



Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta

**PRIPRAVA IN PATOFIZIOLOŠKA
KARAKTERIZACIJA ENCIMSKO NEAKTIVNEGA
MUTANTA AMODITOKSINA, NEVROTOKSIČNE
SEKRETORNE FOSFOLIPAZE A₂ IZ
MODRASOVEGA STRUPA**

**ISOLATION AND PATHOPHYSIOLOGICAL
CHARACTERIZATION OF ENZYMATICALLY
INACTIVE MUTANT OF AMMODYTOXIN, A
NEUROTOXIC SECRETORY PHOSPHOLIPASE A₂
FROM THE VENOM OF LONG-NOSED VIPERS**

Julija Herman

Ljubljana 2022



Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta

UDK: 547.993:577.15:615.279:591.181(043.2)

**PRIPRAVA IN PATOFIZIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA
ENCIMSKO NEAKTIVNEGA MUTANTA
AMODITOKSINA, NEVROTOKSIČNE SEKRETORNE
FOSFOLIPAZE A₂ IZ MODRASOVEGA STRUPA**

**ISOLATION AND PATHOPHYSIOLOGICAL
CHARACTERIZATION OF ENZYMATICALLY
INACTIVE MUTANT OF AMMODYTOXIN, A
NEUROTOXIC SECRETORY PHOSPHOLIPASE A₂
FROM THE VENOM OF LONG-NOSED VIPERS**

Julija Herman

Delo je opravljeno 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 na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti Inštituta »Jožef Stefan« v okviru raziskovalnega programa P1-0207.

Ljubljana 2022

IZVLEČEK

Ključne besede: biološki toksini; sekretorna fosfolipaza A₂; encimska aktivnost; mišična kontrakcija; membranski potencial; živčno-mišični stik; motorična ploščica.

Sekretorne fosfolipaze A₂ (sPLA₂) so biološko zelo pomembni encimi. Nekatere so tudi toksična sestavina strupov, na primer amoditoksin A (AtxA) iz strupa modrasa. Vprašanje, ki smo si ga zastavili, je bilo, kakšno vlogo ima v procesu nevrotoksičnosti tega in podobnih β -nevrotoksinov njihova encimska aktivnost. S tehniko rekombinantne DNA smo pripravili encimsko aktivno obliko molekule AtxA (rAtxA) in njen encimsko neaktivni mutant AtxA(D49S). Oba proteina smo očistili in karakterizirali. Ugotovili smo, da rAtxA v nasprotju z AtxA(D49S) značilno zmanjša amplitudo izometričnih mišičnih kontrakcij mišjega živčno-mišičnega preparata. Medtem ko smo v primeru rAtxA izmerili značilne učinke na opazovane elektrofiziološke parametre (znižanje amplitude potenciala motorične ploščice (PMP), podaljšanje razpolovnega časa padajoče faze PMP, zmanjšanje frekvence miniaturnih potencialov motorične ploščice in padec mirovnega membranskega potenciala), teh v primeru AtxA(D49S) nismo opazili. Opravljene meritve potrjujejo presinaptično delovanje rAtxA, nakazujejo pa tudi njegovo posinaptično (miotoksično) delovanje. Podobnih učinkov pri AtxA(D49S) nismo ugotovili, zato lahko sklepamo, da je encimska aktivnost ključna za toksično delovanje AtxA. AtxA(D49S) je netoksičen antagonist AtxA, torej bi ga potencialno lahko uporabili tudi v terapevtske namene. Z aplikacijo AtxA(D49S) pacientu, zastrupljenemu z modrasovim strupom, bi izpodrinili AtxA z mesta delovanja v živčno-mišičnem stiku in tako omilili ali popolnoma preprečili njegove toksične učinke.

ABSTRACT

Key words: ammodytotoxin A; toxins, biological; phospholipase A₂, secretory; enzyme activators; muscle contraction; membrane potentials; neuromuscular junction; motor endplate.

Secretory phospholipases A₂ (sPLA₂) are a group of extremely important biological enzymes. Among other tasks, some of these enzymes, such as ammodytotoxin A (AtxA) from the venom of a long-nosed viper, function as toxic components of venoms. In this study, we examined the role that enzymatic activity plays regarding the neurotoxicity of AtxA and other β -neurotoxins. Using recombinant DNA, we isolated an enzymatically active form of AtxA (rAtxA) and its enzymatically inactive mutant AtxA(D49S). We purified and characterized both enzymes and discovered that, unlike AtxA(D49S), rAtxA significantly decreases the amplitude of isometric muscle contractions and increases the resting tension of mouse neuromuscular preparations. While rAtxA exhibits significant effects on the measured electrophysiological parameters (i.e., decrease in the amplitude of end-plate potential (EPP), elongation of EPP half-decay time, decrease in the frequency of miniature EPP and decrease in the resting membrane potential), AtxA(D49S) exhibits none of the mentioned effects. The results confirm the presynaptic toxicity of rAtxA and imply postsynaptic (myotoxic) activity, which is not observed for AtxA(D49S). Thus, we can conclude that enzymatic activity is crucial for the toxicity of AtxA. Since AtxA(D49S) is a nontoxic antagonist of AtxA, it has great potential for therapeutic use. By administering AtxA(D49S) to a patient envenomated by the venom of a long-nosed viper, we could supplant AtxA from its target location in the neuromuscular junction and thus limit or completely prevent the neurotoxic effects of envenomation.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK	ii
ABSTRACT	iii
KAZALO VSEBINE	iv
KAZALO SLIK	vi
KAZALO TABEL	viii
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	ix
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED LITERATURE	4
2.1 FOSFOLIPAZE A ₂	4
2.1.1 Sekretorne fosfolipaze A₂	5
2.1.1.1 Amoditoksin A	7
2.1.1.2 Amoditoksin A (D49S)	9
2.2 ŽIVČNO-MIŠIČNI STIK	11
2.2 TOKSIČNO DELOVANJE AMODITOKSINOV	15
2.2.1 Nevrotoksični učinki in delovanje AtxA	15
2.2.2 Citotoksični učinki AtxA	19
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 MATERIALI	20
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema	20
3.1.2 Laboratorijska oprema	22
3.1.3 Uporabljeni pufri in raztopine	25
3.2 METODE	26
3.2.1 Metode izolacije, renaturacije in čiščenja proteinov	26
3.2.1.1 Metode molekulskega kloniranja	26
3.2.1.2 Renaturacija rekombinantnih proteinov	27
3.2.1.3 Ultrafiltracija renaturacijske mešanice	27
3.2.1.4 Visokotlačna tekočinska kromatografija na obrnjenih fazah	28
3.2.1.5 NaDS PAGE	30
3.2.1.6 Barvanje proteinov s koloidnim srebrom	31
3.2.1.7 Analiza vzorcev z masno spektrofotomerijo	31

3.2.1.8	Preverjanje encimske aktivnosti	32
3.2.2	Merjenje mišične kontrakcije	33
3.2.2.1	Priprava živčno-mišičnih preparatov	33
3.2.2.2	Merjenje vpliva na izometrično mišično kontrakcijo izoliranih hemidiafragem miši	34
3.2.3	Merjenje vpliva na membranske potenciale mišičnih vlaken izoliranih hemidiafragem miši.....	37
3.2.4	Analiza podatkov in statistika	39
4	REZULTATI	40
4.1	RENATURACIJA IN ČIŠČENJE REKOMBINANTNIH PROTEINOV	40
4.1.1	RP-HPLC	40
4.1.2	NaDS PAGE.....	41
4.1.3	Masna spektrometrija.....	43
4.1.4	Merjenje encimske aktivnosti	44
4.2	MERJENJE IZOMETRIČNE MIŠIČNE KONTRAKCIJE	45
4.2.1	Vpliv na moč posredno izzvane mišične kontrakcije	47
4.2.2	Vpliv na moč neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije	48
4.2.3	Vpliv na moč posredno izzvane tetanične kontrakcije	49
4.2.4	Vpliv na moč neposredno izzvane tetanične kontrakcije.....	50
4.3	MERJENJE MEMBRANSKIH POTENCIALOV	51
4.3.1	Vpliv na mirovni membranski potencial mišičnega vlakna	51
4.3.1	Vpliv na amplitudo in razpolovni čas padajoče faze PMP	52
4.3.2	Vpliv na frekvenco, amplitudo in razpolovni čas padajoče faze MPMP	54
5	RAZPRAVA	57
6	SKLEPI	63
7	POVZETEK.....	64
8	SUMMARY.....	66
9	ZAHVALA.....	69
10	LITERATURA	71

KAZALO SLIK

Slika 1: Delitev fosfolipaz glede na mesto delovanja na molekuli <i>sn</i> -3-fosfoglicerida	5
Slika 2: Tridimenzionalna struktura AtxA.	8
Slika 3: Razporeditev encimsko neaktivnega mutanta AtxA(D49S) s konjugiranimi nanodelci v celicah PC12 in njihovih mitohondrijih.....	10
Slika 4: Zgradba in osnovni elementi živčno-mišičnega stika.	12
Slika 5: Analiza RP-HPLC C3 analiza rAtxA in AtxA(D49S) po renaturaciji.....	40
Slika 6: Analiza RP-HPLC C18 renaturacijskih mešanic rAtxA in AtxA(D49S).	41
Slika 7: Analizi NaDS-PAGE vzorcev rAtxA in AtxA(D49S) po čiščenju na RP-HPLC kolone C3.	42
Slika 8: Analizi NaDS-PAGE vzorcev rAtxA in AtxA(D49S) po čiščenju na RP-HPLC kolone C18	42
Slika 9: Masni spekter vzorca rAtxA po čiščenju na RP-HPLC kolone C18.	43
Slika 10: Masni spekter vzorca AtxA(D49S) po čiščenju na RP-HPLC kolone C18.	44
Slika 11: Meritev fosfolipazne aktivnosti vzorcev.	45
Slika 12: Učinek rAtxA in AtxA(D49S) na izometrično mišično kontrakcijo mišje hemidiafragme v odvisnosti od časa.....	46
Slika 13: Učinek AtxA(D49S) in rAtxA na amplitudo posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši.....	47
Slika 14: Učinek AtxA(D49S) in rAtxA na amplitudo neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši.....	48
Slika 15: Učinek AtxA(D49S) in rAtxA na amplitudo posredno izzvane tetanične mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši.....	49

Slika 16: Učinek AtxA(D49S) in rAtxA na amplitudo neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši.....	50
Slika 17: Vpliv AtxA(D49S) in rAtxA na rV_m skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši	51
Slika 18: Vpliv AtxA(D49S) in rAtxA na amplitudo PMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši	52
Slika 19: Vpliv AtxA(D49S) in rAtxA na razpolovni čas padajoče faze PMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši	53
Slika 20: Vpliv AtxA(D49S) in rAtxA na frekvenco MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši	54
Slika 21: Vpliv AtxA(D49S) in rAtxA na amplitudo MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši	55
Slika 22: Vpliv AtxA(D49S) in rAtxA na razpolovni čas padajoče faze MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.....	56

KAZALO TABEL

Tabela 1: Kemikalije in drobna oprema	20
Tabela 2: Laboratorijska oprema	22
Tabela 3: Uporabljeni pufri in raztopine	25
Tabela 4: Potek spiranja HPLC kolone C4.....	28
Tabela 5: Potek spiranja HPLC kolone C3.....	29
Tabela 6: Potek spiranja HPLC kolone C18.....	30

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AA	arahidonska kislina
ACh	acetilholin
AChE	acetilholinesteraza
ACN	acetonitril
AP	akcijski potencial
APS	amonijev persulfat
Asn (N)	asparagin
Asp (D)	asparaginska kislina
BSA	goveji serumski albumin
CAA	kloroacetamid
CaM	kalmodulin
dH ₂ O	destilirana voda
dTC	d-tubokurarin
DTT	ditiotreitol
ESI-MS	masna spektrometrija po ionizaciji z električnim razprševanjem
EtOH	etanol
F	fluorescenca
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il] etansulfonska kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IBS	stična vezavna površina
K _d	konstanta disociacije
K _i	konstanta inhibicije

K-R	Krebs-Ringerjeva raztopina
LD ₅₀	odmerek snovi, ki povzroči pogin 50 odstotkov izpostavljenih živali
LPA	lizofosfatidna kislina
MPMP	miniaturni potencial motorične ploščice
MS	masna spektrometrija
MT	mišična tenzija v mirovanju
nAChR	nikotinski acetilholinski receptor
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS
PMP	potencial motorične ploščice
PyrPG	1-heksadekanoil-2-(1-pirendecanoil)-sn-glicero-3-fosfoglicerol
rAtxA	rekombinantni amoditoksin A
RP-HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija na obrnjenih fazah
rVm	mirovni membranski potencial
Q-TOF MS	masni analizator na čas preleta ionov s kvadrupolnim predanalizatorjem
Ser (S)	serin
sPLA ₂	sekretorna fosfolipaza A ₂
TEMED	tetrametiletildiamin
TFA	trifluoroocetna kislina
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
Vaa	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Med strupenimi kačami v Sloveniji je modras (*Vipera ammodytes ammodytes*) najpogostejša in najnevarnejša vrsta. Njegov strup vsebuje več kot 50 različnih beljakovin (proteinov). Med temi številne delujejo toksično na človeka in druge sesalce. Med najbolj raziskanimi toksini v strupu modrasa je amoditoksin A (AtxA), sekretorna fosfolipaza A₂ (sPLA₂) z nevrotoksičnim delovanjem. Čeprav je ta protein toksičen za ljudi, njegova visoka podobnost s človeško sPLA₂ ponuja potencialne za terapevtsko uporabo.

Tehnologija rekombinantne DNA daje možnost proizvodnje načrtno spremenjenih (mutiranih) proteinov, vključujoč mutante AtxA. Z mutacijami lahko poudarimo želene lastnosti izvirnega proteina, hkrati pa zavremo ali odpravimo neželene. Za boljšo usmeritev pri pridobivanju uporabnih rekombinantnih sPLA₂ je potrebno poglobljeno poznavanje njihovega delovanja, kar vključuje tudi stopnjo vpliva encimske aktivnosti proteina na njegov fiziološki učinek.

AtxA(D49S) je rekombinantno pridobljeni mutant AtxA. Zamenjava aminokislinskega ostanka serin (Ser ali S) v aktivnem mestu AtxA z ostankom asparaginske kisline (Asp ali D) izniči njegovo encimsko (fosfolipazno) aktivnost. Opredelitev vpliva AtxA(D49S) na živčno-mišični prenos je zato zelo pomemben prispevek k razumevanju pomena encimske aktivnosti v nevrotoksičnem delovanju AtxA in njemu podobnih sPLA₂ in za nadaljnjo selekcijo lastnosti rekombinantno pridobljenih sPLA₂. Poleg tega ponuja nove možnosti terapevtske uporabe AtxA(D49S) za zmanjševanje toksičnih učinkov amoditoksinov in drugih toksičnih PLA₂.

1.2 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE

Cilji raziskovalne naloge so bili biokemična in patofiziološka karakterizacija mutanta AtxA(D49S) s stališča vpliva na živčno-mišični preparat miši in primerjava njegovega delovanja z delovanjem naravnega AtxA. Mutant AtxA(D49S) in rekombinantni izvorni toksin AtxA (rAtxA) smo izrazili v bakteriji *Escherichia coli* (*E. coli*), ju zvali v nativno obliko in očistili. Sledilo je merjenje učinkov obeh rekombinantnih proteinov na amplitudo izometrične kontrakcije skeletne mišice hemidiafragme miši. Iz membranskih potencialov mišičnih vlaken smo poskušali čim natančneje opredeliti fiziološke, farmakološke in morebitne toksične učinke AtxA(D49S) in rAtxA in sklepati o mehanizmih njunega vpliva na živčno-mišični prenos. Pridobljeni rezultati nam dajejo dodaten vpogled v pomen vpliva encimske aktivnosti na nevrotoksično delovanje sPLA₂ in podpirajo razvoj teh dveh proteinov za potencialno terapevtsko uporabo.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

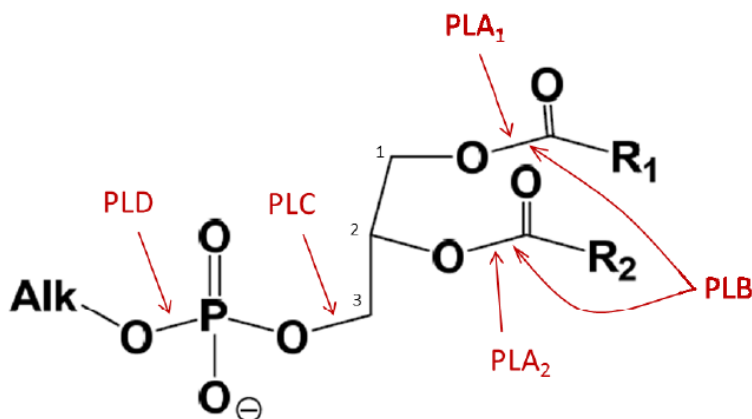
1. Mutant AtxA(D49S) nima encimske aktivnosti, zato je manj nevrotoksičen kot rAtxA.
2. Mutant AtxA(D49S) ne bo zmanjšal amplitude ali zavrl mišične kontrakcije pri prek živca izzvani in neposredni električni stimulaciji živčno-mišičnega preparata miši.
3. Mutant AtxA(D49S) ne bo vplival na amplitudo in pojavnost miniaturnih potencialov motorične ploščice (MPMP) in potenciala motorične ploščice (PMP) pri električni stimulaciji živca v živčno-mišičnem preparatu miši.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 FOSFOLIPAZE A₂

Fosfolipaze A₂ (PLA₂) so obširna skupina encimov – lipaz, ki jih najdemo pri živalih, rastlinah, mikroorganizmih in virusih. Pri sesalcih poznamo več kot 30 različnih vrst PLA₂, ki jih na osnovi strukture, mesta nahajanja in mehanizma encimskega delovanja delimo v več družin. Njihova sposobnost je, da katalizirajo hidrolizo estrske vezi v glicerofosfolipidih na mestu *sn*-2, produkt česar so proste maščobne kisline in lizofosfolipidi (Murakami in sod., 2011). PLA₂ imajo v organizmih številne biološke vloge, od presnove lipidov, obrambe organizma, sodelovanja pri prenosu celičnih signalov, homeostaze celičnih membran, sinteze biološko aktivnih derivatov fosfolipidov, npr. sproščanja arahidonske kisline (AA) kot prekursorja eikozanoidov. Zadnji med drugim sodelujejo tudi pri različnih vnetnih procesih in prenosu celičnih signalov (Kudo in Murakami, 2002). Lizofosfolipidi kot prekursorji lizofosfatidne kisline (LPA) in aktivacijskega faktorja za trombocite (ang. Platelet Activating Factor, PAF) posredno sodelujejo pri preživetju, proliferaciji in migraciji celic in vnetnih procesih (pregledno v Schaloske in Dennis, 2006).

Najobsežnejša družina PLA₂ so sekretorne PLA₂ (sPLA₂), zunajcelični encimi, encimsko delovanje katerih je odvisno od kofaktorja iona Ca²⁺. Prav tako je od Ca²⁺ odvisno delovanje citosolnih PLA₂ z domeno C2 na N-terminalnem koncu, na katero se veže na omenjeni divalentni kation. Neodvisno od Ca²⁺ delujejo znotrajcelične PLA₂ (iPLA₂). Poznamo še dva lizosomska tipa PLA₂, adipocitno PLA₂ in PAF-acetilhidrolaze, ki lahko hidrolizirajo PAF in oksidirane fosfolipide (Dennis in sod., 2011).



Slika 1: **Delitev fosfolipaz glede na mesto delovanja na molekuli *sn*-3-fosfoglicerida (Ivanušec, 2017).** Molekulo diacilglicerol fosfolipida ponazarja glicerol, ki ima na mestih *sn*-1 in *sn*-2 zaestreni maščobni kislini (R_1 in R_2), na mestu *sn*-3 pa fosfat z vezano polarno glavo (serin, etanolamin, holin, glicerol in inozitol). S puščicami so označene vezi, ki jih cepijo različni tipi fosfolipaz.

2.1.1 Sekretorne fosfolipaze A_2

Sekretorne PLA_2 so relativno majhni, zunajcelični encimi z molekulsko maso 14–18 kDa. Strukturo jim učvrščuje 6–8 disulfidnih mostičkov. Encimsko aktivno mesto tvori aminokislinska diada His48-Asp49 (Dennis in sod., 2011). Estrske vezi katalizirajo hidrolizo prek mehanizma odvzema protona iz molekule vode. Zadnjo aktivira katalitična diada s pomočjo iona Ca^{2+} (Burke in Dennis, 2009). Za encimsko katalizo so torej nujno potrebni ioni Ca^{2+} v mikro- do milimolarni koncentraciji; njihovo delovanje je optimalno v območju pH 7–9 (Wilton in Waite, 2002).

Ločimo 10 skupin $sPLA_2$, nekatere od teh vsebujejo več podskupin (navedene v oklepaju): I (A, B), II (A, B, C, D, E, F), III, V, IX, X, XI (A, B), XII (A, B), XII in XIV (Dennis in sod., 2011). AtxA umeščamo v skupino II. Vse $sPLA_2$ iz modrasovega strupa spadajo v podskupino IIA, za katero je značilno podaljšanje C-končnega dela molekule in 7 disulfidnih mostičkov (Wilton in Waite, 2002).

Biološke vloge sPLA₂ se razlikujejo glede na mesto, na katerem so, encimsko aktivnost in vezavo na tarčne molekule (pregledno v Schaloske in Dennis, 2006). Najverjetneje je bila prvotna biološka vloga sPLA₂ homeostaza celičnih membran, nato pa so z izločanjem iz celic pridobile prebavno vlogo (pankreasni encim). Pri nekaterih vrstah kač so se v nadaljevanju iz prebavnih žlez razvile strupne, ki lahko tvorijo in izločajo do 15 različnih vrst toksičnih sPLA₂ (Davidson in Dennis, 1990). Encimska aktivnost ni nujno glavni dejavnik, ki določa toksičnost omenjenih sPLA₂. V kačjih strupih so namreč tudi encimsko neaktivni, toda kljub temu toksični homologi sPLA₂. Mehanizmi toksičnega delovanja sPLA₂ se lahko precej razlikujejo – nekatere med njimi so presinaptično nevrotoksične, druge posinaptično nevrotoksične, nekatere so miotoksične, kardiotoksične ali hemoragične, nekatere sPLA₂ povzročajo hipertenzijo, krče ali hemolizo oziroma vplivajo na strjevanje krvi (Kini, 1997). Kače pred poškodbami z lastnimi sPLA₂ ščitijo proteinski zaviralci oziroma inhibitorji sPLA₂. Te uvrščamo v tri skupine: triprsti zaviralci sPLA₂ (ang. "three-finger"), zaviralci, ki vsebujejo z levcinom (Leu, L) bogate ponovitve, in multilektini tipa C (pregledno v Lambeau in Lazdunski, 1999).

sPLA₂ se na membrano vežejo prek stične vezavne površine (ang. "Interfacial Binding Surface"; IBS), ki jo sestavlja skupina aminokislinskih ostankov na površini encima. Ti okoli hidrofobnega kanala, ki vodi do aktivnega mesta, tvorijo obroč in tako ločijo vezavno površino od aktivnega mesta. Proces vezave sPLA₂ na membrano ni odvisen od interakcije posameznih fosfolipidov z aktivnim mestom, vezavo usmerjajo zlasti omenjeni hidrofobni in aromatski ostanki aminokislin. Njihove lastnosti, struktura in razporeditev vplivajo tudi na afiniteto sPLA₂ do fosfolipidne membrane (Winget in sod., 2006).

