

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Sabina BELC

**ANALIZA RAZŠIRJENOSTI IN PRIDOBIVANJE
AKTINOPORINOM TER PERFORINU PODOBNIH
GLIVNIH PROTEINOV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Sabina BELC

**ANALIZA RAZŠIRJENOSTI IN PRIDOBIVANJE
AKTINOPORINOM TER PERFORINU PODOBNIH GLIVNIH
PROTEINOV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**DISTRIBUTION ANALYSIS AND PRODUCTION OF FUNGAL
ACTINOPORIN- AND PERFORIN-LIKE PROTEINS**

M. SC. THESIS
Master study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija Biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo (L-11) na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bil za mentorja imenovan prof. dr. Gregor Anderluh, za somentorico dr. Nada Kraševc in za recenzenta prof. dr. Peter Maček.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH
Kemijski inštitut, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo

Članica: dr. Nada KRAŠEVEC
Kemijski inštitut, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo

Član: prof. dr. Peter MAČEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Sabina BELC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 577.112:547.96:575.112(043.2)
KG	egerolizini/MACPF/NEP-1/NLP/NPP1/aktinoporini/glive/bioinformatika/BLAST
AV	BELC, Sabina, diplomirana biotehnologinja (UN)
SA	ANDERLUH, Gregor (mentor)/KRAŠEVEC, Nada (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2016
IN	ANALIZA RAZŠIRJENOSTI IN PRIDOBIVANJE AKTINOPORINOM TER PERFORINU PODOBNIH GLIVNIH PROTEINOV
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	XI, 71, [21] str., 20 pregl., 35 sl., 5 pril., 97 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Zaradi uporabnosti v biotehnoloških inovacijah in vloge pri patogenosti gliv, ki so prepoznane kot resna grožnja prehranski varnosti ter zdravju ljudi, so proteini, ki tvorijo pore, zanimivi za raziskave. V magistrski nalogi smo želeli raziskati razširjenost egerolizinov, proteinov z domeno MACPF ter proteinov NLP med glivami. Ugotovili smo, da zastopanost proteinov ne korelira z življenjskim slogom. Posamezni organizmi imajo več različnih kopij genov za iskane proteine, ki so razporejene po celotnem genomu. Analiza sintenije je pokazala, da v 38 primerih homolog PlyA leži zraven homologa PlyB. Pri taksonih <i>Dothideomycetes</i> in <i>Sordariomycetes</i> najdemo take primere večinoma v patogenih, v taksonih <i>Agaricomycotina</i> in <i>Eurotiomycetes</i> pa v saprofitih. V glivi <i>Aspergillus niger</i> smo našli z metodami <i>in silico</i> potencialni horizontalni genski prenos. V neposredni bližini le-tega smo opazili ponavljajoča se zaporedja, ki bi bila lahko povezana s transpozonsko aktivnostjo. V laboratoriju smo poskušali pridobiti proteina B473 (homolog PlyB) in NLP iz glive <i>A. niger</i> v bakteriji <i>Escherichia coli</i> , da bi preverili rezultate bioinformatijske analize ter okarakterizirali njune lastnosti. Oba proteina sta tvorila inkluzijska telesca. Proteina nismo uspeli renaturirati, saj se je protein B473 oboril, pri proteinu NLP pa nismo mogli potrditi pravilnega zvitja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 577.112:547.96:575.112(043.2)

CX aegerolysins/MACPF/NEP-1/NLP/NPP1/actinoporins/fungi/bioinformatics/BLAST

AU BELC, Sabina

AA ANDERLUH, Gregor (supervisor)/KRAŠEVEC, Nada (co-advisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology

PY 2016

TI DISTRIBUTION ANALYSIS AND PRODUCTION OF FUNGAL ACTINOPORIN- AND PERFORIN-LIKE PROTEINS

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO XI, 71, [21] p., 20 tab., 35 fig., 5 ann., 97 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Due to their biotechnological applications and their role in fungal pathogenicity, which are recognized as a serious threat to food safety and public health, pore-forming proteins are currently of great interest. In this Master thesis, we aimed to analyze the prevalence of aegerolysins, MACPF and NLP proteins within the fungi kingdom. We found that the prevalence of the target proteins does not correlate with the fungal lifestyle. Individual organisms possess several different copies of the genes encoding the proteins under study, which are spread throughout the genome. Synteny analysis showed that in 38 cases, homolog PlyA is found adjacent to homolog PlyB. In the case of taxons Dothideomycetes in Sordariomycetes, these cases are found primarily in pathogenic organisms, whereas in the case of Agaricomycotina in Eurotiomycetes they are found in saprotrophs. Further, we used *in silico* methods to discover a potential horizontal gene transfer event in fungus *Aspergillus niger*, and noted repeated sequences in its vicinity that could be due to transposon activity. We attempted to express proteins B473 (a PlyB homolog) and NLP from fungi *A. niger* in bacteria *Escherichia coli*, in order to confirm the results of the bioinformatic analysis, and characterize the properties of the proteins. Both proteins formed inclusion bodies in the bacterial cytoplasm. However, protein renaturation was not possible for B473 due to protein aggregation, for NLP we were not able to confirm correct protein refolding.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED LITERATURE	3
2.1 AKTINOPORINOM PODOBNI PROTEINI.....	3
2.1.1 Aktinoporini	3
2.1.2 Proteini, ki inducirajo nekrozo in produkcijo etilena	3
2.1.2.1 Zgradba proteinov NLP	4
2.1.2.2 Vloga proteinov NLP	5
2.1.3 Proteini z egerolizinsko domeno	6
2.1.3.1 Zgradba egerolizinov	6
2.1.3.2 Vloga egerolizinov	7
2.1.3.3 Biotehnološka uporaba	8
2.2 PERFORINU PODOBNI PROTEINI	8
2.2.1 Proteini z domeno MACPF	9
2.2.1.1 Zgradba proteinov z domeno MACPF	10
2.2.1.2 Vloga proteinov z domeno MACPF	11
2.2.1.3 Biotehnološke aplikacije.....	11
2.3 ZAKAJ KRALJESTVO GLIV?	12
2.3.1 Poddeblo Agaricomycotina	12
2.3.2 Razred Dothideomycetes	12
2.3.3 Razred Eurotiomycetes	13
2.3.4 Razred Leotiomycetes.....	13
2.3.5 Razred Sordariomycetes	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 Sintetična gena in začetni oligonukleotidi	14
3.1.2 Vektorja	14
3.1.3 Bakterijski sevi.....	17
3.1.4 Gojišča.....	17
3.1.5 Antibiotiki.....	17
3.1.6 Pufri.....	18

3.1.7 Kemikalije	20
3.1.8 Oprema	20
3.2 METODE.....	21
3.2.1 Bioinformatična analiza	21
3.2.1.1 Iskanje po podatkovnih zbirkah.....	21
3.2.1.2 Obdelava rezultatov	22
3.2.2 Priprava gojišč	23
3.2.3 Sterilizacija opreme, gojišč in raztopin	24
3.2.4 Priprava genskih konstruktov z metodami molekularnega kloniranja	24
3.2.4.1 Agarozna gelska elektroforeza	24
3.2.4.2 Čiščenje fragmentov iz agaroznega gela	24
3.2.4.3 Restrikcija in izolacija fragmentov	24
3.2.4.4 Ligacija v vektor.....	26
3.2.4.5 Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i>	26
3.2.4.6 Izolacija plazmidne DNA	27
3.2.4.7 Verižna reakcija s polimerazo	27
3.2.4.8 Določanje nukleotidnega zaporedja produktov reakcije PCR.....	28
3.2.5 Priprava heterolognega proteina v bakteriji <i>E. coli</i>	28
3.2.6 Izolacija proteina	29
3.2.6.1 Priprava inkluzijskih telesc za kromatografijo	29
3.2.6.2 Priprava netopne frakcije za kromatografijo	29
3.2.6.3 Priprava periplazemske frakcije za kromatografijo.....	29
3.2.6.4 Nikljeva afinitetna kromatografija	30
3.2.6.5 Poliakrilamidna gelska elektroforeza	30
3.2.6.6 Prenos western.....	31
3.2.6.7 Dializa in cepitev histidinskega repka s proteazo TEV	31
3.2.6.8 Koncentriranje vzorcev.....	32
3.2.7 Analiza proteina	32
3.2.7.1 Hemoliza.....	32
3.2.7.2 Cirkularni dikroizem.....	32
3.2.7.3 Triptofanska fluorescenca.....	32
3.2.7.4 Poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti in odsotnosti reducenta.....	33
3.2.7.5 Testiranje na rastlinah.....	33
4 REZULTATI	34
4.1 NABOR PROTEINSKIH ZAPOREDIJ	35
4.1.1 Proteini NLP	35
4.1.2 Egerolizini	35
4.1.3 Proteini z domeno MACPF	35
4.2 ANALIZA PROTEINSKIH ZAPOREDIJ	36
4.2.1 Proteini NLP	36
4.2.1.1 Zastopanost proteinov NLP.....	36

4.2.1.2	Filogenetska analiza proteinov NLP.....	37
4.2.1.3	Oznaka proteinov NLP.....	39
4.2.1.4	Izločanje proteinov NLP.....	39
4.2.2	Egerolizini	39
4.2.2.1	Zastopanost egerolizinov.....	39
4.2.2.2	Filogenetska analiza egerolizinov.....	41
4.2.3	Proteini z domeno MACPF	43
4.2.3.1	Zastopanost proteinov z domeno MACPF.....	43
4.2.3.2	Filogenetska analiza proteinov z domeno MACPF.....	44
4.2.3.3	Oznaka proteinov z domeno MACPF.....	46
4.2.3.4	Izločanje proteinov z domeno MACPF.....	46
4.2.4	Sintenzija homologov PlyA in PlyB	46
4.3	PRIDOBIVANJE IN ANALIZA PROTEINOV	50
4.3.1	Testiranje sevov bakterije <i>E. coli</i>	50
4.3.2	Izolacija proteinov	50
4.3.2.1	Izolacija proteina NLP.....	50
4.3.2.2	Izolacija proteina B473.....	51
4.3.3	Analiza lastnosti proteina NLP	52
4.3.3.1	Predikcija 3D zgradbe proteina NLP.....	52
4.3.3.2	Analiza prisotnosti disulfidnega mostička.....	53
4.3.3.3	Stabilnost proteina NLP.....	54
4.3.3.4	Analiza sekundarnih zgradb znotraj proteina NLP.....	55
4.3.4	Test delovanja proteina NLP	55
4.3.5	Test delovanja proteina B473	56
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	57
5.1	RAZPRAVA.....	57
5.1.1	Bioinformacijska analiza	57
5.1.1.1	Podatkovne zbirke.....	57
5.1.1.2	Iskanje zadetkov.....	57
5.1.1.3	Obdelava zadetkov.....	58
5.1.2	Heterologno izražanje	61
5.2	SKLEPI.....	62
6	POVZETEK	63
7	VIRI	64
	ZAHVALA.....	72
	PRILOGE.....	73

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sevi bakterije <i>E. coli</i> za pripravo vektorja in pridobivanje proteinov.....	17
Preglednica 2: Gojišča za transformacijo in pridobivanje proteinov	17
Preglednica 3: Antibiotiki za selekcijo transformiranih bakterij <i>E. coli</i>	18
Preglednica 4: Pufri in raztopine	18
Preglednica 5: Restriksijska mešanica za kloniranje v pET-21c.....	25
Preglednica 6: Restriksijska mešanica za kloniranje v vektor pET-22b	25
Preglednica 7: Restriksijska mešanica za kloniranje v vektor pET-22b – vektor	25
Preglednica 8: Ligacijska mešanica za kloniranje v vektor pET-21c.....	26
Preglednica 9: Ligacijska mešanica za kloniranje proteina NLP v vektor pET-22b.....	26
Preglednica 10: Ligacijska mešanica za kloniranje proteina B473 v vektor pET-22b.....	26
Preglednica 11: Restrikcija za kontrolo uspešnosti kloniranja v vektor pET-21c.....	27
Preglednica 12: Restrikcija za kontrolo uspešnosti kloniranja v vektor pET-22b	27
Preglednica 13: Mešanica za reakcijo PCR.....	28
Preglednica 14: Program reakcije PCR	28
Preglednica 15: Zastopanost proteinov NLP v kraljestvu gliv	36
Preglednica 16: Položaj proteinov NLP v genomu glive <i>G. cingulata</i>	37
Preglednica 17: Zastopanost egerolizinov v kraljestvu gliv	40
Preglednica 18: Položaj egerolizinov v genomu glive <i>L. mollusca</i>	40
Preglednica 19: Zastopanost proteinov z domeno MACPF v kraljestvu gliv	43
Preglednica 20: Proteini z domeno MACPF v genomu glive <i>F. graminearum</i>	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Kristalna zgradba proteina NLP iz oomicete <i>Pythium aphanidermatum</i>	4
Slika 2: Prikaz proteinov NLP tipa I, II in III.....	5
Slika 3: Zastopanost različnih tipov proteinov NLP v različnih kraljestvih.....	5
Slika 4: Kristalna zgradba proteina Cry34ab1 iz bakterije <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
Slika 5: Grafični prikaz egerolizinske domene.....	7
Slika 6: Zgradbe in podobnost proteinov CDC ter proteinov z domeno MACPF	9
Slika 7: Prikaz konformacijskih sprememb pleurotolizina med tvorbo pore	10
Slika 8: Motiv MACPF, ki je ohranjen znotraj različnih kraljestev	11
Slika 9: Konstrukta za izražanje rekombinantnih proteinov B473 in NLP	14
Slika 10: Začetni oligonukleotidi za prekloniranje tarčnih genov v vektor pET-22b	14
Slika 11: Plazmidna karta vektorja pET-21c za izražanje proteina v citoplazmi.....	15
Slika 12: Plazmidna karta vektorja pET-22b za izražanje proteina v periplazmi	16
Slika 13: Začetni oligonukleotidi za določanje zaporedja produktov reakcije PCR.....	28
Slika 14: Shematski prikaz poteka dela	34
Slika 15: Filogenetsko drevo proteinov NLP	38
Slika 16: Ohranjenost oznake proteinov NLP	39
Slika 17: Filogenetsko drevo egerolizinov	42
Slika 18: Filogenetsko drevo proteinov z domeno MACPF.....	45
Slika 19: Oznaka proteinov z domeno MACPF	46
Slika 20: Sintenijska karta genov za protein z egerolizinsko domeno in homolog PlyB	47
Slika 21: Filogenetsko drevo za homologe PlyA, ki ležijo zraven homologov PlyB	48
Slika 22: Filogenetsko drevo za homologe PlyB, ki ležijo zraven homologov PlyA	49
Slika 23: Prenos western za izbiro produkcijskega seva	50
Slika 24: Izolacija proteina NLP iz periplazme in iz netopne frakcije.....	51
Slika 25: Primerjava izolacij proteina B473 iz supernatanta.....	51
Slika 26: Prenos western vzorcev izolacij proteina B473	52
Slika 27: 3D model proteina NLP z označenimi sekundarnimi zgradbami	52
Slika 28: 3D model proteina NLP z označenimi cisteinskimi ostanki	53
Slika 29: Elektroforezna analiza proteina NLP z in brez reducenta.....	53
Slika 30: 3D model proteina NLP z označenimi triptofani	54
Slika 31: Graf triptofanske fluorescence proteina NLP.....	54
Slika 32: Spekter cirkularnega dikroizma proteina NLP	55
Slika 33: Infiltracija proteina NLP v list tobaka.....	55
Slika 34: Hemoliza v različnih pufrih.....	56
Slika 35: Potencialni HGT iz glive <i>A. niger</i>	60

