mg. Količina pridobljenih Atx iz takega strupa se bistveno razlikuje med različnimi populacijami kač in lahko presega 10 % celotnih beljakovin

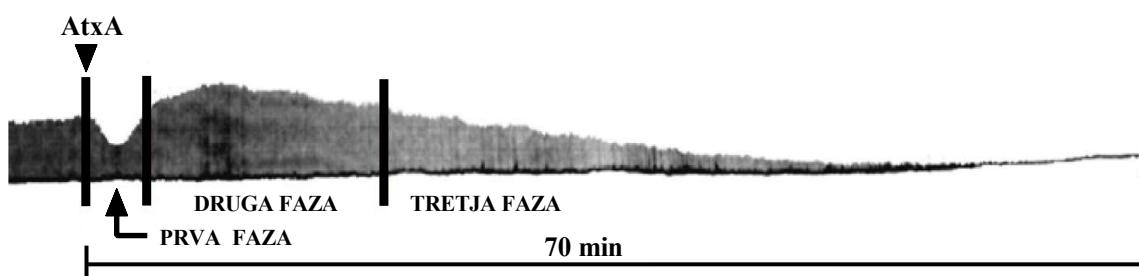
strupa (Halassy in sod., 2010). Njihova vsebnost je odvisna tudi od letnega časa, saj lahko v zimskem času iz strupa popolnoma izginejo (Gubešek in sod., 1974). Za pridobivanje večjih količin Atx se zato uporablja metoda izražanja rekombinantnih proteinov. Pri metodi pridobitve rekombinantnega AtxA iz bakterij *Escherichia coli* se ta proizvaja kot fuzijski protein v obliki netopnih inkluzijskih teles (Križaj, 2011). Po ponovnem zvitju proteina in omejeni hidrolizi s pomočjo encima tripsina je mogoče pridobiti popolnoma aktivni AtxA, ki se po encimski aktivnosti in toksičnosti ne razlikuje od naravnega toksina. Celotni izkoristek tako pridobljenega toksina znaša med 0,7 in 6 mg na liter bakterijske kulture (Križaj, 2011).

2.3.2.1 Vpliv Atx na živčni sistem

Najizrazitejši učinek Atx pri sesalcih je nevrotoksičnost (Križaj, 2011). V kar 16 % obravnavanih primerov ugrizov na jugu Hrvaške v 21 letih so se pri 542 žrtvah pojavili nevrotoksični učinki. Izraženi so bili v obliki spuščene veke, motnje požiranja, hripavosti, paralize očesnih mišic ali živčno-mišične oslabelosti. Atx delujejo kot presinaptični nevrotoksini, tako da presinaptično zavirajo živčno-mišični prenos signala v motorični ploščici predvsem perifernih holnergičnih motoričnih nevronih vretenčarjev (Križaj, 2011; Brgles in sod., 2014). Njihov nevrotoksični učinek na presinaptične nevrone je povezan s postopnim zaviranjem sproščanja sinaptičnih mešičkov z ACh iz živčnih končičev v sinaptično špranjo, kar privede do popolnega in nepovratnega zavrtja živčno-mišičnega prenosa. (Križaj, 2011; Vardjan in sod., 2013). Natančnejši mehanizem delovanja še ni poznan. Z ugrizom kače se Atx vnesejo v periferno tkivo plena na mestu ugriza in v normalnih pogojih zaradi svoje velikosti krvno možgansko bariero prehajajo le v zelo majhnih količinah. Pri neposredni aplikaciji v osrednji živčni sistem so prav tako zelo toksični, saj AtxA po intracerebroventrikularni aplikaciji pri miših (*Mus musculus*) povzroči napade s krči. Nevrotoksična aktivnost AtxA je odvisna od njegove fosfolipazne aktivnosti, saj njegov miotoksični neencimski homolog AtnL ne učinkuje na osrednji živčni sistem (Križaj, 2011).

Pri poskusih na živčno-mišičnem preparatu hemidiafragme miši je ob prisotnosti Atx primarno zavrta posredno izzvana mišična kontrakcija, medtem ko pri neposredno izzvani mišični kontrakciji ne pride do statistično značilnih razlik (Priatelj in sod., 2006; Križaj, 2011). Vsi trije Atx delujejo presinaptično in zavirajo izključno posredno izzvano mišično kontrakcijo. To dejstvo potrjuje membranski potencial v mirovanju, ki po popolnem zavrtju mišične kontrakcije

na živčno-mišičnem preparatu ostane nespremenjen in popolno odziven na neposredno stimulacijo. AtxA povzroči največje, AtxC manjše in AtxB najmanjše zavrtje posredno izzvane kontrakcije na živčno-mišičnem preparatu. Odziv pri posredno izzvanih kontrakcijah ob prisotnosti Atx je trifazen (slika 5). Prva faza – prehodno zaviranje sproščanja nevrotransmiterja ACh se začne kmalu po dodatku Atx in traja nekaj min (Križaj, 2011). Sledi druga faza – povečanje sproščanja ACh in povečanje moči mišične kontrakcije v primerjavi s kontrolo, ki doseže vrh 10–20 min po aplikaciji toksina. V tretji fazi se sproščanje ACh zmanjšuje in privede do popolnega nepovratnega zavrtja živčno-mišičnega prenosa in paralize (Fathi in sod., 2011; Križaj, 2011). Enake značilnosti kažejo tudi meritve MPMP. Frekvanca MPMP v popolnoma paraliziranem preparatu in preparatu, ki ni bil izpostavljen toksinu, je statistično popolnoma enaka. To pomeni, da se kljub preprečenemu živčno-mišičnemu prenosu zaradi delovanja Atx, spontano sproščanje sinaptičnih mešičkov z ACh še vedno pojavlja, in da mehanizem, ki je odgovoren za polnjenje mešičkov z ACh, ob delovanju Atx ni prizadet. Nevrotoksični učinek je temperaturno odvisen. Trifazni učinek, opazen na živčno-mišičnem preparatu, je prisoten pri 37 °C, ne pa pri sobni temperaturi (23 °C), in to kljub doseženemu končnemu zavrtju kontrakcije. Zaviranje sproščanja nevrotransmiterja v prvi fazi je verjetno odvisno od encimske aktivnosti Atx in specifične vezave toksina na presinaptično membrano, na kateri obstaja več potencialnih vezavnih receptorjev za Atx. Eksperimentalni dokazi kažejo, da za povečanje sproščanja ACh v drugi fazi odziva na mišjem živčno-mišičnem preparatu ni odgovorna fosfolipazna aktivnost Atx. Predvidevalo se je, da je za povečano sproščanje ACh v tej fazi odgovorna interakcija Atx z napetostno odvisnimi K⁺ kanali, vendar ionski tokovi skozi mišje, podganje in človeške napetostno odvisne K⁺ kanale (mK_v1.1, rK_v1.2, mK_v1.3, hK_v1.5 in mK_v3.1) pri meritvah niso bili spremenjeni. Tretja faza odziva je odvisna od hidrolizne aktivnosti toksina, vendar za zdaj ni dokazane povezave med letalnostjo izooblike Atx in hitrostjo katalize (Križaj, 2011).



Slika 5: Trifazni odziv živčno-mišičnega preparata mišje hemidiaphragme pri posredno izvvani mišični kontrakciji po aplikaciji Atx. Do popolnega zavrtja mišične kontrakcije pride v približno 1 uri od aplikacije 10 mg/mL AtxA. Slika je povzeta po Križaj, 2011.

Figure 5: Tri-phasic response of the indirectly stimulated neuromuscular preparation of mouse hemidiaphragm after Atx application. The complete arrest of muscle twitching occurred approximately 1 hour after application of 10 mg/mL AtxA. The figure is adapted from Križaj, 2011.

Subpopulacijo nevronskega oz. N-tipa sPLA₂ receptorja predstavljajo še nedoločeni proteini, ki so veliki 18–24, 36–51 in 85 kDa in so najverjetnejši kandidati za specifične Atx receptorje na živčni celici ter odgovorni za nevrotoksičnost (Križaj, 2011). Nevronska izooblika M-tipa sPLA₂ receptorja (R180) je bila prav tako določena kot receptor z visoko afiniteto za Atx v nevronskih plazemskih membranah, vendar ta receptor ni bistven za nevrotoksičnost AtxA (Saul in sod., 2010; Križaj, 2011). Poleg proteinskih so bili na presinaptičnih membranah odkriti tudi specifični ne-proteinski receptorji, katerih nevrotoksična funkcija še ni popolnoma pojasnjena (Križaj, 2011). Prav tako je bila potrjena visoko-afinitetna interakcija med Atx in znotrajceličnim proteinom kalmodulinom, evolucijsko zelo ohranjeno molekulo, ki se nahaja v citosolu vseh evkariontskih celic (Križaj, 2011). Kalmodulin sodeluje pri različnih oblikah membranskega transporta in v številnih drugih regulacijskih procesih v celici. Zaradi vpletenosti v te procese bi bil popolna tarča za toksin, za katerega je znano, da zavira sproščanje sinaptičnih mešičkov (Šribar in sod., 2001). Dokazano je, da AtxA v kompleksu s kalmodulinom postane bolj stabilen in encimsko aktivен, še posebej v redukcijskem okolju, kot je citosol (Kovačič in sod., 2009 in 2010). Potrjena je tudi interakcija Atx z evolucijsko zelo ohranjenima izooblikama proteinov 14-3-3 γ in 14-3-3 ϵ , ki se prav tako nahajata v citosolu in jedru evkariontskih celic (Križaj, 2011; Bergles in sod., 2014;). Biološka aktivnost Atx v citosolu evkariantske celice je bila dokazana z uporabo celic kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. AtxA, heterologno izražen v citosolu celice, specifično zavre celični cikel v fazi G2 zaradi vezave toksina na 14-3-3 γ protein, ki v procesu sodeluje. AtxA, izražen v celicah kvasovk, prav tako za približno 50 % zmanjša hitrost endocitoze. Prvi ugotovljeni znotrajcelični membranski receptor za vezavo sPLA₂ je visoko-afinitetni mitohondrijski membranski vezavni protein R25, ki skupaj z drugimi tremi znotrajceličnimi proteini postavlja dvom o izključno zunajceličnem delovanju sPLA₂. Fosfolipazno aktivnost Atx v citosolu evkariantske celice je tako še vedno treba neposredno dokazati *in vivo*. Glavni izziv je identifikacija presinaptičnih membranskih receptorjev za vezavo Atx, ki so pomembni pri nevrotoksičnosti. Ti so pomembni

za razumevanje mehanizma delovanja in pri razvoju terapije (poleg imunoterapije), ki bi bila učinkovita pri ugrizu modrasa (Križaj, 2011).

2.3.2.2 Citotoksičnost amoditoksinov

Atx imajo največji učinek na motorične nevrone. Pred zastojem dihanja poskusne živali po intraperitonealni aplikaciji AtxA je na elektronsko mikroskopskih slikah preponskega živca (*nervus phrenicus*) opazno otekanje mitohondrijev v živčnem končiču in Ω -invaginacije aksoleme. Na živcu, pridobljenem po zastoju dihanja poskusne živali, je opazno zelo majhno število sinaptičnih mešičkov v živčnem končiču, mitohondriji pa so otekli in njihova citoplazma vakuolizirana (Logonder in sod., 2008; Križaj, 2011). Mišična vlakna, fibrocyti, Schwannove celice in mielinizirani aksoni v nobenem primeru niso bili prizadeti. AtxA je prav tako dokazano citotoksičen za mišjo NCS34-motonevronske celično linijo v kulturi. Citotoksičnost je posledica apoptoze, najverjetneje zaradi mehanizma vmešavanja toksina v napredovanje celičnega ciklusa, opaženega v študiji na celicah kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*, kjer heterologno izražen toksin v citosolu celice specifično zavira zaustavitev celičnega cikla v fazi G2. Citotoksični in apoptotični učinki niso bili opaženi v človeških embrionalnih epitelijskih ledvičnih (HEK293) ali mišjih mioblastnih (C2C12) celicah (Križaj, 2011).

2.3.2.3 Strukturna osnova nevrotoksičnosti Atx

Tako imenovano nevrotoksično mesto na molekuli AtxA je razpršeno po vsej molekuli, kar kaže, da so različni deli molekule vključeni v različne faze večstopenjskega procesa nevrotoksičnosti. C-končna regija AtxA je zelo pomembna, vendar pri nevrotoksičnosti prav tako sodeluje kombinacija hidrofobnih in bazičnih aminokislin na mestu 115–124, Phe na mestu 24 ter aminokislini Met in Gly na mestih 7 in 11 N-končnega dela toksina. Nekaj aminokislin, ki vplivajo na nevrotoksičnost, je prav tako na vezavni površini toksina, zato mutacije, ki vplivajo na nevrotoksičnost, prav tako vplivajo na njegovo encimsko aktivnost (Križaj, 2011).

2.3.3 Kompleksi med sPLA₂ in drugimi proteini v kačjih strupih

Kače strupe sestavljajo pretežno proteini. Modrasov strup na primer vsebuje več kot 50 različnih proteinov, ki jih lahko razvrstimo v 16 družin (Leonardi in sod., 2019). Posamezni proteini lahko v strupu med seboj tvorijo komplekse, posledice pa so lahko njihovo

spremenjeno delovanje, učinek in tudi toksičnost. Kompleksi med sPLA₂ in drugimi molekulami v strupu lahko nastanejo s kovalentnimi, večinoma pa z nekovalentnimi interakcijami (Brgles in sod., 2014). Primer kovalentnega heterodimera je β -bungarotoksin, izoliran iz strupa tajvanskega progastega krajta (*Bungarus multicinctus*). Tvorita ga različni podenoti, ki sta povezani z disulfidnim mostičkom. Prva je sPLA₂, druga pa zaviralec serinske proteaze Kunitzovega tipa, vendar nobena od podenot sama ne zadostuje za ohranitev aktivne konformacije in nevrotoksičnega učinka (Chu in sod., 1994). Primer dveh različnih molekul sPLA₂, nekovalentno povezanih v kompleks, je vipoksin v strupu modrasa (*Vipera ammodytes meridionalis*). Nekovalentni kompleks treh različnih molekul sPLA₂ najdemo v strupu obalnega tajpana (*Oxyuranus scutellatus scutellatus*). Tudi v strupu Russelovega gada (*Daboia russelii*) najdemo trimerni kompleks, imenovan reprotoxin, ki ga sestavljajo sPLA₂, serinska proteaza in tripsinski zaviralec. Kompleks petih različnih sPLA₂ pa je prisoten v strupu rjave kače (*Pseudonaja textilis*) (Brgles in sod., 2014). Strup teksaške koralne kače (*Micruurus tener tener*) pri ugrizu povzroči intenzivno in neprekinjeno bolečino zaradi vzdraženja številnih senzoričnih nevronov. Protein iz strupa omenjene kače MitTx je sestavljen iz heterodimernega kompleksa med zavircem serinske proteaze Kunitzovega tipa in sPLA₂, ki sta nekovalentno povezana. Kompleks ima toksični učinek, čeprav ga posamezni komponenti kompleksa nimata. Kompleks deluje kot močen, obstojen in selektiven agonist kislinskih ionskih kanalov (ang. acid-sensing ion channels, ASICs) in ima enak ali večji učinek v primerjavi s kislim pH (Bohlen in sod., 2011).

2.3.3.1 Kompleks med AtxA in VaaChi

Brgles in sod. (2014) so iz strupa modrasa z uporabo imunoafinitetne kromatografije izolirali Atx in pokazali, da tvorijo nekovalentni kompleks z VaaChi. Specifično interakcijo med Atx in VaaChi so dokazali tudi z metodo površinske plazmonske resonance (SPR), pri kateri so AtxA vezali na čip s pomočjo imobiliziranih protiteles proti Atx. Pripravili so tudi zmesi AtxA in VaaChi v razmerju 1 : 1 in 1 : 4 ter njihov fiziološki vpliv testirali na miših. Medtem ko VaaChi ni imel toksičnega učinka, sta bili zmesi bolj toksični od samega AtxA. Razlik v toksičnosti med zmesema stehiometrije 1 : 1 in 1 : 4 ni bilo. Določili so, da je medsebojna afiniteta AtxA in VaaChi nizka, tako da tvorita kompleks šele v mikromolarnem koncentracijskem območju (Brgles in sod., 2014). Čeprav so pri testiranjih na miših ključna toksična komponenta modrasovega strupa prav Atx, njihova nevtralizacija s specifičnimi

protitelesi ne povzroči nevtralizacije toksičnosti celotnega strupa (Kurtović in sod., 2012). Možno je, da Atx tvorijo komplekse z drugimi proteini v strupu, kar zakrije epitope in vpliva na njihovo dostopnost za protitelesa (Brgles in sod., 2014).

2.4 MEHANIZEM VSTOPA Atx in VaaChi V ŽIVČNI KONČIČ

Mehanizem vstopa Atx in VaaChi v živčni končič in pot do mesta delovanja v nevronu še nista pojasnjena. Teoretični modeli vstopa Atx vključujejo različne poti, pri čemer naj bi imeli ključno vlogo do zdaj še nedoločeni posebni znotrajcelični in zunajcelični receptorji (Križaj in Gubenšek, 2000). Modeli zajemajo endocitozo posredovano preko kaveol ali potocitozo, konstitutivno endocitozo, od klatrina neodvisno endocitozo in s klatrinom posredovano endocitozo (Križaj in Gubenšek, 2000). Predvidevalo se je, da je za presinaptično nevrotoksično delovanje AtxA potrebna interakcija z receptorji PLA₂ tipa M, vendar se je pozneje izkazalo, da ta ni nujno potrebna (Petan in sod., 2005). Obstaja tudi možnost več alternativnih mehanizmov vnosa istega toksina v živčni končič. Več načinov vnosa je prav tako evolucijsko koristno, saj povečuje farmakološko učinkovitost toksina (Križaj in Gubenšek, 2000).

2.5 DENDROTOKSINI (DTx)

DTx so majhne farmakološko aktivne beljakovine, ki so jih leta 1980 prvič izolirali iz strupa vzhodnoafriške zelene mambe (*Dendroaspis angusticeps*) (Harvey in Karlsson, 1980). V strupu te kače so štirje homologni toksični polipeptidi α-, β-, γ- in δ-DTx, v strupu zahodnoafriške zelene mambe (*Dendroaspis viridis*) je toksin Dv14 ter v strupu črne mambe (*Dendroaspis polylepis*) toksina DTx-I in DTx-K (Strydom, 1973; Harvey in Karlsson, 1982; Mehraban in sod., 1986; Benishin in sod., 1988). Iz morske vetrnice (*Anemonia sulcata*) so izolirali še tri homologe DTx, ki jih imenujemo kalikludin 1, 2 in 3 (Schweitz in sod., 1995). Vsi DTx in njihovi homologi so sestavljeni iz 57–60 aminokislinskih ostankov, vključno s šestimi Cys, ki tvorijo tri disulfidne mostičke (Strong PN, 1990; Harvey, 2001). DTx so zelo podobni zaviralcem serinskih proteaz tipa Kunitz, vendar imajo v primerjavi z njimi le šibko sposobnost zaviranja tripsina, kimotripsina in drugih serinskih proteaz (Dufton in Harvey, 1998; Harvey, 2001). Slika 6 prikazuje primerjavo primerjavo primarne strukture α-dendrotoksina (αDTx) z VaaChi in BPTI. Pomembna lastnost DTx je sposobnost zaviranja od napetosti odvisnih K⁺ kanalov

družine K_v1. K⁺ kanali so izjemno pomembni za vzdražljivost živcev in mišic ter veljajo za najbolj raznovrstno skupino ionskih kanalov. Od napetosti odvisne K⁺ kanale najverjetneje zavirajo v presinaptičnem živčnem končiču, kar pa ni lastnost zaviralcev serinskih proteaz (Harvey in Anderson, 1985; Tricaud in sod., 2000; Harvey, 2001). DTx se specifično vežejo na K⁺ kanale v osrednjem živčnem sistemu, kjer je veliko sinaps, tj. v neokorteksu, talamusu, srednjih in malih možganih ter perifernem živčnem sistemu (Balant, 2009). Vezava DTx na K⁺ kanale ni odvisna od koncentracije zunajceličnih Ca²⁺ ionov (Strong, 1990).

| | | |
|-----------|--|----|
| a) BPTI | --RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA----- | 58 |
| b) αDTx | QPRRKLCILHRNPGRCYDKIPAFYYNQKKQCERFDWSGCGGNSNRFKTIEECRRTCIG----- | 59 |
| c) VaaChi | RDRPKFCYLPADPGRCLAYMPRFYYNPASNKCEKFIYGGCRGNANNFKTWDECRTVASGIQPR * . :* * * : :*: *: * :.*. : *.*: :* :** . | 65 |

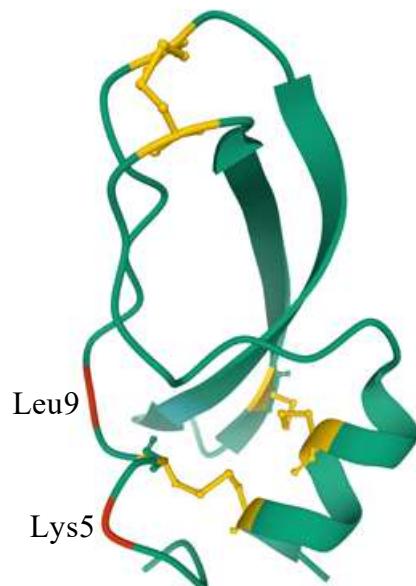
Slika 6: Primerjava primarne strukture αDTx z VaaChi in BPTI. a) BPTI, *Bos taurus* (P00974); b) αDTx, *Dendroaspis angusticeps* (P00980); in c) VaaChi, *Vipera ammodytes ammodytes* (0909196A). Aminokisline, ki so v vseh zaporedjih na istem mestu, so označene z zvezdico v vrstici pod vsemi zaporedji. Položaji v sekvenkah, ki vsebujejo konzervativne zamenjave so označeni z dvopičjem (:), medtem ko so položaji polkonzervativnih in nekonzervativnih zamenjav označeni s pikom (.) oz. praznim poljem ().

Figure 6: Comparison of the primary structure of αDTx with VaaChi and BPTI. a) BPTI, *Bos taurus* (P00974); b) αDTx, *Dendroaspis angusticeps* (P00980); and c) VaaChi, *Vipera ammodytes ammodytes* (0909196A). Amino acids present at the same position in all sequences are designated by an asterisk. Positions in sequences harbouring conservative substitutions are designated by a colon (:), while positions of semi-conservative and non-conservative substitutions are marked by a period (.) or with an empty field, respectively.

2.5.1 α-dendrotoksin (αDTx)

αDTx sestavlja 59 aminokislin s tremi disulfidnimi vezmi na mestih C7–C57, C16–C40 in C32–C53 (Belva in sod., 200). Identičnost zaporedja med BPTI in αDTx je ~37-odstotna, njuni funkcionalni mesti pa sta na topografsko nasprotnih regijah proteina. Področje BPTI, ki ga imenujemo tudi »protiproteazno mesto«, vsebuje ostanke Pro13, Lys15, Arg17, Ile19 in Arg39 in je na vrhu strukture BPTI, medtem ko je funkcionalno mesto αDTx na nasprotnem koncu proteina. Funkcionalno mesto αDTx vključuje šest glavnih aminokislinskih ostankov, ki so v N-končnem delu αDTx in so pomembni za vezavo na K⁺ kanal, najpomembnejša med njimi pa sta Lys5 in Leu9 (Skarzynski, 1992; Gasparini in sod., 1998). Aminokislinski ostanek na mestu 18, ki meji na Tyr17, ima pomembno vlogo pri zmanjšanju sposobnosti zaviranja aktivnosti serinskih proteaz z αDTx. Zaviralci tripsina homologni BPTI imajo na tem mestu aminokislino

Ala ali Gly (tudi VaaChi), pri α DTx pa je na tem mestu Asp (Skarzynski, 1992). Kristalna struktura α DTx je prikazana na sliki 7. Molekula α DTx je v nevtralnem pH pozitivno nabita, vendar je razporeditev naboja zelo asimetrična (Skarzynski, 1992).



Slika 7: Kristalna struktura α DTx (PDB: 1DTX). Za zaviranje K^+ kanalov sta ključna aminokislinska ostanka Lys5 in Leu9, obarvana z rdečo barvo. Cys oz. tri disulfidne vezi, ki stabilizirajo strukturo, so prikazane z rumeno barvo. Avtorica slike je doc. dr. Adrijana Leonardi.

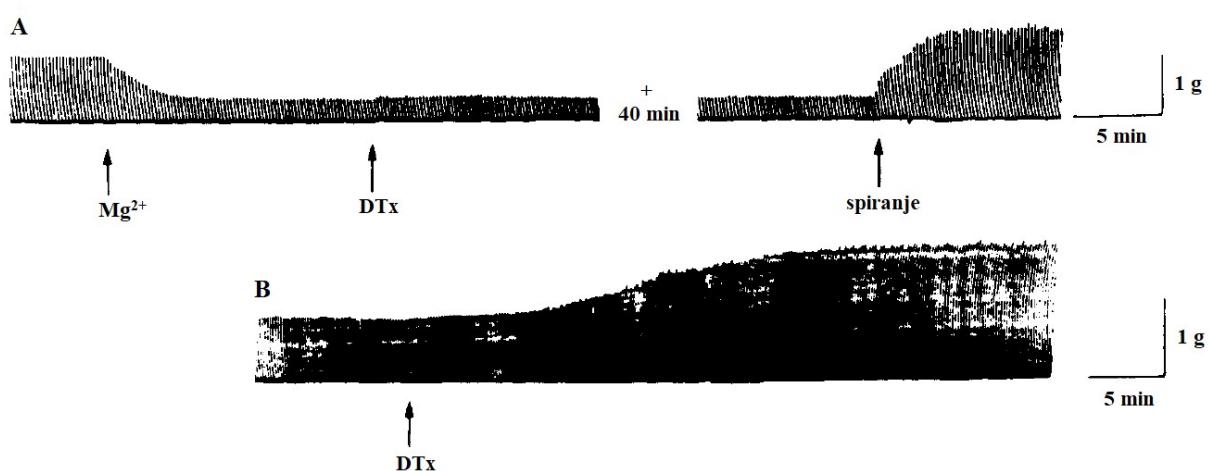
Figure 7: Crystal structure of α DTx (PDB: 1DTX). The amino acid residues Lys5 and Leu9, coloured in red, are crucial for the inhibition of K^+ channels. Cys or the three disulfide bonds that stabilize the structure are shown in yellow. The author of the figure is doc. dr. Adrijana Leonardi.

α DTx v nevronih zavre podtipne napetostno odvisnih kalijevih kanalov $K_v1.1$, $K_v1.2$ in $K_v1.6$ v nanomolarnem območju ($K_d < 20$ nM), drugi kalijevi kanali ($K_v1.3$, $K_v1.4$, $K_v1.5$, $K_v3.1$, $K_v3.4$ in $K_v4.1$) pa niso občutljivi niti na veliko višje koncentracije toksina (Grissmer in sod., 1994; Dufton in Harvey, 1998; Harvey, 2001). Iz skorje velikih možganov goveda so izolirali K^+ kanale, ki vežejo α DTx. Ti kanali so sestavljeni iz štirih večjih α -podenot in štirih manjših β -podenot (Parcej in sod., 1992). Z α DTx morajo za nastanek visoko-afinitetnega vezavnega mesta sočasno reagirati vse štiri α -podene K⁺ kanala, za njegovo zavrtje pa je potrebna le ena molekula α DTx (Tytgat in sod., 1995; Balant, 2009). Vezavna mesta na kanalu, pomembna za vezavo toksina, so Ala352, Glu353 in Tyr379, ki so v zanki med domenama S5 in S6, kar kaže, da zanka S5-S6 leži na zunanjem ustju kanala ali blizu njega, kjer vezava α DTx vodi do njegove okluzije (Hurst in sod., 1991; Tytgat in sod., 1995). α DTx zavre hitro aktivirajoč K⁺ tok, kar je

pomembno za nadzor vzdraženosti motoričnih živčnih končičev. V prisotnosti neselektivnega zaviralca K^+ kanalov tetraethylamonija, α DTx prav tako zavre K^+ tok na motoričnih živčnih končičih s počasnejšo kinetiko (Harvey, 2001).

2.5.2 Učinki α DTx na živčno-mišični preparat

α DTx poveča moč posredno izvvane mišične kontrakcije na izoliranem živčno-mišičnem preparatu. Ta učinek je predvsem posledica povečanega sproščanja ACh kot odziv na presinaptično stimulacijo motoričnih nevronov na živčno-mišičnem stiku (Harvey 2001). α DTx poveča odziv na posredno izvvano stimulacijo živčno-mišičnega preparata mišje hemidiafragme (slika 8B). V času največjega odziva na stimulacijo živca je sprememba v amplitudi odgovora na stimulacijo holinoreceptorjev in na neposredno izvvano stimulacijo mišice majhna, kar kaže, da α DTx deluje presinaptično. Povečana koncentracija Mg^{2+} ionov zavira aktivnost α DTx in ne njegove vezave. Kot je prikazano na sliki 8A, α DTx ne izniči delne blokade kontrakcije, povzročene z raztopino 3 mM magnezija. Po zamenjavi te raztopine z normalno koncentracijo Mg^{2+} se kontrاكija nemudoma povrne. Zavrtje kontrakcije, povzročeno z Mg^{2+} ioni, najverjetneje ni povezano z zmanjšanim prehodom Ca^{2+} ionov v živčni končič, saj je α DTx enako učinkovit pri povečanju kontrakcije preparata v kopeli z 0,5 mM in 2,5 mM raztopino kalcija (Harvey in Anderson, 1985).



Slika 8: Učinki α DTx (4,2 μ M) na posredno izvvano stimulacijo živčno-mišičnega preparata mišje hemidiafragme. (A) Delna paraliza, povzročena z dodatkom 3 mM magnezija. (B) Učinek v fiziološki raztopini z nizko vsebnostjo kalcija (0,5 mM). Slika je povzeta po Harvey in Anderson, 1985.

Figure 8: Effects of α DTx (4,2 μ M) on the indirectly stimulated neuromuscular preparation of mouse hemidiaphragm. (A) Partial paralysis caused by the addition of 3 mM magnesium. (B) Effect in low calcium (0,5 mM) physiological salt solution. The figure is adapted from Harvey and Anderson, 1985.

