

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**VPLIV OSTREOLIZINA NA ZNOTRAJCELIČNO
KONCENTRACIJO Ca^{2+} IN MORFOLOGIJO
NEVROBLASTOMSKIH IN GLADKIH MIŠIČNIH
CELIC**

**THE EFFECT OF OSTREOLYSIN ON
INTRACELLULAR CONCENTRATION OF Ca^{2+} AND
THE MORPHOLOGY OF THE NEUROBLASTOMA
AND SMOOTH MUSCLE CELLS**

Babnik Monika

Diaci Uroš

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 577.112:582.284.5:576.314:612.014.46(043.2)

**VPLIV OSTREOLIZINA NA ZNOTRAJCELIČNO
KONCENTRACIJO Ca^{2+} IN MORFOLOGIJO
NEUROBLASTOMSKIH IN GLADKIH MIŠIČNIH
CELIC**

**THE EFFECT OF OSTREOLYSIN ON
INTRACELLULAR CONCENTRATION OF Ca^{2+} AND
THE MORPHOLOGY OF THE NEUROBLASTOMA
AND SMOOTH MUSCLE CELLS**

Babnik Monika

Diacci Uroš

Delo je pripravljeno v skladu s pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvom prof. dr. Roberta Frangeža in somentorstvom prof. dr. Milke Vrecl na Inštitutu za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo in Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani v okviru raziskovalnega programa P4-0053 ter na Katedri za biokemijo Oddeleka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2014

POVZETEK

Ključne besede: glivični proteini – toksičnost; ostrigar – metabolizem; proteini litičnega kompleksa; celična membrana, propustnost; kalcij – metabolizem; celične linije - analize

Proteina ostreolizin A (15 kDa) in pleurotolizin B (59 kDa), izolirana iz gobe bukov ostrigar, oblikujeta citolitični kompleks OlyA/PlyB, ki ima toksične kardiorespiratorne učinke *in vivo*. Z nalogo smo želeli ugotoviti učinke in mehanizme toksičnega delovanja OlyA/PlyB na ravni celic *in vitro*. S konfokalno mikroskopijo smo pri nevroblastomskih celicah NG108-15 ugotovili, da kompleks OlyA/PlyB v koncentracijah od 42 nM/4,7 nM do 70 nM/7,8 nM povzroči celični edem in oblikovanje membranskih mehurčkov. Nastanek edema prepreči ekvimolarna zamenjava Na^+ in Cl^- v mediju s saharozo ali Na-izetionatom, zato sklepamo, da je za njegov nastanek ključen prehod Cl^- v celico. K nastanku celičnega edema delno prispeva tudi $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjevalec (NCX), saj je v mediju brez Ca^{2+} ali prisotnosti benzamila, zaviralca NCX, celični edem manjši. Fluorometrične meritve so pokazale, da OlyA/PlyB izzove povečano koncentracijo Ca^{2+} v citosolu NG108-15 in gladkomišičnih celicah A10. Mejna koncentracija OlyA/PlyB, ki povzroči značilni porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v celicah NG108-15, je ≈ 15 -krat višja (700 nM/78 nM) kot tista, ki privede do nastanka celičnega edema, medtem ko za porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v celicah A10 zadostuje že 14 nM/1,56 nM koncentracija OlyA/PlyB. V obeh celičnih linijah je za porast odgovoren vdor zunajceličnega Ca^{2+} v celice, saj v mediju brez Ca^{2+} OlyA/PlyB ne izzove povišanja $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Maksimalni porasti $[\text{Ca}^{2+}]_i$, spodbujeni z OlyA/PlyB, so bili v prisotnosti benzamila ali zamenjavi Na^+ in Cl^- z N-metil-D-glukaminom ali saharozo značilno nižji, kar kaže na pomembno vlogo NCX pri porastu $[\text{Ca}^{2+}]_i$. V celicah A10 k porastu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ prispeva tudi sproščanje znotrajceličnih zalog Ca^{2+} , kar ne velja za celice NG108-15, saj je pri njih v prisotnosti tapsigargina (TG) amplituda porasta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nespremenjena. Pri celicah A10 ugotavljamo še značilno nižje poraste $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po izpostavitvi celic lantanovemu kloridu (LaCl_3) in verapamilu, kar kaže, da k maksimalnim porastom $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v gladkomišičnih celicah pomembno prispeva tudi prehod Ca^{2+} skozi L-tip kalcijevih kanalčkov in neselektivne kalcijeve kanalčke. Ugotovljeni morfološki učinki in razjasnitev mehanizmov delovanja na celični ravni pomembno prispevajo k razumevanju toksičnih kardiorespiratornih učinkov proteinskega kompleksa OlyA/PlyB *in vivo*.

SUMMARY

Key words: Fungal proteins – toxicity; Pleurotus – metabolism; complement membrane attack complex; cell membrane permeability; calcium – metabolism; cell line - analysis

Proteins ostreolysin A (15 kDa) and pleurotolysin B (59 kDa), isolated from the oyster mushroom, form cytolytic complex OlyA/PlyB with toxic cardiorespiratory effects *in vivo*. The aim of this study was to assess effects and mechanisms underlying its toxic action by *in vitro* cellular approach. Confocal microscopy revealed that concentrations of OlyA/PlyB ranging from 42 nM/4.6 nM to 70 nM/7.6 nM induced neuroblastoma NG108-15 cell swelling and plasma membrane bleb formation. Iso-osmotic replacement of NaCl by sucrose or Na-isethionate prevented NG108-15 cell swelling, suggesting that the swelling resulted from Cl^- influx. Extracellular Ca^{2+} moderately contributed to the swelling because benzamil, an $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) inhibitor, and Ca^{2+} -free medium partially prevented this response. Fluorometric measurements showed that OlyA/PlyB increased intracellular Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activity in NG108-15 and A10 smooth muscle cells. Approximately 15-fold more OlyA/PlyB (700/78 nM) was needed to increase the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ compared with the amount that induced NG108-15 swelling, while in A10 cells considerably lower concentration (14 nM/1.56 nM) of OlyA/PlyB was sufficient to increase the $[\text{Ca}^{2+}]_i$. In both cell lines $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase was dependent on Ca^{2+} influx because the OlyA/PlyB-mediated effect was absent in Ca^{2+} -free medium. The presence of benzamil or replacement of Na^+ and Cl^- by N-methyl-D-glucamine or sucrose significantly reduced OlyA/PlyB-mediated rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ thus providing further evidence for a role of the NCX. In A10 cells release of Ca^{2+} from internal stores also contributed to the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise, while this was not the case in NG108-15 cells in which the amplitude of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was unaffected by addition of thapsigargin (TG). In A10 cells, lanthanum(III) chloride (LaCl_3) and verapamil significantly reduced OlyA/PlyB-induced increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indicating that in smooth muscle cells Ca^{2+} influx through the L-type and non-selective Ca^{2+} channels substantially contributed to the maximal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. The described morphological effects and the underlying cellular mechanisms responsible for these observations are important steps towards understanding the toxic cardiorespiratory effects of the OlyA/PlyB protein complex *in vivo*.

RAZLAGA KRATIC

$[\text{Ca}^{2+}]_i$	koncentracija Ca^{2+} v citosolu
CHO	ovarijske celice kitajskega hrčka
cAMP	ciklični adenosinmonofosfat (angl. cyclic adenosine monophosphate)
Ca^{2+} ATP-aza	kalcijeva črpalka
$^{\circ}\text{C}$	stopinja celzija
DMSO	dimetilsulfoksid (okrajšano iz angl. dimethyl sulfoxide)
EGTA	etilenglikoltetraocetna kislina (angl. ethyleneglycoltetraacetic acid)
EKG	elektrokardiogram
ER	endoplazemski retikulum
F_{340}	intenziteta fluorescence pri ekscitaciji pri 340 nm
F_{380}	intenziteta fluorescence pri ekscitaciji pri 380 nm
FTIR	po Fourieru transformirana infrardeča spektroskopija
h	ura
Hol	holesterol
IP-3-R	inozitol 1,4,5-trifosfatni receptor
kDa	kilodalton
kg	kilogram
LaCl_3	lantanov klorid
Ld	tekoča neurejena faza
Lo	tekoča urejena faza
MACPF	proteinska domena, definirana na podlagi podobnosti v zaporedju s proteini imunskega sistema, tj. proteini litičnega kompleksa (angl. membrane attack complex, MAC) in perforinom (PFN)
$\text{mNa}^+/\text{Ca}^{2+}$	mitohondrijski natrij-kalcijev izmenjevalec
ml	mililiter
mM	milimolaren
Na^+/K^+ -ATPaza	natrij-kalijeva črpalka

NCX	$3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjevalec
nm	nanometer
nM	nanomolaren
OlyA/PlyB	ostreolizin (mešanica ostreolizina A in pleurotolizina B)
PBS	fosfatni pufer s soljo (angl. p hosphate b uffered s aline)
RyR	rianodinski receptor
s	sekunda
SE	standardni odklon
SM	sfingomielin
SR	sarkoplazemski retikulum
TBC3214	selektivni zaviralec endotelinskega A receptorja
TG	tapsigargin
t.m.	telesna masa
μg	mikrogram
μl	mikroliter
μm	mikrometer
μM	mikromolaren

KAZALO

POVZETEK	i
SUMMARY	ii
RAZLAGA KRATIC	iii
KAZALO	v
1 UVOD.....	1
1.1 Ostreolizin	1
1.1.1 Splošno	1
1.1.2 Strukturne lastnosti OlyA.....	2
1.1.3 OlyA - predstavnik egerolizinske družine	3
1.1.4 Vpliv pH in temperature na vezavo OlyA/PlyB na celične membrane.....	4
1.1.5 Biološki učinki OlyA/PlyB	5
1.1.5.1 Vezava OlyA/PlyB na membranske mikrodomene (membranske rafte).....	5
1.1.5.2 Permeabilizacija celičnih membran.....	6
1.1.5.3 Učinki OlyA/PlyB in vivo	8
1.1.5.4 Učinki OlyA/PlyB in vitro na celičnem in tkivnem nivoju	9
1.1.5.5 Farmakološko proučevanje mehanizmov učinkov OlyA/PlyB	10
1.2 Regulacija znotrajceličnega volumna.....	11
1.3 Homeostaza znotrajceličnega Ca^{2+} v nevronih in gladkih mišičnih celicah	11

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 Materiali	16
3.1.1 Celične linije	16
3.1.2 Specifični zaviralci	16
3.1.3 Ostali material	17
3.1.4 Raztopine in pufri	18
3.2 Metode	19
3.2.1 Izolacija OlyA/PlyB iz bukovega ostrigarja	19
3.2.2 Testiranje hemolitične aktivnosti OlyA/PlyB	19
3.2.3 Priprava celičnih linij A10 in NG108-15	20
3.2.4 Priprava nevroblastomskih celic NG108-15 za morfološke meritve z lasersko konfokalno mikroskopijo	21
3.2.5 Priprava gladkomišičnih celic A10 in nevroblastomskih celic NG108-15 za meritve koncentracije Ca^{2+} v citosolu s čitalcem mikrotitrnih plošč	22
3.2.6 Priprava gladkomišičnih celic A10 in nevroblastomskih celic NG108-15 za meritve koncentracije Ca^{2+} v citosolu z lasersko konfokalno mikroskopijo	23
3.2.7 Statistične metode	24
4 REZULTATI	26
4.1 Biološka aktivnost OlyA/PlyB	26

4.2	Nevroblastomske celice NG108-15	27
4.2.1	Vpliv OlyA/PlyB na morfolgijo celic NG108-15	27
4.2.2	Vpliv OlyA/PlyB na koncentracijo Ca^{2+} v citosolu v celicah NG108-15.....	30
4.2.2.1	Vpliv specifičnih zaviralcev, depolarizacije celične membrane in odstranitve Na^+ v zunajcelični raztopini na koncentracijo Ca^{2+} v citosolu inducirano z OlyA/PlyB ..	31
4.3	Gladkomišične celice A10.....	34
4.3.1	Vpliv OlyA/PlyB na koncentracijo Ca^{2+} v citosolu v gladkomišičnih celicah A10	34
4.3.1.1	Vpliv specifičnih zaviralcev, depolarizacija celične membrane in odstranitev Na^+ v zunajcelični raztopini na koncentracijo Ca^{2+} v citosolu, inducirano z OlyA/PlyB .	38
5	RAZPRAVA	42
5.1	Vpliv OlyA/PlyB na morfolgijo in koncentracija Ca^{2+} v citosolu nevroblastomskih celic NG108-15	42
5.2	Vpliv OlyA/PlyB na koncentracijo Ca^{2+} v citosolu v gladkomišičnih celicah A10	46
6	ZAKLJUČKI	50
7	ZAHVALA	51
8	LITERATURA	52

KAZALO SLIK

Slika 1 – Bukov ostrigar (<i>Pleurotus ostreatus</i>). Foto: dr. Sabina Berne.....	2
Slika 2 – Homeostaza $[\text{Ca}^{2+}]_i$	14
Slika 3 – Eksperimentalni potek naloge.....	25
Slika 4 – Časovni potek hemolize ovčjih eritrocitov po dodatku različnih koncentracij OlyA/PlyB	26
Slika 5 – Laserska konfokalna mikroskopska slika morfoloških sprememb celic NG108-15, obarvanih z oranžnim barvilom za označevanje celičnih membran, brez in ob prisotnosti OlyA/PlyB (70 nM/7,8 nM).	27
Slika 6 – Časovno odvisne spremembe relativne površine celic NG108-15 po dodatku različnih koncentracij OlyA/PlyB.	28
Slika 7 – Spremembe relativne površine celic NG108-15 po dodatku 70 nM/7,8 nM OlyA/PlyB pri različnih pogojih in ob prisotnosti nekaterih zaviralcev ionskih kanalčkov in izmenjevalcev.....	29
Slika 8 – Vpliv različnih koncentracij OlyA/PlyB na spremembo $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v celicah NG108-15 ob prisotnosti zunajceličnega Ca^{2+} in v mediju brez Ca^{2+} in dodanem 2 mM EGTA.	30
Slika 9 – Učinek 700 nM/78 nM OlyA/PlyB na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po predinkubaciji celic NG108-15 z različnimi učinkovinami.	32
Slika 10 – Maksimalni porasti razmerja F_{340}/F_{380} v celicah NG 108-15 po dodatku 700 nM/78 nM OlyA/PlyB in vpliv različnih farmakoloških učinkovin.....	33
Slika 11 – Lasersko konfokalna mikroskopska slika gladkomišičnih celic A10 obarvanih s FLUO-4 AM.	34

Slika 12 – Lasersko konfokalna mikroskopska slika skupine celic A10, inkubiranih s FLUO-4 AM.	35
Slika 13 – Učinek OlyA/PlyB na časovno odvisne spremembe v inteziteti fluorescenc pri 340 in 380 nm in prikaz sprememb v razmerju F_{340}/F_{380} v celicah A10.	36
Slika 14 – Vpliv OlyA/PlyB na spremembo $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v celicah A10.	37
Slika 15 – Učinek OlyA/PlyB na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po predinkubaciji celic A10 z različnimi učinkovinami.	39
Slika 16 – Maksimalni porasti razmerja F_{340}/F_{380} v celicah A10 po dodatku 700 nM/78 nM OlyA/PlyB in vpliv različnih farmakoloških učinkovin.	40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1 - Primerjalna tabela ugotovljenih učinkov OlyA/PlyB v celicah NG108-15 in A10.	41
---	----

1 UVOD

1.1 Ostreolizin

1.1.1 Splošno

Iz bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*) izolirana proteina ostreolizin A (15 kDa) in pleurotolizin B (59 kDa) oblikujeta citolitični kompleks (OlyA/PlyB), ki vsebuje domeno MACPF (angl. membrane attack complex component/perforin). Podobno domeno vsebujejo proteini imunskega sistema, tj. proteini komplementnega litičnega kompleksa in perforina. Proteina OlyA in PlyB se v izolatu nahajata v molskem razmerju 9:1 (1, 2, 3). Prevladujoči protein OlyA se sintetizira v času oblikovanja primordijev in plodišč bukovega ostrigarja. Pripada veliki skupini visoko homolognih proteinov, t. i. egerolizinov (4, 5). Izolirani so bili iz različnih gob, plesni, rastlin in bakterij. Njihove skupne lastnosti so: nizka izoelektrična točka, termolabilnost, podobna molekulska masa ter stabilnost v širokem razponu pH (3,5 – 10). Večina predstavnikov egerolizinov, izoliranih iz bazidiomicetnih gliv, je tudi membransko aktivnih (5, 6).

Kompleks OlyA/PlyB povzroči nastanek por v bioloških in umetnih membranah, bogatih s holesterolom (Hol) in sfingomielinom (SM), oz. specifično prepozna t. i. membranske rafte (7). Za prepoznavanje omenjenih membranskih domen in začetno vezavo je odgovoren OlyA. Površinsko vezane molekule OlyA se povežejo z monomernim ali oligomernim PlyB, kar izzove kooperativne konformacijske spremembe molekul PlyB in oblikovanje pore. Posamezna člena citolitičnega kompleksa (OlyA in PlyB) nista porotvorna (1). V nanomolarnih koncentracijah (45 nM/4,9 nM – 448 nM/48,6 nM) je OlyA/PlyB citotoksičen za številne celične linije in eritrocite (8). V poskusih na glodalcih so ugotovili, da OlyA/PlyB v letalnih odmerkih povzroči zastoj dihanja in odpoved srčne funkcije (9).



Slika 1 – Bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*). Foto: dr. Sabina Berne.

1.1.2 Strukturne lastnosti OlyA

OlyA ima izoelektrično točko pri pH 5,0. Po sekveniranju cDNA za OlyA so odkrili, da ta kodira protein s 137 aminokislinami. Zgrajen je iz 13 pozitivno (arginin, lizin, histidin) in 16 negativno nabitih (asparaginska kislina, glutaminska kislina) aminokislinskih ostankov ter iz relativno visokega deleža aromatskih (šest triptofanskih, štiri tirozinske in dva fenilalaninska ostanka) in dveh cisteinskih ostankov. Cisteini na mestih 61 in 93 in triptofanski ostanki na položajih 5, 27, 91, 95, 102 in 111 so v OlyA evolucijsko ohranjeni, kar kaže na njihovo pomembno strukturno in/ali funkcionalno vlogo. Ohranjeni cisteinski ostanki so po poročanju nekaterih avtorjev nujno potrebni za hemolitično aktivnost kompleksa OlyA/PlyB, območja bogata s triptofanom pa pri nekaterih drugih citolitičnih proteinih sodelujejo pri začetni pritrditvi le-teh na celično membrano (8). Po Fourieru transformirana infrardeča spektroskopija (FTIR) je pokazala, da je OlyA pretežno β -strukturirani protein s približno 50 % β -strukture (od tega 15 % β -obratov in 35 % β -plosč), 20 % α -heliksov in 30 % naključnih zvitkov (8).