Izločanje sPLA₂ v zunajcelični prostor usmerja signalni peptid na N-koncu molekule, ki se pri prenosu encimov v lumen endoplazemskega retikuluma (ER) odcepi, pri čemer nastane aktivna oblika sPLA₂ (Lambeau in Gelb, 2008). Encimska aktivnost sPLA₂ je nizka na monomernih

substratih in večja na agregiranih, kot so vezikli, miceli in lipidni dvosloji. Pri zadnjih pride po vezavi na substrat do medfazne aktivacije (ang. "interfacial activation"). Vzrok za njen pojav so majhne konformacijske spremembe, ki se pojavijo kot posledica vezave sPLA₂ na membrano. Lastnosti membrane, kot so fluidnost, ukrivljenost, gostota in naboj, zato posredno vplivajo na encimsko aktivnost sPLA₂ (Tatulian, 2001; Kini, 2003).

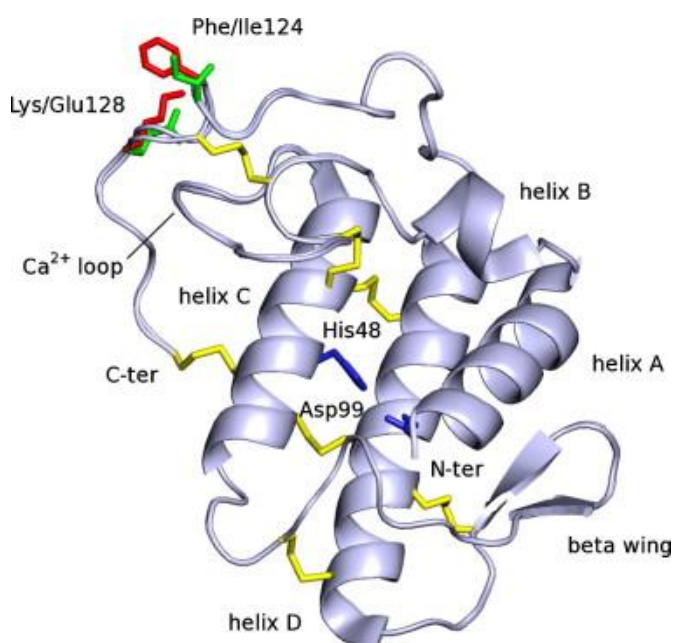
2.1.1.1 Amoditoksin A

Amoditoksini (Atx) so nevrotoksične sPLA₂, ki strukturno spadajo v podskupino IIA sPLA₂. Kot je značilno tudi za druge sPLA₂, se pri Atx pojavlja več izooblik z različnimi farmakološkimi aktivnostmi. sPLA₂ so namreč multigenska družina proteinov. Do hitre evolucijske diverzifikacije sPLA₂ je najverjetneje prišlo zaradi potrebe po hitrem prilagajanju kač različnim sovražnikom (obramba) in vrstam plena (prehrana), med katerimi so žuželke, ribe, dvoživke, plazilci in sesalci. Podobna zaporedja intronov potrjujejo skupni evolucijski izvor sPLA₂ v skupini II ter eksoni, območja, ki kodirajo beljakovine in nakazujejo funkcionalno raznolikost aktivnosti sPLA₂ v omenjeni skupini. Njihov evolucijski razvoj je najverjetneje potekal prek mehanizma ponavljajočega se podvajanja genov od predniške enotne prebavne sPLA₂ do številnih novejših nevrotoksičnih in miotoksičnih oblik encima (Križaj, 2011).

V strupu modrasa se pojavljajo tri izooblike Atx: AtxA, AtxB in AtxC. Vsako sestavlja 122 aminokislinskih ostankov, njihova masa je približno 13,8 kDa. Čeprav se njihove primarne strukture razlikujejo le v dveh ali treh aminokislinah, so med njimi precejšnje razlike v toksičnosti. AtxB je trojni mutant (Y115H/R118M/N119Y), AtxC pa dvojni (F124I/K128E) AtxA (Saul in sod., 2010). LD₅₀ (srednja smrtna doza oz. doza, ki povzroči pogin polovice poskusnih živali) najbolj toksične izooblike AtxA je za miši po intraperitonealni aplikaciji (*i. p.*) 21 µg/kg miši. AtxB je 17-krat manj toksičen od AtxA, AtxC pa 28-krat (Prijetelj in sod.,

2006; Pungerčar in sod., 2011). Razlike v toksičnosti izooblik Atx so verjetno v glavnem posledica razlik v površinskem ujetanju toksina in njegovega celičnega receptorja (natančneje opisano v poglavju 2.2.1) (Saul in sod., 2010).

V strupu modrasa lahko poleg izooblik Atx najdemo tudi netoksični sPLA₂, amoditina I₁ in I₂ (AtnI₁/I₂) in miotoksičen, encimsko neaktiven homolog sPLA₂, amoditin L (AtnL). AtnI₁ in AtnI₂ se v aminokislinskem zaporedju z AtxA ujemata 68-odstotno, AtnL pa ima z AtxA 74-odstotno stopnjo ujemanja aminokislinskega zaporedja (Brgles in sod., 2014).



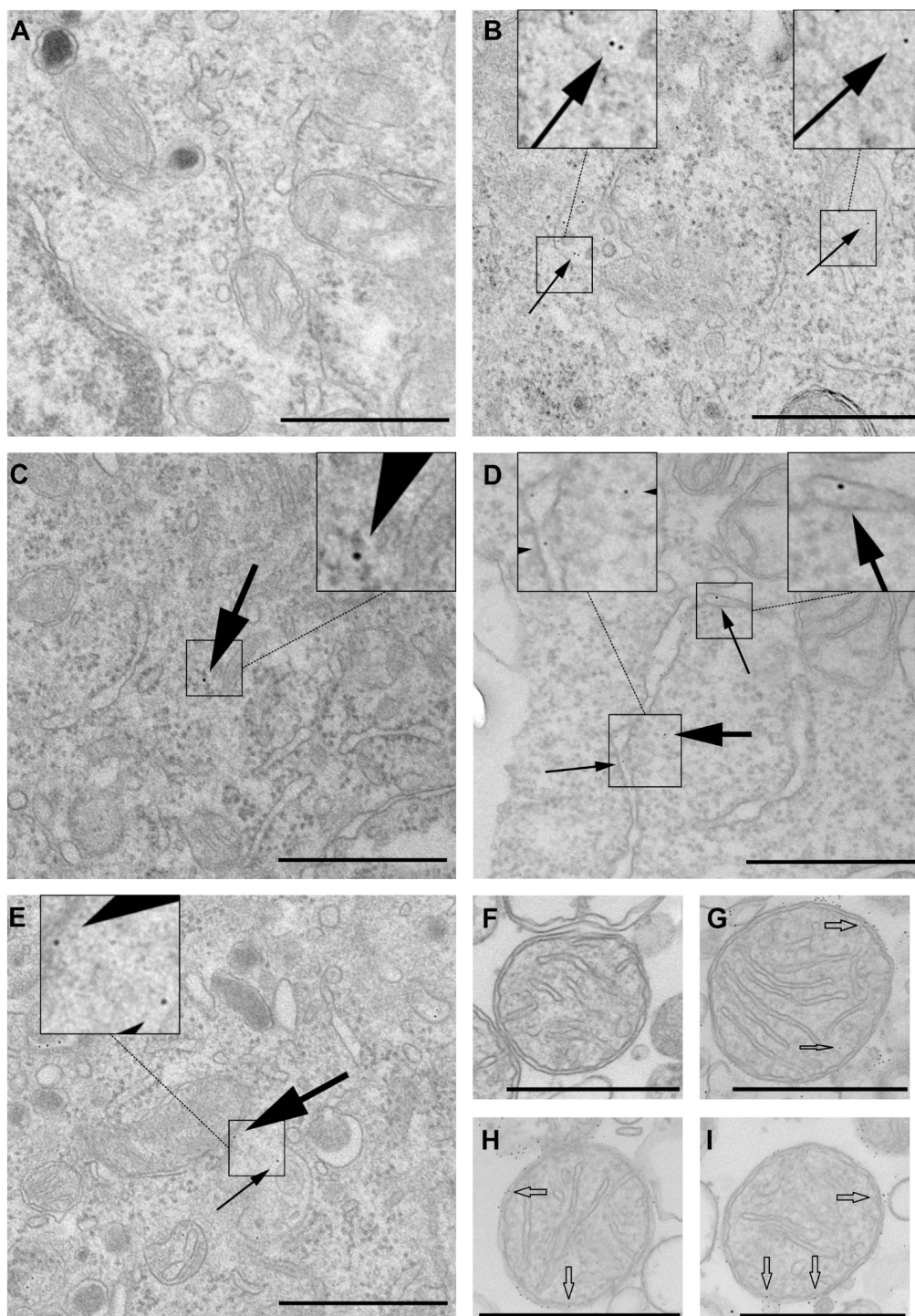
Slika 2: **Tridimenzionalna struktura AtxA** (Saul in sod. 2010). Z rumeno je označenih sedem disulfidnih mostičkov, z modro pa diada aktivnega mesta His-Asp. Označene so tudi vijačnice α (1-4), krilo β , N- in C-konec.

Med glavnimi kliničnimi znaki zastrupitve organizma z modrasovim strupom so upočasnjeno strjevanje krvi, pojav oteklina v bližini mesta ugriza, limfadenopatije, izliv krvi v podkožje in številni živčni znaki, kot so disfonija (motnja govora), ptoza (povešenost zgornje veke), oftalmoplegija (paraliza očesnih mišic), disfagija (oteženo požiranje) in živčno-mišična oslabelost (Radonić in sod., 1997; Lukšić in sod., 2006).

AtxA je tudi v strupu laškega gada (*Vipera aspis aspis*) in podvrste modrasa *Vipera ammodytes meridionalis* (Križaj, 2011).

2.1.1.2 Amoditoksin A (D49S)

Amoditoksin A (D49S) (AtxA(D49S)) je z rekombinantno tehnologijo pridobljeni mutant AtxA. Nukleotidni zapis za AtxA je spremenjen tako, da se aminokislinski ostanek Asp v aktivnem mestu, na mestu 49 (D49), nadomesti s Ser (S). Posledica te zamenjave je izguba encimske aktivnosti proteina. Molekulska masa AtxA(D49S) znaša 13.747 Da. Za ultrastrukturne raziskave s transmisijsko elektronsko mikroskopijo se uporablja tudi različica AtxA(D49S/N79C), pri kateri je v spremenjeni molekuli AtxA poleg zamenjave D49S narejena še zamenjava Asn79Cys (N79C), ki omogoča označevanje mutirane molekule na tem mestu na različne načine, npr. z nanodelcem zlata ali fluorescenčnim označevalcem (Ivanušec, 2017).



Slika 3: **Razporeditev encimsko neaktivnega mutanta AtxA(D49S) s konjugiranimi nanodelci v celicah PC12 in njihovih mitohondrijih** (Ivanušec in sod., 2022). Fotografije so bile ustvarjene z uporabo transmisibilne elektronske mikroskopije (TEM). (A-E) Reprezentativne TEM-fotografije celic PC12, dve uri inkubiranih brez (A) in z AtxA(D49S) (B-E). Elektronsko gostejši delci so bili koncentrirani v različnih mešičkastih strukturah ((B,E) majhne puščice), citosolu ((C, D) velike puščice) in endoplazemskem retikulumu ((D) majhne puščice) ali so bili v neposredni bližini mitohondrijev ((E) velike puščice). Na sliki F je reprezentativna TEM-fotografija mitohondrijev iz celic PC12 brez aplikacije AtxA(D49S), na slikah G-I pa po enourni izpostavljenosti mutantu. AtxA(D49S) je bil lokaliziran predvsem na zunanji mitohondrijski membrani.

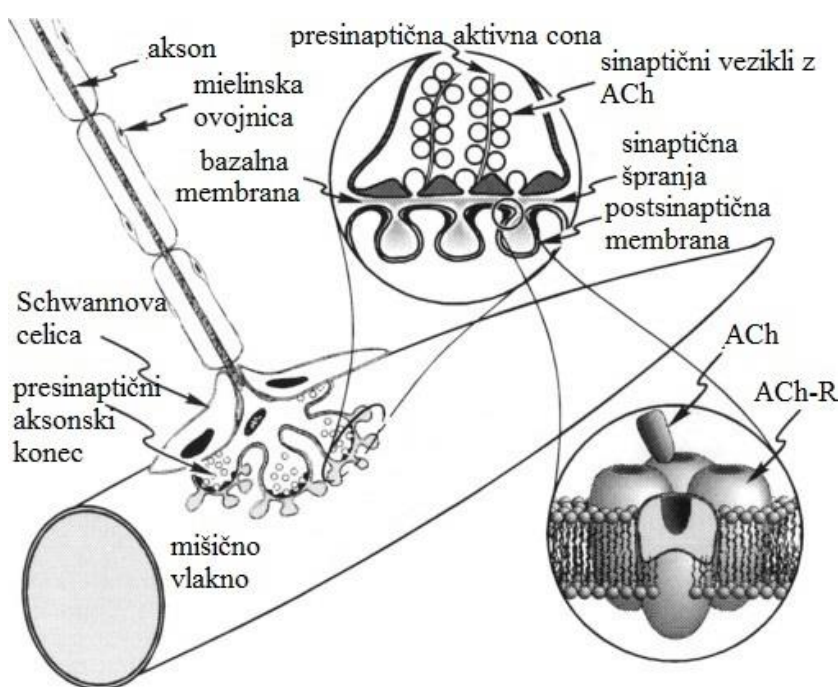
2.2 ŽIVČNO-MIŠIČNI STIK

Živčno-mišični stik oz. sinapso med živčnim končičem α -motoričnega nevrona in skeletnim mišičnim vlaknom imenujemo motorična ploščica (Ali in Savarese, 1976). α -motorični nevroni so nevroni, ki omogočajo prenos signalov za krčenje do mišičnih vlaken (Webb, 2017). Motorično ploščico delimo na presinaptični del, sinaptično špranjo in posinaptični del. Sinaptična špranja je široka približno 20 nm. V njej najdemo številne makromolekule, pomembne za pravilen potek živčno-mišične komunikacije, med drugim acetilholinesterazo (AChE), kolagen ter α - in β -laminin. Nevrotransmitter, odgovoren za prenos signala skozi motorično ploščico, je acetilholin (ACh) (Mentis, 2013).

Vzdraženje iz ventralnega dela hrbtenjače do tarčnih skeletnih mišičnih celic prevaja dolg mieliniziran akson motoričnega nevrona, ki se v bližini ciljnih mišičnih vlaken razveji na 20–100 nemieliniziranih živčnih končičev. Vsak živčni končič oživčuje eno mišično vlakno (Bittner in Martyn, 2019). Končne, nemielinizirane dele aksonov ovijajo Schwannove celice, ki kot nadomestek mielinske ovojnice prispevajo k hitrejšemu prenosu živčnih dražljajev ter varujejo živčni končič pred kemičnimi in mehanskimi poškodbami (Hall in Sanes, 1993; Ghai in sod., 2006).

Za sintezo ACh v živčnem končiču iz holina in acetil-koencima A je odgovoren encim holin acetiltransferaza. ACh se po sintezi s pomočjo transmembranskega prenašalca za ACh prenese v sinaptične mešičke. Ti nastajajo v telesu (somi) motoričnega nevrona, od tam pa s hitrim aksonalnim transportom potujejo v živčni končič, kjer prevzamejo ACh. Posamezni mešiček navadno vsebuje od 6.000 do 10.000 molekul ACh, kar je ekvivalent F enega kvanta nevrotransmitterja (Juel, 2019). Sproščanje vsebine mešičkov, ki so si po velikosti precej podobni, v sinaptično špranjo je urejeno na dva načina: s takoj dostopno zalogo in rezervno zalogo mešičkov. Zaloga mešičkov, ki je na voljo takoj, je po številu manjša in mešičke omejuje

na območje, kjer so vezani na aktivne cone na notranji strani presinaptične membrane. Tam je omogočeno povratno odpiranje in zapiranje fuzijskih por (prehodna fuzija) ter sproščanje ACh, ne da bi se pri tem spremenila oblika ali funkcija mešička (Guček, 2015; Bittner in Martyn, 2019). Taki mešički lahko tudi zadržijo del vsebine (Guček, 2015). Večinski delež mešičkov pa je s citoskeletom iz aktina, sinapsina, sinaptotagmina in spektrina povezan v rezervno zalogo (Bittner in Martyn, 2019). Pri sproščanju ACh iz teh mešičkov pride do popolne fuzije membrane mešičkov s plazmalemo in sprostitev ACh v sinaptično špranjo (Guček, 2015).



Slika 4: Zgradba in osnovni elementi živčno-mišičnega stika (Suszkiw, 1995).

Sprožitev saltatornega (skokovitega; od enega do drugega Ranvierjevega zažemka) prevajanja akcijskega potenciala, ki vključuje tok ionov Na^+ iz zunajceličnega prostora v notranjost aksona, povzroči depolarizacijo živčnega končiča. Ta izzove odpiranje napetostno odvisnih Ca^{2+} -kanalov in posledično povečanje koncentracije ionov Ca^{2+} v živčnem končiču (Bittner in Martyn, 2019). Živčna celica se nato repolarizira s pomočjo toka ionov K^+ skozi napetostno odvisne K^+ -kanale (Hawgood in Bon, 1991). Ločimo več različnih tipov napetostno odvisnih

Ca^{2+} -kanalov (T, L, N, P in Q). Ca^{2+} -kanali tipa P in Q so odgovorni za kvantno sproščanje ACh v sinaptično špranjo, L in N tip Ca^{2+} -kanalov pa prek sklopitve s presinaptičnimi α_1 - in β_1 -adrenoreceptorji dodatno olajšujejo sproščanje ACh (Wessler, 1996). T tip Ca^{2+} -kanalov so napetostno odvisni kanali, ki sodelujejo pri sprožanju AP (Rossier, 2016). Povišana koncentracija Ca^{2+} v živčnem končiču posredno povzroči zlitje presinaptičnih mešičkov s celično membrano in eksocitozo ACh. Do zlitja pride na območjih plazmaleme, imenovanih aktivna mesta (Matthews, 2003), kjer je tudi največje število Ca^{2+} -kanalov. Ob vsaki depolarizaciji se lahko sprostijo med 200 in 400 kvantov ACh, njihovi učinki se med seboj seštevajo (Van der Kloot in Molgo, 1994; Wood in Slater, 2001).

V sinaptično špranjo sproščeni ACh difundira prek sinaptične špranje do posinaptične membrane in se veže na α -podenoto mišičnih nikotinskih acetilholinskih receptorjev (nAChR). Vezava ACh na α -podenoto povzroči konformacijske spremembe nAChR, kanal se odpre, omogoči pretok ionov Na^+ v mišično vlakno in ionov K^+ v obratni smeri, kar izzove depolarizacijo posinaptične membrane. Če nastane potencial motorične plosčice (PMP) z amplitudo 35 mV ali več, je prag za nastanek akcijskega potenciala (AP) presežen in odprejo se napetostno odvisni Na^+ -kanali v posinaptični membrani. AP se nato razširi po plazmalemi in T-cevčicah v notranjost vlakna, kar sproži sproščanje Ca^{2+} in skrčenje mišičnega vlakna (Matthews, 2003; Bittner in Martyn, 2019). Dejavnik, ki vpliva na amplitudo PMP, je količina nevrottransmitterja ACh, sproščenega v sinaptično špranjo, ki je odvisna od števila s presinaptično membrano živčnega končiča zlitih mešičkov ter posledične množine sproščenega ACh in vezave tega na nAChR. Če je živčno vlakno izpostavljeno snovem, ki zmanjšujejo sproščanje ACh, bo amplituda PMP nižja, prag za sprožanje AP ne bo presežen in pogoji za skrčenje mišice ne bodo izpolnjeni. Zmanjšano amplitudo kontrakcije ali ohlapno paralizo mišice lahko povzročijo kompetitivni/nekompetitivni antagonisti nAChR (Katz in Thesleff,

1957). Nasprotni učinek imajo v primeru enostavne kontrakcije zaviralci AChE, encima, odgovornega za razgradnjo ACh v sinaptični špranji. V primeru tetaničnih kontrakcij pa lahko v prisotnosti zaviralcev AChE zaradi zasičenja receptorjev pride tudi do delne ali popolne zavore kontrakcije (Chang in sod., 1985). Če je razgradnja ACh v sinaptični špranji upočasnjena ali zavrta, se njegova količina znotraj špranje poveča, več se ga veže na nAChR in poveča se amplituda PMP. V tem primeru začne amplituda PMP zaradi desenzibilizacije nAChR sčasoma upadati (Katz in Thesleff, 1957).

AChE v sinaptično špranjo, na bazalno lamino, na katero se AChE pritrdjuje s pomočjo kolagena, izločajo mišične celice. Molekule ACh, ki se niso takoj vezale na nAChR (~50 % sproščenega ACh) ali so se že sprostile z receptorjev, AChE v manj kot 1 ms razgradi/hidrolizira na acetat in holin. Zaradi hitrega delovanja AChE je za uspešen živčno-mišični prenos torej ključen zadosten presežek nevrottransmitterja v sinaptični špranji. ACh se reciklira s pomočjo posebnega transporterja, ki holin prenese nazaj v živčni končič (Bittner in Martyn, 2019).

Spontane depolarizacije posinaptične membrane v obsegu amplitude 0,5–1,5 mV, kar je le ~1 % amplitude PMP, so fiziološka posebnost. Te spremembe v potencialu posinaptične membrane imenujemo miniaturni potenciali motorične ploščice (MPMP). Vzrok za njihov pojav je spontano zlivanje sinaptičnih mešičkov s presinaptično membrano. Z vsakim spontano zlitim mešičkom se v sinaptično špranjo sprostí 1 kvant ACh. Pri sesalskih motoričnih ploščicah se v fizioloških pogojih MPMP pojavljajo približno od 1- do 2-krat na sekundo (Matthews, 2003; Bittner in Martyn, 2019).

2.2 TOKSIČNO DELOVANJE AMODITOKSINOV

Po *i. p.* vnosu AtxA v miš (sesalca) je njegovo najizrazitejše delovanje nevrotoksično. Poleg nevrotoksičnega je najbolj raziskano njegovo antikoagulantno delovanje, s pomočjo laboratorijskih poskusov na celičnih linijah in transmisijske elektronske mikroskopije pa je bilo pokazano tudi citotoksično delovanje toksina (Križaj, 2011).

2.2.1 Nevrotoksični učinki in delovanje AtxA

Najpogostejše zabeleženi znaki po ugrizu modrasa pri ljudeh so oteklina in podplutba na mestu ugriza, spuščene veke in paraliza očesnih mišic, težave pri požiranju, hripav glas in živčno-mišična oslabeledost (Grenc, 2009; Križaj, 2011). Razen otekline in podplutbe so vsi drugi znaki nevrološki (Križaj, 2011). Največkrat pride do ugriza v periferne dele telesa. V takih primerih običajno niso opazni učinki na osrednji živčni sistem, saj lahko AtxA le izjemoma preide krvno-možgansko pregrado. Neposreden vnos AtxA v določena območja možganov pa ima izrazito toksičen učinek, ki se kaže v obliki napadov s krči (Connolly in sod., 1995; Križaj, 2011).

Pri poskusnih živalih (miš, podgana, budra) se po parenteralni aplikaciji AtxA najpogostejše pojavi ohlapna (flacidna) paraliza skeletnih mišic, ki je posledica blokade živčno-mišične komunikacije (pregledno v Šrihar in sod., 2014). Vzrok pogina živali je v večini primerov zadušitev zaradi paralize dihalnih mišic (Connolly in sod., 1995; Prasarnpun in sod., 2005).