Trenutno poznamo dva učinka na sproščanje ACh, ki ju α DTx povzročijo na mišjem živčno-mišičnem preparatu. α DTx (1,4–5,6 μ M) v 2–15 min po dodatku v kopel pri približno tretjini živčno-mišičnih preparatov in temperaturi 37 °C povzroči prehodno povečanje amplitude PMP za 20–50 %. Večja amplituda PMP kaže povečano sproščanje nevrotransmiterja ACh. Do povečanja amplitude PMP pride pri živčno-mišičnem preparatu v kopeli, ki vsebuje normalno koncentracijo Ca^{2+} ionov, in tudi v kopeli, ki vsebuje nižjo koncentracijo Ca^{2+} ionov. α DTx ima manjši učinek na živčno-mišični preparat pri 32 °C kot pri 37 °C. Po 60–105 min izpostavljenosti preparata α DTx pri 20 °C, kot odgovor na posamezno stimulacijo živca, ne pride do povečanja amplitude PMP. Drugi učinek opazimo 20–60 min po aplikaciji toksina. Po enkratni stimulaciji živca nastane večje število PMP (Anderson in Harvey, 1988). Kot odgovor na vsak posamezen dražljaj živca nastaneta pri podganah dva PMP (ponavljača se PMP), občasno pa celo trije (Harvey in Anderson 1985; Anderson in Harvey, 1988;). Pri žabah nastane ob posamezni stimulaciji živca do 7 PMP (Harvey in Anderson 1985). Čas za pojav drugega učinka ni odvisen od koncentracije uporabljenega toksina. V raztopini z nižjo vsebnostjo Ca^{2+} ionov se pojavi 20–30 min po aplikaciji toksina, v raztopini z normalno vsebnostjo Ca^{2+} ionov pa po 45–60 min. Ko se ponavljači PMP pojavijo prvič, je med njimi 6–8 ms razlike, s podaljševanjem časa od aplikacije toksina pa je časovni razmik med njimi vse krajši. PMP se po aplikaciji α DTx pojavljajo tudi spontano posamično ali v rafalih pri raztopinah z različnima koncentracijama Ca^{2+} ionov s frekvenco 15–20 Hz. Izpiranje z raztopino, ki ne vsebuje toksina, ne prekine ponavljačih se PMP. Ponavljače se in tudi spontane PMP prekine aplikacija zaviralca od napetosti odvisnih Na^+ kanalov tetrodotoksina (3–15,6 nM). Razlika med žabjam in mišjem živčno-mišičnim preparatom je v odzivu na spremembo frekvence stimulacije po dodatku toksina. Pri živčno-mišičnem preparatu (*musculus cutaneus pectoris*) žabe se ob znižanju frekvence stimulacije z 0,5 Hz na 0,1 Hz kot odgovor na vsak posamezni dražljaj živca skrajša interval med ponavljačimi se PMP in poveča njihova frekvanca. Po drugi strani pa povečanje frekvence stimulacije na 1–5 Hz zavre ponavljače se PMP. Pri mišjem živčno-mišičnem preparatu se v nasprotju z žabjam preparatom aktivnost ponavljačih se PMP poveča ob povečanju frekvence stimulacije z 0,2–0,5 na 2–12 Hz. Nekateri živčno-mišični preparati mišje hemidiafragme so popolnoma

neobčutljivi na α DTx, saj pri 7 preparatih od 31 ni bilo mogoče opaziti povečanja amplitude PMP niti ponavljajočih se PMP. α DTx naj ne bi vplival na amplitudo MPMP in njegov časovni potek oz. razpolovni čas (Hawgood in Bon, 1991). V prvih 5 min po aplikaciji α DTx pride do hitrega zmanjšanja frekvence MPMP, vendar se ta po navadi povrne v 30 min po aplikaciji toksina. Podobno α DTx nima večjega vpliva na frekvenco MPMP žabjih živčno-mišičnih preparatov (Anderson in Harvey, 1988).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Z namenom opredelitve mehanizma delovanja in soodvisnosti med VaaChi in AtxA, beljakovinama iz modrasovega strupa, smo za izolacijo, čiščenje in karakterizacijo VaaChi ter AtxA in za delo na živčno-mišičnem preparatu uporabili kemikalije in drobno opremo navedeno v tabeli 1, laboratorijsko opremo navedeno v tabeli 2 ter pufre in raztopine navedene v tabeli 3.

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

Tabela 1: Kemikalije in drobna oprema

Table 1: Chemicals and small equipment

| Kemikalija | Proizvajalec |
|----------------------------------|---|
| acetonitril | Merck, Darmstadt, Nemčija |
| AgNO ₃ | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| akrilamid, 40-odstotni | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| APS | Serva, Heidelberg, Nemčija |
| β-alanin | Merck, Darmstadt, Nemčija |
| BSA | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| CAA | Acros Organics, Morris Plains, NJ, ZDA |
| CaCl ₂ | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| DTT | Fluka, Volketswil, Švica |
| d-tubokurarin klorid pentahidrat | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| EtOH, > 99,8-odstotni | Merck, Darmstadt, Nemčija |
| glicerol | VWR chemicals, Leuven, Belgija |
| glukoza | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| HCl | J.T.Baker, Deventer, Nizozemska |
| HEPES | Serva, Heidelberg, Nemčija |
| izopropanol, 99,9-odstotni | Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francija |
| KCl | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| kimotripsin | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| MgCl ₂ | Merck, Dermstadt, Nemčija |
| modrasov strup | Imonološki zavod, Zagreb, Hrvaska |
| mravljična kislina | Thermo Scientific, Waltham, MA, ZDA |

Nadaljevanje tabele 1.

Table 1 (continued).

| Kemikalija | Proizvajalec |
|---|--|
| NaCl | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| Na ₂ CO ₃ | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| NaDS | Thermo Scientific, Waltham, MA, ZDA |
| NaOH | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| Page Blue, koloidalno commassie G-250 barvilo za proteine | Thermo Scientific, Waltham, MA, ZDA |
| proteinski standard (PageRuler Unstained Protein Ladder) | Thermo Scientific, Waltham, MA, ZDA |
| PyrPG | Molecular Probes, Eugene, OR, ZDA |
| Sephacryl S-200 HR gel | GE Healthcare, Uppsala, Švedska |
| SP Sepharose Fast Flow gel | GE Healthcare, Uppsala, Švedska |
| substrat za kimotripsin (Ala-Ala-Phe-4-metil-kumaril-7-amid; Ala-Ala-Phe-MCA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| substrat za tripsin (Z-Phe-Arg-7-amido-4-metilkumarin; Z-Phe-Arg-AMC) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| TCEP | Acros Organics, Morris Plains, NJ, ZDA |
| TEMED | Merck, Darmstadt, Nemčija |
| TFA | Thermo Scientific, Waltham, MA, ZDA |
| toluen | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| tripsin | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| Tris | Serva, Heidelberg, Nemčija |
| urea | Merck, Darmstadt, Nemčija |
| μ-konotoksin GIIIB | Bachem, Bubendorf, Švica |

3.1.2 Laboratorijska oprema

Tabela 2: Laboratorijska oprema

Table 2: Laboratory equipment

| Laboratorijska oprema | Proizvajalec |
|--|--|
| analogno-digitalni pretvornik Digidata 1440A | Molecular Devices, Sunnyvale, CA, ZDA |
| naprava za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE) Mini Protean II | Bio-Rad, Hercules, CA, ZDA |
| avtomatski sekvenator proteinov Procise 492A | Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA |
| avtomatični zbiralnik frakcij (fraction collector FRAC-100) | Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska |
| barvilo metil zeleno | Thermo Scientific, Waltham, MA, ZDA |
| centrifuga MiniSpin plus | Eppendorf, Hamburg, Nemčija |
| centrifuga Rotina 380R | Hettich, Tuttlingen, Nemčija |
| čitalnik mikrotitrskih plošč Infinite M1000 | Tecan, Männedorf, Švica |
| črna mikrotitrska plošča (brez vezave) | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Nemčija |
| črpalka VP100 | Savant, Farmingdale, NY, ZDA |
| digitalni merilnik podtlaka DVG 50 | Savant, Farmingdale, NY, ZDA |
| filter Minisart (0,2 µm) | Sartorius, Goettingen, Nemčija |
| filtrirna nuča (100 mL) | Robu, Hattert, Nemčija |
| hladilnik in zamrzovalnik (4°C, -20°C) | Gorenje, Velenje, Slovenija |
| hlajeni zbiralnik hlapov RVT400 | Savant, Farmingdale, NY, ZDA |
| izometrični mehanoelektrični pretvornik Grass FT03 | Grass Instruments, West Warwick, RI, ZDA |
| kolona za HPLC BIOshell A400 Protein (C4) | Merck, Darmstadt, Nemčija |
| kolona za HPLC Symmetry Shield RP18 | Waters, Dublin, Irska |
| kolona za HPLC Zorbax 300SB-C3 | Agilent, Santa Clara, CA, ZDA |
| kvarčne kivete za spektrofotometer QS 1000 | Hellma Analytics, Müllheim, Nemčija |
| magnetno mešalo Rotamix SHP-10 | Tehnica, Železniki, Slovenija |
| masni spektrometer Q-TOF Premier | Waters-Micromass, Manchester, Velika Britanija |
| membrana Empore™ C18 | 3M, St. Paul, MN, ZDA |
| mikrocentrifugirke z nizko vezavo proteinov | Costar, Salt Lake City, UT, ZDA |
| napajalnik za elektroforezo PowerPac basic | Bio-Rad, Hercules, CA, ZDA |
| napetostni stimulator S-48 | Grass Instruments, West Warwick, RI, ZDA |

Nadaljevanje tabele 2.

Table 2 (continued).

| Laboratorijska oprema | Proizvajalec |
|--|--|
| naprava za izdelavo mikropipet (Fleming/Brown micropipette puller P-97) | Sutter Instruments, Novato, CA, ZDA |
| ogrevalni in hladilni blok ThermoE | Bioer Technology, Tokyo, Japonska |
| ojačevalnik električnega signala Axoclamp 900A | Molecular Devices, Sunnyvale, CA, ZDA |
| ojačevalnik električnega signala P122 | Grass Instruments, West Warwick, RI, ZDA |
| peristaltična črpalka AutoAnalyzer | Technicon, Tarrytown, NY, ZDA |
| pH-meter SevenEasy S20 | Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica |
| sistem za dokumentiranje gelov ChemiDoc XRS+ | Bio-Rad, Hercules, CA, ZDA |
| spektrofotometer NanoDrop 2000c | Thermo Scientific, Waltham, MA, ZDA |
| stresalnik Rotamax 120 | Heidolph Instruments, Schwabach, Nemčija |
| stresalnik za epruvete VP-1 | Grant Instruments, Cambridge, Velika Britanija |
| tehnicka Analytical Balance GH-252 | A and D Instruments, Adelaide, Avstralija |
| tehnicka Vibra AJH-4200CE | Shinko Denshi Co., Tokyo, Japonska |
| ultrafilter Amicon 8200 ali 8400 | Amicon, Billerica, MA, ZDA |
| ultrafiltracijska membrana OMEGA 3K oz. 10K | Pall, Port Washington, NY, ZDA |
| vakuumski koncentrator miVac Duo | Genevac, Sproughton, Velika Britanija |
| visokozmogljivostni tekočinski kromatograf (HPLC) Series 1100 | Hewlett Packard, Palo Alto, CA, ZDA |

3.1.3 Uporabljeni pufri in raztopine

Tabela 3: Uporabljeni pufri in raztopine

Table 3: Buffers and solutions used

| Pufer/raztopina | Sestava | Namen |
|-----------------|--|---|
| A | 50 mM HEPES, pH 8,2 | ionska izmenjevalna kromatografija |
| B | 50 mM HEPES, pH 8,2 0,4 M NaCl | ionska izmenjevalna kromatografija |
| C | 0,35 M β -alanin/ocetna kislina, pH 4,4 | gelska filtracija |
| D | 0,1-odstotna (v/v) TFA v vodi | RP-HPLC |
| E | 0,1-odstotna (v/v) TFA, 90-odstotni (v/v) ACN v vodi | RP-HPLC |
| F | 15 mM Tris, pH 7,8 0,1 M KCl, 20 mM CaCl ₂ | test zaviranja tripsinske in kimotripsinske aktivnosti |
| G | 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM KCl, 1 mM CaCl ₂ | merjenje fosfolipazne aktivnosti s PyrPG |
| H | 250 mM Tris/HCl, pH 8,3 1,92 M glicin, 1-odstotni (m/v) NaDS | 10-kratni elektroforezni pufer za NaDS-PAGE elektroforezo |
| I | 50 mM Tris/HCl, pH 7,0 1 mM CaCl ₂ | elektroforezni pufer za nativno elektroforezo |
| K-R | 5 mM HEPES, pH 7,4 154 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 11 mM glukoza | živčno-mišični preparat |

3.2 METODE

3.2.1 Metode izolacije in karakterizacije VaaChi

3.2.1.1 Ionska izmenjevalna kromatografija

Ionsko izmenjevalno kromatografijo (IIK) smo uporabili v prvem (IIK-1) in zadnjem koraku (IIK-2) izolacije VaaChi. Izvajali smo jo na kationskem nosilcu SP Sepharose Fast Flow pri pretoku 42 mL/h in temperaturi 4 °C. Za IIK-1 smo uporabili kolono, ki je bila velika 23 cm × 1,5 cm (dolžina × premer) in jo uravnotežili v pufru A. Nanjo smo nanesli 4 g liofiliziranega modrasovega strupa, predhodno raztopljenega v 25 mL pufra A. IIK-2 smo izvedli na koloni, ki je bila velika 18 cm × 1 cm in predhodno uravnotežena v pufru A. V njej smo ločevali vzorec po gelski kromatografiji. Obe koloni smo po nanosu vzorca najprej izpirali s pufrom A, da smo izprali nevezane proteine. Vezane proteine smo izprali z linearnim gradientom pufra B. Frakcije smo zbirali avtomatsko na 7 oz. 5 min in jim izmerili absorbanco s spektrofotometrom pri valovni dolžini 280 nm (A₂₈₀). Prisotnost zaviralcev v posameznih frakcijah smo potrdili s testom zaviranja aktivnosti encima tripsina. Aktivne frakcije smo nato združili in skoncentrirali, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.1.9.

3.2.1.2 Gelska filtracija

Z gelsko filtracijo smo ločili nizkomolekulske zaviralce od visokomolekulskih proteinov. Skoncentriran in dializiran vzorec po IIK-1 smo ločevali z gelsko filtracijo v pufru C pri 4 °C. Izvedli smo jo na koloni, veliki 110 cm × 3,8 cm (dolžina × premer), napolnjeni z gelom Sephadryl S-200 HR, ki ločuje proteine v območju molekulskih mas 5–250 kDa, pri pretoku 33,6 mL/h. Frakcije smo zbirali na 15 min s pomočjo avtomatičnega zbiralnika in jim nato izmerili A₂₈₀.

3.2.1.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjenima fazama (RP-HPLC)

RP-HPLC smo uporabili v analitske namene, za preverjanje sestave in čistosti vzorcev v posameznih korakih izolacije ter tudi za pripravo vzorcev za strukturno analizo. Uporabili smo kolono BIOshell A400 protein (C4) veliko 15 cm × 0,46 cm, z delci premera 3,4 µm in velikostjo por 400 Å. Kolono smo uravnotežili z raztopino D pri pretoku 0,8 mL/min. Za analizo smo nanesli 250 µL posameznega vzorca, razredčenega z raztopino D do 1 mL. Vezane proteine

smo izprali z večstopenjskim gradientom raztopine E po protokolu, opisanem v tabeli 4, pri pretoku 0,8 mL/min. Potek kromatografije smo spremljali s kontinuiranim merjenjem absorbance izpirka pri valovni dolžini 215 nm (A_{215}).

Tabela 4: **Potek izpiranja RP-HPLC kolone C4**

Table 4: **Washing protocol of RP-HPLC column C4**

| Čas [min] | Gradient [% raztopine E] |
|-----------|--------------------------|
| 0–5 | 0 |
| 5–10 | 0–15 |
| 10–45 | 15–50 |
| 45–46 | 50–100 |
| 46–50 | 100 |
| 50–51 | 100–0 |

3.2.1.4 Zaviranje tripsinske aktivnosti

Frakcije, pridobljene z IIK-1, smo testirali na sposobnost zaviranja encimske aktivnosti tripsina. V 1,5 mL veliko mikrocentrifugirko smo odpipetirali 5 μ L tripsina s koncentracijo 0,429 μ M in dodali 25 μ L posamezne frakcije, ki je vsebovala zaviralec in 2 μ L 2 M CaCl₂. Zmes smo inkubirali 10 min pri sobni temperaturi. Nato smo v vsako zmes dodali 58 μ L pufra F in 10 μ L fluorogenega substrata za tripsin (Z-Phe-Arg-AMC) s koncentracijo 0,1 mM. Mikrocentrifugirke smo nato inkubirali 10 min pri 37 °C. Reakcijo smo prekinili z dodatkom 100 μ L 0,2 M HCl. Iz mikrocentrifugirk smo reakcijske zmesi prenesli v posamezne jamice črne mikrotitrskie plošče s 96 vdolbinicami in ravnim dnom ter izmerili fluorescenco s čitalnikom mikrotitrskih plošč Infinite M1000 pri valovni dolžini eksitacije 360 nm in emisije 470 nm. Kontrolni in slepi vzorec sta namesto posamezne frakcije vsebovala ustrezno količino pufra F. Spleti vzorec je tudi namesto encima vseboval ustrezno količino pufra F.

3.2.1.5 Zaviranje kimotripsinske aktivnosti

Merjenje encimske aktivnosti kimotripsina v prisotnosti kimotripsinskega zaviralca (VaaChi) smo izvedli enako, kot je opisano za tripsin, le da smo uporabili specifični fluorogeni substrat za kimotripsin (Ala-Ala-Phe-MCA). V mikrocentrifugirke z volumnom 1,5 mL smo v treh paralelkah odpipetirali 2,5 μ L kimotripsina s koncentracijo 0,02 μ g/ μ L in dodali 2,5 μ L, 12,5

μL oziroma $25 \mu\text{L}$ VaaChi s koncentracijo $6,12 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Tako smo pripravili vzorce, ki so vsebovali kimotripsin in zmes izooblik VaaChi v molskem razmerju $1 : 1$, $1 : 5$ in $1 : 10$. Test zaviranja kimotripsinske aktivnosti s posameznimi vrhovi RP-HPLC, ki so vsebovali posamezno izoobliko VaaChi, smo izvedli le v molskem razmerju $1 : 1$ in $1 : 5$. Mikrocentrifugirke smo predinkubirali 10 min pri sobni temperaturi in potem v vsako dodali pufer F do $100 \mu\text{L}$ in po $10 \mu\text{L}$ substrata za kimotripsin s koncentracijo $200 \mu\text{M}$. Reakcijske zmesi smo inkubirali 10 min pri 37°C in reakcijo prekinili z dodatkom $100 \mu\text{L}$ 30-odstotne ocetne kisline. Iz mikrocentrifugirk smo reakcijske zmesi prenesli v posamezne jamice črne mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami in ravnim dnom ter izmerili fluorescenco. Kontrolni in slepi vzorec sta namesto zaviralca vsebovala ustrezno količino reakcijskega pufra F, ki je bil namesto encima dodan tudi v slepi vzorec.

3.2.1.6 Vpliv VaaChi na encimsko aktivnost naravnega AtxA

Fosfolipazno aktivnost sPLA₂ ob prisotnosti VaaChi smo merili z modificirano pirensko metodo po Radvanyiju (1989). 1-heksadecanoil-2-(1-pirendecanoil)-sn-glicero-3-fosfoglicerol (PyrPG), ki ima na mestu *sn*-2 vezano maščobno kislino, označeno s pirenom, smo uporabili kot substrat. Aktivnost smo merili s pomočjo fluorescence 1-pirendekanojske kisline, ki se pri delovanju sPLA₂ na fosfolipid sprosti z mesta *sn*-2. Pirendekanojska kislina ni topna v vodi in vezana na fosfolipid ne oddaja fluorescence. To zaznamo šele, ko se pirendekanojska kislina veže na molekule govejega serumskega albumina (BSA) (Petan, 2003). Za pripravo veziklov, ki so vsebovali PyrPG, smo naprej pripravili založno raztopino fluorogenega substrata PyrPG v koncentraciji $1 \text{ mg}/\text{mL}$, tako da smo PyrPG raztopili v zmesi $1 : 1$ (v : v) toluena in izopropanola. Hranili smo jo v steklenički s teflonskim zamaškom pri -20°C . V mikrocentrifugirko smo odpipetirali $200 \mu\text{L}$ založne raztopine in v vakuumskem koncentratorju miVac Duo odparili topilo. Fosfolipidu smo nato dodali 1 mL etanola (EtOH) visoke čistosti ($> 99,8\%$). Med dodajanjem topila in še nekaj min pozneje smo raztopino vrtinčili na mešalniku in jo segrevali v rokah, nato pa jo 2 min centrifugirali pri 14.000 obratih na min. V drugo stekleničko s teflonskim zamaškom smo prenesli $5 \mu\text{L}$ supernatanta, ga stokrat redčili v EtOH in mu nato na spektrofotometru NanoDrop 2.000c proti slepemu vzorcu EtOH izmerili absorbanco pri valovni dolžini 342 nm . Glede na izmerjeno absorbanco etanolne raztopine PyrPG, ki je znašala $0,12 \text{ mg}/\text{mL}$, smo prek molarnega absorpcijskega koeficiente PyrPG ($40.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) izračunali njeno koncentracijo ($300 \mu\text{M}$). Za pripravo veziklov, ki so

vsebovali PyrPG smo etanolno raztopino segrevali v rokah in jo med tem večkrat močno zvrtinčili. Med konstantnim vrtinčenjem smo v delovni pufer G prenesli ustrezeno količino etanolne raztopine, tako da je končna koncentracija PyrPG v delovnem pufru znašala 4,2 µM. Pripravljeno raztopino veziklov smo pred uporabo hranili na ledu, še isti dan pa smo jo izpostavili vzorcem naravnega AtxA in VaaChi. S cepitvijo estrske vezi z AtxA na mestu *sn*-2 se sprosti 1-pirendekanojska kislina, kar zaznamo kot povečanje fluorescenčnega signala na čitalniku mikrotitrskih plošč. Vzorec IIK-2-A (podpoglavlje 3.2.1.1) smo nato lahko testirali na sposobnost zaviranja encimske aktivnosti AtxA. Test smo izvedli tako, da smo v posamezne jamice črne mikrotitrskie plošče s 96 vdolbinicami in ravnim dnom dodali 190–200 µL 0,09-odstotnega (m/v) BSA (brez vezanih maščobnih kislin) v delovnem pufru G. Volumen dodanega BSA je bil odvisen od volumna, dodanih AtxA in VaaChi, tako da je končni volumen reakcijske zmesi vedno znašal 200 µL. V vdolbinice smo nato dodali 2 µL vzorca AtxA s koncentracijo 1 ng/200 µL reakcijske zmesi. Ustrezno razredčitev vzorca IIK-2-A smo pripravili z redčenjem v 0,09-odstotnem (m/v) BSA in nato v jamice mikrotitrskie plošče v treh paralelkah dodali 2 µL oziroma 8 µL vzorca IIK-2-A. Tako smo pripravili vzorce, ki so vsebovali AtxA in VaaChi v molskem razmerju 1 : 1 in 1 : 4. Slepi vzorec je vseboval le 200 µL BSA. Negativna in pozitivna kontrola sta v ustremnem volumnu BSA vsebovali 2 µL VaaChi oziroma AtxA. Po 30-minutni predinkubaciji pri sobni temperaturi smo v vse vdolbinice hkrati s pomočjo multikanalne pipete dodali po 100 µL 4,2 µM raztopine veziklov PyrPG. Merjenje fluorescence s čitalnikom mikrotitrskih plošč Infinite M1000 pri valovni dolžini ekscitacije 342 nm in emisije 495 nm smo začeli takoj po dodatku veziklov.

3.2.1.7 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)

Z NaDS-PAGE smo preverjali molekulsko maso in čistost izoliranih proteinov. Analizo smo izvedli na diskontinuiranem gelu, ki sta ga sestavljala 4-odstotni (m/v) koncentracijski (tabela 5) in 15-odstotni (m/v) ločevalni (tabela 6) poliakrilamidni gel debeline 0,75 mm. Pripravili smo gele in izvedli elektroforezo po navodilih proizvajalca v napravi Mini Protean II. Vzorce smo pripravili v redukcijskem pufru (tabela 7) in jih 5 min segrevali pri 90 °C. Pred nanosom v žepke smo jih centrifugirali 30 s na 10.000 obratov/min (4.500 g). V enega od žepkov smo prav tako nanesli 5 µL proteinskih standardov (PageRuler Unstained Protein Ladder), velikih 10–200 kDa. Elektroforeza je potekala približno 45 min pri konstantnem električnem toku 20 mA v pufru H. Po končani elektroforezi smo gel najprej izpirali s 100 mL destilirane vode

(dH₂O) trikrat po 10 min in ga nato 15 min fiksirali v enakem volumnu raztopine 25-odstotnega (v/v) izopropanola in 10-odstotne (v/v) ocetne kisline. Gel smo nato na stresalniku čez noč barvali v 30 mL raztopine barvila PageBlue. Po končanem barvanju smo gel ob stresanju razbarvali v 100 mL dH₂O.

Tabela 5: Sestava 4-odstotnega koncentracijskega gela

Table 5: Composition of 4 % stacking gel

| Reagenti | Volumen |
|-----------------------|----------|
| dH ₂ O | 3,175 mL |
| 1 M Tris/HCl (pH 8,8) | 1,25 mL |
| 10-odstotni NaDS | 50 µL |
| 40-odstotni akrilamid | 0,5 mL |
| 10-odstotni APS | 25 µL |
| TEMED | 5 µL |

Tabela 6: Sestava 15-odstotnega ločevalnega gela

Table 6: Composition of 15 % separating gel

| Reagenti | Volumen |
|-----------------------|---------|
| dH ₂ O | 3,6 mL |
| 1 M Tris/HCl (pH 8,8) | 2,5 mL |
| 10-odstotni NaDS | 100 µL |
| 40-odstotni akrilamid | 3,75 mL |
| 10-odstotni APS | 50 µL |
| TEMED | 5 µL |

Tabela 7: Sestava redukcijskega pufra

Table 7: Composition of reducing buffer

| Reagenti | Količina |
|-------------------------|--------------------|
| 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) | 2,5 mL |
| 10-odstotni (m/v) NaDS | 4 mL |
| glicerol | 2 mL |
| bromfenol modro | 2 mg |
| DTT | 310 mg |
| dH ₂ O | dopolnili do 10 mL |

3.2.1.8 Določitev N-končnega aminokislinskega zaporedja

Aminokislinsko zaporedje na N-koncu proteinov smo določili z Edmanovo metodo. Uporabili smo sistem za določevanje aminokislinskega zaporedja proteinov, ki je sestavljen iz treh podenot: avtomatskega proteinskega sekvenatorja (Procise 492A), visokozmogljivostnega tekočinskega kromatografa (model 140C) in UV-detektorja (model 785A), s pomočjo katerih določimo produkte razgradnje. Vzorce VaaChi, pridobljene z metodo RP-HPLC, smo pred analizo skoncentrirali v vakuumskem koncentratorju. Analizo aminokislinskega zaporedja je izvedla doc. dr. Adrijana Leonardi iz Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti Instituta Jožef Stefan.

3.2.1.9 Ultrafiltracija

Metodo ultrafiltracije smo uporabili za koncentriranje in dializiranje vzorcev med izolacijo. Uporabili smo ultrafilter Amicon in membrano 10K, ki zadržuje molekule z maso nad 10 kDa. Ultrafiltracijo smo izvajali pri 4 °C. Z merjenjem A₂₈₀ filtrata smo preverjali, da membrana ne prepušča molekul, večjih od 10 kDa. Po končanem koncentriranju smo vzorce dializirali tako, da smo dodali 100 mL pufra A in raztopino ponovno koncentrirali. Postopek smo ponovili trikrat. Vzorec VaaChi, ki smo ga testirali na živčno-mišičnem preparatu, pa smo dializirali proti 50 mM HEPES pufru, pH 7.0.

3.2.2 Metode čiščenja in karakterizacije rekombinantnega AtxA (rAtxA)

3.2.2.1 RP-HPLC na kolonah C3 in C18

42 mL že pripravljene renaturacijske mešanice rAtxA s koncentracijo 15 mg/mL smo zmešali z raztopino D (0,1-odstotna (v/v) TFA) v razmerju 1 : 1 in jo čez noč pustili pri 4 °C. Mešanico smo nato centrifugirali 10 min pri 4 °C in 4.500 g v centrifugi Rotina 380R ter supernatant s pomočjo brizge prefiltrirali skozi filter Minisart z velikostjo por 0,2 µm. Za čiščenje rAtxA z RP-HPLC smo uporabili kolono Zorbax 300SB-C3, veliko 15 cm × 0,46 cm, z delci premera 3,5 µm in velikostjo por 300 Å (kolona C3). Kolono smo uravnovežili s 5-odstotno (v/v) raztopino E (0,1-odstotna (v/v) TFA, 90-odstotni (v/v) acetonitril) v raztopini D in nanesli 13-krat po 1 mL vzorca pri pretoku 2 mL/min. Kolono smo nato pri enakem pretoku izpirali po protokolu, opisanem v tabeli 8. Postopek smo ponovili šestkrat. Analizo smo spremljali s

kontinuiranim merjenjem A₂₁₅. Frakcije, ki so vsebovale rAtxA, smo združili in skoncentrirali v vakuumskem koncentratorju. Nato smo dodali dvakrat po 0,5 mL dH₂O in vzorec ponovno skoncentrirali s pomočjo vakuma ter nadaljevali z njihovim čiščenjem.

Tabela 8: **Potek izpiranja RP-HPLC kolone C3**

Table 8: **Washing protocol of RP-HPLC column C3**

| Čas [min] | Gradient [% raztopine E] |
|-----------|--------------------------|
| 0–5 | 0–5 |
| 5–11 | 5–35 |
| 11–31 | 35–55 |
| 31–34 | 55–100 |
| 34–39 | 100 |
| 39–41 | 100–5 |

Čiščenje rAtxA smo nadaljevali z uporabo kolone Symmetry Shield RP18, velike 25 cm × 0,46 cm, z delci premera 5 µm in velikostjo por 100 Å (kolona C18). Kolono smo najprej uravnotežili s 30-odstotno (v/v) raztopino E pri pretoku 1 mL/min. Nanesli smo 100 µL vzorca, ki smo ga razredčili s 700 µL raztopine D. Kolono smo nato izpirali pri pretoku 2 mL/min po protokolu, opisanem v tabeli 9. Postopek smo ponovili trikrat. Tudi tokrat smo frakcije, ki so vsebovale rAtxA, združili in skoncentrirali v vakuumskem koncentratorju, jim dodali dvakrat po 0,5 mL dH₂O, vmes pa jih sušili v vakuumskem koncentratorju.