1.1.3 OlyA - predstavnik egerolizinske družine

Sorodnost med predstavniki egerolizinske družine je težko določiti in filogenetsko drevo še ni v celoti razjasnjeno. Predvidevajo, da so se geni, ki kodirajo te proteine, prvič pojavili pri zadnjem predhodniku gliv razredov askomicet (*Ascomycetes*) in bazidiomicet (*Basidiomycetes*), ki zajemata največje število vrst, ki sintetizirajo egerolizine. Od tod bi se lahko s horizontalnim prenosom prenesli na bakterije in iz bakterij ter gliv na rastline, s katerimi so bodisi v simbiozi bodisi so rastlinski patogeni. Do sedaj so te beljakovine podrobneje proučevali le pri glivah in bakterijah (5). Bukov ostrigar je razširjen v kulinariki po vsem svetu, vendar je zelo malo podatkov o celičnih procesih, ki sprožijo začetek razvoja plodnih teles. Pri njem so primerjali genska zaporedja cDNA, ki se izrazijo med oblikovanjem primordijev in plodišč, da bi odkrili spremembe v izražanju genov v času plodenja. Izmed vseh 1069-genskih zaporedij, ki so jih določili v plodnih telesih omenjene gobe, se je niz zaporedij v času plodenja drugače izrazil. Ta zaporedja so bila visoko homologna z genom *Aa-pri1*, ki se prav tako izrazi v času tvorbe primordijev in plodišč pri užitni gobi topolovki (*Agrocybe aegerita*). Obstoje prevedenih produktov so potrdili z njihovo izolacijo in proteina poimenovali OlyA in egerolizin (3). Ko so OlyA določili zaporedje 50. N-terminalnih aminokislinskih ostankov, so ugotovili, da je to v 88 odstotkih identično z aminokislinskim zaporedjem domnevnega proteina PriA gobe *P. ostreatus* in v 68 odstotkih aminokislinskemu zaporedju iz cDNA napovedanega hipotetičnega proteina Aa-Pri1 iz gobe *A. aegerita* (3). Prav tako je bilo zaporedje njegovih ostankov v 46,9 odstotkih podobno zaporedju Asp-hemolizina plesni *Aspergillus fumigatus*, v 43,9 in 43 odstotkih zaporedjema dveh proteinov bakterije *Clostridium bifermentans*, Cbm17.1 in Cbm17.2 (3), podobna pa je bila tudi zaporedjem proteinov plesni *Neurospora crassa* in bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (8). Vsi naštetni proteini so kisli proteini z molekulsko maso okoli 16 kDa, zaradi česar so v družino egerolizinov lahko prišteli tudi OlyA. Opazovanja kažejo, da *Aa-pri1* in podobni proteini (OlyA), ki se pojavijo v začetku plodenja gob, sodelujejo pri razvojnem ciklu organizma, ki ga proizvaja (3, 5). OlyA/PlyB in egerolizin so odkrili v hitrorastočih se primordijih ter v bazidijih in bazidosporah razvijajočih se trosnjakov (plodnih teles) (5), zato domnevajo, da imata pomembno vlogo v začetni fazi plodenja gobe (3). Slednje dodatno podpira tudi

ugotovitev, da eksogeni dodatek OlyA/PlyB k miceliju gobe povzroči oblikovanje primordijev in razvoj mladih plodnih teles (10).

1.1.4 Vpliv pH in temperature na vezavo OlyA/PlyB na celične membrane

pH pomembno vpliva na vezavo kompleksa OlyA/PlyB in nastanek por, vendar optimalni pH, ki je potreben za vezavo OlyA/PlyB na eritrocitne in umetne lipidne membrane, ne sovпада z optimalnim pH, pri katerem je permeabilizacijska aktivnost OlyA/PlyB največja. OlyA/PlyB se optimalno veže na membrane v pH razponu med 6 in 7, medtem ko sta porotvornost in hemolitična aktivnost najizrazitejši pri pH med 7 in 8 (4). Egerolizini, med katere sodi tudi OlyA, membransko aktivnost ohranijo v širokem območju pH 3,5–10,5 (5). Z višanjem pH, ki vodi do nastanka ostreolizinskega dimera, sposobnost vezave pade, saj se dimer ni sposoben vezati na membrane. Za vezavo OlyA/PlyB na multilamelarne vezikle iz sfingomielina (SM) in holesterola (Hol) in njihovo permeabilizacijo mora biti OlyA v nativnem konformacijskem stanju. To je stanje, kjer ima OlyA pri 25 °C in pri pH med 6 in 9 monomerno in termodinamično stabilno nativno zgradbo, za katero je značilna rigidna terciarna zgradba s prevladujočo β -strukturom. Med pH 2 in 3 protein nepovratno preide v obliko razrahljane kroglice z večjo vsebnostjo α -strukture in izgubi terciarno zgradbo. Pri pH, višjem od 12, protein denaturira in popolnoma izgubi proteinske funkcije. V razponu pH med 3,6 in 6 pride do obarjanja OlyA/PlyB, kar nakazuje na to, da pH vpliva tudi na njegovo topnost v vodi. To je najverjetneje posledica izoelektrične precipitacije in ne konformacijskih sprememb proteina, saj je njegova topnost tudi pri pH med 7 in 8 precej slaba (4).

Na konformacijske prehode OlyA/PlyB vpliva tudi temperatura. V območju pH med 6 in 11, kjer je bil prehod, izzvan s temperaturo, kooperativen ima OlyA/PlyB največjo termično stabilnost pri pH 8. Tu je do denaturacije prišlo pri $51,2 \pm 0,5$ °C, medtem ko je bila pri ostalih vrednostih pH temperatura nižja (pri pH 6: $48,6 \pm 0,5$ °C, pri pH 9: $47,2 \pm 0,5$ °C, pri pH 10: $39,4 \pm 0,5$ °C in pri pH 11: $34,6 \pm 0,5$ °C). Pri pH 7 nastopi dvofazni prehod: prvi se pojavi pri $47,2 \pm 0,5$ °C, drugi pa pri $54,6 \pm 0,5$ °C. Zdi se, da je sekundarna zgradba OlyA/PlyB pri pH 7 bolj stabilna kot pri pH 8. Za primerjavo: pri 80

°C je odstotek α -heliksa pri pH 7 štirikrat višji kot pri pH 8, zato sklepajo, da se OlyA/PlyB v temperaturnem intervalu med 65 °C in 80 °C nahaja v visokotemperaturnem vmesnem stanju brez prisotne terciarne zgradbe in z inducirano nenativno α -strukturo (4).

1.1.5 Biološki učinki OlyA/PlyB

1.1.5.1 Vezava OlyA/PlyB na membranske mikrodomene (membranske rafte)

Vezava OlyA/PlyB na lipidne eno- in dvosloje ter njihova permeabilizacija je posebej odvisna od prisotnosti Hol in SM (7). OlyA/PlyB se veže in ustvarja pore na specifičnih mestih v membrani, ki so obogatena s Hol in SM. Takšne mikrodomene so lipidni rafti, ki so heterogene s Hol in sfingolipidi (SM, glikosfingolipidi) bogate, visokodinamične mikrodomene v celični membrani. Zaradi odpornosti proti raztapljanju z mrzlim detergentom Triton X-100 imenujemo lipidne rafte tudi proti detergentu odporne membrane (angl. detergent resistant membranes — DRM). Lipidni rafti združujejo tudi različne vrste proteinov, ki torej predstavljajo področje tesno urejenih lipidov in specifičnih proteinov (tekočo urejeno fazo – Lo) in plavajo v bolj tekočem matriksu, ki se imenuje tekoča neurejena faza (Ld) (7). V celičnih membranah sodelujejo pri membranskem transportu, prenosu signalov ter predstavljajo vezavno/vstopno mesto za celične patogene, toksine in raznovrstne ligande (11, 12, 13, 14). V nasprotju z ostalimi domnevnimi lipidnimi označevalci, ki se vežejo na čisti Hol (perfringolizin) ali SM (aktinoporini, lizenin), lahko OlyA/PlyB prepozna le mešanico teh dveh lipidov, kar kaže na specifičnost interakcije OlyA/PlyB z membranskimi rafti (15). Deluje tudi na membrane, kjer je namesto SM v povezavi s Hol nasičeni dipalmitoilfosfatidilholin (glicerofosfolipid), vendar se ob tem litična aktivnost OlyA/PlyB zmanjša (7). Drugače pa je ob dodatku nenasičenih glicerofosfolipidov, kot sta mono- ali dinenasičen fosfatidilholin. V tem primeru se membranska aktivnost citolitičnega proteina do veziklov, sestavljenih iz ekvimolarnih razmerij SM in Hol, močno zmanjša (7, 15). Pomen Hol za biološke učinke OlyA/PlyB so potrdile tudi raziskave na ovarijskih celicah kitajskega hrčka (CHO). Ugotovili so, da je bil OlyA/PlyB bolj citotoksičen za tiste

ovarijske celice, katerih membrane so vsebovale večji delež Hol, njegova vsebnost pa je hkrati sovpadala tudi s prisotnostjo preučevanega proteina v DRMs teh celic (7). V sublitičnih koncentracijah so s fluorescenčno označenimi protitelesi proti OlyA/PlyB opazovali tudi vezavo OlyA/PlyB na membrane celic CHO in somatototropnih celic podgane (16). Dokazali so, da se je po obdelavi celic z 20 mM metil- β -ciklodekstrinom, ki je delež Hol v membranah znižal za 43 %, vezava OlyA/PlyB znižala na vsega 2 %. Pri obdelavi s 10 mM M β CD se je količina membranskega Hol znižala za 35 %, delež vezave pa se ni bistveno spremenil. Iz tega izhaja prepričanje, da OlyA/PlyB za vezavo na membrane potrebuje določeno mejno koncentracijo tega sterola (7). Vezavo OlyA/PlyB zmanjša tudi obdelava celic CHO in Hol/SM lipidnih veziklov (1:1) z lizofosfolipidom lizofostatidilinozitolom. Imunofluorescenčne raziskave so pokazale, da se OlyA/PlyB specifično veže na membranske mikrodomene, bogate s Hol, ki se razlikujejo od membranskih domen, na katere se vežejo nekateri drugi predlagani označevalci raftov, kot sta kaveolin in podenota B-toksina kolere. To nakazuje na dejstvo, da so membranski rafti strukturno in funkcionalno zelo heterogeni, s tem pa obstaja možnost uporabe OlyA/PlyB kot specifičnega označevalca subpopulacije lipidnih raftov (16). Rekombinantni fluorescenčni fuzijski nelitični derivat OlyA (OlyA-mCherry) so v novejših raziskavah že uporabili kot označevalec s SM in Hol bogatih domen v naravnih in umetnih lipidnih membranah (17).

1.1.5.2 Permeabilizacija celičnih membran

Membranska aktivnost je splošno znana značilnost velikega števila egerolizinov. Vežejo se na biološke in umetne membrane in v njih tvorijo pore (jih permeabilizirajo) (6). Za razliko od nekaterih egerolizinov iz nižjih gliv (npr. Asp-hemolizina iz plesni *Apergillus fumigatus*), ki so biološko učinkoviti (v večini imajo litične učinke na celične membrane) v monomerni obliki, je OlyA iz gobe *P. ostreatus* eden od partnerjev v dvokomponentnem citolitičnem kompleksu skupaj s proteinom PlyB (1, 2).

Za razumevanje interakcije OlyA/PlyB z lipidnimi membranami so proučevali njegove učinke na sesalskih celicah in veziklih, pripravljenih iz ekstrakta bukovega ostrigarja in eritrocitov. Ugotovili so, da OlyA/PlyB v nanomolarnih koncentracijah v enaki meri lizira človeške, goveje in ovčje eritrocite (8), medtem ko je veliko manj učinkovit proti pasjim eritrocitom in eritocitom glodalcev in dvoživk, kar kaže na to, da so eritrociti vrstno različno občutljivi na egerolizine (6). OlyA/PlyB je bil v submikromolarnih koncentracijah citotoksičen tudi za celične linije. Pri mikroskopskem opazovanju človeških fibrosarkomskih celic HT 1080 in celic adenokarcinoma mlečne žleze MCF 7 so ugotovili, da OlyA/PlyB v koncentraciji 448 nM/48,6 nM v 50 odstotkih povzroči lizo koloidno-osmotskega značaja, za katero je značilno nabrekanje, degranulacija celic ter oblikovanje membranskih mehurčkov (6, 8). V koncentracijah OlyA/PlyB nad 23,3 μM /2,5 μM se podobne spremembe pojavijo tudi pri hondrocitih in osteoblastih (6, 18). Zanimiva je ugotovitev, da vezikli, pripravljeni iz lipidov, ekstrahiranih iz bukovega ostrigarja, niso občutljivi na permeabilizacijo, so pa močan zaviralec hemolize, povzročene z OlyA/PlyB. Obstajata dve možni razlagi, in sicer: i) OlyA/PlyB se lahko veže na vezikle, vendar jih ne more permeabilizirati in ii) membrane vsebujejo lizofosfolipide, ki se s področja vezikla prenesejo do OlyA/PlyB in ga inaktivirajo. Zadnjo razlago podpira ugotovitev, da lahko lizofosfolipidi, zlasti lizofosfatidilinozitol in sfingozin-1-fosfat ter v manjši meri tudi proste maščobne kisline, pod njihovo kritično micelarno koncentracijo zavirajo permeabilizacijsko aktivnost OlyA/PlyB (8). Nekateri drugi egerolizini, kot je npr. Asp-hemolizin, se lahko neposredno vežejo na lizofosfolipide, vendar to za OlyA/PlyB še ni bilo potrjeno. Bolj verjetno je, da se lizofosfolipidi vključijo v lipidni dvosloj in spremenijo fizikalne lastnosti membranske domene, na katero se OlyA/PlyB veže, ter na tak način preprečijo vezavo in nastanek por (16). Drugačni učinki so se pojavili na sesalskih celičnih membranah in veziklih, pripravljenih iz celokupnega lipidnega ekstrakta eritrocitov. V tem primeru je prišlo do stabilne vezave med lipidi membrane in ostreolizinom; temu je nato sledil nastanek transmembranskih por z notranjim hidrodinamičnim premerom 4 nm (8). Interakcija z lipidnimi vezikli in posledična permeabilizacija je sovpadala z agregacijo OlyA/PlyB na površini membrane, porastom njegove intrizične (triptofanske) fluorescence in vsebnostjo

α -heliksa, kar nakazuje na to, da vezava OlyA/PlyB na lipidne dvosloje izzove strukturne spremembe v proteinu, ki so nujno potrebne za nastanek por (8). Do teh sprememb ne pride ob interakciji z lizofosfolipidi, zato predpostavljajo, da bi zaviralen učinek lizofosfolipidov lahko odseval njihovo regulacijsko vlogo pri delovanju proučevanega proteina in podobnih proteinov v času plodenja gobe (8).

1.1.5.3 Učinki OlyA/PlyB *in vivo*

Bukov ostrigar je v gurmanski kulinariki zelo cenjena goba, vendar so po zaužitju velikih količin surovih gob pri ljudeh in živalih odkrili sporadične akutne zastrupitve ter predlagali, da bi za toksične učinke lahko bile odgovorne proteinske molekule (19). Pokazali so, da vodni ekstrakt te gobe izzove krvavitve v črevesju, jetrih in pljučih ter povzroči degenerativne spremembe na jetrih miši pri polovični letalni dozi (LD_{50}), višji od 3000 $\mu\text{g/kg}$ (19). Ker je veliko bioaktivnih proteinov, ki povzročajo lizo celic in hemolizo, tudi toksičnih za organizem, so preverili, ali to drži tudi za OlyA/PlyB, ki je produkt te gobe. Njegove učinke so proučevali na glodalcih v *in vivo* ter *in vitro* poskusih. Poskusi so pokazali, da ima OlyA/PlyB kardiorespiratorne in letalne učinke (6, 9). Ugotovili so, da je LD_{50} OlyA/PlyB pri miših 1170 $\mu\text{g/kg}$ telesne mase (t.m.), medtem ko je bila LD_{100} 1400 $\mu\text{g/kg}$ t.m. (6, 9). Zaradi razjasnitve kardiorespiratornih učinkov so podganam v splošni anesteziji intravensko aplicirali odmerek LD_{50} , ugotovljen pri miših. OlyA/PlyB so aplicirali trem skupinam, tj. intaktnim (kontrolnim), farmakološko vagotomiranim in umetno ventiliranim podganam, in jim merili arterijski krvni tlak, respiratorno aktivnost in elektrokardiogram (EKG) (9). Nekaj sekund po vnosu OlyA/PlyB je pri intaktnih podganah prišlo do začasnega povečanja krvnega tlaka, ki mu je nato sledil progresiven in nepovraten padec do srednjega cirkulacijskega tlaka. Tega so spremljale bradikardija in spremembe v zapisu EKG, kot so sinusna aritmija, povišana amplituda T-vala in podaljšan interval P-R. Pogosto so se pojavili tudi povišan segment S-T, razširjen kompleks QRS in prekatne ekstrasistole, kar je nakazovalo na ishemijo in hipoksijo miokarda kot primarni vzrok aritmij. Nekaj sekund po dodatku OlyA/PlyB se je pojavila apneja, ki ji je sledila kratka respiratorna aktivnost in nato respiratorni zastoj s

poginom vseh poskusnih živali, ki so prejele en LD_{50} -odmerek OlyA/PlyB (9). Do podobnih sprememb je prišlo tudi pri vagotomiranih in umetno ventiliranih podganah, zato so sklepali, da hipoksija in vagotonija (povečana aktivnost parasimpatikusa) nimata primarne vloge v kardiotoksičnosti OlyA/PlyB (9). OlyA/PlyB lizira eritrocite *in vitro*, *in vivo* pa izzove nenaden porast K^+ v serumu, zato obstaja velika verjetnost, da je hemolitičen tudi *in vivo*. Hiperkaliemija, ki je posledica hemolize in lize drugih celic, bi zato lahko bila odgovorna za nastanek srčnih aritmij pri podganah. Direktni učinek OlyA/PlyB na kardiomiocyte so izključili, saj v miokardu niso zasledili patohistoloških sprememb, vendar kljub temu obstaja verjetnost neposrednega učinka OlyA/PlyB na kardiomiocyte (9, 20).

1.1.5.4 Učinki OlyA/PlyB *in vitro* na celičnem in tkivnem nivoju

Da bi ugotovili natančne mehanizme delovanja OlyA/PlyB, so njegove učinke proučevali tudi *in vitro*, in sicer na pljučnih fibroblastih kitajskega hrčka, endotelijskih celicah človeške umbilikalne vene ter na aortnih obročkih, pridobljenih iz izolirane podganje aorte. OlyA/PlyB je bil v submikromolarnih koncentracijah citotoksičen za obe celični liniji in je v koncentracijah 233 nM/25 nM – 1400 nM/156 nM povzročil kontrakcije mišične stene aortnih obročkov. Amplituda kontrakcije je naraščala z višanjem koncentracije citolitičnega proteina (21). Koncentracije 700 nM/78 nM – 1400 nM/156 nM, pri katerih je bila moč kontrakcije največja *in vitro*, so bile podobne maksimalnim preračunanim koncentracijam v krvi med poskusi *in vivo*. Iz tega so sklepali, da bi lahko bil krč koronarnih žil, povzročen z OlyA/PlyB, primarni vzrok pogina pri glodalcih, saj bi, če bi v teh žilah prišlo do podobnih sprememb kot na aorti, nastali vazospazem izzval ishemijo in s tem hipoksično poškodbo kardiomiocitov (6). Slednjo predpostavko so potrdili s poskusi *in vitro* na obročkih, izoliranih iz koronarnih arterij prašiča, kjer je amplituda kontrakcije prav tako naraščala z naraščajočo koncentracijo OlyA/PlyB (21). OlyA/PlyB je preprečil relaksacijo obročkov, uravnano s strani endotelija, ki so bili predhodno skrčeni z noradrenalinom v primeru aortnih žilnih obročkov ali s 40 mM K^+ v primeru koronarnih žilnih obročkov (20, 21). Predvideva se, da bi do tega lahko prišlo

zaradi poškodbe endotelijskih celic ali okvare mehanizma, ki je odgovoren za nastanek mišične sprostitve gladkih mišičnih celic, ki so uravnane s strani žilnega endotelija (21).

Vpliv OlyA/PlyB *in vitro* so proučevali tudi z vodnim ekstraktom bukovega ostrigarja na gladkih mišičnih celicah sapnika, kjer so ugotovili, da povzroči kontrakcijo gladke mišičnine sapnika (22).