AtxA uvrščamo med β -nevrotoksine, glavna tarča katerih so sinapse motoričnih nevronov. Toksični učinek izzovejo tako, da preprečijo ali zmanjšajo sproščanje ACh v sinaptično špranjo, s čimer zavrejo prenos živčnega dražljaja z živčne na mišično celico. Posledica je ohlapna paraliza mišičnega vlakna.

Za vse β -nevrotoksine je značilno temperaturno odvisno trifazno delovanje, ki je lepo vidno pri poskusu na izoliranem živčno-mišičnem preparatu mišje hemidiafragme, izvedenem pri 37 °C. V prvi fazi, ki nastopi po krajšem časovnem obdobju od izpostavitve preparata AtxA, se zmanjša sproščanje ACh v sinaptično špranjo, kar opazimo kot blag upad amplitude krčenja mišice. V drugi fazi, ki doseže vrh v 10–20 min po izpostavitvi AtxA, se sproščanje ACh poveča, kar se kaže v blagem povečanju amplitude krčenja mišice. V tretji fazi se ponovno pojavi inhibicija sproščanja ACh, ki po 60–120 min privede do popolne in nepovratne paralize mišičnega vlakna. Frekvenca MPMP v paraliziranem preparatu in kontrolnem preparatu, ki ni bil izpostavljen toksinu, je značilno enaka. To kaže, da mehanizem polnjenja sinaptičnih mešičkov z ACh ostane kljub inhibiciji prenosa živčno-mišičnega dražljaja zaradi AtxA neprizadet ter da še vedno prihaja do spontanega zlivanja sinaptičnih mešičkov s presinaptično membrano in do kvantnega sproščanja ACh (Križaj, 2011).

Prva faza z blagim zaviranjem krčenja mišice preparata se pojavi samo pri temperaturi 37 °C, pri sobni temperaturi (22 °C) je ni mogoče opaziti. To kaže, da je za zmanjšano sproščanje nevrotoksina v tej fazi najverjetneje odgovorna encimska aktivnost AtxA, ki je temperaturno pogojena. Povečano sproščanje ACh v drugi fazi naj bi bilo posledica vezave toksina na napetostno odvisne K^+ -kanale, ne pa encimske aktivnosti, saj temperatura ne vpliva na potek te faze. Tretjo fazo prav tako pogojuje predvsem temperaturno odvisna encimska aktivnost toksina (Priatelj in sod., 2006; Križaj, 2011). Z uporabo encimsko neaktivnega miotoksičnega amoditoksina AtnL je bilo dodatno potrjeno, da je encimska aktivnost zelo pomemben dejavnik nevrotoksičnosti AtxA (Petan in sod., 2007). Ob encimski aktivnosti določa nevrotoksičnost β -nevrotoksinov tudi interakcija β -nevrotoksina z nekaterimi vezavnimi proteini. Vezavni proteini β -nevrotoksinov so npr. kalmodulin (CaM) ter proteini 14-3-3 v citosolu živčnih celic, krokalbin, proteinska disulfid izomeraza (PDI) in TCBP-49 (iz angl.

"taipoxin-associated calcium-binding protein 49") v lumnu endoplazemskega retikuluma, in citokrom C oksidaza (CCOX) v mitohondriju (Šribar in Križaj, 2011).

Za nevrotoksično delovanje AtxA so pomembni različni deli molekule. Med najpomembnejšimi je C-terminalna regija proteina, k nevrotoksičnosti pa pripomorejo tudi hidrofobne in bazične aminokisline na mestih 115–124, Phe24 ter Met7 in Gly11 na N-terminalnem delu AtxA in nekateri aminokislinski ostanki na stični vezavni površini proteina. Mutacije zadnjih lahko vplivajo na nevrotoksičnost AtxA in tudi na njegovo encimsko aktivnost (Križaj, 2011).

Zaradi razjasnitve mehanizmov nevrotoksičnega delovanja β -nevrotoksinov so bile izvedene številne raziskave na izoliranih organih miši in celičnih linijah (Šribar in sod., 2011; Prasarnpun in sod., 2004; Logonder in sod., 2008), kljub temu pa ti še vedno niso popolnoma pojasnjeni. Ni jasno, kako toksini prehajajo v citosol in mitohondrije tarčnih celic, kakšna je vloga vezavnih proteinov β -nevrotoksinov in v kateri fazi je fosfolipazna aktivnost kritična za toksičnost. Po vnosu v telo se β -nevrotoksini tarčno lokalizirajo v sinapsah motoričnih ploščic, kjer se z različno afiniteto vežejo na posebne nevronske receptorje. Ob vezavi proteina na receptor pride do lokalne hidrolize presinaptične membrane. Pri tem se sproščajo produkti, proste maščobne kisline in lizofosfolipidi, kar naredi plazmalemo fluidnejšo. Pospeši se eksocitoza sekretornih veziklov z ACh. Poleg tega naj bi se β -nevrotoksini ob recikliranju sekretornih veziklov prenesli tudi v citosol živčnega končiča, kjer se vežejo na kalmodulin (CaM) in proteine 14-3-3 (pregledno v Šribar in sod., 2014). Vezava naj bi pozitivno vplivala na stabilnost in encimsko aktivnost toksičnih sPLA₂, olajšal pa naj bi se tudi vstop dodatnih molekul β -nevrotoksina v celico, saj kalmodulin sodeluje pri različnih oblikah membranskega transporta (Šribar in sod., 2001). Zelo pomembno vlogo pri β -nevrotoksičnosti naj bi imela povečana fosfolipazna aktivnost na natančno določenih mestih znotraj živčnega končiča – tako naj bi bila zmanjšana

eksocitoza mešičkov z ACh posledica hidrolize notranjega sloja plazmaleme na aktivnih mestih. Poleg tega naj bi vezava toksinov na mitohondrijski receptor R25 in njihova fosfolipazna aktivnost sprožili mehanizem nastanka apoptotskih por na zunanji mitohondrijski membrani in posledični razklop mitohondrijev. Zaradi tega naj bi se sinteza ATP zmanjšala ali celo ustavila, nekateri mitohondriji pa naj bi celo popolnoma degenerirali. β -nevrotoksini naj bi sčasoma povzročili razgradnjo celičnih membran in posledičen dvig znotrajcelične koncentracije ionov Ca^{2+} , ki privede do stimulacije od Ca^{2+} odvisnih znotrajceličnih hidrolaz, kot so cPLA₂ in določene proteinaze. Povečana znotrajcelična hidrolazna aktivnost v končni fazi privede do degeneracije živčnega končiča, ki jo lahko opazimo na elektronskih mikrofah zastrupljenih živčnih končičev v končnem stadiju zastrupitve (pregledno v Šribar in sod., 2014).

Učinki AtxA se v določenih pogledih razlikujejo od tipičnih učinkov drugih β -nevrotoksinov. Pri AtxA ne pride do tako drastičnega zmanjšanja števila sinaptičnih mešičkov (delež mešičkov se zmanjša za približno 13,6 odstotka, medtem ko se pri β -bungarotoksinu ta zmanjša do 80 odstotkov), Ω -zažemki na plazmalemi, ki so pri delovanju drugih β -nevrotoksinov opazni pod elektronskim mikroskopom, po zastrupitvi z AtxA niso bili ugotovljeni (Prasarnpun in sod., 2004; Logonder in sod., 2008). Iz tega lahko sklepamo, da pri delovanju AtxA zavrtje prenosa živčnega dražljaja najverjetneje ni posledica zmanjšane števila sinaptičnih mešičkov, temveč predvsem inaktivacije mitohondrijev zaradi poškodb zunanje membrane pod vplivom delovanja PLA₂, kar vodi v pomanjkanje ATP v živčnem končiču, posledično pa v porušenje razmerja med depolarizacijo in sproščanjem ACh v sinaptično špranjo (Logonder in sod., 2008).

2.2.2 Citotoksični učinki AtxA

AtxA ima tudi citotoksični učinek na celice, zlasti na motorične nevrone. Na elektronskih mikrofrah sta bila dokumentirana otekanje mitohondrijev in njihova vakuolizacija (Logonder in sod., 2008; Križaj, 2011). R25, poseben receptor za Atx v mitohondrijih, je podenota 2 CCOX. Ta interakcija je verjetno odgovorna za citotoksične učinke Atx (Kovačič, 2009; Oberčkal, 2010).

AtxA prek inhibicije zaustavitve celičnega cikla v fazi G2 povzroča tudi apoptozo motoričnih nevronov mišje celične linije NCS34. Citotoksični učinki AtxA na mišične, vezivne in Schwannove celice niso bili ugotovljeni (Križaj, 2011).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Za določitev vpliva mutanta AtxA(D49S) na živčno-mišični prenos in krčenje skeletne mišice smo za izolacijo, čiščenje ter karakterizacijo rekombinantnega AtxA (rAtxA) in AtxA(D49S) uporabili drobno opremo in kemikalije, navedene 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

Kemikalija	Proizvajalec
acetonitril	Merck, Darmstadt, Nemčija
AgNO ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
akrilamid, 40-odstotni	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
APS	Serva, Heidelberg, Nemčija
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
DTT	Fluka, Volketswil, Švica
EtOH, > 99,8-odstotni	Merck, Darmstadt, Nemčija
glicerol	VWR chemicals, Leuven, Belgija
glukoza	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, 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, Missouri, ZDA

Nadaljevanje tabele 1.

Kemikalija	Proizvajalec
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Nemčija
modrasov strup	Imunološki zavod, Zagreb, Hrvaška
mravljična kislina	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
NaDS	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA
NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
proteinski standard (PageRuler Unstained Protein Ladder)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA
PyrPG	Molecular Probes, Eugene, Oregon, ZDA
TEMED	Merck, Darmstadt, Nemčija
TFA	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA
toluen	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Tris	Serva, Heidelberg, Nemčija
urea	Merck, Darmstadt, Nemčija
μ-konotoksin GIIIB	Bachem, Bubendorf, Švica

3.1.2 Laboratorijska oprema

Tabela 2: Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
analogno-digitalni pretvornik Digidata 1440A	Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornija, ZDA
avtoklav Varioklav	Labortechnik, Nemčija
avtomatski sekvenator proteinov Procise 492A	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA
avtomatični zbiralnik frakcij (fraction collector FRAC-100)	Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska
centrifuga MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
centrifuga Rotina 380R	Hettich, Tuttlingen, Nemčija
bralnik mikrotitrskih plošč Infinite M1000	Tecan, Männedorf, Švica
črna mikrotitrška plošča (brez vezave)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Nemčija
črpalka VP100	Savant, Farmingdale, New York, ZDA
digestorij R 25	Iskra, Slovenija
filter Minisart (0,2 µm)	Sartorius, Göttingen, Nemčija
filtrirna nuča (100 mL)	Robu, Hattert, Nemčija
hladilnik in zamrzovalnik (4° C, –20 °C)	Gorenje, Velenje, Slovenija
hlajeni zbiralnik hlapov RVT400	Savant, Farmingdale, New York, ZDA
prečiščevalec šumov Hum Bag	Digitimer, Welwyn Garden City, Velika Britanija
izometrični mehano-električni pretvornik Grass FT03	Grass Instruments, West Warwick, Rhode Island, ZDA

Nadaljevanje tabele 2.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
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, Kalifornija, ZDA
kvarčne kivete za spektrofotometer QS 1000	Hellma Analytics, Müllheim, Nemčija
magnetno mešalo Rotamix SHP-10	Tehtnica, Železniki, Slovenija
masni spektrometer Q-TOF Premier	Waters-Micromass, Manchester, Velika Britanija
mikrocentrifugirke z nizko vezavo proteinov	Costar, Salt Lake City, Utah, ZDA
napajalnik za elektroforezo PowerPac basic	Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, ZDA
napetostni stimulator Grass S-48	Grass Instruments, West Warwick, Rhode Island, ZDA
naprava za izdelavo mikropipet (Fleming/Brown micropipette puller P-97)	Sutter Instruments, Novato, Kalifornija, ZDA
naprava za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE) Mini Protean II	Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, ZDA
ogrevalni in hladilni blok ThermoE	Bioer Technology, Tokyo, Japonska
ojačevalnik električnega signala Axoclamp 900A	Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornija, ZDA
ojačevalnik električnega signala P122	Grass Instruments, West Warwick, Rhode Island, ZDA
peristaltična črpalka AutoAnalyzer	Technicon, Tarrytown, New York, ZDA
pH-meter SevenEasy S20	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica

Nadaljevanje tabele 2.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
sistem za dokumentiranje gelov ChemiDoc XRS+	Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, ZDA
spektrofotometer NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA
stresalnik Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach, Nemčija
stresalnik za epruvete VP-1	Grant Instruments, Cambridge, Velika Britanija
tehnica Analytical Balance GH-252	A and D Instruments, Adelaide, Avstralija
tehnica Vibra AJH-4200CE	Shinko Denshi Co., Tokyo, Japonska
ultrafiltracijska naprava Amicon 8200 ali 8400	Amicon, Billerica, Massachusetts, ZDA
ultrafiltracijska membrana OMEGA OM010076	Pall, Port Washington, New York, ZDA
vakuumski koncentrador SpeedVac Plus SC 110A	Savant, Farmingdale, New York, ZDA
visokozmogljivostni tekočinski kromatograf (HPLC) Series 1100	Hewlett Packard, Palo Alto, Kalifornija, ZDA

3.1.3 Uporabljeni pufri in raztopine

Tabela 3: Uporabljeni pufri in raztopine

Pufer/Raztopina	Sestava	Namen
A	0,1-odstotna (v/v) TFA v vodi	mobilna faza za HPLC
B	0,1-odstotna (v/v) TFA, 90-odstotni (v/v) ACN v vodi	mobilna faza za HPLC
C	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM KCl, 1 mM CaCl ₂	delovni pufer za merjenje fosfolipazne aktivnosti s PyrPG
D	250 mM Tris/HCl, pH 8,3 1,92 M glicin, 1-odstotni (m/v) NaDS	10-kratni elektroforezni pufer za NaDS-PAGE elektroforezo
E	200 mM Tris-HCl (pH 6,8), 8,0 % (m/v) NaDS, 40 % (v/v) glicerol, 0,08-odstotna (m/v) bromfenol modra, 800 mM DTT	4-kratni nanašalni pufer za NaDS-PAGE z DTT
F	10 % (v/v) AcOH, 30 % (v/v) EtOH	razbarvalna raztopina pri barvanju proteinov v PA-gelu
G	3 % (m/v) Na ₂ CO ₃ , 0,05-odstotni (v/v) formaldehid	razvijalna raztopina pri barvanju proteinov v PA-gelu
H	0,9 M Gdn-HCl, 25 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O, 5 mM L-cistein	renaturacijski pufer
I	30 % (v/v) EtOH, 10-odstotni (v/v) AcOH	fiksativna raztopina pri detekciji proteinov s koloidnim srebrom
K-R	5 mM HEPES, pH 7,4 154 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 11 mM D-glukoza	K-R raztopina za delo z živčno-mišičnimi preparati

3.2 METODE

3.2.1 Metode izolacije, renaturacije in čiščenja proteinov

AtxA se lahko pridobi z izolacijo iz kačjega strupa ali v laboratoriju s sintezo z uporabo tehnologije rekombinantne DNA. Iz odraslega modrasa lahko z enkratnim odvzemom (molžo) pridobimo od 15 do 45 mg strupa (Halassy in sod., 2010). Vsebnost AtxA v modrasovem strupu niha glede na letni čas. V nekaterih primerih pozimi v strupu sploh ni bilo AtxA (Gubešek in sod., 1974). Za pridobitev večjih količin AtxA zato največkrat uporabljamo metodo izražanja rekombinantnih proteinov v bakteriji *E. coli*. To uporabljamo tudi za pridobivanje mutanta AtxA(D49S).

3.2.1.1 Metode molekulskega kloniranja

Molekulsko kloniranje in pridobitev začetnih oblik obeh rekombinantnih proteinov je izvedel doktorski študent Adrijan Ivanušec z Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti Inštituta »Jožef Stefan« v Ljubljani.

Plazmidno DNK je izoliral z uporabo kompleta QIAprep Spin Miniprep. Začetne oligonukleotide je oblikoval s pomočjo Agilentovega spletnega orodja (<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>).

3.2.1.2 Renaturacija rekombinantnih proteinov

Za renaturacijo rAtxA in AtxA(D49S) smo uporabili dvolitrski steklenici z 2 L renaturacijskega pufra. Pri rAtxA smo v steklenico na ledu med konstantnim mešanjem magnetnega mešala po kapljicah (na vsakih 10 s približno 1 kapljica) dodali 20 mL S-sulfoniranega rekombinantnega rAtxA, pri AtxA(D49S) pa 25 ml S-sulfoniranega rekombinantnega AtxA(D49S). Da bi renaturacija potekala čim uspešneje, smo renaturacijsko mešanico tri dni pustili počivati v hladilniku pri 4 °C.

Po končani renaturaciji smo vsebini steklenic 35 min centrifugirali pri $10.000 \times g$ pri 4 °C. Dobljeni supernatant smo z uporabo vodne vakuumske črpalke prefiltrirali čez 0,2- μ m filtracijsko membrano.

3.2.1.3 Ultrafiltracija renaturacijske mešanice

Za ultrafiltracijo smo uporabili ultrafiltracijsko membrano OMEGA OM010076, ki ima premer 76 mm in prepušča molekule, manjše od 10 kDa, in ultrafiltracijsko napravo z magnetnim mešalom z volumenom 300 mL. Ultrafiltracijo smo izvedli v hladni sobi pri 4 °C. Ultrafiltracijsko napravo smo priklopili na vir N₂, ki je v napravi ustvaril nadtlak in tako pospešil prehajanje molekul skozi membrano. Celoten volumen obeh renaturacijskih mešanic smo skoncentrirali na 50 ml (40-krat manjši volumen kot pred ultrafiltracijo).

Med postopkom ultrafiltracije smo večkrat odvzeli vzorce renaturacijskih mešanic in filtratov, jim pomerili absorbanco pri valovni dolžini 280 nm (A_{280} – pri tej valovni dolžini absorbirajo proteini), jih primerjali in tako nadzorovali, da ultrafiltracijski membrani slučajno ne bi prepuščali rekombinantnih proteinov.

Koncentrirani renaturacijski mešanici smo po ultrafiltraciji ponovno centrifugirali za 10 min na $9.000 \times g$ pri 4 °C. Supernatanta smo nato ročno, z brizgo, prefiltrirali še čez filter z 0,2- μ m porami, da bi dodatno zmanjšali količino oborjenih proteinov in drugih trdnih primesi v vzorcih.

3.2.1.4 Visokotlačna tekočinska kromatografija na obrnjenih fazah

Zadnjo stopnjo čiščenja rekombinantnih proteinov smo opravili s pomočjo visokotlačne tekočinske kromatografije na obrnjenih fazah (RP-HPLC). Uporabili smo raztopino A (0,1-odstotna (v/v) TFA) in raztopino B (0,1-odstotna (v/v) TFA, 90-odstotni (v/v) acetonitril). Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 215 nm. To je valovna dolžina, pri kateri svetlobo absorbira peptidna vez, tj. vez med aminokislinskimi ostanki v (poli)peptidih. Ker so proteini polipeptidi, dokaz prisotnosti peptidne vezi služi kot posredni kazalnik prisotnosti proteinov v vzorcih. Med čiščenjem frakcij na RP-HPLC smo lahko na osnovi števila pomerjenih vrhov v časovnih intervalih pri omenjeni valovni dolžini grobo ocenili tudi čistost vzorcev.

Najprej smo analizo vzorcev renaturacijskih mešanic izvedli v manjšem obsegu, in sicer s kolono Aquapore BU-300, 7 μ m (PerkinElmer, ZDA), dimenzija 4,6 mm $\times$ 30,0 mm (kolona C4). Kolono smo sprali s 5-odstotno (v/v) raztopino B v raztopini A, nanесли 1 mL vzorca pri pretoku 1 mL/min, nato pa kolono spirali po spodaj navedenem postopku (tabela 4).

Tabela 4: Potek spiranja HPLC kolone C4

Čas (min)	Raztopina (% B v A)
0–3	5–20
3–23	20–60
23–26	60–100
26–29	100
29–30	100–5

Prvo stopnjo čiščenja na RP-HPLC v večjem obsegu smo opravili na koloni Zorbax 300SB-C3, z delci polnila s premerom 3,5 μm (Agilent, ZDA) in dimenzijo 4,6 mm $\times$ 150,0 mm (kolona C3). Kolono smo preprali s 5-odstotno (v/v) raztopino B v raztopini A, za vsako ponovitev protokola nanesti po 1 mL vzorca pri pretoku 1 mL/min in kolono spirali pri pretoku 2 mL/min po spodaj navedenem postopku (tabela 5).

Tabela 5: Potek spiranja HPLC kolone C3

Čas (min)	Raztopina (% B v A)
0–5	5
5–8	5–20
8–43	20–55
43–48	55–100
48–53	100
53–55	100–5

Frakcije vzorcev smo zbirali v mikrocentrifugirkah in jih pri sobni temperaturi posušili s pomočjo vakuumskega koncentradorja. Vsakega od vzorcev smo sprali s 100 μL dH₂O in ponovno posušili. Postopek smo ponovili dvakrat. Nato smo vsakega od vzorcev na podlagi podatka o A₂₁₅ z RP-HPLC zredčili z dH₂O na koncentracijo ~ 1 mg/mL in analizirali s pomočjo enodimenzionalne poliakrilamidne gelske elektroforeze v prisotnosti NaDS (NaDS PAGE; opisano v poglavju 3.2.1.5).

Vzorci, ki so bili homogeni na NaDS PAGE, smo združili in čistili naprej na RP-HPLC s pomočjo kolone Symmetry Shield RP-18, 5 μm (Waters, Irska) z dimenzijo 4,6 mm $\times$ 250 mm (kolona C18). Kolono smo sprali s 30-odstotno (v/v) raztopino B v raztopini A, nanesti po 1 mL vzorca pri pretoku 1 mL/min in nadaljevali spiranje kolone po spodaj navedenem postopku (tabela 6).

Tabela 6: Potek spiranja HPLC kolone C18

Čas (min)	Raztopina (% B v A)
0–5	30
5–38	30–40
38–41	40–100
41–46	100
46–48	100–30

Dobljene frakcije smo posušili, sprali in pripravili za elektroforezo, kot je opisano zgoraj.

3.2.1.5 NaDS PAGE

Po eluciji s C3 in C18 smo vzorce proteinov analizirali na poliakrilamidnih (PA) gelih z debelino 0,75 mm s 4-odstotnim (m/v) koncentracijskim gelom in 15-odstotnim (m/v) separacijskim gelom. Oba gela smo pripravili v 25-mL erlenmajerici. Separacijski gel smo pripravili iz 3,6 mL dH₂O, 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 3,75 mL 40-odstotnega (m/v) akrilamida, 100 µL 10-odstotne NaDS, 50 µL 10-odstotnega (m/v) APS in 7,5 µL TEMED, ga z 10-mL pipeto odmerili v kalup (med stekelci) in ga po tem, ko se je delno strdil, zaščitili pred izsušitvijo s tanko plastjo dH₂O. Gel smo 40–50 min pustili strjevati na sobni temperaturi, nato smo odlili vodo, preostale kapljice pa popivnali s filtrirnim papirjem. Iz 3,175 mL dH₂O, 1,250 mL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 500 µL 40-odstotnega (m/v) akrilamida, 50 µL 10-odstotne (m/v) NaDS, 25 µL 10-odstotnega (m/v) APS in 7,5 µL TEMED smo nato pripravili še koncentracijski gel, ga s 5 mL pipeto vlili med stekelci pripravljenega kalupa, vanj pa vstavili glavniček z 10 ali 15 žepki. Koncentracijski gel je polimeriziral 40–50 min, nato smo odstranili glavniček. Pripravljeni gel (v steklenem kalupu) smo potem uporabili v napravi za elektroforezo (Biorad Mini Protean II). Med gela (v steklenem kalupu) ali gel in plastično pregrado smo skoraj do zgornjega roba kalupa natočili elektroforezni pufer, nato pa v žepke nanесли vzorce.