KAZALO PRILOG

Priloga A: Življenjski slog gliv ter pojavnost proteinov z domeno MACPF, egerolizinov in proteinov NLP	73
Priloga B: Analiza izločanja proteinov NLP	83
Priloga C: Analiza izločanja egerolizinov	87
Priloga D: Analiza izločanja proteinov z domeno MACPF	89
Priloga E: Rezultati analize spektra CD s programom DichroWeb	92

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
AspGD	ang. <i>Aspergillus</i> Genome Database
BLAST	ang. Basic Local Alignment Search Tool
CD	cirkularni dikroizem
CDC	od holesterola odvisni citolizini
Da	dalton (enota atomske mase)
DELTA-BLAST	ang. Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST
gojišče LB	gojišče Luria-Bertani
HGT	horizontalni genski prenos
IPTG	izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid
JGI	ang. Joint Genome Institute
LD ₅₀	koncentracija snovi, pri kateri preživi 50% testnih osebkov
MACPF	ang. Membrane Attack Complex component/PerForin
MEGA	ang. Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MUSCLE	ang. MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti anionskega detergenta natrijevega dodecilsulfata
NCBI	ang. National Center for Biotechnology Information
NEP-1	peptid 1, ki inducira nekrozo in sproščanje etilena (ang. Necrosis and ethylene-inducing peptide 1)
NLP	protein, podoben NEP-1 (ang. NEP-1-like proteins)
NPP1	protein, ki ga proizvaja oomiceta <i>Phytophthora</i> in inducira nekrozo (ang. Necrosis-inducing <i>Phytophthora</i> Protein)
OD	optična gostota
pBLAST	ang. Protein BLAST
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PDB	ang. Protein Data Bank
Phyre ²	ang. Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0
PlyA (ali B)	pleurotolizin A (ali B)
PSI-BLAST	ang. Position-Specific Iterated BLAST
SOC	ang. Super Optimal Broth with Catabolite Repression
TB	ang. Terrific Broth

1 UVOD

Biološke membrane so ključni pretvorniki informacij, povezanih s celičnim delovanjem ter signalizacijo (Schmick in Bastiaens, 2014). Okvare membran lahko spremenijo celično delovanje. Proteini, ki tvorijo pore, so dobro poznani bakterijski virulenčni dejavniki. Nekaj let nazaj so raziskave pokazale, da se zgradbe, ki jih najdemo pri teh proteinih, pojavljajo v različnih membransko aktivnih proteinih znotraj različnih kraljestev. Podobnosti med temi proteini najdemo na ravni 3D zgradbe. Domene, ki jih najdemo v perforinu, so podobne od holesterola odvisnim citolizinom. Proteini iz družine proteinov B-celičnega limfoma, ki so regulatorji apoptoze, pa si delijo podobno zgradbo s kolicini iz bakterije *Escherichia coli*. Povezave med temi družinami proteinov ponujajo vpogled v zgradbene zahteve za vezavo na membrano in tvorbo pore (Anderluh in Lakey, 2008).

Čprav se proteini, ki tvorijo pore, pojavljajo v bakterijskih in parazitskih infekcijah ter v imunskem odgovoru vretenčarjev na prisotnost patogenov (Anderluh in sod., 2014; Gilbert, 2005), imajo tudi druge temeljne in »neškodljive« biološke vloge (Anderluh in Lakey, 2008; Gilbert in sod., 2013). Njihova uporabnost se je pokazala v razvoju nekaterih biotehnoloških inovacij, ki so prinesle napredek na področju določanja zaporedja DNA in biosenzorjev (Majd in sod., 2010). Poleg tega pa se jih lahko izkoristi v medicinski biotehnologiji pri tarčni dostavi zdravil (Provoda in Lee, 2000).

Proteini, ki tvorijo pore oz. interagirajo z membrano, so soodgovorni za patogenost gliv. Le-te so prepoznane kot resna vsesvetovna grožnja prehranski varnosti, zaradi širokega spektra gostiteljskih rastlin in intenzivnega transporta ljudi in tovara. V zadnjih desetletjih so zaznali izumrtja nekaterih rastlinskih in tudi živalskih vrst zaradi glivnih infekcij (Fisher in sod., 2012). Pogostost invazivnih mikoz oportunističnih glivnih patogenov pri ljudeh se je drastično povečala zaradi naraščajočega števila imunokompromitiranih ljudi, kar je posledica staranja prebivalstva, naraščajočega števila transplantacij ter ljudi z boleznijo AIDS (Pfaller in Diekema, 2004).

Široka uporabnost proteinov, ki tvorijo pore, in porajajoča se problematika gliv sta razloga, da je to področje zelo zanimivo in aktualno za raziskovalce.

1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA

V magistrski nalogi smo želeli raziskati razširjenost egerolizinov, proteinov z domeno MACPF (ang. Membrane Attack Complex/Perforin) ter proteinov, podobnih peptidom, ki inducirajo nekrozo in produkcijo etilena, znotraj kraljestva gliv. Za analizo smo uporabili štiri različne podatkovne zbirke (AspGD, NCBI, Pfam in JGI), da bi zajeli čim večje število glivnih genomov in dobili čim bolj reprezentativen vzorec. Zaradi nizke podobnosti na ravni aminokislinskega zaporedja je težavno zajeti vse relevantne proteine, zato smo

želeli ugotoviti potrebne izboljšave iskalnih parametrov, da bi povečali učinkovitost iskanja. Z analizo smo želeli dobiti vpogled v zastopanost teh proteinov v različnih taksonih gliv, da bi videli, če je pojavnost povezana z življenjskim slogom ali prostorom. Nadalje je sledila analiza lege v genomu, v primeru homologov pleurotolizina A (PlyA) in B (PlyB), saj naj bi le-ta ležala v neposredni bližini en drugega. Zanimal nas je tudi izvor teh proteinov ter verjetnost in način izločanja iz glive.

S pridobivanjem kandidatnih proteinov v bakteriji *E. coli* smo želeli preveriti naše rezultate bioinformacijske analize. Hkrati pa smo pridobljena proteina želeli analizirati in izvedeti čim več o njunih lastnostih in vlogah. Z novim znanjem bi se lahko usmerili v problematiko patogenosti gliv ali razvoj biotehnoške aplikacije.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

1. Zastopanost perforinu in aktinoporinom podobnih proteinov bo večja v patogenih glivah.
2. Bioinformacijska analiza bo nakazala potencialne primere horizontalnega genskega prenosa med različnimi taksoni gliv.
3. Pridobljen protein NLP bo imel nekrotično, homolog PlyB v kombinaciji s homologom PlyA pa hemolitično aktivnost.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 AKTINOPORINOM PODOBNI PROTEINI

2.1.1 Aktinoporini

Aktinoporini so proteini, ki se v morskih vetrnicah nahajajo v ožigalkah, zato njihovo vlogo pripisujejo plenilstvu, obrambi in prebavi (Basulto in sod., 2006). V njihovi zgradbi so ključne štiri regije. Prva regija je vezavno mesto za fosfoholin (del sfingomielina), sestavljeno iz hidrofobnih in hidrofilnih aminokislinskih ostankov, ki stabilizirajo povezavo med membrano in toksinom (Mancheño in sod., 2003). Druga regija je dobro ohranjena regija aromatskih aminokislinskih ostankov, ki je najverjetneje odgovorna za interakcijo z membrano v začetnih stopnjah nastanka pore (Hong in sod., 2002). Tretja regija je pogosto sestavljena iz bazičnih aminokislinskih ostankov, ki naj bi pripomogli k prepoznavi membrane preko interakcij z negativno nabitimi lipidnimi glavami (Hinds in sod., 2002). Bakrač in sod. (2008) pa nasprotno navajajo, da ta regija ni ohranjena znotraj aktinoporinov in da so raziskave pokazale, da pri prepoznavi elektrostatske interakcije ne igrajo pomembne vloge. Četrta regija je 30 aminokislinski dolgi N-konec, ki je potreben za pravilno tvorbo pore in se usidra v membrano (Hong in sod., 2002).

2.1.2 Proteini, ki inducirajo nekrozo in produkcijo etilena

Leta 1995 je Bailey iz filtrata kulture glive *Fusarium oxysporum* izoliral 24 kDa velik protein, ki je induciral nekrozo in produkcijo etilena v večjemu številu dvokaličnicah. Poimenoval ga je peptid 1, ki inducira nekrozo in sproščanje etilena (NEP-1). Člani nove družine proteinov, imenovane proteini NLP (ang. NEP-1-like proteins), si delijo visoko podobnost aminokislinskega zaporedja in inducirajo preobčutljivostni odgovor v raznovrstnih rastlinah, kar se odraža v celični smrti (Pemberton in Salmond, 2004).

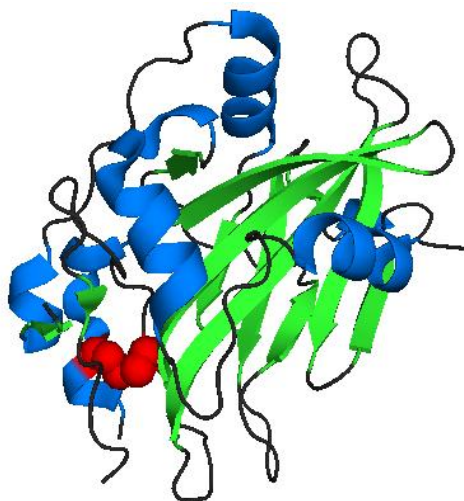
Vsi proteini NLP vsebujejo domeno proteina, ki ga proizvaja oomiceta *Phytophthora* in inducira nekrozo (NPP1; Fellbrich in sod., 2002). Njihova posebnost je široka distribucija med različnimi kraljestvi ter širok spekter delovanja. Vloga proteinov NLP še ni znana, vendar obstajajo dokazi, da delujejo kot virulenčni dejavniki, ki pospešujejo bolezen in spodbujajo rast patogena v gostiteljski rastlini. Zanimanje za to skupino proteinov raste, saj je dobro zastopana pri rastlinskih patogenih (Gijzen in Nürnberger, 2006).

Razloga za široko zastopnost teh proteinov v različnih kraljestvih je horizontalni genski prenos (HGT). Analiza vsebnosti gvanina in citozina pa namiguje, da ti geni niso bili preneseni nedavno, saj se deleži vsebnosti gvanina in citozina v genu za protein NLP v večini primerov ujemajo z deležem v genomih teh organizmov (Pemberton in Salmond, 2004).

V glivnem kraljestvu se proteini NLP v večini primerov pojavljajo v eni ali nekaj kopijah. Obstajajo pa tudi izjeme z večjim številom kopij, npr. patogena gliva *Verticillium dahliae* jih ima okoli osem. V oomicetah pa so ti geni zastopani v dosti večjih številkah. V oomiceti *Phytophthora sojae* so našli 70 potencialnih proteinov NLP, od katerih je 33 pravih genov in 37 pseudogenov (tj. več kot 50 %). Raziskave niso potrdile prisotnosti intronov, skoraj vsi proteini pa imajo signalno zaporedje. V nekaterih proteinih so opazili tudi odsotnost heptapeptida GHRHDWE in fitotoksične aktivnosti, kar kaže na evolucijo proteina, ki naj bi prevzel drugo vlogo (Dong in sod., 2012). Zhou in sod. (2012) so raziskovali proteine NLP iz glive *V. dahliae*. Ugotovili so, da se induciranje nekroze ter imunski odziv pokrivata in da nimajo vsi najdeni proteini nekrotične aktivnosti.

2.1.2.1 Zgradba proteinov NLP

Zgradba proteinov NLP vsebuje centralni beta-sendvič, sestavljen iz beta-ploskve s tremi verigami in antiparalelne beta-ploskve s petimi verigami (slika 1). Na vrhu beta-sendviča so tri alfa-vijačnice. Proteini NLP imajo le eno domeno, za njihovo aktivnost pa je pomembna prisotnost dvovalentnega kationa, ki je ključen za usidranje proteinov NLP v tarčne membrane oz. je potreben za permeabilizacijo celične membrane. Zvitje proteinov NLP je podobno glivnim lektinom in aktinoporinom iz morskih vetrnic (Ottmann in sod., 2009).

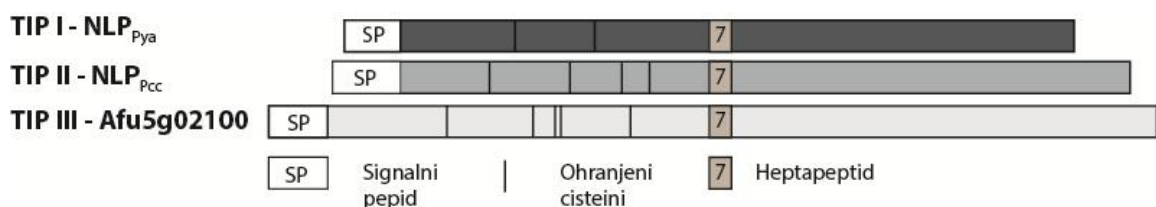


Alfa-vijačnice so označene z modro, beta-ploskve pa z zeleno barvo. Disulfidni mostiček je označen rdeče.

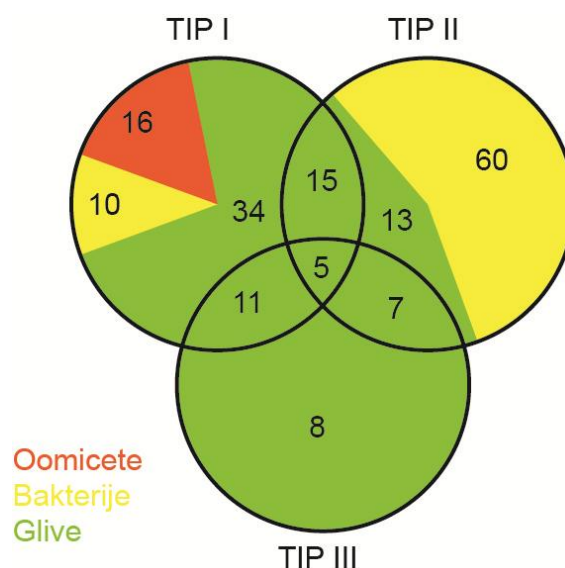
Slika 1: Kristalna zgradba proteina NLP iz oomicete *Pythium aphanidermatum* (PDB 3GNZ)

Z analizo proteinskih zaporedij so ugotovili, da se proteini znotraj skupine NLP delijo na proteine tipa I in tipa II (slika 2). V tipu I najdemo dva ohranjena cisteinska ostanka, ki tvorita disulfidni mostiček, v tipu II pa štiri. Tip I najdemo v glivah, bakterijah in oomicetah. Tip II pa le v glivah in bakterijah (slika 3). Oba tipa sta lahko istočasno zastopana v istem organizmu. Poleg ohranjenih cisteinskih ostankov je za proteine NLP

značilno tudi ohranjeno zaporedje heptapeptida (GHRHDWE). Razen nekaj izjem imajo proteini NLP signalno zaporedje za izločanje (Gijzen in Nürnberger, 2006). Oome in Van den Ackerveken (2014) pa sta opazila še proteine NLP tipa III (slika 2) s šestimi ohranjenimi cisteinski ostanki, ki jih najdemo samo v askomicetah (slika 3).