1.1.5.5 Farmakološko proučevanje mehanizmov učinkov OlyA/PlyB

OlyA/PlyB pri podganah po parenteralnem vnosu izzove poškodbe endotelija s perivaskularnim edemom v srcu in pljučih kot tudi krvavitve v miokardu. Na obročkih, pridobljenih iz izolirane koronarne arterije prašiča, je bilo ugotovljeno, da OlyA/PlyB izzove krčenje koronarnih obročkov. Prisotnost selektivnega zaviralca endotelinskih receptorjev TBC3214 ne prepreči z OlyA/PlyB izzvanega skrčenja koronarnih obročkov, zato so sklepali, da vazokonstrikcija ni posledica sproščanja in delovanja vazokonstriktorja endotelina (ET-1), ki po vezavi na omenjene receptorje – ti se nahajajo na površini gladkih mišičnih celic – fiziološko povzroči vdor Ca^{2+} v gladke mišične celice v žilni steni in njihovo skrčenje. Obstaja tudi verjetnost, da OlyA/PlyB neposredno učinkuje na gladke mišične celice in prek depolarizacije aktivira od napetosti odvisne kalcijeve kanalčke in posledično povzroči vdor Ca^{2+} v citosol. Za proučitev te predpostavke so uporabili zaviralca L-tipa kalcijevih kanalčkov verapamil in lantanov klorid (LaCl_3), ki zavira neselektivne kationske kanalčke. Ugotovili so, da se je amplituda z OlyA/PlyB izzvane kontrakcije koronarnih obročkov, ki so bili predhodno inkubirani z verapamilom, bistveno zmanjšala, ob dodatku LaCl_3 pa popolnoma ustavila. Iz tega lahko povzamemo, da je kontrakcija obročkov koronarne arterije prašiča posledica vdora Ca^{2+} iz zunajceličnega prostora skozi L-tip kalcijevih kanalčkov in skozi neselektivne kationske kanalčke (20).

1.2 Regulacija znotrajceličnega volumna

Ohranjanje normalnega volumna celic je ključnega pomena za preživetje celic. Membrana celic je propustna za vodo, volumen znotrajcelične tekočine pa določa ozmotski gradient. Na^+/K^+ -ATPaza ohranja asimetrično porazdelitev Na^+ in K^+ ter posredno tudi Cl^- ionov. Na^+ koncentracijski gradient je zelo pomemben za delovanje $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjevalca (NCX), omogoča transport glukoze, aminokislin, nastanek akcijskega potenciala v vzdražnih tkivih ipd. Neprekinjen vstop Na^+ ionov zato zahteva sprotno delovanje Na^+/K^+ ATP-aze in na ta način tudi ohranjanje znotrajceličnega ozmotskega ravnotežja. Pomanjkanje ATP lahko vodi v zmanjšanje znotrajceličnega K^+ in povečanje znotrajceličnega Na^+ . Posledica je povečana koncentracija zunajceličnega K^+ in depolarizacija celične membrane, kar vodi v prehod Cl^- v celico, povečanje ozmotskega gradienta zaradi povečane znotrajcelične koncentracije Na^+ in Cl^- ter nastanek celičnega edema in nekroze celic. Zmanjšan koncentracijski gradient za Na^+ upočasni delovanje NCX, kar sočasno privede do povečane kontrakcije znotrajceličnega $[\text{Ca}^{2+}]_i$. To stanje ima številne negativne učinke, kot so zaviranje dihalne verige in zmanjšano nastajanje ATP, oksidativne poškodbe membran, nastajanje celičnih mehurčkov ipd. (23). Ker OlyA/PlyB tvori kationsko neselektivne pore (2), predpostavljamo, da bi v tarčnih celicah lahko povzročil porušenje ionskega ravnotežja in spremembe v morfologiji celic, ki lahko privedejo do celične smrti (nekroze).

1.3 Homeostaza znotrajceličnega Ca^{2+} v nevronih in gladkih mišičnih celicah

Znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) v citosolu je nizka, približno 100 nM, medtem ko je v zunajceličnem prostoru le-ta večja in je približno 2 mM (24).

Tako velika razlika med koncentracijama Ca^{2+} nastopi, ker se ta neprestano črpa iz citosola v znotrajcelične organele, ki predstavljajo znotrajcelično zalogo Ca^{2+} , ali pa se prenesejo izven celice. Organeli, v katerih so zaloge znotrajceličnega Ca^{2+} , so endoplazemski/sarkoplazemski retikulum (ER/SR), vezikli, mitohondriji in jedro.

Znotrajcelični prenos poteka s Ca^{2+} ATP-azno črpalko (tj. primarni aktivni transport) in v primeru efluksa (izplava) s sekundarnim aktivnim transportom s $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiportom (24, 25).

Povečanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je signal za številne celične funkcije in ima izreden pomen pri kontrakciji mišičnih celic. Med drugim vpliva na eksocitozo nevrotransmiterjev v presinaptičnih membranah živčnih celic, izločanje hormonov in sekreta eksokrinih žlez z ekscitacijo določenih senzoričnih celic, odpiranje in zapiranje drugih tipov ionskih kanalčkov, migracijo levkocitov in tumorskih celic, aktivacijo trombocitov in mobilizacijo semenske tekočine (25).

Povečanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je lahko posledica sprostitve Ca^{2+} iz znotrajceličnih organelov ali pa posledica vdora Ca^{2+} iz zunajceličnega prostora (24, 26, 27).

Povečana $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je lahko posledica aktivacije:

1. od liganda (agonista) odvisnih receptorjev (Slika 2, točka 1), od napetosti odvisnih kalcijevih kanalčkov (Slika 2, točka 2) in v nevzdražnih tkivih od Ca^{2+} odvisnih kalcijevih kanalčkov; vsi omogočajo prehod Ca^{2+} skozi celično membrano v celico;
2. inozitol 1,4,5-trifosfatnih receptorjev (IP-3-R) in rianodinskih receptorjev (RyR) v membrani ER/SR; povečanje koncentracije Ca^{2+} v citosolu je posledica vdora Ca^{2+} iz znotrajceličnih zalog (Slika 2, točka 3);
3. NCX v celični membrani (Slika 2, točka 6) in mitohondrijskega $\text{mNa}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjevalca (Slika 2, točka 4).

Za znižanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ so odgovorni naslednji mehanizmi:

1. v celični membrani Ca^{2+} -ATPaza – kalcijeva črpalka (Slika 2, točka 5) in NCX (Slika 2, točka 6), ki deluje na podlagi velikega koncentracijskega gradienta Na^+ , ki ga vzdržuje Na^+/K^+ -ATPaza (23, 25) (Slika 2, točka 8);

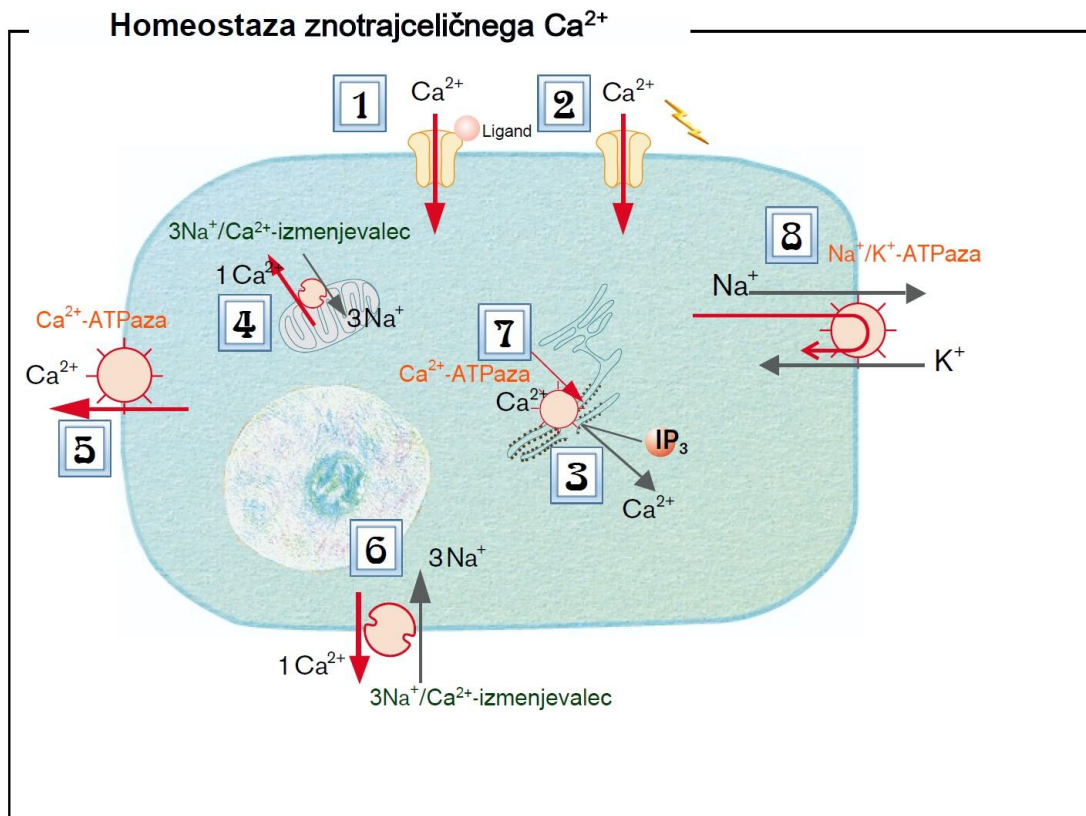
2. na ER ali SR Ca^{2+} -ATPaza – kalcijeva črpalka (Slika 2, točka 7) in na mitohondrijih mitohondrijski uniporter.

Poznamo več vrst od napetosti odvisnih kalcijevih kanalčkov v celični membrani:

1. L-tip: za aktivacijo običajno potrebujejo močno depolarizacijo, aktivacija pa je dolgotrajna. Največ jih je v celični membrani gladkomišičnih celic in v endokrinem sistemu, kjer so odgovorni za krčenje in izločanje. Omenjeni L-tip je najpomembnejše mesto vdora Ca^{2+} v citosol ob depolarizaciji celične membrane.

Obstaja tudi L-tip od napetosti odvisnih kalcijevih kanalčkov, ki se aktivirajo že pri blagi depolarizaciji in se nahajajo pretežno v nevronih in v celicah sinuatrialnega vozla v srcu (28).

2. T-, P- ali Q-tip, N- in R-tip se nahajajo pretežno v nevronih. Pomembni so za sproščanje nevrottransmitterjev (26, 27).



Slika 2 – Homeostaza $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Shematski prikaz najpomembnejših membranskih ionskih kanalčkov, prenašalcev in ionskih črpalk, ki so fiziološko pomembni pri uravnavanju $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen raziskovalnega dela je bil na celičnem in subceličnem nivoju ugotoviti mehanizme, odgovorne za toksičnost delovanja proteinskega kompleksa OlyA/PlyB, izoliranega iz užitne gobe bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*).

Da je za neposredne učinke OlyA/PlyB odgovoren nastanek por in posledični vdor Ca^{2+} v gladkomišične celice koronarnih žil, smo poskušali potrditi s fluorometričnimi meritvami $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v gladkih mišičnih celicah A10 po dodatku OlyA/PlyB. Da bi pojasnili mehanizem nastanka respiratornega zastoja, smo na celičnem nivoju na nevronih NG108-15 kot modelu respiratornih nevronov z uporabo konfokalne mikroskopije in fluorometričnimi meritvami ugotavljali neposredne učinke OlyA/PlyB na njihovo morfolologijo in $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Postavili smo naslednji hipotezi:

1. OlyA/PlyB poveča volumen nevroblastomskih celic NG108-15.
2. OlyA/PlyB poveča $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v gladkomišičnih in nevroblastomskih celicah.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Celične linije

V poskusih smo uporabili mišje nevroblastomske in podganje gliomske celice, ki so bile ob prisotnosti inaktivnega *Sendai virusa* spojene v hibridne celice NG108-15, ter podganje mioblastne celice prsnega dela aorte A10, ki imajo mnoge lastnosti žilnih gladkomišičnih celic. Obe celični liniji smo pridobili iz Ameriške kolekcije celičnih kultur (ATCC; American Type Culture Collection).

3.1.2 Specifični zaviralci

Verapamil	Sigma-Aldrich Co (St. Louis, ZDA); zaviralec L-tipa kalcijevih kanalčkov
Lantanov klorid (LaCl_3)	Sigma-Aldrich Co (St. Louis, ZDA); neselektivni zaviralec kalcijevih kanalčkov
Benzamil	Sigma-Aldrich Co (St. Louis, ZDA); zaviralec $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjevalca
Tapsigargin (TG)	Molecular Probes (Eugene, Oregon ZDA); zaviralec sarko/endoplazemske Ca^{2+} -ATPaze

3.1.3 Ostali material

Ionicin

(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ZDA);

V poskusih, kjer smo merili $[\text{Ca}^{2+}]_i$ smo za pozitivno kontrolo uporabili ionofor ionicin, pridobljen iz bakterije *Streptomyces globatus*, ki veže kalcijeve ione in jih prenaša skozi celično membrano.

OlyA/PlyB (ostreolizin)

Citolitični kompleks OlyA/PlyB smo pod vodstvom prof. dr. Kristine Sepčič izolirali iz bukovega ostrigarja na **Biotehniški fakulteti, Univerza v Ljubljani, Slovenija.**

Dimetil sulfoksid (DMSO)

Merck (Darmstadt, Nemčija);

V njem smo raztopili lipofilna zaviralca benzamil in tapsigargin.

Orange plasma membrane stain

Molecular Probes (Eugene, Oregon ZDA);

Oranžno barvilo, ki specifično obarva celično membrano.

Fura-2 AM

Molecular Probes (Eugene, Oregon ZDA);

Fluorescenčno barvilo, ki omogoča meritev $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in ima eksitacijski vrh med 300 - 400 nm ter emisijski vrh pri 510 nm.

FLUO-4 AM

Molecular Probes (Eugene, Oregon ZDA);

Fluorescenčno barvilo, ki omogoča meritev $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in ima eksitacijsko-emisijski vrh pri 490 in 520 nm.

NaCl	Merck, Darmstadt, Nemčija
D-(+)-Glukoza	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ZDA
KCl	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ZDA
CaCl_2	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Nemčija
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, Nemčija
EGTA	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ZDA
saharoza	Merck, Darmstadt, Nemčija
N-metil-D-glukamin hidroklorid	Chemical point, Deisenhofen, Nemčija
Na-izetionat	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ZDA

3.1.4 Raztopine in pufri

Pri delu smo uporabljali naslednje raztopine in pufre:

Dulbeccova fiziološka raztopina v fosfatnem pufu (DPBS) (pH 7,4; Gibco Life Technologies) brez Ca^{2+} in Mg^{2+} vsebuje 2,67 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 137,9 mM NaCl in 8,09 mM in brezvodni Na_2HPO_4 .

DPBS, obogatena s piruvatom in glukozo (sDPBS) (pH 7,4; Gibco Life Technologies), vsebuje 137,93 mM NaCl, 8,06 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 5,56 mM D-(+)-Glukoze, 2,67 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 0,90 mM CaCl_2 , 0,49 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,33 mM natrijev piruvat.

Pri raztopinah brez Ca^{2+} ni bil dodan CaCl_2 . Raztopini je bil dodan 2 mM kelator **EGTA**, ki veže kalcijeve ione.

Pri nekaterih poskusih je bil NaCl popolnoma ekvimolarno nadomeščen s saharozo, N-metil-D-glukamin hidrokloridom ali Na-izetionatom.

Pri uporabi 71,34 mM raztopine **KCl** je bil Na^+ ekvimolarno zamenjan s K^+ .

3.2 Metode

3.2.1 Izolacija OlyA/PlyB iz bukovega ostrigarja

Postopek izolacije OlyA/PlyB iz svežih plodnih teles užitne gobe *P. ostreatus* je potekal po ustaljenem, predhodno opisanem postopku (3). V kratkem, 350 g svežih bukovih ostrigarjev smo homogenizirali v 30 ml 50 mM TRIS-HCl pufru pri pH 8,5 in homogenat centrifugirali na 15.500 obratih/min, 30 min. Nastali supernatant smo frakcionirano obarjali z amonijevim sulfatom do 65-odstotnega nasičenja. Dobljeni precipitat smo raztopili v TRIS-HCl pufru (50 mM, pH 8,5) in OlyA/PlyB ločili od ostalih sestavin vzorca z gelsko filtracijo na gelu Sephadex G50 medium, ki sta ji sledili dve ionsko izmenjevalni kromatografiji na anionski koloni Econo High Q (Bio-Rad, ZDA) ter anionski koloni Resource Q (Pharmacia, Švedska). Na vseh posameznih stopnjah izolacije smo določali vsebnost proteina v vzorcu in spremljali njegovo hemolitično aktivnost. Čistost proteina smo preverili z NaDS-elektroforezo na poliakrilamidnem gelu in z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). Z izjemo HPLC so bile vse stopnje izolacije opravljene pri 4 °C (8). Izoliran Oly je mešanica ostreolizina A (OlyA) in pleurotolizina B (OlyB) v molskem razmerju 9:1 (1).

3.2.2 Testiranje hemolitične aktivnosti OlyA/PlyB

Ovčje eritrocite smo s centrifugiranjem izolirali iz sveže krvi, ki smo ji pri odvzemu dodali citrat, da ni prišlo do strjevanja. Nato smo jo dvakrat sprali s 0,9-odstotno fiziološko raztopino in enkrat s pufrom Tris/HCl. Hemolitično aktivnost smo merili z turbidimetrično metodo. V 175 µl suspenzije ovčjih eritrocitov smo dodali 25 µl OlyA/PlyB, raztopljenega v pufru Tris/HCl. Tako pripravljena suspenzija eritrocitov je imela pri 650 nm navidezno absorbanco 0,1. Hemolitično aktivnost smo spremljali s kinetičnim čitalcem mikrotitrnih plošč (Molecular Devices, ZDA) pri temperaturi 25 °C. Hemolizo, ki povzroči padec absorbcije pri 650 nm, smo spremljali 30 minut. Odčitali smo polovični čas hemolize ($t_{0,5}$) – čas, ki je potreben za 50-odstotno hemolizo ter

najvišjo vrednost hemolize, t. i. maksimalni naklon hemolize. $\text{HC}_{0,5}$ ($\mu\text{g/ml}$) predstavlja koncentracijo hemolizina, ki povzroči 50-odstotno lizo v 2 minutah.

Krivulja hemolitične aktivnosti je predstavljena kot začetna faza lag, kateri sledi hiter padec absorpcije (liza) in nato ustalitev krivulje.

3.2.3 Priprava celičnih linij A10 in NG108-15

Mišje nevroblastomske in podganje gliomske hibridne celice NG108-15 smo rutinsko vzdrževali v Eaglovem mediju, modificiranem po Dulbeccu z Glutamaxom-I (DMEM), ki smo mu dodali 5 % fetusnega (plodovega) seruma goveda (FCS), 2 % 50-kratne izhodne razopine hipoksantina, aminopterina in timidina (HAT; končna delovna koncentracija 100 μM hipoksantin, 0,4 μM aminopterin, 16 μM timidin), 100 IU/ml penicilina in 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomicina pri nadzorovani temperaturi 37 °C in navlaženi atmosferi, ki je vsebovala 5 % CO_2 . Ko so celice dosegle 80–90-odstotno gostoto, tj. preraslost dna posode, smo pričeli s postopkom diferenciacije. Celice smo najprej vzdrževali v kompletnem hranilnem mediju z dodatkom 2 % dimetilsulfoksida (DMSO). Po 72 h smo kompletni hranilni medij z DMSO zamenjali z medijem, ki je vseboval 1 % FCS in 0,5 mM dibutiril-ciklični-adenozin monofosfat. Čas, potreben za diferenciacijo, je bil 2–5 dni. Celice A10 smo gojili pri enakih pogojih kot celice NG108-15. Pri gojenju celic A10 smo uporabljali hranilni medij DMEM z dodatkom 10 % FCS, 100 IU/ml penicilina in 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomicina. Pod mikroskopom smo vsakodnevno ocenjevali gostoto celic v gojitvenih posodah ter preverjali morebitne okužbe.

3.2.4 Priprava nevroblastomskih celic NG108-15 za morfološke meritve z lasersko konfokalno mikroskopijo

Diferencirane celice smo dvakrat sprali s DPBS. Nato smo dodali oranžno barvilo za specifično označevanje celičnih membran (končna koncentracija 5 $\mu\text{g/ml}$) in celice inkubirali 15 min pri sobni temperaturi v temnem prostoru. Po inkubaciji smo celice trikrat sprali s DPBS ter nazadnje celicam dodali sDPBS. Tako pripravljene celice smo uporabili za morfološke meritve z lasersko konfokalno mikroskopijo.