Vzorci smo predhodno pripravili tako, da smo jim v razmerju 1 : 3 dodali 4-kratni nanašalni pufer z DTT (elektroforezo smo izvajali pri redukcijskih pogojih), jih 5 min inkubirali v termobloku pri 95 °C, potem pa 5 min ohlajali na ledu in na koncu 2 min centrifugirali pri $14.100 \times g$. V žepke smo nanašali od 2 do 20 µL vzorcev. V prvi žepki vsakega gela je bila nanesena pozitivna kontrola – očiščen AtxA –, v drugi žepki 5 µL proteinskih standardov (PageRuler Unstained Protein Ladder), velikih 10–200 kDa, nato so sledili drugi vzorci. Elektroforezo smo izvajali pri konstantnem električnem toku 20 mA na gel. Analizo smo prekinili, ko je fronta vzorca dosegla spodnji rob gela. V povprečju je elektroforezna analiza trajala 40 min.

3.2.1.6 Barvanje proteinov s koloidnim srebrom

Po koncu elektroforeze smo gele z vzorci previdno odstranili iz kalupov, označili njihovo orientacijo z zarezo v desni spodnji kot in jih za najmanj 30 min inkubirali v fiksativni raztopini za barvanje s koloidnim srebrom. Gel smo nato dvakrat temeljito sprali v dH₂O, potem pa 30 min reducirali v raztopini 32 µM DTT. Za tem smo gel ponovno splaknili z dH₂O, ga potopili v 0,1-odstotno (m/v) raztopino AgNO₃ in ga v njej inkubirali čez noč. Naslednji dan smo gel splaknili z razvijalno raztopino in ga v njej razvijali, dokler se niso pojavile jasne lise. Reakcijo razvijanja smo ustavili z dodatkom 5 g citronske kisline na 100 mL razvijalne raztopine.

3.2.1.7 Analiza vzorcev z masno spektrofotometrijo

Ustreznost molekulske mase in čistost vzorcev smo ob barvanju s koloidnim srebrom potrjevali tudi z analizo z masnim spektrometrom Q-TOF Premier (Waters-Micromass, Manchester, VB) po metodi z električnim razprševanjem (ESI-MS). Analizirani vzorci so vsebovali po 5 µg proteinov. Molekulska masa AtxA je bila 13.775 Da, molekulska masa AtxA(D49S) pa 13.747 Da. Eksperimentalna napaka določanja mase po našem postopku je bila ± 2 Da. Analize je izvedel dr. Dušan Žigon iz Centra za masno spektroskopijo Instituta »Jožef Stefan«.

3.2.1.8 Preverjanje encimske aktivnosti

Encimsko aktivnost vzorcev rAtxA in AtxA(D49S) smo določali na veziklih, ki so vsebovali *sn*-2 pirenske derivate glicerofosfolipidov, PyrPG (1-heksadekanoil-2-(1-pirendekanoil)-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol), po modificirani Radvanyijevi metodi (Radvanyi in sod., 1989). Encimsko aktivne sPLA₂ katalizirajo hidrolizo estrske vezi v glicerofosfolipidu na položaju 2 (*sn*-2). Ob cepitvi PyrPG se tako sprosti 1-pirendekanojska kislina, ki fluorescira. Sproščanju 1-pirendekanojske kisline sledimo s fluorimetrom, bralnikom mikrotitrskih plošč, ki meri spreminjanje fluorescenčnega signala. Ob povečanem sproščanju 1-pirendekanojske kisline se signal povečuje.

Za analizo smo raztopino PyrPG v EtOH, ki smo jo hranili na -20°C , segreli v dlani in jo vmes večkrat intenzivno premešali na stresalniku. Nato smo to raztopino po kapljicah dodajali v delovni pufer do končne koncentracije $4,2\ \mu\text{M}$ za merjenje fosfolipazne aktivnosti. Pufer smo ves čas intenzivno mešali, pri čemer je prišlo do spontane tvorbe fosfolipidnih veziklov. Tako pripravljeno disperzijo veziklov (substrat) smo vedno porabili v 24 urah.

Vzorci smo nanašali v vdolbinice črnih mikrotitrskih plošč (format s 96 vdolbinicami) z ravnim dnom ("non-binding", Greiner Bio-One, Nemčija). Z bralnikom mikrotitrskih plošč Infinite M1000 (Tecan, Švica) smo fluorescenco v vzorcih najprej vzbudili pri valovni dolžini 342 nm (valovna dolžina ekscitacije), nato pa izmerili pri valovni dolžini 395 nm (valovna dolžina emisije). Za pozitivno kontrolo smo uporabili $5\ \mu\text{L}$ redčenega $61\ \mu\text{M}$ AtxA s končno koncentracijo v jamici 2 nM, ki smo mu dodali $200\ \mu\text{L}$ 0,09-odstotnega (m/v) BSA v delovnem pufru. Vdolbinice za negativno kontrolo so vsebovale le $200\ \mu\text{L}$ 0,09-odstotnega (m/v) BSA. Tako pozitivni kot negativni kontroli smo pred meritvijo v vdolbinico dodali še $100\ \mu\text{L}$ substrata. V vsako testno vdolbinico smo odmerili najprej po $200\ \mu\text{L}$ 0,09-odstotnega (m/v) BSA, nato pa dodali 1–5 μL ustrezno redčenega testnega vzorca. Optimalne razredčitve vzorcev

za meritev smo dobili z redčenjem 0,09-odstotnega (m/v) BSA. Nato smo v vse vdolbinice (vključno s pozitivno in negativno kontrolo) hkrati dodali po 100 μ L 4,2- μ M raztopine substrata in takoj začeli meriti fluorescenco. Končna koncentracija AtxA v pozitivni kontroli je bila 2 nM, končna koncentracija vzorcev AtxA(D49S) pa 200 nM, 100-krat višja.

Ob vsakem nanosu na mikrotitrsko ploščo smo hkrati nanесли po dve ponovitvi pozitivne kontrole, po dve ponovitvi negativne kontrole in po dve ponovitvi vsakega od vzorcev, da bi zagotovili čim boljšo reprezentativnost rezultatov. Vsak set meritev s posebnimi vzorci smo nato še dodatno dvakrat ponovili z novimi nanosi na mikrotitrsko ploščo in odčitavanjem fluorescence.

3.2.2 Merjenje mišične kontrakcije

3.2.2.1 Priprava živčno-mišičnih preparatov

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 19 odraslih mišjih samcev linije BALB/c, starih približno sedem mesecev. Miši so izvirale iz Centra za genomiko Inštituta za predklinične vede Veterinarske fakultete. Miši so bile usmrčene z metodo cervikalne dislokacije s takojšnjo izkrvavitvijo. Po usmrčitvi smo iz miši izolirali diafragmo s pripadajočima preponskima živcema in jo razpolovili na dva preparata, vsakega s svojim živcem. Preparata smo od trenutka izolacije in do konca poskusa oksigenirali v Krebs-Ringerjevi (K-R) raztopini pri sobni temperaturi (21–25 °C, pH 7,4). Pripravo živčno-mišičnega preparata je izvedla doc. dr. Monika C. Žužek, dr. vet. med., z Veterinarske fakultete v Ljubljani.

3.2.2.2 Merjenje vpliva rAtxA in AtxA(D49S) na izometrično mišično kontrakcijo izoliranih hemidiafragm miši

Mišjo hemidiafragma s preponskim živcem smo prenesli v kopel za izolirane organe, ki je vsebovala 4 mL K-R raztopine. Raztopina v kopeli je bila ves čas poskusa oksigenirana prek sistema za dovajanje kisika. Hemidiafragma smo na lateralnem delu z entomološkimi iglami pričvrstili na silikonsko dno kopeli, tetivni del hemidiafragme pa smo s kovinsko kljukico na nitki povezali z ročico mehano-električnega pretvornika Grass FT03. Preponski živec smo s pomočjo brizge, s katero smo ustvarili negativni tlak, vsesali v lumen sukcijske elektrode. Z natančnim odmikanjem ročice mehano-električnega prevodnika smo mišico postopoma optimalno raztegnili do stopnje, na kateri je bila izmerjena največja moč krčenja, ter določili supramaksimalno napetost dražljaja pri posredno in neposredno izzvani mišični kontrakciji. Čas zatezanja je navadno trajal od 35 do 45 min. Mišična tenzija v mirovanju (MT), pri kateri smo začeli poskuse, je variirala od 1,1 do 1,6 g. Pred začetkom registracije poskusa je morala biti mišična tenzija stabilna, prav tako tudi amplituda kontrakcije. Poskuse smo izvajali pri temperaturi od 21 °C do 24 °C.

Za posredno in neposredno stimulacijo hemidiafragme smo uporabili napetostni stimulator Grass S-48. Posredno smo preponski živec vzdražili prek sukcijske elektrode s pravokotnimi supramaksimalnimi električnimi impulzi amplitude 7–10 V pri frekvenci stimulacije 0,1 Hz in trajanjem dražljaja 0,1 ms. Pri neposredni stimulaciji smo za prenos dražljaja uporabili platinasti elektrodi, ki sta bili v kopel vpeti tako, da sta potekali prečno na skeletna mišična vlakna hemidiafragme. Supramaksimalna napetost za neposredno vzdraženje je znašala 60–70 V, frekvenca stimulacije in čas trajanja dražljaja pa sta ostala enaka kot pri posredni stimulaciji. Poleg enostavnih kontrakcij smo na hemidiafragmah merili tudi posredno in neposredno izzvane tetanične kontrakcije. Za posredno izzvane tetanične kontrakcije smo

uporabili pravokotne napetostne impulze z amplitudo 7–10 V, frekvenco 80 Hz in časom trajanja impulza 0,1 ms, za neposredno izzvane tetanične kontrakcije pa je vrednost parametrov stimulacije ostala enaka razen amplitude električnih impulzov, ki je variirala med 60 in 70 V. Za merjenje in zapis izometričnih mišičnih kontrakcij smo uporabljali mehano-električni pretvornik Grass FT03, ojačevalnik P122, 16-bitni analogno-digitalni pretvornik Digidata 1440A in stacionarni osebni računalnik. Ojačan signal smo z napravo Hum Bag (Digitimer, Welwyn Garden City, VB) filtrirali in iz koristnega signala odstranili električni šum frekvence 50 Hz pred digitalizacijo in zapisovanjem na trdi disk računalnika.

Proučevali smo učinek 0,85 μM AtxA(D49S) na tako posredno kot neposredno izzvano enostavno in tetanično kontrakcijo in opažanja primerjali z učinkom, izmerjenim po aplikaciji 0,85 μM rAtxA. Logonder in sod. navajajo, da je po empiričnih izkušnjah dosežena popolna blokada živčno-mišičnega prenosa s preponskega živca na mišična vlakna diafragme že pri 0,72- μM koncentraciji rAtxA v kopeli (Logonder in sod., 2008), zato bi moral biti pričakovani učinek zagotovljen pri 0,85- μM koncentraciji. Na podlagi rezultatov smo želeli opredeliti vpliv AtxA(D49S) na živčno-mišični prenos in ugotoviti, ali deluje nevrotoksično in miotoksično, ter primerjati njegove učinke z učinki rAtxA.

Meritve izometrične kontrakcije smo na vseh živčno-mišičnih preparatih izvedli po spodaj navedenem protokolu:

1. Skupno 24 min zapisa, ki vključuje registracijo 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; aplikacija rAtxA ali AtxA(D49S) v K-R raztopino v kopeli in 150-minutna registracija posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije;

3. 3 min zapisa neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije ter nato še posredno in neposredno izzvanih tetaničnih kontrakcij;
4. izpiranje živčno-mišičnega preparata s 4 mL oksigenirane K-R raztopine (ponovili trikrat);
5. 15 min zapisa posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije;
6. 5 min zapisa neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije;
7. zapis posredno in neposredno izzvanih tetaničnih kontrakcij.

Kontrolne meritve smo opravili po enakem protokolu, ne da bi v kopel dodali rAtxA ali AtxA(D49S). Namesto tega smo iz kopeli vzeli ustrezen volumen K-R raztopine (33 μ L) in ga nadomestili z enako količino sveže K-R raztopine. Tako kontrolne poskuse kot poskuse z rAtxA in AtxA(D49S) smo ponovili šestkrat, da bi čim bolj omejili vpliv biološke variabilnosti na dobljene rezultate, hkrati pa še vedno pazili na vestno uporabo načela 3 R (reduction, replacement, refinement) pri delu z izoliranimi organi.

S pomočjo programa pClamp-Clampfit 10,7 (Molecular Devices, Union City, CA, ZDA) smo posneli zapise:

- a) posredno izzvanih enostavnih mišičnih kontrakcij;
- b) neposredno izzvanih enostavnih mišičnih kontrakcij;
- c) posredno izzvanih tetaničnih mišičnih kontrakcij;
- d) neposredno izzvanih tetaničnih mišičnih kontrakcij.

Na koncu vsakega poskusa smo z istim programom izmerili amplitudo mišičnih kontrakcij in v časovnih intervalih izračunali odstotek maksimalne amplitude kontrakcije glede na začetno maksimalno amplitudo kontrakcij pred aplikacijo rAtxA ali AtxA(D49S).

3.2.3 Merjenje vpliva rAtxA in AtxA(D49S) na membranske potenciale mišičnih vlaken izoliranih hemidiafragem miši

Hemidiafragme s pripadajočimi živci smo za meritve membranskih potencialov izolirali in pripravili enako kot za merjenje mišične kontrakcije.

Pred začetkom poskusa smo jih 30 min inkubirali v kopeli s 3 mL oksigenirane K-R raztopine z dodatkom 2 μ L μ -konotoksina. μ -konotoksin prepreči kontrakcijo mišičnih vlaken, saj zavira delovanje od napetosti odvisnih Na^+ -kanalov, imenovanih $\text{Nav}1.4$, in tako onemogoča pojav AP ob nastanku PMP. To pomeni, da lahko v poskusu z dodatkom zadostne količine μ -konotoksina zagotovimo mehansko stabilnost merilne mikroelektrode, kar nam omogoča večjo natančnost meritev in zmanjša možnost poškodbe mikroelektrode, vstavljen v mišično vlakno.

Hemidiafragmo smo ob prenosu v kopel z entomološkimi iglami pričvrstili na dno kopeli tako, da je bila mišica primerno raztegnjena, hkrati pa je bil omogočen dostop merilne mikroelektrode do živčno-mišičnega stika. Prosti konec preponskega živca smo s podtlakom vsesali v lumen sukcijske elektrode.

Bromosilikatne mikroelektrode smo izdelali s pomočjo naprave za izdelavo mikropipet P-97 (Sutter Instruments, Novato, Kalifornija, ZDA). Vsako mikroelektrodo smo napolnili s 3 M KCl in se prepričali, da v njej ni mehurčkov zraka. Za meritve smo uporabili le mikroelektrode z uporom med 10 in 20 $\text{M}\Omega$. Mikroelektrode smo z uporabo natančnega mehanskega mikromanipulatorja na območju motorične ploščice uvedli v mišično vlakno in registrirali membranske potenciale. V danih časovnih intervalih smo pomerili membranske potenciale 6–16 mišičnih vlaken na hemidiafragmo. Upoštevali in posneli smo samo meritve, pri katerih je bila vrednost mirovnega membranskega potenciala (rV_m) med -55 in -80 mV. Izjema so bile nekatere meritve rV_m po aplikaciji rAtxA, pri katerih so bili skoraj vsi rV_m višji od -55 mV.

Prisotnost MPMP v registriranem zapisu nam je služila kot kazalnik, da smo dejansko v področju motorične ploščice.

Z uporabo napetostnega stimulatorja Grass S-48 smo prek živca v sukcijski elektrodi neposredno stimulirali aksone v freničnem živcu ter registrirali PMP in spontane MPMP. Stimulacija je potekala s supramaksimalnimi 10-V dražljaji amplitude, frekvenca draženja živca je bila 0,1 Hz, trajanje dražljajev pa 0,1 ms. Membranske potenciale smo z ojačevalnikom Axoclamp 900A ojačali in jih nato digitalizirali z analogno-digitalnim pretvornikom Digidata 1440A. Oba krmili programski paket pClamp-Clampfit 10.7 (Molecular Devices, Union City, Kalifornija, ZDA). Preparirana hemidiafragma je bila ves čas poskusa potopljena v oksigenirani K-R raztopini na temperaturi 20–25 °C.

Potencialne smo registrirali pred aplikacijo rAtxA in AtxA(D49S) ter 30, 60, 90, 120 in 150 min po aplikaciji in 15 min po spiranju hemidiafragme s K-R raztopino. Registrirali smo membranske potenciale na 6–16 mišičnih vlaknih v vsakem danem časovnem obdobju pri šestih hemidiafragmah. Merili smo vpliv 0,85 μ M rAtxA in 0,85 μ M AtxA(D49S) na membranske potenciale. Pri kontrolnih vzorcih smo namesto rAtxA ali AtxA(D49S) iz komorice odpipetirali ustrezno količino K-R raztopine in jo nadomestili z enakim volumnom sveže K-R raztopine. Med poskusi smo in registrirali in opazovali učinek rAtxA in AtxA(D49S) na:

- a) amplitudo PMP,
- b) amplitudo MPMP,
- c) frekvenco MPMP,
- d) rV_m .

3.2.4 Analiza podatkov in statistika

Grafični prikaz postopkov izpiranja HPLC kolon in merjenja encimske aktivnosti smo izvedli s programom GraphPad (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornija, ZDA).

Za analizo rezultatov meritev izometrične kontrakcije in membranskih potencialov smo uporabili program pClamp-Clampfit 10.7 (Molecular Devices, Union City, Kalifornija, ZDA).

Na osnovi dobljenih rezultatov smo izvedli statistične analize in izrisali ustrezne grafe v programu SigmaPlot (Systat Software Inc., Erkrath, Nemčija).

Ker smo pri vseh analizah primerjali tri sete podatkov, smo za statistično interpretacijo rezultatov pri meritvah mišične kontrakcije in membranskih potencialov uporabili metodo enosmerne analize variance.

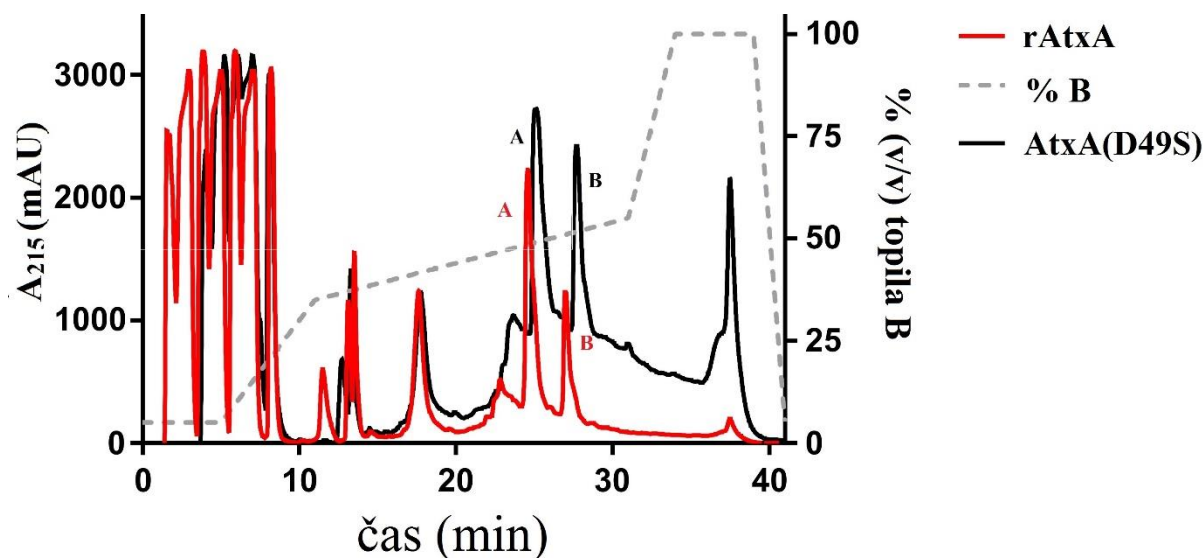
Vrednosti meritev z normalno porazdelitvijo po testu Shapiro-Wilk smo prikazali s stolpičnim diagramom srednje vrednosti $\pm$ standardna napaka (SE). Vrednosti meritev, ki niso bile normalno porazdeljene, smo nadaljnje analizirali po metodi ANOVA on Ranks, za ugotavljanje značilnih razlik med analiziranimi skupinami pa uporabili neparametrični *post hock* test po Dunnu. Mejna vrednost za statistično značilne razlike med skupinami je bila $p \leq 0,05$. Te rezultate smo grafično predstavili z mediano in grafikoni kvartilov.

4 REZULTATI

4.1 RENATURACIJA IN ČIŠČENJE REKOMBINANTNIH PROTEINOV

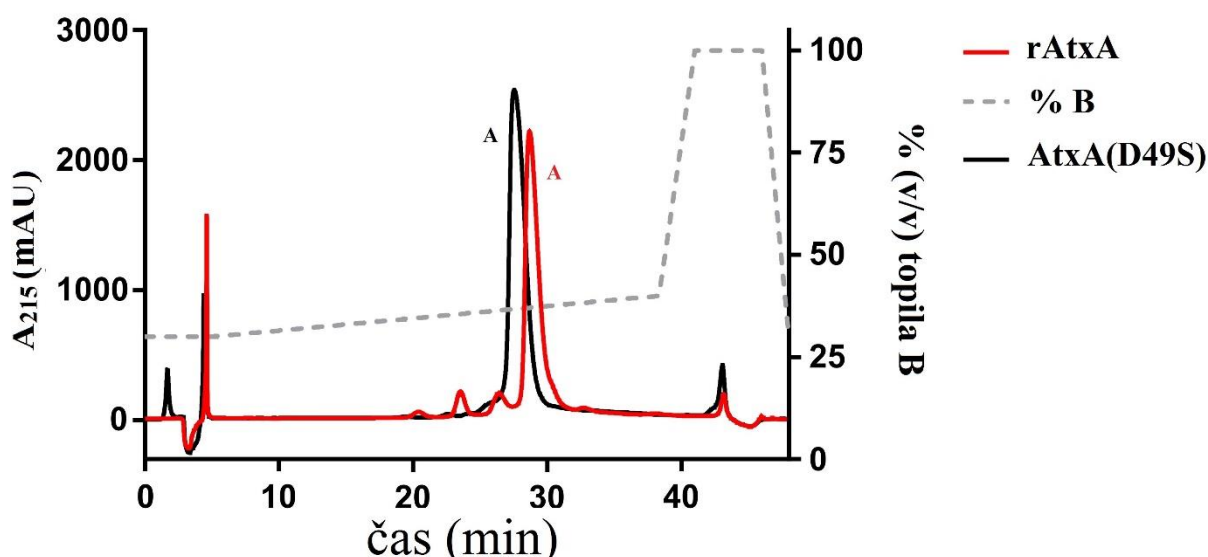
4.1.1 RP-HPLC

Vzorci renaturacijske mešanice rAtxA in AtxA(D49S) smo najprej analizirali na koloni C3, nato pa še na koloni C18. Iz analiz na slikah 5 in 6 je razvidno, da je bilo v fazi kolone C3 v obeh primerih prisotnih precej več primesi in da sta se tako rAtxA kot AtxA(D49S) sprala s kolone z retencijskim časom ~24 min oz. pri ~48 odstotkih (v/v) topila B. Oba proteina sta se eluirala v dveh vrhovih. Pri vzorcu rAtxA smo encimsko aktivnost izmerili samo v prvem vrhu, v drugem pa ne (rezultati niso prikazani). Za nadaljnje delo smo zato tako pri rAtxA kot pri AtxA(D49S) uporabili le material iz prvega vrha. V drugem vrhu sta bili metioninski obliki rAtxA in AtxA(D49S), pri katerih se metionin (Met) na mestu -1 ni odcepil z bakterijsko peptidazo.