Tabela 9: **Potek izpiranja RP-HPLC kolone C18**

Table 9: **Washing protocol of RP-HPLC column C18**

| Čas [min] | Gradient [% raztopine E] |
|-----------|--------------------------|
| 0–5 | 30 |
| 5–38,33 | 30–40 |
| 38,33–41 | 40–100 |
| 41–46 | 100 |
| 46–48 | 100–30 |

3.2.2.2 Preverjanje čistosti rAtxA z NaDS-PAGE

NaDS-PAGE smo izvedli, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.1.7. Gel smo po končani elektroforezi 30 min ob stresanju fiksirali v 200 mL raztopine 30-odstotnega (v/v) EtOH in 10-odstotne ocetne kisline. Nato smo ga večkrat dobro izprali z dH₂O in pustili na stresalniku 10 min. Proteine v gelu smo reducirali v raztopini DTT (0,5 mg/100 mL dH₂O) 30 min, nato pa gel za 60 min prestavili v 0,1-odstotno (v/v) raztopino AgNO₃ v vodi. Gel smo izprali s 50 mL dH₂O in ga nato razvili v 100 mL razvijalne raztopine (28,5 g Na₂CO₃ in 0,5 mL 37-odstotnega (v/v) formaldehida/L). Razvijanje smo prekinili ob pojavu dobro vidnih proteinskih lis z dodatkom 5 g trdne citronske kisline na 100 mL razvijalne raztopine.

3.2.2.3 Merjenje encimske aktivnosti očiščenega rAtxA

Encimsko aktivnost očiščenega rAtxA, pridobljenega z RP-HPLC na koloni C18 (podpoglavlje 3.2.2.1), smo testirali z modificirano pirensko metodo. Test smo izvedli tako, da smo v posamezne jamice črne mikrotitrski plošče s 96 vdolbinicami in ravnim dnem dodali 198 µL 0,09-odstotnega (m/v) BSA (brez vezanih maščobnih kislin) v delovnem pufru. V paralelkah smo v vdolbinice dodali po 2 µL vzorca rAtxA s koncentracijo 0,27 ng/µL. Ustrezno razredčitev smo pripravili z redčenjem vzorca v 0,09-odstotnem BSA. Spleti vzorec je vseboval le 200 µL 0,09-odstotnega BSA, pozitivni kontroli pa poleg tega še 2 µL naravnega AtxA (AtxA) s koncentracijo 0,5 ng/µL. V vse vdolbinice smo s pomočjo multikanalne pipete hkrati dodali po 100 µL 4,2 µM raztopine PyrPG veziklov, ki smo jo pripravili na enak način, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.1.6. Merjenje fluorescence s čitalnikom mikrotitrskih plošč Infinite M1000 pri valovni dolžini ekscitacije 342 nm in emisije 495 nm smo začeli takoj po dodatku veziklov.

3.2.3 Masna spektrometrija (MS)

3.2.3.1 Določitev molekulske mase

Vzorce VaaChi in rAtxA, očiščene z RP-HPLC (podpoglavlji 3.2.1.3 in 3.2.2.1), smo do suhega posušili v vakuumskem koncentratorju, jim dodali 1 mL dH₂O in jih ponovno posušili. To smo ponovili še dvakrat, da smo odstranili vse ostanke topil. Molekulsko maso posameznega vzorca smo določili na masnem spektrometu Q-TOF Premier (Waters-Micromass, VB). Gre za tandemski kvadrupolni masni spektrometer, ki vzorce analizira na osnovi časa preleta ionov.

Vzorce smo analizirali z uporabo metode ionizacije z elektrorazprševanjem raztopin v električnem polju (ESI-MS). Analize je izvedel dr. Dušan Žigon iz Odseka za znanosti o okolju Instituta Jožef Stefan.

3.2.3.2 Določitev delne primarne strukture

Za določitev delnega aminokislinskega zaporedja smo reducirane in alkilirane proteine razgradili s tripsinom in dobljene peptide analizirali z masno spektrometrijo. 1 µg (3–5 µL) posameznega vzorca VaaChi smo posušili do suhega v vakuumskem koncentratorju. Vzorcem smo dodali 10 µL pufra za redukcijo in alkilacijo, ki je vseboval 50 mM NH₄HCO₃, 6 M ureo, 10 mM TCEP in 40 mM CAA. Reakcija je potekala 30 min v temi pri sobni temperaturi. Nato smo vzorce razredčili do 100 µL s 25 mM NH₄HCO₃ in dodali 2 µL (20 ng) tripsina. Vzorce smo nežno premešali, jih kratko centrifugirali v centrifugi MiniSpin plus in jih pustili stati čez noč na 37 °C. Reakcijo smo prekinili z dodatkom 1 µL mravljične kisline. Nastale peptide smo pred MS-analizo očistili na C18-mikrokolonah, ki smo jih pripravili sami, tako da smo v nastavek za pipete z volumnom 200 µL dali košček membrane EmporeTM C18. V pokrov mikrocentrifugirke z volumnom 1,5 mL smo naredili luknjico in vanjo namestili pripravljeno kolono. Posamezno kolono smo aktivirali z izpiranjem z metanolom, izpiranje smo nadaljevali z raztopino 80-odstotnega (v/v) acetonitrila (ACN) in 3-odstotne (v/v) ocetne kisline, na koncu pa še dvakrat izprali z 0,1-odstotno (v/v) mravljično kislino. Za vsako izpiranje smo uporabili 50 µL posamezne raztopine. Raztopine smo skozi kolono potiskali z brizgo. Kolone smo namestili na nove, čiste mikrocentrifugirke, nanesli vzorce in po vezavi izprali nečistoče s 50 µL 0,1-odstotne (v/v) mravljične kisline. Še enkrat smo zamenjali mikrocentrifugirke in vezane peptide dvakrat izprali s po 50 µL raztopine 60-odstotnega (v/v) ACN in 0,1-odstotne (v/v) mravljične kisline. Na koncu smo vzorcem dodali 50 µL 0,1-odstotne (v/v) mravljične kisline in jih skoncentrirali v vakuumskem koncentratorju do volumna 10 µL. Tandemska MS-analizo na masnem spektrometu z ionsko pastjo ESI-LC/MSD Trap XCT Ultra (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, ZDA) in identifikacijo peptidov je izvedla doc. dr. Adrijana Leonardi iz Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti Instituta Jožef Stefan.

3.2.4 Preverjanje nastanka kompleksov z nativno elektroforezo

Z nativno elektroforezo smo preverjali ali rAtxA in VaaChi tvorita kompleks. Analizo smo izvedli na 12,5-odstotnem ločevalnem gelu debeline 0,75 mm (tabela 10). Pripravili smo vzorce, ki so vsebovali rAtxA in zmes izoblik VaaChi v molskem razmerju 1 : 1, 1 : 5 in 1 : 10, jih 15 sekund centrifugirali v centrifugi MiniSpin plus na 10.000 obratov/min (4.500 g) in jih nato do suhega posušili v vakuumskem koncentratorju. Vzorcem smo dodali 9 µL pufra za elektroforezo (pufer I) in jih inkubirali 30 min na sobni temperaturi. Vzorcem smo pred nanosom v žepke gela dodali 3 µL nanašalnega pufra (tabela 11) in jih ponovno 15 sekund centrifugirali. Proteinskih standardov pri tej metodi nismo uporabili. Elektroforeza je potekala približno 1 uro pri konstantnem električnem toku 20 mA v pufru I. Po končani elektroforezi smo gel brez predhodnega spiranja z dH₂O najprej 15 min fiksirali v 100 mL raztopine 25-odstotnega (v/v) izopropanola in 10-odstotne (v/v) ocetne kisline. Gel smo nato na stresalniku čez noč barvali v 30 mL raztopine barvila PageBlue. Po končanem barvanju smo gel ob stresanju razbarvali v 100 mL dH₂O.

Tabela 10. Sestava 12,5-odstotnega ločevalnega gela

Table 10. Composition of 12,5 % separating gel

| Reagenti | Volumen |
|-----------------------|----------|
| dH ₂ O | 6,3 mL |
| 40-odstotni akrilamid | 4,75 mL |
| pufer I | 3,75 mL |
| 10-odstotni APS | 75 µL |
| TEMED | 11,25 µL |

Tabela 11. Sestava nanašalnega pufra

Table 11. Composition of application buffer

| Reagenti | Volumen |
|---|---------|
| pufer I | 2,5 mL |
| glicerol | 2,5 mL |
| dH ₂ O | 0,4 mL |
| 10 mg barvila metil zeleno v 500 µL dH ₂ O | 100 µL |

3.2.5 Metode dela na živčno-mišičnem preparatu

3.2.5.1 Priprava živčno-mišičnega preparata

Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin je z dovoljenjem št. 34401-12/2012/2 odobrila delo na izoliranih organih. Delo je potekalo v skladu z etičnimi standardi. Izolirane organe smo pridobili od 16 odraslih mišjih samcev (starost 5–7 mesecev) linije BALB/c. Miši so izvirale iz Centra za genomiko Inštituta za predklinične vede Veterinarske fakultete. Po žrtvovanju miši z metodo cervicalne dislokacije s takojšnjo izkravavitvijo smo s preparacijo izolirali diafragmo, jo prepolovili in dobili hemidiafragmi s pripadajočima preponskima živcema. Iz posamezne diafragme smo pridobili dva živčno-mišična preparata, ki smo ju do začetka poskusa hranili v oksigenirani Krebs-Ringerjevi (K-R) raztopini pri sobni temperaturi (21–23 °C, pH 7,4). Pripravo živčno-mišičnega preparata je izvedla doc. dr. Monika C. Žužek, dr. vet. med., z Veterinarske fakultete v Ljubljani.

3.2.5.2 Meritve vpliva VaaChi ter sočasne aplikacije VaaChi in rAtxA na izometrično mišično kontrakcijo izoliranih hemidiafragm miši

S posebnimi entomološkimi iglami smo lateralni del hemidiafragme pričvrstili na dno s silikonsko prevleko prekrite kopeli za izolirane organe, napolnjene s 4 mL K-R raztopine, ki je bila ves čas poskusa oksigenirana. Z ročico izometričnega mehano-električnega pretvornika Grass FT03 smo povezali tetivni del hemidiafragme, v lumen sukcijске elektrode pa smo s pomočjo podtlaka vsesali prosti del preponskega živca. Med raztezanjem mišice smo pri delni raztegnitvi za posredno in neposredno izzvane mišične kontrakcije najprej določili supramaksimalno napetost dražljaja. Raztezanje hemidiafragme smo nadaljevali do meje, pri kateri je bila amplituda enostavne mišične kontrakcije pri posredni supramaksimalni stimulaciji maksimalna. Čas zatezanja je trajal med 30 in 45 min. Mišična tenzija v mirovanju (MT), pri kateri je bila amplituda kontrakcije najvišja, je znašala od 1,2 do 2,2 g. Meritve smo začeli ob stabilni MT in doseženi maksimalni amplitudi kontrakcije, izvajali pa smo jih pri sobni temperaturi (21–23 °C). Hemidiafragmo smo stimulirali z napetostnim stimulatorjem Grass S-48. Pri posredni mišični stimulaciji smo preponski živec vzdražili prek sukcijске elektrode s supramaksimalno napetostjo, ki je bila med 5 in 7 V. Frekvenca stimulacije je bila 0,1 Hz in dražljaj je trajal 0,1 ms. Neposredno mišično stimulacijo smo izzvali z elektrodama iz platine, ki sta bili vpeti v kopel in sta potekali prečno na skeletna mišična vlakna hemidiafragme. V tem

primeru smo hemidiafragmo vzdražili s supramaksimalno napetostjo med 50 in 60 V ter z enako frekvenco in trajanjem dražljaja kot pri posredno izzvani mišični stimulaciji. Posredno in neposredno izzvane tetanične kontrakcije smo izzvali s supramaksimalnimi napetostnimi dražljaji s frekvenco 80 Hz in trajanjem stimulacije 1 s. Razlika je bila le v napetosti, ki je pri posredni tetanični stimulaciji znašala med 5 in 7 V, pri neposredni tetanični stimulaciji pa med 50 in 60 V. Izometrične mišične kontrakcije smo beležili s pomočjo mehano-električnega pretvornika Grass FT03, jih ojačali z ojačevalnikom P122 in nato digitalizirali s 16-bitnim analogno-digitalnim pretvornikom Digidata 1440A. Frekvenca vzorčenja signala je ves čas poskusa znašala 0,5 kHz (Trobec, 2018).

Proučevali smo učinek VaaChi pri 7 μM koncentraciji ter učinek mešanice predinkubiranega rAtxA v 0,845 μM koncentraciji in VaaChi v 7 μM koncentraciji (molsko razmerje 1 : 8,3) na živčno-mišični prenos in posledično vpliv na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema. Pri vseh poskusih na živčno-mišičnem preparatu smo uporabili le rAtxA. Po empiričnih izkušnjah pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ oz. pri 0,72 μM koncentraciji AtxA v kopeli živčno-mišičnega preparata, zagotovo dosežemo popolno blokado živčno-mišičnega prenosa (Logonder in sod., 2008). V poskusih smo uporabili še nekoliko višjo koncentracijo AtxA, tako da smo bili lahko prepričani o zanesljivosti učinka in hkrati karseda varčni z materialom. V poskusih smo uporabili približno 10-krat višjo koncentracijo VaaChi. Predvidevali smo, da bi morali ob tako visokem molarnem presežku zaviralca izmeriti učinek, če ta obstaja. VaaChi je v obeh primerih predstavljal vzorec IIK-2-A, pridobljen z ionsko izmenjevalno kromatografijo 2 (podpoglavlje 3.2.1.1, analizo vzorca prikazuje slika 16A), v katerem je bilo vsaj šest različnih naravnih izoblik VaaChi. rAtxA in VaaChi smo pred aplikacijo v kopel z K-R raztopino skupaj inkubirali 30 min na sobni temperaturi (21–23°C). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 0,845 μM rAtxA, ki je znan zaviralec sproščanja ACh. K-R raztopino smo uporabili kot kontrolo. Meritve izometrične kontrakcije smo na vseh živčno-mišičnih preparatih izvajali po sledečem protokolu:

1. Skupno 24 min zapisa posredno in neposredno izzvane najprej enostavne in nato tetanične mišične kontrakcije, ki so jim ponovno sledile posredno in neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije;
2. 10 min kontrolnega zapisa posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije;

3. aplikacija VaaChi ali predinkubirane mešanice rAtxA in VaaChi v K-R raztopino v kopeli in 150 min zapisa posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije;
4. 5 min zapisa neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije in nato še obeh posredno in neposredno izzvanih tetaničnih kontrakcij;
5. trikratno izpiranje živčno-mišičnega preparata s 4 mL oksigenirane K-R raztopine;
6. 15 min zapisa posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije;
7. 5 min zapisa neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije;
8. zapis posredno in neposredno izzvanih tetaničnih kontrakcij.

V nadaljevanju smo učinek VaaChi na amplitudo neposredno izzvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije preverjali na živčno-mišičnem preparatu po predhodni aplikaciji d-tubokurarina (dTc), ki deluje kot kompetitivni antagonist nAChR (Spirova in sod., 2019). Tako smo ob neposredno izzvani mišični stimulaciji preprečili učinke posredno izzvane mišične stimulacije. Uporabili smo 10 µM koncentracijo dTC in 7 µM koncentracijo VaaChi. Meritve izometrične kontrakcije smo do 3. točke izvajali po enakem protokolu kot pri poskusih brez dTC, ki je opisan zgoraj, v nadaljevanju pa smo jih izvajali po sledečem protokolu:

3. Zapis 10 kontrakcij neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije;
4. aplikacija dTC v K-R raztopino v kopeli in zapis posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije do popolnega zavrtja;
5. zapis 10 kontrakcij neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije;
6. aplikacija VaaChi v K-R raztopino v kopeli in 150 min zapisa neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije;
7. 5 min zapisa posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije in nato še obeh posredno in neposredno izzvanih tetaničnih kontrakcij;
8. trikratno izpiranje živčno-mišičnega preparata s 4 mL oksigenirane K-R raztopine;
9. 15 min zapisa posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije;
10. 10 min zapisa neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije;
11. zapis posredno in neposredno izzvanih tetaničnih kontrakcij.

Za analizo in vidni prikaz registriranih sprememb smo uporabili program pClamp-Clampfit 10.7 (Molecular Devices, Union City, CA, ZDA), ki v realnem času omogoči na zaslonu monitorja prikaz zapisa mišične kontrakcije in njegovo shranjevanje na trdi disk računalnika. Izmerili smo: (i) amplitudo posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije; (ii) amplitudo

neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije; (iii) amplitudo posredno izzvane tetanične mišične kontrakcije in (iv) amplitudo neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije. Vpliv testiranih snovi na amplitudo mišične kontrakcije smo izrazili kot odstotek maksimalne amplitude kontrakcije glede na maksimalno amplitudo kontrakcije pred aplikacijo testirane snovi.

3.2.5.3 Meritve vpliva VaaChi na membranske potenciale mišičnih vlaken izoliranih hemidiafragem miši

Hemidiafragme smo pred izvedbo poskusov 30 min inkubirali v oksigenirani K-R raztopini z dodatkom 2 μ M μ -konotoksina, ki je v sarkolemi zavrl od napetosti odvisne Na^+ kanale. Ob nastanku PMP tako ne nastane AP, mišično vlakno se ne krči in s tem zagotavlja mehansko stabilnost merilne mikroelektrode pri meritvah membranskih potencialov. Hemidiafragmo smo enako kot pri meritvah vpliva na izometrično mišično kontrاكijo pričvrstili na dno s silikonsko prevleko prekrite kopeli za izolirane organe s pomočjo entomoloških igel in kopel napolnili s 3 mL K-R raztopine z dodatkom 2 μ M μ -konotoksina. Tudi tokrat smo preponski živec s pomočjo podtlaka vsesali v sukijsko elektrodo, ki je omogočala posredno električno stimulacijo živca. Z napravo za izdelavo mikropipet P-97 smo pripravili borosilikatne mikroelektrode, napolnjene s 3 M KCl, in uporabili le tiste z uporom od 10 do 20 $\text{M}\Omega$. Mikroelektrodo smo z uporabo natančnega mehanskega mikromanipulatorja nato na območju motorične ploščice uvedli v mišično vlakno in izmerili membranske potenciale. Vrednost mirovnega membranskega potenciala (rV_m) je bila med -55 in -75 mV. Da smo resnično na območju motorične ploščice, smo potrdili s pojavljanjem MPMP v registriranem zapisu. Registrirali smo spontane MPMP in posredno z električno stimulacijo izzvane PMP. Za proženje PMP smo uporabili napetostni stimulator Grass S-48 s parametri stimulacije: supramaksimalni dražljaj 10 V, frekvenca stimulacije živca 0,1 Hz in trajanje pravokotnega napetostnega impulza 0,1 ms. Vse meritve membranskih potencialov mišičnih vlaken so bile opravljene ob neprekinjeni oksigenaciji K-R raztopine pri sobni temperaturi (20–24 °C). Za registracijo in ojačanje merjenih signalov smo uporabili ojačevalnik Axoclamp 900A. Signale smo nato s frekvenco vzorčenja 25 kHz digitalizirali s 16-bitnim analogno-digitalnim pretvornikom Digidata 1440A, krmiljenim s programskim paketom pClamp-Clampfit 10.7 (Molecular Devices, Union City, CA, USA). Meritve potencialov so bile opravljene pred aplikacijo, 30, 90 in 150 min po aplikaciji testirane snovi ter 15 min po izpiranju s K-R raztopino. V vsakem izbranem časovnem obdobju smo

opravili meritve membranskih potencialov na 5–15 mišičnih vlaknih na posamezni hemidiafragmi. Proučevali smo učinek VaaChi pri izbrani 7 µM koncentraciji. Pri kontrolnih meritvah smo namesto izbrane snovi v kopel aplicirali ustrezno količino K-R raztopine. VaaChi je ponovno predstavljal vzorec IIK-2-A, pridobljen z ionsko izmenjevalno kromatografijo 2.

Tudi tokrat smo meritve analizirali s programom pClamp-Clampfit 10.7. Določali smo: (i) rV_m , (ii) amplitudo in razpolovni čas PMP; (iii) amplitudo in razpolovni čas MPMP ter (iv) frekvenco MPMP. Uporabili smo absolutne vrednosti navedenih parametrov.

3.2.6 Analiza podatkov in statistika

S programom pClamp-Clampfit 10.7 smo analizirali rezultate meritev mišičnih kontrakcij in membranskih potencialov. Za statistično analizo pridobljenih vrednosti in izdelavo grafov smo uporabili programa SigmaPlot za Windows 11.0 (Systat Software Inc., Erkrath, Nemčija) in GraphPad Prism7 (GraphPad Software, San Diego, CA, ZDA).

Rezultati zaviranja tripsinske aktivnosti, zaviranja aktivnosti kimotripsina, vpliva VaaChi na encimsko aktivnost naravnega AtxA, encimske aktivnosti očiščenega rAtxA in rezultati meritev mišične kontrakcije, razen amplitude neposredno izvvane enostavne mišične kontrakcije, so predstavljeni kot srednja vrednost deleža amplitude mišične kontrakcije \pm S.E. Vrednosti amplitude neposredno izvvane enostavne mišične kontrakcije in vrednosti membranskih potencialov (rV_m , amplituda PMP in MPMP, razpolovni čas padajoče faze PMP in MPMP ter frekvanca MPMP na min) niso bile normalno porazdeljene, zato so rezultati predstavljeni z mediano in grafikoni kvartilov.

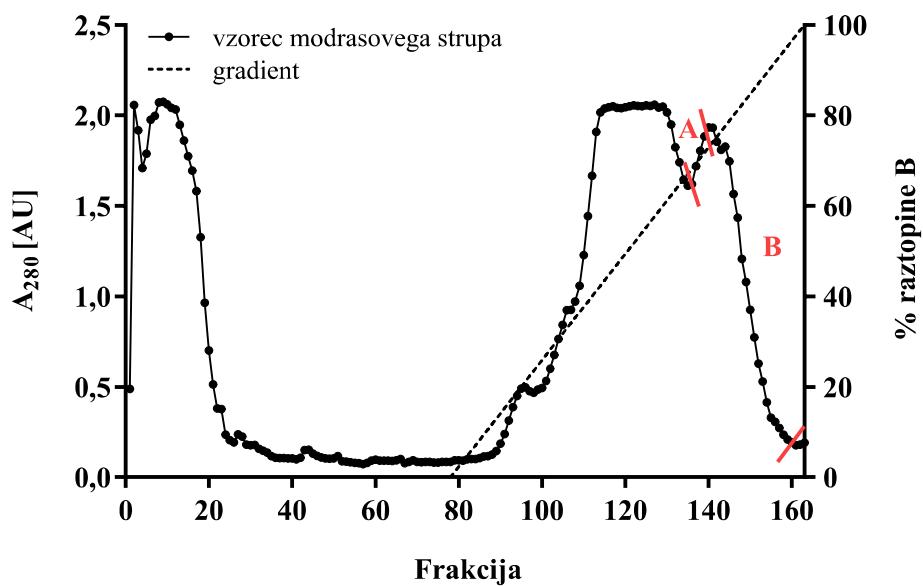
Vrednosti smo najprej analizirali s testom normalnosti porazdelitve (Shapiro-Wilk). Če so bile te normalno porazdeljene, smo za statistično analizo uporabili Studentov t-test, pri čemer je $p \leq 0,05$ štel za statistično značilen. Vrednosti, ki niso bile normalno porazdeljene, smo analizirali s testom Mann-Whitney, ki se pogosto uporablja kot neparametrična alternativa t-testa. Omenjeni statistični analizi smo izbrali, ker je bila za potrditev dejanskih učinkov VaaChi in predinkubirane mešanice rAtxA in VaaChi pomembna le primerjava vrednosti s kontrolo v istem časovnem obdobju.

Za izračun statistično značilnih razlik povprečnih vrednosti amplitude mišične kontrakcije med skupinami smo uporabili enosmerno analizo variance, pri čemer je $p \leq 0,05$ štel za statistično značilen. Statistično značilne razlike za pare skupin smo pri normalno porazdeljenih vrednostih spremenljivk izračunali s post hoc Holm-Sidak testom, pri čemer je bila mejna vrednost $p \leq 0,001$. Zaradi nenormalne porazdelitve numeričnih spremenljivk smo za neposredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo uporabili Kruskal-Wallis enosmerno analizo variance, statistično značilne razlike za pare skupin pa smo izračunali z neparametričnim post hoc Dunn testom, pri čemer je bila mejna vrednost $p \leq 0,05$.

4 REZULTATI

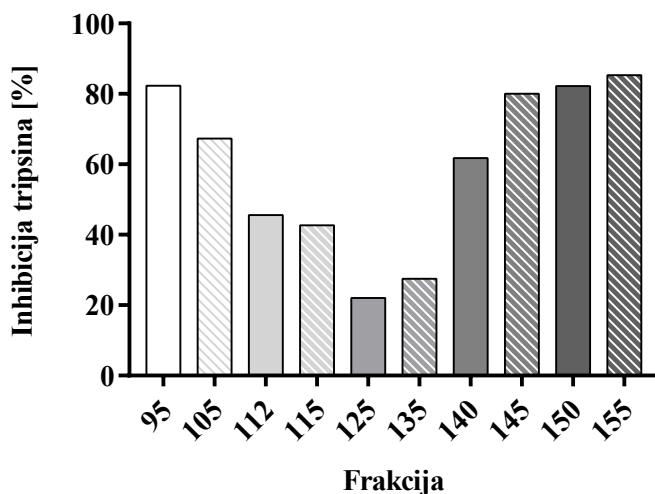
4.1 IZOLACIJA VaaChi IZ STRUPA MODRASA

Prva stopnja izolacije VaaChi iz surovega modrasovega strupa je bila ionska izmenjevalna kromatografija 1 (IIK-1), s katero smo ločili proteine iz skupno 4 g strupa, kot prikazuje slika 9. Kromatografijo smo izvedli po postopku, opisanem v podpoglavlju 3.2.1.1. V prvem vrhu so nevezani proteini, vezani pa so se izprali v nekaj med seboj slabo ločenih vrhovih. Vezane proteine smo testirali na sposobnost zaviranja aktivnosti tripsina (slika 10), kot je opisano v podpoglavlju 3.2.1.4. Največjo zaviralno aktivnost so imeli proteini v frakcijah 95 (82,4 %), 145 (80,1 %), 150 (82,2 %) in 155 (85,3 %). Ker smo sklepali, da sta za visoko zaviralno aktivnost frakcije 95 odgovorna v njej prisotna tripsinska zaviralca (VaaTi), ki se z ionsko izmenjevalno kromatografijo izpereta pred kimotripsinskim zavircem (Ritonja in sod., 1983c), smo v posamična vzorca združili le aktivne frakcije zadnjega vrha na sliki 9. Frakcije 136–139 smo združili v vzorec IIK-1-A, 140–160 pa v vzorec IIK-1-B.



Slika 9: **Ionska izmenjevalna kromatografija 1 modrasovega strupa.** 4 g modrasovega strupa smo nanesli na kolono, ki je bila velika $23 \text{ cm} \times 1,5 \text{ cm}$ (dolžina \times premer) in je vsebovala 80 mL gela SP Sepharose Fast Flow. Nevezane proteine smo izprali s pufrom A, vezane pa z gradientom 0–100-odstotnega pufra B pri pretoku 42 mL/min. Avtomatični zbiralnik je zbiral frakcije z volumnom 7 mL, ki smo jim izmerili absorbenco pri 280 nm (A_{280}) in jih testirali na sposobnost zaviranja tripsina. Zaviralno aktivne frakcije zadnjega vrha 136–139 smo združili v vzorec IIK-1-A, 140–160 pa v vzorec IIK-1-B. Postopek je podrobno opisan v podpoglavlju 3.2.1.1.

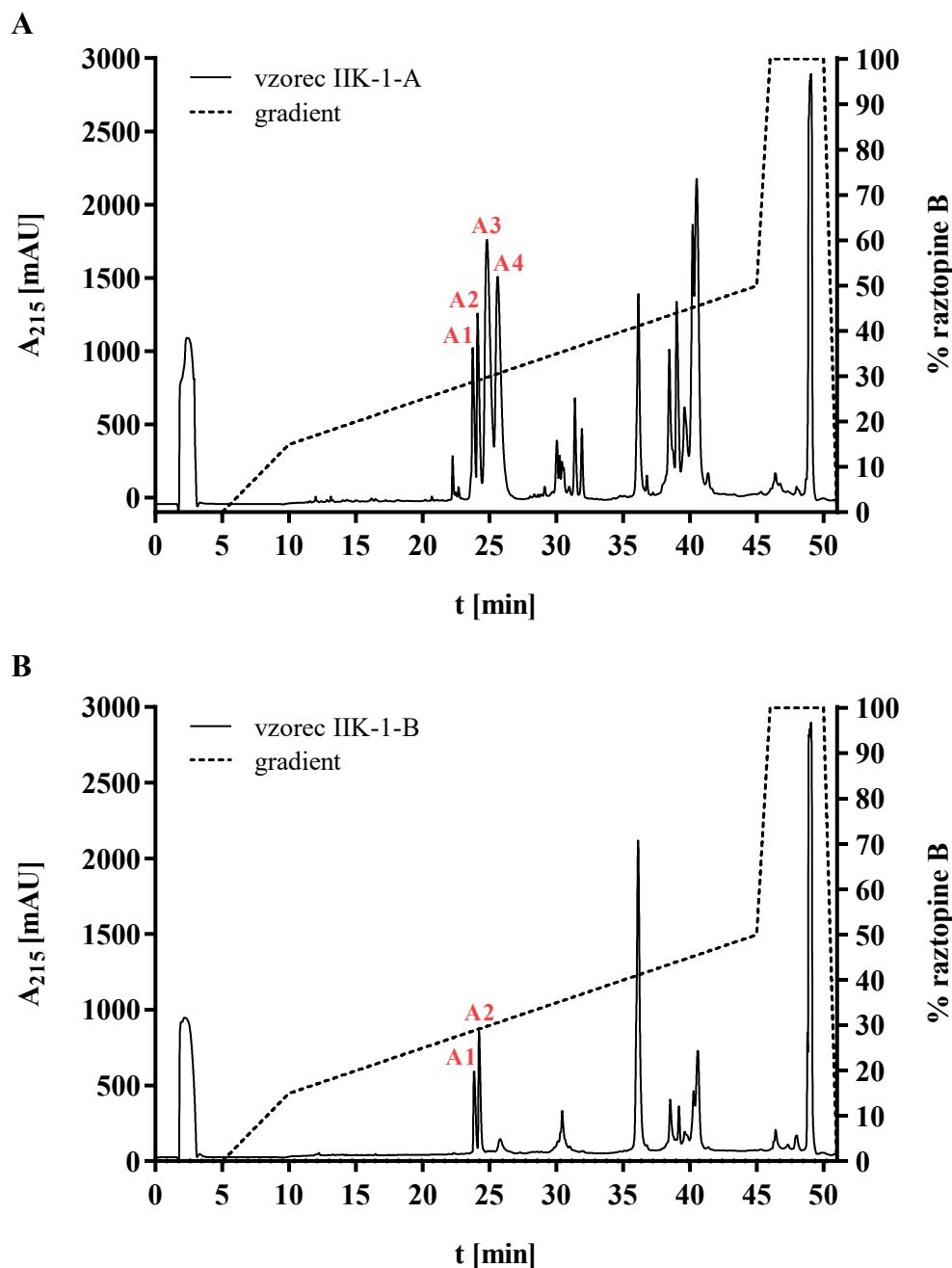
Figure 9: **Ion exchange chromatography 1 of nose-horned viper venom.** 4 g of nose-horned viper venom was applied to a column with dimensions of 23 cm × 1,5 cm (length × diameter) containing 80 mL of SP Sepharose Fast Flow gel. Unbound proteins were washed with buffer A, whereas bound proteins were washed with a gradient of 0–100 % buffer B at a flow rate of 42 mL/min. The automatic fraction collector collected 7 mL fractions. We measured absorbance of the fractions at 280 nm (A_{280}) and tested them for trypsin inhibition. Inhibitory active fractions of the last peak 136–139 were combined into sample IIK-1-A, and fractions 140–160 were combined into sample IIK-1-B. The procedure is described in detail in section 3.2.1.1.