Morfološke učinke OlyA/PlyB na celice NG108-15 smo ugotavljali tudi ob prisotnosti 138 mM saharoze, 138 mM Na-izetionata in 2 mM EGTA v mediju.

Meritve smo opravili na multispektralnem laserskem konfokalnem mikroskopu (Leica TCS NT). Za ekscitacijo oranžnega barvila smo uporabili helij/neonski laser z ekscitacijsko linijo 543 nm in emitirano fluorescenco zajemali v območju valovnih dolžin med 560-610 nm. Uporabili smo objektiv (Leica TCS NT, Planapo 40xN.A.=1,25), dikroično ogledalo (510 nm) in zaslonko 1 AD.

V posameznem poskusu smo naredili časovno serijo (snemali smo pred in po dodatku različnih preiskovanih koncentracij OlyA/PlyB v 2., 5., 15., 30., 40., 50. in 60. min) optičnih rezin formata 1024x1024 pikslov. Uporabljene koncentracije OlyA/PlyB so bile 7 nM/0,78 nM, 42 nM/4,7 nM in 70 nM/7,8 nM. V poskusih, v katerih smo celice predhodno inkubirali s saharozo, benzamilom, Na-izetionatom, in v mediju brez Ca^{2+} z dodatkom 2 mM EGTA smo uporabili 70 nM/7,8 nM OlyA/PlyB. V vsaki časovni točki smo naredili serijo optičnih rezin skozi nevroblastomske celice debeline 1 μm .

S programom Leica (ROI) smo na projekciji fluorescenčnih slik obrisali posamezne celice (meritve v spremembi projicirane površine smo uporabili kot kazalnik sprememb v volumnu NG108-15 celic) in izračunali površino v μm^2 v vseh časovnih točkah.

3.2.5 Priprava gladkomišičnih celic A10 in nevroblastomskih celic NG108-15 za meritve koncentracije Ca^{2+} v citosolu s čitalcem mikrotitrnih plošč

Diferencirane celice A10 in NG108-15 smo s tripsinom odlepili od podlage in jih prenesli v 15 ml epruveto. Celice smo centrifugirali 3 min pri 1000 vrt./min. Po centrifugiranju smo supernatant odlili in celice resuspendirali v 5 ml DPBS in nato celice ponovno centrifugirali 3 min pri 1000 vrt./min. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v sDPBS (gostota celic $4 \times 10^6/\text{mL}$) ter dodali indikator Fura-2 AM v končni koncentraciji 2,5 μM . Inkubacija je potekala 30 min pri sobni temperaturi (22–24 °C) v temi. Indikator Fura-2 acetoksi-metil ester (AM) je bil raztopljen v DMSO z dodatkom 2-odstotne pluronske kisline F-127. Tako indikator Fura-2 AM kot acetoksi-metil ester prehajata v celico in ne poškodujeta celične membrane. Indikator Fura-2 AM v celici nespecifične esteraze hidrolizirajo in tako nastane hidrofilna kislina, ki ne more zapustiti celice. Po končani inkubaciji smo celice ponovno centrifugirali 3 min pri 1000 vrt./min, odstranili supernatant in celični pelet trikrat sprali s DPBS. Po zadnjem centrifugiranju smo celice resuspendirali v sDPBS (gostota celic $2 \times 10^6/\text{mL}$) in jih prenesli na črno ploščo z 96 jamicami (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) v gostoti $4 \times 10^5/\text{jamico}$. V nekaterih poskusih smo celice preinkubirali za 30–45 min s specifičnimi zaviralci nekaterih membranskih proteinov, ki so vključeni v regulacijo $[\text{Ca}^{2+}]_i$, kot so npr. NCX, od napetosti odvisni kalcijevi kanalčki, neselektivni kationski kanalčki ipd., in meritve opravili ob njihovi prisotnosti v mediju. OlyA/PlyB smo injicirali 40 s po začetku registracije fluorescence (bazalna vrednost) z avtomatskim mikroinjektorjem, čemur je takoj sledilo stresanje mikrotitrne plošče za 1 s. Nato smo registrirali fluorescenčni signal naslednjih 5 min.

Za ugotavljanje učinka OlyA/PlyB smo pri nevroblastomskih celicah NG108-15 uporabili naslednje končne koncentracije: 70 nM/7,8 nM, 350 nM/39 nM in 700 nM/78 nM.

Za ugotavljanje učinka OlyA/PlyB na gladkomišične celice A10 pa naslednje koncentracije: 14 nM/1,56 nM, 35 nM/3,9 nM, 70 nM/7,8 nM, 175 nM/19,5 nM, 350 nM/39 nM, 700 nM/78 nM.

Končna koncentracija OlyA/PlyB v mediju pri uporabi zaviralcev je bila pri obeh celičnih linijah 700 nM/78 nM.

Volumen dodanega OlyA/PlyB je bil vedno 20 μL v 180 μL suspenzije celic.

V poskusih, kjer smo celice depolarizirali s KCl, smo najprej 40 s snemali fluorescenčni signal ozadja. Nato smo z injektorjem 1 injicirali 20 μL KCl (končna koncentracija 70 mM) in spremljali fluorescenčni signal naslednjih 5 min. Temu je sledilo avtomatsko injiciranje OlyA/PlyB z injektorjem 2 v končni koncentraciji 700 nM/78 nM in nadaljnjih 5 min meritev fluorescenčnih signalov.

Vse meritve smo opravili na čitalcu mikrotitrnih plošč Mithras LB 942 (Berthold Technologies, Nemčija). Za eksitacijo indikatorja Fura-2 AM smo uporabili valovni dolžini 340 nm (F_{340} – indikator Fura-2 AM vezan s Ca^{2+}) in 380 nm (F_{380} – prosti indikator Fura-2 AM). Oba emisijska fluorescenčna signala F_{340} in F_{380} smo zajemali pri valovni dolžini 510 nm. Zajeta fluorescenca pri 510 nm po vzbujenem indikatorju Fura-2 AM pri 340 nm je intenziteta fluorescenčnega signala indikatorja Fura-2 AM, vezanega s Ca^{2+} . Močnejši signal pomeni naraščanje koncentracije Ca^{2+} v citosolu. Zajeta fluorescenca pri 510 nm po vzbujenem indikatorju Fura-2 AM pri 380 nm je intenziteta fluorescenčnega signala prostega indikatorja Fura-2 AM. Povišano razmerje med F_{340}/F_{380} pomeni naraščanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Poskusi so bili izvedeni v duplikatih/triplikatih in vsaj v treh ponovitvah. Vse meritve so bile izvedene pri 30 °C.

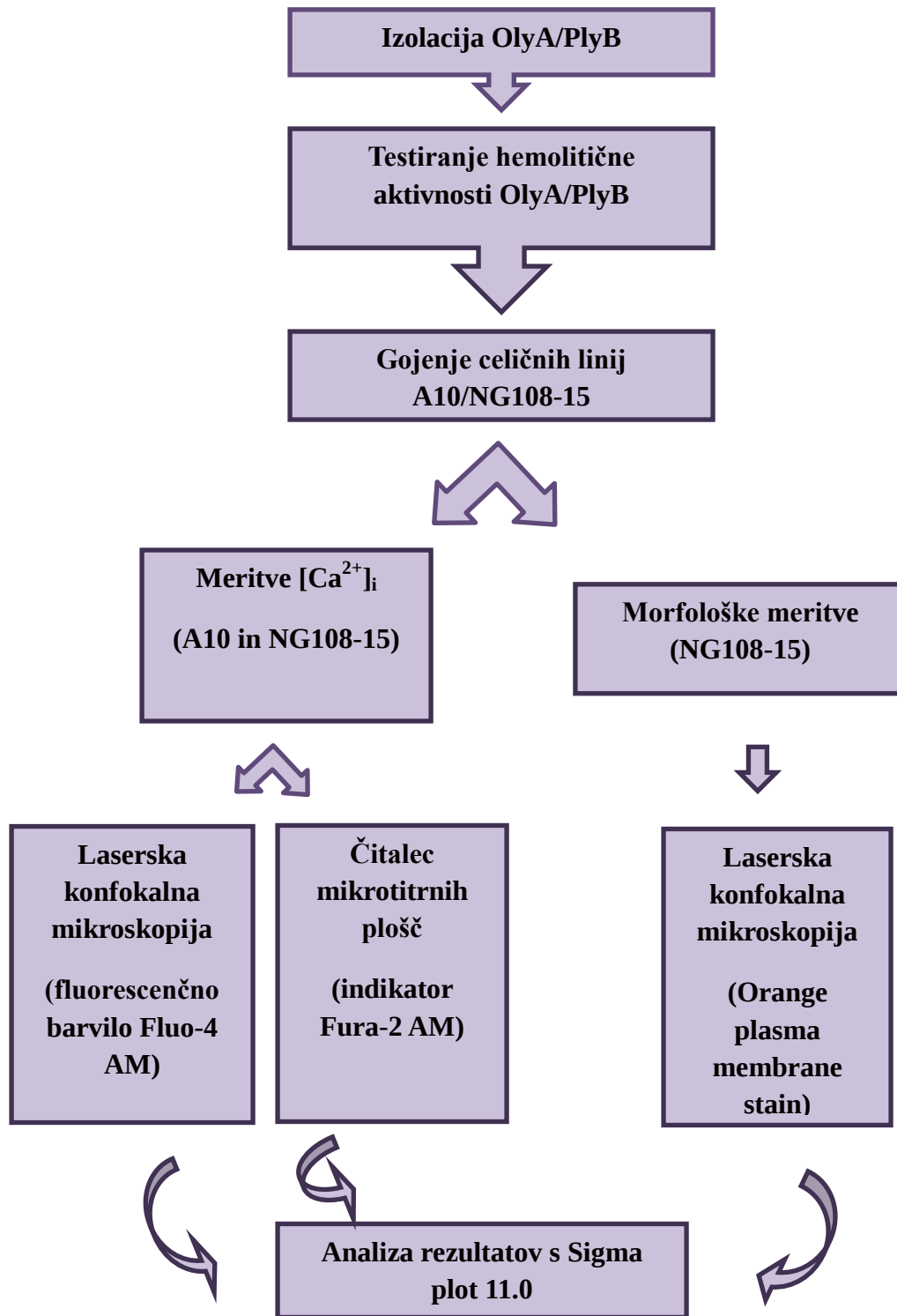
3.2.6 Priprava gladkomišičnih celic A10 in nevroblastomskih celic NG108-15 za meritve koncentracije Ca^{2+} v citosolu z lasersko konfokalno mikroskopijo

Za meritve $[\text{Ca}^{2+}]_i$ z lasersko konfokalno mikroskopijo smo celice gojili v komorah, pritrjenih na predmetno stekelce (Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System). Uporabili smo predmetna stekelca z 8 komorami, ki imajo 0,7 cm^2 gojitvene površine, in uporabili nasaditveno gostoto 3×10^4 celic/komoro ter jih gojili in diferencirali po zgoraj opisanem postopku. Na dan poskusa smo celice trikrat sprali z

DPBS. Nato smo celice inkubirali v sDPBS, ki je vseboval 4 μM Fluo-4 AM, 30 min pri 37 °C in atmosferi z 5 % CO_2 . Po inkubaciji smo celice ponovno trikrat sprali z DPBS in v posamezno komoro dodali 200 μL sDMEM. Tako pripravljene celice smo nato uporabili za meritve $[\text{Ca}^{2+}]_i$ s konfokalnim mikroskopom. Pred dodatkom OlyA/PlyB smo pri maksimalno odprti zaslonki 10 Airyjevih diskov (AD) posneli bazalni fluorescenčni signal skozi celice v vidnem polju. Nato smo v izbrano komoro dodali OlyA/PlyB v proučevani koncentraciji in nadaljevali snemanje, pri čemer smo slike zajemali v časovnem intervalu 1,7 s največ 20 min. Za ekcitacijo Fluo-4 AM smo uporabili argonski laser z ekscitacijsko linijo 488 nm in fluorescenco zajemali v območju valovnih dolžin 505–570 nm. Meritve smo izvedli pri sobni temperaturi (22–24 °C).

3.2.7 Statistične metode

Rezultate smo analizirali s Sigma plot 11.0. programom. Dobljene vrednosti smo obdelali s Studentovim T-testom in pri tem smo upoštevali stopnjo značilnosti $p \leq 0,05$ (*), vrednosti pa smo izrazili kot srednjo vrednost $\pm$ SE.

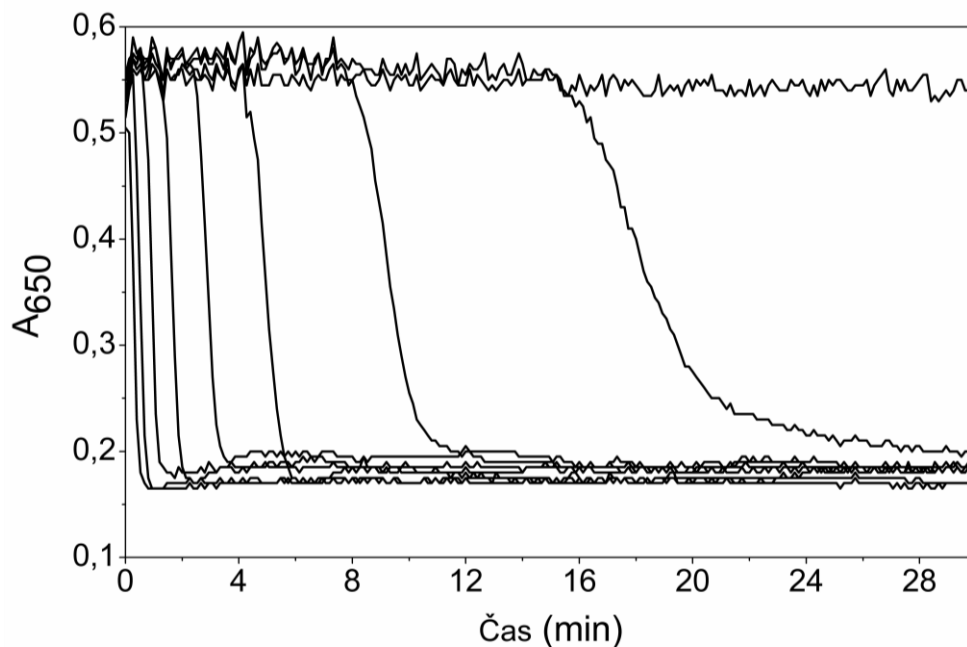


Slika 3 – Eksperimentalni potek naloge.

4 REZULTATI

4.1 Biološka aktivnost OlyA/PlyB

Izoliran OlyA/PlyB povzroči hemolizo ovčjih eritrocitov v nanomolarnih koncentracijah. Časovni potek hemolize ima značilno sigmoidno obliko (Slika 4). Po krajši lag fazi hemoliza steče precej hitro, nato se liza eritrocitov ponovno upočasni. Hitrost hemolize je sorazmerna s koncentracijo dodanega hemolizina.



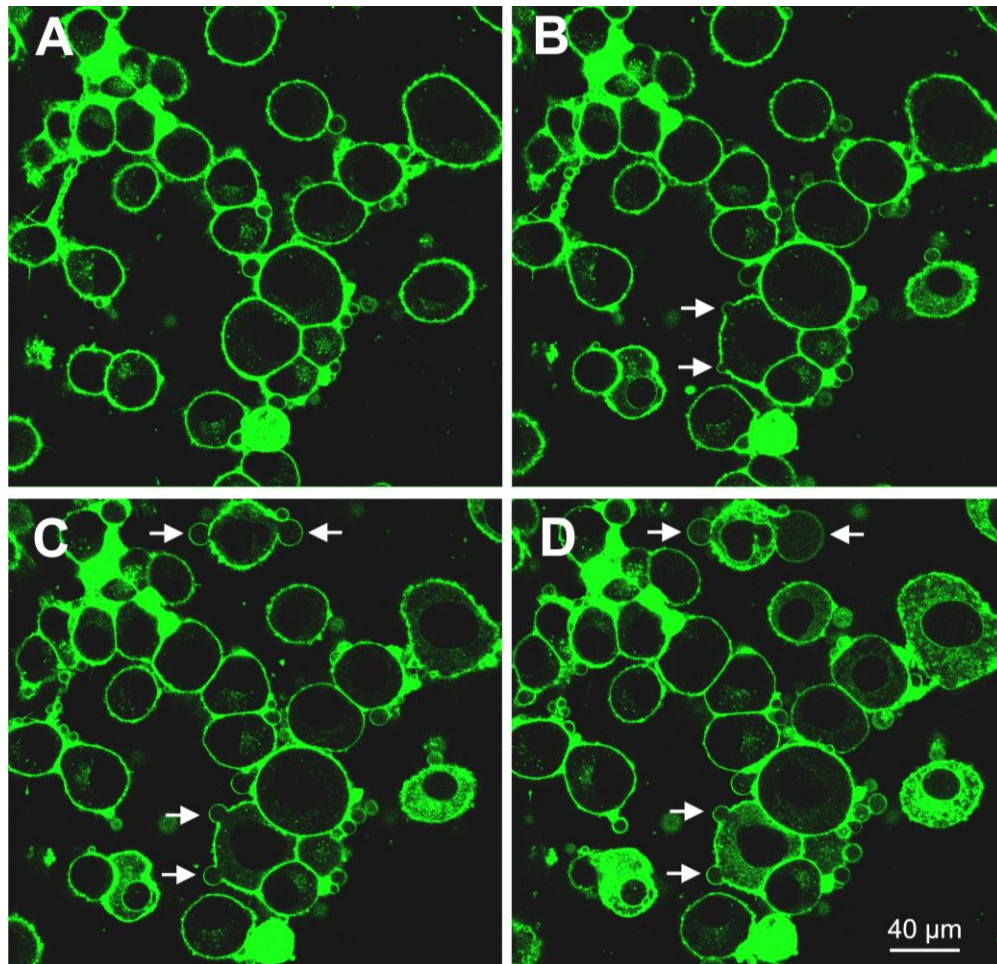
Slika 4 – Časovni potek hemolize ovčjih eritrocitov po dodatku različnih koncentracij OlyA/PlyB

Od leve proti desni: 817 μM /89 μM ; 411 μM /45 μM ; 205 μM /22 μM ; 103 μM /11,2 μM ; 51,3 μM /5,6 μM ; 28 μM /3,1 μM ; 14 μM /1,56 μM ; 7,2 μM /0,8 μM in 3,7 μM /0,4 μM pri pH 7,4 in pri 25°C.