Slika 5: Analiza RP-HPLC C3 analiza rAtxA in AtxA(D49S) po renaturaciji. Na kolono C3 smo nanesti po 1 mL posamezne renaturacijske mešanice in frakcije eluirali po prej opisanem postopku (tabela 5). Na sliki sta superponirani analizi renaturacijskih mešanic rAtxA in AtxA(D49S). Prikazan je tudi gradient topila B (0,1-odstotna (v/v) TFA, 90-odstotni (v/v) acetonitril). S črko A sta označena vrhova, kjer sta se eluirala rAtxA (rdeč) in AtxA(D49S) (črn). S črko B sta označena vrhova, kjer se je s kolone eluirala metioninska oblika rAtxA (rdeč) in AtxA(D49S) (črn).

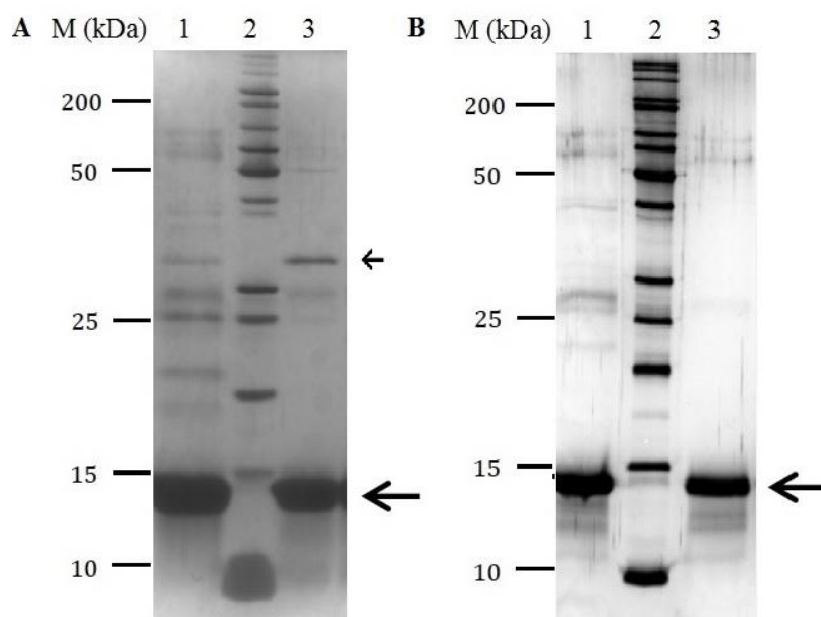
Na koloni C18 se je rAtxA spral s kolone ~28 min od začetka analize oz. pri ~39 odstotkih (v/v) topila B, AtxA(D49S) pa po ~26 min od začetka oz. pri ~41 odstotkih (v/v) topila B. Tako pri rAtxA kot pri mutantu je mogoče opaziti, da se je s čiščenjem na koloni C3 odstranil že precejšen delež primesi (slika 6).



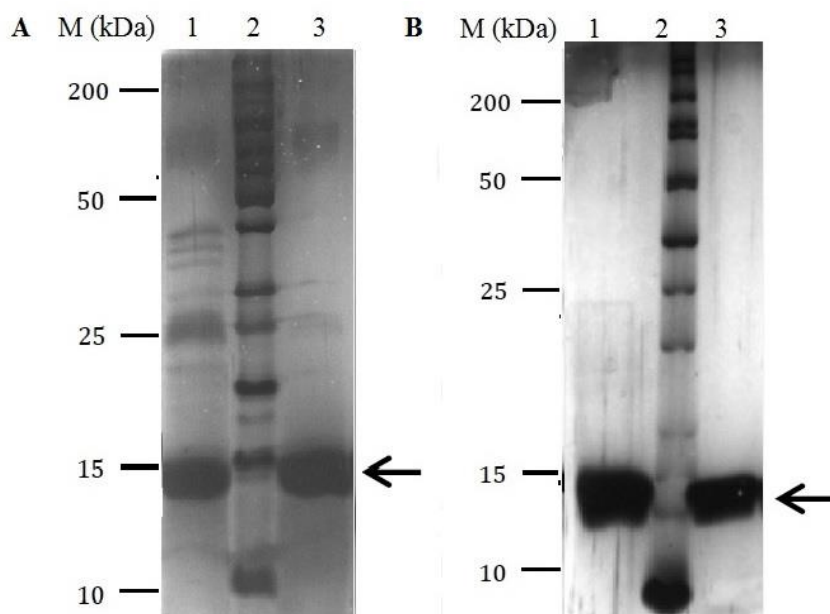
Slika 6: **Analiza RP-HPLC C18 renaturacijskih mešanic rAtxA in AtxA(D49S).** Na kolono C18 smo nanegli po 1 mL posamezne renaturacijske mešanice in frakcije eluirali po prej opisanem postopku (tabela 6). Na sliki sta superponirani analizi renaturacijskih mešanic rAtxA in AtxA(D49S). Prikazan je tudi gradient topila B (0,1-odstotna (v/v) TFA, 90-odstotni (v/v) acetonitril). S črko A sta označena vrhova, kjer sta se eluirala rAtxA (rdeč) in AtxA(D49S) (črn).

4.1.2 NaDS PAGE

Vse pobrane frakcije po čiščenju na koloni C3 in C18 smo pred združevanjem analizirali z NaDS PAGE. Proteine v elektroforeznih gelih smo zaznali s pomočjo AgNO_3 . Oba rekombinantna proteina sta bila na pričakovanem mestu na gelu, tj. na položaju, ki odgovarja velikosti ~14 kDa. Na položaju, ki ustreza masi ~28 kDa, so pri rAtxA prav tako vidne proteinske lise. Predvidevamo, da te lise predstavljajo dimerno obliko rAtxA. NaDS PAGE analiza vzorcev po čiščenju na koloni C3 je tako v primeru rAtxA kot AtxA(D49S) razkrila precej več primesi kot po čiščenju na koloni C18 (sliki 7 in 8).



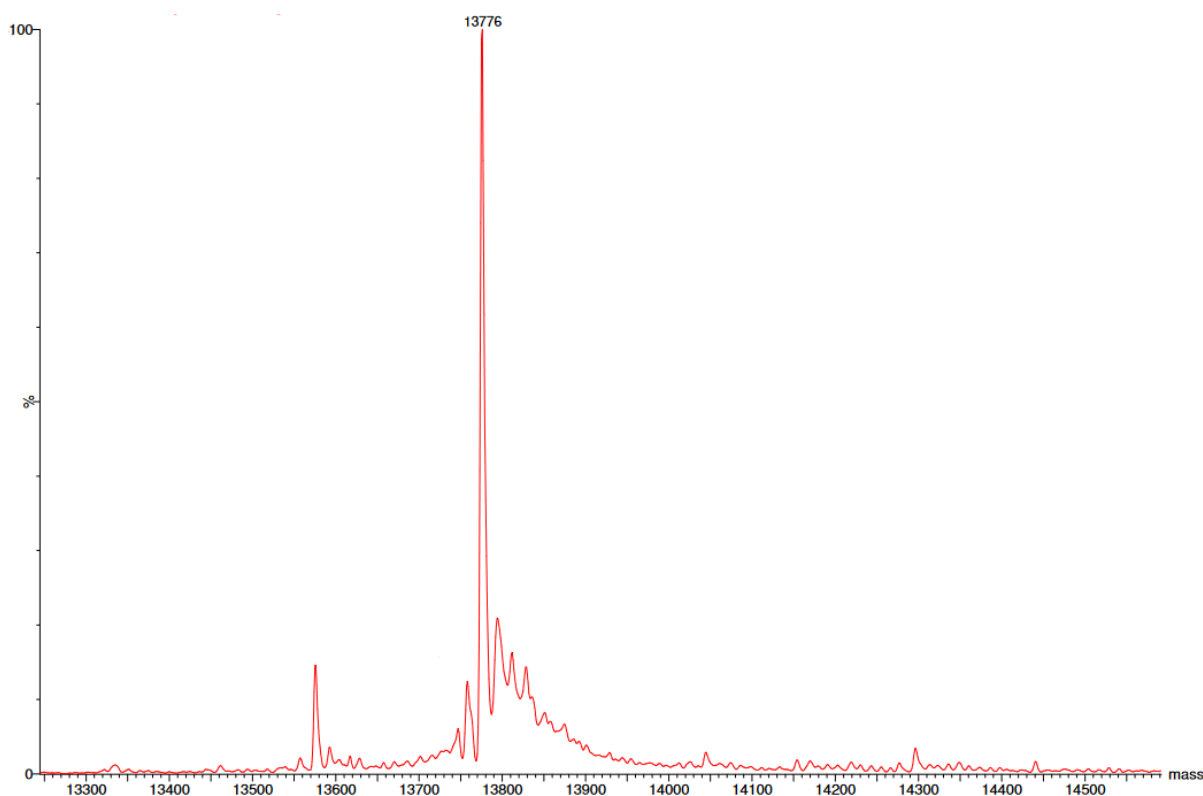
Slika 7: Analizi **NaDS-PAGE** vzorcev **rAtxA** in **AtxA(D49S)** po čiščenju na **RP-HPLC** kolone **C3**. Po končani elektroforezi smo proteine v gelu obarvali s koloidnim srebrom. Na sliki A je prikazan vzorec **rAtxA**, na sliki B pa **AtxA(D49S)**. Na obeh gelih sta z veliko puščico označeni lisi pri ~14 kDa, ki predstavljata naša rekombinantna proteina. Na sliki A je vidna tudi lisa pri ~28 kDa (majhna puščica), ki ustreza dimeru **rAtxA**.



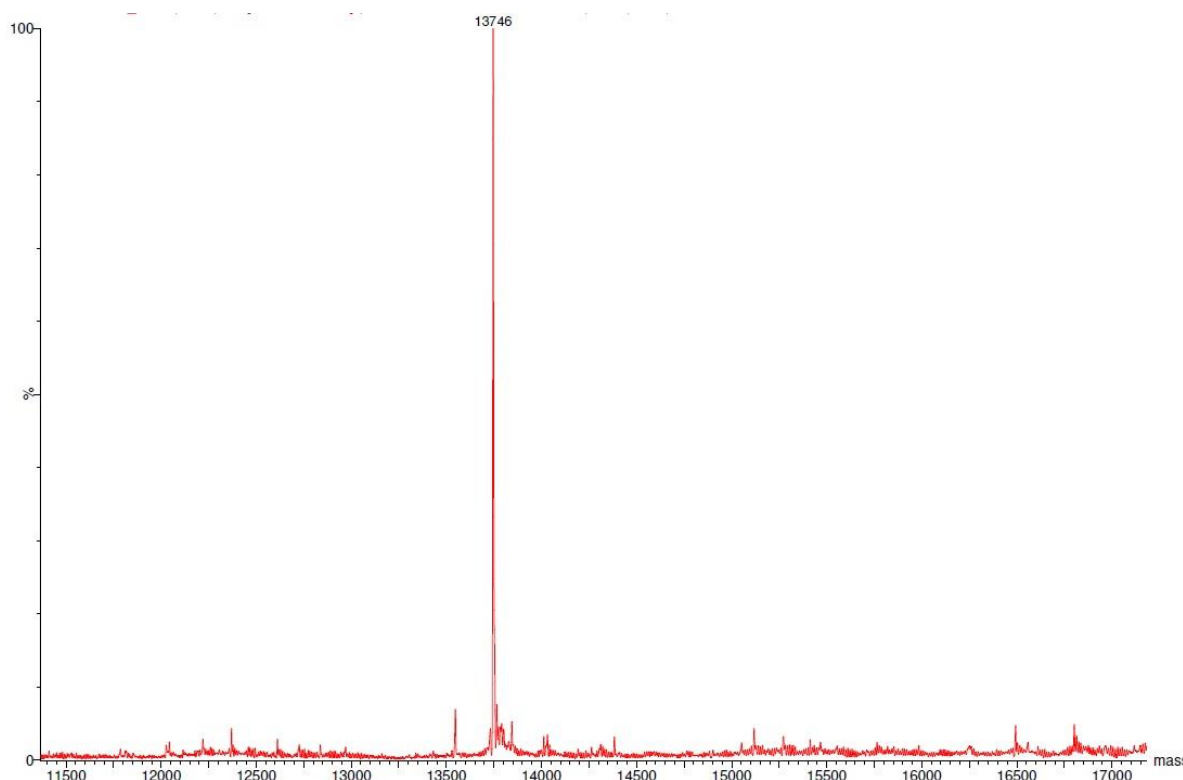
Slika 8: Analizi **NaDS-PAGE** vzorcev **rAtxA** in **AtxA(D49S)** po čiščenju na **RP-HPLC** kolone **C18**. Po končani elektroforezi smo proteine obarvali s koloidnim srebrom. Na sliki A je prikazan vzorec **rAtxA**, na sliki B pa **AtxA(D49S)**. Na obeh gelih sta s puščico označeni lisi z velikostjo ~14 kDa, kjer se nahajata naša rekombinantna proteina.

4.1.3 Masna spektrometrija

Molekulsko maso in čistost vzorcev smo preverili z masnospektroskopsko analizo na masnem spektrometru Q-TOF Premier. Na sliki 9 je prikazana analiza vzorca rAtxA. Njegova molekulska masa 13.776 Da za 1 Da odstopa od teoretične, kar je znotraj meja eksperimentalne napake (± 2 Da). Delež primesi je zelo nizek. Na sliki 10 pa je prikazana analiza rekombinantnega AtxA(D49S). Najmočnejši signal, pravzaprav edini, je pri molekulske masi 13.746 Da za 1 Da manjši od teoretične mase AtxA(D49S). Tudi ta rezultat je v meji eksperimentalne napake za uporabljeno metodo, zato je potrjena uspešna priprava obeh rekombinantnih proteinov. Tudi v tem vzorcu je delež drugih primesi zanemarljivo nizek.



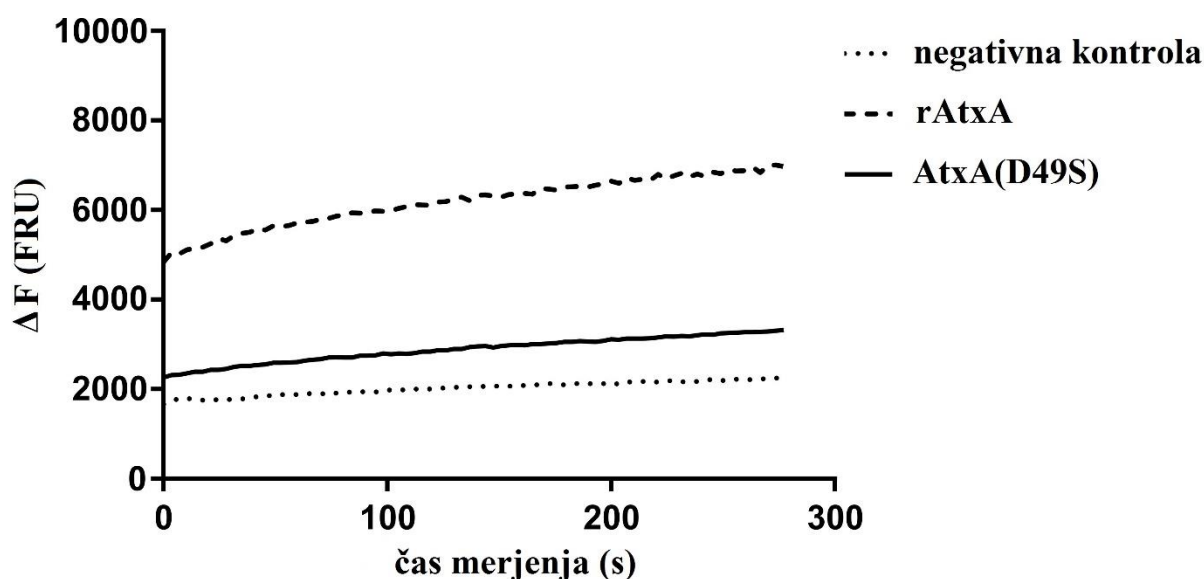
Slika 9: **Masni spekter vzorca rAtxA po čiščenju na RP-HPLC kolone C18.** Vrh z najvišjo intenziteto v spektru ustreza molekulskemu ionu z maso 13.776 Da.



Slika 10: **Masni spekter vzorca AtxA(D49S) po čiščenju na RP-HPLC kolone C18.** Vrh z najvišjo intenziteto v spektru ustreza molekulskemu ionu z maso 13.746 Da.

4.1.4 Merjenje encimske aktivnosti

Encimsko aktivnost rAtxA in AtxA(D49S) smo merili z modificirano pirensko metodo po Radvanyiju, opisano v podpoglavju 3.2.1.8. Encimsko aktivnost izoliranega rAtxA smo primerjali z encimsko aktivnostjo predhodno pripravljenega rAtxA v enaki koncentraciji, ki je imel encimsko aktivnost, primerljivo naravnemu AtxA. Ta vzorec rAtxA smo uporabili tudi kot referenco pri analizi encimske aktivnosti 100-krat bolj koncentrirane raztopine mutanta AtxA(D49S). Izmerjena encimska aktivnost pripravljenega rAtxA je bila primerljiva z aktivnostjo referenčnega vzorca rAtxA (~96-odstotna), AtxA(D49S) pa je imel zanemarljivo encimsko aktivnost (~0,4-odstotno) (slika 11). Encimsko aktivnost smo izračunali iz začetnega naklona krivulje spremembe fluorescence.

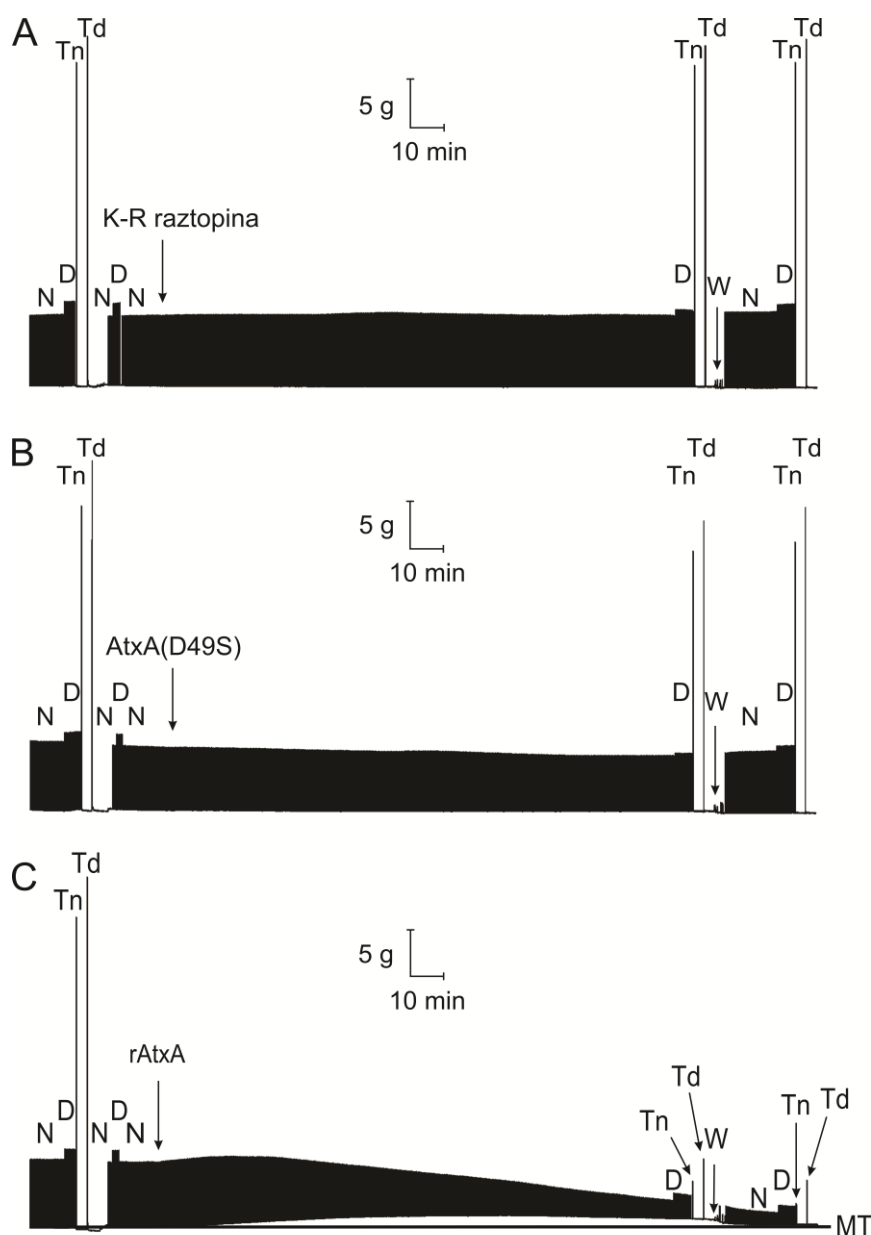


Slika 11: **Meritev fosfolipazne aktivnosti vzorcev.** Vzorcem smo fosfolipazno aktivnost merili s pirensko metodo. Prikazana je razlika (ΔF) med fluorescenco vzorca, pri kateri je bil dodan protein (AtxA ali njegov mutant AtxA(D49S)).

4.2 MERJENJE IZOMETRIČNE MIŠIČNE KONTRAKCIJE

Na sliki 12 so prikazani reprezentativni zapisi mišične kontrakcije v kontrolnem poskusu po izpostavitvi $0,85 \mu\text{M}$ rAtxA in izpostavitvi $0,85 \mu\text{M}$ AtxA(D49S). Pri kontrolnem zapisu je MT ostal nespremenjen, prav tako se je od začetka do konca poskusa ohranila tudi moč (amplituda) posredne in neposredne, enostavne in tetanične kontrakcije. Pri AtxA(D49S) ni opaznega dviga MT, moč enostavne in tetanične kontrakcije ostane nespremenjena. rAtxA je sprva izzval povečano moč kontrakcije, potem pa se je amplituda kontrakcij hitro zmanjševala. rAtxA v $0,85\text{-}\mu\text{M}$ koncentraciji zmanjša amplitudo enostavnih mišičnih kontrakcij za $70,5 \pm 4,5$ odstotka glede na njihovo amplitudo pred aplikacijo rAtxA. MT se je v primerjavi z začetnim stanjem izrazito povečala. Dvigovanje bazalne tenzije se je pojavilo $3,05 \pm 1,07$ min po aplikaciji rAtxA, najvišjo vrednost pa je MT dosegel $103,3 \pm 5,15$ min po aplikaciji rAtxA.

Vrednost največjega dviga MT je v povprečju znašala $1,15 \pm 0,04$ g oz. $86,93 \pm 3,59$ odstotka vrednosti bazalne tenzije pred aplikacijo toksina.