Slika 10: **Zaviranje tripsinske aktivnosti frakcij.** Proteine v posameznih frakcijah, pridobljene z ionsko izmenjevalno kromatografijo 1, smo testirali na sposobnost zaviranja aktivnosti tripsina, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.1.4. Delež zaviranja v odstotkih je bil izračunan glede na kontrolni vzorec, tj. aktivnost tripsina brez zaviralca. Najvišjo zaviralo aktivnost smo določili v frakcijah 95, 145, 150 in 155. Meritve smo izvedli samo enkrat brez ponovitev. Postopek je podrobno opisan v podpoglavlju 3.2.1.4.

Figure 10: **Inhibition of trypsin activity by fractions.** Proteins in individual fractions obtained by ion exchange chromatography 1 were tested for their ability to inhibit trypsin activity as described in section 3.2.1.4. The percent inhibition was calculated according to the control sample, i.e., the activity of trypsin without inhibitor. The highest inhibitory activity was determined in fractions 95, 145, 150 and 155. Measurements were performed only once without repetition. The procedure is described in detail in section 3.2.1.4.

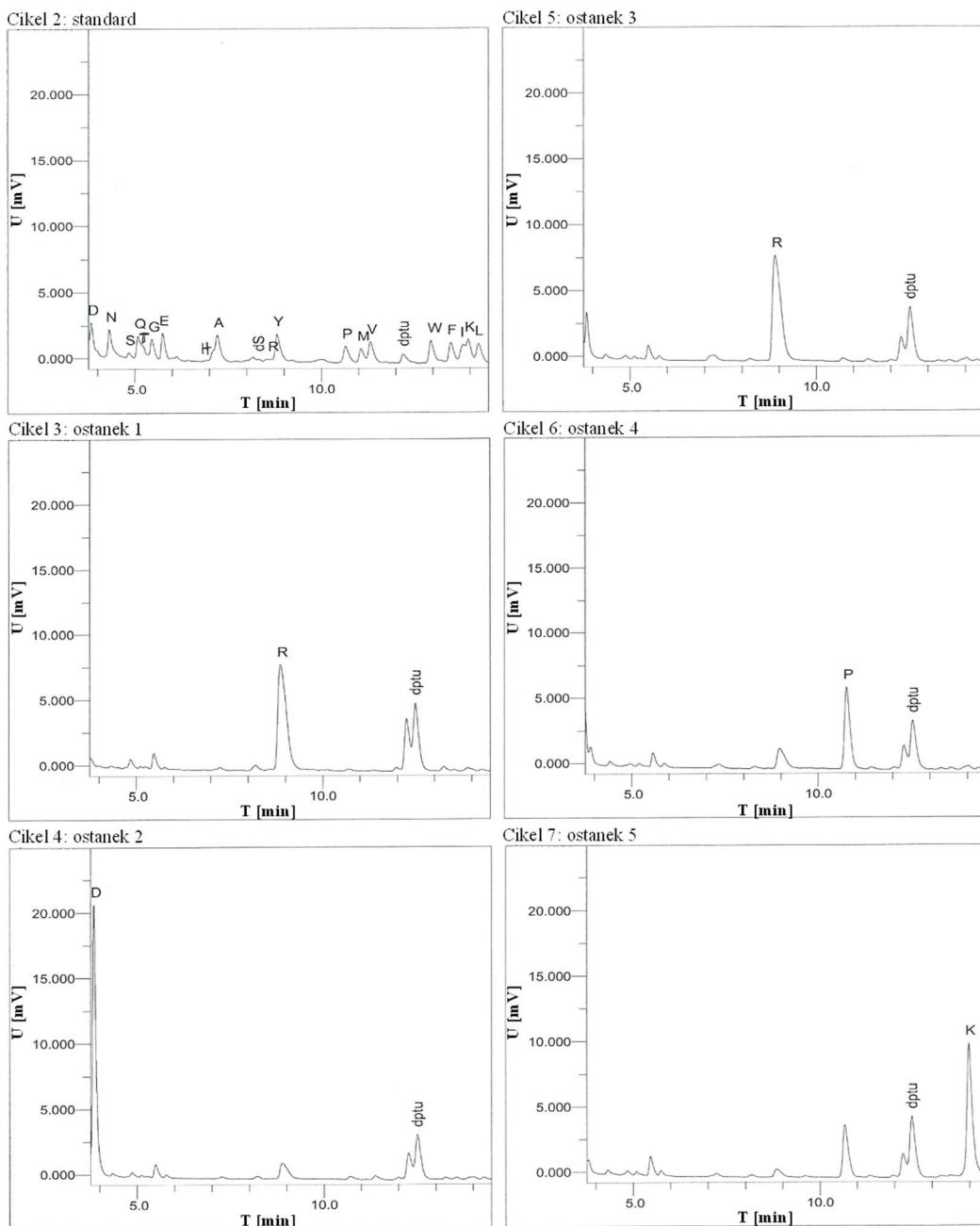
Vzorca IIK-1-A in IIK-1-B smo v analitske namene, za preverjanje sestave in čistosti, naprej ločevali z metodo RP-HPLC na koloni BIOshell A400 protein (C4), po postopku opisanem v podpoglavlju 3.2.1.3. Kromatograma analiz sta prikazana na sliki 11, iz katerih je razvidno, da oba vzorca vsebujeta primesi drugih proteinov.



Slika 11: Analiza vzorcev IIK-1-A in IIK-1-B z metodo RP-HPLC. Vzorca (A) IIK-1-A in (B) IIK-1-B smo ločevali na koloni BIOshell A400 protein (C4), uravnoteženi z raztopino D. Vezane proteine smo izprali z gradientom raztopine E, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.1.3. Izpiranje proteinov smo spremljali z merjenjem absorbance pri 215 nm (A_{215}). Z N-terminalnim sekveniranjem smo pokazali, da so VaaChi prisotni v vrhovih HPLC-1-A1 do A4 in HPLC-2-A1 do A2. Vrhova HPLC-1-A1 in HPLC-2-A1 imata v obeh analizah enak retencijski čas, kar verjetno pomeni, da vsebujejo enake ali zelo podobne proteine, enako pa velja tudi za vrhova HPLC-1-A2 in HPLC-2-A2, ki imata prav tako enak retencijski čas.

Figure 11: Analysis of samples IIK-1-A and IIK-1-B by RP-HPLC. Samples (A) IIK-1-A and (B) IIK-2-B were separated on a BIOshell A400 protein (C4) column equilibrated with solution D. Bound proteins were eluted with a gradient of solution E as described in section 3.2.1.3. Protein elution was monitored by absorbance measurements at 215 nm (A_{215}). N-terminal sequencing showed that VaaChi were present in the peaks of HPLC-1-A1 to A4 and HPLC-2-A1 to A2. Peaks HPLC-1-A1 and HPLC-2-A1 have the same retention time in both analysis, which suggests that they contain identical or very similar proteins and the same applies to peaks HPLC-1-A2 and HPLC-2-A2, which also have the same retention time.

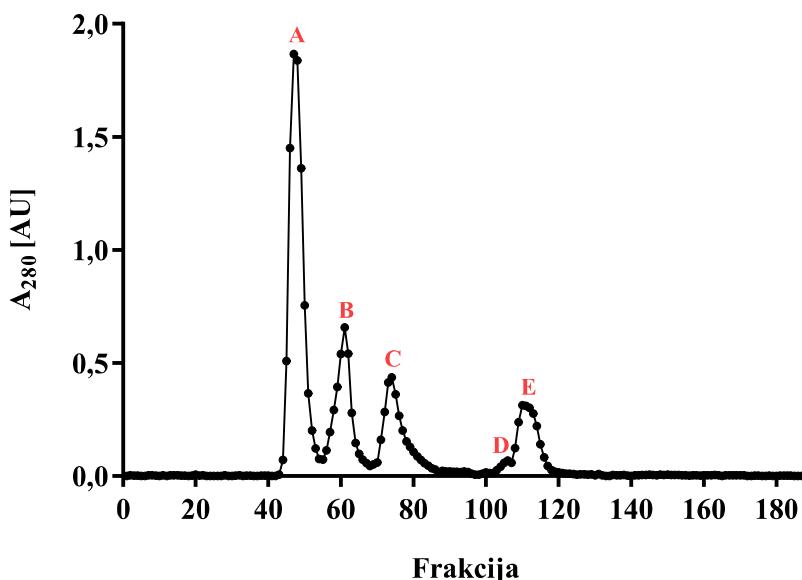
Z Edmanovo metodo, ki je opisana v podpoglavlju 3.2.1.8, smo nato določili aminokislinsko zaporedje na N-koncu izoliranih proteinov. Prisotnost čistih zaviralcev smo potrdili v vrhovih HPLC, ki so na sliki 11 označeni z A1–A4. Vsi so imeli zaporedje Arg-Asp-Arg-Pro-Lys (RDRPK), kar ustreza predhodno določenemu aminokislinskemu zaporedju VaaChi iz strupa modrasa. Na sliki 12 je primer kromatograma Edmanovega sekveniranja vzorca HPLC-2-A1, iz katerega je razvidno, da vzorec ne vsebuje primesi drugih proteinov.



Slika 12: **Analiza N-končnega aminokislinskega zaporedja vzorca HPLC-2-A1.** Uporabili smo metodo Edmanove razgradnje (podpoglavlje 3.2.1.8). Prikazanih je šest kromatogramov. Cikel 2 prikazuje standardne aminokisline oziroma pripadajoče feniltiohidantoinske (PTH) derivate, ki so produkt Edmanove razgradnje in s pomočjo katerih glede na retencijski čas določimo odcepljene PTH-derivate aminokislín preiskovanega vzorca v posameznem ciklu. Standardne aminokisline so označene z dogovorjenim enočrkovnim zapisom. Cikli 3, 4, 5, 6 in 7 prikazujejo po vrsti odcepljene posamezne aminokisline. Določeno zaporedje, Arg-Asp-Arg-Pro-Lys (RDRPK), je identično N-končnemu zaporedju VaaChi.

Figure 12: Analysis of the N-terminal amino acid sequence of the HPLC-2-A1 sample. Edman degradation method was used for this analysis (section 3.2.1.8). Six chromatograms are shown. Cycle 2 shows the standard amino acids or the corresponding phenylthiohydantoin (PTH) derivatives, which were the product of Edman degradation. The separated PTH derivatives of the examined sample in a respective cycle were determined by retention time and are named using the standard single-letter amino acid code. Cycles 3, 4, 5, 6 and 7 show consecutively separated amino acids. The determined sequence, Arg-Asp-Arg-Pro-Lys (RDRPK), was identical to the N-terminal sequence of VaaChi.

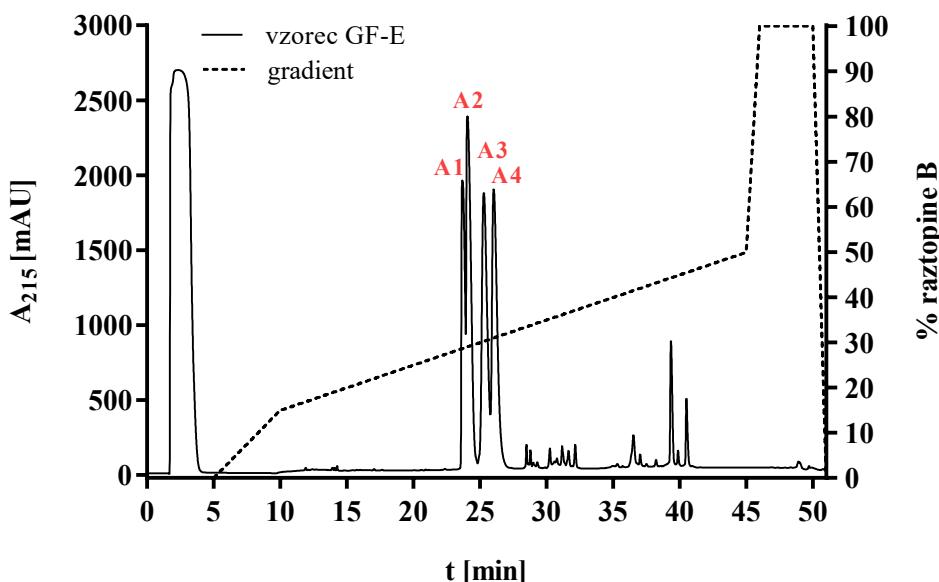
Ker smo v vzorcih IIK-1-A in IIK-1-B dokazali prisotnost VaaChi, smo ju združili ter skoncentrirali in dializirali, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.1.9. Nato smo združene proteine ločevali po molekulskih masah z gelsko filtracijo (GF) v pufru C (podpoglavlje 3.2.1.2). Dobili smo pet lepo ločenih vrhov z različno intenziteto, ki smo jih poimenovali GF-A do E (slika 13).



Slika 13: Gelska filtracija vzorca VaaChi po IIK-1. Vzorca IIK-1-A in IIK-1-B smo združili, skoncentrirali in nanesli na kolono, ki je bila velika 110 cm × 3,8 cm (dolžina × širina) in je vsebovala gel Sephadryl S-200 HR, uravnotežen s pufrom C. Proteine smo izpirali z istim pufrom pri pretoku 33,6 mL/h, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.1.2. Frakcijam smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 280 nm (A₂₈₀) in jih združili v pet vrhov, označenih GF-A do E.

Figure 13: Gel filtration of the VaaChi sample obtained by IIK-1. Samples IIK-1-A and IIK-1-B were combined, concentrated and applied to a 110 cm × 3,8 cm (length × width) column containing Sephadryl S-200 HR gel equilibrated with buffer C. Proteins were eluted with the same buffer at a flow rate of 33,6 mL/h, as described in section 3.2.1.2. The absorbance of the fractions was measured at 280 nm (A₂₈₀). The sample was separated into five peaks named GF-A to E.

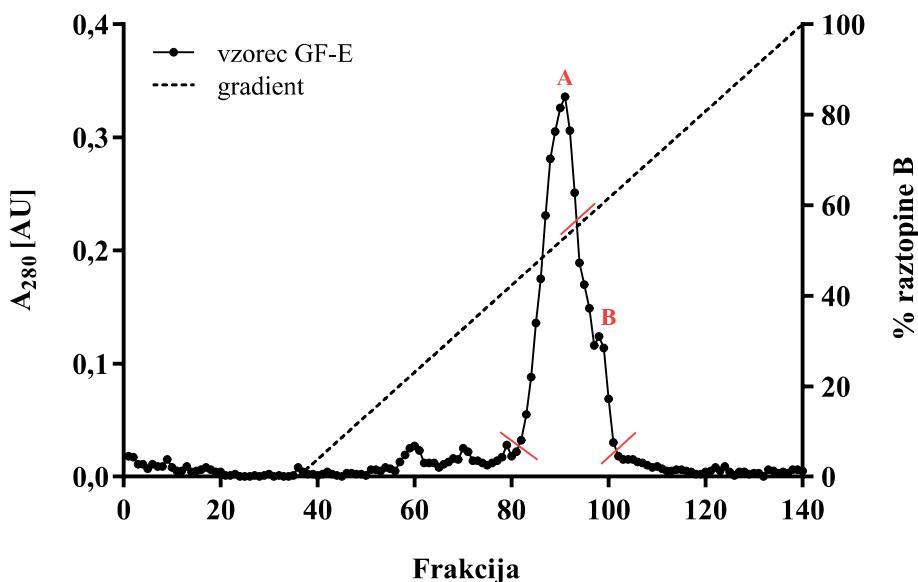
Glede na molekulsko maso VaaChi smo te pričakovali v zadnji frakciji, GF-E. Združene frakcije tega vrha smo zato analizirali z RP-HPLC na koloni C4, kot je opisano zgoraj. Kot lahko vidimo na sliki 14, se je vzorec VaaChi ponovno ločil v štiri vrhove (HPLC-3-A1 do A4), vendar je veliko manj primesi drugih proteinov.



Slika 14: Analiza RP-HPLC vzorca GF-E. Sestava mobilne faze je prikazana kot vsebnost topila E (0,1 % (v/v) TFA, 90 % (v/v) acetonitril) v topilu D (0,1 % (v/v) TFA) v odvisnosti od časa. Kolono smo izpirali pri pretoku 0,8 mL/min. Izpiranje proteinov smo spremljali z merjenjem absorbance pri 215 nm (A_{215}). Štiri ločene vrhove VaaChi z retencijskimi časi med 23,6 in 26,7 min smo poimenovali HPLC-3-A1 do A4.

Figure 14: **RP-HPLC analysis of the GF-E sample.** The composition of the mobile phase is shown as the percent of solvent E (0,1 % (v/v) TFA, 90 % (v/v) acetonitrile) in solvent D (0,1 % (v/v) TFA), as a function of time. The column was washed at a flow rate of 0,8 mL/min. The elution of proteins was monitored by measuring the absorbance at 215 nm (A_{215}). Four separated VaaChi peaks with retention times between 23,6 and 26,7 min were named HPLC-3-A1 to A4.

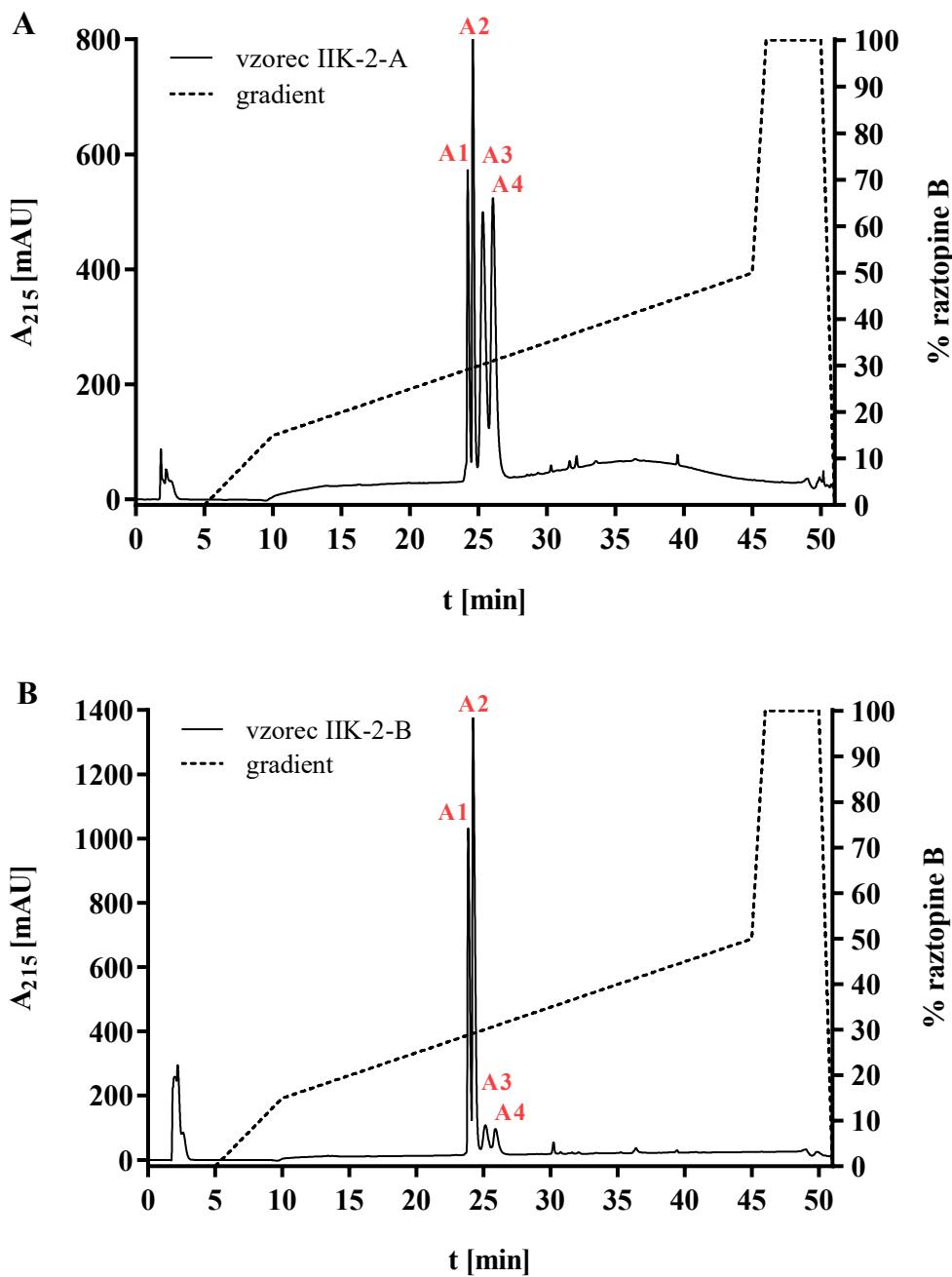
Z gelsko filtracijo pridobljen vzorec GF-E smo nato skoncentrirali in dializirali po postopku, ki je opisan v podpoglavlju 3.2.1.9. Zadnji korak izolacije VaaChi je bila ionska izmenjevalna kromatografija 2 (IIK-2), ki smo jo izvedli na ionskem izmenjevalcu SP Sepharose Fast Flow po postopku, opisanem v podpoglavlju 3.2.1.1. Frakcijam smo izmerili A_{280} in jih združili v vrhova IIK-2-A in IIK-2-B, kot prikazuje slika 15.



Slika 15: Ionska izmenjevalna kromatografija 2. Vzorec GF-E smo nanesli na kolono, ki je bila velika $18\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ (dolžina \times premer) in je vsebovala 20 mL gela SP Sepharose Fast Flow. Pred nanosom vzorca smo kolono uravnotežili s pufrom A pri pretoku 42 mL/min. Nevezane proteine smo s kolone izprali s pufom A, vezane pa z linearnim gradientom pufra B. Frakcijam z volumnom približno 3,5 mL smo izmerili absorbenco pri 280 nm (A_{280}). Frakcije 82–93 smo združili v vzorec IIK-2-A, frakcije 94–101 pa v vzorec IIK-2-B.

Figure 15: **Ion exchange chromatography 2.** The GF-E sample was applied to an $18\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ (length \times diameter) column containing 20 mL of SP Sepharose Fast Flow gel. Prior to sample application, the column was equilibrated with buffer A at a flow rate of 42 mL/min. The unbound proteins were washed from the column with buffer A, while the bound proteins were washed with a linear gradient of buffer B. The absorbances of the fractions with a volume of approximately 3,5 mL were measured at 280 nm (A_{280}). Tubes 82–93 and 94–101 were combined to form samples IIK-2-A and IIK-2-B, respectively.

Vrhova IIK-2-A in IIK-2-B smo nato ločeno skoncentrirali in dializirali, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.1.9. Vzorci smo v nadaljevanju v analitske namene ponovno ločevali z RP-HPLC na koloni C4. Kromatograma analiz RP-HPLC sta prikazana na sliki 16. V vzorcu IIK-2-A so posamezni vrhovi VaaChi prisotni v podobnih količinah, medtem ko v vzorcu IIK-2-B prevladujejo prva dva.

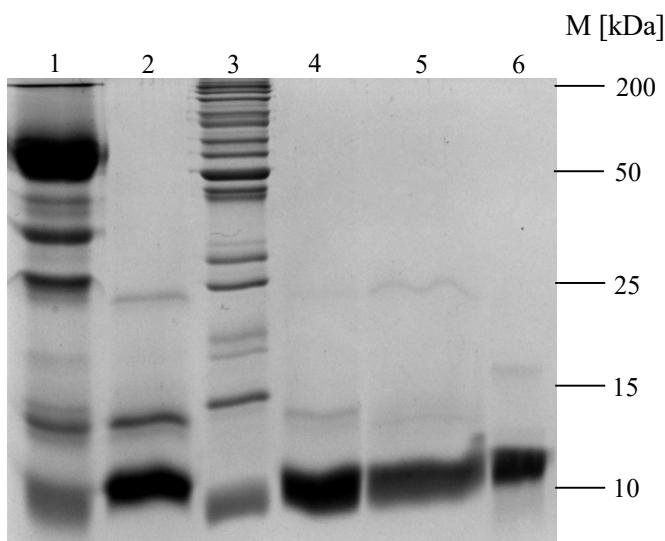


Slika 16: Analiza RP-HPLC vzorcev IIK-2-A in IIK-2-B. Vzorca smo analizirali na koloni BIOshell A400 protein (C4), uravnoteženi z raztopino D pri pretoku 0,8 mL/min. Vezane proteine smo izpirali z gradientom topila E ob sprotinem merjenju absorbance pri 215 nm (A_{215}). (A) Vzorec IIK-2-A se je ločil v štiri vrhove HPLC-4-A1 do A4 s podobno intenziteto. (B) Vzorec IIK-2-B se je prav tako ločil v štiri vrhove HPLC-5-A1 do A4, od katerih prevladujeta prva dva.

Figure 16: RP-HPLC analysis of samples IIK-2-A and IIK-2-B. The samples were analysed on a BIOshell A400 protein (C4) column equilibrated with solution D at a flow rate of 0,8 mL/min. Bound proteins were eluted with a gradient of solvent E while continuously measuring the absorbance at 215 nm (A_{215}). (A) The IIK-2-A sample was

separated into four peaks, HPLC-4-A1 to A4, of similar intensity. (B) The IIK-2-B sample was also separated into four peaks, HPLC-5-A1 to A4, of which the first two predominated.

Čistost VaaChi po posamezni stopnji čiščenja smo preverili tudi z analizo NaDS-PAGE posameznih vrhov (slika 17), kot je opisano v podpoglavlju 3.2.1.7. Kot referenčni vzorec smo uporabili vzorec VaaChi, ki ga je leta 1983 izolirala dr. Anka Ritonja. Na sliki se vidi, da je vzorec VaaChi po IIK-1 (steza 1) vseboval veliko proteinov z višjimi molekulskimi masami, ki smo jih uspešno ločili z GF (steza 2). Preostanek nečistoč smo nato odstranili z IIK-2 (stezi 4 in 5).

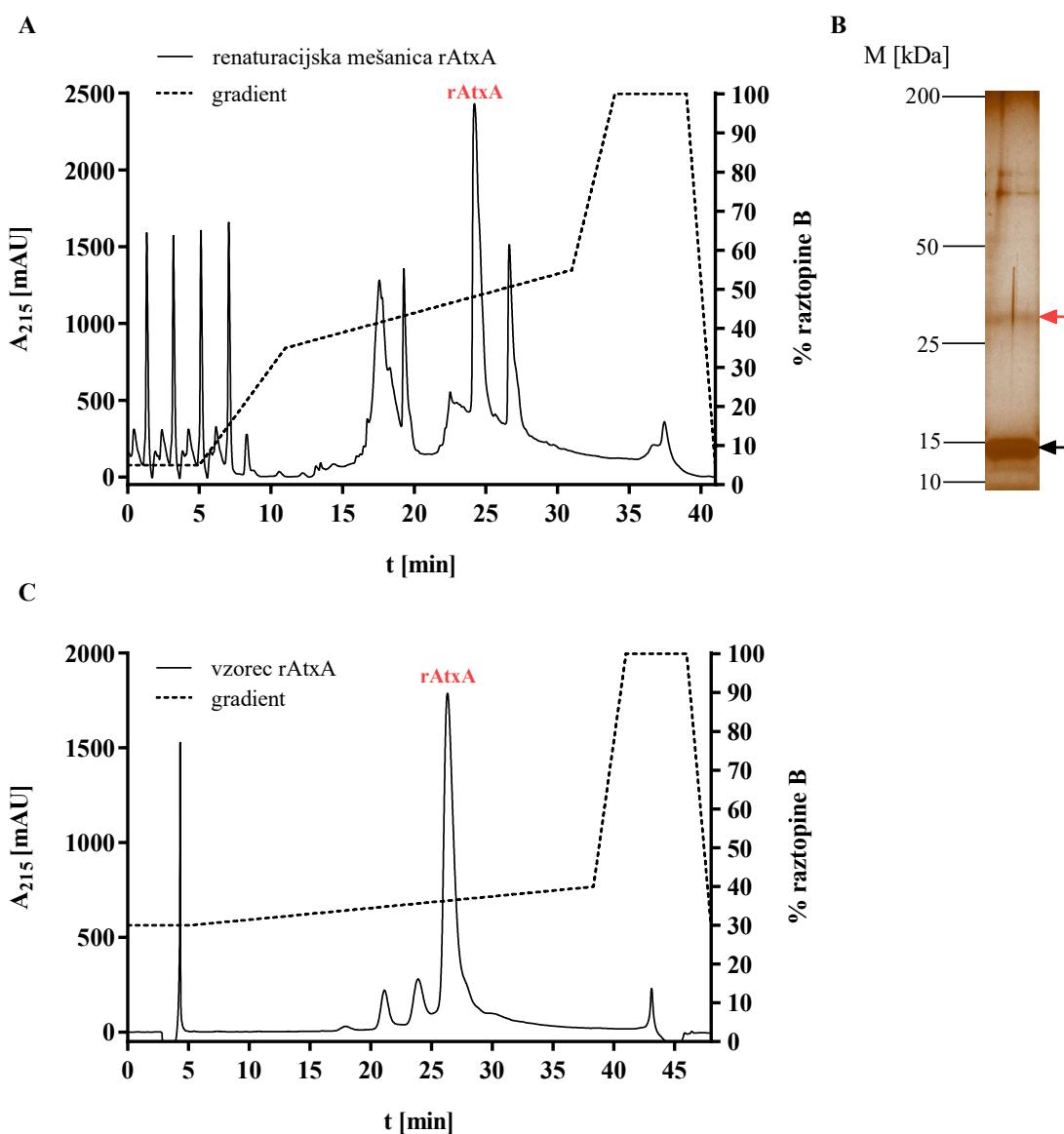


Slika 17: Preverjanje čistosti različnih frakcij z VaaChi z NaDS-PAGE. Vzorce smo analizirali z NaDS-PAGE na 15-odstotnem poliakrilamidnem gelu pod redukcijskimi pogoji. Steza 1 – združena vzorca IIK-1-A in IIK-1-B, pridobljena z ionsko izmenjevalno kromatografijo 1; steza 2 – vzorec GF-E, pridobljen z gelsko filtracijo; steza 3 – proteinski standardi, veliki od 10 do 200 kDa; steza 4 – vzorec IIK-2-A, pridobljen z ionsko izmenjevalno kromatografijo 2; steza 5 – vzorec IIK-2-B, pridobljen z ionsko izmenjevalno kromatografijo 2; steza 6 – referenčni vzorec VaaChi.