Slika 2: Prikaz proteinov NLP tipa I, II in III (Oome in Van den Ackerveken, 2014)



Slika 3: Zastopanost različnih tipov proteinov NLP v različnih kraljestvih (Oome in Van den Ackerveken, 2014)

2.1.2.2 Vloga proteinov NLP

Vloga proteinov NLP je zaenkrat še ni povsem pojasnjena. Bailey in sod. (2002) so dokazali, da odsotnost proteina NEP-1 ne vpliva na fitopatogenost glive *F. oxysporum*. Predvideva pa se, da imajo ti proteini dvojno vlogo v patogenezi rastlin, in sicer inducirajo imunski odziv rastline ter delujejo kot toksini (Qutob in sod., 2006). Proteini NLP ne morejo povzročiti nekroze, če jih apliciramo na površino lista. Kaže, da ne morejo predreti kutikule lista in da lahko delujejo le v notranjosti le-tega (Pemberton in Salmond, 2004). Qutob in sod. (2006) poročajo, da proteini NLP za svojo delovanje potrebujejo stik z ekstracelularno stranjo celične membrane dvokaličnic. Za boljše razumevanje mehanizma

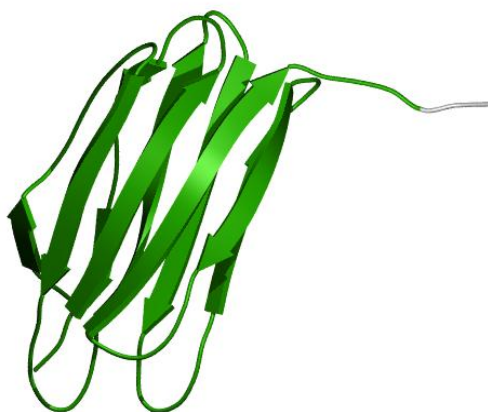
delovanja bi bilo potrebno izolirati odporno rastlinsko mutanto in najti molekularno tarčo proteinov NLP (Gijzen in Nürnberger, 2006).

2.1.3 Proteini z egerolizinsko domeno

Egerolizinska proteinska družina (PF06355) je bila definirana v letu 2002. V letu 2008 je vsebovala le 43 proteinskih zaporedij iz 21 vrst (Berne in sod., 2009), dne 8. 11. 2015 pa sem našla 94 zaporedij iz 63 vrst. Predstavniki te družine, ki jih najdemo v glivah, rastlinah in bakterijah, so si zelo podobni in imajo zanimive biološke značilnosti (Berne in sod., 2009). Družina se imenuje po egerolizinu iz glive *Agrocybe aegerita* (Novak in sod., 2015). Kardiotoksičen Asp-hemolizin, ki naj bi pripomogel k patogenezi glive *Aspergillus fumigatus*, je prvi egerolizinu podobni protein, ki so ga izolirali in mu določili zaporedje (Sakaguchi in sod., 1975; Ebina in sod., 1994). Primarni izvor genov, ki kodirajo egerolizine, je neznan. Predvideva se, da izvirajo iz glive, ki je zadnji skupni prednik razredov Ascomycetes in Basidiomycetes. To hipotezo lahko podpremo z njihovo biološko vlogo v tvorbi plodnega telesca, signalizaciji in patogenezi. Najdbo teh genov v bakterijah lahko razložimo s HGT med glivami in bakterijami, ki so močno povezane z njimi. Pojav genov v rastlinah lahko razložimo s HGT iz gliv ali bakterij, ki tvorijo tesne odnose z gostiteljsko rastlino. Možno pa je tudi, da so bili vzorci rastlin, v katerih so bili najdeni ti geni, kontaminirani s plesnijo (Berne in sod., 2009).

2.1.3.1 Zgradba egerolizinov

Egerolizini so pretežno sestavljeni iz beta-struktur (slika 4). V primeru ostreolizina je pri pH 7,8 delež beta-struktur 66 % (beta-ploskve 60 % in beta-obrati 6 %), 10 % je alfa-vijačnic, preostanek pa je neperiodična sekundarna zgradba (Berne in sod., 2005).



Slika 4: Kristalna zgradba proteina Cry34ab1 iz bakterije *Bacillus thuringiensis* (PDB 4JOX)

Egerolizinska proteinska domena je bogata z aromatskimi (10 %) in nabitimi (20–24 %) aminokislinami (Fukuchi in sod., 1996a). Bazidiomicete in glive *Aspergillus* imajo odsek,

ki je homologen ApoB vezavnemu mestu človeškega receptorja za lipide z nizko gostoto in vsebuje gručo negativno nabitih aminokislin. Ta odsek veže oksidirane lipide z nizko gostoto in lizofosfatidilholin (Fukuchi in sod., 1996b). Ohranjeni so tudi cisteini in nekateri triptofani (slika 5), kar namiguje na njihovo strukturno ali funkcionalno vlogo. Nedotaknjeni cisteinski ostanki so ključni za hemolitično aktivnost ostreolizina (Berne in sod., 2002) in Asp-hemolizina (Kudo in sod., 2002). Regije bogate s triptofani so bile prepoznane kot odgovorne za začetno vezavo na membrano v nekaterih drugih proteinih, ki tvorijo pore (Hong in sod., 2002). Kombinacija aromatskih in cisteinskih ostankov pa naj bi bila vključena v vezavo na sterole v od holesterola odvisnih bakterijskih toksinih, ki tvorijo pore (Ramachandran in sod., 2002).



Rdeče puščice prikazujejo popolnoma ohranjene regije (glicin na mestu 75, triptofan na mestu 94 in aromatska AK na mestu 114). Rdeči krogi prikazujejo negativno nabite AK (mesta 39, 41, 43, 45, 49 in 50). Ohranjena cisteina najdemo na mestih 67 ter 96 in sta označena z zelenim krogom pod domeno. Triptofani, ki jih najdemo na mestih 10, 33, 94 in 98, so tudi dobro ohranjeni, na shemi pa so prikazani s črno črtico pod domeno.

Slika 5: Grafični prikaz egerolizinske domene (Berne in sod., 2009)

Lastnosti proteinov z egerolizinsko domeno so, da imajo nizko izoelektrično točko, molekulsko maso od 15 do 17 kDa, so temperaturno občutljivi in stabilni v širokem pH območju (Sakaguchi in sod., 1975; Ngai in Ng, 2006; Berne in sod., 2005). Določeni egerolizini delujejo samostojno (Sakaguchi in sod., 1975), drugi (npr. pleurotolizin A) pa za svoje delovanje potrebujejo še drugo komponento (bikomponentni citolizini). Protein PlyA se poveže s proteinom PlyB in tvori prstanu podobno transmembransko poro (Tomita in sod., 2004; Ngai in Ng, 2006; Dunstone in Tweten, 2012; Ota in sod., 2013).

2.1.3.2 Vloga egerolizinov

Nekateri egerolizini imajo dokazano protitumorsko, protiproliferativno ali protibakterijsko učinkovitost, zato so zelo zanimivi za nadaljnje raziskave. Egerolizini interagirajo s celično membrano in tvorijo pore v lipidnih veziklih. Za interakcijo z membrano potrebujejo določene lipide oz. distribucijo lipidov (Berne in sod., 2009). Egerolizini se vežejo tudi na serumske proteine. Z dodatkom seruma inhibiramo citolitično sposobnost Asp-hemolizina (Fukuchi in sod., 1998). Asp-hemolizin je dokazano citotoksičen za levkocite, različne makrofage ter endotelijske celice popkovnične vene. Ostreolozin pa je citotoksičen za fibrosarkom, celično linijo raka dojke, ovarijske celice kitajskega hrčka in fibroblaste (Berne in sod., 2009). Zaradi citotoksičnega efekta so toksični za eksperimentalne živali. Asp-hemolizin je nevro-, dermo- in nefrotoksičen, poleg tega pa je tudi hemolitičen

(Henrici, 1939; Rebolj in sod., 2007). V miših in piščancih je smrtna doza LD₅₀ 750 oz. 350 µg/kg (Berne in sod., 2009). Asp-hemolizin inducira tudi imunski odgovor človeka, ki ga zaznamo v porastu histaminov in citokinov (npr. tumor nekroznega dejavnika- α , inteleukina-8 in -6; Iwata in sod., 1962; Kumagai in sod., 2001).

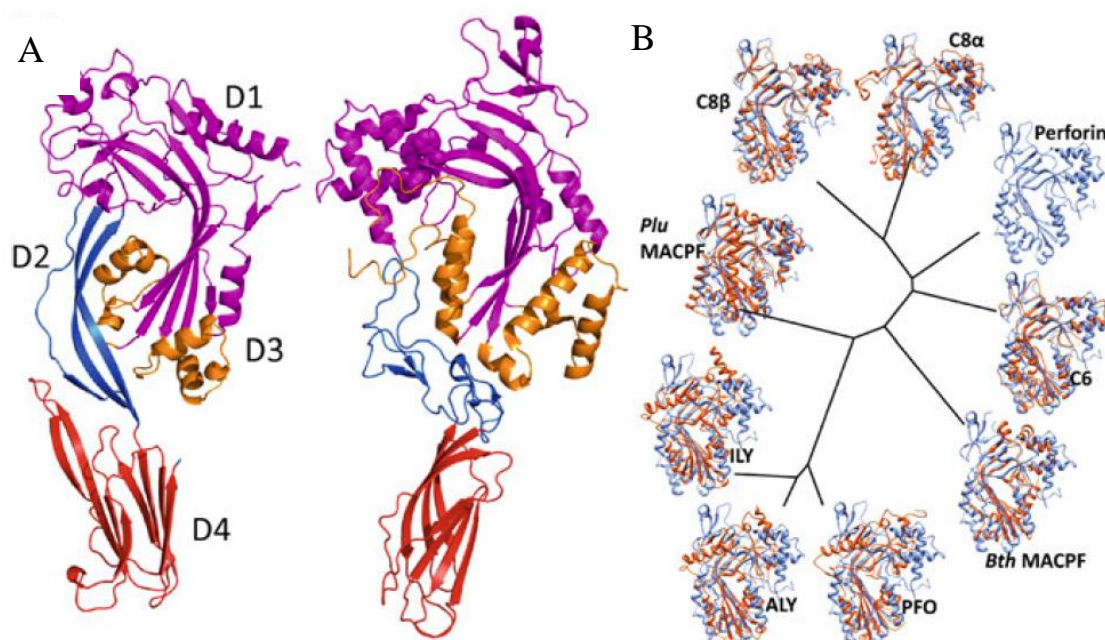
2.1.3.3 Biotehnološka uporaba

Egerolizine se lahko uporabi pri razvoju zdravil, na primer v produkciji protiteles (imunoglobulina G) proti Asp-hemolizinu (Budzko in Negrone, 1976). Na tem področju so bili podeljeni tudi patenti (Weinstock in Bush, 2009; Rubenfield in sod., 2007). Uporabimo jih lahko tudi pri študijah patofiziološkega pomena oksidiranih lipidov z nizko gostoto, s čimer bi dobili pomembne informacije o preventivi in zdravljenju ateroskleroze (Kudo in sod., 2002). Fluorescenčno označene mutante proteinov brez litičnih sposobnosti bi lahko uporabili za strukturne in funkcijske študije bioloških membran, saj različni egerolizini prepoznajo določeno sestavo membran (Berne in sod., 2009). Bando in sod. (2011) so poročali o promotorju gena za protein, podoben egerolizinu, katerega izražanje ni zavirala velika koncentracija glukoze, zato omogoča prekomerno izražanje v glivi *Aspergillus oryzae*. Egerolizine lahko najdemo v gojišču, čeprav nimajo klasičnih signalnih zaporedij za izločanje, kar bi bilo lahko zanimivo za nadaljnje biotehnološke aplikacije na področju heterolognega izražanja, mogoče celo v kombinaciji z že uporabljenimi promotorji teh genov (Novak in sod., 2015). Za bakterijske hemolizine so pokazali uporabno vrednost za dostavo bioloških zdravil v citosol (Provoda in Lee, 2000; Provoda in sod., 2003).

2.2 PERFORINU PODOBNI PROTEINI

Proteini z domeno MACPF in od holesterola odvisni citolizini (CDC) so pomembni efektorji v imunskem sistemu in bakterijski patogenezi. Njihov učinek je povezan z membranskimi interakcijami in tvorjenjem transmembranskih por. Njihova vloga pa ni omejena le na te vloge, zato bo potrebno še kar nekaj dela, da se ugotovi njihovo vlogo in mehanizem delovanja za vse predstavnike (Anderlugh in sod., 2014).

Proteini z domeno MACPF so del sistema komplemента v naravni imunosti (Lichtenheld in sod., 1988; Shinkai in sod., 1988). Proteine CDC pa najdemo pretežno v gram-pozitivnih bakterijah (Tweten, 2005; Gilbert, 2005). Čeprav sta bili ti skupini proteinov odkriti ločeno in med njima ni podobnosti v zaporedju, so zaradi intenzivnega dela na zgradbah predstavnikov družine proteinov z domeno MACPF odkrili, da sta evolucijsko povezana (slika 6b). Obe družini se zdaj omenjata skupaj kot družina proteinov MACPF/CDC, ki tvorijo pore (Anderlugh in sod., 2014).



Slika 6: Zgradbe in podobnost proteinov CDC ter proteinov z domeno MACPF (Anderluh in sod., 2014)

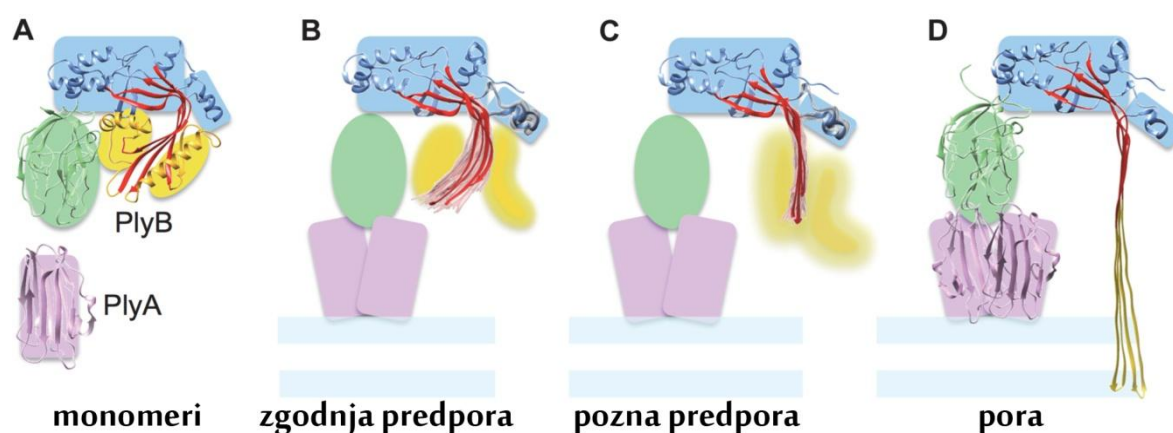
Na sliki 6a se levo nahaja kristalna zgradba perfringolizina O, ki je prvi protein CDC z določeno zgradbo (Rossjohn in sod., 1997), desno pa se nahaja mišji perforin (Law in sod., 2010). Zgradba proteinov CDC je razdeljena v štiri domene, ki imajo različne vloge med tvorjenjem pore. C-terminalna domena D4 se pripne na lipidno membrano. Domena MACPF/CDC (D1) se primarno uporablja za kontakte med monomeri (pri perforinu so s kroglicami označeni zelo ohranjeni predeli). D3 sodeluje pri tvorbi pore v obliki beta sodčka. D2 je povezovalna zgradba, ki omogoča fleksibilnost, ki je potrebna za tvorbo pore (Gilbert, 2005; Tweten, 2005). Na desni najdemo filogenetsko drevo proteinov z znanimi zgradbami. Zgradba perforina je označena modro, zgradba MACPF/CDC pa oranžno.