4.2 Nevroblastomske celice NG108-15

4.2.1 Vpliv OlyA/PlyB na morfologijo celic NG108-15

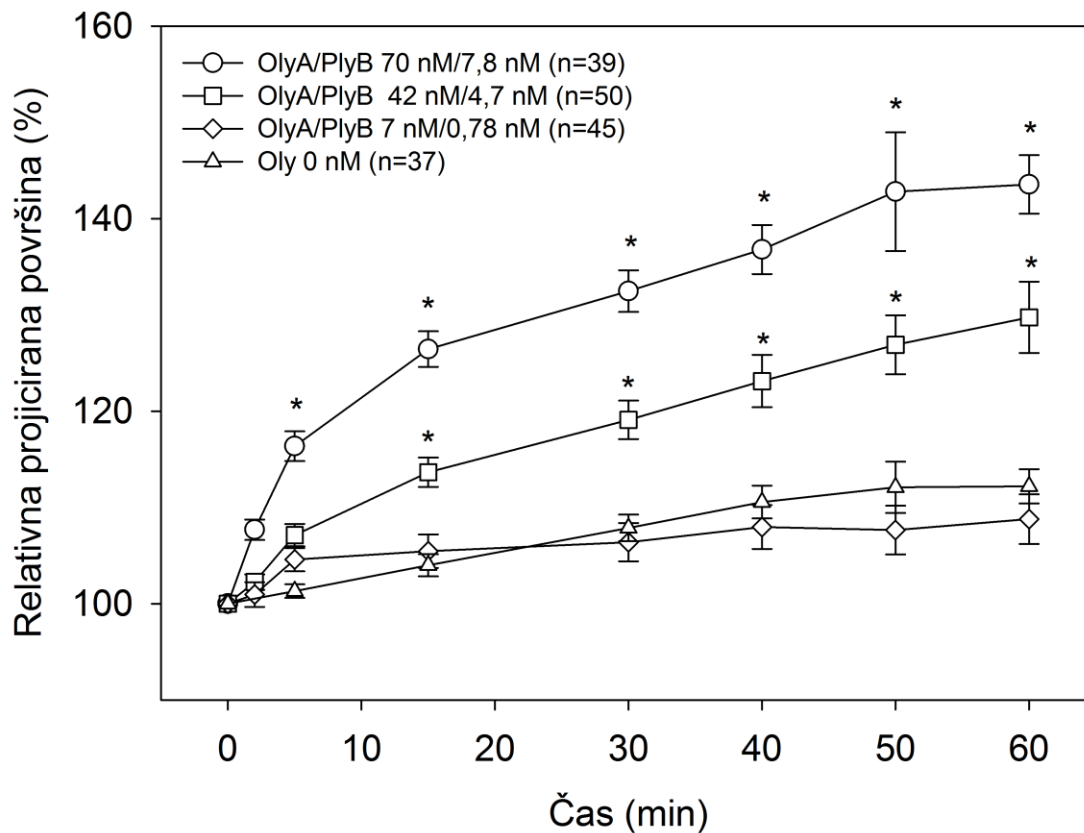
Celice NG108-15 se ob dodatku OlyA/PlyB (42 nM/4,7 nM–70 nM/7,8 nM) v mediju s Ca^{2+} odzovejo s povečanjem površine. Sočasno se pojavijo na površini protruzije celične membrane v obliki mehurčkov (Slika 5).



Slika 5 – Laserska konfokalna mikroskopska slika morfoloških sprememb celic NG108-15, obarvanih z oranžnim barvilom za označevanje celičnih membran, brez in ob prisotnosti OlyA/PlyB (70 nM/7,8 nM).

Slika 5A prikazuje skupino celic NG108-15 pred dodatkom OlyA/PlyB, Slika 5B prikazuje isto skupino celic 15 minut po dodatku OlyA/PlyB, Slika 5C 30 min po dodatku OlyA/PlyB in Slika 5D 45 min po dodatku OlyA/PlyB. Puščice označujejo protruzije celične membrane (mehurčke).

Povečanje površine nevroblastomskih celic po izpostavitvi je premosorazmerno s časom izpostavitve celic in koncentracijo OlyA/PlyB (Slika 6).



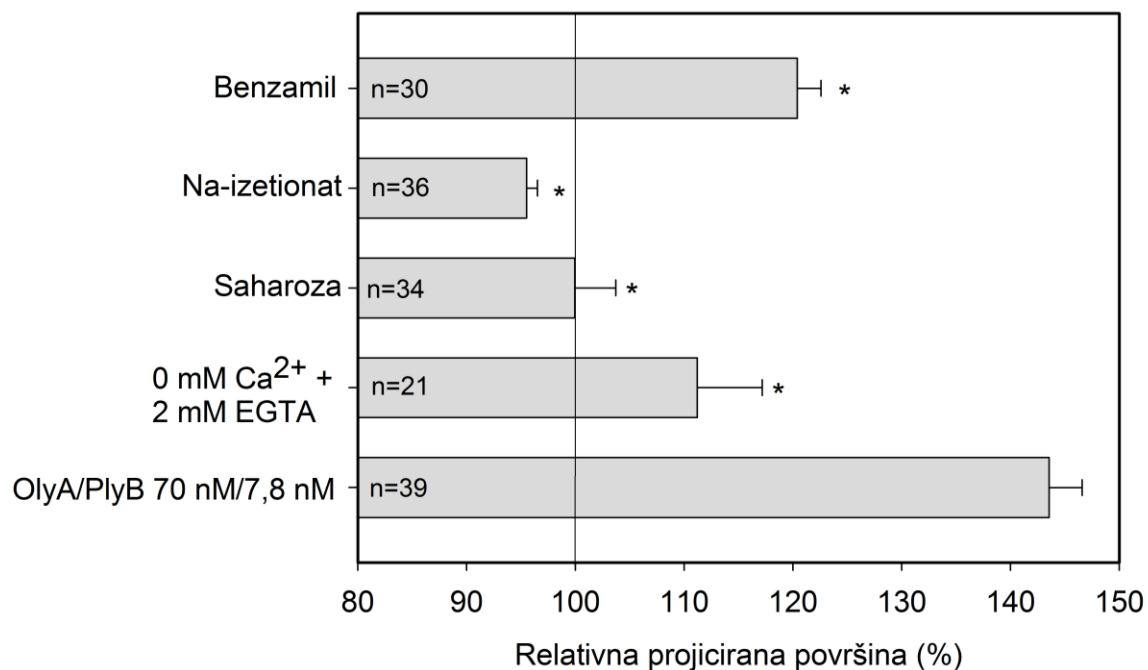
Slika 6 – Časovno odvisne spremembe relativne površine celic NG108-15 po dodatku različnih koncentracij OlyA/PlyB.

Vsak simbol predstavlja srednjo vrednost $\pm$ SE projicirane površine analiziranih celic. Število analiziranih celic je označeno s črko n. *Razlika je statistično značilna pri $p < 0,05$.

V prisotnosti Ca^{2+} v zunajcelični raztopini OlyA/PlyB v koncentracijah 42 nM/4,7 nM in 70 nM/7,8 nM povzroči povečanje volumna celic NG108-15, ki se odrazi kot povečana projicirana površina celic. Pri tem višja koncentracija OlyA/PlyB povzroči večji odziv celic. OlyA/PlyB v koncentraciji 7 nM/0,78 nM ne povzroči značilnega povečanja projicirane površine celic, saj je odziv primerljiv z izmerjenimi vrednostmi pri negativnih kontrolah v mediju s Ca^{2+} in v mediju brez njega brez prisotnosti OlyA/PlyB (Slika 6).

Z uporabo izbranih zaviralcev ionskih kanalčkov in izmenjevalcev, vključenih v regulacijo celičnega volumna oziroma spremembo eksperimentalnih pogojev, smo poskušali razjasniti mehanizem delovanja OlyA/PlyB (Slika 7).

Benzamil, zaviralec NCX, je statistično značilno zmanjšal nabrekanje nevroblastomskih celic ($p \leq 0,05$) izzvanih s 70 nM/7,8 nM OlyA/PlyB. Z OlyA/PlyB induciran nastanek celičnega edema je preprečila tudi ekvimolarna zamenjava NaCl s saharozo ali samo Cl^- z ekvimolarno zamenjavo NaCl s Na-izetionatom. Učinek OlyA/PlyB je značilno manjši tudi v mediju brez Ca^{2+} z dodanim 2 mM EGTA (Slika 7).

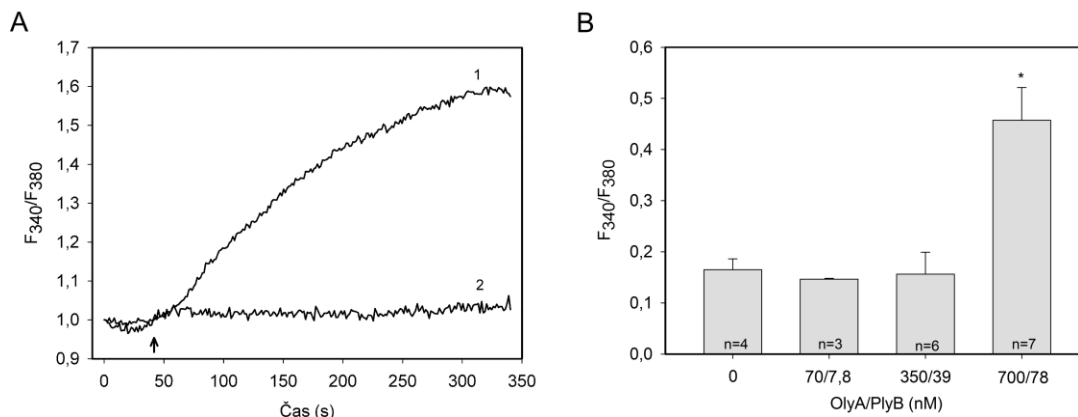


Slika 7 – Spremembe relativne površine celic NG108-15 po dodatku 70 nM/7,8 nM OlyA/PlyB pri različnih pogojih in ob prisotnosti nekaterih zaviralcev ionskih kanalčkov in izmenjevalcev.

Slika prikazuje odziv celic NG108-15 na 70 nM/7,8 nM OlyA/PlyB v prisotnosti 0,5 μM benzamila, selektivnega zaviralca NCX, 138 mM Na-izetionata, ki smo ga ekvimolarno zamenjali za NaCl in 138 mM saharoze, ki smo jo prav tako ekvimolarno zamenjali za NaCl. Pri vseh omenjenih snoveh je bil v zunajcelični tekočini prisoten Ca^{2+} . Celice smo izpostavili tudi mediju brez Ca^{2+} z dodanim 2 mM EGTA in mediju s Ca^{2+} , kateremu smo dodali le OlyA/PlyB. Prikazane so srednje vrednosti $\pm$ SE. *Razlika je statistično značilna pri $p < 0,05$.

4.2.2 Vpliv OlyA/PlyB na koncentracijo Ca^{2+} v citosolu v celicah NG108-15

Vpliv OlyA/PlyB na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ smo ugotavljali na posameznih celicah ter na populaciji celic. Uporabili smo fluorescenčni barvili Fluo-4 AM in Fura-2 AM. Spremembe smo spremljali na ravni konfokalne mikroskopije ter spektrofotometrično s čitalcem mikrotitrnih plošč. Slika 8A prikazuje z 700 nM/78 nM OlyA/PlyB induciran časovni porast razmerja F_{340}/F_{380} , ki je indikator povečane $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (krivulja 1), medtem ko v poskusih, pri katerih v zunajcelični raztopini ni Ca^{2+} , ista koncentracija OlyA/PlyB ne poveča $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (krivulja 2). Prav tako OlyA/PlyB v koncentracijah od 0–350 nM/39 nM ne povzroči porasta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Slika 8B).



Slika 8 – Vpliv različnih koncentracij OlyA/PlyB na spremembo $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v celicah NG108-15 ob prisotnosti zunajceličnega Ca^{2+} in v mediju brez Ca^{2+} in dodanem 2 mM EGTA.

Slika 8A prikazuje časovni porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po dodatku 700 nM/78 nM OlyA/PlyB v mediju s Ca^{2+} (krivulja 1) ter spremembo v $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po dodatku enake koncentracije OlyA/PlyB v mediju brez Ca^{2+} in dodanem 2 mM EGTA (krivulja 2). Puščica prikazuje čas injiciranja OlyA/PlyB. Slika 8B predstavlja srednje vrednosti $\pm$ SE maksimalnih porastov razmerja F_{340}/F_{380} ob prisotnosti različnih koncentracij OlyA/PlyB. n = št. ponovitev pri določeni koncentraciji. *Razlika je statistično značilna pri $p < 0,05$.

4.2.2.1 Vpliv specifičnih zaviralcev, depolarizacije celične membrane in odstranitve Na^+ v zunajcelični raztopini na koncentracijo Ca^{2+} v citosolu inducirano z OlyA/PlyB

Za razjasnitev mehanizma delovanja OlyA/PlyB v povezavi z $[\text{Ca}^{2+}]_i$ smo uporabili farmakološko aktivne snovi, ki delujejo na prenašalne membranske proteine, vključene v homeostazo $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Slika 9 in 10). Slika 9 prikazuje vpliv farmakoloških učinkovin na časovni potek in amplitudo $[\text{Ca}^{2+}]_i$, medtem ko slika 10 prikazuje maksimalne poraste razmerja $[\text{Ca}^{2+}]_i$, inducirane s 700 nM/78 nM OlyA/PlyB pri različnih eksperimentalnih pogojih.

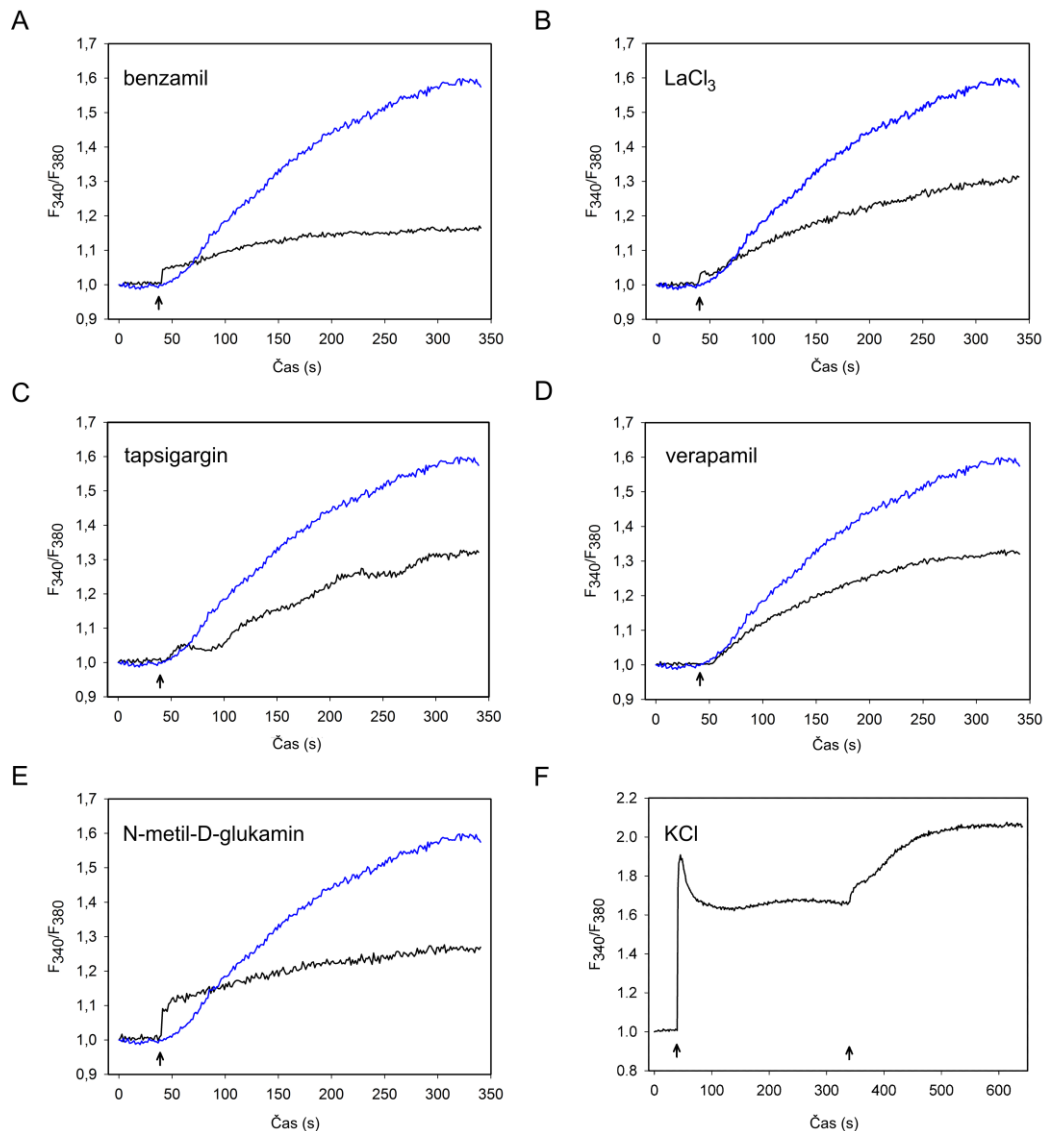
Vlogo NCX pri z OlyA/PlyB spodbujenem porastu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ smo proučili na dva načina: z zaviralcem NCX, benzamilom, in nadomestitvijo NaCl z N-metil-D-glukaminom, ki izniči koncentracijski transmembranski gradient Na^+ , potrebnega za njegovo funkcijo. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili Ca^{2+} ionofor ionomicin, ki pričakovano povzroči najvišji porast v razmerju fluorescenc F_{340}/F_{380} (slika 10). Kot je razvidno iz slike 9A, prisotnost 10 μM benzamila v zunajcelični raztopini statistično značilno zmanjša odziv celic NG108-15 na 700 nM/78 nM OlyA/PlyB ($p \leq 0,05$). Podoben učinek ima ekvimolarna zamenjava NaCl z N-metil-D-glukaminom (Slika 10).

Da bi opredelili vlogo znotrajceličnih zalog Ca^{2+} pri porastu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po dodatku 700 nM/78 nM OlyA/PlyB, smo celice NG108-15 predhodno tretirali z 0,15 μM tapsigarginom (TG). TG je nekompetitivni zaviralec encima Ca^{2+} -ATPaze na ER/SR. TG je zmanjšal odziv pri 700 nM/78 nM OlyA/PlyB, vendar razlika ni bila statistično značilna ($p > 0,05$) (Slika 10).

Povišana koncentracija K^+ v mediju s Ca^{2+} povzroči depolarizacijo celične membrane in prehodni porast Ca^{2+} v celici (Slika 9F). Sprememba $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ob dodatku KCl hitro doseže vrh in začne padati, vendar se ne vrne na osnovno raven pred dodatkom OlyA/PlyB. Kljub temu da so bile celice predhodno depolarizirane, dodatek 700 nM/78 nM OlyA/PlyB povzroči dodatno povišanje (potenciacijo) $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

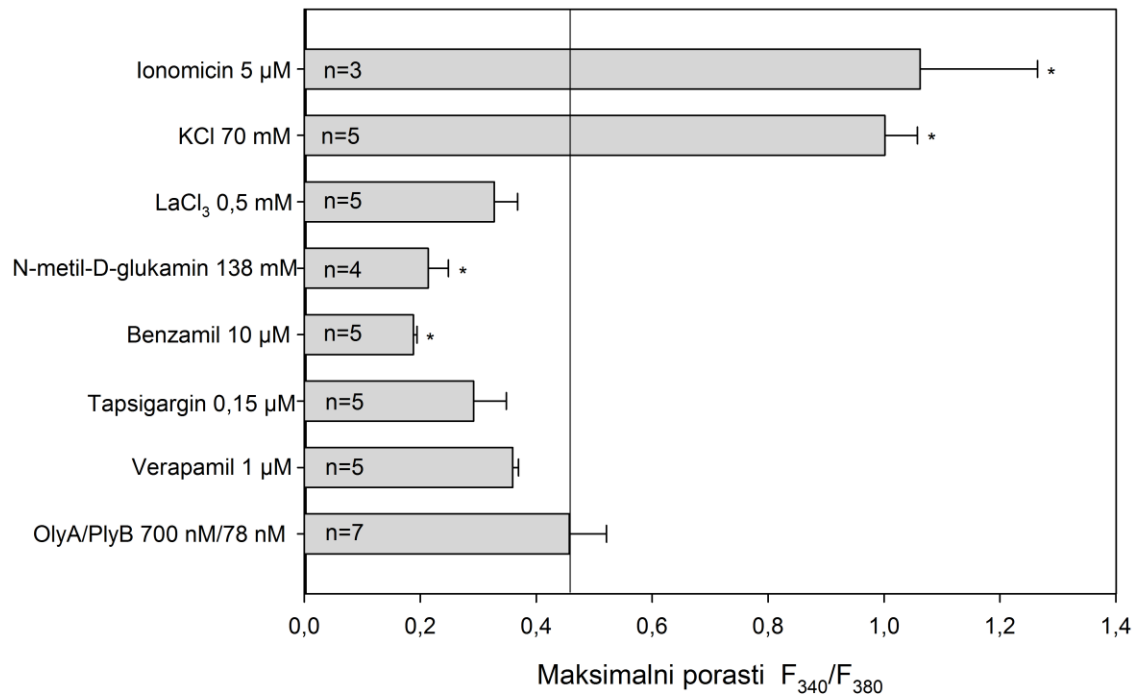
Inkubacija celic in prisotnost verapamila, zaviralca L-tipa kalcijevih kanalčkov, po dodatku OlyA/PlyB bistveno ne zavre porasta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Slika 9D in 10). Prisotnost LaCl_3 ,

ki je nespecifični zaviralec kalcijevih kanalčkov, v zunajcelični raztopini značilno ne vpliva na OlyA/PlyB induciran porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Slika 10).