Figure 17: Purity checking of the VaaChi-containing fractions with NaDS-PAGE. Samples were analysed by NaDS-PAGE on a 15 % polyacrylamide gel under reducing conditions. Lane 1 – combined samples IIK-1-A and IIK-1-B obtained by ion exchange chromatography 1; lane 2 – sample GF-E obtained by gel filtration; lane 3 – protein marker in the range from 10 to 200 kDa; lane 4 – sample IIK-2-A obtained by ion exchange chromatography 2; lane 5 – sample IIK-2-B obtained by ion exchange chromatography 2; lane 6 – reference VaaChi sample.

4.2 ČIŠČENJE IN KARAKTERIZACIJA rAtxA

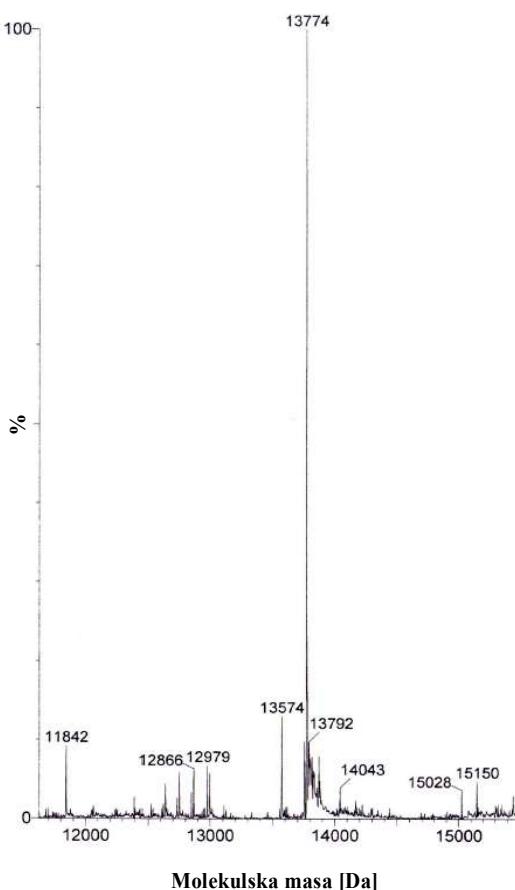
Vzorec renaturacijske mešanice rAtxA smo čistili na koloni C3 RP-HPLC sistema (podpoglavlje 3.2.2.1) po že uveljavljenem postopku. Iz kromatograma na sliki 18A je razvidno, da se je ta izpral z retencijskim časom 24,2 min oziroma pri 50 % (v/v) topila E. Izprano frakcijo rAtxA smo nato analizirali z NaDS-PAGE. Gel smo obarvali s koloidnim srebrom (slika 18B). Dokazali smo protein, velik 14 kDa (črna puščica), kar ustreza velikosti AtxA, in njegov homodimer, velik 28 kDa (rdeča puščica). Na podlagi rezultata obeh metod smo se odločili za nadaljnje čiščenje rAtxA, saj je vzorec še vedno vseboval primesi drugih proteinov. Čiščenje rAtxA smo nadaljevali na koloni C18 po postopku, opisanem v podpoglavlju 3.2.2.1. rAtxA se je tokrat izpral z retencijskim časom 26,3 min oziroma pri 37 % (v/v) topila E (slika 18C).



Slika 18: **Čiščenje rAtxA.** Z metodo RP-HPLC smo čistili vzorec renaturacijske mešanice rekombinantno pridobljenega AtxA, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.2.1. (A) Kolono C3 smo pred nanosom vzorca uravnotežili z raztopino D pri pretoku 2 mL/min. Vezane proteine smo izpirali z gradientom topila E, njihovo izpiranje pa smo spremljali z merjenjem absorbance pri 215 nm (A_{215}). rAtxA se izpere z retencijskim časom 24,2 min. (B) Izprano frakcijo rAtxA smo analizirali z NaDS-PAGE na 15-odstotnem poliakrilamidnem gelu pod neredukcijskimi pogoji. Proteine v gelu smo obarvali s koloidnim srebrom. Monomerni rAtxA z maso 14 kDa je označen s črno puščico, njegov homodimer, velik 28 kDa, pa z rdečo. (C) Vzorec rAtxA, pridobljen s čiščenjem na koloni C3, smo dodatno čistili na koloni C18. Vezane proteine smo izprali z gradientom topila E, rAtxA pa se je izpral z retencijskim časom 26,3 min.

Figure 18: **Purification of rAtxA.** Recombinantly obtained AtxA was purified from the renaturation mixture using the RP-HPLC method as described in section 3.2.2.1. (A) Before applying the sample, column C3 was equilibrated with solution D at a flow rate of 2 mL/min. Bound proteins were washed with a gradient of solvent E, and the elution was monitored by measuring the absorbance at 215 nm (A_{215}). rAtxA eluted with a retention time of 24,2 min. (B) The eluted rAtxA fraction was analysed by NaDS-PAGE on a 15 % polyacrylamide gel under non-reducing conditions. The proteins in the gel were stained with colloidal silver. The monomeric rAtxA with a molecular mass of 14 kDa and its homodimer with a molecular mass of 28 kDa are indicated by black and red arrows, respectively. (C) The AtxA sample obtained by purification on a C3 column was further purified on a C18 column. Bound proteins were eluted with a gradient of solvent E, and rAtxA eluted with a retention time of 26,3 min.

Molekulsko maso in stopnjo čistosti pridobljenega rAtxA smo preverili z MS na instrumentu Q-TOF Premier, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.3.1. S slike 19 je razvidno, da v vzorcu prevladuje protein z molekulsko maso 13774 Da, kar ustreza molekulski masi AtxA.

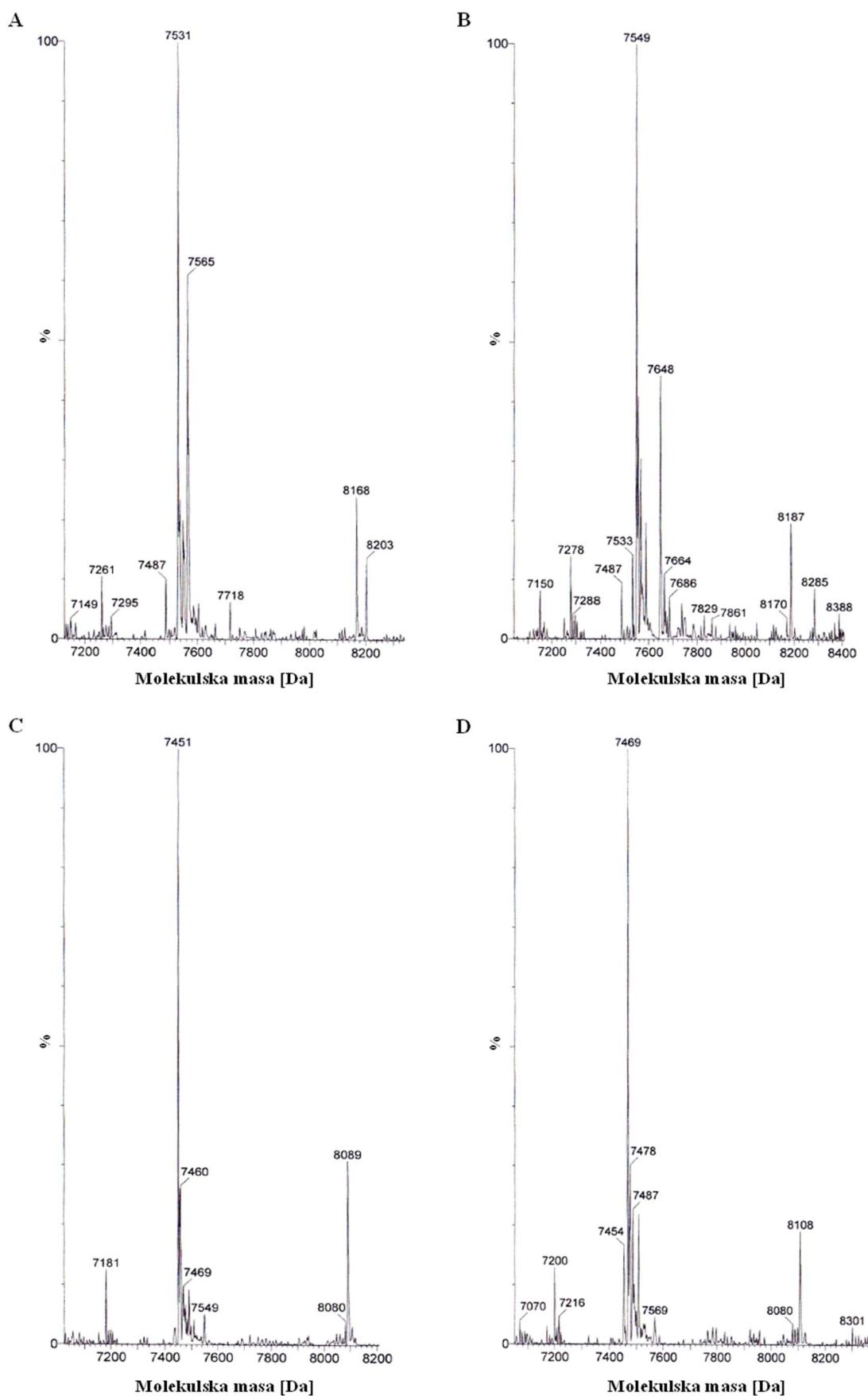


Slika 19: Preverjanje mase in čistosti rAtxA z MS. V vzorcu prevladuje protein z molekulsko maso 13774 Da, to je molekulsko maso AtxA.

Figure 19: **Mass and purity verification of rAtxA by MS.** The predominant protein in the sample was a protein with a molecular mass of 13774 Da, which is the same molecular mass as that of AtxA.

4.3 DOLOČITEV MOLEKULSKE MASE IN DELNEGA AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA IZOLIRANIM ZAVIRALCEM SERINSKIH PROTEAZ

Štirim vzorcem VaaChi, ki smo jih izolirali s HPLC-3 (slika 14), smo določili molekulsko maso z MS analizo, opisano v podpoglavlju 3.2.3.1. Kot lahko vidimo na sliki 20, v vzorcu HPLC-3-A1 prevladujeta proteina z molekulskima masama 7531 in 7565 Da, v vzorcu HPLC-3-A2 proteina z molekulskima masama 7549 in 7648 Da, v vzorcu HPLC-3-A3 protein z molekulsko maso 7451 Da in v vzorcu HPLC-3-A4 protein z molekulsko maso 7469 Da.



Slika 20: Preverjanje mase in čistosti VaaChi z MS. Vzorci HPLC-3-A1 do A4 vsebujejo več izoblik VaaChi, ki se med seboj razlikujejo po molekulski masi. V vzorcu (A) HPLC-3-A1 prevladujeta proteina z molekulskima masama 7531 in 7565 Da, v vzorcu (B) HPLC-3-A2 pa proteina z masama 7549 in 7648 Da. V vzorcih (C) HPLC-3-A3 in (D) HPLC-3-A4 prevladuje po en protein z molekulsko maso 7451 Da oz. 7469 Da.

Figure 20: Mass and purity verification of VaaChi by MS. Samples HPLC-3-A1 to A4 contain several VaaChi isoforms that differ in their molecular masses. In (A) HPLC-3-A1, the dominant molecular masses are 7531 and 7565 Da, whereas in (B) HPLC-3-A2, 7549 and 7648 Da dominate. In both (C) HPLC-3-A3 and (D) HPLC-3-A4, there is only one dominant protein with molecular mass of 7451 and 7469 Da, respectively.

Vzorce VaaChi HPLC-4-A1 do A4 (slika 16A) smo razgradili s tripsinom in nastale peptide analizirali z MS, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.3.2. Zbrane MS in MS/MS spektre smo primerjali z bazo proteinskih zaporedij UniProt in določili peptidne sekvence. Rezultati so zbrani v tabeli 12. V vseh analiziranih vzorcih smo določili le VaaChi, kar je potrdilo njihovo čistost. V vzorcih A1 in A2 smo določili več različnih izoblik zaviralca, od katerih sta bili dve, VaaChi (0909196A) in VaaChi-3 (P00992), že prej določeni na proteinski ravni, druge pa le na nukleotidni. V vzorcih A3 in A4 smo določili le po en peptid iz VaaChi-3 (P00992). Molekulska masa 7469 Da (frakcija A4) ustreza teoretični masi določeni za to izobliko.

Tabela 12: Strukturna karakterizacija VaaChi.

Table 12: Structural characterization of VaaChi.

| HPLC-4 frakcija | Molekulski masa [Da] | N-končno zaporedje | MS peptidne sekvence | Določeni proteini | UniProt-številka proteina |
|-----------------|----------------------|--------------------|---|-------------------|--|
| A1 | 7531, 7565 | RDRPK | FCYLPADPGR FYYNPASNK TWDECRHTCVASGIQPR | VaaChi | 0909196A |
| | | | FCYLPADPGR CLAYMPSFYDSASNK TWDECRHTCVASGIQPR | VaaChi-3 | P00992 |
| | | | FCYLPADPGR FYYNPASNK EFIYGGCRGNANNFK TWDECRHTCVASGIQPR | cVaaChi-2 | A0A1S5QJK2 |
| A2 | 7549, 7648 | RDRPK | FCYLPADPGR FYYNPASNKCEKFIYGGCR GNANNFKTWDECR GNANNFKTWDECRHTCVASGIQPR TWDECRHTCVASGIQPR | VaaChi | 0909196A |
| | | | FCYLPADPGR CLAYMPSFYDSASNK GNANNFKTWDECR GNANNFKTWDECRHTCVASGIQPR TWDECRHTCVASGIQPR | VaaChi-3 | P00992 |
| | | | FCYLPADPGR CKEFIYGGCRGNANNFK GNANNFKTWDECR | cVaaChi-2,-3,-5 | A0A1S5QJK2, A0A1S5QJJ1, A0A1S5QK73 |
| A3 | 7451 | RDR | CLAYMPSFYDSASNK | VaaChi-3 | P00992 |
| A4 | 7469 | RDR | CLAYMPSFYDSASNK | VaaChi-3 | P00992 |

Aminokislinsko poravnava določenih kimotripsinskih zaviralcev smo izvedli s programom Clustal Omega (Madeira in sod., 2019), prikazuje pa jo slika 21. Zaviralci iz modrasovega strupa se med seboj razlikujejo v sedmih aminokislinah, na položajih 19 (Tyr ali Glu), 22 (Arg ali Ser), 26 (Asn ali Asp), 27 (Pro ali Ser), 33 (Glu ali Lys), 34 (Glu ali Lys) in 65 (Gln ali His).

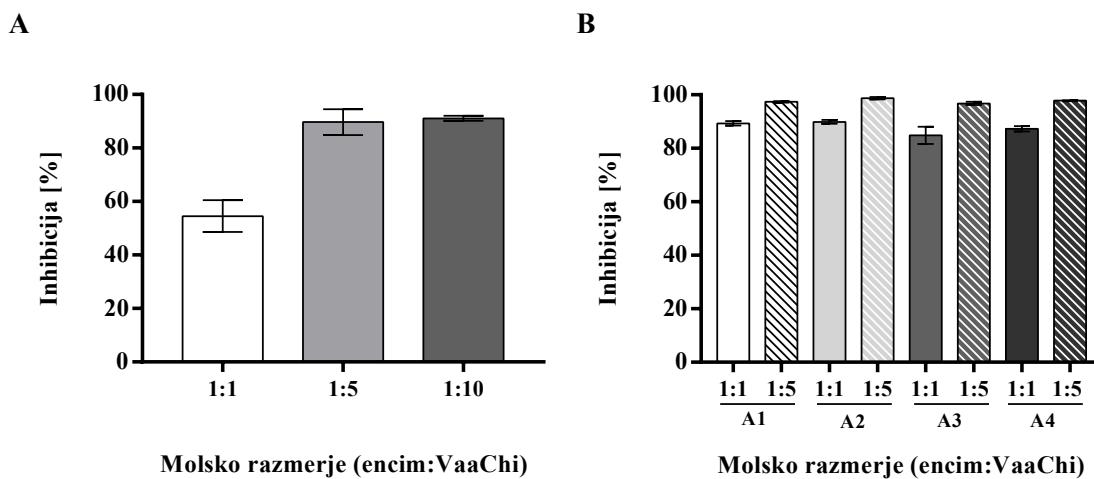
| | | % identičnosti |
|--------------|--|----------------|
| a) VaaChi | RDRPKFCYLPADPGRCLAYMPRFYYNPASNKCEKFIYGGCRGNANNFKTWDECRHTCVAS--GIQPR | 65 100 |
| b) VaaChi-3 | RDRPKFCYLPADPGRCLAYMPSFYDSASNKCKKFIFYGGCRGNANNFKTWDECRHTCVAS--GIQPR | 65 94 |
| c) cVaaChi-2 | RDRPKFCYLPADPGRCLAEMPRFYYNPASNKCKEFIYGGCRGNANNFKTWDECRHTCVAS--GIQPR | 65 95 |
| d) cVaaChi-3 | RDRPKFCYLPADPGRCLAYMPRFYYNPASNKCKEFIYGGCRGNANNFKTWDECRHTCVASGKGIGQPR | 67 97 |
| e) cVaaChi-5 | RDRPKFCYLPADPGRCLAYMPRFYYNPASNKCKEFIYGGCRGNANNFKTWDECRHTCVAS--GIHPR | 65 95 |
| | *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****: | *:***:* |

Slika 21: Aminokislinska poravnava določenih kimotripsinskih zaviralcev. a) VaaChi, *Vipera ammodytes ammodytes* (Vaa) (0909196A); b) VaaChi-3, Vaa (P00992); c) cVaaChi-2, Vaa (A0A1S5QJK2); d) cVaaChi-3, Vaa (A0A1S5QJJ1); in e) cVaaChi, Vaa (A0A1S5QK73). Osenčena so zaporedja, ki smo jih določili z MS ali metodo Edmanove razgradnje. Aminokislinski ostanki, ki so v vseh zaporedjih na istem mestu, so označeni z zvezdico v spodnji vrstici. Položaji v sekvencah, ki vsebujejo konzervativne zamenjave, so označeni z dvopičjem (:), položaji polkonzervativnih in nekonzervativnih zamenjav pa so označeni s praznim poljem ().

Figure 21: **Amino acid alignment of the identified chymotrypsin inhibitors.** a) VaaChi, *Vipera ammodytes ammodytes* (*Vaa*) (0909196A); b) VaaChi-3, *Vaa* (P00992); c) cVaaChi-2, *Vaa* (A0A1S5QJK2); d) cVaaChi-3, *Vaa* (A0A1S5QJJ1); and e) cVaaChi, *Vaa* (A0A1S5QK73). The sequences determined by MS or Edman degradation are shaded. Amino acid residues present at the same position in all sequences are designated by an asterisk. Positions in sequences harbouring conservative substitution are designated by a colon (:), while positions of semi-conservative and non-conservative substitutions are designated with an empty field (), respectively.

4.4 ZAVIRANJE KIMOTRIPSINSKE AKTIVNOSTI z VaaChi

Vzorec IIK-2-A, v katerem je prisotnih vsaj šest izoblik VaaChi, smo testirali na sposobnost zaviranja aktivnosti kimotripsina (slika 22A). Analizo smo izvedli po postopku, opisanem v podpoglavlju 3.2.1.5. Reakcijske zmesi so vsebovale encim in VaaChi v molskem razmerju 1 : 1, 1 : 5 in 1 : 10. Pri molskem razmerju 1 : 1 je prišlo do ~55-odstotnega zaviranja encimske aktivnosti, pri razmerju 1 : 5 in 1 : 10 pa do ~90-odstotnega. Enako smo testirali zaviralno aktivnost vzorcev HPLC-3-A1 do A4 (slika 22B). Pri molskem razmerju 1 : 1 so vse posamezne frakcije VaaChi imele višjo zaviralno aktivnost kot zgoraj omenjena frakcija IIK-2-A in so povzročile ~88-odstotno zaviranje kimotripsina. Pri molskem razmerju 1 : 5 smo dosegli skoraj 100-odstotno zaviranje.

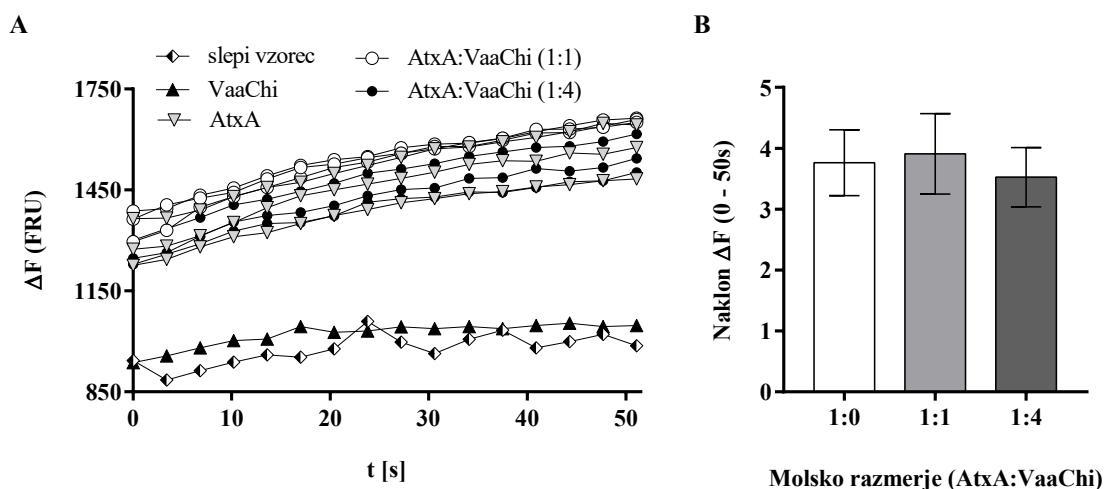


Slika 22: **Zaviranje aktivnosti kimotripsina.** (A) Določili smo aktivnost encima kimotripsina v prisotnosti zbirnega vzorca kimotripsinskih zaviralcev (IIK-2-A) v molskem razmerju 1 : 1, 1 : 5 in 1 : 10. (B) Zaviranje aktivnosti encima kimotripsina v prisotnosti ločenih frakcij VaaChi (HPLC-3-A1 do A4) v molskem razmerju 1 : 1 in 1 : 5. Metoda je opisana v podpoglavlju 3.2.1.5. Meritve smo izvedli v treh ponovitvah, rezultati pa so prikazani kot srednje vrednosti zaviranja aktivnosti encima \pm S.E.

Figure 22: **Inhibition of chymotrypsin activity.** (A) The activity of the chymotrypsin enzyme in the presence of a pooled sample of chymotrypsin inhibitors (IIK-2-A) was determined in molar ratios of 1 : 1, 1 : 5 and 1 : 10. (B) The graph shows the inhibition of chymotrypsin enzyme activity in the presence of RP-HPLC separated VaaChi fractions (HPLC-3-A1 to A4) at molar ratios of 1 : 1 and 1 : 5. The method is described in section 3.2.1.5. The results were obtained from 3 independent measurements and are shown as the mean percent enzyme inhibition \pm SEM.

4.5 VPLIV VaaChi NA ENCIMSKO AKTIVNOST AtxA

Fosfolipazno aktivnost naravnega AtxA v prisotnosti VaaChi (frakcija IIK-2-A) smo merili z modificirano pirensko metodo po Radvanyiju, ki je opisana v podpoglavlju 3.2.1.6. Pripravili smo vzorce, ki so vsebovali AtxA in VaaChi v molskem razmerju 1 : 1 in 1 : 4, in izmerili spremembo fluorescence (ΔF) v prvih 50 sekundah po dodatku veziklov (slika 23A). V prisotnosti VaaChi ni bilo statistično značilne spremembe encimske aktivnosti AtxA (slika 23B).

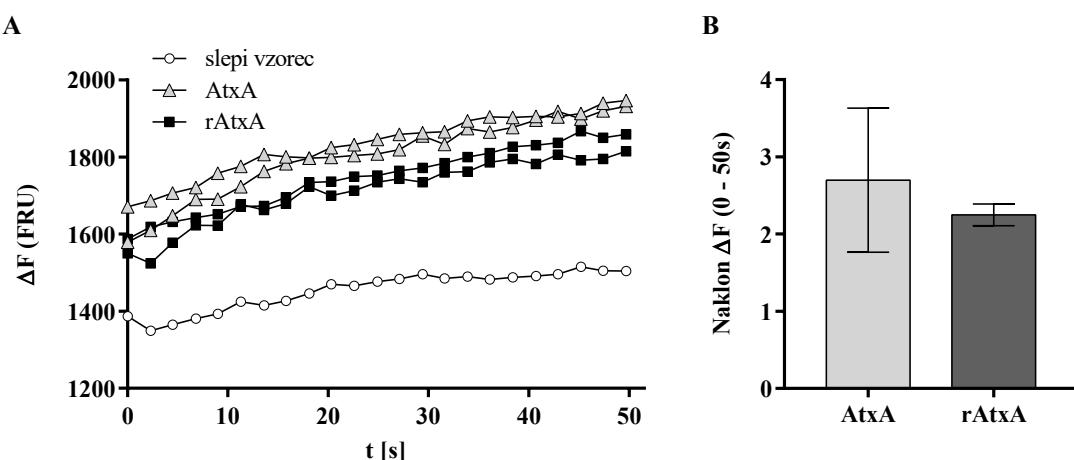


Slika 23: **Vpliv VaaChi na encimsko aktivnost naravnega AtxA.** Pripravili smo reakcijske zmesi, ki so vsebovale naravni AtxA (1 ng/200 μ L) in VaaChi (frakcija IIK-2-A) v molskem razmerju 1 : 1 in 1 : 4. Spleti vzorec je namesto VaaChi in AtxA vseboval ustreznou količino BSA. Negativna in pozitivna kontrola sta vsebovali ustreznou količino VaaChi oziroma AtxA. (A) Sprememba fluorescence (ΔF) v prvih 50 sekundah po dodatku veziklov. (B) Naklon spremembe fluorescence (ΔF) v času ne kaže statistično značilnih razlik v aktivnosti AtxA v prisotnosti VaaChi v razmerju 1 : 1 ali 1 : 4. Meritve smo izvedli v treh ponovitvah, rezultati pa so prikazani kot srednje vrednosti \pm S.E.

Figure 23: The influence of VaaChi on the enzymatic activity of natural AtxA. Reaction mixtures containing natural AtxA (1 ng/200 µL) and VaaChi (fraction IIK-2-A) were prepared in molar ratios of 1 : 1 and 1 : 4. The blank sample contained an adequate amount of BSA instead of VaaChi and AtxA. The negative and positive controls contained an adequate amount of VaaChi or AtxA, respectively. (A) The change in fluorescence (ΔF) within the first 50 seconds after vesicle addition. (B) The slope of the fluorescence change did not show a significant difference in AtxA activity in the presence of VaaChi in the ratios of 1 : 1 or 1 : 4. The results were obtained from 3 independent measurements and are shown as the mean \pm SEM.

4.6 MERJENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI rAtxA

Z modificirano pirenško metodo po Radvanyiju, ki je opisana v podpoglavlju 3.2.2.3, smo testirali encimsko aktivnost očiščenega rAtxA in jo primerjali z aktivnostjo naravnega AtxA v enaki koncentraciji. Oba vzorca imata primerljivo encimsko aktivnost (slika 24), s čimer smo potrdili uspešno pripravo rAtxA.



Slika 24: Meritve encimske aktivnosti očiščenega rAtxA. Vzorcu očiščenega rAtxA smo s pirenško metodo izmerili encimsko aktivnost in jo primerjali z encimsko aktivnostjo naravnega AtxA. (A) Spremembo fluorescence (ΔF) smo merili prvih 50 sekund po dodatku veziklov. (B) Naklon spremembe fluorescence (ΔF) v času ne kaže statistično značilnih razlik v aktivnosti rekombinantnega in naravnega AtxA. Meritve smo izvedli v dveh ponovitvah, rezultati pa so prikazani kot srednje vrednosti \pm S.E.

Figure 24: Enzymatic activity measurements of the purified rAtxA. The enzymatic activity of the purified rAtxA was tested with the pyrene method and compared with the enzymatic activity of natural AtxA. (A) The change in the fluorescence (ΔF) was measured within the first 50 seconds after the addition of vesicles. (B) The slope of the fluorescence change did not show a significant difference in the activity of recombinant and natural AtxA. The results were obtained from 2 independent measurements and are shown as the mean \pm SEM.

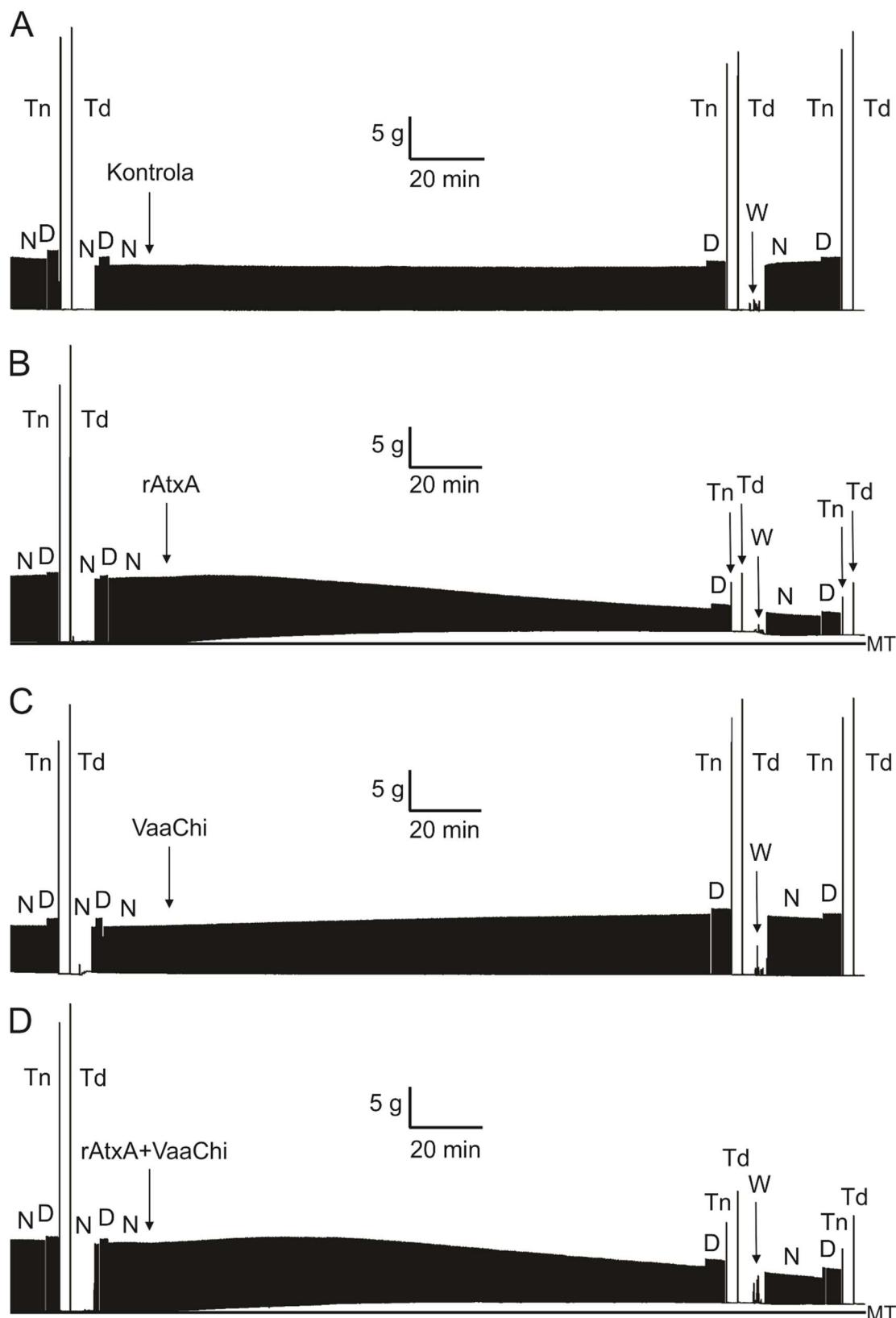
4.7. PREVERJANJE NASTANKA KOMPLEKSOV MED rAtxA in VaaChi

Nastanka kompleksov med rAtxA in VaaChi z metodo nativne elektroforeze nismo uspeli dokazati, rezultat zato ni prikazan.

