



# Razjasnitev mehanizma nevrotoksičnega delovanja proteina ostreolizina, izoliranega iz gobe bukovega ostrigarja

Effect of the ostreolysin A/pleurotolysin B pore-forming complex on neuroblastoma cell morphology and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  activity.

Vrecl Milka, Babnik Monika, Diacci Uroš, Benoit Evelyne, Frangež Robert

*Toxicological Sciences*, 2015; 144(2):276-83. IF 3,88

Ljubljana, 24.XI.2016

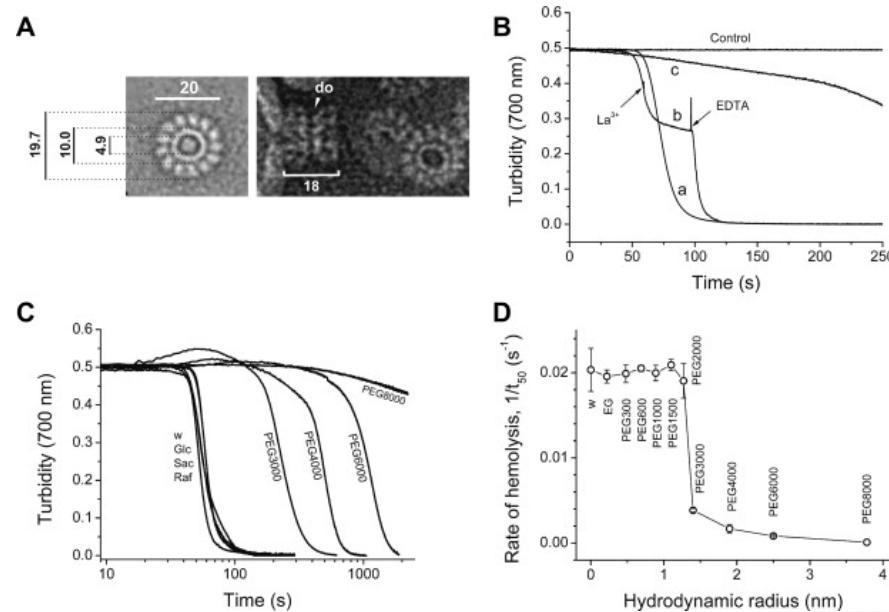
- Žužek MC, Maček P, Sepčić K, Cestnik V, **Franež R**. Toxic and lethal effects of ostreolysin, a cytolytic protein from edible oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), in rodents. *Toxicon*. 2006 Sep 1;48(3):264-71.
- Schlumberger S, Kristan KČ, Ota K, **Franež R**, Molgó J, Sepčić K, Benoit E, Maček P. *Permeability characteristics of cell-membrane pores induced by ostreolysin A/pleurotolysin B, binary pore-forming proteins from the oyster mushroom*. *FEBS Lett.* 2014 Jan 3;588(1):35-40.
- Vrecl M, Babnik M, Sepčić K, Žužek MC, Maček P, Diacci U, **Franež R**. *Effect of the ostreolysin A/pleurotolysin B pore-forming complex on intracellular Ca<sup>2+</sup> activity in the vascular smooth muscle cell line A10*. *Toxicol In Vitro*. 2015 Dec;29(8):2015-21.
- **Vrecl M, Babnik M, Diacci U, Benoit E, Franež R**. *Effect of the ostreolysin A/pleurotolysin B pore-forming complex on neuroblastoma cell morphology and intracellular Ca<sup>2+</sup> activity*. *Toxicol Sci*. 2015;144(2):276-83.
- Skočaj M, Yu Y, Grundner M, Resnik N, Bedina Zavec A, Leonardi A, Križaj I, Guella G, Maček P, Kreft ME, **Franež R**, Veranič P, Sepčić K. *Characterisation of plasmalemmal shedding of vesicles induced by the cholesterol/sphingomyelin binding protein, ostreolysin A-mCherry*. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Nov;1858(11):2882-2893.