Slika 9 – Učinek 700 nM/78 nM OlyA/PlyB na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po predinkubaciji celic NG108-15 z različnimi učinkovinami.

Prikazani so časovni poteki sprememb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reprezentativnih poskusov (črna krivulja). Puščice prikazujejo čas injiciranja OlyA/PlyB. Modra krivulja na grafih od A–E prikazuje časovni potek sprememb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po aplikaciji OlyA/PlyB (700 nM/78 nM). Na sliki 9F prva puščica označuje čas injiciranja KCl, druga pa 700 nM/78 nM OlyA/PlyB. Učinek OlyA/PlyB po predhodni izpostavitvi celic (A) 10 μM benzamilu, (B) 0,5 mM LaCl_3 , (C) 0,15 μM TG, (D) 1 μM verapamilu (E) in 138 mM N-metil-D-glukaminu (F) po predhodni depolarizaciji celic z 70 mM KCl.



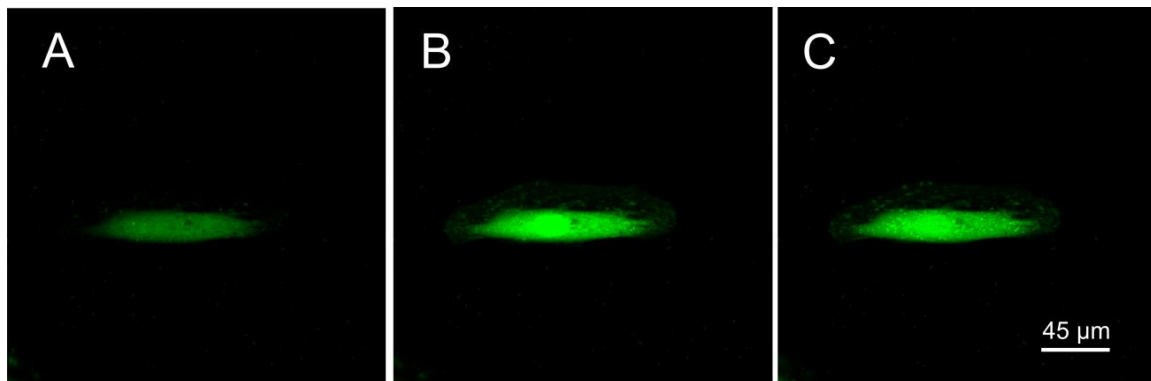
Slika 10 – Maksimalni porasti razmerja F_{340}/F_{380} v celicah NG108-15 po dodatku 700 nM/78 nM OlyA/PlyB in vpliv različnih farmakoloških učinkovin.

Uporabili smo naslednje učinkovine: 70 mM KCl, 0,5 mM LaCl_3 , NaCl smo ekvimolarno zamenjali s 138 mM N-metil-D-glukaminom, 10 μM benzamil, 0,15 μM TG in 1 μM verapamil. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 5 μM ionomicin. Prikazane so srednje vrednosti $\pm$ SE. *Razlika je statistično značilna pri $p < 0,05$.

4.3 Gladkomišične celice A10

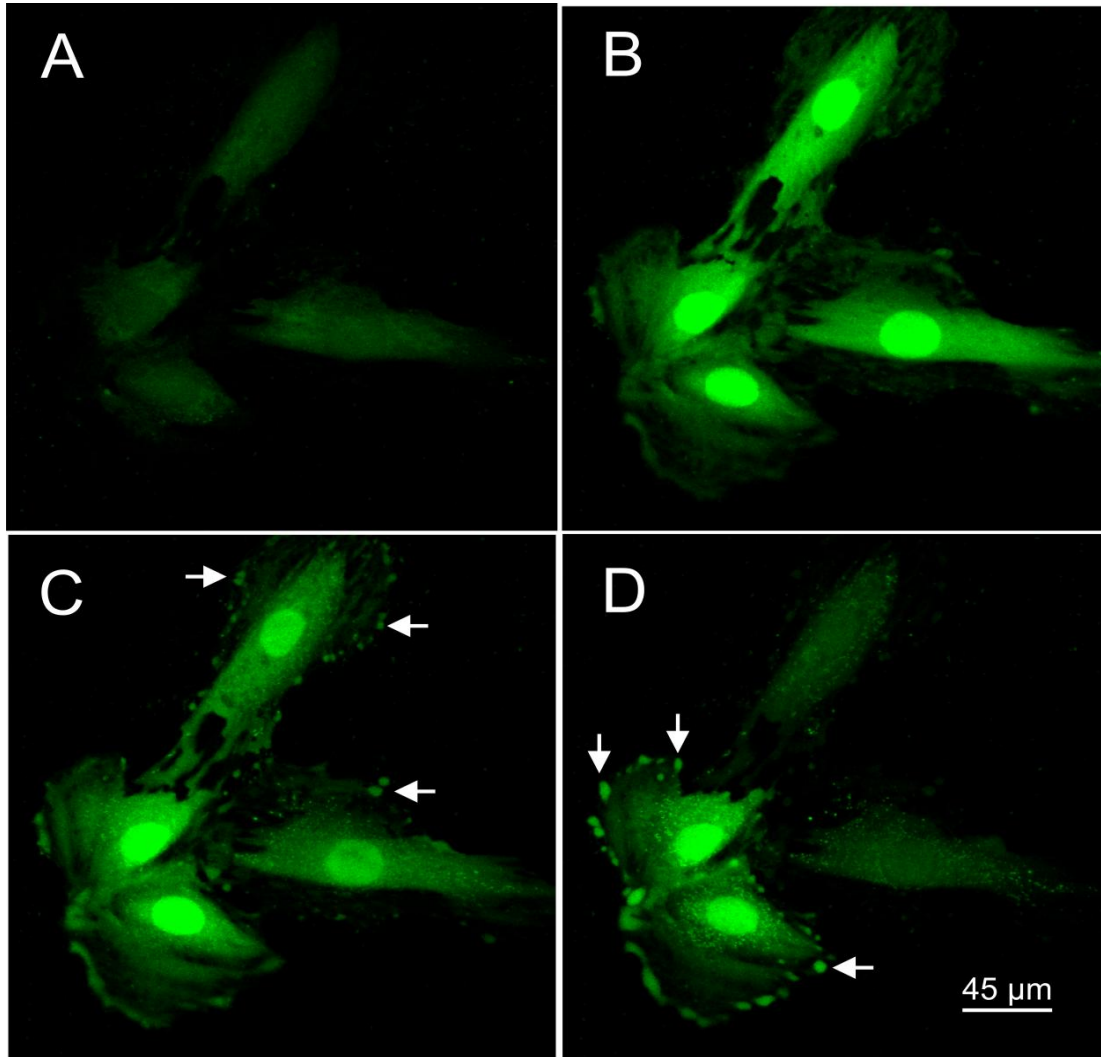
4.3.1 Vpliv OlyA/PlyB na koncentracijo Ca^{2+} v citosolu v gladkomišičnih celicah A10

Povečana $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v gladkomišičnih celicah sproži kontrakcijo, ki v cevastih organih, kot so žile, povzroči vazokonstrikcijo in zmanjšan pretok krvi. OlyA/PlyB v odvisnosti od koncentracije poveča $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v gladkomišičnih celicah A10 in spodbudi oblikovanje membranskih mehurčkov (Sliki 11 in 12). OlyA/PlyB v nižji koncentraciji (175 nM/19,5 nM) povzroči relativno počasen porast v intenziteti fluorescence celic, ki je odraz porasta v $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Slika 11). Pri dvakrat višji koncentraciji OlyA/PlyB (350 nM/39 nM) so spremembe v intenziteti fluorescence celic zaznavne že po 10 min. Višja koncentracija OlyA/PlyB povzroči tudi oblikovanje membranskih mehurčkov (Slika 12).



Slika 11 – Lasersko konfokalna mikroskopska slika gladkomišičnih celic A10 obarvanih s FLUO-4 AM.

Prikazana je celica A10 (A) pred dodatkom, (B) 25 min po dodatku ter (C) 35 min po dodatku 175 nM/19,5 nM OlyA/PlyB v mediju s Ca^{2+} . Na sliki 11B je opazna večja intenziteta fluorescence, kar nakazuje na to, da je prišlo do povečanja $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Po 35 min izpostavljenosti celic 175 nM/19,5 nM OlyA/PlyB se intenziteta fluorescence zmanjšuje. Merilo na sliki 11C velja tudi za sliki 11A in 11B.

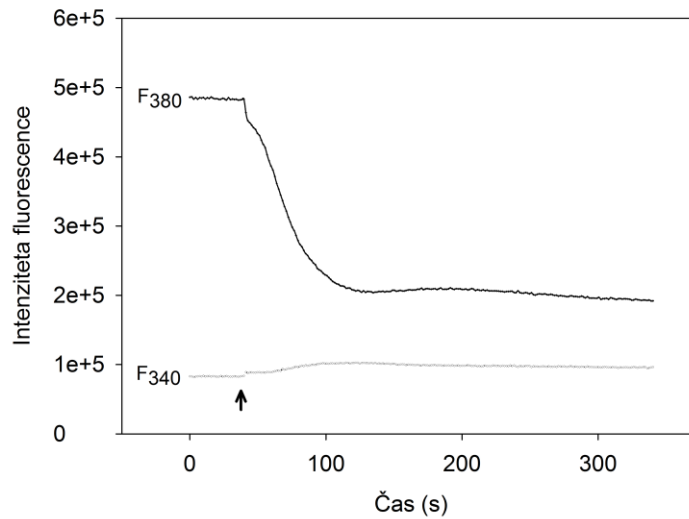


Slika 12 – Lasersko konfokalna mikroskopska slika skupine celic A10, inkubiranih s FLUO-4 AM.

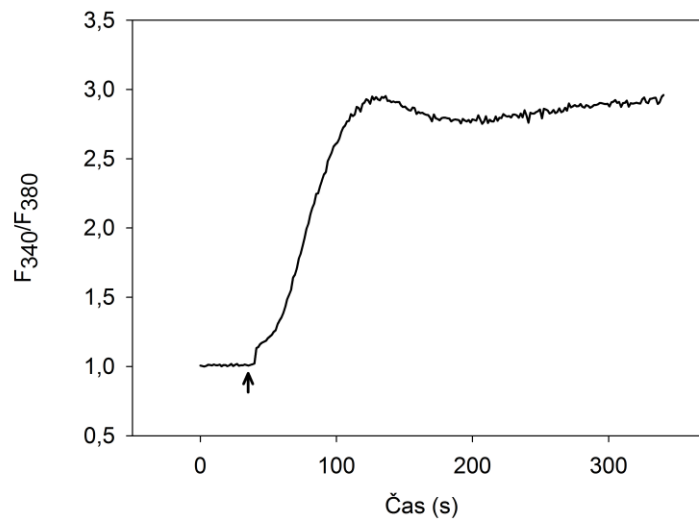
Prikazane so celice A10 (A) pred dodatkom ter (B) 10 min, (C) 12 min in (D) 13 min po dodatku 350 nM/39 nM OlyA/PlyB v mediju s Ca^{2+} . Porast v $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ki se odrazi v povečani intenziteti fluorescence celic, je viden že po 10 minutah izpostavitve celic OlyA/PlyB (Slika 12B). Po 12 min (Slika 12C) se oblikujejo tudi membranski mehurčki. 13 min po dodatku OlyA/PlyB se intenzivnost fluorescence v posameznih celicah zmanjša, pri drugih pa intenziteta signala še narašča; membranski mehurčki so še vedno lepo vidni (Slika 12D). Sčasoma vse celice prenehajo fluorescirati (ni prikazano). Puščice označujejo membranske mehurčke. Merilo na sliki 12D velja tudi za sliki 12A, 12B in 12C.

Na sliki 13 je prikazan značilen časovni potek sprememb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po aplikaciji OlyA/PlyB (700 nM/78 nM).

A



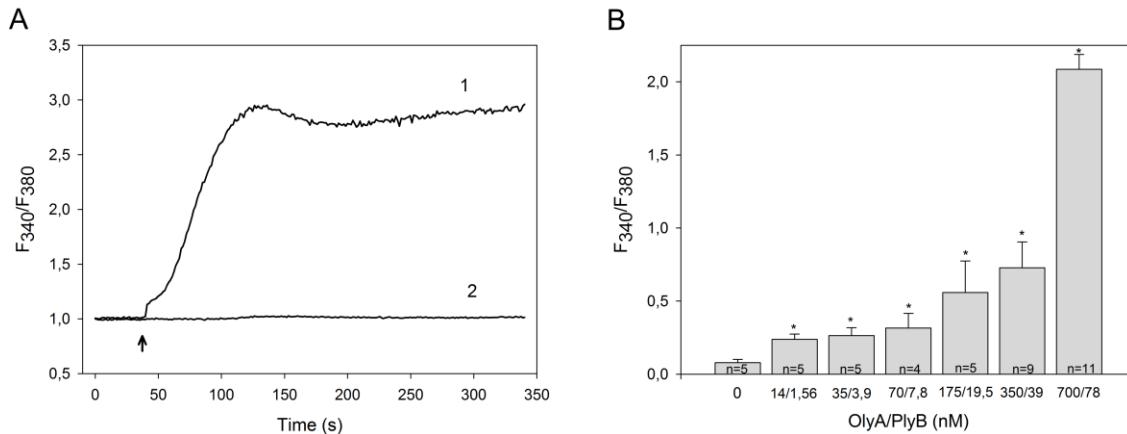
B



Slika 13 – Učinek OlyA/PlyB na časovno odvisne spremembe v intenziteti fluorescenc pri 340 in 380 nm in prikaz sprememb v razmerju F_{340}/F_{380} v celicah A10.

(A) Prikaz časovnih sprememb v intenziteti fluorescenc po dodatku OlyA/PlyB (700 nM/78 nM). Intenziteta fluorescenc pri 380 nm (F_{380}), ki predstavlja fluorescenco prostega indikatorja Fura-2 AM, se po dodatku OlyA/PlyB, zmanjša in F_{340} , ki predstavlja fluorescenco indikatorja Fura-2 AM vezano s Ca^{2+} , poveča. (B) Izračunano razmerje F_{340}/F_{380} se poveča. Puščica prikazuje čas aplikacije OlyA/PlyB.

Na sliki 14 so prikazane časovne spremembe razmerja F_{340}/F_{380} po dodatku OlyA/PlyB. 700 nM/78 nM OlyA/PlyB poveča $[\text{Ca}^{2+}]_i$ samo ob prisotnosti Ca^{2+} v zunajcelični raztopini (Slika 14A, krivulja 1), medtem ko v mediju brez Ca^{2+} z dodanim 2 mM EGTA nima učinka na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Slika 14A, krivulja 2).



Slika 14 – Vpliv OlyA/PlyB na spremembo $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v celicah A10.

Slika 14A prikazuje povečano $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po dodatku 700 nM/78 nM OlyA/PlyB v mediju s Ca^{2+} (krivulja 1) ter odsotnost sprememb v $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po dodatku enake koncentracije OlyA/PlyB v mediju brez Ca^{2+} z dodanim 2mM EGTA (krivulja 2). Puščica označuje čas injiciranja OlyA/PlyB. Slika 14B predstavlja srednje vrednosti $\pm$ SE maksimalnih porastov razmerja F_{340}/F_{380} ob prisotnosti naraščajočih koncentracij OlyA/PlyB. n = št. ponovitev pri določeni koncentraciji. *Razlika je statistično značilna pri $p < 0,05$.

OlyA/PlyB v koncentracijah med 14 nM/1,56 nM in 700 nM/78 nM poveča $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Pražna vrednost OlyA/PlyB, pri kateri pride do opaznega in statistično značilnega povečanja $[\text{Ca}^{2+}]_i$, je 14 nM/1,56 nM. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nato premo sorazmerno narašča v odvisnosti od koncentracije proteina. Pri 700 nM/78 nM koncentraciji OlyA/PlyB učinek strmo naraste (Slika 14B).

4.3.1.1 Vpliv specifičnih zaviralcev, depolarizacija celične membrane in odstranitev Na^+ v zunajcelični raztopini na koncentracijo Ca^{2+} v citosolu, inducirano z OlyA/PlyB

Za razjasnitev mehanizma delovanja OlyA/PlyB v povezavi z $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v celicah A10 smo uporabili enak pristop kot pri celicah NG108-15. Uporabili smo farmakološko aktivne snovi, ki delujejo na prenašalne membranske proteine, vključene v homeostazo $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Sliki 15 in 16). Slika 15 prikazuje vpliv farmakoloških učinkovin na časovni potek in amplitudo $[\text{Ca}^{2+}]_i$, medtem ko slika 16 prikazuje maksimalne poraste razmerja F_{340}/F_{380} inducirane s 700 nM/78 nM OlyA/PlyB pri različnih eksperimentalnih pogojih.

Ionicin, ki smo ga uporabili kot pozitivno kontrolo, pričakovano povzroči porast v koncentraciji Ca^{2+} v citosolu (Slika 16).

Vpliv benzamila (10 μM) na časovni potek in amplitudo $[\text{Ca}^{2+}]_i$ prikazuje slika 15A. Njegova prisotnost v zunajcelični raztopini značilno zmanjša porast Ca^{2+} v citosolu celic A10 po dodatku 700 nM/78 nM OlyA/PlyB ($p \leq 0,05$) (Slika 16).

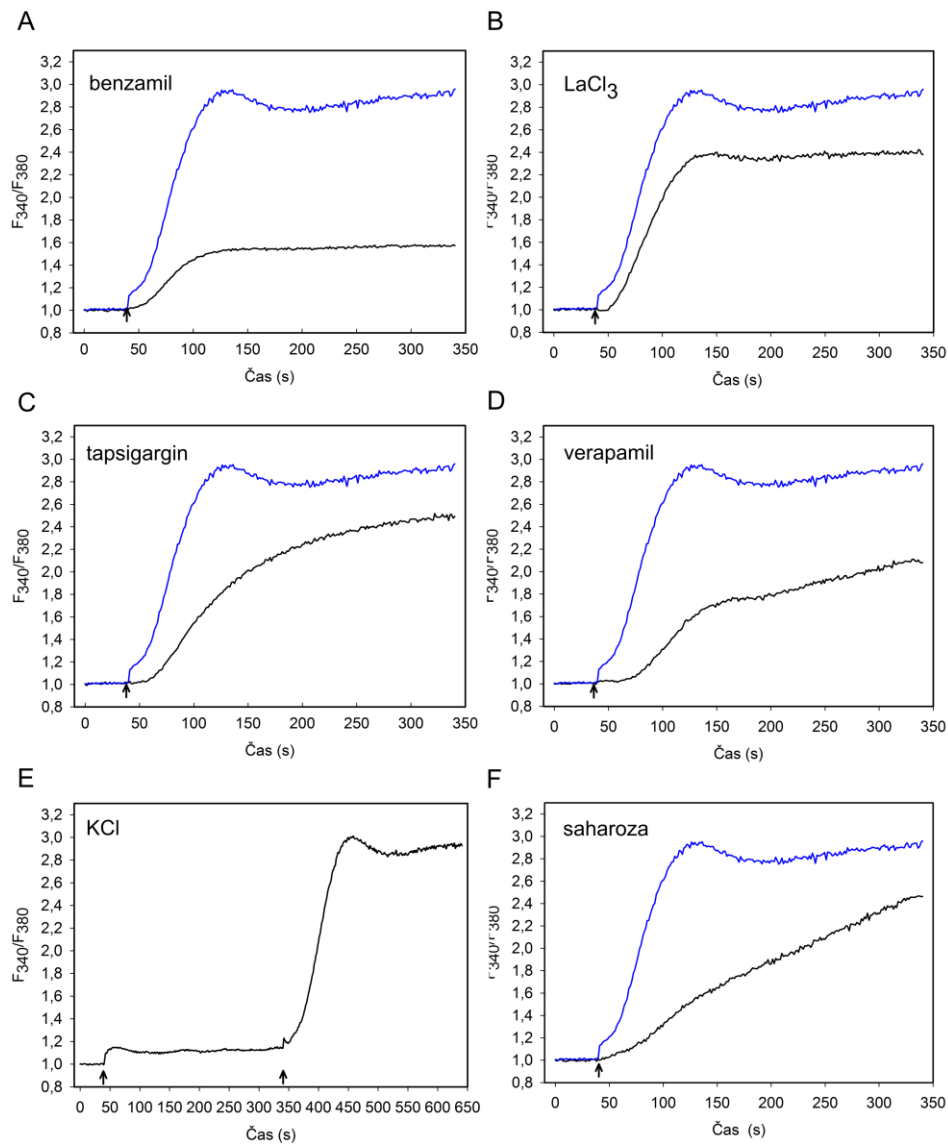
0,5 mM LaCl_3 (Slika 15B), neselektivni zaviralec kalcijevih kanalčkov, in 1 μM verapamil (Slika 15D), zaviralec L-tipa kalcijevih kanalčkov, sta značilno zmanjšala odziv celic A10 na 700 nM/78 nM OlyA/PlyB ($p \leq 0,05$) (Slika 16).