2.2.1 Proteini z domeno MACPF

Družina proteinov z domeno MACPF (PF01823) je največja družina evkariotskih proteinov, ki tvorijo pore, v podatkovni zbirki Pfam. Vsebuje 1329 zaporedij, ki so razširjena po različnih domenah življenja (Gilbert in sod., 2013). Največ proteinov z domeno MACPF najdemo v kraljestvu živali, zlasti v višjih vretenčarjih. V človeškem genomu najdemo 12 različnih genov za proteine z domeno MACPF (Anderluh in sod., 2014). Veliko število genov, ki kodirajo proteine z domeno MACPF, najdemo tudi v drugih organizmih, npr. škrgoustka *Branchiostoma floridae* ima kar 29 takih genov (Huang in sod., 2008). V tem organizmu je približno 10 % vseh genov povezanih z obrambo. Ker so proteini z domeno MACPF pomemben del imunskega sistema, tako visoko število teh genov ni presenetljivo. Ohranjenost med zaporedji proteinov z domeno MACPF je samo okoli 20 % (Anderluh in sod., 2014).

2.2.1.1 Zgradba proteinov z domeno MACPF

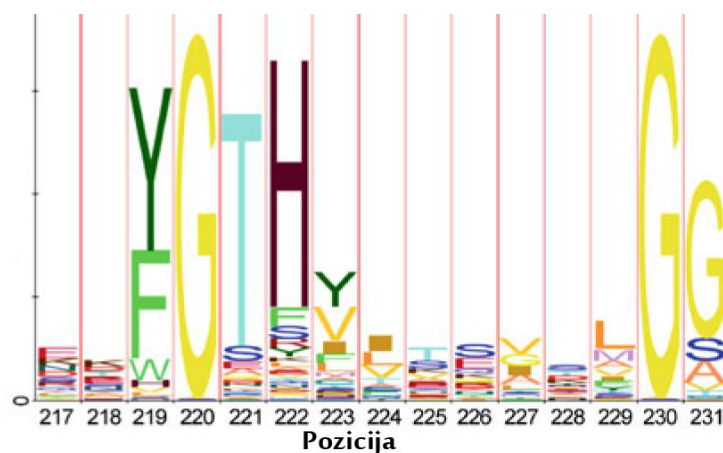
V večini primerov najdemo v proteinu le eno domeno MACPF/CDC, čeprav poročajo tudi o primerih, kjer jih je več (Gilbert in sod., 2013). Pogosto pa najdemo še dodatne domene, ki so odgovorne za izvedbo biološke vloge določenega proteina z domeno MACPF. Veliko teh proteinov je vpletenih v interakcijo z membrano in tvorbo pore, zato potrebujejo domene, ki so bogate z beta-ploskvami in ki so odgovorne za vezavo na membrano. V drugih proteinih pa so domene odgovorne za pritrditev na celico preko vezave na sladkorje, kot je na primer lektinska domena za vezavo na manozo (Anderluh in sod., 2014). Obstajajo tudi proteini z domeno MACPF, kjer ni dodatne domene. Pri teh je potrebno šele ugotoviti, če se lahko vežejo na membrane in če je vezava sploh nujna za njihovo biološko vlogo. Znani so proteini z domeno MACPF, ki se povežejo z drugimi komponentami za uspešno tvorbo pore (slika 7). Protein PlyB iz glive *Pleurotus ostreatus* potrebuje manjšo komponento PlyA za vezavo na membrano in tvorbo pore (Tomita in sod., 2004; Ota in sod., 2013).



Vijolično je označena beta-struktura monomera PlyA. Z modro je označena regija monomera PlyB z alfa-vijačnicami, z zeleno regija bogata z beta-strukturami, z rumeno so označene transmembranske lasnice, rdeče pa domena MACPF/CDC.

Slika 7: Prikaz konformacijskih sprememb pleurotolizina med tvorbo pore (Lukyanova in sod., 2015)

Podobnost med zgradbami proteinov CDC in proteinov z domeno MACPF leži v centralni beta-ploskvi iz štirih verig, obdani z grozdom alfa-vijačnic (domena MACPF/CDC) (Rosado in sod., 2007). Skozi poravnavo zgradbe se je izkazalo, da sta domeni D1 in D3 funkcionalni enoti z zvitjem, ki je ohranjeno v celotnem drevesu življenja. Univerzalno sta ohranjena glicina, ki omogočata konformacijske spremembe te regije proteina za vključitev v membrano. Najbolj ohranjene aminokisliline (slika 8) so znotraj tako imenovanega motiva MACPF (Ponting, 1999). Ta motiv najdemo na vrhu zvite beta-ploskve (slika 6). Nizka ohranjenost celotnih zaporedij predstavlja velik izziv pri odkrivanju novih proteinov z domeno MACPF (Anderluh in sod., 2014).



Slika 8: Motiv MACPF, ki je ohranjen znotraj različnih kraljestev (Anderluh in sod., 2014)

2.2.1.2 Vloga proteinov z domeno MACPF

Proteini z domeno MACPF imajo ključno vlogo v imunski obrambi proti virusom in bakterijam ter odstranjevanju rakavih celic (Anderluh in sod., 2014). Pore, ki jih tvorijo proteini z domeno MACPF, se lahko uporabljajo za lizo celic ali transport molekul v in izven celice (Dunstone in Tweten, 2012). Perforin je edina molekula človeškega imunskega sistema, ki omogoča vstop grancima v tarčno celico in iniciacijo apoptoze (Anderluh in sod., 2014). Pomembno vlogo imajo tudi pri razvoju insektov (Stevens in sod., 1990), morskih vetrnic (Haag in sod., 1999) in sesalčjih nevronov (Kawano in sod., 2004).

2.2.1.3 Biotehnološke aplikacije

Wright in sod. (2004) so raziskovali vlogo proteina DBCCR1, ki vsebuje domeno MACPF/CDC. Ugotovili so, da je možno, da deluje kot tumorski supresor pri raku mehurja. Nadaljnje raziskave se bodo usmerile v razumevanje in manipulacijo izražanja tega proteina, saj ima terapevtski potencial za zdravljenje raka.

Malarija je najpomembnejša parazitska bolezen na svetu. Odgovorna je za od 1,5 do 2,7 milijonov smrti letno. Proteini z domeno MACPF igrajo ključno vlogo pri infekciji komarja s parazitom. Nadaljnja analiza tega molekularnega mehanizma bi lahko pripeljala do učinkovitih strategij za preventivo transmisije (Kadota in sod., 2004).

Najnovejša tehnologija za določanje zaporedja DNA vključuje uporabo nanopor. Poleg tega pa analize z nanoporami odpirajo nove možnosti za študije na nivoju ene molekule (Feng in sod., 2015).

2.3 ZAKAJ KRALJESTVO GLIV?

Glive imajo veliko pomembnih vlog v ekosistemu, kot so na primer razgradnja organskega materiala, zaščita rastlin in pomoč pri črpanju hranil. V nasprotju s temi vlogami pa imajo glive uničujoč vpliv na agronomijo (Galagan in sod., 2005). Glive so patogeni vseh največjih poljščin, s čimer ogrožajo prehransko preskrbljenost ljudi. Že sedaj je vsaj 800 milijonov ljudi podhranjenih, epidemije glivnih okužb pa lahko to stanje še poslabšajo. Rastlinske patogene je težko kontrolirati, ker variirajo v času, prostoru in genotipu. Patogeni se pogosto razvijajo in obidejo odpornost rastlin (Strange in Scott, 2005). Raziskave so pokazale HGT, ki so povezani z virulenco. S HGT je gliva *Pyrenophora tritici-repentis* prevzela toksin iz glive *Stagonospora nodorum*, kar je imelo hude posledice za pridelek pšenice (Friesen in sod., 2006). Ne smemo pa pozabiti, da glive ne ogrožajo le rastlin, saj zadnjih nekaj desetletij opažajo številna izumrtja živalskih vrst zaradi glivnih patogenov (Fischer in sod., 2012).

Glivne infekcije ljudi so tretja izmed najpogostejših bolnišničnih okužb. Posledice so lahko smrtonosne zlasti za paciente z boleznijo AIDS ter bolnike, ki jemljejo imunosupresive (Galagan in sod., 2005). Težave so z razvojem učinkovitih zdravil, saj so glive tudi evkarionti, zato imajo protimikotiki hude stranske učinke (Georgopapadakou, 1998).

Vse te problematike so razlog, da glive predstavljajo zelo zanimivo kraljestvo za raziskave. Raziskovalce zanimajo mehanizmi virulence ter molekularne razlike med patogenimi in nepatogenimi glivami, da bi našli nove tarče za zdravila oz. metode za povečevanje odpornosti poljščin.

2.3.1 Poddeblo Agaricomycotina

Glive iz poddebla Agaricomycotina za pridobivanje ogljikovih spojin razgrajujejo organske snovi ali pa vstopijo v različne interakcije (tako antagonistične kot neškodljive) z rastlinami, živalmi in drugimi glivami. Nekatere glive iz tega poddebla so medicinsko zanimive, imajo pa tudi predstavnika oportunističnih človeških patogenov, tj. gliva *Cryptococcus neoformans*. V tej taksonomski skupini najdemo tudi večino užitnih gob (Hibbett, 2007).

2.3.2 Razred Dothideomycetes

Razred Dothideomycetes je največji in najbolj ekološko raznolik razred gliv. Več predstavnikov lahko okuži skoraj vsako glavno poljščino, ki se uporablja v prehrani, proizvodnji krme, vlaknin ali biogoriv. Prisotni so na vseh kontinentih (tudi Antarktiki) in so pomembni za ekosistem in kroženje ogljika. Nekateri predstavniki so človeški in živalski patogeni (Ohm in sod., 2012).

2.3.3 Razred Eurotiomycetes

Molekularne analize so bile ključne za definiranje tega razreda. Sestavljen je iz dveh podrazredov. Podrazred Eurotiomycetidae vključuje proizvajalce toksičnih in koristnih sekundarnih metabolitov, prehranskih izdelkov ter encimov. Pomemben predstavnik je gliva *Aspergillus nidulans*, ki je modelni organizem. Podrazred Chaetothyriomycetidae vključuje črne kvasovke, ki so človeški in živalski patogeni. Večina človeških patogenov iz poddebla Pezizomycotina so iz razreda Eurotiomycetes (Geiser in sod., 2006).

2.3.4 Razred Leotiomycetes

Morfološko je razred Leotiomycetes zelo raznolik. Člani reda Helotiales imajo zelo raznolike ekosisteme in pokrijejo širok spekter niš. Opisani so bili kot rastlinski patogeni, endofiti, paraziti nematod in gliv, zemeljski in vodni saprofiti, simbionti ter kot glive rdeče trohnobe (Wang in sod., 2006a). Mnogo teh gliv je poznanih le po telomorfih, njihovi anamorfi pa še niso bili odkriti ali pa so bili izločeni med procesom evolucije. Razred Leotiomycetes je zelo aktiven. S pomočjo filogenetske analize vključujejo nove in izključujejo stare rede iz njega (Wang in sod., 2006b).

2.3.5 Razred Sordariomycetes

Tudi predstavniki razreda Sordariomycetes imajo širok spekter niš in življenjskih slogov. Nekatere vrste rodu *Trichoderma* se uporabljajo kot biokontrola v kmetijstvu za preprečevanje rastlinskih bolezní (alternativa pesticidom; Harman in sod., 2004). Gliva *Neurospora crassa* se uporablja kot modelni organizem za molekularne in genetske raziskave. Razred Sordariomycetes je poznan po proizvajalcih najpomembnejših glivnih sekundarnih metabolitov (Zhang in sod., 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Sintetična gena in začetni oligonukleotidi

Gena za proteina B473 in NLP smo naročili pri podjetju GenScript (slika 9). Rdeče je označeno restrikcijsko mesto za proteazo TEV, zeleno pa povezovalc, ki povezuje restrikcijsko mesto in histidinski repek na vektorju.

B473-tev-linker-His6 (473 AK)

MAELVPYFDGMQQGQGYNTYLQQIGVADAVTITPGQPESATYDLFYRSEIRIDEYTKLAQSLEISAGAAISGWG
QSSQIDAGYLDRLSFESSSTVTYQVEVSSRQQASIGNSYSFNQISTDTPNRLYGDRFIADFIIRGGQYFARVSI
AVNKSTSQEIQRQASEVAFSMYGVTGSVTNEVRSVAVETINRHSRVTVWIHTSGGGGRSGVIAEHPHDGEDSPFL
AIKEGADDFYQELREGKHRYRRFALLWRYTNVNFNNAFTPFDYAFANQRSWYLFGDFTQYDAYLELIRKIPV
QKFINGREQQAEELYEEGANILSGIRTKVQAVNENPEEINSPFSYSPEDYKKLVLAIARTVTMIAQERTLDNG
SFSIDIALPTLQGNARTLFKFKQTYDFDTGFGNTVVSFGRDSSFCISGQRVSDGYREESVFWAFEDPVEEVSE
QQVHVASMRTRDLLLSRTDPGPRPLFTFYAKSSWENLYFQGEKSSGSG

NLP-tev-linker-His6 (246 AK)

MSLRLLLLAASTLSATAAAGKHLHARDWIASDEIVGFNQTVPDNSTGDLYLAYQPYLKVNGCVPPFGVDAE
GDTDAGLAPTASDGDSSNTGQIYVRSNITSTSSTSTYPTALLYSWYMPKDEPSDGLGHRHDWEGVIIYLS
ATTISADNILAVCPSAHGGWDCSTDGYTLEGTKALIKYESIWPLDHSCGLTDVVGQTQPLVAWESLTTAARDA
LQTADFKAIVPFKDFSTFDENLAKATYENLYFQGEKSSGSG

Slika 9: Konstrukta za izražanje rekombinantnih proteinov B473 in NLP

Za prekloniranje tarčnih genov v vektor pET-22b smo naročili dva para začetnih oligonukleotidov pri podjetju Eurofins MWG Operon (slika 10).