4.8 VPLIV VaaChi TER MEŠANICE rAtxA IN VaaChi NA IZOMETRIČNO MIŠIČNO KONTRAKCIJO IZOLIRANIH HEMIDIAFRAGEM MIŠI

Reprezentativni zapis celotnih meritev vpliva VaaChi in rAtxA na amplitudo posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije so prikazani na sliki 25. Slika 25A prikazuje zapis kontrole (K-R raztopina), slika 25B vpliv $0,845 \mu\text{M}$ rAtxA, slika 24C vpliv $7 \mu\text{M}$ VaaChi ter slika 25D vpliv predinkubirane mešanice rAtxA in VaaChi enakih koncentracij kot posamično. VaaChi povzroči statistično značilno povečanje amplitude posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije, ne pa tudi posredno izzvane tetanične kontrakcije. Učinek na posredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo je povraten v 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino, saj se v tem času amplituda povrne na vrednost, ki se statistično več ne razlikuje od vrednosti kontrole (slika 25C). Ob aplikaciji rAtxA opazimo izrazit padec amplitude posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične mišične kontrakcije, padanje moči kontrakcije pa se nadaljuje tudi po izpiranju, kar kaže, da je učinek nepovraten (slika 25B). Pri vseh štirih poskusih z $0,845 \mu\text{M}$ rAtxA smo prav tako opazili dvig MT oz. kontrakturo, ki se začne v 5 min po aplikaciji rAtxA in v povprečju doseže vrh $113,5 \pm 7,3$ min po aplikaciji. Vrednost največjega dviga MT je v povprečju znašala $1,4 \pm 0,1$ g oz. $95,1 \pm 0,6$ % vrednosti bazalne tenzije pred aplikacijo toksina. Dvig MT v povprečju za $0,9 \pm 0,1$ g je bil opazen tudi 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino, vrednost pa je predstavljala $97 \pm 0,3$ % vrednosti bazalne tenzije pred aplikacijo toksina, kar ponovno kaže, da je učinek nepovraten. Enake učinke na amplitudo mišične kontrakcije kot pri rAtxA, ne glede na način stimulacije, opazimo tudi po izpostavitvi živčno-mišičnega preparata mešanici rAtxA in VaaChi (slika 25D). Pri vseh štirih poskusih z mešanicom rAtxA in VaaChi smo enako kot pri samem rAtxA opazili dvig MT, ki se začne v 5 min po aplikaciji mešanice in v povprečju doseže vrh $101,3 \pm 15,7$ min po aplikaciji. Vrednost največjega dviga MT je v povprečju znašala $1,2 \pm 0,2$ g oz. $96,7 \pm 0,4$ % vrednosti MT pred aplikacijo toksina. Dvig MT v povprečju za $0,6 \pm 0,2$ g je bil prav tako opazen 15 min po izpiranju živčno-mišičnega

preparata s K-R raztopino, vrednost pa je predstavljala $98,3 \pm 0,6\%$ vrednosti bazalne tenzije pred aplikacijo toksina, kar ponovno kaže, da je učinek nepovraten.

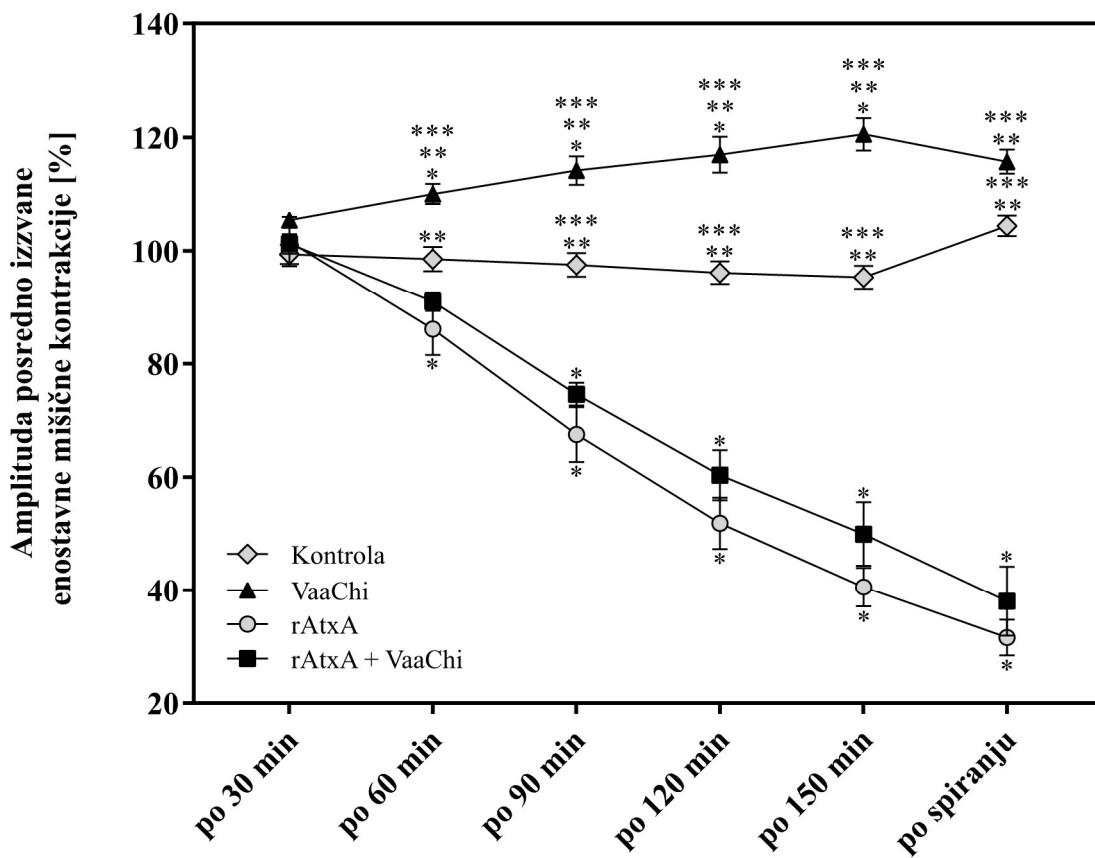


Slika 25: Učinek rAtxA, VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na izometrično mišično kontrakcijo mišč hemidiafragme v odvisnosti od časa. Slika prikazuje (A) kontrolni zapis, (B) vpliv $0,845 \mu\text{M}$ rAtxA, (C) vpliv $7 \mu\text{M}$ VaaChi ter (D) vpliv predinkubirane mešanice rAtxA in VaaChi prej omenjenih koncentracij na izometrično mišično kontrakcijo v odvisnosti od časa. N označuje posredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo; D označuje neposredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo; Tn označuje posredno izzvano tetanično mišično kontrakcijo; Td označuje neposredno izzvano tetanično mišično kontrakcijo; W označuje zamenjavo medija s K-R raztopino in MT označuje potek mišične tenzije v mirovanju.

Figure 25: Effects of rAtxA, VaaChi and the mixture of rAtxA and VaaChi on isometric muscle contraction of the mouse hemidiaphragm as a function of time. The figure (A) shows the control recording, (B) the effect of $0,845 \mu\text{M}$ rAtxA, (C) $7 \mu\text{M}$ VaaChi and (D) the preincubated mixture of rAtxA and VaaChi at the concentrations mentioned above on isometric muscle contraction as a function of time. N denotes nerve-evoked muscle contraction; D denotes directly elicited muscle contraction; Tn denotes nerve-evoked tetanic contraction; Td denotes directly elicited tetanic contraction; W denotes the wash-out of hemidiaphragm with K-R solution, and MT denotes the resting muscle tension.

4.8.1 Vpliv VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na posredno izzvano enostavno mišično kontrakcijo

VaaChi pri $7 \mu\text{M}$ koncentraciji povzroči povečanje amplitude posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije (slika 26). Povečanje amplitude posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije je statistično značilno 60, 90, 120 in 150 min po aplikaciji v primerjavi s kontrolo. V navedenih časovnih obdobjih je amplituda kontrakcije v povprečju povečana za $11,7 \pm 1,8$; $17,1 \pm 2,6$; $21,6 \pm 3,3$ in $26,5 \pm 3,0 \%$. Učinek je 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino povraten. Aplikacija predinkubirane mešanice rAtxA ($0,845 \mu\text{M}$) in VaaChi ($7 \mu\text{M}$) povzroči zmanjšanje amplitude posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije (slika 26). Padec amplitude posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije je statistično značilen 90, 120 in 150 min po aplikaciji in 15 min po izpiranju hemidiafragmem s K-R raztopino v primerjavi s kontrolo. V navedenih časovnih obdobjih je amplituda kontrakcije po aplikaciji mešanice v povprečju zmanjšana za $23,5 \pm 2,1$; $37,2 \pm 4,6$ in $47,6 \pm 5,9 \%$, po izpiranju pa za $63,5 \pm 5,9 \%$. Učinek mešanice rAtxA in VaaChi se statistično ne razlikuje od učinka samostojno apliciranega rAtxA ($0,845 \mu\text{M}$).

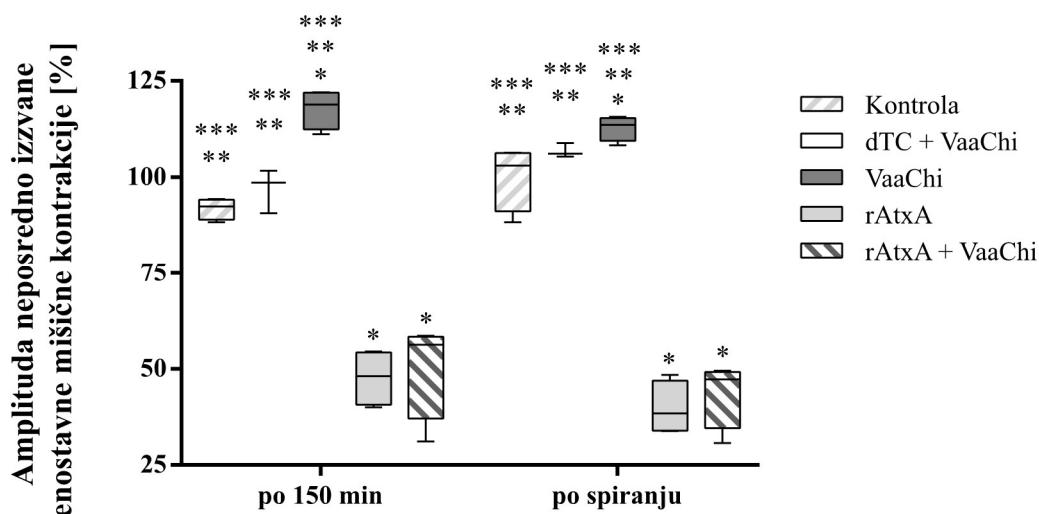


Slika 26: Učinek VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na amplitudo posredno izvvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši. Prikazani so vplivi K-R raztopine (kontrola), 7 μ M VaaChi, 0,845 μ M rAtxA ter predinkubirane mešanice rAtxA in VaaChi prej omenjenih koncentracij na amplitudo posredno izvvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši 30, 60, 90, 120, 150 min po aplikaciji in po izpiranju s K-R raztopino. Prikazane so srednje vrednosti deleža amplitude mišične kontrakcije \pm S.E. 4 različnih izoliranih hemidiafragem miši v poskusni skupini. * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in kontrolo v istem časovnem obdobju. ** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in rAtxA v istem časovnem obdobju. *** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in vrednostjo predinkubirane mešanice rAtxA in VaaChi v istem časovnem obdobju.

Figure 26: Effects of VaaChi and the mixture of rAtxA and VaaChi on the amplitude of nerve-evoked single twitch of the isolated mouse hemidiaphragm preparations. The effects of K-R solution (control), 7 μ M VaaChi, 0,845 μ M rAtxA and a preincubated mixture of rAtxA and VaaChi at the concentrations mentioned above on the amplitude of nerve-evoked single twitch in the mouse hemidiaphragm preparations after 30, 60, 90, 120, and 150 min of exposure and after wash-out with K-R solution are shown. All values are expressed as the mean \pm SEM from 4 different nerve-muscle preparations in the experimental group. * Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and the control over the same period. ** Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and rAtxA over the same period. *** Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and the preincubated mixture of rAtxA and VaaChi over the same period.

4.8.2 Vpliv VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na neposredno izvvano enostavno mišično kontrakcijo

VaaChi pri 7 μM koncentraciji povzroči povečanje amplitude neposredno izvvane enostavne mišične kontrakcije (slika 27). Povečanje amplitude neposredno izvvane enostavne mišične kontrakcije je statistično značilno 150 min po aplikaciji in po izpiranju hemidiafragem s K-R raztopino v primerjavi s kontrolo. Po 150 min je moč kontrakcije v povprečju povečana za $28,1 \pm 2,8 \%$, po izpiranju pa za $12,6 \pm 1,6 \%$. Aplikacija predinkubirane mešanice 0,845 μM rAtxA in 7 μM VaaChi povzroči padec amplitude neposredno izvvane enostavne mišične kontrakcije (slika 27). Ta je statistično značilen 150 min po aplikaciji in po izpiranju hemidiafragem s K-R raztopino v primerjavi s kontrolo. Po 150 min po aplikaciji mešanice je moč kontrakcije v povprečju zmanjšana za $45,0 \pm 7,1 \%$, po izpiranju pa za $56,4 \pm 4,4 \%$. Učinek mešanice rAtxA in VaaChi se statistično ne razlikuje od učinka samostojno apliciranega rAtxA (0,845 μM). Učinek VaaChi na amplitudo neposredno izvvane enostavne mišične kontrakcije smo nato preverjali na živčno-mišičnem preparatu ob prisotnosti dTC, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.5.2. Uporabili smo 10 μM dTC in 7 μM VaaChi. VaaChi v teh pogojih ne povzroči sprememb v amplitudi neposredno izvvane enostavne mišične kontrakcije (slika 27).



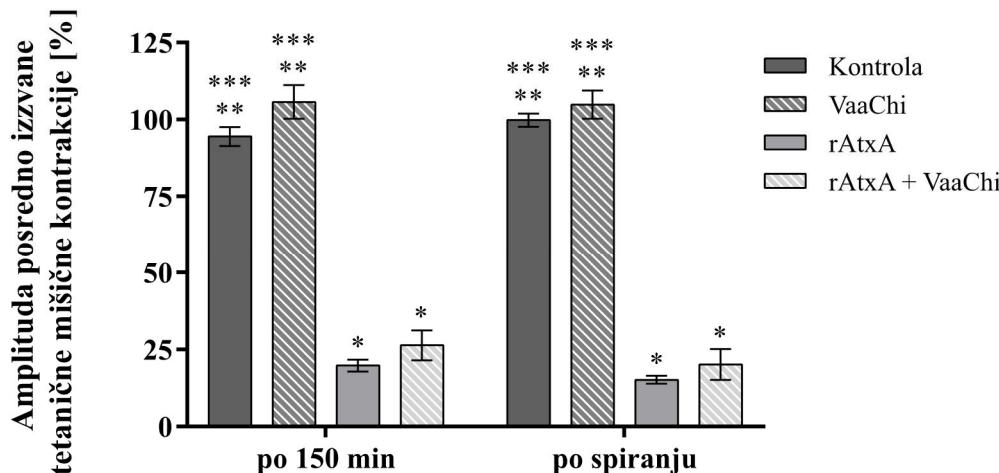
Slika 27: Učinek VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na amplitudo neposredno izvvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši. Prikazani so vplivi K-R raztopine (kontrola), 7 μM VaaChi, 7 μM VaaChi po aplikaciji 10 μM dTC, 0,845 μM rAtxA in predinkubirane mešanice rAtxA in VaaChi prej omenjenih koncentracij na amplitudo neposredno izvvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši 150 min po aplikaciji in po izpiranju s K-R raztopino. Vse vrednosti deleža amplitude mišične kontrakcije so

predstavljene kot mediane in kvartilni rangi 3 oz. 4 različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini. * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in kontrolo v istem časovnem obdobju. ** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in rAtxA v istem časovnem obdobju. *** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in vrednostjo predinkubirane mešanice rAtxA in VaaChi v istem časovnem obdobju.

Figure 27: Effects of VaaChi and the mixture of rAtxA and VaaChi on directly elicited single twitch of the isolated mouse hemidiaphragm preparations. The effects of K-R solution (control), 7 μM VaaChi, 7 μM VaaChi after 10 μM dTC application, 0,845 μM rAtxA and the preincubated mixture of rAtxA and VaaChi at the concentrations mentioned above on directly elicited single twitch in the isolated mouse hemidiaphragm preparations after 150 min of exposure and after wash-out with K-R solution are shown. All values are expressed as box and whisker plots of 3 or 4 different nerve-muscle preparations in the experimental group. * Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and the control over the same period. ** Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and rAtxA over the same period. *** Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and the preincubated mixture of rAtxA and VaaChi over the same period.

4.8.3 Vpliv VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na posredno izzvano tetanično mišično kontrakcijo

VaaChi pri 7 μM koncentraciji ne vpliva na amplitudo posredno izzvane tetanične mišične kontrakcije (slika 28). Aplikacija predinkubirane mešanice 0,845 μM rAtxA in 7 μM VaaChi zmanjša amplitudo posredno izzvane tetanične mišične kontrakcije (slika 28). Padec amplitude posredno izzvane tetanične mišične kontrakcije je statistično značilen 150 min po aplikaciji in po izpiranju hemidiafragem s K-R raztopino v primerjavi s kontrolo. Po 150 min je moč kontrakcije v povprečju zmanjšana za $72,1 \pm 5,1\%$, po izpiranju pa za $79,8,0 \pm 5,0\%$. Učinek mešanice rAtxA in VaaChi na amplitudo posredno izzvane tetanične mišične kontrakcije se statistično ne razlikuje od učinka samostojno apliciranega rAtxA (0,845 μM).



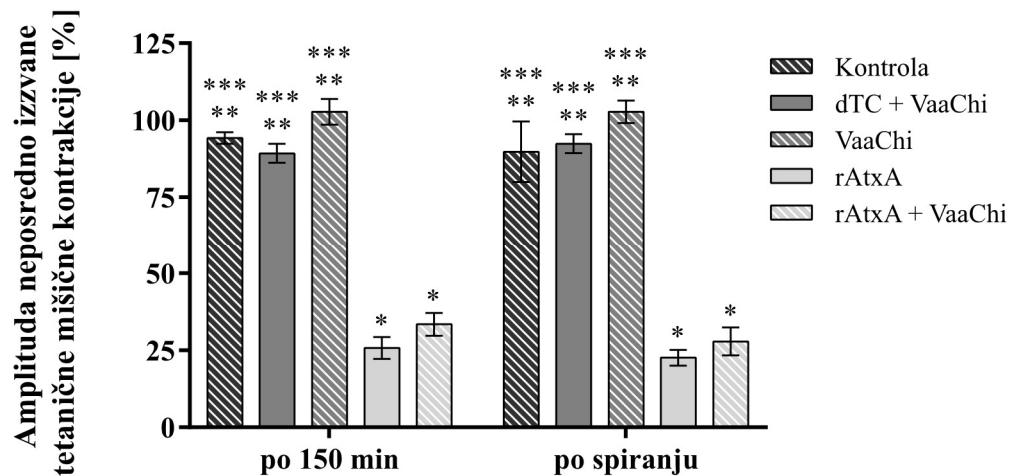
Slika 28: Učinek VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na amplitudo posredno izzvane tetanične mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši. Prikazani so vplivi K-R raztopine (kontrola), 7 µM VaaChi, 0,845 µM rAtxA in predinkubirane mešanice rAtxA in VaaChi prej omenjenih koncentracij na amplitudo posredno izzvane tetanične mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši 150 min po aplikaciji in po izpiranju s K-R raztopino. Prikazane so srednje vrednosti deleža amplitude mišične kontrakcije ± S.E. 4 različnih izoliranih hemidiafragem miši v poskusni skupini. * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in kontrolo v istem časovnem obdobju. ** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in rAtxA v istem časovnem obdobju. *** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in vrednostjo predinkubirane mešanice rAtxA in VaaChi v istem časovnem obdobju.

Figure 28: Effects of VaaChi and the mixture of rAtxA and VaaChi on the amplitude of nerve-evoked tetanic contractions of the isolated mouse hemidiaphragm preparations. The effects of K-R solution (control), 7 µM VaaChi, 0,845 µM rAtxA and the preincubated mixture of rAtxA and VaaChi at the concentrations mentioned above on the amplitude of nerve-evoked tetanic contractions in the isolated mouse hemidiaphragm preparations after 150 min of exposure and after wash-out with K-R solution are shown. All values are expressed as the mean ± SEM from 4 different nerve-muscle preparations in the experimental group. * Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and the control over the same period. ** Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and rAtxA over the same period. *** Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and the preincubated mixture of rAtxA and VaaChi over the same period.

4.8.4 Vpliv VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na neposredno izzvano tetanično mišično kontrakcijo

VaaChi pri 7 µM koncentraciji ne povzroči statistično značilne spremembe v amplitudi neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije (slika 29). Izpostavitev živčno-mišičnega preparata predinkubirani mešanici 0,845 µM rAtxA in 7 µM VaaChi zmanjša amplitudo

neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije (slika 29). Padec amplitude neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije je statistično značilen 150 min po aplikaciji in po izpiranju hemidiafragem s K-R raztopino v primerjavi s kontrolo. Po 150 min je moč kontrakcije v povprečju zmanjšana za $64,5 \pm 4,0\%$, po izpiranju pa za $68,9 \pm 5,0\%$. Učinek mešanice rAtxA in VaaChi se statistično ne razlikuje od učinka samostojno apliciranega rAtxA ($0,845 \mu\text{M}$). Učinek VaaChi na amplitudo neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije smo nato preverjali tudi na živčno-mišičnem preparatu ob prisotnosti dTC, kot je opisano v podpoglavlju 3.2.5.2. Uporabili smo $10 \mu\text{M}$ koncentracijo dTC in $7 \mu\text{M}$ koncentracijo VaaChi. VaaChi pri tej koncentraciji dTC ne povzroči statistično značilne spremembe v amplitudi neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije 150 min po aplikaciji in po izpiranju (slika 29).



Slika 29: Učinek VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na amplitudo neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši. Prikazani so vplivi K-R raztopine (kontrola), $7 \mu\text{M}$ VaaChi, $7 \mu\text{M}$ VaaChi po aplikaciji $10 \mu\text{M}$ dTC, $0,845 \mu\text{M}$ rAtxA in predinkubirane mešanice rAtxA in VaaChi prej omenjenih koncentracij na amplitudo neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši 150 min po aplikaciji in po izpiranju s K-R raztopino. Prikazane so srednje vrednosti deleža amplitude mišične kontrakcije $\pm \text{S.E.}$. 4 različnih izoliranih hemidiafragem miši v poskusni skupini. * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in kontrolo v istem časovnem obdobju. ** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in rAtxA v istem časovnem obdobju. *** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in vrednostjo predinkubirane mešanice rAtxA in VaaChi v istem časovnem obdobju.

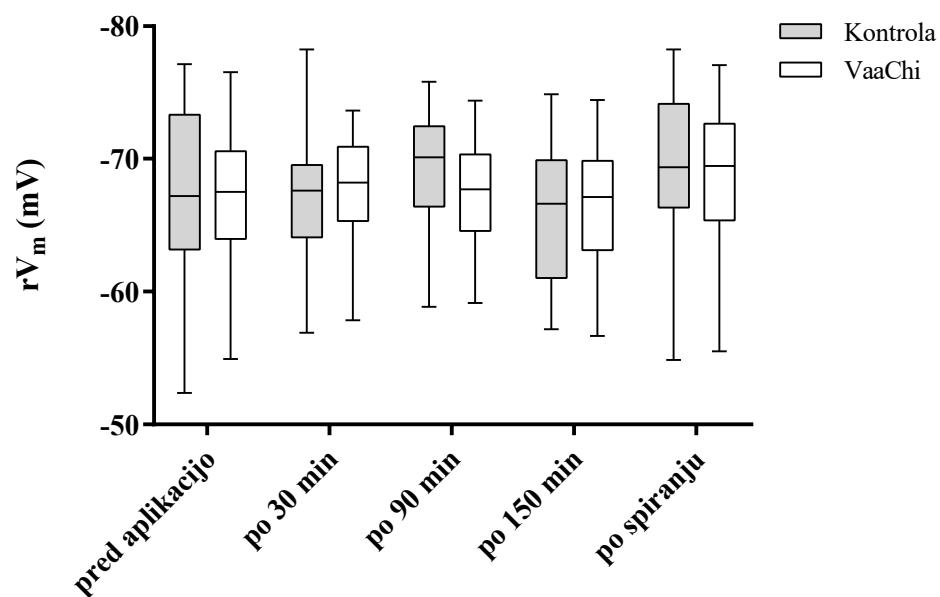
Figure 29: Effects of VaaChi and the mixture of rAtxA and VaaChi on the amplitude of directly elicited tetanic contractions of the isolated mouse hemidiaphragm preparations. The effects of K-R solution (control), 7 μ M VaaChi, 7 μ M VaaChi after 10 μ M dTC application, 0,845 μ M rAtxA and the preincubated mixture of rAtxA and VaaChi at the concentrations mentioned above on the amplitude of directly elicited tetanic contractions in the isolated mouse hemidiaphragm preparations after 150 min of exposure and after wash-out with K-R solution are shown. All values are expressed as the mean \pm SEM from 4 different nerve-muscle preparations in the experimental group. * Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and the control over the same period. ** Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and rAtxA over the same period. *** Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and the preincubated mixture of rAtxA and VaaChi over the same period.

4.9 VPLIV VaaChi NA ELEKTROFIZIOLOŠKE PARAMETRE MIŠIČNIH VLAKEN

Proučevali smo vpliv VaaChi na rV_m , vpliv na amplitudo in razpolovni čas padajoče faze PMP ter vpliv na amplitudo, razpolovni čas padajoče faze in frekvenco MPMP.

4.9.1 Vpliv VaaChi na rV_m

VaaChi pri 7 μ M koncentraciji ne vpliva na vrednost rV_m v odvisnosti od časa izpostavljenosti v primerjavi s kontrolo (slika 30).



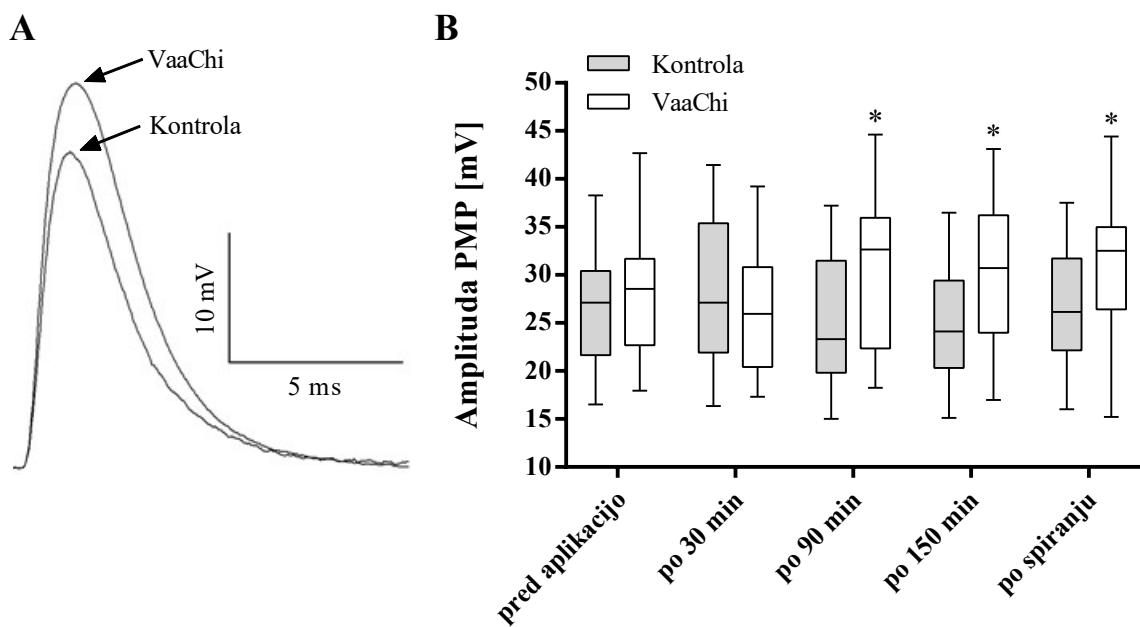
Slika 30: Vpliv VaaChi na rV_m skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. Prikazan je vpliv kontrole (K-R raztopina) in VaaChi (7 μ M) na rV_m skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti od časa

izpostavljenosti (pred aplikacijo, po 30, 90 in 150 min ter po izpiranju). Vrednosti po izpiranju smo dobili z meritvami, opravljenimi 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. Vse vrednosti so predstavljene kot mediane in kvartilni rangi izmerjenih vrednosti 4 različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini ($n = 5\text{--}15$ skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme).

Figure 30: Effects of VaaChi on the rV_m in skeletal muscle fibres of mouse hemidiaphragms. Effects of control (K-R solution) and VaaChi ($7 \mu\text{M}$) on the rV_m in skeletal muscle fibres of mouse hemidiaphragms as a function of exposure time (before application, after 30, 90 and 150 min, and after washout) are shown. The values after washout represent measurements 15 min after washout of the neuromuscular preparation with K-R solution. All values are expressed as box and whisker plots of 4 different isolated mouse hemidiaphragms in the experimental group ($n = 5\text{--}15$ skeletal muscle fibres from each hemidiaphragm).