# Predstavitev znanstvenega problema

- **Ostreolizin** - citolitični kompleks izoliran iz gobe bukov ostrigar *Pleurotus ostreatus* (Sepčić *in sod.*, Biochim Biophys Acta, 2002)
- **Biološki učinki - tvorba por** v membranah sesalskih celic, hemolitično delovanje, kardiorespiratorni zastoj.
- **Namen dela** - proučiti mehanizme odgovorne za nastanek dihalnega zastoja
- **Eksperimentalni pristop** - nevroblastomske celice NG108-15 (*in vitro* model respiratornih nevronov)

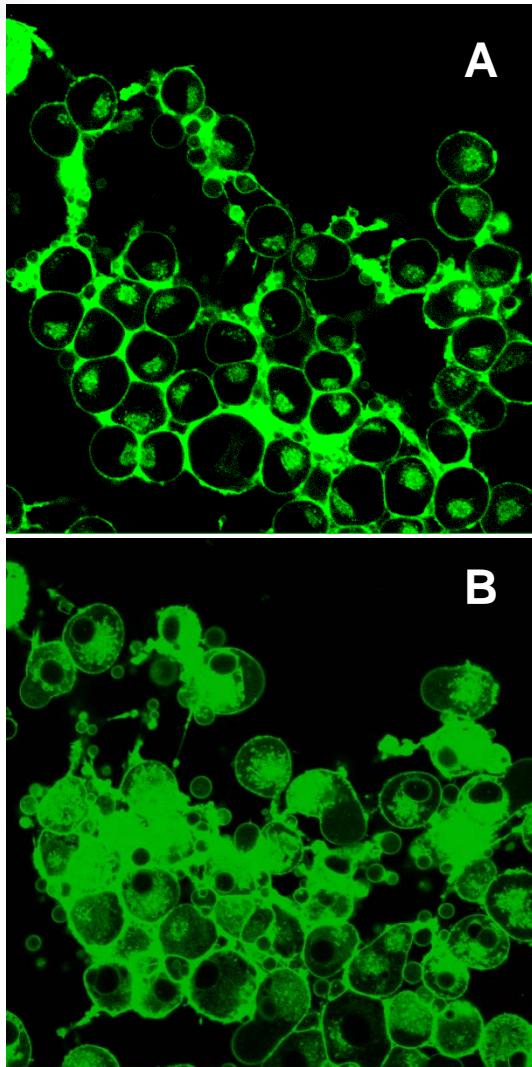