NcoI NLP: CATGCCATGGCTCTGCGCACCCCTGCTGCTGG (31 NK)

XhoI NLP: CCGCTCGAGACCGGATCCGCTGC (23 NK)

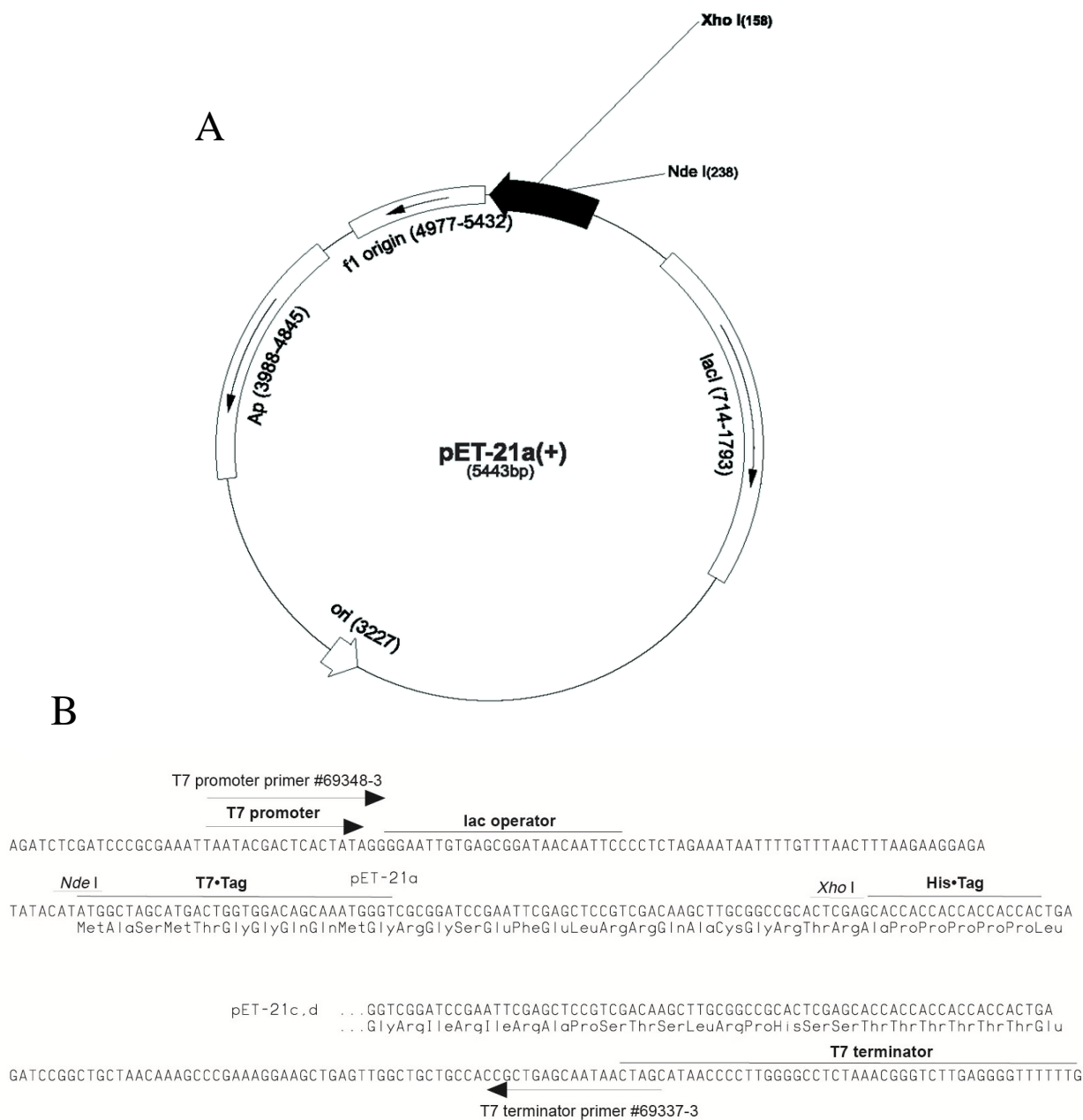
NcoI B473: CATGCCATGGCTGAACTGGTGCCGATTTTCGATG (35 NK)

XhoI B473: CCGCTCGAGACCGGATCCGCTTG (23 NK)

Slika 10: Začetni oligonukleotidi za prekloniranje tarčnih genov v vektor pET-22b

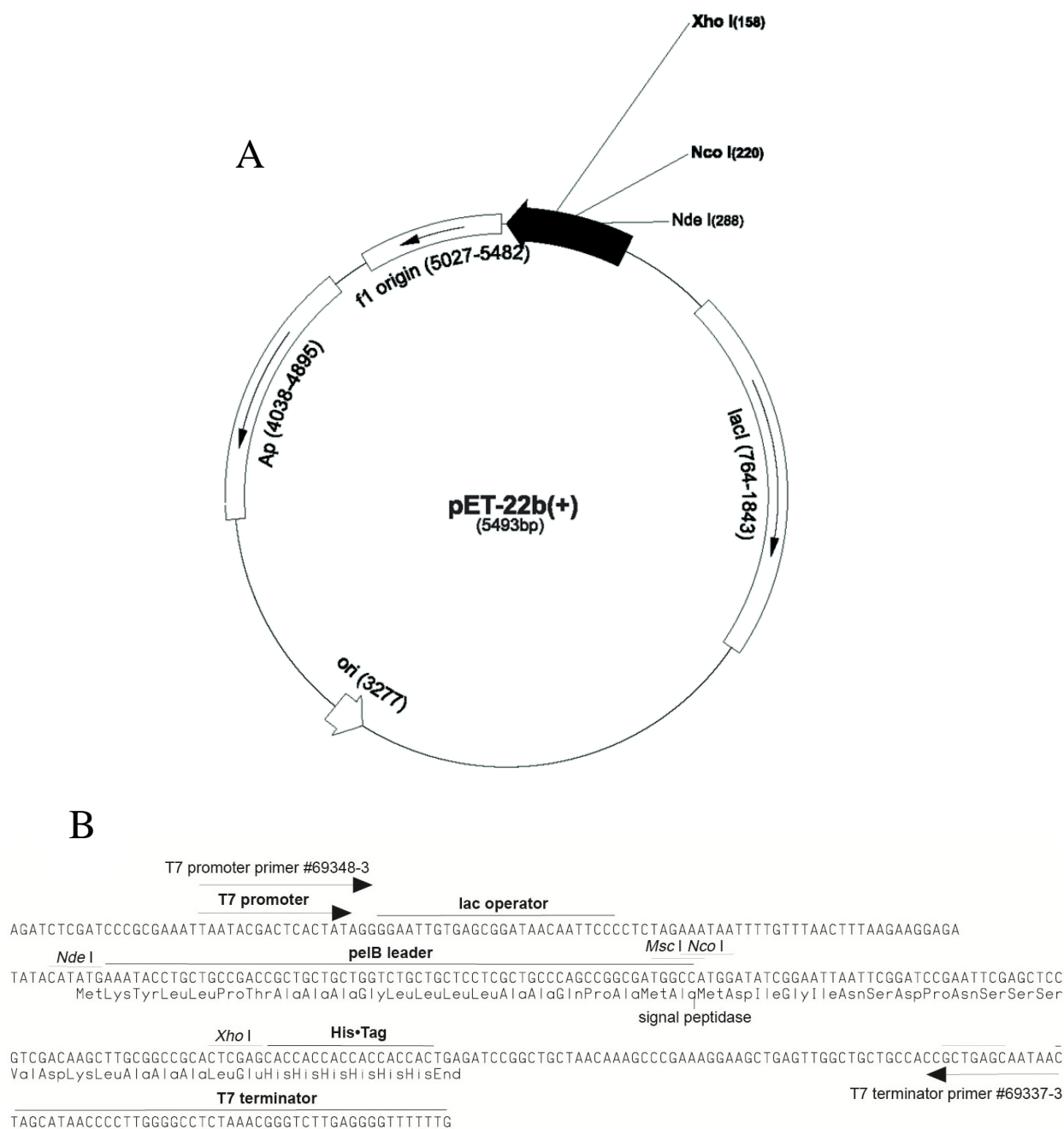
3.1.2 Vektorja

Pri delu v laboratoriju smo uporabili dva različna vektorja znamke Novagen, pET-21c za pridobivanje proteina v citoplazmi in pET-22b za izražanje proteina v perioplazmi. Na slikah 11 in 12 najdemo shematski prikaz uporabljenih vektorjev.



Ekspresijski plazmid (slika 11a): Ori - mesto začetka replikacije; f1 origin – mesto začetka replikacije faga f1; *lacI* – regulatorni gen, mesto za vezavo *lac* represorja; Ap – gen za odpornost na ampicilin; *NdeI*, *XhoI* – restrikcijski mesti encimov. Ekspresijska regija (slika 11b): T7 promotor, terminator in tag – genski elementi bakteriofaga T7; *lac* operator – indukcija izražanja z reagentom izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG); *NdeI*, *XhoI* – restrikcijski mesti encimov; His tag – histidinski repek.

Slika 11: Plazmidna karta vektorja pET-21c za izražanje proteina v citoplazmi



Ekspresijski plazmid (slika 12a): Ori - mesto začetka replikacije; f1 origin – mesto začetka replikacije faga f1; *lacI* – regulatorni gen, mesto za vezavo *lac* represorja; Ap – gen za odpornost na ampicilin; *NcoI*, *NdeI*, *XhoI* – restrikcijska mesta encimov. Ekspresijska regija (slika 12b): T7 promotor in terminator – genski elementi bakteriofaga T7; *lac* operator – indukcija izražanja z reagentom IPTG; *NcoI*, *NdeI*, *XhoI* – restrikcijska mesta encimov; His tag – histidinski repek; *pelB* – signalno zaporedje za izražanje v periplazmi.

Slika 12: Plazmidna karta vektorja pET-22b za izražanje proteina v periplazmi

3.1.3 Bakterijski sevi

Večina uporabljenih sevov bakterije *E. coli* (preglednica 1) vsebuje lizogeni fag DE3 z genom za T7 RNA polimerazo, ki je pod kontrolo inducibilnega promotorja *lacUV5*. Letega induciramo z dodatkom substrata IPTG. Vsi sevi so del celične zbirke Laboratorija za molekularno biologijo in nanotehnologijo na Kemijskem inštitutu.

Preglednica 1: Sevi bakterije *E. coli* za pripravo vektorja in pridobivanje proteinov

Bakterijski sev	Genetske posebnosti	Selekcija
DH5 α	/	AMP (vektor)
BL21 (DE3)	odsotnost <i>lon</i> in <i>ompT</i> proteaz	AMP (vektor)
Origami (DE3)	<i>trxB</i> in <i>gor</i> mutant	KAN, TC + AMP (vektor)
Rosetta - gami (DE3)	izražanje redkih tRNA	KAN, TC, CAM + AMP (vektor)

3.1.4 Gojišča

Pri gojenju in selekciji transformiranih bakterij *E. coli* smo uporabili različna gojišča, sestavine katerih so navedene v preglednici 2.

Preglednica 2: Gojišča za transformacijo in pridobivanje proteinov

Gojišče	Sestava gojišča
Luria Bertanijevo (LB) trdno gojišče	0,5-% (m/V) Bacto™ kvasni ekstrakt (BD, ZDA), 1-% (m/V) Bacto™ tripton (BD, ZDA), 1-% (m/V) NaCl (Merck, Nemčija), 15 mg/ml agar-agar (Merck, Nemčija)
Luria Bertanijevo (LB) tekoče gojišče	0,5-% (m/V) Bacto™ kvasni ekstrakt (BD, ZDA), 1-% (m/V) Bacto™ tripton (BD, ZDA), 1 % (m/V) NaCl (Merck, Nemčija)
Bogato gojišče TB (ang. Terrific Broth)	2,4-% (m/V) Bacto™ kvasni ekstrakt (BD, ZDA), 1,2-% (m/V) Bacto™ tripton (BD, ZDA), 0,4-% (V/V) glicerol (Sigma, ZDA), 10-% (V/V) fosfatni pufer
Gojišče SOC (ang. Super Optimal Broth with Catabolite Repression)	2 -% (m/V) Bacto™ tripton (BD, ZDA), 0,5-% (m/V) Bacto™ kvasni ekstrakt (BD, ZDA), 0,1-% (m/V) NaCl (Merck, Nemčija), 1,9-% (m/V) KCl (Sigma, ZDA), 0,2-% (m/V) MgCl ₂ × 6H ₂ O (Merck, Nemčija), 0,2-% (V/V) glukoza (Sigma, ZDA)

3.1.5 Antibiotiki

Za selekcijo transformiranih bakterij *E. coli* smo uporabili različne antibiotike (preglednica 3) glede na sev bakterije (preglednica 1).

Preglednica 3: Antibiotiki za selekcijo transformiranih bakterij *E. coli*

Antibiotiki	Koncentracija antibiotika	Končna koncentracija	Ponudnik
Ampicilin - AMP	50 mg/mL	50 µg/mL	Sigma, ZDA
Tetraciklin - TC	12,5 mg/mL	12,5 µg /mL	Sigma, ZDA
Kanamicin - KAN	30 mg/mL	30 µg /mL	Sigma, ZDA
Kloramfenikol - CAM	34 mg/mL	34 µg /mL	Sigma, ZDA

3.1.6 Pufri

V preglednici 4 so navedeni vsi pufri, ki smo jih uporabili med gojenjem bakterij ter pridobivanjem, izolacijo in analizo proteinov.

Preglednica 4: Pufri in raztopine

Pufer	Sestava pufra
Fosfatni pufer	0,17 M KH ₂ PO ₄ (Merck, Nemčija), 0,72 M K ₂ HPO ₄ (Sigma, ZDA)
Tris-borat-EDTA (TBE) pufer	89 mM Tris-borat (Sigma, ZDA), 2 mM EDTA (Sigma, ZDA)
Nanašalni gel IV	0,25-% (V/V) bromfenolmodro (Sigma, ZDA), 40-% (m/V) saharoza (Sigma, ZDA)
Pufer za izolacijo iz inkluzijskih telesc (PIIT) 1 pH 8,0	20 mM Tris-HCl (Sigma, ZDA)
PIIT 2 pH 8,0	20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl (Merck, Nemčija), 2 M urea (Sigma, ZDA), 2-% Triton X-100 (Sigma, ZDA)
PIIT 3 pH, 8,0	20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 2-% Triton X-100
PIIT 4 pH, 8,0	20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 6 M gvanidinijev hidroklorid (Sigma, ZDA), 5 mM imidazol (Sigma, ZDA) in 5 mM DTT (Sigma, ZDA)
PIIT 5 pH, 8,0	20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol in 5 mM DTT
Hipotonična raztopina	5 mM MgSO ₄
Hipertonična raztopina pH 8,0	30mM Tris (Merck, Nemčija), 20-% (m/V) saharoze, 1 mM EDTA
Pufer za lizo celic pH 7,5	50 mM NaH ₂ PO ₄ (Sigma, ZDA), 300 mM NaCl
Pufer za spiranje kolone pH 7,5	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM imidazol
Elucijski pufer pH 7,5	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 300 mM imidazol
Pufer TBS pH 7,4	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl
Dializni pufer pH 7,5	50 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (Sigma, ZDA), 150 mM NaCl (Merck, Nemčija), 5-% glicerol (Carlo Erba Reagenti, Italija)

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 4

Pufer	Sestava pufru
Pufer za CD pH 7,4	20 mM Tris-baza (Sigma, ZDA), 10 mM NaCl
Pufer za triptofansko fluorescenco pH 7,4	50 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl
Eritrocitni pufer pH 7,4	20 mM Tris, 150 mM NaCl
5N (hemoliza)	50 mM Na-acetate pH 5 (Sigma, ZDA), 2 M NaCl, 1 mg/mL lizocim (Sigma, ZDA), 5 mM EDTA
6N (hemoliza)	50 mM MES (Sigma, ZDA) pH 6, 2 M NaCl, 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
7N (hemoliza)	50 mM Tris pH 7, 2 M NaCl, 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
8N (hemoliza)	50 mM Tris pH 8, 2 M NaCl, 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
9N (hemoliza)	50 mM Tris pH 9, 2 M NaCl, 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
5G50 (hemoliza)	50 mM Na acetate pH 5, 500 mM NaCl, 50-% glicerol, 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
7G50 (hemoliza)	50 mM Tris pH 7, 500 mM NaCl, 50-% glicerol, 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
9G50 (hemoliza)	50 mM Tris pH 9, 500 mM NaCl, 50-% glicerol, 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
5G15 (hemoliza)	50 mM Na acetate pH 5, 500mM NaCl, 15-% glicerol, 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
7G15 (hemoliza)	50 mM Tris pH 7, 500 mM NaCl, 15-% glicerol, 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
9G15 (hemoliza)	50 mM Tris pH 9, 500 mM NaCl, 15-% glicerol, 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
7EG (hemoliza)	50 mM Tris pH 7, 500 mM NaCl, 15-% etilen glikol (Merck, Nemčija) 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
7GHCL (hemoliza)	50 mM Tris pH 7, 500 mM NaCl, 500 mM gvanidinijev hidroklorid, 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
7SOR (hemoliza)	50 mM Tris pH 7, 500 mM NaCl, 1 M sorbitol (Sigma, ZDA), 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
6TAC (hemoliza)	500 mM NaCl, 50-% taksimant (Hampton Research, ZDA) pH6, 1 mg/mL lizocim, 5 mM EDTA
OTA pufer (hemoliza)	20 mM Tris-HCl pH 8, 0,5 mM NaCl, 5 mM imidazol, 5 mM DTT

3.1.7 Kemikalije

Etidijev bromid, agaroz, detergent Tween, vodikov peroksid, lizocim, PMSF, benzamidin, metanol, Color Development Reagent – 4-kloro-1-naftol, Sigma Fast™ Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, ZDA), λ DNA/*Hind*III marker, eritrociti, fiziološka raztopina, proteini A145, PlyA in PlyB (KI), QIAquick® PCR Purification Kit, QIAprep® Miniprep in α His₄ Ab BSA-free 100 μ g (Qiagen, Nemčija), BSA, NEB4, *Nde*I, *Hind*III in *Xho*I (NEB, ZDA), Kod Hot Start DNA Polymerase (Merck Millipore, ZDA), nemastno suho mleko (Pomurka, Slovenija), T4 DNA Ligase Kit, FastDigest Green Buffer, *Nco*I (Thermo Scientific, ZDA), zajčja proti mišja Ab (BF), IPTG (GBT, ZDA), benzonaza (Merck, Nemčija), RNAza (Boehringer, Nemčija), 4 \times NuPAGE® LDS Sample Buffer, Novex® Sharp Unstained ali Prestained marker, NuPAGE® MES SDS Running Buffer, NuPAGE® Antioxidant, SimplyBlue™ SafeStain, SilverQuest™ Silver Staining Kit (Life Technologies, ZDA), očetna kislina (Sigma, ZDA).