4.9.2 Vpliv VaaChi na amplitudo PMP

VaaChi pri $7 \mu\text{M}$ koncentraciji poveča amplitudo PMP skeletnih mišičnih vlaken v odvisnosti od časa izpostavljenosti (slika 31). Amplituda PMP je statistično značilno povečana 90 in 150 min po aplikaciji VaaChi ter 15 min po izpiranju hemidiafragem s K-R raztopino v primerjavi s kontrolo. V navedenih časovnih obdobjih je amplituda PMP v povprečju povečana za $5,4 \text{ mV}$ oz. $21,4 \%$ in $5,5 \text{ mV}$ oz. $22,3 \%$, po izpiranju pa za 4 mV oz. $14,8 \%$.



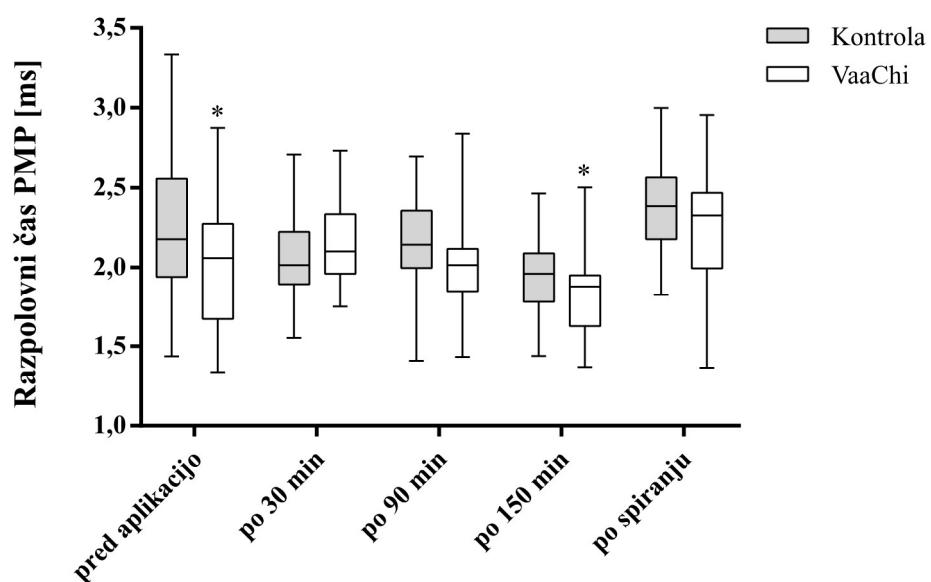
Slika 31: Vpliv VaaChi na amplitudo PMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. (A) Reprezentativna zapisa PMP 150 min po aplikaciji K-R raztopine (kontrola) in VaaChi ($7 \mu\text{M}$). (B) Vpliv kontrole in VaaChi ($7 \mu\text{M}$) na PMP skeletnih mišičnih vlaken v odvisnosti od časa izpostavljenosti (pred aplikacijo, po 30,

90 in 150 min ter po izpiranju). Vrednosti po izpiranju smo dobili z meritvami, opravljenimi 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. Vse vrednosti so predstavljene kot mediane in kvartilni rangi izmerjenih vrednosti 4 različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini ($n = 5\text{--}15$ skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in kontrolo v istem časovnem obdobju.

Figure 31: Effects of VaaChi on the end-plate potential (EPP) amplitudes in skeletal muscle fibres of mouse hemidiaphragms. (A) Representative examples of EPP amplitude recordings 150 min after application of K-R solution (control) and VaaChi (7 μM). (B) Effects of control and VaaChi (7 μM) on EPP amplitudes in skeletal muscle fibres of mouse hemidiaphragms as a function of exposure time (before application, after 30, 90 and 150 min, and after washout). The values after washout represent measurements 15 min after washout of the neuromuscular preparation with K-R solution. All values are expressed as box and whisker plots of 4 different isolated mouse hemidiaphragms in the experimental group ($n = 5\text{--}15$ skeletal muscle fibres from each hemidiaphragm). * Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and the control over the same period.

4.9.3 Vpliv VaaChi na razpolovni čas padajoče faze PMP

VaaChi pri 7 μM koncentraciji skrajša razpolovni čas padajoče faze PMP skeletnih mišičnih vlaken v odvisnosti od časa izpostavljenosti (slika 32). Razpolovni čas je statistično značilno skrajšan 150 min po aplikaciji v primerjavi s kontrolo. V navedenem časovnem obdobju je razpolovni čas padajoče faze PMP v povprečju skrajšan za 0,1 ms oz. 5,1 %.



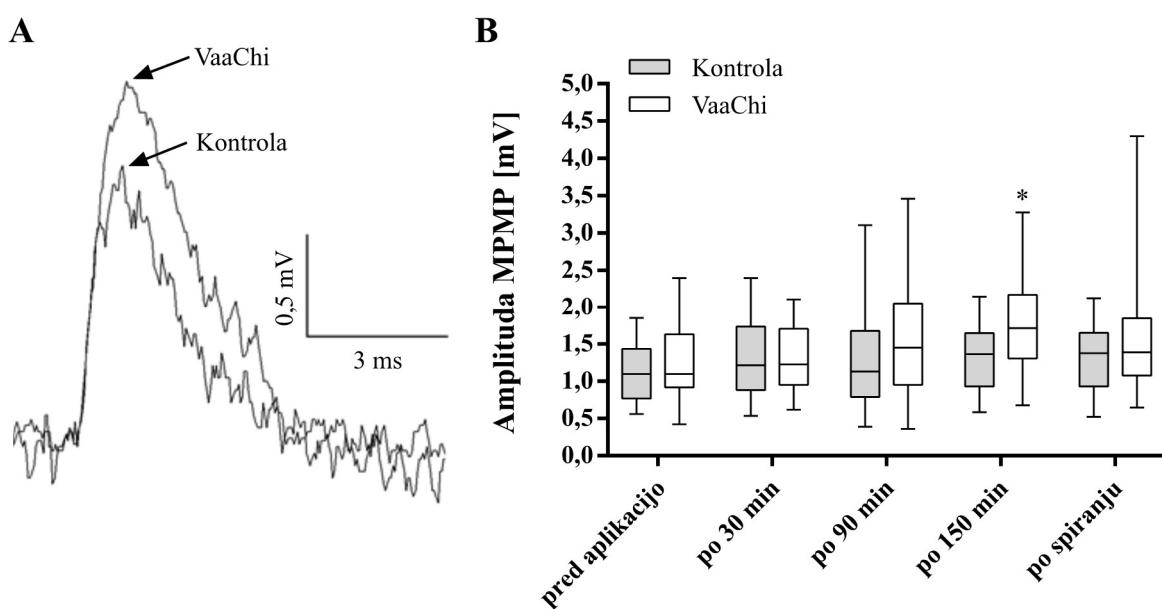
Slika 32: Vpliv VaaChi na razpolovni čas padajoče faze PMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. Prikazan je vpliv kontrole (K-R raztopina) in VaaChi (7 μM) na razpolovni čas padajoče faze PMP skeletnih

mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti od časa izpostavljenosti (pred aplikacijo, po 30, 90 in 150 min ter po izpiranju). Vrednosti po izpiranju smo dobili z meritvami, opravljenimi 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. Vse vrednosti so predstavljene kot mediane in kvartilni rangi izmerjenih vrednosti 4 različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini ($n = 7\text{--}13$ skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in kontrolo v istem časovnem obdobju.

Figure 32: Effects of VaaChi on the half-decay time of EPP amplitudes in skeletal muscle fibres of mouse hemidiaphragms. Effects of control (K-R solution) and VaaChi (7 μM) on the half-decay time of EPP amplitudes in skeletal muscle fibres of mouse hemidiaphragms as a function of exposure time (before application, after 30, 90 and 150 min, and after washout) are shown. The values after washout represent measurements 15 min after washout of the neuromuscular preparation with K-R solution. All values are expressed as box and whisker plots of 4 different isolated mouse hemidiaphragms in the experimental group ($n = 5\text{--}15$ skeletal muscle fibres from each hemidiaphragm). * Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and the control over the same period.

4.9.4 Vpliv VaaChi na amplitudo MPMP

VaaChi pri 7 μM koncentraciji poveča amplitudo MPMP skeletnih mišičnih vlaken v odvisnosti od časa izpostavljenosti (slika 33). Amplituda MPMP je statistično značilno povečana 150 min po aplikaciji VaaChi v primerjavi s kontrolo (K-R raztopina). V navedenem časovnem obdobju je amplituda MPMP v povprečju povečana za 0,4 mV oz. 30,1 %.



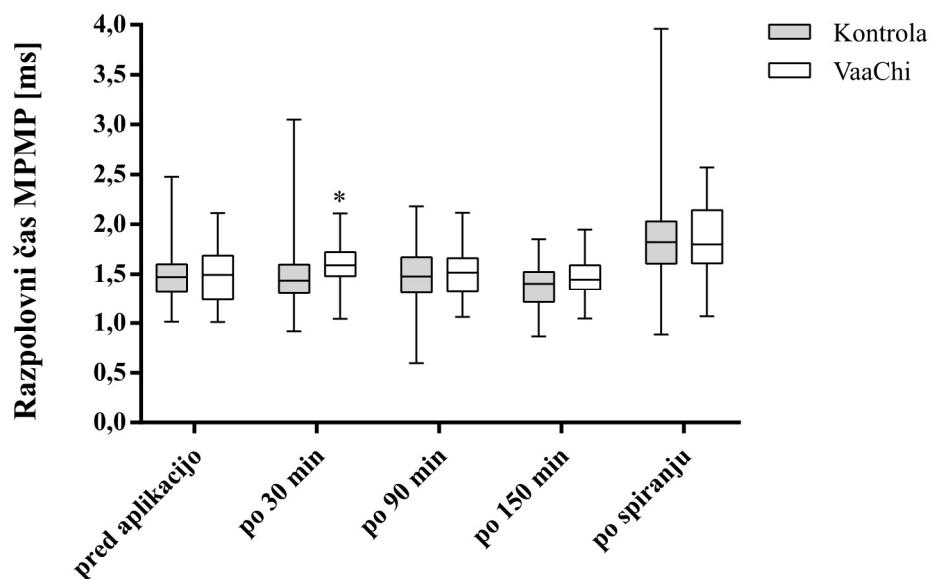
Slika 33: Vpliv VaaChi na amplitudo MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. (A) Reprezentativna zapisa MPMP 150 min po aplikaciji K-R raztopine (kontrola) in VaaChi (7 μM). (B) Prikazan je

vpliv kontrole in VaaChi ($7 \mu\text{M}$) na MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti od časa izpostavljenosti (pred aplikacijo, po 30, 90 in 150 min ter po izpiranju). Vrednosti po izpiranju smo dobili z meritvami, opravljenimi 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. Vse vrednosti so predstavljene kot mediane in kvartilni rangi izmerjenih vrednosti 4 različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini ($n = 5-15$ skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in kontrolo v istem časovnem obdobju.

Figure 33: Effects of VaaChi on the miniature end-plate potential (MEPP) amplitudes in skeletal muscle fibres of mouse hemidiaphragms. (A) Representative examples of MEPP amplitude recordings 150 min after application of K-R solution (control) and VaaChi ($7 \mu\text{M}$). (B) Effects of control and VaaChi ($7 \mu\text{M}$) on MEPP amplitudes in skeletal muscle fibres of mouse hemidiaphragms as a function of exposure time (before application, after 30, 90 and 150 min, and after washout). The values after washout represent measurements 15 min after washout of the neuromuscular preparation with K-R solution. All values are expressed as box and whisker plots of 4 different isolated mouse hemidiaphragms in the experimental group ($n = 5-15$ skeletal muscle fibres from each hemidiaphragm). * Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and the control over the same period.

4.9.5 Vpliv VaaChi na razpolovni čas padajoče faze MPMP

VaaChi pri $7 \mu\text{M}$ koncentraciji podaljša razpolovni čas padajoče faze MPMP skeletnih mišičnih vlaken v odvisnosti od časa izpostavljenosti (slika 34). Razpolovni čas padajoče faze je statistično značilno podaljšan 30 min po aplikaciji v primerjavi s kontrolo (K-R raztopina). V navedenem časovnem obdobju je razpolovni čas padajoče faze MPMP v povprečju podaljšan za $0,08 \text{ ms}$ oz. $5,4 \%$.

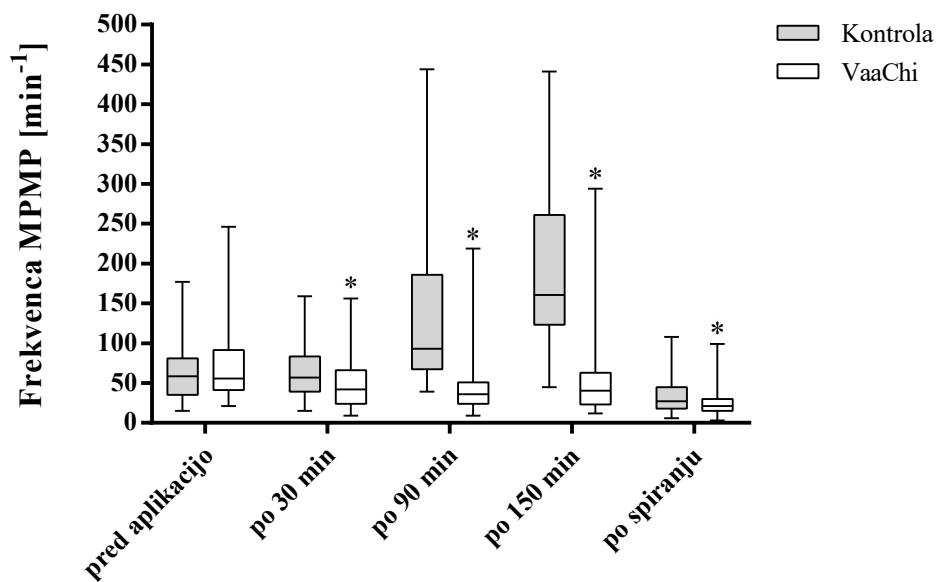


Slika 34: Vpliv VaaChi na razpolovni čas padajoče faze MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. Prikazan je vpliv kontrole (K-R raztopina) in VaaChi ($7 \mu\text{M}$) na razpolovni čas MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti od časa izpostavljenosti (pred aplikacijo, po 30, 90 in 150 min ter po izpiranju). Vrednosti po izpiranju smo dobili z meritvami, opravljenimi 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. Vse vrednosti so predstavljene kot mediane in kvartilni rangi izmerjenih vrednosti 4 različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini ($n = 5-15$ skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in kontrolo v istem časovnem obdobju.

Figure 34: Effects of VaaChi on the half-decay time of MEPP amplitudes in skeletal muscle fibres of mouse hemidiaphragms. Effects of control (K-R solution) and VaaChi ($7 \mu\text{M}$) on the half-decay time of MEPP amplitudes in skeletal muscle fibres of mouse hemidiaphragms as a function of exposure time (before application, after 30, 90 and 150 min, and after washout) are shown. The values after washout represent measurements 15 min after washout of the neuromuscular preparation with K-R solution. All values are expressed as box and whisker plots of 4 different isolated mouse hemidiaphragms in the experimental group ($n = 5-15$ skeletal muscle fibres from each hemidiaphragm). * Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and the control over the same period.

4.9.6 Vpliv VaaChi na frekvenco MPMP

Statistično značilna razlika v frekvenci MPMP na min med kontrolo (K-R raztopina) in VaaChi ($7 \mu\text{M}$) je opazna 30, 90 in 150 min po aplikaciji in 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino (slika 35). Po aplikaciji VaaChi je frekvanca MPMP v navedenih časovnih obdobjih v povprečju zmanjšana za 21,3, 64,5 in 73,4 %, po izpiranju pa za 30,3 %. Pri kontroli število na min do izpiranja postopno narašča, pri VaaChi pa ostane približno enako.



Slika 35: Vpliv VaaChi na frekvenco MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. Prikazan je vpliv kontrole (K-R raztopina) in VaaChi ($7 \mu\text{M}$) na frekvenco MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti od časa izpostavljenosti (pred aplikacijo, po 30, 90 in 150 min ter po izpiranju). Vrednosti po izpiranju smo dobili z meritvami, opravljenimi 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. Vse vrednosti so predstavljene kot mediane in kvartilni rangi izmerjenih vrednosti 4 različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini ($n = 5-15$ skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med izbrano vrednostjo in kontrolo v istem časovnem obdobju.

Figure 35: Effects of VaaChi on the frequency of MEPP amplitudes in skeletal muscle fibres of mouse hemidiaphragms. Effects of control (K-R solution) and VaaChi ($7 \mu\text{M}$) on the frequency of MEPP in skeletal muscle fibres of mouse hemidiaphragms as a function of exposure time (before application, after 30, 90 and 150 min, and after washout) are shown. The values after washout represent measurements 15 min after washout of the neuromuscular preparation with K-R solution. All values are expressed as box and whisker plots of 4 different isolated mouse hemidiaphragms in the experimental group ($n = 5-15$ skeletal muscle fibres from each hemidiaphragm). * Indicates a significant difference ($p \leq 0,05$) between the selected value and the control at the same period.

5 RAZPRAVA

Že v 80. letih prejšnjega stoletja so iz modrasovega strupa prvič izolirali kimotripsinski zaviralec (VaaChi), ki močno zavira α -kimotripsin ter šibko tripsin in človeški plazemski kalikrein (Ritonja in sod., 1983a; Ritonja in sod., 1983c). Učinki in mehanizem delovanja VaaChi na živčno-mišični prenos niso bili znani, ugotovili pa so, da molekula lahko tvori kompleks s presinaptično nevrotoksično sPLA₂, AtxA (Brgles in sod., 2014). V tej nalogi smo prvič pokazali tudi učinke VaaChi na prenos živčnega signala med motoričnim nevronom in skeletno mišico. Iz surovega modrasovega strupa smo z ionsko izmenjevalno kromatografijo, gelsko filtracijo in HPLC v štirih frakcijah izolirali vsaj šest različnih izooblik VaaChi (tabela 12). Čistost izoliranih frakcij smo preverjali z NaDS-PAGE (slika 17) in s strukturnimi analizami, s sekveniranjem po Edmanu (slika 12) in MS (slika 20). Na osnovi navidezne molekulske mase (~10 kDa) in N-končnega aminokislinskega zaporedja (RDRPK), ki je značilno za VaaChi (Ritonja in sod., 1983a), smo potrdili, da smo izolirali kimotripsinski zaviralec. Glede na to, da ima VaaTi podobno navidezno maso kot VaaChi in blokirano N-končno aminokislino, zaradi česar mu z Edmanovo razgradnjo ne moremo določiti aminokislinskega zaporedja, smo vse vzorce VaaChi analizirali še z MS (slika 20). MS-analiza je razkrila masno heterogenost, predvsem v prvih dveh frakcijah. V prvi frakciji prevladujeta zaviralca z masama 7531 in 7565 Da, v drugi pa zaviralca z masama 7549 in 7648 Da. Nobena izmed določenih mas se ni skladala z znanima masama znanih zaviralcev VaaTi-I in VaaTi-II, ki znašata 6869 Da oziroma 7010 Da (Ritonja in sod., 1983c). Nato smo proteine v frakcijah razgradili s tripsinom in nastale peptide analizirali z MS. Ponovno smo potrdili prisotnost le VaaChi. V prvih dveh frakcijah smo določili dele zaporedja petih različnih izooblik modrasovih VaaChi, od katerih sta bili le dve že prej opisani na proteinski ravni (VaaChi in VaaChi-3), druge (cVaaChi-2, cVaaChi-3 in cVaaChi-5) pa le na ravni genoma (tabela 12). V preostalih dveh frakcijah smo z MS določili le VaaChi-3 z molekulskima masama 7451 Da in 7469 Da. Ker eksperimentalno določene molekulske mase treh cVaaChi ne ustrezajo masam, izračunanim na osnovi primarnih zaporedij, in ker smo z MS uspeli določiti le aminokislinsko zaporedje peptidov, ki so identični v vseh treh zavircih, jih med seboj ne moremo razlikovati. Obstaja torej možnost, da smo prvič v aktivni obliki uspeli izolirati le eno ali dve izmed njih oziroma celo vse tri izooblike. Primarna zaporedja določenih zaviralcev se med seboj razlikujejo le v sedmih aminokislinah, na položajih 19 (Tyr ali Glu), 22 (Arg ali Ser), 26 (Asn ali Asp), 27 (Pro ali Ser), 33 (Glu ali Lys), 34 (Glu ali Lys) in 65 (Gln ali His) (slika 21). Mesta

sprememb niso pomembna za aktivnost oz. specifičnost zaviralcev, saj mesto P1, ki ključno določa specifičnost, v vseh izoblikah zaseda hidrofobni aminokislinski ostanek Leu17 (Thakur in Mukherjee, 2017). Vse izolirane frakcije, ne glede na sestavo, so izražale podobno zaviralno aktivnost. V molskem razmerju 1 : 1 (encim : zaviralec) so vse frakcije aktivnost kimotripsina inhibirale ~88-odstotno, v razmerju 1 : 5 pa vse skoraj 100-odstotno (slika 22A). Zato predvidevamo, da posamezne izoblike VaaChi s primerljivo močjo zavirajo kimotripsin, čeprav ne moremo izključiti, da je prispevek posamezne izoblike k zaviranju v heterogenih frakcijah različen. Za odgovor na to vprašanje bi bilo treba popolnoma ločiti izoblike, prisotne v prvih dveh frakcijah, in jih samostojno testirati. Tega v okviru te naloge zaradi pomanjkanja materiala žal nismo mogli izvesti.

Brgles in sod. (2014) so pokazali, da VaaChi lahko tvori komplekse z AtxA, in na osnovi preliminarnih rezultatov predlagali, da na ta način poveča njegovo nevrotoksičnost. Poročali so, da je bila LD₅₀ zmesi AtxA in VaaChi za približno 11 % nižja od LD₅₀ za AtxA v *in vivo* poskusih na miših, sam VaaChi pa ni imel nevrotoksičnega učinka. V tej raziskavi smo žeeli proučiti vpliv kompleksa AtxA-VaaChi na periferni živčno-mišični prenos na izoliranih živčno-mišičnih preparatih mišjih hemidiafragem in ga primerjati z vplivom posameznih komponent. S pomočjo proteinskega inženirstva smo pripravili večjo količino rekombinantnega AtxA (rAtxA). Čistost proteina smo preverili z MS, s katero smo določili le en vrh z molekulsko maso 13774 Da, kar ustrezta teoretični masi naravnega AtxA (slika 19) (Ritonja in Gubenšek, 1985). Z encimskim testom smo pokazali, da ima rekombinantni protein enako fosfolipazno aktivnost kot naravni AtxA, zato smo ga lahko uporabili v elektrofizioloških poskusih (slika 24). Za tvorbo kompleksa AtxA-VaaChi in vse nadaljnje študije smo uporabili rAtxA in mešanico vseh izoliranih izoblik VaaChi. Nastanka kompleksa med rAtxA in VaaChi z nativno elektroforezo nismo uspeli dokazati (rezultat ni prikazan), zato le predvidevamo, da se ta dejansko tvori. Najverjetnejši razlog za neuspeh je, da AtxA in VaaChi v izbranih pogojih izvedbe nativne elektroforeze nista tvorila dovolj stabilnega kompleksa, da bi ga lahko zaznali. Kompleksi med naravnim AtxA in VaaChi so bili do zdaj dokazani z uporabo AtxA-afinitetne kromatografije in z metodo SPR, mi pa smo uporabili drugo metodo in rekombinantni AtxA (Brgles in sod., 2013). Eno ali drugo bi lahko bilo vzrok, da nastanka kompleksa nismo uspeli dokazati. VaaChi v molskem razmerju 1 : 1 in 1 : 5 (encim : zaviralec) ni vplival na encimsko aktivnost naravnega AtxA (slika 23).

Po izpostavitvi živčno-mišičnega preparata mišje hemidiafragme predinkubirani mešanici rAtxA ($0,845 \mu\text{M}$) in VaaChi ($7 \mu\text{M}$) ali samemu rAtxA v enaki koncentraciji v obeh primerih pride do znižanja amplitude posredno in neposredno izzvanih enostavnih in tetaničnih mišičnih kontrakcij (slike 25–29). Učinek je bil nepovraten, saj se 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino amplituda kontrakcije ni vrnila na vrednost kontrole. Statistično pomembnih razlik v učinkih mešanice rAtxA in VaaChi ter samega rAtxA nismo ugotovili, zato sklepamo, da AtxA in VaaChi ne delujeta niti sinergistično niti antagonistično. Znano je, da AtxA deluje presinaptično in da zavira izključno posredno izzvano mišično kontrakcijo. To dejstvo potrjuje membranski potencial v mirovanju, ki po popolnem zavrtju mišične kontrakcije na živčno-mišičnem preparatu ostane nespremenjen in popolno odziven na neposredno stimulacijo (Križaj, 2011). V poskusih smo poleg vpliva samega rAtxA ter mešanice rAtxA in VaaChi na posredno in neposredno stimulacijo opazili tudi dvig MT oziroma očitno kontrakturo, ki se ne povrne tudi 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino (slika 25). Kontraktura in učinek na neposredno izzvano mišično kontrakcijo naj bi nakazovala miotoksično delovanje AtxA in s tem vzbujala pomislek o do zdaj znanem dejству, da AtxA deluje le presinaptično (Harvey in sod., 1994; Vardjan in sod., 2013). Izključno presinaptično delovanje AtxA bi bilo treba preveriti še na živčno-mišičnem preparatu po dodatku dTC, dobro znanega antagonistika nAChR mišičnega tipa.

Nasprotno od zgoraj opisanih učinkov je sam VaaChi ($7 \mu\text{M}$) statistično značilno povečal amplitudo posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije mišje hemidiafragme (po 150 min za $26,5 \pm 3,0 \%$) (sliki 25C in 26), ni pa vplival na amplitudo neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije ob prisotnosti dTC (slika 27) niti na amplitudo posredno in neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije (sliki 28 in 29). V eni od hipotez smo predvidevali, da je kompleks AtxA-VaaChi bolj nevrotoksičen od samega AtxA. Ker ima sam VaaChi očitno ravno nasprotni učinek kot AtxA in poveča amplitudo posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije, stopnje nevrotoksičnosti na osnovi elektrofizioloških meritev mišične kontrakcije ni mogoče primerjati. Enaka učinka na amplitudo posredno in neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije sta značilna tudi za naravni zaviralec napetostno odvisnih K^+ kanalov α DTx, izoliran iz strupa elapidne vrste kače zelene mambe (*Dendroaspis angusticeps*), zato sklepamo, da podobno kot α DTx tudi VaaChi deluje presinaptično (Harvey in Anderson, 1985). Primarni strukturi α DTx in VaaChi kažeta ~49-odstotno identičnost (slika 6). Funkcionalno mesto α DTx vključuje šest glavnih aminokislinskih ostankov, ki so v N-končnem delu proteina

in so pomembni za vezavo na K⁺ kanal, najpomembnejša med njimi pa sta Lys5 in Leu9, ki ju vsebuje tudi VaaChi (Gasparini in sod., 1998; Banijamali in sod., 2019a). Drugi štirje pomembni aminokislinski ostanki so Arg3, Arg4, Leu6 in Ile8, od katerih VaaChi vsebuje le prvega od naštetih (Gasparini in sod., 1998). Na osnovi strukturne podobnosti in ugotovljenih učinkov VaaChi na živčno-mišičnem preparatu predpostavljamo, da je povečanje amplitude posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije posledica zaviralnega delovanja VaaChi na napetostno odvisne K⁺ kanale v presinaptični membrani motoričnega nevrona. Za potrditev predlaganega mehanizma delovanja bi bilo treba opraviti dodatne elektrofiziološke meritve vpliva VaaChi neposredno na tok skozi K⁺ kanale, kar pa presega okvir te raziskave. Če se z elektrofiziološkimi metodami potrdi delovanje na K⁺ kanale, bi bil VaaChi prva molekula izolirana iz strupov viperidnih kač s potrjenim dvojnim delovanjem, tj. kot zaviralec serinskih proteaz in zaviralec K⁺ kanalov. Na splošno je znanih le nekaj proteinov s takim dvojnim delovanjem. Njihova skupna lastnost je, da je učinek na eno od fizioloških funkcij šibkejši od drugega (Banijamali in sod., 2019b). Tak protein je dendrotoksin-I (DTx-I) iz strupa elapidne kače, ki je učinkovit zaviralec K⁺ kanalov in le šibko zavira proteazno aktivnost kimotripsina (Banijamali in sod., 2019a). Pred kratkim so na podlagi 3-D-strukturne podobnosti z αDTx in računalniškega modeliranja kompleksa s K⁺ kanali postavili hipotezo, da bi tako dvojno delovanje lahko izražal tudi zaviralec tripsina PPTI iz strupa viperidne kače *Pseudocerastes Persicus* (PPTI) (Banijamali in sod., 2019a).