**Slika 1:** *Pleurotus ostreatus*  
(Jacquin: Fries) P. Kummer. 1871

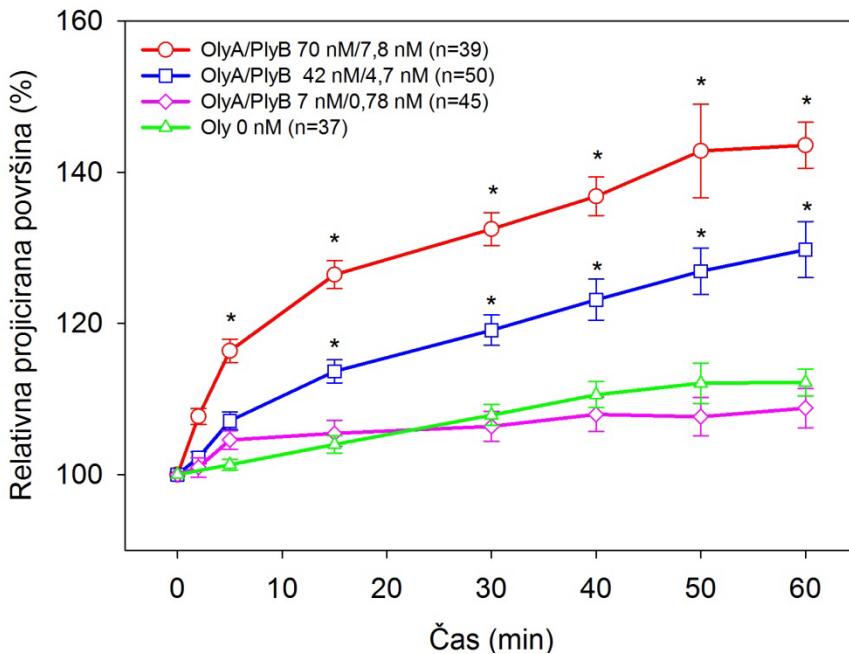


**Slika 2:** Tvorba kationsko neselektivnih por  
*Schlumberger in sod., FEBS Letters, 2014*

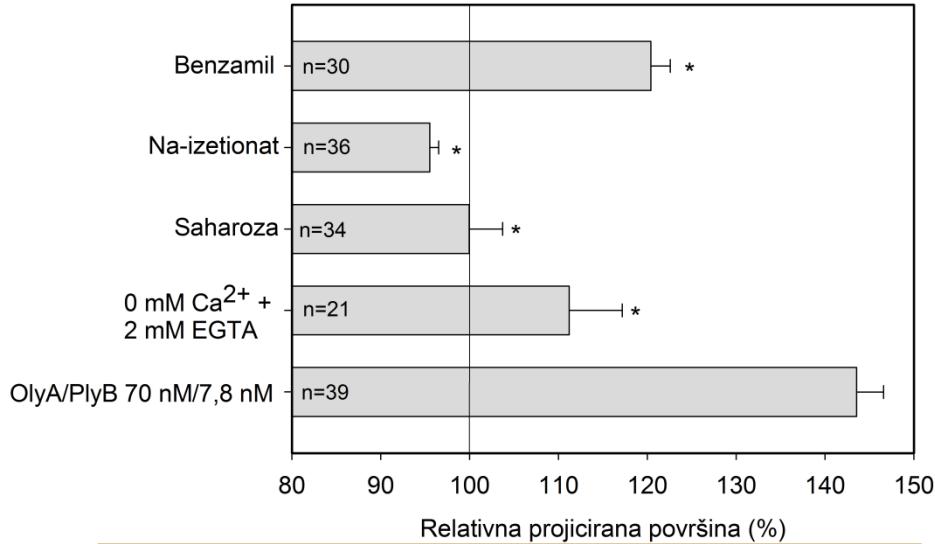
## Učinki Ostreolizina na nevrone: vezikulacija in znotrajcelični edem



**Slika 1:** Morfološke spremembe celic NG108-15 po izpostavitvi OlyA/PlyB (70 nM/7,6 nM). (A) Skupina nevronov pred dodatkom OlyA/PlyB ter (B) ista skupina nevronov 60 min po izpostavitvi OlyA/PlyB.