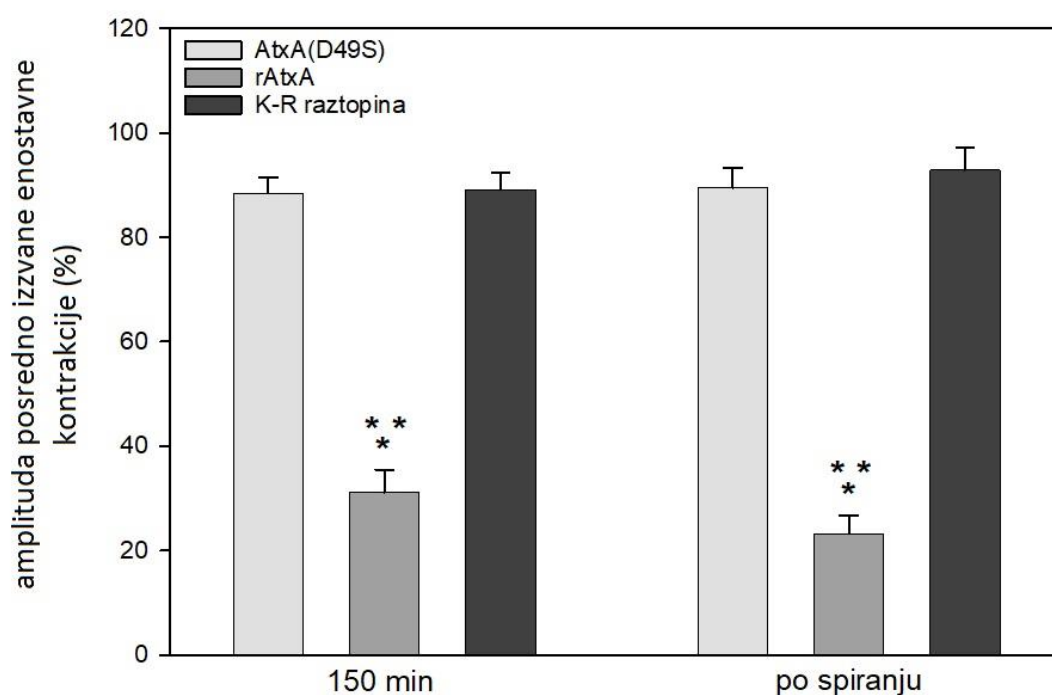


Slika 12: Učinek rAtxA in AtxA(D49S) na izometrično mišično kontrakcijo mišje hemidiafragme v odvisnosti od časa. Slika prikazuje (A) kontrolni zapis, (B) vpliv 0,85 μM AtxA(D49S) in (C) vpliv 0,85 μM rAtxA na izometrično mišično kontrakcijo v odvisnosti od časa. N označuje posredno izzvano enostavno 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. S puščico je označen čas aplikacije K-R raztopine, AtxA(D49S) ali rAtxA.

4.2.1 Vpliv rAtxA in AtxA(D49S) na moč posredno izzvane mišične kontrakcije

Ker nas je zanimalo, ali AtxA(D49S), ki nima fosfolipazne aktivnosti, vpliva na amplitudo kontrakcije, smo živčno-mišične preparate izpostavili 0,85 μ M konc. in v teh pogojih registrirali amplitudo mišične kontrakcije. Kot pozitivno kontrolo učinka smo uporabili rAtxA.

Statistična analize je potrdila, da rAtxA povzroči značilen upad amplitude enostavne mišične kontrakcije (slika 12), medtem ko se amplituda enostavne kontrakcije ob prisotnosti AtxA(D49S) značilno ne spremeni v primerjavi s kontrolo. Po spiranju živčno-mišičnega preparata ostane amplituda kontrakcij enaka, kar potrjuje, da je učinek rAtxA na kontrakcijo nepovraten (slika 13).

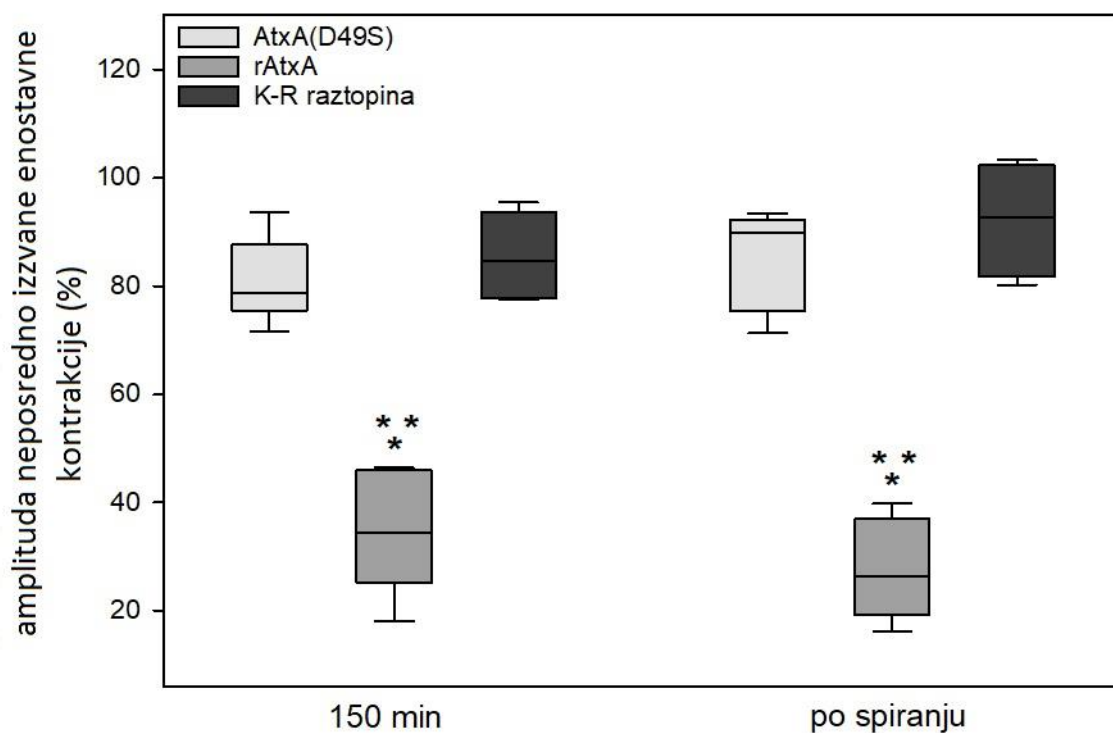


Slika 13: Učinek AtxA(D49S) in rAtxA na amplitudo posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši. Prikazani so vplivi K-R raztopine (kontrola), 0,85 μ M AtxA(D49S) in 0,85 μ M rAtxA na amplitudo posredno izzvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši 150 min po aplikaciji in po spiranju s K-R raztopino. Vse vrednosti deleža amplitude mišične kontrakcije so predstavljene kot srednje vrednosti $\pm$ SE šestih različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini. * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in kontrolo v istem časovnem obdobju. ** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in AtxA(D49S) v istem časovnem obdobju.

4.2.2 Vpliv rAtxA in AtxA(D49S) na moč neposredno izzvane enostavne mišične

kontrakcije

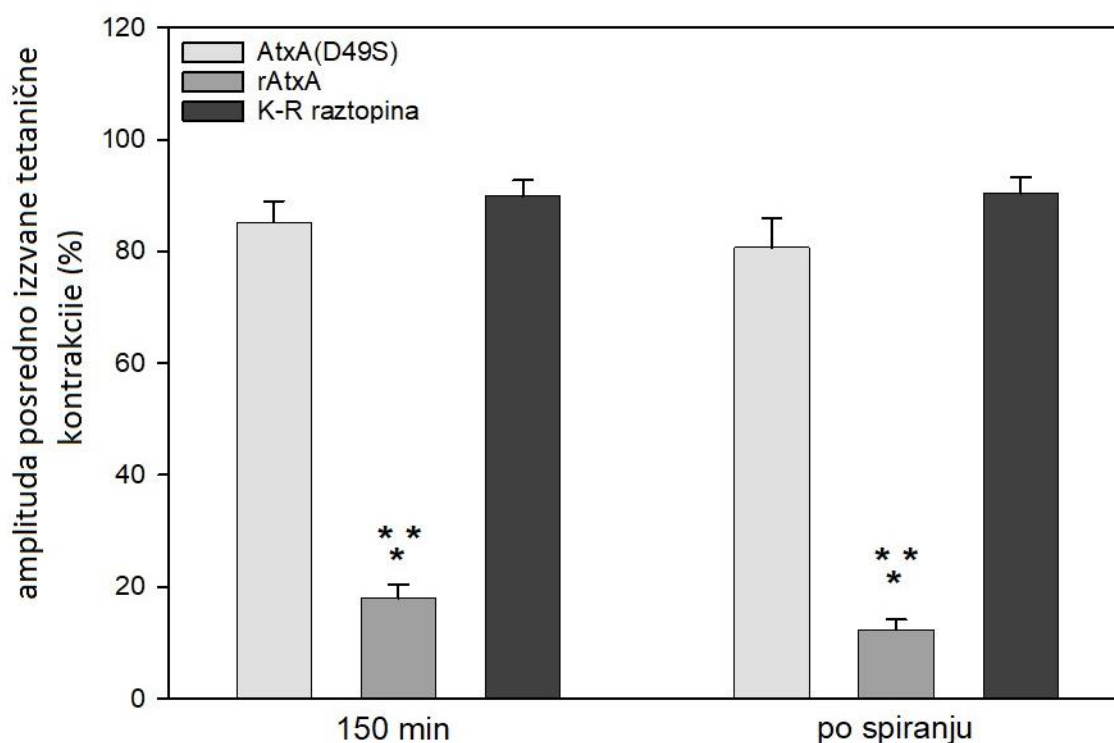
Med kontrolo in meritvami po aplikaciji AtxA(D49S) ni značilnih razlik (slika 14). Po aplikaciji rAtxA je prišlo do značilnega znižanja amplitude neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije in posledično značilnih odstopanj od kontrole in AtxA(D49S) (slika 14).



Slika 14: Učinek AtxA(D49S) in rAtxA na amplitudo neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši. Prikazani so vplivi K-R raztopine (kontrola), 0,85 μ M AtxA(D49S) in 0,85 μ M rAtxA na amplitudo neposredno izzvane enostavne mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši 150 min po aplikaciji in po spiranju s K-R raztopino. Vse vrednosti deleža amplitude mišične kontrakcije so predstavljene kot mediane in interkvartilni rangi šestih različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini. * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in kontrolo v istem časovnem obdobju. ** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in AtxA(D49S) v istem časovnem obdobju.

4.2.3 Vpliv rAtxA in AtxA(D49S) na moč posredno izzvano tetanične kontrakcije

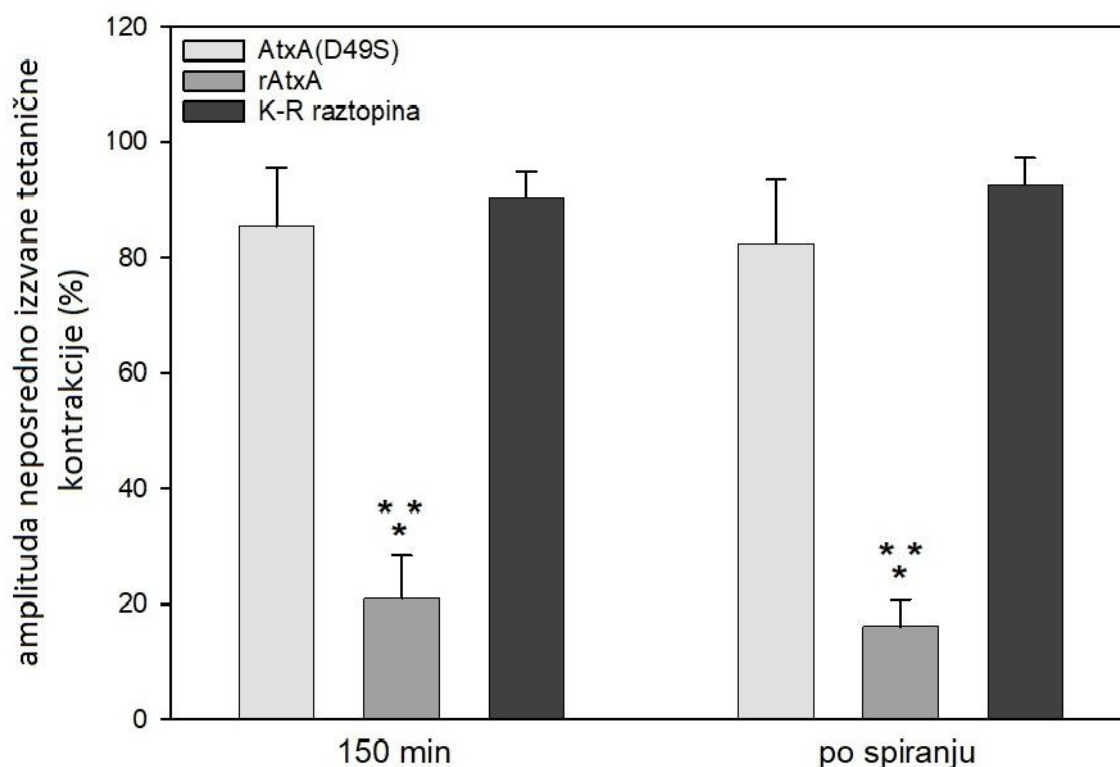
Tudi pri merjenju amplitude posredno izzvano tetanične kontrakcije so bile povprečne vrednosti amplitude po aplikaciji rAtxA značilno manjše od vrednosti moči kontrakcije pri kontrolnih poskusih ali po izpostavitvi hemidiafragme AtxA(D49S). Med kontrolami in poskusi z AtxA(D49S) v amplitudi posredno izzvano tetanične kontrakcije ni bilo značilnih razlik (slika 15).



Slika 15: Učinek AtxA(D49S) in rAtxA na amplitudo posredno izzvano tetanične mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši. Prikazani so vplivi K-R raztopine (kontrola), 0,85 μ M AtxA(D49S) in 0,85 μ M rAtxA na amplitudo posredno izzvano tetanične mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši 150 min po aplikaciji in po spiranju s K-R raztopino. Vse vrednosti deleža amplitude mišične kontrakcije so predstavljene kot srednje vrednosti $\pm$ SE šestih različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini. * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in kontrolo v istem časovnem obdobju. ** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in AtxA(D49S) v istem časovnem obdobju.

4.2.4 Vpliv rAtxA in AtxA(D49S) na moč neposredno izzvane tetanične kontrakcije

Dunnov test je potrdil značilno odstopanje vrednosti meritev po aplikaciji rAtxA od meritev vrednosti v kontrolnih poskusih in poskusih po aplikaciji AtxA(D49S), ki je razvidno tudi s slike 16. Med kontrolno skupino in skupino z AtxA(D49S) ni bilo značilnih razlik (slika 16).



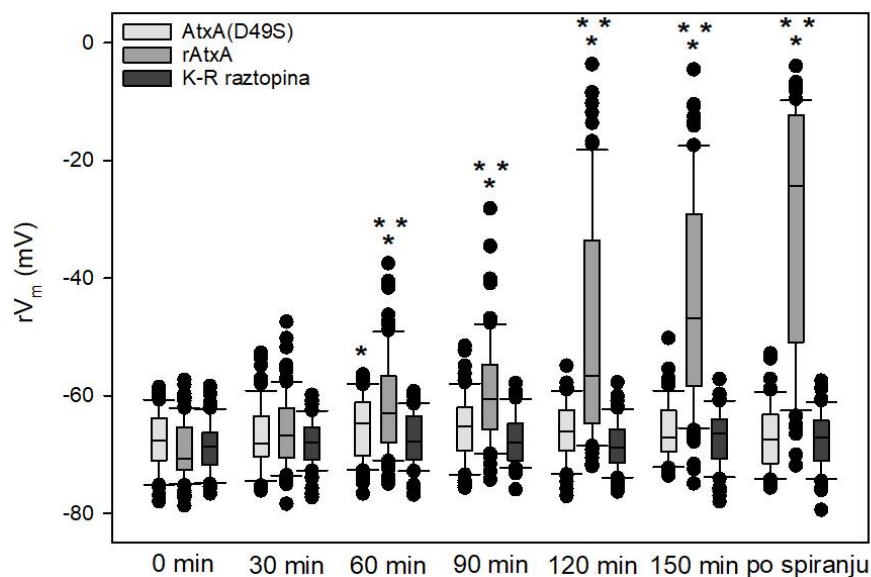
Slika 16: Učinek AtxA(D49S) in rAtxA na amplitudo neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši. Prikazani so vplivi K-R raztopine (kontrola), 0,85 μ M AtxA(D49S) in 0,85 μ M rAtxA na amplitudo neposredno izzvane tetanične mišične kontrakcije izoliranih hemidiafragem miši 150 min po aplikaciji in po spiranju s K-R raztopino. Vse vrednosti deleža amplitude mišične kontrakcije so predstavljene kot srednje vrednosti $\pm$ SE šestih različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini. * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in kontrolo v istem časovnem obdobju. ** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in AtxA(D49S) v istem časovnem obdobju.

4.3 MERJENJE MEMBRANSKIH POTENCIALOV

Meritve membranskih potencialov smo izvedli za mehanistično razjasnitev učinkov rAtxA in AtxA(D49S) na mišično kontrakcijo. Pri poskusih merjenja membranskih potencialov smo proučevali vpliv rAtxA in AtxA(D49S) na mirovni membranski potencial mišičnih vlaken, amplitudo in razpolovni čas padajoče faze PMP, amplitudo ter razpolovni čas padajoče faze MPMP in frekvenco MPMP. Osredinili smo se na delovanje AtxA(D49S) ter tudi na primerjavo njegovega delovanja s kontrolo in delovanjem rAtxA.

4.3.1 Vpliv rAtxA in AtxA(D49S) na mirovni membranski potencial mišičnega vlakna

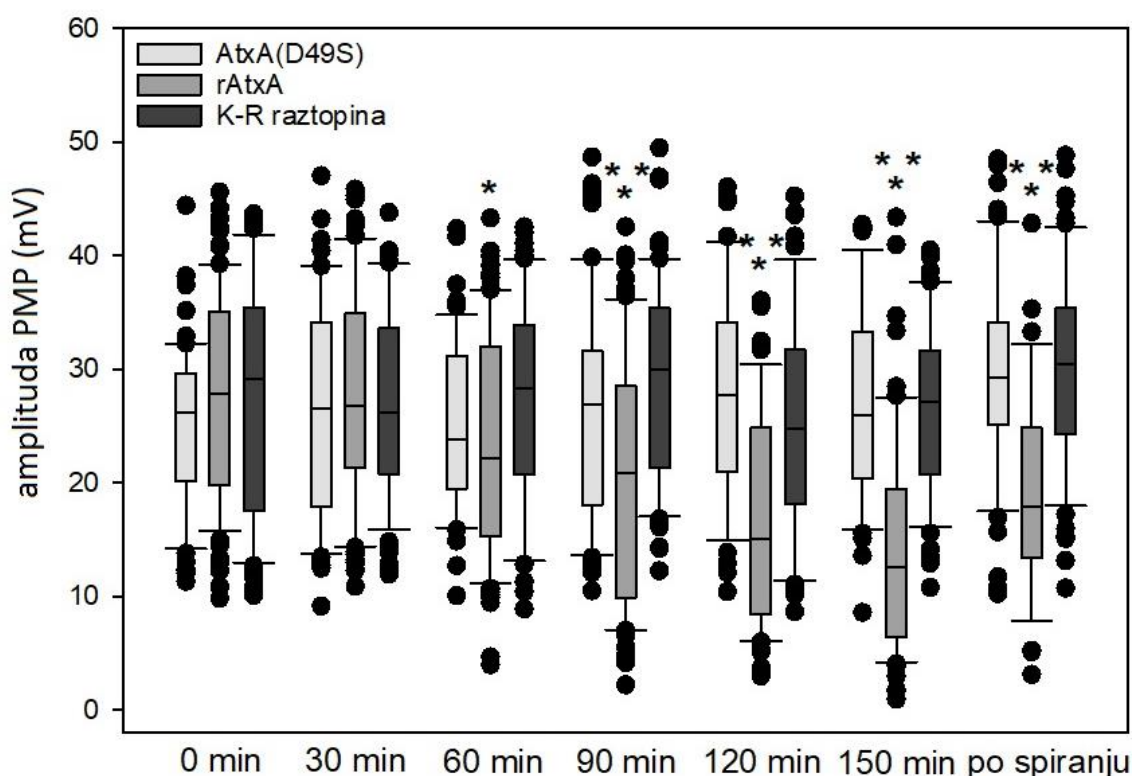
AtxA(D49S) glede na rezultate poskusov ne vpliva na mirovni membranski potencial, 60 min po aplikaciji rAtxA se pojavi viden trend kontinuiranega padanja napetosti mirovnih membranskih potencialov (slika 17). Izmerjene vrednosti se značilno razlikujejo od vrednosti, izmerjenih pri kontroli in AtxA(D49S).



Slika 17: Vpliv AtxA(D49S) in rAtxA na rV_m skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragme miši. Prikazan je vpliv kontrole (K-R raztopina), 0,85 μ M AtxA(D49S) in 0,85 μ M rAtxA na rV_m skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragme miši v odvisnosti od časa izpostavljenosti (pred aplikacijo, po 30, 60, 90, 120 in 150 min ter po spiranju). Vrednosti po spiranju smo dobili z meritvami, opravljenimi 15 min po spiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. Vse vrednosti so predstavljene kot mediane in interkvartilni rangi izmerjenih vrednosti šestih različnih hemidiafragme miši v poskusni skupini ($n = 6-16$ skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med AtxA(D49S)/rAtxA in kontrolo v istem časovnem obdobju. ** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in AtxA(D49S) v istem časovnem obdobju.

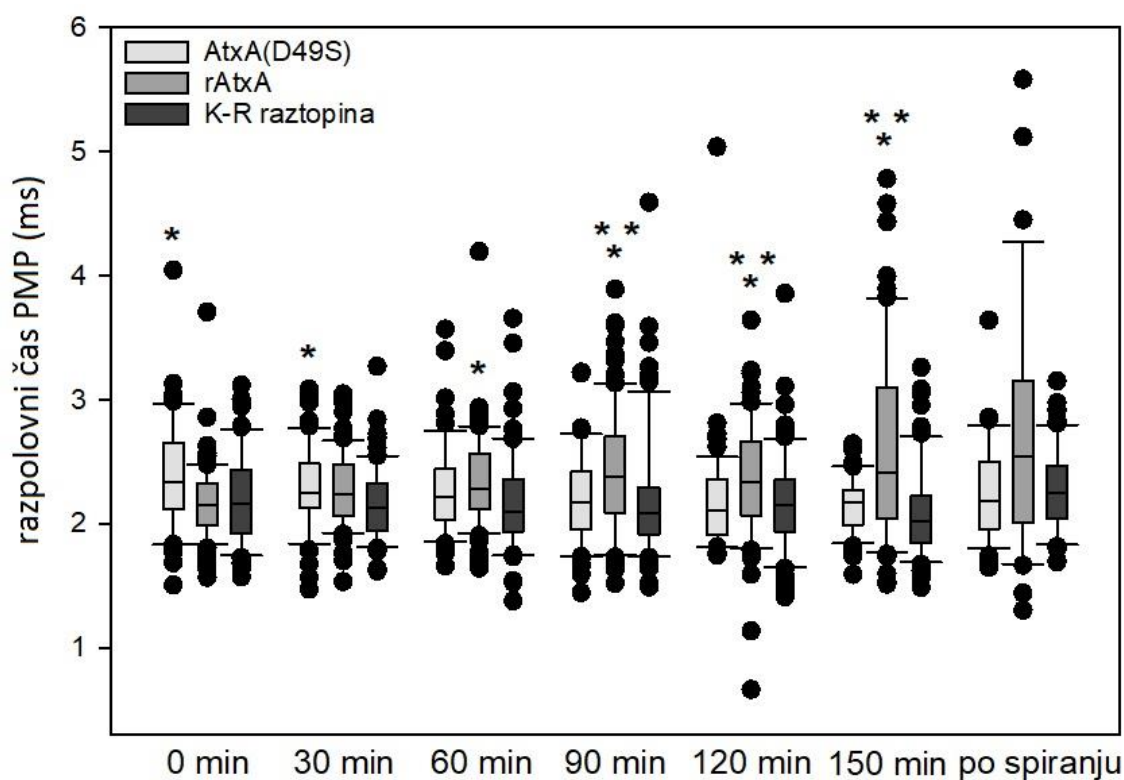
4.3.1 Vpliv rAtxA in AtxA(D49S) na amplitudo in razpolovni čas padajoče faze PMP

Med AtxA(D49S) in kontrolo v času meritev nismo ugotovili značilnih razlik v amplitudi PMP (slika 18). 60 min po aplikaciji rAtxA se je začela amplituda PMP vidno zmanjševati in upadala je vse do konca poskusa in po spiranju živčno-mišičnega preparata. Od vključno 60 min naprej se vrednosti mišičnih vlaken po aplikaciji rAtxA značilno razlikujejo od vrednosti kontrole, od 90 minut naprej pa tudi od vrednosti po aplikaciji AtxA(D49S) (slika 18).