Z namenom raziskovanja mehanizmov delovanja VaaChi na periferni živčno-mišični sistem smo poleg vpliva na izometrično mišično kontrakcijo proučevali tudi njegov vpliv na elektrofiziološke parametre mišičnih vlaken mišje hemidiafragme. Proučevali smo vpliv VaaChi na naslednje parametre membranskih potencialov: (i) rV_m, (ii) amplitudo in razpolovni čas PMP; (iii) amplitudo in razpolovni čas MPMP in (iv) frekvenco MPMP. VaaChi (7 µM) povzroči statistično značilno povečanje amplitude PMP skeletnih mišičnih vlaken 90 in 150 min po izpostavitvi (v povprečju za 21,4 in 22,3 %) (slika 31), ki je tudi 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino nepovratno. Učinek se razlikuje od učinka αDTx, ki 2–15 min po izpostavitvi povzroči le prehodno povečanje amplitude PMP (Anderson in Harvey, 1988). αDTx zaradi zavrtja K⁺ kanalov prepreči tok K⁺ ionov iz celice med fazo repolarizacije akcijskega potenciala, kar podaljša trajanje depolarizacije in tako poveča tok Ca²⁺ ionov v celico, posledica tega pa je povečanje z vsakim živčnim impulzom sproščenega ACh in povečanje amplitude PMP (Hawgood in Bon, 1991; Atchison, 2017). Menimo, da je

mehanizem povečanja amplitude PMP po izpostavitvi VaaChi enak mehanizmu, opisanemu v primeru α DTx. VaaChi 150 min po izpostavitvi prav tako statistično značilno nekoliko skrajša razpolovni čas padajoče faze PMP (v povprečju za 5,1 %) (slika 32) in poveča amplitudo MPMP (v povprečju za 30,1 %) (slika 33), kar nakazuje povečano kvantno sproščanje ACh. VaaChi 30 min po izpostavitvi le prehodno nekoliko podaljša razpolovni čas padajoče faze MPMP (v povprečju za 5,4 %) (slika 34), vendar je učinek majhen in se pozneje ne razlikuje več od kontrole. V nasprotju z VaaChi α DTx naj ne bi vplival na amplitudo MPMP in njegov časovni potek oz. razpolovni čas (Hawgood in Bon, 1991). Ugotovili smo tudi vpliv VaaChi na frekvenco MPMP. VaaChi povzroči zmanjšanje frekvence MPMP 30, 90 in 150 min po aplikaciji (v povprečju za 21,3, 64,5 in 73,4 %) in izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino (v povprečju za 30,3 %) (slika 35), kar kaže, da je učinek nepovraten. Pri kontroli frekvence MPMP na min do izpiranja postopno narašča, pri VaaChi pa ostane približno enaka ves čas poskusa. Tudi α DTx 5 min po izpostavitvi povzroči znižanje frekvence MPMP, vendar se ta običajno povrne v 30 min po aplikaciji toksina, kar kaže, da povečanje kvantov sproščenega ACh ni posledica dolgotrajnega dviga koncentracije Ca^{2+} v citosolu, v primeru VaaChi pa menimo, da bi dvig koncentracije lahko vztrajal dalj časa (Anderson in Harvey, 1988; Hawgood in Bon, 1991). Povečana amplituda MPMP in znižana frekvenco MPMP na min kažeta, da VaaChi povzroči povečanje števila ACh molekul, ki jih vsebuje en kvant nevrotransmiterja in da deluje zaviralno na napetostno odvisne K^+ kanale v presinaptični membrani motoričnega nevrona. Na opažene razlike v delovanju med α DTx in VaaChi bi lahko vplivala tudi razlika v temperaturi, pri kateri so bili opravljeni poskusi, saj smo svoje poskuse izvajali pri sobni temperaturi in smo zaznavanje sprememb omogočili s podaljšanjem poskusa, poskusi z α DTx pa so bili opravljeni pri temperaturi 37 °C, ki je bližja fiziološkim pogojem. Prav tako je znano, da ima α DTx manjši učinek na živčno-mišični preparat pri 32 °C kot pri 37 °C, kar bi lahko veljalo tudi za VaaChi. Pri 20 °C po 60–105 min izpostavljenosti živčno-mišičnega preparata α DTx toksin prav tako ne vpliva več na amplitudo PMP (Anderson in Harvey, 1988). Za α DTx je značilno tudi, da po enkratni stimulaciji živca nastane večje število PMP (spontani ponavljači PMP), ki se pri poskusih z VaaChi niso pojavljali (Anderson in Harvey, 1988). VaaChi prav tako ni vplival na rV_m (slika 30), kar potrjuje, da

VaaChi ne deluje direktno na mišična vlakna, jih ne depolarizira, torej ne vpliva na njihove pasivne elektrofiziološke lastnosti.

V tabeli 13 so povzeti vsi ugotovljeni vplivi VaaChi ($7 \mu\text{M}$) ter mešanice rAtxA ($0,845 \mu\text{M}$) in VaaChi ($7 \mu\text{M}$) na merjene elektrofiziološke parametre motorične ploščice živčno-mišičnega preparata mišje hemidiafragme, ki omogočajo hiter pregled vseh učinkov. Če na kratko povzamemo, VaaChi pri $7 \mu\text{M}$ koncentraciji poveča amplitudo posredno izvvane enostavne mišične kontrakcije ter ne vpliva na amplitudo neposredno izvvane enostavne mišične kontrakcije niti na amplitudo tetanične mišične kontrakcije. VaaChi prav tako poveča amplitudo PMP in MPMP ter zniža frekvenco MPMP. Vpliv VaaChi na razpolovni čas PMP in MPMP je manjši, in sicer nekoliko skrajša razpolovni čas padajoče faze PMP in prav nasprotno nekoliko podaljša razpolovni čas MPMP. Učinek na zadnja parametra je relativno majhen in biološko ni pomemben, saj ne vpliva na fiziologijo krčenja mišice. Učinek mešanice rAtxA in VaaChi se statistično značilno ne razlikuje od učinkov samostojno dodanega rAtxA, amplituda mišične kontrakcije pa je ne glede na način stimulacije in proučevane parametre v vseh primerih znižana. Pomembno je tudi dejstvo, da smo vse poskuse na živčno-mišičnem preparatu mišje hemidiafragme izvajali z vzorcem VaaChi, ki je vseboval vsaj šest različnih naravnih izoblik, zato bi jih bilo treba v nadaljnjih raziskavah ločiti in testirati njihove posamične učinke.

Tabela 13: **Vpliv VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na elektrofiziološke parametre motorične ploščice**

Table 13: **Effects of VaaChi and the mixture of rAtxA and VaaChi on neuromuscular junction**

| Način stimulacije | Proučevani parametri | VaaChi | rAtxA+VaaChi | rAtxA |
|---------------------------------|---|--------|--------------|-------|
| posredna stimulacija prek živca | amplituda enostavne mišične kontrakcije | ↗ | ↘ | ↘ |
| | amplituda tetanične mišične kontrakcije | → | ↘ | ↘ |
| | amplituda PMP | ↗ | | |
| | razpolovni čas PMP | ↘ | | |
| neposredna stimulacija mišice | amplituda enostavne mišične kontrakcije | → | ↘ | ↘ |
| | amplituda tetanične mišične kontrakcije | → | ↘ | ↘ |
| brez stimulacije | amplituda MPMP | ↗ | | |
| | razpolovni čas MPMP | ↗ | | |
| | frekvanca MPMP | ↘ | | |
| | rVm | → | | |

Legenda: → nespremenjeno; ↗ povečanje/podaljšanje; ↘ znižanje/skrajšanje

Legend: → unchanged; ↗ increase/extension; ↘ reduction/shortening

6 SKLEPI

1. Živčno-mišični preparat mišje hemidiafragme smo izpostavili rAtxA in predinkubirani mešanici rAtxA ter VaaChi. Razlik v amplitudi posredno in neposredno izzvane enostavne ter tetanične mišične kontrakcije med poskusi nismo ugotovili, zato sklepamo, da AtxA in VaaChi ne delujeta sinergistično, kot smo predvidevali v prvi hipotezi.
2. Na podlagi pridobljenih rezultatov na živčno-mišičnem preparatu miši ima VaaChi ravno nasprotni učinek kot rAtxA, torej poveča amplitudo posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije. V drugi hipotezi smo predvidevali, da je kompleks AtxA-VaaChi bolj nevrotoksičen od samega AtxA, vendar stopnje nevrotoksičnosti, zaradi nasprotnega delovanja vsake od komponent potencialnega kompleksa, na osnovi opravljenih elektrofizioloških meritev ni mogoče primerjati.
3. VaaChi je statistično značilno povečal amplitudo posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije mišje hemidiafragme, amplitudo PMP in amplitudo MPMP. Tretjo hipotezo nam je s poskusi torej uspelo potrditi. Ker je VaaChi strukturno zelo podoben α DTx, zavircu napetostno odvisnih K^+ kanalov iz strupa zelene mambe, menimo, da so opaženi učinki VaaChi posledica zaviralnega delovanja na napetostno odvisne K^+ kanale v presinaptični membrani živčno-mišičnega stika. Presinaptične učinke potrjuje tudi dejstvo, da VaaChi v prisotnosti dTC ni povečal amplitude neposredno izzvane mišične kontrakcije.

7 POVZETEK

Za ugotavljanje mehanizmov delovanja in učinkov VaaChi ter mešanice rAtxA in VaaChi na živčno-mišični prenos smo iz modrasovega strupa (*Vaa*) strupa z ionsko izmenjevalno kromatografijo, gelsko filtracijo in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z obrnjenima fazama v štirih frakcijah prvič izolirali vsaj šest različnih naravnih izooblik VaaChi. Čistost izoliranih frakcij smo preverjali z NaDS-PAGE in sekveniranjem po Edmanu. S tem metodama smo izoliranim proteinom določili navidezno molekulsko maso okoli 10 kDa in N-končno aminokislinsko zaporedje RDRPK, kar je značilno za VaaChi. Na podlagi MS-analize smo v prvih dveh frakcijah določili dele zaporedja petih različnih izooblik modrasovih VaaChi, od katerih sta bili dve že prej opisani na proteinski ravni (VaaChi in VaaChi-3), druge tri (cVaaChi-2, cVaaChi-3 in cVaaChi-5) pa le na ravni genoma. V prvi frakciji prevladujeta zaviralca z molekulskima masama 7531 in 7565 Da, v drugi frakciji pa zaviralca z masama 7549 in 7648 Da. V preostalih dveh frakcijah smo dokazali le prisotnost izooblike VaaChi-3 z molekulskima masama 7451 in 7469 Da. Treh cVaaChi, ki so bile do zdaj določene le na ravni genoma, z uporabljenimi metodami med seboj nismo uspeli ločiti, zato obstaja možnost, da smo prvič v aktivni obliki izolirali le eno ali dve izmed njih oziroma celo vse tri izooblike. Primarna zaporedja določenih zaviralcev se med seboj razlikujejo le v sedmih aminokislinah na položajih, ki niso pomembni za njihovo aktivnost oz. specifičnost. Vse izolirane frakcije so, ne glede na sestavo, izražale podobno zaviralno aktivnost kimotripsina, čeprav ne moremo izključiti, da je prispevek izooblik k zaviranju v heterogenih frakcijah različen. Nobena izolirana frakcija ni vplivala na encimsko aktivnost naravnega AtxA, zato smo vse nadaljnje poskuse lahko izvajali z mešanico vseh izooblik VaaChi. Pripravili smo tudi rekombinantni AtxA (rAtxA) z molekulsko maso, identično teoretični masi naravnega AtxA. Z encimskim testom smo pokazali, da ima rekombinantni protein enako fosfolipazno aktivnost kot naravni AtxA, zato ga je lahko nadomestil v vseh elektrofizioloških poskusih, ki smo jih izvedli na živčno-mišičnem preparatu mišje hemidiafragme. Določali smo vpliv samega rAtxA oziroma VaaChi in predinkubirane mešanice obeh na amplitudo posredno in neposredno izzvanih enostavnih in tetaničnih mišičnih kontrakcij. Ker nam kompleksov med rAtxA in VaaChi z nativno elektroforezo ni uspelo dokazati, le predvidevamo da se ti dejansko tvorijo v mešanici. Po izpostavitvi živčno-mišičnega preparata mišje hemidiafragme predinkubirani mešanici rAtxA in VaaChi ali samemu rAtxA v enaki koncentraciji v obeh primerih pride do znižanja amplitude posredno in neposredno izzvanih enostavnih in tetaničnih mišičnih

kontrakcij, učinek pa je nepovraten znotraj 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. Učinki rAtxA se niso razlikovali od učinkov mešanice rAtxA in VaaChi, zato sklepamo, da AtxA in VaaChi ne delujeta sinergistično. V obeh primerih je bila opazna tudi kontraktura oz. dvig MT, ki kaže na mogoče miotoksično delovanje AtxA. Sam VaaChi je statistično značilno povečal amplitudo posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije mišje hemidiafragme, učinek pa je bil povraten v 15 min po izpiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. V nadalnjih poskusih smo nato ugotovili, da VaaChi prav tako poveča amplitudi PMP in MPMP, podaljša razpolovni čas padajoče faze PMP in zmanjša frekvenco MPMP. VaaChi je strukturni homolog α DTx, zaviralca napetostno odvisnih K^+ kanalov iz strupa zelene mambe. Na osnovi strukturne podobnosti med njima in ugotovljenih učinkov VaaChi na živčno-mišični preparat predvidevamo, da je povečanje amplitude posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije posledica zaviralnega delovanja VaaChi na napetostno odvisne K^+ kanale v presinaptični membrani motoričnega nevrona. VaaChi je tako verjetno sploh prvi primer proteina Kunitzovega tipa iz strupa viperidne kače, ki zavira serinske proteaze in napetostno odvisne K^+ kanale. Za potrditev predlaganega mehanizma delovanja bo treba opraviti dodatne elektrofiziološke meritve vpliva VaaChi neposredno na ionski tok skozi K^+ kanale. Prav tako bo treba med seboj ločiti vse naravne izooblike VaaChi in vsaki posebej določiti njihovo sposobnost, da zavirajo serinske proteaze in K^+ kanale.

8 SUMMARY

To determine the mechanisms of action and effects on neuromuscular transmission of VaaChi and a mixture of rAtxA and VaaChi, at least six different natural isoforms of VaaChi in four fractions were isolated for the first time from nose-horned viper (*Vaa*) venom by ion exchange chromatography, gel filtration chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography. The purity of the isolated fractions was determined by NaDS-PAGE and Edman sequencing. Using these methods, we determined an apparent protein molecular mass of approximately 10 kDa and the N-terminal amino acid sequence of RDRPK, which is a characteristic of VaaChi. Based on MS analysis, we determined parts of the sequence of five different isoforms of VaaChi from *Vaa* venom, two of which were previously described at the protein level (VaaChi and VaaChi-3) and the other three (cVaaChi-2, cVaaChi-3 and cVaaChi-5) only at the genome level. Inhibitors with molecular masses of 7531 and 7565 Da predominated in the first fraction, while inhibitors with masses of 7549 and 7648 Da predominated in the second fraction. In the remaining two fractions, only the presence of the VaaChi-3 isoform with molecular masses of 7451 and 7469 Da were found. These three cVaaChi isoforms, which have so far only been determined at the genome level, could not be differentiated by the methods used, so there is a possibility that for the fist time, we isolated only one, two or even all three isoforms in their active form. The primary sequences of the determined inhibitors differ from each other only by seven amino acids at positions that are not important for their activity or specificity. All isolated fractions, regardless of their composition, expressed similar chymotrypsin inhibitory activity, although it cannot be ruled out that the contribution of these isoforms on the inhibition in the heterogeneous fractions was different. No isolated fraction affected the enzymatic activity of natural AtxA; therefore, all further experiments were performed with a mixture of all VaaChi isoforms. We also prepared recombinant AtxA (rAtxA) with a molecular mass identical to the theoretical mass of natural AtxA. An enzyme test showed that the recombinant protein had the same phospholipase activity as natural AtxA; therefore, it was possible to use the recombinant AtxA as a replacement in all electrophysiological experiments performed on the neuromuscular preparation of the mouse hemidiaphragm. We determined the effects of rAtxA, VaaChi and the preincubated mixture of both on the amplitude of indirectly and directly evoked simple and tetanic muscle contractions. Since we were unable to prove the formation of a complex between rAtxA and VaaChi by native electrophoresis, we only assumed that they actually form a complex in the mixture. After

exposure of the neuromuscular preparation of the mouse hemidiaphragm to a preincubated mixture of rAtxA and VaaChi or rAtxA alone at the same concentration, the amplitude of the directly and indirectly evoked simple and tetanic muscle contractions decreased in both cases, and the effects were irreversible within 15 min after washout of the neuromuscular preparation with K-R solution. The effects of rAtxA did not differ from the effects of a mixture of rAtxA and VaaChi; therefore, we concluded that AtxA and VaaChi do not act synergistically. In both cases, contracture or an increase in MT was also observed, indicating a possible myotoxic effect of AtxA. VaaChi significantly increased the amplitude of the indirectly evoked simple muscle contraction of the mouse hemidiaphragm. The effect was reversible within 15 min after washout of the neuromuscular preparation with K-R solution. In further experiments, we proved that VaaChi increases the amplitudes of EPP and MEPP, prolongs the half-decay time of EPP and decreases the frequency of MEPP. VaaChi is a structural homologue of α DTx, a blocker of voltage-dependent K^+ channels from green mamba (*Dendroaspis angusticeps*) venom. Based on the structural similarity between these proteins and the observed effects of VaaChi on neuromuscular preparation, we suggest that the increase in the amplitude of indirectly evoked simple muscle contraction is due to the inhibitory action of VaaChi on voltage-dependent K^+ channels in the presynaptic membrane of motor neurons. VaaChi is probably the first example of a Kunitz-type protein from viperid snake venom that inhibits both serine proteases and voltage-dependent K^+ channels. To confirm the proposed mechanism of action, additional electrophysiological measurements of the direct effects of VaaChi on the ion current through the K^+ channels will need to be performed. Additionally, it will be necessary to distinguish between all natural VaaChi isoforms and to separately determine their ability to inhibit serine proteases and K^+ channels.

9 ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Robertu Frangežu in somentorju prof. dr. Igorju Križaju se zahvaljujem za priložnost opravljanja raziskovalnega dela, strokovne nasvete, konstruktivne komentarje in vodenje pri pisanju naloge.

Za izvedeno tandemsko MS-analizo, določitev aminokislinskega zaporedja z Edmanovo metodo, vodenje in pomoč pri laboratorijskem delu, predvsem pa za neizmerno potrežljivost, prijaznost in znanje, ki ga je delila z menoj, ter številne izčrpne popravke se posebej zahvaljujem delovni mentorici doc. dr. Adriani Leonardi.

Za pripravo živčno-mišičnega preparata, izvedene elektrofiziološke meritve, pomoč pri analizah meritev in statistiki, še zlasti pa za pozitivno energijo, prijaznost, spodbudne besede in znanje, ki ga je delila z menoj, se najlepše zahvaljujem delovni mentorici doc. dr. Moniki C. Žužek.

Zahvaljujem se tudi Katarini Babnik, Tomažu Trobcu in Adrijanu Ivanušcu za nasvete, prijaznost, ustrežljivost in pomoč pri laboratorijskem delu, dr. Dušanu Žigonu pa za določitev molekulskih mas na masnem spektrometru.

Mag. Brigita Greč-Smole je skrbno pregledala seznam literature, za kar se ji prijazno zahvaljujem.

Iskreno se zahvaljujem tudi svoji družini, partnerju Tadeju in njegovi družini za ljubečo skrb, spodbudo in izkazano podporo med študijem ter za opogumljanje v težkih trenutkih.

10 LITERATURA

- Anderson AJ, Harvey AL. Effects of the potassium channel blocking dendrotoxins on acetylcholine release and motor nerve terminal activity. *Br J Pharmacol* 1988; 93: 215–21.
- Atchison W. Toxicology of the neuromuscular junction. In: McQueen CA, eds. *Comprehensive toxicology*. Vol. 6. 3rd ed. Amsterdam : Elsevier, 2017: 268.
- Balant A. Izolacija blokatorjev K⁺ kanalčkov iz morske veternice *Urticina crassicornis*. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2009. Diplomsko delo
- Belva H, Valois C, Lange C. Determination of disulfide bonds in highly bridged α-dendrotoxin by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 2000; 14: 224–9.
- Banijamali SE, Amininaseb M, Elmi MM. Characterization of a new member of kunitz-type protein family from the venom of Persian false-horned viper, *Pseudocerastes persicus*. *Arch Biochem Biophys* 2019a; 662: 1–6.
- Banijamali SE, Amininasab M, Zaeifi D. Structural characterization of PPTI, a kunitz type protein from the venom of *Pseudocerastes persicus*. *PLoS ONE* 2019b; 14(4): e0214657. doi: 10.1371/journal.pone.0214657
- Benishin CG, Sorensen RG, Brown WE, Krueger BK, Blaustein MP. Four polypeptide components of green mamba venom selectively block certain potassium channels in rat synaptosomes. *Mol Pharmacol* 1988; 34: 152–9.
- Bittner EA, Martyn JA. Neuromuscular physiology and pharmacology. In: Egan TD, Hemmings HC, eds. *Pharmacology and physiology for anesthesia: foundations and clinical application*. 2nd ed. Philadelphia : Elsevier, 2018: 413–4.
- Bohlen CJ, Chesler AT, Sharif-Naeini R, et al. A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature* 2011; 479: 410–6.
- Brgles M, Kurtović T, Kovačič L, et al. Identification of proteins interacting with ammodytoxins in *Vipera ammodytes ammodytes* venom by immuno-affinity chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2014; 406: 293–304.

Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* 2009; 50: S237–42.

Chu CC, Chu ST, Chen SW, Chen YH. The nonphospholipase A₂ subunit of beta-bungarotoxin plays an important role in the phospholipase A₂-independent neurotoxic effect: characterization of three isotoxins with a common phospholipase A₂ subunit. *Biochem J* 1994; 303: 171–6.

de Magalhães MTQ, Mambelli FS, Santos BPO, Morais SB, Oliveira SC. Serine protease inhibitors containing a Kunitz domain: their role in modulation of host inflammatory responses and parasite survival. *Microbes Infect* 2018; 20(9/10): 606–9.

Dufton MJ, Harvey AL. Dendrotoxins: how does structure determine function? *J Toxicol Toxin Rev* 1998; 17(2): 161–82.

Eguchi T, Tezuka T, Fukudome T, Watanabe Y, Sagara H, Yamanashi Y. Overexpression of Dok-7 in skeletal muscle enhances neuromuscular transmission with structural alterations of neuromuscular junctions: Implications in robustness of neuromuscular transmission. *Biochem Biophys Res Commun* 2020; 523(1): 214–19.

Fathi B, Harvey AL, Rowan EG. Suramin inhibits the early effects of PLA₂ neurotoxins at mouse neuromuscular junctions: a twitch tension study. *J Venom Res* 2011; 2: 6–10.

Gasparini S, Danse JM, Lecoq A, et al. Delineation of the functional site of α -dendrotoxin. *J Biol Chem* 1998; 273(39): 25393–403.

Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, et al. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 1994; 48: 1227–34.

Gubešek F, Sket D, Turk V, Lebez D. Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variations of its composition. *Toxicon* 1974; 12(2):167–71.

Guček A. Meritve elementarnih dogodkov uravnavane eksocitoze v astrocitih. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015. Doktorska disertacija

Halassy B, Habjanec L, Langa Balija M, Kurtović T, Brgles M, Križaj I. Ammodytoxin content of *Vipera ammodytes ammodytes* venom as a prognostic factor of venoms immunogenicity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2010; 151: 455–60.

Harvey AL. Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon* 2001; 39: 15–26.

Harvey AL, Anderson AJ. Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. *Pharmacol Ther* 1985; 31(1/2): 33–55.

Harvey AL, Barfaraz A, Thomson E, Faiz A, Preston S, Harris JB. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. *Toxicon* 1994; 32(3): 257–65.

Harvey AL, Karlsson E. Dendrotoxin from the venom of the green mamba, *Dendroaspis angusticeps*: a neurotoxin that enhances acetylcholine release at neuro-muscular junctions. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1980; 312: 1–6.

Harvey AL, Karlsson E. Protease inhibitor homologues from mamba venoms: facilitation of acetylcholine release and interaction with prejunctional blocking toxins. *Br J Pharmacol* 1982; 77: 133–61.

Hurst RS, Busch AE, Kavanaugh MP, Osborne PB, North RA, Adelman JP. Identification of amino acid residues involved in dendrotoxin block of rat voltage-dependent potassium channels. *Mol Pharmacol* 1991; 40(4): 572–6.

Hawgood B, Bon C. Snake venom presynaptic toxins. In: Tu AT, eds. *Handbook of natural toxins: reptile venoms and toxins*. Vol. 5. New York : M. Dekker, 1991: 26.

Juel VC. Clinical neurophysiology of neuromuscular junction disease. In: Levin KH, Chauvel P, eds. *Handbook of clinical neurology: clinical neurophysiology: diseases and disorders*. Vol. 161. Philadelphia : Elsevier, 2019: 291–303.

Kovačič L, Novinec M, Petan T, Baici A, Križaj I. Calmodulin is a nonessential activator of secretory phospholipase A₂. *Biochemistry* 2009; 48: 11319–28.

Kovačič L, Novinec M, Petan T, Križaj I. Structural basis of the significant calmodulin-induced increase in the enzymatic activity of secreted phospholipases A₂. *Protein Eng Des Sel* 2010; 23(6): 479–87. doi: 10.1093/protein/gzq019.

Križaj I. Ammodytoxin: a window into understanding presynaptic toxicity of secreted phospholipases A₂ and more. *Toxicon* 2011; 58: 219–29.

Križaj I, Gubenšek F. Neuronal receptors for phospholipases A₂ and β-neurotoxicity. *Biochimie* 2000; 82: 807–14.

Kurtović T, Leonardi A, Balija ML, et al. The standard mouse assay of anti-venom quality does not measure antibodies neutralising the haemorrhagic activity of *Vipera ammodytes* venom. *Toxicon* 2012; 59: 709–17.

Laskowski M. Jr, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Ann Rev Biochem* 1980; 49: 593–626.

Leonardi A, Sajevic T, Pungerčar J, Križaj I. Comprehensive study of the proteome and transcriptome of the venom of the most venomous European viper: discovery of a new subclass of ancestral snake venom metalloproteinase precursor-derived proteins. *J Proteome Res* 2019; 18(5): 2287–309.

Logonder U, Križaj I, Rowan EG, Harris JB. Neurotoxicity of ammodytoxin A in the envenoming bites of *Vipera ammodytes ammodytes*. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67(10): 1011–9.

Madeira F, Park YM, Lee J, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* 2019; 47(W1): W636–41.

Mehraban F, Haines A, Dolly JO. Monoclonal and polyclonal antibodies against dendrotoxin: their effects on its convulsive activity and interaction with neuronal acceptors. *Neurochem Int* 1986; 9(1): 11–22.

NCBI. Inhibitor, chymotrypsin.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/0909196A> (2. mar. 2020).

Parcej DN, Scott VES, Dolly JO. Oligomeric properties of α -dendrotoxin-sensitive potassium ion channels purified from bovine brain. *Biochemistry* 1992; 31: 11084–8.

Petan T. Nevrotoksično in encimsko delovanje modrasovih fosfolipaz A2. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2003. Doktorska disertacija

Petan T, Križaj I, Gelb MH, Pungerčar J. Ammodytoxins, potent presynaptic neurotoxins, are also highly efficient phospholipase A2 enzymes. *Biochemistry* 2005; 44(37): 12535–45.

Prijatelj P, Vardjan N, Rowan EG, Križaj I, Pungerčar J. Binding to the high-affinity M-type receptor for secreted phospholipases A₂ is not obligatory for the presynaptic neurotoxicity of ammodytoxin A. *Biochimie* 2006; 88: 1425–33.

Pungerčar J, Žnidaršič PP, Petan T. Structure-function relationship studies of ammodytoxins and ammodytins by protein engineering. *Acta Chim Slov* 2011; 58: 660–70.

Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 1993; 290: 205–18.

Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J* 2004; 378: 705–16.

Ritonja A, Gubenšek F. Ammodytoxin A, a highly lethal phospholipase A₂ from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Biochim Biophys Acta* 1985; 828: 306–12.

Ritonja A, Meloun B, Gubenšek F. The primary structure of *Vipera ammodytes* venom chymotrypsin inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1983a; 746: 138–45.

Ritonja A, Meloun B, Gubenšek F. The primary structure of *Vipera ammodytes* venom trypsin inhibitor I. *Biochim Biophys Acta* 1983b; 748: 429–35.

Ritonja A, Turk V, Gubenšek F. Serine proteinase inhibitors from *Vipera ammodytes* venom: isolation and kinetic studies. *Eur J Biochem* 1983c; 133: 427–32.

Rüdiger R, Straka T. Nicotinic acetylcholine receptor at vertebrate motor endplates: endocytosis, recycling, and degradation. *Neurosci Lett* 2019; 711: 134434.

Saul FA, Žnidaršič PP, Normand VB et al. Comparative structural studies of two natural isoform of ammodytoxin, phospholipases A₂ from *Vipera ammodytes ammodytes* which differ in neurotoxicity and anticoagulant activity. *J Struct Chem* 2010; 169: 360–69.

Schweitz H, Bruhn T, Guillelmore E et al. Kalicladines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels. *J Biol Chem* 1995; 270: 25121–6.

Skarzynski T. Crystal structure of α-dendrotoxin from the green mamba venom and its comparison with the structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J Mol Biol* 1992; 224: 671–83.

Spirova EN, Ivanov IA, Kasheverov IE, et al. Curare alkaloids from Matis Dart poison: comparison with d-tubocurarine in interactions with nicotinic, 5-HT₃ serotonin and GABA_A receptors. *PLoS ONE* 2019; 14(1): e0210182. doi: 10.1371/journal.pone.0210182

Strydom DJ. Protease inhibitors as snake venom toxins. *Nature New Biol* 1973; 243(124): 88–9.

Strong PN. Potassium channel toxin. *Pharmac Ther* 1990; 46: 137–62.

Šribar J, Čopič A, Pariš A, et al. A high affinity acceptor for phospholipase A₂ with neurotoxic activity is a calmodulin. *J Biol Chem* 2001; 276: 12493–6.

Thakur R, Mukherjee AK. Pathophysiological significance and therapeutic applications of snake venom protease inhibitors. *Toxicon* 2017; 131: 37–47.

Trobec T. Vpliv rutenijeve spojine C1a na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema. Ljubljana : UL, Veterinarska fakulteta, 2018. Prešernova naloga.

Tricaud N, Marchot P, Martin-Eauclaire MF. On the kaliotoxin and dendrotoxin binding sites on rat brain synaptosomes. *Toxicon* 2000; 38: 1749–58.

Tytgat J, Debont T, Carmeliet E, Daenens P. The α-dendrotoxin footprint on a mammalian potassium channel. *J Biol Chem* 1995; 270(42): 24776–81.

Kunitz-type serine protease inhibitor 1. UniProt. UniProtKB - P00991 (VKT1_VIPAA).
<https://www.uniprot.org/uniprot/P00991> (2. mar. 2020)

Kunitz-type serine protease inhibitor 3. UniProt. UniProtKB - P00992 (VKT3_VIPAA).

<https://www.uniprot.org/uniprot/P00992> (2. mar. 2020)

Vardjan N, Mattiazzi M, Rowan EG, Križaj I, Petrovič U, Petan T. Neurotoxic phospholipase A₂ toxicity model: an insight from mammalian cells. *Commun Integr Biol* 2013; 6(3): e23600. doi: 10.4161/cib.23600.

Wachter E, Deppner K, Hochstrasser K, Lempart K, Geiger R. A new Kunitz-type inhibitor from bovine serum amino acid sequence determination. *FEBS Lett* 1980, 119(1): 58–62.

Wenzel HR, Tschesche H. „Chemische Mutation“ durch Aminosäureaustausch im reaktiven Zentrum eines Proteinase-Inhibitors und Änderung seiner Hemmspezifität. *Angew Chem* 1981; 93(3): 292–3.

Wessler I. Acetylcholine release at motor endplates and autonomic neuroeffector junctions: a comparison. *Pharmacol Res* 1996; 33(2): 81–94.

Wessler I, Dooley DJ, Lohr B. P-type Ca²⁺ channels trigger stimulus-evoked [³H]acetylcholine release from mammalian motor endplates. *Eur J Pharmacol* 1995; 278: 83–6.

Wilton CD, Waite M. Phospholipases. In: Vance DE, Vance JE, eds. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 4th ed. Amsterdam : Elsevier 2002: 291–306.

Župunski V, Kordič D, Gubenšek F. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS Lett* 2003; 547: 131–6.