3.1.8 Oprema

Avtoklav, stresalnik in inkubator (Kambič, Slovenija), stresalnik ISF – 1 – W (Kühner, Švica), tehtnici Kern PEJ in Kern KB (Kern & Sohn, Nemčija), pH meter in tehtnica XS205 (Mettler Toledo, Švica), vakuumska črpalka XF54 230 50, MilliQ RG, celuloza acetatni filter – 0,22 μ m, Amicon® Ultra – 15, Ultracel® 10 kDa (Milipore, ZDA), centrifuga Biofuge 28RS (Heraeus, Nemčija), centrifuga Sorval Lynx 4000, spektrofotometer Nanodrop Spectrophotometer ND-1000, dializna kasetna Slide-A-Lyzer® 10K Dialysis Cassettes (Thermo Scientific, ZDA), ledomat MF 26 (Scotsman, ZDA), destilator vode RiOs 16 (Rephile, Kitajska), BioDoc-It® Imaging System (UVP, ZDA), elektroforetske celice (Biorad, ZDA), mikrovalovka (LG, Južna Koreja), sistem za prenos na membrano iBlot™, naprava za PCR reakcijo AB GeneAmp® PCR System 2700, NuPAGE® Novex® (4-12 %) Bis-Tris Mini Gel, XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System (Life Technologies, ZDA), brezprašna komora PIO LFVP12 (Iskra, Slovenija), avtoklav Systec VX-150 (Biocompare, ZDA), centrifuga 5415R (Eppendorf, Nemčija), grelni blok CH-100 (Biosan, Latvija), vodna kopel LKB 2219 (LKB Bromma, Švedska), centrifuga Rotina 35R (Hettich, Nemčija), sonikator Ultrasonic Processor (Cole-Parmer, ZDA), 0,45 μ m filter (TPP, Švica), cOmplete His-Tag Purification Resin (Roche, Nemčija), spektrometer Chirascan™ CD Spectrometer (Applied Photophysics, Velika Britanija), fluorimeter LS 55 Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer, ZDA).

3.2 METODE

3.2.1 Bioinformacijska analiza

3.2.1.1 Iskanje po podatkovnih zbirkah

Za iskanje egerolizinov smo uporabili sondi:

>gi|54312026|dbj|BAD66668.1| pleurotolysin A [Pleurotus ostreatus] – **SONDA 1**
MAYAQWV I I I I HNVGSKDVKIKNLKPSWGLHADGDKDTEVSASKYEGTVIKPDEKLQINACGRSDAAEGTTG
TFDLVDPADGDKQVRHFYWDPCWGSKTNTWTVSGSNTKWMIEYSGQNLDSGALGTITVDTLKKGN

>Afu3g00590 aspHS AspGDID:ASPL0000104578 COORDS:Chr3_A_fumigatus_
Af293:129373-128892C, translated using codon table 1 (139 amino acids) Verified ORF; Asp-hemolysin;
hemolytic toxin; highly secreted; enriched in conidia; expression increases in vivo; binds
lysophosphatidylcholine – **SONDA 2**
MASVQAYAQWVTVHLINSMSSETLSIQNASLSWGKWKYKDGDKDAEITSEDVQQKTAPPGGSVNVNSCGRSDAS
SGTTGGFDLYDGN TKIGRVHWDCPWGSKTNDFDVGERNKNYWVEIGTWNKYGGAI GTVDVEVGRKR

Za iskanje proteinov z domeno MACPF smo uporabili sondi:

>gi|54312024|Pleurotus ostreatus (523 AK) pleurotolysin B – **SONDA 3**
MEAVLSRQAATAEAI GRFQDSSTSVGLVAGSPSTRIRRQADNVVLKSTS QAGDTLNDVIQDPTRRNKLINDNN
LLKGIIMGRDGPVPSRELIVRPDTLR AI INN R AT I E T T T M E A E F T E T L M E S N Y N S A S V K V S A P F I T A N S E Y S
E S S S F K N T E T E K S M Y T S S R Y L F P Q G R I D F T T P D S G F D D V I K L S P Q F T S G V Q A A L A K A T G T E K R E A L Q N L F Q E Y
G H V F R T K V H I G G V L S A H T M E T F S R S E N E T E V K Q D V K A G L E G A V K G W G G G A T A G H G N T Q G T I T T S Q N R K L N V K Y
I V N G G D Y T K I Q N T E E W V A S T N Q S E H W R V I E V T E V T A V A D L L P Q P I R G Q V K D L L K P L L G K W V D V E K V P G L E S L P
V S V Y R P K G A I P A G W F W L G D T A D A S K A L L V K P T L P A R S G R N P A L T S L H Q G S G M T E Q P F V D L P Q Y Q Y L S T Y F G S F
A H D T P P G S T L R G L R P D H V L P G R Y E M H G D T I S T A V Y V T R P V D V P F P E D E C F D L K S L V R V K L P G S G N P P K P R S A L
K K S M V L F D S G E K

>jgi|77|Alternaria brassicicola (244 AK) DOT – **SONDA 4**
MGEVVPYISGMQRGQGYNTYLQALCVKDAVTIDRHNDNDPAFTREYYSDLVQEYEKI AKSMKI SAGAAVSGWG
QSGNVNVSILNRSEFESSTLT FEVKVLVQH QVSVLDKHSFNKIETANPHATYGD RFIADFIKGGHFYARVSIT
ARNSSETSELKQSAELAMTMYGVSGKVTQEVEQAVSSIQRNASVKIIIIESTGTNTNSASGESFAVKAEESSD
LVAVKAKADQFYKDADTGKHSYVLL

Za iskanje proteinov NLP smo uporabili sondo:

>gi|239781912|pdb|3GNU|P Chain P, Toxin Fold As Basis For Microbial Attack And Plant Defense –
SONDA 5
AVINHDAVPVWPQPEPADATQALAVRFKPKQLDVVNGCQPYPAVDPPQGNTSGGLKPSGSQAAACRDMSKAQVYS
RSGTYNGYYDIMYSWYMPKDSPSIGIGHRHWDENVVVWLDNAASANIVALSAHSGYKKSFPADKSYLDGIT
AKISYKSTWPLDHELGF T T S A G K Q Q P L I Q W E Q M T Q A A R D A L E S T D F G N A N V P F K S N F Q D K L V K A F F Q

Aminokislinska zaporedja smo iskali v štirih podatkovnih zbirkah. Na strani NCBI (ang. National Center for Biotechnology Information) smo uporabili algoritem BLAST (ang.

Basic Local Alignment Search Tool), ki se uporablja za iskanje podobnosti med zaporedji (Altschul in sod., 1990), oz. različici DELTA-BLAST (ang. Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST) za egerolizine in proteine NLP ter PSI-BLAST (ang. Position-Specific Iterated BLAST) za proteine z domeno MACPF. DELTA-BLAST je različica algoritma BLAST, ki vključuje iskanje po ohranjenih domenah in tako omogoča detekcijo tudi oddaljenih homologov (Boratyn in sod., 2012). PSI-BLAST pa je različica, ki prvotne zadetke uporabi za nadaljnja iskanja (Altschul in sod., 1997). Analizo s PSI-BLAST smo izvedli v petih ponovitvah in le za sondo 3. Pregledovali smo podatkovno zbirko ref_seq za kraljestvo gliv. Izbrali smo zadetke z E-vrednostjo pod 0,005 (egerolizini in proteini NLP) ter pod 2 (proteini z domeno MACPF). E-vrednost nam pove, kakšna je verjetnost, da je zadelek statistično značilen. Manjša kot je, večja je verjetnost, da se zadelek ni pojavil po naključju.

Za iskanje po podatkovnih zbirkah JGI (ang. Joint Genome Institute; Grigoriev in sod., 2011; Grigoriev in sod., 2014) in AspGD (ang. *Aspergillus* Genome Database; Arnaud in sod., 2012) smo za vse proteine uporabili različico pBLAST (ang. Protein BLAST), ki je prototip algoritma BLAST za proteine (Altschul in sod., 1997). V podatkovni zbirki JGI smo iskali v podatkovni zbirki gene katalog proteinov za kraljestvo gliv. V podatkovni zbirki AspGD smo uporabili privzete nastavitve. Izbrali smo zadetke z E-vrednostjo pod 0,005 (egerolizini in proteini NLP) ter pod 2 (proteini z domeno MACPF).

V podatkovni zbirki Pfam (Punta in sod., 2011) smo iskali po domenah, ki se nahajajo v naših tarčnih proteinih. To sta domeni MACPF in NPP1 ter egerolizinska domena.

Nabrana zaporedja ustrezajo stanju na dan 12. 4. 2014.

3.2.1.2 Obdelava rezultatov

V zadetkih proteinov z domeno MACPF smo poiskali oznako za MACPF, [YW]-G-x₂-[FY]-x₆-GG, z regularnimi izrazi (ang. regular expressions) v programu Notepad++. Tista zaporedja, ki so ga vsebovali, smo obdržali, ostale pa smo izbrisali.

Proteinska zaporedja smo uvozili v program MEGA6 (ang. Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6; Tamura in sod., 2011) in jih poravnali z algoritmom MUSCLE (ang. MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation), ki se zaradi velike natančnosti uporablja za poravnavo večjega števila zaporedij (Edgar, 2004). Po poravnavi smo s pomočjo izrisa filogenetskega drevesa z algoritmom Maximum Likelihood (Myung, 2003) ugotavljali podobnost nabranih proteinskih zaporedij. Identična zaporedja smo izbrisali. Kot identična zaporedja smo smatrali zaporedja, ki se razlikujejo za največ eno aminokislino, so pridobljena iz istega seva na različen način ali pa iz različnih paritvenih

tipov istega seva. Če se aminokislinski zaporedji iz različnih sevov iste vrste ujemata, smo ohranili le eno zaporedje in njegovemu imenu navedli oba proteina.

Iz končnega nabora proteinskih zaporedij smo izrisali filogenetsko drevo v programu MEGA in ga uredili v programu FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Zastopanost zaporedij v različnih taksonih gliv smo obdelali v programu Excel. Logo proteinov smo izrisali s programom WebLogo (Crooks in sod., 2004). Pri izrisu drevesa za proteine NLP smo izločili proteinska zaporedja z manj kot 150 aminokislin (jgi|Aspc11|707|*Aspergillus clavatus* NRRL 1 (86 AK) EUR (PFAM); jgi|Dotse1|114624|*Dothistroma septosporum* NZE10 v1.0 (54 AK) DOT; PFAM Q2HQE9.1/38-126 *Botryotinia globosa* (126 AK) LEO; PFAM Q2HQF0.1/38-126 *Botryotinia sphaerosperma* (126 AK) LEO).

Za vse organizme, v katerih najdemo oba homologa tako PlyA kot PlyB in se nahajajo v podatkovni zbirki JGI, smo preverili lego homologov. Pridobljene podatke smo kombinirali z analizo sintenije v podatkovni zbirki JGI s funkcijo Synteny.

Pregledana zaporedja smo obdelali z algoritmom SecretomeP 1.0f, ki predvidi način izločanja sesalčjih proteinov (Bendtsen in sod., 2004). Na podlagi rezultatov smo predvideli, ali se proteini izločajo konvencionalno s signalnim peptidom, nekonvencionalno ali pa so citoplazemski.

Izvedli smo tudi obširno internetno iskanje življenjskih slogov in sistematike gliv, ki imajo vsaj enega od iskanih proteinov in se nahajajo v vsaj eni uporabljeni podatkovni zbirki.

3.2.2 Priprava gojišč

Tekoči gojišči LB in SOC smo pripravili z raztapljanjem komponent v destilirani vodi, kot je navedeno v preglednici 2. Gojišče smo avtoklavirali 20 min na 121 °C in ga shranili v hladilniku na štiri stopinje Celzija do uporabe. Pred inokulacijo smo aseptično dodali antibiotike, ki jih potrebujemo za selekcioniranje transformiranih bakterijskih celic določenega seva *E. coli* (preglednica 1).

Tekoče gojišče TB smo pripravili z raztapljanjem komponent v 900 mL destilirane vode, kot je navedeno v preglednici 2. Gojišče smo avtoklavirali 20 min na 121 °C, nato smo mu aseptično dodali 100 mL fosfatnega pufra in ga shranili v hladilniku na štiri stopinje Celzija do uporabe. Pred inokulacijo smo dodali antibiotike, ki jih potrebujemo za selekcioniranje določenega seva *E. coli* (preglednica 1).

Trdno gojišče LB smo pripravili z raztapljanjem komponent in agarja v destilirani vodi, kot je navedeno v preglednici 2. Gojišče smo avtoklavirali 20 min na 121 °C. Ko se je gojišče

ohladilo na 50 °C, smo mu aseptično dodali zelene antibiotike v koncentracijah, navedenih v preglednici 3. Približno 35 mL gojišča smo vlili v posamezno petrijevko in ga shranili v hladilniku na štiri stopinje Celzija do uporabe. Po potrebi smo dodali dodatne antibiotike gojišču pred razmazom bakterijske kulture.

3.2.3 Sterilizacija opreme, gojišč in raztopin

Temperaturno neobčutljiv material smo sterilizirali z avtoklaviranjem 20 min na 121 °C, pri 1,2 bara. Pufre, uporabljene pri izolaciji proteinov, pa smo sterilno prefiltrirali skozi 0,22 µm celuloza acetatni filter.

3.2.4 Priprava genskih konstruktov z metodami molekularnega kloniranja

3.2.4.1 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozno gelsko elektroforezo smo uporabili za preverjanje uspešnosti ligacij in za izolacijo naših vektorjev. V 140 mL enkratnega pufra TBE smo dodali 1,4 g agaroze (1-% gel) in mešanico segrevali tri minute na maksimalni temperaturi v mikrovalovki. Homogeno zmes smo nekoliko ohladili, ji dodali 13 µL etidijevega bromida (10 mg/mL), nato pa jo vlili v kadičko z glavničkom. Za nanašanje smo uporabljali nanašalni gel IV. Uporabljeni marker je bil λDNA/*Hind*III (1 µg). Elektroforeza je potekala 40 min pri napetosti 100 V.