Slika 18: Vpliv AtxA(D49S) in rAtxA na amplitudo PMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. Prikazan je vpliv kontrole (K-R raztopina), 0,85 μ M AtxA(D49S) in 0,85 μ M rAtxA na amplitudo PMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti od časa izpostavljenosti (pred aplikacijo, po 30, 60, 90, 120 in 150 min ter po spiranju). Vrednosti po spiranju smo dobili z meritvami, opravljenimi 15 min po spiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. Vse vrednosti so predstavljene kot mediane in interkvartilni rangi izmerjenih vrednosti šestih različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini ($n = 6-16$ skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in kontrolo v istem časovnem obdobju. ** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in AtxA(D49S) v istem časovnem obdobju.

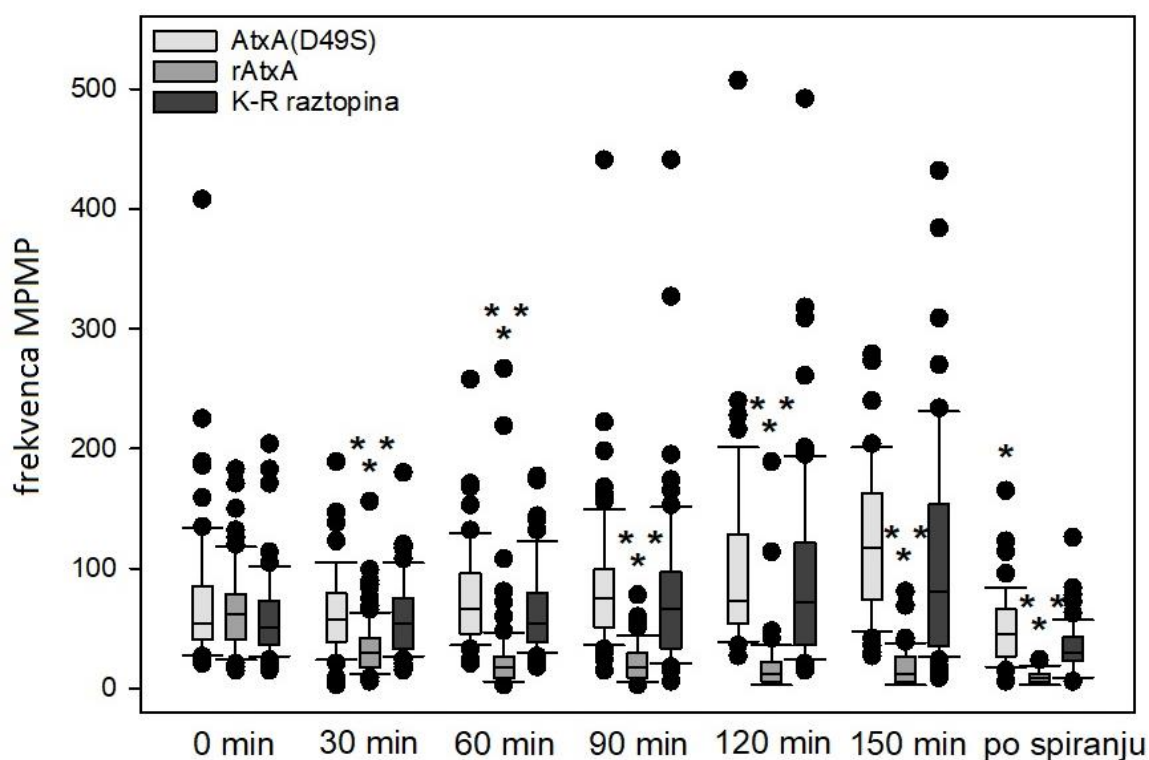
Pri meritvah časa padajoče faze PMP se značilne razlike, čeprav zelo majhne, med proučevanimi skupinami pojavijo že pred aplikacijo učinkovin. Časi padajoče faze pred aplikacijo AtxA(D49S) so bili daljši od časov padajoče faze pred aplikacijo rAtxA (slika 19). Pri AtxA(D49S) in kontroli ni videti opaznih sprememb, pri rAtxA pa se razpolovni časi PMP od 60 min naprej med potekom poskusa opazno daljšajo (slika 19).



Slika 19: Vpliv AtxA(D49S) in rAtxA na razpolovni čas padajoče faze PMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragme miši. Prikazan je vpliv kontrole (K-R raztopina), 0,85 μ M AtxA(D49S) in 0,85 μ M rAtxA na razpolovni čas padajoče faze PMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragme miši v odvisnosti od časa izpostavljenosti (pred aplikacijo, po 30, 60, 90, 120 in 150 min ter po spiranju). Vrednosti po spiranju smo dobili z meritvami, opravljenimi 15 min po spiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. Vse vrednosti so predstavljene kot mediane in interkvartilni rangi izmerjenih vrednosti šestih različnih hemidiafragme miši v poskusni skupini (n = 6–16 skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med AtxA(D49S)/rAtxA in kontrolo v istem časovnem obdobju. ** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in AtxA(D49S) v istem časovnem obdobju.

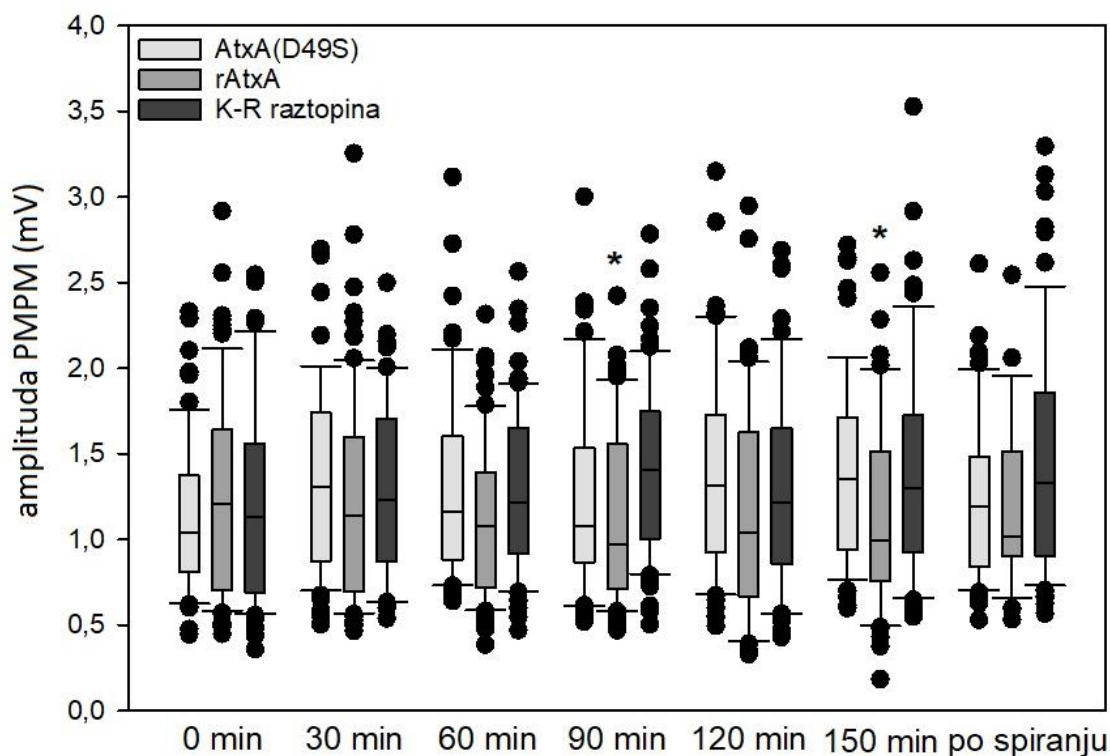
4.3.2 Vpliv rAtxA in AtxA(D49S) na frekvenco, amplitudo in razpolovni čas padajoče faze MPMP

Statistična analiza je pokazala, da mutant AtxA(D49S) ne vpliva značilno na frekvenco MPMP. Med vrednostmi kontrole in AtxA(D49S) ni značilnih razlik, razen na koncu poskusa, po spiranju hemidiafragem s K-R raztopino (slika 20). Frekvenca MPMP je po aplikaciji rAtxA že po 30 min značilno manjša od frekvence pri kontrolnih mišičnih vlaknih in mišičnih vlaknih, izpostavljenih AtxA(D49S). Med poskusom frekvenca MPMP v skupini z rAtxA vidno upada vse do zadnje meritve po spiranju hemidiafragem (slika 20).



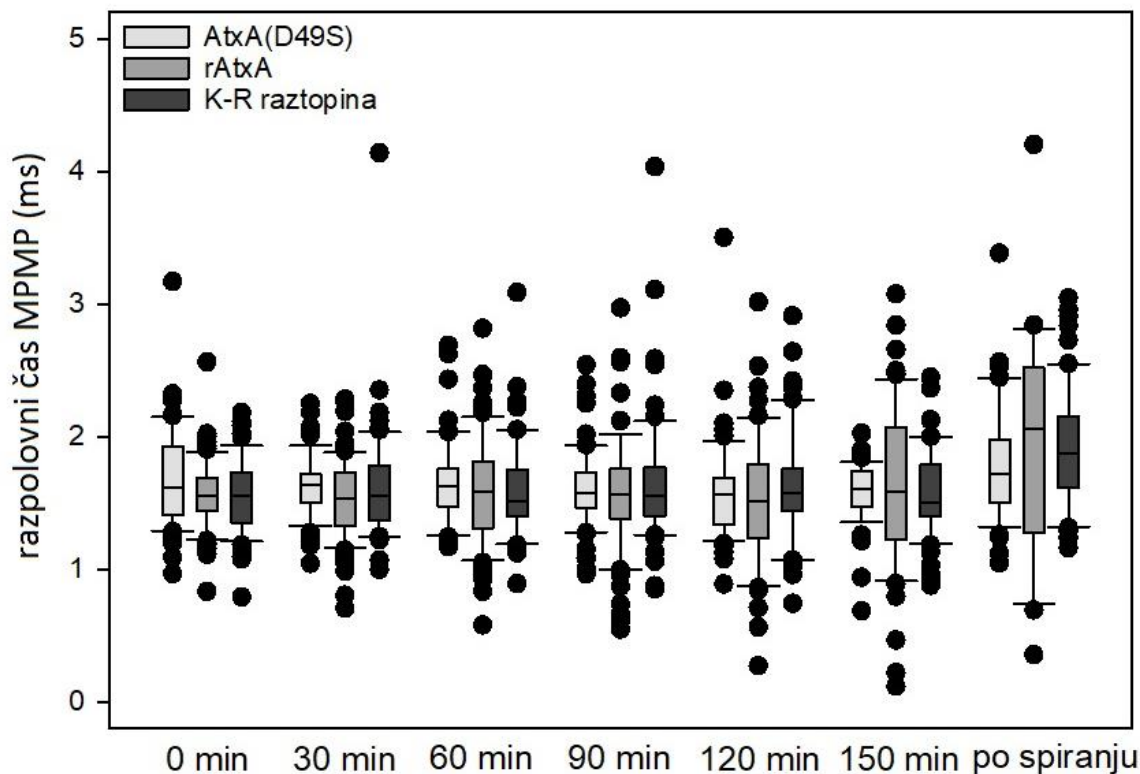
Slika 20: Vpliv AtxA(D49S) in rAtxA na frekvenco MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. Prikazan je vpliv kontrole (K-R raztopina), 0,85 μ M AtxA(D49S) in 0,85 μ M rAtxA na frekvenco MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti od časa izpostavljenosti (pred aplikacijo, po 30, 60, 90, 120 in 150 min ter po spiranju). Vrednosti po spiranju smo dobili z meritvami, opravljenimi 15 min po spiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. Vse vrednosti so predstavljene kot mediane in interkvartilni rangi izmerjenih vrednosti šestih različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini ($n = 6-16$ skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med AtxA(D49S)/rAtxA in kontrolo v istem časovnem obdobju. ** označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in AtxA(D49S) v istem časovnem obdobju.

Pri meritvah amplitud MPMP med 150 minutami snemanja in spiranja nismo ugotovili značilnih razlik med preiskovanimi skupinami, razen razlik med rAtxA in kontrolo po 90 in 150 min. Med rAtxA in AtxA(D49S) teh razlik ni bilo (slika 21).



Slika 21: **Vpliv AtxA(D49S) in rAtxA na amplitudo MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši.** Prikazan je vpliv kontrole (K-R raztopina), 0,85 μ M AtxA(D49S) in 0,85 μ M rAtxA na amplitudo MPMP mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti od časa izpostavljenosti (pred aplikacijo, po 30, 60, 90, 120 in 150 min ter po spiranju). Vrednosti po spiranju smo dobili z meritvami, opravljenimi 15 min po spiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. Vse vrednosti so predstavljene kot mediane in interkvartilni rangi izmerjenih vrednosti šestih različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini ($n = 6-16$ skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme). * označuje statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med rAtxA in kontrolo v istem časovnem obdobju.

Pri meritvah razpolovnih časov MPMP med proučevanimi skupinami znotraj 150 min in po spiranju ni značilnih razlik (slika 22).



Slika 22: Vpliv AtxA(D49S) in rAtxA na razpolovni čas padajoče faze MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši. Prikazan je vpliv kontrole (K-R raztopina), 0,85 μ M AtxA(D49S) in 0,85 μ M rAtxA na razpolovni čas padajoče faze MPMP skeletnih mišičnih vlaken hemidiafragem miši v odvisnosti od časa izpostavljenosti (pred aplikacijo, po 30, 60, 90, 120 in 150 min ter po spiranju). Vrednosti po spiranju smo dobili z meritvami, opravljenimi 15 min po spiranju živčno-mišičnega preparata s K-R raztopino. Vse vrednosti so predstavljene kot mediane in interkvartilni rangi izmerjenih vrednosti šestih različnih hemidiafragem miši v poskusni skupini ($n = 6$ –16 skeletnih mišičnih vlaken vsake hemidiafragme).

5 RAZPRAVA

Sposobnost kataliziranja hidrolize estrske vezi na mestu *sn*-2 v glicerofosfolipidih (aktivnost sPLA₂) je skupna značilnost vseh β -nevrotoksinov (Petan in sod., 2005). Kljub temu je bilo ugotovljeno, da stopnja encimske aktivnosti proteinov in njihove β -nevrotoksičnosti nista vedno neposredno povezani (Paoli in sod., 2009). Za poglobitev razumevanja toksičnega delovanja sPLA₂ in tudi preveritve njihove uporabnosti v zdravstvene namene smo izolirali, renaturirali, očistili in patofiziološko karakterizirali encimsko neaktivni mutant AtxA – AtxA(D49S). Na podlagi izmerjenih učinkov mutanta na živčno-mišičnih preparatih miši smo želeli ugotoviti vlogo encimske aktivnosti pri nevrotoksičnem in miotoksičnem delovanju AtxA. Iz tega bi lahko sklepali o možnosti uporabe AtxA(D49S) v terapevtske namene, in sicer v vlogi antagonista AtxA ali celo telesu lastnih sPLA₂ ob patološko povečanem delovanju teh. Najprej smo izolirali in očistili oba proteina. Iz predhodno pripravljenih raztopin S-sulfoniranega rAtxA in S-sulfoniranega AtxA(D49S) smo v renaturacijskem pufru proteina zvili v naravno obliko ter ju z metodo ultrafiltracije grobo prečistili in skoncentrirali na manjši volumen. S prilagojenimi metodami RP-HPLC smo proteine s pomočjo kolon C3 (slika 5) in C18 (slika 6) dodatno očistili. Z omenjenih slik je razvidno, da je v vzorcih po čiščenju na koloni C18 že izrazito manj primesi kot v vzorcih po čiščenju na koloni C3. Razvidno je tudi, da je bilo selektivno pobiranje frakcij s kolon RP-HPLC učinkovito. To smo potrdili z analizo vzorcev na NaDS PAGE in barvanjem gelov s koloidnim srebrom (sliki 7 in 8) ter z določitvijo masnih spektrov vzorcev (sliki 9 in 10). Oba proteina sta se s kolon RP-HPLC eluirala ob pričakovanih časih in koncentraciji topila B. Na obarvanih gelih so opazne izrazite proteinske lise na območju, ki ustreza masi ~ 14 kDa, kar sovпада z molekulsko maso rAtxA in tudi AtxA(D49S). Geli z vzorci s kolone C3 (slika 7) razkrivajo tudi prisotnost proteinov z drugačnimi masami od tiste, ki je značilna za sPLA₂. To so neidentificirane primesi velikosti ~

25 kDa. Proteinska lisa pri ~28 kDa pa je verjetno dimer rAtxA oziroma AtxA(D49S), saj je znano, da AtxA v pogojih analize NaDS PAGE intenzivno dimerizira. Analiza NaDS PAGE vzorcev po separaciji na koloni C18 (slika 8) kaže daleč najizrazitejše proteinske lise pri ~14 kDa v območju mase zelenih produktov, delež primesi pa je zelo nizek. Masnospektroskopska (MS) analiza očiščenega vzorca rAtxA (slika 9) razkrije molekularni ion z maso 13.776 Da, kar ob upoštevanju standardne napake meritve, ki znaša ± 2 Da, ustreza teoretični masi naravne molekule AtxA, ki znaša 13.775 Da. Tako lahko sklepamo, da smo s pomočjo tehnike rekombinantne DNA uspešno pripravili naravno obliko AtxA (rAtxA). Kot pri analizi NaDS PAGE tudi analiza MS razkriva nizko vsebnost kontaminantov v vzorcu rAtxA, saj so višine drugih ionov v spektru zanemarljivo nizke v primerjavi z vrhom iona, ki izhaja iz rAtxA. Na sliki 10 je prikazan masni spekter molekule z maso 13.746 Da. Pričakovana masa molekule AtxA(D49S) je 13.747 Da, zato lahko sklepamo, da smo s pomočjo bakterij uspeli pripraviti AtxA z želeno mutacijo D49S v aktivnem mestu. Tudi v tem primeru iz MS spektra izhaja, da je stopnja kontaminacije zelenega produkta zanemarljivo nizka.

Izmerjena encimska aktivnost produkta rAtxA je bila praktično enaka tisti, ki jo je izražala pozitivna kontrola – naravni AtxA (~96-odstotna). Naš vzorec rAtxA je bil torej primeren za izvajanje poskusov na mišjem živčno-mišičnem preparatu. V primeru AtxA(D49S) smo sicer izmerili minimalno (~0,4-odstotno) encimsko aktivnost glede na pozitivno kontrolo. Sklepamo, da ta rezidualna encimska aktivnost v vzorcu AtxA(D49S) ne izhaja iz AtxA(D49S), temveč je posledica minimalne kontaminacije z rAtxA, do katere je prišlo med čiščenjem. Kot že omenjeno, so Atx zelo nagnjeni k dimerizaciji in rAtxA bi lahko tvoril dimer tudi z AtxA(D49S). Dodatno čiščenje bi bilo prezahtevno (če ne celo nemogoče), zato smo rezidualno encimsko aktivnost v vzorcu AtxA(D49S) preprosto zanemarili, saj je bila tako nizka v

primerjavi z aktivnostjo rAtxA, da smo presodili, da ne bo vplivala na elektrofiziološke poskuse.

Vpliv AtxA na mišično kontrakcijo so opazovali v številnih raziskavah, ki so vključevale poskuse na živčno-mišičnimi preparatih. Zato so učinki tega β -nevrotoksina dobro opisani. V nekaj minutah po dodatku AtxA v kopel pri 37 °C pride do povečanja amplitude krčenja mišice, nato sledi postopen, zvezen upad posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične kontrakcije vse do popolnega zastoja krčenja mišice. AtxA oziroma rAtxA povzroči tudi dvig MT. Zmanjšanje amplitude posredno izzvane kontrakcije je posledica nevrotoksičnega delovanja rAtxA, upad posredno izzvane kontrakcije pa nakazuje miotoksični učinek (Križaj, 2011; Vardjan in sod., 2013). Rezultati meritev mišičnih kontrakcij po izpostavitvi 0,85 μ M rAtxA sovpadajo z že opisanimi učinki (slika 12). V vseh primerih so bile 150 min po izpostavitvi živčno-mišičnega preparata rAtxA izračunane značilne razlike v merjenih parametrih kontrakcije v primerjavi z rezultati kontrolnih meritev. rAtxA je izrazito, značilno zmanjšal amplitudo krčenja mišice pri posredni in neposredni stimulaciji, pri enostavni in tetanični kontrakciji (slike 13, 14, 15 in 16). Pojavil se je tudi značilen dvig MT, kar nakazuje dvig bazalne tenzije mišice oz. kontrakturo mišic, domnevno zaradi učinkov rAtxA na mišico. Moč krčenja mišice se ni izboljšala niti 15 min po spiranju membran s K-R raztopino. Prav tako je vztrajala kontraktura mišice. Relativna stopnja blokade mišične kontrakcije je med poskusi variirala in je znašala $70,5 \pm 4,5$ -odstotka.

Na drugi strani 0,85 μ M AtxA(D49S) na živčno-mišični prenos in krčenje mišice ni imelo značilnega učinka. 150 min po izpostavitvi živčno-mišičnega preparata AtxA(D49S) je amplituda pri enaki koncentraciji posredno in neposredno izzvane enostavne in tetanične kontrakcije ostala nespremenjena (slike 13, 14, 15 in 16) oziroma je amplituda kontrakcij ostala enaka kot pri kontrolnem poskusu. Tudi 15 min po spiranju nismo opazili razlik med testnim

poskusom z AtxA(D49S) in kontrolnim poskusom s K-R raztopino. Pri vseh vrstah meritev z AtxA(D49S) pa je bil rezultat, kot smo napovedali v hipotezah, značilno drugačen od rezultatov, pridobljenih z rAtxA. Ker je glavna razlika med rAtxA in mutantom AtxA(D49S) ta, da je AtxA(D49S) encimsko neaktiven, odsotnost učinka na mišično kontrakcijo v primeru AtxA(D49S) razkriva, da je fosfolipazna aktivnost zelo pomembna za toksično delovanje rAtxA. Brez encimske aktivnosti mutant AtxA(D49S) kljub 99,2-odstotni identičnosti aminokislinskega zaporedja z rAtxA toksično ne učinkuje na živčno-mišični preparat miši.