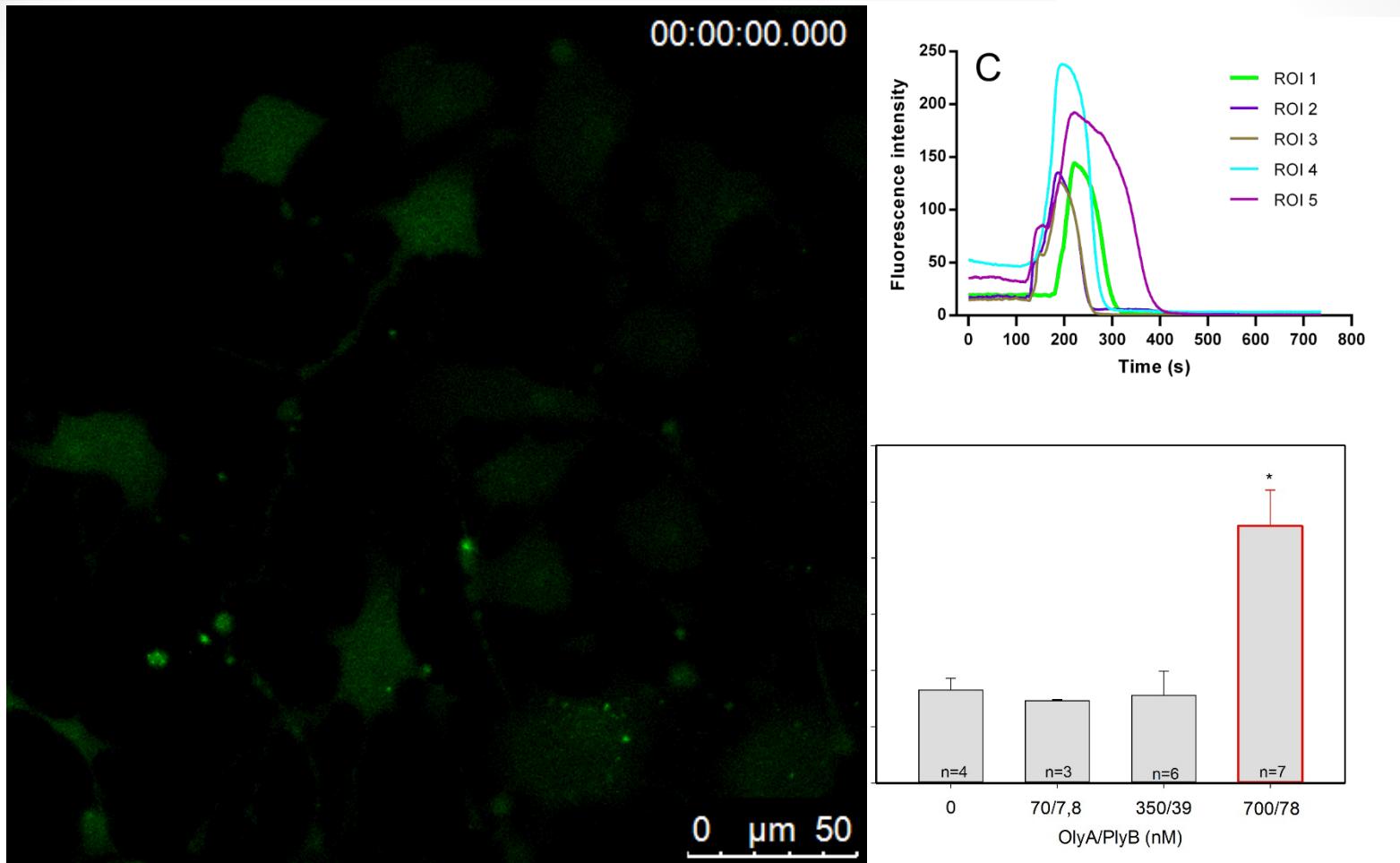


**Slika 2:** Analiza časovnega poteka sprememb volumna nevronov kot indikatorja celičnega edema po dodatku različnih koncentracij OlyA/PlyB.