3.2.4.2 Čiščenje fragmentov iz agaroznega gela

Fragmente, izrezane iz agaroznega gela, smo očistili z QIAquick® PCR Purification Kit po protokolu QIAquick® Gel Extraction Kit Protocol (using a microcentrifuge). Nato smo vzorec fragmenta naložili na agarozno gelsko elektroforezo in preverili uspešnost izolacije in čistost fragmenta.

3.2.4.3 Restrikcija in izolacija fragmentov

Sintetične gene za vstavljanje v vektor pET-21c smo z restrikcijskimi encimi izrezali iz vektorja pUC57. Restrikcijaska mešanica je podana v Preglednica 5. Mešanico smo inkubirali 3 h na 37 °C, nato pa restrikcijske encime deaktivirali 10 min na 75 °C. Izrezane fragmente smo naložili na agarozno elektroforezo in jih izolirali z QIAquick® PCR Purification Kit po protokolu QIAquick® Gel Extraction Kit Protocol (z uporabo mikrocentrifuge). Uspešnost čiščenja smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Vektor pET-21c sem dobila že pripravljen in lineariziran z restrikcijskima encimoma *Nde*I in *Xho*I.

Preglednica 5: Restriksijska mešanica za kloniranje v pET-21c

Komponenta	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen (μL)
Sintetični gen (pUC57)		3 μg /reakcijo	15
NEB4 pufer	10 \times	1 \times	10
BSA	20 mg/mL	0,2 mg/mL	1
<i>NdeI</i>	20 000 U/mL	40 U	2
<i>XhoI</i>	20 000 U/mL	40 U	2
milliQ H ₂ O			70
Končni volumen			100

Za vstavljanje genov z novimi restriksijskimi mesti v vektor pET-22b smo potrebovali ujemajoče lepljive konce, zato smo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) vstavili nova restriksijska mesta. Produkt PCR smo dodali v restriksijsko mešanico, podano v preglednici 6, vektor pET-22b pa v restriksijsko mešanico, podano v preglednici 7. Mešanici smo inkubirali tri ure na 37 °C, nato pa restriksijske encime deaktivirali s segrevanjem na 75 °C za 10 min. Izrezane fragmente smo naložili na agarozno elektroforezo in jih izolirali z QIAquick® PCR Purification Kit po protokolu QIAquick® Gel Extraction Kit Protocol (z uporabo mikrocentrifuge). Uspešnost čiščenja smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

Preglednica 6: Restriksijska mešanica za kloniranje v vektor pET-22b

Komponenta	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen (μL)
reakcija PCR (celoten V)			50
FastDigest Green pufer	10 \times	1 \times	10
<i>NcoI</i>	1 000 FDU/mL	5 FDU	5
<i>XhoI</i>	20 000 U/mL	60 U	3
milliQ H ₂ O			32
Končni volumen			100

Preglednica 7: Restriksijska mešanica za kloniranje v vektor pET-22b – vektor

Komponenta	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen (μL)
vektor pET-22b		3 μg /reakcijo	60
FastDigest Green pufer	10 \times	1 \times	10
<i>NcoI</i>	1 000 FDU/mL	3 FDU	3
<i>XhoI</i>	20 000 U/mL	40 U	2
milliQ H ₂ O			25
Končni volumen			100

3.2.4.4 Ligacija v vektor

Očiščenim fragmentom ali vektorjema smo dodali preostale komponente ligacijske zmesi (preglednice 8, 9 in 10) ter inkubirali na sobni temperaturi 30 min.

Preglednica 8: Ligacijska mešanica za kloniranje v vektor pET-21c

Komponenta	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen (μL)
sintetični gen (<i>NdeI</i> , <i>XhoI</i>)			2,5
pET-21c (<i>NdeI</i> , <i>XhoI</i>)			2,5
ligacijski pufer	10 \times	1 \times	1
T4 ligaza	5 000 U/mL	2,5 U	0,5
milliQ H ₂ O			3,5
Končni volumen			10

Preglednica 9: Ligacijska mešanica za kloniranje proteina NLP v vektor pET-22b

Komponenta	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen (μL)
PCR produkt NLP (<i>NcoI</i> , <i>XhoI</i>)			2
pET-22b (<i>NcoI</i> , <i>XhoI</i>)			1,5
ligacijski pufer	10 \times	1 \times	1
T4 ligaza	5 000 U/mL	2,5 U	0,5
milliQ H ₂ O			5
Končni volumen			10

Preglednica 10: Ligacijska mešanica za kloniranje proteina B473 v vektor pET-22b

Komponenta	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen (μL)
PCR produkt B473 (<i>NcoI</i> , <i>XhoI</i>)			1
pET-22b (<i>NcoI</i> , <i>XhoI</i>)			1
ligacijski pufer	10 \times	1 \times	1
T4 ligaza	5 000 U/mL	2,5 U	0,5
milliQ H ₂ O			6,5
Končni volumen			10

3.2.4.5 Transformacija kompetentnih celic *E. coli*

Transformacijo celic smo izvedli s toplotnim šokom, posledica katerega je odprtje por v celični membrani, ki omogoči vstop plazmidne DNA. Kompetentne bakterijske celice (150-200 μL), ki so bile shranjene pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo odtajali na ledu in jim aseptično dodali 10 μL ligacijske mešanice oz. 1 μL plazmida. Na ledu smo jih inkubirali 15 min, nato pa jih predstavili v vodno kopel, segreto na $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, za 1,5 min. Ponovno smo jih prenesli na led in jih inkubirali pet minut. Po končani inkubaciji smo jim dodali 600 μL na sobno temperaturo ogretega gojišča SOC. Vse skupaj smo stresali približno eno uro pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri 200 obratov/min. Potencialno transformirane celice smo selekcionirali na ploščah LB z odgovarjajočimi antibiotiki na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ čez noč.

3.2.4.6 Izolacija plazmidne DNA

Kolonijo transformiranih bakterij DH5 α smo z zobotrebcem aseptično prenesli v 10 mL gojišča LB z ampicilinom in jih namnožili čez noč na 37 °C pri 160 obratih/min. Gojišče z biomaso (6 mL) smo centrifugirali pri 13200 obratov/min dve min, nato pa smo plazmid izolirali s QIAprep® Miniprep. Po izolaciji plazmida smo naredili kontrolno restrikcijo (Preglednica 11 in Preglednica 12), ki je potekala približno dve uri na 37 °C. Mešanico smo nanесли na agarozno gelsko elektroforezo.

Preglednica 11: Restrikcija za kontrolo uspešnosti kloniranja v vektor pET-21c

Komponenta	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen (μ L)
vektor z vključkom (pET-21c)			5
NEB4 pufer	10 \times	1 \times	2
BSA	20 mg/mL	0,2 mg/mL	0,2
<i>Nde</i> I	20 000 U/mL	6 U	0,3
<i>Xho</i> I	20 000 U/mL	6 U	0,3
milliQ H ₂ O			12,2
Končni volumen			20

Preglednica 12: Restrikcija za kontrolo uspešnosti kloniranja v vektor pET-22b

Komponenta	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen (μ L)
vektor z vključkom (pET-22b)			5
FastDigest Green pufer	10 \times	1 \times	2
<i>Nco</i> I	1 000 FDU/mL	0,3 FDU	0,3
<i>Xho</i> I	20 000 U/mL	6 U	0,3
milliQ H ₂ O			12,4
Končni volumen			20

3.2.4.7 Verižna reakcija s polimerazo

Sintetične gene za vstavljanje v vektor pET-21c smo naročili pri podjetju GenScript. Za kloniranje v vektor pET-22b smo z metodo PCR vstavili novo restrikcijsko mesto. Za protein NLP smo uporabili *Nco*I NLP ter *Xho*I NLP začetna oligonukleotida in plazmid iz klona številka 7. Za protein B473 pa *Nco*I B473 ter *Xho*I B473 začetna oligonukleotida in plazmid iz klona številka 1. Sestava mešanice in program za reakcijo PCR sta podana v preglednicah 13 in 14.

Preglednica 13: Mešanica za reakcijo PCR

Komponenta	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen (μL)
Plazmid	/	/	0,3
Vodilni začetni oligonukleotid	100 pmol/ μL	30 pmol/ μL	1,5
Povratni začetni oligonukleotid	100 pmol/ μL	30 pmol/ μL	1,5
dNTP		0,2 mM	5
MgSO ₄		1 mM	3
Hot Start pufer	10 \times	1 \times	5
Kod Hot Start DNA polimeraza		1U	1
milliQ H ₂ O			32,7
Končni volumen			50

Preglednica 14: Program reakcije PCR

Stopnja		Temperatura	Čas
Začetna denaturacija		95 °C	2 min
35 ciklov	Denaturacija verige	95 °C	20 s
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	60 °C	20 s
	Podaljševanje verige	70 °C	40 s
Končno podaljševanje		70 °C	7 min
Shranjevanje reakcije		4 °C	∞

3.2.4.8 Določanje nukleotidnega zaporedja produktov reakcije PCR

Za določanje zaporedja produktov reakcije PCR smo namešali vzorce sestavljene iz 2,5 μL DNA, 2,5 μL začetnih oligonukleotidov (10 pmol/ μL ; slika 13) in 5 μL milliQ H₂O. Le-te smo nato poslali podjetju GATC.

T7 promoter: TAATACGACTCACTATAGG (20 NK)

T7 terminator: GCTAGTTATTGCTCAGCGG (19 NK)

Slika 13: Začetni oligonukleotidi za določanje zaporedja produktov reakcije PCR

3.2.5 Priprava heterolognega proteina v bakteriji *E. coli*

Transformirano kolonijo *E. coli* smo prenesli v 10 mL gojišča LB z ustreznimi antibiotiki in jo inkubirali pri 37 °C čez noč. Vcepek smo nato prenesli v od 100 mL do enega litra gojišča LB oz. TB in pri optični gostoti (OD) 0,6-1,0 inducirali sintezo proteinov z dodatkom IPTG (1 mM). Celice smo stresali 24 ur pri 20 °C ali 37 °C.

3.2.6 Izolacija proteina

3.2.6.1 Priprava inkluzijskih telesc za kromatografijo

Ota in sod. (2013) so razvili protokol za izolacijo inkluzijskih telesc, ki smo ga uporabili pri našem delu. Kulturo smo centrifugirali 10 min na $10000 \times g$ (4°C). Usedlini celic smo dodali pufer za izolacijo iz inkluzijskih telesc (PIIT) 1 pH 8,0 v razmerju 1 : 3 (3 mL na 1 g usedline). Tri minute smo sonicirali po programu enosekundnega pulza in dvosekundne pavze z amplitudo 37 %. Sledilo je 20 min centrifugiranja pri $17000 \times g$ in štiri stopinje Celzija. Odstranili smo supernant in dodali PIIT 2 pH 8,0 v razmerju 1 : 5. Ponovili smo triminutno soniciranje in centrifugiranje. Supernatant smo ponovno odstranili in usedlino resuspendirali v PIIT 3 pH 8,0 v razmerju 1 : 5. Naslednjih 20 min smo centrifugirali na $17.000 \times g$ pri 4°C . Odstranili smo supernatant in usedlini dodali PIIT 4 pH 8,0 v razmerju 1 : 3. Suspenzijo smo stresali čez noč v hladni sobi, nato pa jo centrifugirali 30 min pri $17.000 \times g$ in štiri stopinje Celzija. Denaturirani protein v supernatantu smo renaturirali s 100-kratnim redčenjem v PIIT 5 pH 8,0. Rastopino proteina smo stresali eno uro v hladni sobi. Sledilo je ponovno centrifugiranje 30 min pri $4800 \times g$ in 10 min pri $10000 \times g$. Usedlino smo zavrgli, supernatant pa uporabili v nadaljnjih postopkih.

3.2.6.2 Priprava netopne frakcije za kromatografijo

Kulturo smo centrifugirali 10 min na $10000 \times g$ (4°C). Stehtali smo usedlino celic in ji dodali pufer za lizo (dvakratnik mase usedline), 0,5 mg/mL lizocima, 10 $\mu\text{g/mL}$ DNAze (benzonaze), 20 $\mu\text{g/mL}$ RNAze, 0,5 mM PMSF ali $\frac{1}{2}$ tablete SIGMA FAST™ Protease Inhibitor Cocktail ter 1 mM benzamidin. Suspenzijo smo stresali eno uro v hladni sobi, nato pa jo prenesli na led. V časo smo potopili sondo in sonicirali s programom dvakrat po pet minut, kjer sta se izmenjevala enosekundni pulz in dvosekundna pavza.

Razbite celice smo centrifugirali 30 min pri $25000 \times g$ (4°C). Supernatant smo odlili, peletu pa dodali 25 mL pufera za lizo s 6 M gvanidinijevim hidrokloridom. Rastopino smo stresali čez noč v hladni sobi, nato pa jo centrifugirali 30 min pri $30000 \times g$ (4°C). Supernatant smo filtrirali skozi 0,45 μm -filter.

3.2.6.3 Priprava periplazemske frakcije za kromatografijo

Za pripravo periplazemske frakcije smo uporabili protokol podjetja Novagen (pET System manual, 2006). Dva litra kulture smo centrifugirali 10 min pri $10000 \times g$ (4°C). Usedlini celic smo dodali 50 mL hipertonične rastopine pH 8,0, nato pa inkubirali 30 min pri 4°C . Po koncu inkubacije smo ponovno centrifugirali 10 min pri $10000 \times g$ (4°C). Usedlini smo nato dodali hipotonično rastopino in inkubirali 30 min pri štirih stopinjah Celzija. Sledilo

je centrifugiranje 10 min pri 10000 x g (4 °C). Supernatant smo filtrirali skozi 0,45 µm-filter.

3.2.6.4 Nikljeva afinitetna kromatografija

Nikljeva afinitetna kromatografija je metoda, ki temelji na tvorbi koordinacijskih vezi med imidazolnimi skupinami histidinov in nikljevimi ioni na koloni. Ta metoda je primerna za izolacijo rekombinantnih proteinov, ki imajo na N- ali C- koncu dodan histidinski repek (Loughran in Walls, 2011).

Izolirane vzorce smo naložili na kolono, napolnjeno z nosilcem cOmpete His-Tag Purification Resin, ki je bil predhodno ekvilibiran z liznim pufrom pH 7,5. Po dodatku vzorca na kolono smo ju inkubirali pri štirih stopinjah Celzija 20 min z rahlim stresanjem. Kolono, na kateri so bili vezani proteini s histidinskimi ostanki, smo spirali z 10 mL liznega pufru pH 7,5, nato je sledila elucija nespecifično vezanih proteinov s 15 mL pufru za spiranje pH 7,5. Na koncu smo eluirali naš rekombinantni protein z elucijskim pufrom pH 7,5.

3.2.6.5 Poliakrilamidna gelska elektroforeza

Poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE) v prisotnosti anionskega detergenta natrijevega dodecilsulfata (NaDS-PAGE) je metoda ločevanja proteinov na osnovi molekulske mase. Razmerje med negativnim nabojem in dolžino polipeptidnih verig je enako za vse proteine (Shapiro in sod., 1967).

Za nanos na gel PAGE smo pripravili 50 µL mešanice; 20 µL vzorca, ki smo ga razredčili s 15 µL vode, 5 µL 2 M DTT, 10 µL štirikratnega pufru NuPAGE® LDS Sample Buffer. Segrevali smo ga 10 min na 70 °C. Na gel NuPAGE® Novex® (4-12 %) Bis-Tris Mini Gel smo nanесли vzorce in marker Novex® Sharp Unstained ali Prestained marker ter smo ga vstavili v elektroforetski sistem X-Cell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System. Elektroforeza je potekala 40 min v elektroforeznem pufu 1-kratni NuPAGE® MES SDS Running Buffer z dodanimi 100 µL antioksidanta NuPAGE® pri konstantni napetosti 200 V. Po končani elektroforezi smo proteine obarvali z barvilom SimplyBlue™ SafeStain ali s srebrom.