Raziskav vpliva rAtxA na membranske potenciale mišičnih vlaken v motorični ploščici v širšem obsegu še ni bilo. Dokazano je bilo presinaptično nevrotoksično delovanje AtxA, ki posredno zavre zlivanje veziklov, napolnjenih z nevrotoksinom ACh, s presinaptično membrano živčnega končiča (Matiazzi in sod, 2012). Zato smo pričakovali, da bo po dodatku rAtxA živčno-mišičnemu preparatu najverjetneje prišlo do upada amplitude PMP ter zmanjšanja frekvence in amplitude MPMP. Predvidevanja smo potrdili, saj je amplituda PMP 60 min po izpostavitvi preparata rAtxA začela izrazito padati (slika 18). Zmanjševanje amplitude PMP se ni ustavilo vse do konca poskusa. Enak rezultat smo dobili v primeru opazovanja frekvence MPMP, ki je od 30 min po dodatku rAtxA in do konca poskusa upadala, vse do točke, na kateri smo lahko izmerili le še posamezne MPMP (slika 20). Kljub pričakovanjem so bile pri amplitudi MPMP značilne razlike s kontrolo dokazane le po 150 min in 15 min po spiranju preparata s K-R raztopino (slika 21). To kaže, da se amplituda potencialov ni spremenila kljub zmanjšanemu izločanju ACh iz presinaptičnih živčnih končičev (ki se izraža v zmanjšani frekvenci MPMP), če vseeno pride do sprožitve MPMP. Padec amplitude PMP bi lahko bil tudi posledica znižanja rV_m , ki se je prav tako pojavilo po 60 min in se je progresivno nepovratno nadaljevalo vse do konca poskusa (slika 17). Padec mirujočega membranskega potenciala nakazuje tudi posinaptični učinek rAtxA, ki ga bo še treba raziskati. Mogoče bi bilo,

da rAtxA s svojo fosfolipazno aktivnostjo ali drugače poškoduje sarkolemo mišičnega vlakna, povzroči prehod kationov v celico in posledično znižanje rV_m . Lahko pa, da rAtxA zavre delovanje Na^+/K^+ -črpalke ter tako onemogoči aktivno izmenjavo ionov in ponovno vzpostavitev rV_m (Pivovarov in sod., 2018). S padanjem membranskega potenciala se torej vse bolj znižuje amplituda PMP, hkrati pa je tudi vse težje doseči potencial, pri katerem sploh lahko pride do proženja AP in posledično nastanka PMP. Najverjetneje so tudi podaljšani razpolovni časi padajoče faze PMP od 60 min po aplikaciji rAtxA naprej (slika 19) posledica padca rV_m , kar še dodatno podpira domnevo o poškodbi sarkoleme mišičnih vlaken in posinaptični toksičnosti rAtxA. Za dokončno ugotovitev mehanizma posinaptične toksičnosti in načina poškodbe membrane bi bilo treba opraviti nadaljnje raziskave. V primerjavi s kontrolo rAtxA tako kot pri amplitudah MPMP ni značilno vplival na časovni potek razpolovnega časa padajoče faze MPMP (slika 22). Iz tega lahko sklepamo, da padec rV_m in zmanjšano presinaptično izločanje veziklov ACh ne vplivata niti na amplitudo niti na razpolovni čas padajoče faze MPMP. Iz rezultatov je razvidno tudi, da se presinaptični toksični učinki rAtxA pojavijo prej (po 30 min) kot posinaptični (po 60 min).

AtxA(D49S) ni vplival na razpolovni čas padajoče faze PMP oziroma ni izzval nobenih učinkov, pri katerih bi se pojavile značilne razlike s kontrolnim poskusom. Odstopanja od kontrole smo opazili samo pred aplikacijo in v prvih 30 min (slika 19). Omenjena izstopajoča rezultata sta najverjetneje posledica variabilnosti meritev bioloških poskusov. V večini primerov, v katerih so se pojavile značilne razlike med rAtxA in kontrolo, so bile izračunane tudi značilne razlike med rAtxA in Atx(D49S9).

Na osnovi pridobljenih rezultatov lahko torej sklepamo, da mutant AtxA(D49S) ni imel niti presinaptičnih niti posinaptičnih toksičnih učinkov na mišjem živčno-mišičnem preparatu, karakterističnih za rAtxA. Odsotnost toksičnih lastnosti je lahko samo posledica zavrte

encimske aktivnosti. Naši rezultati tako potrjujejo sklepe Petana in sod., da je encimska aktivnost eden od ključnih dejavnikov nevrotoksičnosti pri AtxA in podobnih β -nevrotoksinih in tudi za miotoksičnost proteinov, ki smo jo opisali v nalogi (Petan in sod., 2007).

Dejstvo, da AtxA(D49S) nima škodljivih učinkov na funkcijo živčno-mišičnega preparata nakazuje možnost oziroma potencial za uporabo v terapevtske namene. β -nevrotoksičnost je prek receptorjev posredovana aktivnost (Ivanušec in sod., 2022). Ker se AtxA(D49S) veže na iste receptorje kot rAtxA in nekateri drugi β -nevrotoksini, bi lahko služil kot antagonist za izpodrivanje teh škodljivih molekul z njihovih tkivnih receptorjev po zastrupitvi zaradi ugriza modrasa. Potencialno bi se lahko uporabil tudi za zaviranje čezmernega delovanja podobnih endogenih sPLA₂ v primeru nekaterih bolezni, npr. Alzheimerjeve. Naša raziskava je torej dobro izhodišče za načrtovanje poskusov v omenjenih smereh.

6 SKLEPI

1. S tehniko rekombinantne DNA smo s pomočjo bakterije *E. coli* uspeli pripraviti ustrezno zvita proteina, rekombinantni amoditoksin A (rAtxA) in mutant AtxA(D49S), pri katerem je bila potrjena odsotnost encimske aktivnosti.
2. Mutant AtxA(D49S) ni vplival na amplitudo posredno in neposredno izzvanih mišičnih kontrakcij živčno-mišičnega preparata hemidiafragme miši.
3. Mutant AtxA(D49S) ni vplival na amplitudo in pojavnost MPMP niti na amplitudo PMP pri električni stimulaciji živca v živčno-mišičnem preparatu miši.
4. Elektrofiziološke meritve so na živčno-mišičnem preparatu miši nakazale tudi miotoksično aktivnost rATXA.
5. Encimska aktivnost je pomembna za nevrotoksični in miotoksični učinek rAtxA, kar smo potrdili v poskusih z encimsko neaktivno mutanto AtxA(D49S) na živčno-mišičnem preparatu miši.

7 POVZETEK

Amoditoksin A, β -nevrotoksin iz strupa modrasa (*Vipera ammodytes ammodytes*), ki ga uvrščamo v družino sekretornih fosfolipaz A₂, je že več let zanimivo izhodišče za raziskave. Eno od glavnih vprašanj, ki se pojavljajo ob raziskovanju njegovih učinkov, je, kakšno vlogo ima pri tem encimska aktivnost. Da bi odgovorili na to vprašanje, smo pripravili ter biokemično in patofiziološko karakterizirali encimsko aktivni AtxA (rAtxA) in njegovo encimsko neaktivno različico AtxA(D49S). V poskusih smo ju primerjali in iz rezultatov sklepali o pomenu encimske aktivnosti.

Oba proteina smo pripravili s tehniko rekombinantne DNA in ju renaturirali v pravilno terciarno strukturo. Renaturacijski mešanici smo skoncentrirali in prečistili z ultrafiltracijo in nanosom na kolone HPLC. Čistost vzorcev smo dodatno preverili z NaDS-PAGE in masno spektrometrijo. S pirensko metodo po Radvanyiju smo za rAtxA dokazali encimsko aktivnost, medtem ko pri AtxA(D49S) encimske aktivnosti nismo ugotovili.

Na živčno-mišičnih preparatih smo izvedli meritve izometrične kontrakcije mišičnih vlaken mišjih hemidiafragem v prisotnosti rAtxA in AtxA(D49S). Merili smo vpliv na posredno (prek preponskega živca) in neposredno izzvano enostavno in tetanično mišično kontrakcijo. Rezultati meritev poskusov z rAtxA so sovpadali z opisanimi v literaturi. Po aplikaciji rAtxA je najprej prišlo do povečanja amplitude krčenja mišice, nato do strmega upada krčenja in vse do popolne zavore kontrakcije. Prizadeti sta bili posredno in neposredno izzvana kontrakcija, kar kaže, da rAtxA ne učinkuje samo nevrotoksično, temveč tudi miotoksično. Učinki so bili vidni pri enostavnih in tetaničnih kontrakcijah. Pri AtxA(D49S) ni bilo značilnih odstopanj od kontrolnih meritev s K-R raztopino, izmerjen ni bil noben vpliv na prenos živčno-mišičnih dražljajev ali na sposobnost krčenja mišice. To potrjuje domnevo, da je encimska aktivnost ključna za toksično delovanje rAtxA.

Pri merjenju drugega seta poskusov na živčno-mišičnih preparatih smo se osredotočili na vpliv rAtxA in AtxA(D49S) na amplitudo in razpolovne čase padajoče faze PMP, vrednost rV_m in frekvence pojavljanja MPMP. rAtxA je povzročil značilno znižanje amplitude PMP in podaljšanje njihovih razpolovnih časov njegove padajoče faze, zmanjšanje frekvence MPMP in znižanje rV_m , medtem ko ni vplival na amplitudo in razpolovni čas padajoče faze MPMP. Zmanjšana frekvenca MPMP je najverjetneje posledica presinaptičnega delovanja rAtxA, zmanjšana amplituda PMP posledica kombinacije presinaptičnega in posinaptičnega delovanja rAtxA, znižan rV_m in podaljšan razpolovni čas padajoče faze PMP pa posledica posinaptične toksičnosti. Medtem ko so mehanizmi presinaptične nevrotoksičnosti rAtxA že bolje raziskani, je natančno načelo posinaptičnega učinkovanja rAtxA za zdaj še skrivnost. Najverjetnejša teorija je, da rAtxA povzroči poškodbo celične membrane živčnih vlaken in posledični vdor kationov v celice, kar se izraža v padcu rV_m . To bi pojasnilo tudi miotoksične učinke pri meritvah mišične kontrakcije. Druga teorija je, da rAtxA ovira normalno delovanje Na^+/K^+ -črpalke ter s tem onemogoči aktivno prečrpavanje ionov čez membrano in vzpostavitev normalnega rV_m . AtxA(D49S) pri meritvah vpliva na membranske potenciale ni imel značilnih odstopanj od kontrole, kot je bilo pričakovano, pa so se na prej omenjenih področjih pojavile značilne razlike z učinki rAtxA. Na osnovi tega sklepamo, da je prav encimska aktivnost ključna za nevrotoksično delovanje rAtxA.

Encimsko neaktivni AtxA(D49S) bi se lahko v zdravstvu potencialno uporabili kot antagonist AtxA. V primeru zastrupitve z modrasovim strupom bi lahko z AtxA(D49S) izpodrivali AtxA z njegovih vezavnih mest v živčno-mišičnem stiku in tako omilili ali v celoti preprečili nastop nevroloških kliničnih znakov. Nujno pa bi bilo za boljšo oceno varnosti in uporabnosti AtxA(D49S) treba izvesti nadaljnje raziskave afinitete vezave na receptorje ter *in vivo* poskuse toksičnosti in stranskih učinkov.

8 SUMMARY

AtxA, a β -neurotoxin from the venom of a long-nosed viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) belonging to the family of sPLA₂, is an intriguing starting point for many research projects. There are many questions regarding the effects of AtxA, and one uncertainty is to what extent enzymatic activity influences β -neurotoxicity. To answer this question, we isolated and pathophysiologically characterized enzymatically active AtxA (rAtxA) and its enzymatically inactive mutant AtxA (D49S). We compared their effects in experiments, analysed the results and drew conclusions about the role of enzymatic activity in AtxA toxicity.

We isolated both enzymes using recombinant DNA technology and renatured the enzymes into the correct tertiary form. We performed ultrafiltration and purified the samples using RT-HPLC. We checked for contaminants by analysing the samples with SDS PAGE and mass spectrometry. Using the Radvany pyrene method, we demonstrated the enzymatic activity of rAtxA and the lack of activity in AtxA(D49S).

We measured the effect of rAtxA and AtxA(D49S) on the isometric contraction of muscle fibres in mouse hemidiaphragms. We focused on measuring the effects on indirect (through the phrenic nerve) and direct simple and tetanic muscular contractions. The expected results were obtained with the rAtxA application. After applying rAtxA, the amplitude of contraction first increased but then started to steadily decrease until muscle contraction was entirely inhibited. Both indirectly and directly stimulated contractions were affected, which indicates that rAtxA exhibits myotoxic and neurotoxic activity. The descending effects appeared in simple and tetanic contractions. AtxA(D49S) did not result in any significant differences from the control experiments with K-R solution. We did not detect any influence on the transmission of neuromuscular stimuli or muscle contraction. Thus, we confirmed that enzymatic activity plays an instrumental role in the toxicity of rAtxA.

The aim of other experiments on neuromuscular tissues was to determine the effect of rAtxA and AtxA(D49S) on the amplitudes, half decay times and frequencies of appearance of different types of membrane potentials. rAtxA significantly decreased the amplitude of end plate potentials (EPPs) and elongated their half-decay times. It also caused a decrease in the frequency of miniature EPP (MEPP) appearances and caused an increase in rV_m . The amplitude and half-decay times of MEPPs were unaffected by rAtxA. The decrease in the frequency of MEPPs is probably due to the presynaptic activity of rAtxA, the decreased amplitude of EPPs is the result of combined presynaptic and postsynaptic toxicity, and the increased rV_m and elongated EPP half-decay times are consequences of postsynaptic effects. While the mechanisms of the presynaptic activity of rAtxA are well researched, the mechanisms of postsynaptic toxicity remain unclear. A more probable explanation might be that rAtxA damages the cell membranes of nerve fibres and causes an influx of cations into the cell, resulting in a higher rV_m . This theory would also explain the myotoxic effects registered in experiments with isometric muscle contractions. Another explanation might be that rAtxA obstructs the normal functioning of $Na^+/K^+ - ATPase$ and thus disables the mechanisms responsible for maintaining a normal rV_m . AtxA(D49S) did not cause any significant effects on membrane potentials and did not significantly differ from control experiments. However, as expected, significant differences were observed from the results of rAtxA. This finding supports the conclusion that enzymatic activity plays an integral role in the neurotoxicity of rAtxA.

The enzymatically inactive AtxA(D49S) has a great potential for medical applications. It could be used as an antagonist to AtxA in cases of envenomation with long-nosed viper venom. By supplanting AtxA from its target receptors in neuromuscular junctions, AtxA could limit or entirely prevent the onset of neurological clinical signs. Despite very promising results, we need

to perform further studies of receptor affinity and *in vivo* experiments to better determine the safety and usefulness of AtxA(D49S).

9 ZAHVALE¹

Mentorju prof. dr. Robertu Frangežu in somentorju prof. dr. Igorju Križaju bi se rada zahvalila za ponujeno priložnost, predano znanje, strokovne nasvete in usmerjanje pri pisanju naloge.

Za neskončno potrpežljivost in zdravo dozo črnega humorja se zahvaljujem delovnim mentorjema Adrijanu Ivanušcu in doc. dr. Moniki C. Žužek. Poleg znanja in pomoči sta mi vseskozi nudila tudi moralno podporo. Iskreno lahko rečem, da mi brez vaju ne bi uspelo dokončati tega maratona. Adrijan, hvala za vse situacije in nezgode v laboratoriju, na katere si se raje odzval s smehom kot pa z jezo in frustracijo, in hvala, da si v vseh teh letih s skoraj bratsko skrbnostjo pazil name. Če bom še kdaj imela težave z ultrafiltracijo, vem, koga poklicati. Dr. Žužek, hvala za vse dneve, mesece, ki ste jih z mano preždeli v laboratoriju, hvala za vsak siv las, ki mi je bil prihranjen zaradi vas. Hvala, da ste bili iskreni, razumevajoči, človeški. Zame boste vedno največja Excel mojstrica in Monty Python bo do konca življenja ostal najina himna.

Kity Požek in Tadeji Bele bi se rada zahvalila za 101 nasvet pri delu s HPLC in geli za elektroforezo. Brez vaju bi bili dnevi, preživeti za to nesrečno napravo, veliko turobnejši, reševanje zapletov pri laboratorijskem delu pa neprimerljivo težje. Hvala tudi Tomažu Trobcu za dobro voljo, dobro družbo, najrazličnejše posvete in vse razrešene tehnične težave.

Za številne tehnične nasvete, druga mnenja in vsesplošno pripravljenost pomagati vsaki izgubljeni duši bi se rada zahvalila dr. Jerneju Šribarju z Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti Instituta »Jožef Stefan«. S svojo prijaznostjo ste mi vedno znova polepšali dan.

¹ Na željo avtorice v zahvalah niso upoštevani slogovni jezikovni popravki.

Hvala dr. Dušanu Žigonu iz Centra za masno spektroskopijo Instituta »Jožef Stefan« za izvedene analize vzorcev.

Stanka Ujc in Slavica Sekulić sta skrbno pregledali seznam literature, za kar se jima lepo zahvaljujem. Hvala tudi mag. Giti Greccs-Smole.

Za pregled in korekcijo angleškega Izvlečka (Abstract) in Povzetka (Summary) se zahvaljujem organizaciji American Journal Experts. Za lektoriranje naloge bi se rada zahvalila dr. Nini Novak Kerbler.

Najlepša hvala partnerju Tjašu Cveku. Čeprav pri nastanku naloge nisi bil neposredno vpleten, ti gre veliko zaslug za to, da je ta naloga danes ugledala luč sveta. Hkrati si bil moj zaupnik, strokovni svetovalec, navijač in negovalec, ko se zaradi zasedenosti nisem spomnila niti jesti. Z mano si delil vso navdušenje, vse vzpone in vse padce. Ne bi si mogla želeli boljšega partnerja.

10 LITERATURA

Ali HH, Savarese JJ. Monitoring of neuromuscular function. *Anesthesiology* 1976; 45(2): 216–49.

Bittner EA, Martyn JAJ. Neuromuscular physiology and pharmacology. In: Hemmings HC, Egan TD, eds. 2nd ed. *Pharmacology and physiology for anesthesia: foundations and clinical application*. Philadelphia : Elsevier, 2019: 413–4.

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(1): 293–304.

Chang CC, Hong SJ, Lin HL, Su MJ. Acetylcholine hydrolysis during neuromuscular transmission in the synaptic cleft of skeletal muscle of mouse and chick. *Neuropharmacology* 1985; 24(6): 533–9.

Connolly S, Trevett AJ, Nwokolo NC, et al. Neuromuscular effects of Papuan Taipan snake venom. *Ann Neurol* 1995; 38(6): 916–20.

Davidson FF, Dennis EA. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. *J Mol Evol* 1990; 31(3): 228–38.

Dennis EA, Cao J, Hsu Y, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* 2011; 111(10): 6130–85.

Ghai B, Makkar JK, Wig J. Neuromuscular monitoring: a review. *J Anaesth Clin Pharmacol* 2006; 22(4): 347–56.

Grenc D. Ugrizi strupenih kač. *Med Razgl* 2009; 48(1/2): 145–51.

Gubenšek 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

Hall ZW, Sanes JR. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell* 1993; 72(suppl): 99–121.

Halassy B, Habjanec L, Bališa ML, 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(4): 455–60.

Hawgood B, Bon C. Snake venom presynaptic toxins. In: Tu AT, ed. *Handbook of natural toxins: reptile venoms and toxins*. Vol. 5. New York : Marcel Dekker, 1991: 3–52.

Ivanušec A. Priprava mutant amoditoksina a za ultrastrukturno lokalizacijo v mitohondriju. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2017. Magistrska naloga

Ivanušec A, Šribar J, Veranič P, Križaj I. The phospholipase activity of ammodytotoxin, a prototype snake venom-neurotoxin, is not obligatory for cell internalisation and translocation to mitochondria. *Toxins* 2022; 14(6): 375. (11str.)

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. Amsterdam : Elsevier, 2019: 291–303.

Kini RM. *Venom phospholipase A2 Enzymes: structure, function and mechanism*. Chichester, New York : John Wiley 1997: 1–28.

Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 2003; 42(8): 827–40.

Kovačič L, Novinec M, Petan T, Baici A, Križaj I. Calmodulin is a nonessential activator of secretory phospholipase A2. *Biochemistry* 2009; 48(47): 11319–28.

Križaj I. Ammodytotoxin: a window into understanding presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2 and more. *Toxicon* 2011; 58(3): 219–29.

Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68/69: 3–58.

Katz B, Thesleff S. A study of the 'desensitization' produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* 1957; 138: 63–80.

Lambeau G, Lazdunski M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20(4): 162–70.

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

Lukšić B, Bradarić N, Prgomet S. Venomous snakebites in southern Croatia. *Coll Antropol* 2006; 30(1): 191–7.

Matthews GG. *Cellular physiology of nerve and muscle*. 4th ed. Oxford : Blackwell publishing, 2003: 110–29.

Mentis GZ. The Spinal and Peripheral Motor System. In: Squire LR, Berg D, Bloom FE, du Lac S, Ghosh A, Spitzer NC, eds. *Fundamental Neuroscience*. 4th ed. Amsterdam : Elsevier, 2013: 613–30.

Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K. Recent progress in phospholipase A2 research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res* 2011; 50(2): 152–92.

Oberčkal J. Identifikacija vezavnih proteinov za amoditoksin C v sesalskih nevronskih celicah. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2010. Diplomsko delo

Prasarnpun S, Walsh J, Awad SS, Harris JB. Envenoming bites by kraits: the biological basis of treatment-resistant neuromuscular paralysis. *Brain* 2005; 128(12): 2987–96.

Prasarnpun S, Walsh J, Harris JB. Beta-bungarotoxin-induced depletion of synaptic vesicles at the mammalian neuromuscular junction. *Neuropharmacology* 2004; 47(2): 304–14.

Petan T, Križaj I, Pungerčar J. Restoration of enzymatic activity in a Ser-49 phospholipase A2 homologue decreases its Ca(2+)-independent membrane-damaging activity and increases its toxicity. *Biochemistry* 2007; 46(44): 12795–809.

Pivovarov AS, Calahorra F, Walker RJ. Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invert Neurosci* 2018; 19(1): e1. (16 str.) doi: 10.1007/s10158-018-0221-7.

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(10): 1425–33.

Pungerčar J, Žnidaršič PP, Petan T. Structure-function relationship studies of ammodytoxins and ammodytins by protein engineering. *Acta Chim Slov* 2011; 58(4): 660–70.

Radonić V, Budimir D, Bradarić N, Lukšić B, Sapunar D, Vilović K. Envenomation by the horned viper (*Vipera ammodytes* L.). *Mil Med* 1997; 162(3): 179–82.

Radvanyi F, Jordan L, Russo-Marie F, Bon C. A sensitive and continuous fluorometric assay for phospholipase A₂ using pyrene-labeled phospholipids in the presence of serum albumin. *Anal Biochem* 1989; 177(1): 103–9.

Rossier MF. T channels and steroid biosynthesis: in search of a link with mitochondria. *Cell Calcium* 2006; 40(2): 155–64.

Saul FA, Žnidaršič PP, Normand VB, et al. Comparative structural studies of two natural isoforms of ammodytoxin, phospholipases A2 from *Vipera ammodytes ammodytes* which differ in neurotoxicity and anticoagulant activity. *J Struct Biol* 2010; 169(3): 360–9.

Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761(1): 1246–59.

Suszkiewicz JB. Synaptic Transmission, In: Sperelakis N, ed. *Cell physiology source book*. 1st ed. Amsterdam : Elsevier, 1995: 442–63.

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(16): 12493–6.

Šribar J, Križaj I. Secreted phospholipases A2 – not just enzymes. *Acta Chim Slov* 2011; 58(4): 678–88.

Šribar J, Oberčkal J, Križaj I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2: an update. *Toxicon* 2014; 89: 9–16.

Tatulian SA. Toward understanding interfacial activation of secretory phospholipase A2 (PLA2): membrane surface properties and membrane-induced structural changes in the enzyme contribute synergistically to PLA2 activation. *Biophys J* 2001; 80(2): 789–800.

Webb WG. *Neurology for the speech-language pathologist*. 6th ed. Amsterdam : Elsevier, 2017: 110–39.

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

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

Winget JM, Pan YH, Bahnson BJ. The interfacial binding surface of phospholipase A2s. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761(11): 1260–9.