Do statistično zmanjšane $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pride pri uporabi 0,15 μM TG, ki blokira delovanje Ca^{2+} -ATPaze na ER/SR (Slika 15C). Z njegovo uporabo smo želeli ovrednotiti, v kolikšni meri je za povečano $[\text{Ca}^{2+}]_i$ odgovorna sprostitvev Ca^{2+} iz prej omenjenih znotrajceličnih zalog. Maksimalni porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ob prisotnosti TG se značilno zmanjša (slika 16).

Pri izpostavitvi celic povišani koncentraciji K^+ v mediju (70 mM KCl) je prišlo do depolarizacije celične membrane in prehodnega porasta Ca^{2+} v celici kot posledica aktivacije od napetosti odvisnih kalcijevih kanalčkov. KCl hitro doseže vrh in začne upadati, vendar se ne vrne na bazalno raven pred dodatkom OlyA/PlyB. Po dodatku 700 nM/78 nM OlyA/PlyB se $[\text{Ca}^{2+}]_i$ še poveča (Sliki 15E in 16).

Če protein povzroči vdor Na^+ v celice in depolarizacijo celične membrane pod -40 mV, NCX začne delovati v obratni smeri, kar pomeni, da Na^+ prenaša v izvencelični prostor v

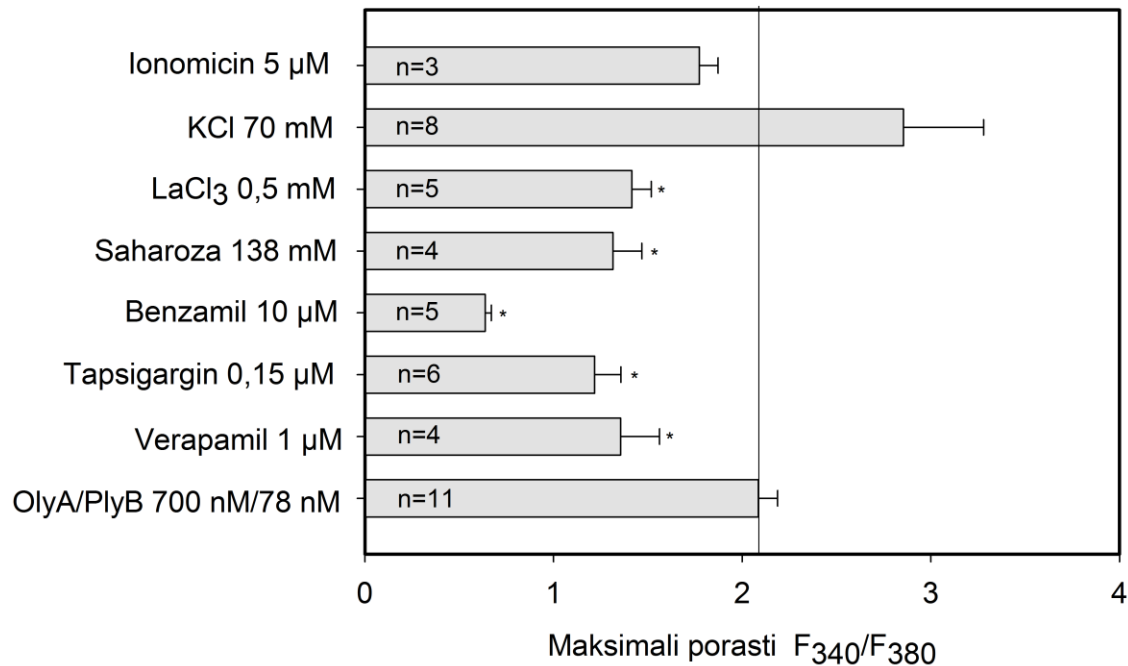
zamenjavo za Ca^{2+} . Na ta način lahko ta prenašalec bistveno prispeva k porastu $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Da bi blokirali in ovrednotili pomen delovanja NCX, smo v zunajcelični tekočini Na^+ ekvimolarno zamenjali s 138 mM saharozo. Maksimalni porasti $[\text{Ca}^{2+}]_i$, inducirani s 700 nM/78 nM OlyA/PlyB, so pri teh pogojih in ob prisotnosti benzamila značilno nižji (Slika 16).



Slika 15 – Učinek OlyA/PlyB na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po predinkubaciji celic A10 z različnimi učinkovinami.

Prikazani so časovni poteki sprememb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reprezentativnih poskusov. Puščice prikazujejo čas injiciranja OlyA/PlyB. Na sliki 15E prva puščica označuje čas injiciranja KCl, druga pa 700 nM/78 nM OlyA/PlyB.

Modra krivulja na grafih A–D in F prikazuje časovni potek sprememb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po aplikaciji OlyA/PlyB (700 nM/78 nM). Učinek OlyA/PlyB po predhodni izpostavitvi celic (A) 10 μM benzamilu, (B) 0,5 mM LaCl_3 , (C) 0,15 μM TG; (D) 1 μM verapamilu (E), po predhodni depolarizaciji celic z 70 mM KCl in (F) po ekvimolarni zamenjavi zunajceličnega Na^+ s saharozo.



Slika 16 – Maksimalni porasti razmerja F_{340}/F_{380} v celicah A10 po dodatku 700 nM/78 nM OlyA/PlyB in vpliv različnih farmakoloških učinkovin.

Uporabili smo: 70 mM KCl, 0,5 mM LaCl_3 , zunajcelični Na^+ smo ekvimolarno zamenjali s 138 mM saharozo, 10 μM benzamil, 0,15 μM TG in 1 μM verapamil. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 5 μM ionomicin. Prikazane so srednje vrednosti s $\pm$ SE. * Razlika je statistično značilna pri $p < 0,05$.

Preglednica 1 - Primerjalna tabela ugotovljenih učinkov OlyA/PlyB v celicah NG108-15 in A10.

	Celice NG108-15	Celice A10
VPLIV OlyA/PlyB NA MORFOLOGIJO CELIC		
NG108-15: OlyA/PlyB 70 nM/7,8 nM A10: OlyA/PlyB 175 nM/19,5 nM	povečanje površine celic in pojav mehurčkov	pojav mehurčkov
SPREMEMBA RELATIVNE POVRŠINE CELIC NG108-15 PRI RAZLIČNIH POGOJIH		
OlyA/PlyB 70 nM/7,8 nM, 0,5 μM benzamil	značilno	np
OlyA/PlyB 70 nM/7,8 nM, 138 mM Na-izetionat	značilno	np
OlyA/PlyB 70 nM/7,8 nM, 138 mM saharoza	značilno	np
OlyA/PlyB 70 nM/7,8 nM, 0 mM Ca^{2+} + 2 mM EGTA	značilno	np
VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ OlyA/PlyB NA $[\text{Ca}^{2+}]_i$		
42 nM/4,7 nM OlyA/PlyB	ni učinka	je učinek
70 nM/7,8 nM OlyA/PlyB	ni učinka	je učinek
350 nM/39 nM OlyA/PlyB	ni učinka	je učinek
700 nM/78 nM OlyA/PlyB	je učinek	je učinek
$[\text{Ca}^{2+}]_i$ IN PRISOTNOST RAZLIČNIH UČINKOVIN		
OlyA/PlyB 700 nM/78 nM, 10 μM benzamil	značilno	značilno
OlyA/PlyB 700 nM/78 nM, 0,5 mM LaCl_3	neznačilno	značilno
OlyA/PlyB 700 nM/78 nM, 0,15 μM TG	neznačilno	značilno
OlyA/PlyB 700 nM/78 nM, 1 μM verapamil	neznačilno	značilno
OlyA/PlyB 700 nM/78 nM, 138 mM N-metil-D-glukamin	značilno	np
OlyA/PlyB 700 nM/78 nM, 70 mM KCl	značilno	neznačilno
OlyA/PlyB 700 nM/78 nM, saharoza	np	značilno

np-ni podatka

5 RAZPRAVA

5.1 Vpliv OlyA/PlyB na morfologijo in koncentracija Ca^{2+} v citosolu nevroblastomskih celic NG108-15

S proučevanjem sistemskih učinkov letalnih in subletalnih odmerkov OlyA/PlyB na podganah v splošni anesteziji so ugotovili, da OlyA/PlyB povzroči kardiorespiratorni zastoj in pogin (9). Celični mehanizmi teh učinkov ostajajo nepojasneni, vendar so rezultati navedene raziskave ovrgli možnost, da imata hipoksija in vagotonija osrednjo vlogo pri nastanku kardiotoksičnih učinkov. OlyA/PlyB povzroči kardiorespiratorni zastoj v različnih eksperimentalnih pogojih, tako pri intaktnih kot tudi pri farmakološko vagotomiranih in umetno ventiliranih podganah. S svojim litičnim delovanjem bi lahko binarni kompleks OlyA/PlyB poškodoval krvno-možgansko pregrado, kar bi mu omogočilo prehod in neposredno delovanje na celice osrednjega živčevja, predvsem nevrone v dihalnem centru (8). Posledica tega bi lahko bila motena funkcija ali celo poškodba dihalnih nevronov in dihalni zastoj, kot je bilo ugotovljeno v poskusih *in vivo* (9). Z nalogo smo želeli proučiti morfološke učinke in mehanizme toksičnega delovanja OlyA/PlyB na celice osrednjega živčevja *in vitro*, zato smo poskuse opravili na mišjih nevroblastomskih celicah NG108-15. Znano je, da lahko OlyA/PlyB tvori neselektivne pore v celični membrani (2). Povečana prevodnost za katione lahko vodi do povečanja ozmolarnosti v nevroblastomskih celicah in nastanek celičnega edema. Vzdrževanje celičnega volumna je funkcija ozmotskega ravnotežja v znotrajceličnem prostoru. Preživetje celic je odvisno od njihove sposobnosti regulacije in vzdrževanja celičnega volumna ter znotrajceličnega okolja (23). Dolgotrajna povečana $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lahko privede do aktivacije številnih znotrajceličnih citotoksičnih mehanizmov. Povečana $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in celični edem močno omejujeta delovanje celic osrednjega živčevja in pogosto vodita v celično smrt (29, 30, 31). Rezultati naših raziskav kažejo, da je mejna koncentracija OlyA/PlyB, pri kateri pride do značilnega povečanja volumna nevroblastomskih celic, 42 nM/4,7 nM; povečanje volumna je premo sorazmerno s časom izpostavljenosti in koncentracijo

OlyA/PlyB. Za razjasnitev mehanizmov toksičnega delovanja OlyA/PlyB, ki privedejo do povečanja volumna, smo nevroblastomske celice NG108-15 izpostavili različnim zaviralcem ionskih kanalčkov in izmenjevalcem v mediju. Ugotovili smo, da je učinek OlyA/PlyB na volumen celic značilno nižji v mediju brez Ca^{2+} , zato sklepamo, da ima zunajcelični Ca^{2+} pomembno vlogo pri povečanju volumna nevroblastomskih celic. Vendar odsotnost Ca^{2+} v mediju ni popolnoma preprečila z OlyA/PlyB izzvanega nabrekanja celic (Slika 6). Koncentracija Na^+ in Cl^- ionov je znatno višja v zunajcelični tekočini ($\text{Na}^+ \sim 150 \text{ mM}$, $\text{Cl}^- \sim 100 \text{ mM}$) kot znotraj celice ($\text{Na}^+ \sim 3\text{-}5 \text{ mM}$ in $\text{Cl}^- \sim 4 \text{ mM}$). Ugotoviti smo želeli, ali je vdor Na^+ in Cl^- v nevroblastomske celice odgovoren za nabrekanje nevroblastomskih celic in nastanek celičnega edema. Prehod Na^+ ali Cl^- (lahko tudi obeh) v znotrajcelični prostor bi povečal ozmotski tlak v citosolu in prehod molekul vode iz zunajcelične tekočine v znotrajcelični prostor na podlagi povečanega celičnega ozmotskega tlaka. Celične membrane so zelo propustne za molekule vode in povečan prehod v celico privede do celičnega edema. Za proučitev te hipoteze smo Na^+ in Cl^- v mediju ekvimolarno zamenjali s saharozo, za katero je celična membrana nepropustna. V teh pogojih je zaradi odsotnosti Na^+ in nizkega ali celo obrnjenega koncentracijskega gradienta onemogočeno tudi delovanje NCX. Volumen nevroblastomskih celic se v teh eksperimentalnih pogojih po dodatku $70 \text{ nM}/7,8 \text{ nM}$ OlyA/PlyB ni povečal, kar kaže na pomen vdora Na^+ in Cl^- v nevroblastomske celice v mehanizmu nastanka celičnega edema. Te rezultate dodatno podpira ugotovitev, da OlyA/PlyB v celičnih membranah nevroblastomskih N18 in celic CHO-K1 oblikuje kationsko neselektivne pore, kar so potrdile meritve prevodnosti posamezne pore in transmembranskega toka (2). Ugotovili so tudi, da OlyA/PlyB v membrani eritrocitov oblikuje pore s hidrodinamskim premerom $3,78 \text{ nm}$, kar privede do osmotske hemolize (2). Benzamil, ki je selektivni antagonist NCX (32), delno zmanjša maksimalni učinek OlyA/PlyB, vendar je njegova vloga v procesu nastanka celičnega edema verjetno majhna, saj smo ugotovili, da povečanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ki ga inducira OlyA/PlyB, izmerimo šele pri $700 \text{ nM}/78 \text{ nM}$ koncentraciji, torej pri ~ 16 -krat višji koncentraciji, kot je potrebna za nastanek celičnega edema. V poskusih, kjer smo v mediju Na^+ ekvimolarno zamenjali z Na-izetionatom (odstranili Cl^- v mediju), se volumen nevroblastomskih celic ni povečal.

Še več, volumen celic se je celo nekoliko zmanjšal. Iz tega sklepamo, da je prehod Cl^- v znotrajcelični prostor pomemben pri nastanku celičnega edema. Pomen vdora zunajceličnega Ca^{2+} v citosol nevronov skozi NCX pri nastanku celičnega edema ostaja nepojasnen. Ta izmenjevalec izkorišča velik koncentracijski transmembranski gradient Na^+ in v fizioloških pogojih deluje tako, da Ca^{2+} transportira v zunajcelični prostor v zamenjavo za 3Na^+ (33, 34). Transport poteka v nasprotni smeri v primeru depolarizacije membrane, ko je membranski potencial pod - 40 mV. Če bi OlyA/PlyB povzročil vdor Ca^{2+} v celico, bi se izmenjevalec lahko aktiviral in bi pričel v zameno za Na^+ Ca^{2+} prenašati iz celice. Zanimivo je, da je zaviralec NCX preprečil porast volumna nevroblastomskih celic izzvanega s koncentracijami OlyA/PlyB, ki niso povzročile porasta $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ta razkorak je lahko posledica majhne rezidualne prehodnosti celične membrane za Ca^{2+} , ki je z našo metodo meritev $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nismo zaznali. OlyA/PlyB (2,7 μM /0,3 μM) tvori neselektivne kationske pore v celični membrani nevroblastomskih celic N18 (2), zato smo proučili tudi vpliv OlyA/PlyB na $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Za porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je potrebna ≈ 16 -krat višja koncentracija OlyA/PlyB kot tista, ki povzroči nastanek edema nevroblastomskih celic. Koncentracijo 700 nM/78 nM smo uporabili v vseh nadaljnjih poskusih kot smiselno koncentracijo, ki je dosežena po sistemskem dodatku podganam in povzroči kardiorespiratorne učinke. Povečana aktivnost Ca^{2+} v nevroblastomskih celicah je posledica vdora Ca^{2+} iz zunajceličnega prostora, kar potrjujejo poskusi, pri katerih v mediju ni bilo Ca^{2+} . V teh eksperimentalnih pogojih OlyA/PlyB ne inducira porasta $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Znano je, da lahko vdor Ca^{2+} iz zunajceličnega prostora aktivira sproščanje znotrajceličnih rezerv Ca^{2+} (30). Da bi preverili, ali znotrajcelične zaloge Ca^{2+} prispevajo k OlyA/PlyB inducirane maksimalnemu porastu Ca^{2+} v citoplazmi nevroblastomskih celic, smo celice predhodno izpostavili TG, zaviralcu Ca^{2+} -ATPaze, ki se nahaja na ER, in z njim izpraznili znotrajcelične zaloge Ca^{2+} . Po dodatku OlyA/PlyB je kljub blokadi Ca^{2+} -ATPaze časovni potek in maksimalni porast Ca^{2+} v celicah podoben kot pri poskusih v mediju brez TG. Na podlagi rezultatov teh meritev sklepamo, da ima zunajcelični Ca^{2+} pri porastu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ najpomembnejšo vlogo in da sproščanje znotrajceličnih rezerv Ca^{2+} bistveno ne prispeva k povečanju z OlyA/PlyB inducirane $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

V poskusih, kjer smo pred dodatkom OlyA/PlyB celično membrano depolarizirali s KCl, smo poskušali pojasniti vpliv od napetosti odvisnih kalcijevih kanalčkov na porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ki so v teh pogojih inaktivirani. Povišana koncentracija K^+ v mediju je sprožila depolarizacijo celične membrane nevroblastomskih celic in prehodno povišanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ki je hitro dosegla vrh in nato začela upadati, vendar bazalne ravni pred dodatkom OlyA/PlyB ni dosegla. Po dodatku OlyA/PlyB je kljub predhodni depolarizaciji s KCl prišlo do porasta $[\text{Ca}^{2+}]_i$, katere amplituda je bila podobna tisti, ki jo izzove sam OlyA/PlyB. Zato sklepamo, da aktivacija od napetostno odvisnih kalcijevih kanalčkov pri povečani $[\text{Ca}^{2+}]_i$, inducirani z OlyA/PlyB, nima pomembne vloge. To so potrdili tudi rezultati poskusov, pri katerih smo uporabili verapamil, zaviralec L-tipa kalcijevih kanalčkov (35), in LaCl_3 , neselektivni zaviralec dvovalentnih kationskih kanalčkov (36). Nobeden od proučenih zaviralcev ni značilno znižal z OlyA/PlyB inducirane spremembe v $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da povečana $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ni posledica prehoda Ca^{2+} skozi omenjene kalcijeve kanalčke ali pa je prehod premajhen, da bi izzval povečanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Glede na to, da je bilo ugotovljeno, da OlyA/PlyB v nevroblastomskih celicah N18 tvori kationsko neselektivne pore (2), bi lahko OlyA/PlyB povzročil tudi porast Na^+ v celici in depolarizacijo membrane. Zato bi lahko NCX, ki v normalnih pogojih iz celice prenaša Ca^{2+} za izmenjavo za Na^+ , začel delovati v nasprotni smeri (37). Na ta način bi prispeval k porastu $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Maksimalni porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v poskusih, kjer smo zunajcelični NaCl nadomestili s slabo prehajajočim kationom skozi membrane, N-metil-D-glukaminom, so bili maksimalni porasti $[\text{Ca}^{2+}]_i$ značilno nižji. Te ugotovitve potrjujejo tudi rezultati poskusa z uporabo zaviralca NCX, benzamila, ki je prav tako značilno znižal maksimalni porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v nevroblastomskih celicah po dodatku OlyA/PlyB.