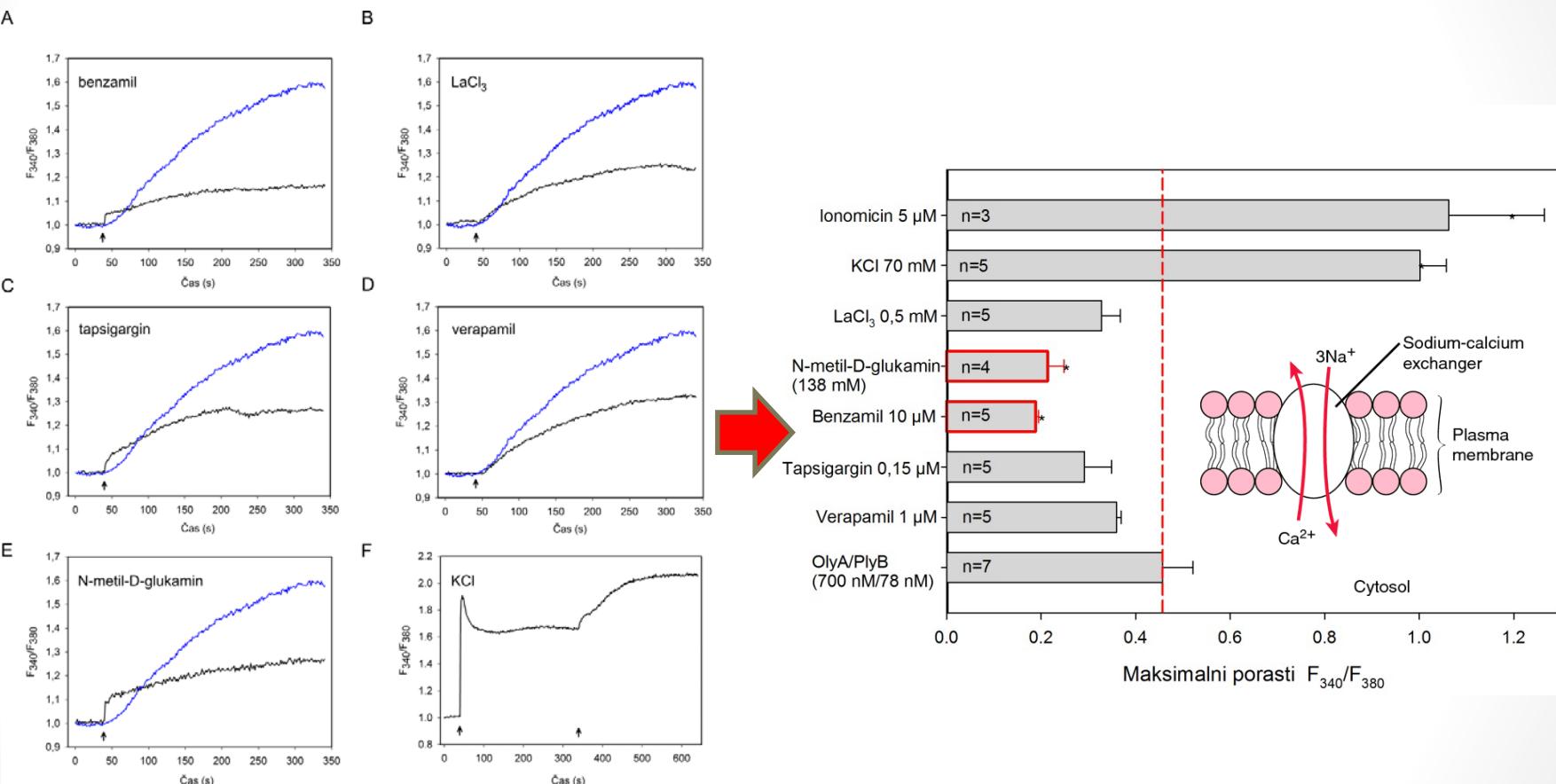
**Slika 3:** Relativne spremembe projicirane površine nevronov po dodatku 70 nM/7,6 nM OlyA/PlyB pri različnih pogojih.

# Vpliv ostreolizina na $[Ca^{2+}]_i$ v nevronih



**Slika 4:** Vpliv različnih koncentracij OlyA/PlyB na  $[Ca^{2+}]_i$  v nevronih: (A, B) konfokalna slika sprememb fluorescence ob spremembi  $[Ca^{2+}]_i$ ; (C) časovni potek sprememb  $[Ca^{2+}]_i$  v posameznih nevronih; (D) vpliv Oly na  $[Ca^{2+}]_i$  ob prisotnosti zunajceličnega  $Ca^{2+}$  in v mediju brez  $Ca^{2+}$ ; (E) kvantitativna analiza vpliva Oly na  $[Ca^{2+}]_i$ .

**Mehanizem delovanja:** povečana znotrajcelična aktivnost  $\text{Ca}^{2+}$  je posledica vdora  $\text{Ca}^{2+}$  skozi novo nastale pore, pomembno prispeva tudi  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  izmenjevalec



**Slika 5:** Učinek 700 nM/76 nM OlyA/PlyB na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (modra krivulja) in učinek prisotnosti OlyA/PlyB (črna krivulja) in ob prisotnosti nekaterih blokatorjev  $\text{Ca}^{2+}$  kanalčkov in prenosačev v plazmalemi ter  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaze v membrani endoplazemskega retikuluma.

# Zaključki:

- Ugotovili smo, da Oly v nano-molarnih koncentracijah povzroči vezikulacijo celične membrane, celični edem in poveča  $[Ca^{2+}]_i$  v nevronih, kar je verjetno primarno posledica vdora  $Ca^{2+}$  skozi novonastale pore.
- Pomembno vlogo pri porastu znotrajceličnega  $Ca^{2+}$  ima tudi  $3Na^+/Ca^{2+}$  izmenjevalec.
- Opisane spremembe lahko vodijo v disfunkcijo in smrt dihalnih nevronov ter dihalni zastoj *in vivo*.

**Raziskave so bile opravljene v okviru raziskovalnega programa P4-0053, financiranega s strani ARRS.**