Zato lahko zaključimo, da ima pri nevroblastomskih celicah NCX pomembno vlogo pri OlyA/PlyB induciranem porastu $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

5.2 Vpliv OlyA/PlyB na koncentracijo Ca^{2+} v citosolu v gladkomišičnih celicah A10

V poskusih na podganah *in vivo* je bilo ugotovljeno, da OlyA/PlyB povzroči srčne aritmije in progresivni padec arterijskega tlaka, kar vodi v pogin poskusne živali (9). *In vitro* je bilo dokazano, da OlyA/PlyB v odvisnosti od koncentracije sproži vazokonstrikcijo prašičjih venčnih (koronarnih) arterij (20), ki je verjetno odgovorna za kardiotoksične učinke OlyA/PlyB. Skrčitev gladkomišičnih celic v steni venčnih žil lahko pri majhnem zmanjšanju preseka žil močno zmanjša pretok krvi, saj je odvisen od četrte potence polmera žil ter vodi v hipoksijo miokarda in do nastanka aritmij. Domnevo, da OlyA/PlyB lahko povzroči krčenje gladkomišičnih celic neposredno na celičnem nivoju, smo preverjali s poskusi na gladkomišičnih celicah A10 *in vitro*.

Celična signalizacija, ki vključuje spremembe prostega Ca^{2+} ima v gladkomišičnih celicah številne funkcije (38). Med njimi je funkcionalno najpomembnejša kontrakcija in vzdrževanje mišičnega tonusa v steni cevastih in votlih organov, kot so npr. žile. Porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v gladkomišičnih celicah povzroči vezavo Ca^{2+} na celični protein kalmodulin. Ta kompleks nato aktivira encim kinazo lahke verige miozina (ang. myosin light chain kinase; MLCK), ki fosforilira lahko verigo miozina in omogoči interakcijo z aktinskimi nitkami in krčenje (39). Zato smo proučili, ali OlyA/PlyB v gladkomišičnih celicah A10 poveča $[\text{Ca}^{2+}]_i$, saj vemo, da povišana $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sproži kontrakcijo miocitov in na ta način uravnava tonus gladkomišičnih celic žilne stene in presek žil. Povečana raven $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lahko povzroči krčenje gladkomišičnih celic in krč koronarnih žil, posledično ishemijo in na koncu hipoksično poškodbo kardiomiocitov.

Vpliv OlyA/PlyB na homeostazo $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na posameznih celicah A10 smo proučevali z meritvami fluorescence z laserskim konfokalnim mikroskopom, pri čemer smo kot indikator Ca^{2+} uporabili fluorescenčno barvilo Fluo-4 AM. Celice smo izpostavili različnim koncentracijam OlyA/PlyB. Porast intenzitete fluorescenčnega signala pri 510 nm nakazuje, da je v celicah prišlo do porasta Ca^{2+} (Slika 11). Pri 350 nM/39 nM koncentraciji smo na podlagi fluorescence v celični membrani opazili oblikovanje protruzij v obliki mehurčkov. Znano je, da je pojav mehurčkov vsesplošen celični odgovor na poškodbo celične membrane, ki ji pogosto sledi celična smrt ali nekroza (40).

V prid poškodbi celične membrane govori tudi hiter padec fluorescence, ki sledi maksimalnemu porastu fluorescence po dodatku OlyA/PlyB v medij. Hiter padec fluorescence je verjetno posledica izgube barvila skozi poškodovano celično membrano zaradi litičnega učinka OlyA/PlyB. Povečanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ki jo sproži OlyA/PlyB, potrjujejo tudi meritve poskusov na populaciji celic A10, izvedenih na čitalcu mikrotitrnih plošč z uporabo kalcijevega indikatorja Fura-2 AM. Analiza razmerij F_{340}/F_{380} kot indikatorja sprememb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je potrdila prvotno hipotezo, da OlyA/PlyB dejansko poveča raven $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Slika 13).

Povečan $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po dodatku OlyA/PlyB je posledica vdora zunajceličnega Ca^{2+} v celico (Slika 14), kar so pokazale meritve $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na celicah A10 v mediju brez Ca^{2+} in dodani 2 mM EGTA. To ni nepričakovano, saj so zaloge znotrajceličnega Ca^{2+} majhne in krčenje gladkomišičnih celic odvisno predvsem od vdora zunajceličnega Ca^{2+} . Za razliko od nevroblastomskih celic, pri katerih pride do povečanja $[\text{Ca}^{2+}]_i$ šele pri 700 nM/78 nM OlyA/PlyB, pa pri celicah A10 povečanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ izzovejo že zelo nizke koncentracije OlyA/PlyB, tj. 14 nM/1,56 nM.

Najpomembnejša pot za vdor kalcija v gladkomišične celice so od napetosti odvisni kalcijevi kanalčki (41, 42). Zato smo proučili mehanizme, ki omogočijo z OlyA/PlyB induciran porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v celicah A10. S serijo poskusov smo na populaciji celic fluorometrično spremljali spremembe v $[\text{Ca}^{2+}]_i$, povzročene z OlyA/PlyB. Predpostavili smo, da je povečanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lahko posledica i) vdora Ca^{2+} iz zunajceličnega medija skozi že obstoječe kalcijeve kanalčke, ii) tvorbe *de novo* kationsko neselektivnih por, prepustnih za Ca^{2+} v celični membrani ali iii) sprostitve Ca^{2+} iz znotrajceličnih zalog, v glavnem iz SR.

Poskuse smo izvedli ob prisotnosti dveh zaviralcev, LaCl_3 - neselektivnega zaviralca kalcijevih kanalčkov - ali z uporabo verapamila - zaviralca L-tipa kalcijevih kanalčkov, ki prevladujejo v celični membrani gladkomišičnih celic (41, 42). Ugotavljali smo, ali je za povečanje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ odgovoren vdor zunajceličnega Ca^{2+} skozi že obstoječe od napetosti odvisne kalcijeve kanalčke v celični membrani.

Rezultati kažejo, da je porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po dodatku 700 nM/78 nM OlyA/PlyB značilno nižji, kar pomeni, da je za pomemben del povečanja $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ki ga povzroči OlyA/PlyB, odgovoren vstop Ca^{2+} v gladkomišične celice skozi napetostno odvisne kalcijeve kanalčke (Slika 15). Da bi ugotovili, ali je za vdor Ca^{2+} v celico in aktivacijo kalcijevih kanalčkov odgovorna depolarizacija celične membrane in predvsem aktivacija od napetosti odvisnih kalcijevih kanalčkov, smo gladkomišične celice predhodno izpostavili povišani koncentraciji K^+ v mediju. Od napetosti odvisni kalcijevi kanalčki naj bi bili v teh eksperimentalnih pogojih inaktivirani. Dodatek OlyA/PlyB je kljub predhodni depolarizaciji celične membrane privedel do značilnega porasta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v gladkomišičnih celicah A10, kar nakazuje, da so za z OlyA/PlyB induciran porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ odgovorne druge poti vdora Ca^{2+} v celice in ne od napetosti odvisni kalcijevi kanalčki.

K povečanju $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bi lahko v primeru depolarizacije celične membrane prispeval tudi NCX v celični membrani gladkomišičnih celic. Rezultati poskusov, pri katerih smo uporabili neselektivni zaviralec benzamil ali Na^+ in Cl^- v mediju ekvimolarno zamenjali s saharozo, to dokazujejo. Preverjali smo hipotezo, da OlyA/PlyB povzroči vdor Na^+ v gladkomišične celice ter s tem povzroči depolarizacijo membrane, zato začne NCX delovati v nasprotni smeri, tj da v zameno za izplavljanje Na^+ v celico črpa Ca^{2+} . Ta sicer fiziološki mehanizem je pomemben v času nastanka akcijskih potencialov v vzdraznih tkivih, še posebej je pomemben za fiziologijo krčenja kardiomiocitov, saj bistveno prispeva k porastu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in krčenju srčne mišice (36). Rezultati teh poskusov kažejo, da je prišlo do značilnega znižanja maksimalnega porasta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v gladkomišičnih celicah, kar potrjuje domnevo, da ima NCX pomembno vlogo pri povečanju $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Do povečanja $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bi lahko prišlo tudi zaradi njegove sprostitve iz znotrajceličnih zalog, predvsem iz SR, zato smo z predhodno izpostavitvijo gladkomišičnih celic TG povzročili izpraznjenje najpomembnejših znotrajceličnih rezerv Ca^{2+} . Po dodatku OlyA/PlyB je bil maksimalni porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$ značilno nižji (Slika 16). Torej je maksimalni porast $[\text{Ca}^{2+}]_i$, povzročen z OlyA/PlyB, odvisen tudi od Ca^{2+} , sproščenega iz celičnih organelov, ki so občutljivi na omenjeni zaviralec.

Povečana $[\text{Ca}^{2+}]_i$, inducirana z OlyA/PlyB je v gladkomišičnih celicah, je verjetno posledica nastanka kationsko neselektivnih por v celični membrani, pomembno pa tudi prispeva NCX. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da OlyA/PlyB poveča znotrajcelično aktivnost Ca^{2+} v gladkomišičnih celicah, kar lahko privede do vazospazma, za kardiotoksičnost pa je odgovoren neposreden učinek OlyA/PlyB na gladkomišične celice v steni venčnih žil. Pri obeh celičnih linijah k povečani $[\text{Ca}^{2+}]_i$ prispeva NCX in verjetno tvorba kationsko neselektivnih por. Celični edem pa je predvsem posledica prehoda klorovih ionov v znotrajcelični prostor. Povečana $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v nevroblastomskih celicah in celični edem sta lahko razloga za respiratorni zastoj po sistemski aplikaciji OlyA/PlyB.

6 ZAKLJUČKI

1. OlyA/PlyB v nanomolarnih koncentracijah povzroči vezikulacijo celične membrane in poveča tridimenzionalno projekcijo nevroblastomskih celic, kar pomeni, da je sposoben povzročiti celični edem, disfunkcijo dihalnih nevronov in dihalni zastoj *in vivo*.
2. OlyA/PlyB dolgotrajno poveča $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v gladkomišičnih in nevroblastomskih celicah, ki lahko v gladkomišičnih celicah sprožijo krčenje, odgovorno za vazospazem in kardiotoksične učinke, v nevroblastomskih celicah pa patofiziološke celične procese, ki vodijo v smrt celic.
3. Povečana $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je pri nevroblastomskih celicah verjetno posledica vdora Ca^{2+} skozi novo nastale pore, pri gladkomišičnih celicah pa tudi skozi obstoječe kalcijeve kanalčke in NCX v celični membrani ter sproščanja iz znotrajceličnih zalog.

7 ZAHVALA

Delo je potekalo na Inštitutu za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo in Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani ter na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakulteta Univerze v Ljubljani od februarja 2012 do februarja 2014.

Najprej bi se rada v največji meri zahvalila mentorju prof. dr. Robertu Frangežu, ki naju je navdušil za opravljanje Prešernove raziskovalne naloge s področja toksikologije, kjer smo na celičnem in subceličnem nivoju ugotavljali mehanizme delovanja proteinskega kompleksa OlyA/PlyB. Zahvaljujema se mu za ves trud in prizadevnost pri izdelavi najine naloge, saj je ves čas z zanimanjem in nasveti spremljal najino delo ter je v največji meri zaslužen, da sva skupni projekt izpeljala do konca.

Zahvaljujema se tudi somentorici prof. dr. Milki Vrecl za vso potrpežljivost pri delu v laboratoriju in za veščine, ki sva jih pri tem osvojila ter za pomoč pri pregledu naloge.

Nenazadnje ne moreva niti mimo prof. dr. Kristine Sepčič, ki nama je v laboratoriju Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani omogočila izvedbo postopka izolacije proteinskega kompleksa in njegovo nadaljnje proučevanje učinka na gladkomišične in nevroblastomske celice.

Rada bi se zahvalila tudi Katarini Babnik, ki nama je pomagala pri pripravi raztopin, potrebnih za izvedbo poskusa.

Za konec pa bi se zahvalila tudi najinima družinama, Dejanu in prijateljem, ki so naju več čas podpirali, lektorju Luku Pavlinu za jezikovni pregled in mag. Giti Grecs Smole, univ. dipl. bibl. za skrben pregled seznama literature.

8 LITERATURA

- 1 Ota K, Leonardi A, Mikelj M, et al. Membrane cholesterol and sphingomyelin, and ostreolysin A are obligatory for pore-formation by a MACPF/CDC-like pore-forming protein, pleurotolysin B. *Biochimie* 2013; 95(10): 1855–64.
- 2 Schlumberger S, Kristan KČ, Ota K, et al. Permeability characteristics of cell-membrane pores induced by ostreolysin A/pleurotolysin B, binary pore-forming proteins from the oyster mushroom. *FEBS Lett* 2014; 588(1): 35–40.
- 3 Berne S, Križaj I, Pohleven F, Turk T, Maček P, Sepčič K. *Pleurotus* and *Agrocybe* hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1570(3): 153–9.
- 4 Berne S, Sepčič K, Anderluh G, Turk T, Maček P, Poklar Ulrih N. Effect of pH on the pore forming activity and conformational stability of ostreolysin, a lipid raft-binding protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochemistry* 2005; 44(33): 11137–47.
- 5 Berne S, Lah L, Sepčič K. Aegerolysins: structure, function, and putative biological role. *Protein Sci* 2009; 18(4): 694–706.
- 6 Sepčič K, Frangež R. Cytolytic and toxic effects of ostreolysin, a protein from the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). In: Gupta VK, ed. *Comprehensive bioactive natural products*. Vol. 2. Efficacy, safety & clinical evaluation I. Texas: Stadium Press, 2010: 251–64.
- 7 Sepčič K, Berne S, Rebolj K, et al. Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interacts specifically with membrane cholesterol-rich lipid domains. *FEBS Lett* 2004; 575(1/3): 81–5.

- 8 Sepčić K, Berne S, Potrich C, Turk T, Maček P, Menestrina G. Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. *Eur J Biochem* 2003; 270(6): 1199–210.
- 9 Žužek MC, Maček P, Sepčić K, Cestnik V, Frangež R. Toxic and lethal effects of ostreolysin, a cytolytic protein from edible oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), in rodents. *Toxicon* 2006; 48(3): 264–71.
- 10 Berne S, Pohleven J, Vidic I, et al. Ostreolysin enhances fruiting initiation in the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Mycol Res* 2007; 111(12): 1431–6.
- 11 Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 2010; 327(5961): 46–50.
- 12 Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387(6633): 569–72.
- 13 Simons K, Gerl MJ. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(10): 688–99.
- 14 Simons K, Sampaio JL. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(10): a004697 (17 str.)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21628426> (14.7.2014).
- 15 Skočaj M, Bakrač B, Križaj I, Maček P, Anderluh G, Sepčić K. The sensing of membrane microdomains based on pore-forming toxins. *Curr Med Chem* 2013; 20(4): 491–501.
- 16 Chowdhury HH, Rebolj K, Kreft M, Zorec R, Maček P, Sepčić K. Lysophospholipids prevent binding of a cytolytic protein ostreolysin to cholesterol-enriched membrane domains. *Toxicon* 2008; 51(8): 1345–56.

- 17 Skočaj M, Resnik N, Grundner M, et al. Tracking cholesterol/sphingomyelin-rich membrane domains with the ostreolysin A-mCherry protein. *PloS One* 2014; 9(3): e92783 (12 str.)
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0092783>
3 (25.5.2014).
- 18 Maličev E, Chowdhury HH, Maček P, Sepčič K. Effect of ostreolysin, an Asp-hemolysin isoform, on human chondrocytes and osteoblasts, and possible role of Asp-hemolysin in pathogenesis. *Med Mycol* 2007; 45(2): 123–30.
- 19 Al-Deen IH, Twaij HA, Al-Badr AA, Istarabadi TA. Toxicologic and histopathologic studies of *Pleurotus ostreatus* mushroom in mice. *J Ethnopharmacol* 1987;21(3):297–305.
- 20 Juntos P, Rebolj K, Sepčič K, et al. Ostreolysin induces sustained contraction of porcine coronary arteries and endothelial dysfunction in middle- and large-sized vessels. *Toxicon* 2009; 54(6):784–92.
- 21 Rebolj K, Batista U, Sepčič K, Cestnik V, Maček P, Frangež R. Ostreolysin affects rat aorta ring tension and endothelial cell viability in vitro. *Toxicon* 2007; 49(8): 1211–3.
- 22 Schachter EN1, Zuskin E, Goswami S, Castranova V, Arumugam U, Whitmer M, Siegel P, Chiarelli A, Fainberg J. Pharmacological study of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) extract on isolated guinea pig trachea smooth muscle. *Lung* 2005; 183(1): 63–71.
- 23 Silbernagl S, Lang F. Color atlas of pathophysiology. Stuttgart: Thieme, 2000:10–1.
- 24 Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 2007; 131(6):1047–58.
- 25 Silbernagl S, Despopoulos A. Color atlas of physiology: fundamentals and cell physiology. 6th ed. New York:Thieme, 2009: 26–37.

- 26 Karlstad J, Sun Y, Singh BB. Ca^{2+} signaling: an outlook on the characterization of Ca^{2+} channels and their importance in cellular functions. *Adv Exp Med Biol* 2013; 740: 143–57.
- 27 Schwaller B. The Regulation of a cell's Ca^{2+} signaling toolkit: the Ca^{2+} homeostasome. *Adv Exp Med Biol* 2013; 740: 1–25.
- 28 Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57(4): 411–25.
- 29 Jiménez-Jiménez FJ, García-Ruiz PJ, de Bustos F. Calcium, neuronal death and neurological disease. *Rev Neurol* 1996; 24(134): 1199–209.
- 30 Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 1998; 21(1): 13–26.
- 31 Tornero D, Posadas I, Ceña V. Bcl-x(L) blocks a mitochondrial inner membrane channel and prevents Ca^{2+} overload-mediated cell death. *PLoS One* 2011; 6(6): e20423 (15 str.)
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0020423>
3 (2.6.2014).
- 32 Schweda F, Seebauer H, Krämer BK, Kurtz A. Functional role of sodium-calcium exchange in the regulation of renal vascular resistance. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(1): F155–61.
- 33 Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 1999; 79: 763–864.
- 34 Noble D, Herchuelz A. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in cell function. *EMBO Rep* 2007; 8(3): 228–32.

- 35 Tytgat J, Vereecke J, Carmeliet E. Differential effects of verapamil and flunarizine on cardiac L-type and T-type Ca channels.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1988; 337(6): 690–2.
- 36 Cohen J, Gutman Y. Effects of verapamil, dantrolene and lanthanum on catecholamine release from rat adrenal medulla.
Br J Pharmacol 1979; 65(4): 641–5.
- 37 Tykocki NR, Jackson WF, Watts SW. Reverse-mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange is an important mediator of venous contraction. Pharmacol Res 2012; 66(6): 544–54.
- 38 Hill-Eubanks DC, Werner ME, Heppner TJ, Nelson MT. Calcium signaling in smooth muscle. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011; 3(9): a004549 (21 str.)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21709182> (18.5.2014).
- 39 Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation.
Adv Physiol Educ 2003; 27(1/4): 201–6.
- 40 Babiychuk EB, Monastyrskaya K, Potez S, Draeger A. Blebbing confers resistance against cell lysis. Cell Death Differ 2011; 18(1): 80–9.
- 41 Welling A. Voltage-dependent calcium channels. BIOTREND Rev 2009; (4):): 11 str. http://www.biotmed.com/download/NET_BTReview_040109.pdf (5.6.2014)
- 42 Frelin C, Vigne P, Renterghem C. Calcium homeostasis in vascular tissues. In: Abraham S, Amitai G, eds. Calcium channel modulators in heart and smooth muscle: basic mechanisms and pharmacological aspect. Weinheim : Verlag Chemie, 1990: 177–87.