Protokol za barvanje s srebrom vključuje spiranje z miliQ H₂O, fiksiranje v 10-% očetni kislini in 40-% etanolu (20 min). Sledila je inkubacija v 30-% etanolu 10 min, raztopini »Sensitizing solution« 10 min in ponovno v 30-% etanolu nadaljnjih 10 min. Nato smo gel spirali z miliQ H₂O 10 min. Gel smo prelili z raztopino »Staining solution« in inkubirali 15 min. Eno minuto smo gel spirali z miliQ H₂O in dodali razvijalec barve (4–8 min).

Barvanje smo ustavili z dodatkom ustavljalca za 10 min. Obarvani gel smo nato ponovno spirali v miliQ H₂O 10 min. Po zaključku postopka smo gel poslikali.

3.2.6.6 Prenos western

Metoda prenos western je uporabna za identifikacijo tarčnega proteina v mešanici proteinov (Mahmood in Yang, 2012). Pri našem delu smo uporabili protitelesa za detekcijo histidinskega repka.

Z napravo iBlot™ smo izvedli prenos proteinov iz poliakrilamidnega gela na nitrocelulozno membrano. Po transferju smo membrano osušili in blokirali nespecifična vezavna mesta na membrani z 10 mL 5-% (m/V) nemastnega suhega mleka v pufru TBS pH 7,4. Blokiranje poteka med stresanjem eno uro pri sobni temperaturi. Membrano smo spirali dvakrat po pet minut v pufru TBS z 0,1-% Tweenom (TBS-T) pH 7,4. Sledila je vezava primarnih mišjih poliklonskih protiteles proti His₄ repku v 5-% mleku v pufru TBS pH 7,4. Inkubirali smo preko noči pri štirih stopinjah Celzija. Po koncu inkubacije smo spirali štirikrat po pet minut v pufru TBS-T pH 7,4.

Sledila je vezava sekundarnih zajčjih proti mišjih protiteles v 5-% mleku v pufru TBS pH 7,4. Inkubirali smo eno uro pri sobni temperaturi med stresanjem. Nato smo membrano spirali dvakrat po pet minut v pufru TBS-T pH 7,4 in trikrat po pet minut v pufru TBS pH 7,4. Detekcijo smo izvedli s 4-kloro-1-naftolom. V 5 mL metanola smo zatehtali 15 mg razvijalca barve »Color Development Reagent« in raztopino zaščitili s folijo. Tej raztopini smo dodali 25 mL puфра TBS pH 7,4 z 15 μL ohlajenega 30-% H₂O₂. Tako smo dobili 0,01-% H₂O₂ razvijalno raztopino. Reakcijo smo ustavili s spiranjem v milliQ H₂O. Slikali smo še vlažno membrano, nato pa jo posušili čez noč.

3.2.6.7 Dializa in cepitev histidinskega repka s proteazo TEV

Vzorcem izoliranih proteinov smo dodali približno 7,5-% (V/V) proteaze TEV ($A_{280}=0,7$) in jih injicirali v 3–12 mL veliko dializno kaseto Slide-A-Lyzer® 10K Dialysis Cassettes. Vzorce smo inkubirali čez noč v hladni sobi z rahlim mešanjem v 3 L dializnega puфра pH 7,5. Nato smo vzorce shranili na –70 °C.

Proteazo TEV smo odstranili na Ni-afinitetni kromatografiji, kjer se je vezal histidinski repke in s histidini označena proteaza TEV, naš protein pa se je izločil v nevezani frakciji. Uspešnost cepitve in čistost proteina smo preverili z elektroforezo NaDS-PAGE.

3.2.6.8 Koncentriranje vzorcev

Za koncentriranje vzorcev smo uporabili koncentrator Amicon® Ultra – 15, Ultracel® 10 kDa. Najprej smo navlažili membrano s centrifugiranjem vode, nato pa smo odpipetirali vzorec in ga centrifugirali pri 3600 obratov/min na 4 °C, dokler ni ostal želeni volumen raztopine proteina.

3.2.7 Analiza proteina

3.2.7.1 Hemoliza

Oborino proteina B473 smo poskusili raztopiti v 16 različnih pufrih (preglednica 4). Vzorce smo stresali čez noč v hladni sobi. Po koncu inkubacije smo jih centrifugirali in jih uporabili za hemolizo.

Eritrocite smo spirali s fiziološko raztopino in jih centrifugirali pri 2500 obratov/min pri sobni temperaturi, dokler supernatant ni bil bister. Sprane eritrocite smo resuspendirali v eritrocitnem pufri pH 7,4, da smo dobili $A_{630} = 0,5$.

Naredili smo dve seriji meritev. V prvi smo proteinu B473 (98 μ L) dodali 2 μ L proteina A145 ($c = 1$ mg/mL) in 100 μ L eritrocitov. V kontrolni seriji pa smo proteinu B473 (100 μ L) dodali le 100 μ L eritrocitov. Merili smo A_{630} na 20 s, skupno 30 min (91 odčitkov). Za pozitivno kontrolo smo uporabili proteina PlyA in PlyB, v razmerju 25 : 1.

3.2.7.2 Cirkularni dikroizem

Cirkularni dikroizem (CD) je spektroskopska metoda, ki temelji na absorbciji levo- in desno- sučne polarizirane svetlobe optično aktivnih molekul. Z merjenjem v daljnem območju UV (190-280 nm) lahko določimo delež sekundarnih zgradb. Spekter v bližnjem območju UV pa nam pokaže odtis terciarne zgradbe na podlagi karakterističnih profilov aromatskih aminokislin (Kelly in sod., 2005).

Protein smo razredčili v pufri za CD pH 7,4, da smo dobili koncentracijo okoli 0,2 mg/mL. CD spekter v daljnem UV območju (195–280 nm) smo merili pri 20 °C v kiveti z dolžino poti enega milimetra. Opravili smo tri ponovitve. Razmik med posameznimi točkami je bil en nanometer, čas povprečenja pa ena sekunda.

3.2.7.3 Triptofanska fluorescenca

Za pojav fluorescence so odgovorne predvsem tri aromatske aminokisliline, fenilalanin, tirozin in triptofan (Lakowicz, 2006) Triptofanska fluorescenca je odvisna od okolja, v

katerem se nahaja triptofan, zato je uporabna pri spremljanju konformacijskih sprememb proteina (Vivian in Callis, 2001).

Pripravili smo 0,5 mL raztopine proteina (koncentracija je 0,06 mg/mL) v pufru za triptofansko fluorescenco pH 7,4. Selektivno smo eksцитirali triptofane pri 295 nm in spremljali emisijo od 305 do 400 nm valovne dolžine pri različnih temperaturah (20 °C, 40 °C, 70 °C in 90 °C). Izračunali smo povprečje treh meritev.

3.2.7.4 Poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti in odsotnosti reducenta

Za nanos na gel PAGE smo pripravili 50 µL vzorca v prisotnosti reducenta; 5 µL 10 × redčenega proteina, ki smo mu dodali 33 µL vode, 5 µL 2 M DTT in 10 µL štirikratnega pufru NuPAGE® LDS Sample Buffer. Vzorec smo segrevali 10 min pri 70 °C.

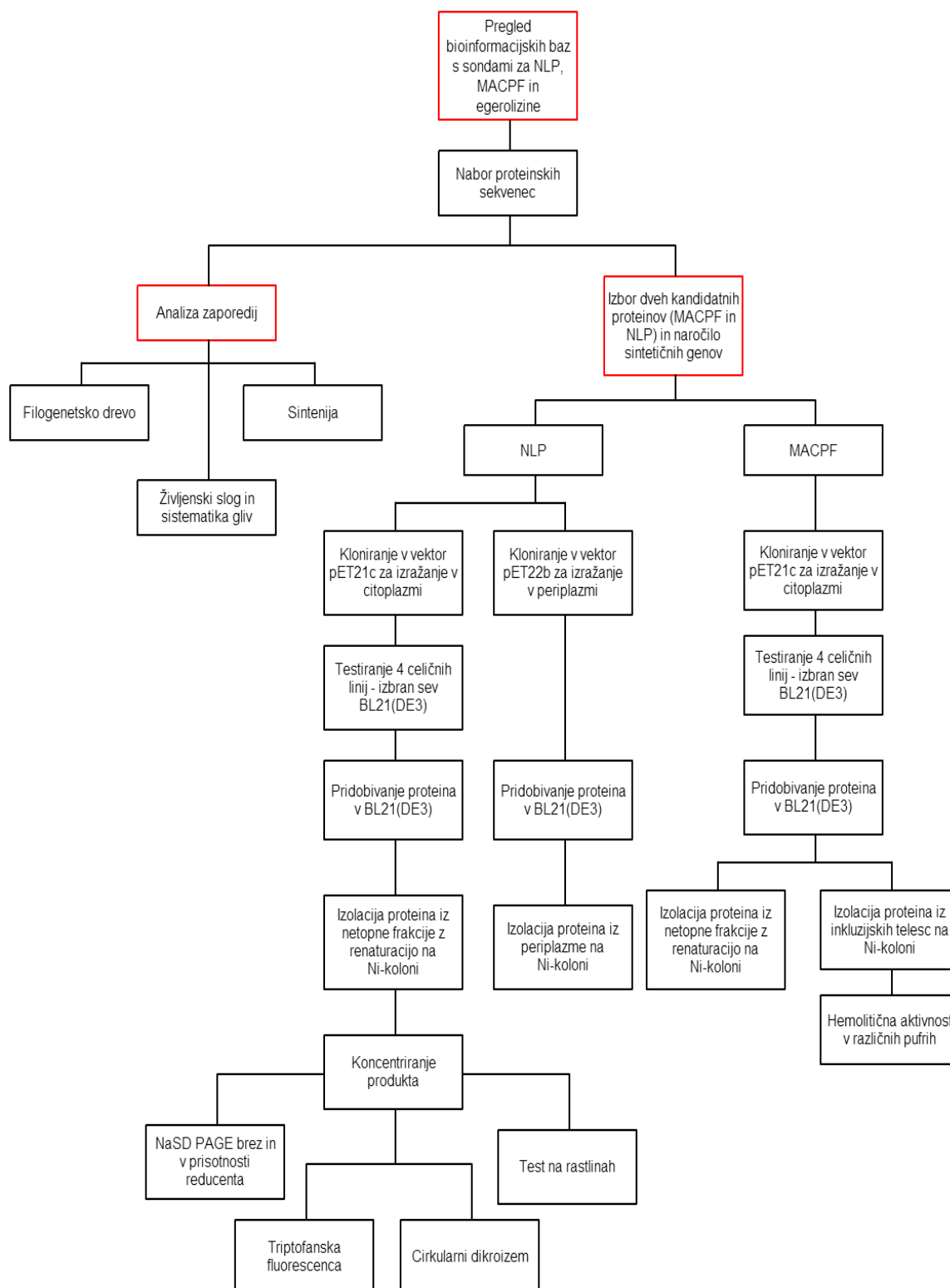
Drugi vzorec pa ni vseboval reducenta; 5 µL 10 × redčenega proteina smo dodali 38 µL vode in 10 µL štirikratnega pufru NuPAGE® LDS Sample Buffer. Vzorec smo segrevali 10 min pri 70 °C.

Elektroforeza je potekala enako, kot je opisano pod točko 3.2.6.5.

3.3.7.5 Testiranje na rastlinah

Testiranje nekrotičnosti našega proteina NLP je izvedla Vesna Hodnik, uni. dipl. biologinja, iz Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti. Za testno rastlino je uporabila rastlino *Nicotiana tabacum* (tobak). Protein je razredčila v milliQ H₂O in ga infiltrirala v koncentracijah 0,0165, 0,033, 0,066, 0,132 in 0,264 mg/mL. Rezultate je poslikala po štirih dneh.

4 REZULTATI



Slika 14: Shematski prikaz poteka dela

4.1 NABOR PROTEINSKIH ZAPOREDIJ

4.1.1 Proteini NLP

Analiza Pfam za domeno NPP1 (PF05630) – **207**

Rezultati za sondo 5:

NCBI (delta blast, ref protein, fungi, E=0,005): **82**

JGI (pblast, gene catalog protein, fungi, E=0,005): **263**

AspGD (pblast, default, E=0,005): **30**

Vse skupaj smo našli 582 proteinskih zaporedij.

4.1.2 Egerolizini

Analiza Pfam za egerolizinsko domeno (PF06355) – **62**

Rezultati za sondo 1:

NCBI (delta blast, ref protein, fungi, E=0,005): **36**

JGI (pblast, gene catalog protein, fungi, E=0,005): **124**

AspGD (pblast, default, E=0,005): **27**

Rezultati za sondo 2:

NCBI (delta blast, ref protein, fungi, E=0,005): **35**

JGI (pblast, gene catalog protein, fungi, E=0,005): **156**

AspGD (pblast, default, E=0,005): **36**

Vse skupaj smo našli 476 proteinskih zaporedij.

4.1.3 Proteini z domeno MACPF

Analiza Pfam za domeno MACPF (PF01823) – **46**

Rezultati za sondo 3:

JGI (pblast, gene catalog protein, fungi, E=2): **381**

NCBI (PSI blast – 5 krogov, ref protein, fungi, E=2): **366**

AspGD (pblast, default, E=2): **15**

Rezultati za sondo 4:

JGI (pblast, gene catalog protein, fungi, E=2): **529**

AspGD (pblast, default, E=2): **19**

+ 1 zaporedje je najdeno s sintenijo
>jgi|Beaba1|2700|BBA_02700m.01

Vse skupaj smo našli 1356 proteinskih zaporedij. Selekcija zaporedij je bila narejena na podlagi prisotnosti oznake za MACPF ([YW]-G-x₂-[FY]-x₆-GG).

4.2 ANALIZA PROTEINSKIH ZAPOREDIJ

Nabrana proteinska zaporedja smo pregledali in izločili podvojene zadetke. Prečiščene rezultate smo uporabili v nadaljnjih analizah. Za glive, v katerih se pojavljajo egerolizini, proteini z domeno MACPF ter/ali proteini NLP, smo poiskali življenjski slog (priloga A).

4.2.1 Proteini NLP

4.2.1.1 Zastopanost proteinov NLP

Dne 8. 11. 2015 smo v podatkovni zbirki Pfam našli domeno NPP1 v 341 vrstah, od tega je bilo 44 % vrst glivnih (149 vrst). Od 1353 najdenih proteinskih zaporedij z domeno NPP1 je bilo 32 % zaporedij glivnih (434 zaporedij).









Zastopanost proteinov NLP znotraj kraljestva gliv smo preverili v podatkovni zbirki JGI. V oklepaju je navedeno število vrst znotraj taksonov, ki jih najdemo v tej zbirki. V taksonih, ki so pisani krepko, najdemo vsaj en protein NLP (preglednica 15).

Preglednica 15: Zastopanost proteinov NLP v kraljestvu gliv

Glivne vrste iz JGI	Št. proteinskih zaporedij	Število vrst	Povprečno št. proteinskih zaporedij na vrsto	Zastopanost NLP v taksonu (%)
Agaricomycotina (94 vrst)	16	7	2	7
Chytridiomycota (1 vrsta)	3	1	3	100
Cryptomycota (1 vrsta)	/	/	/	0
Dothideomycetes (50 vrst)	66	37	2	74
Eurotiomycetes (49 vrst)	56	33	2	67
Glomeromycota (1 vrsta)	/	/	/	0
Lecanoromycetes (2 vrsti)	/	/	/	0
Leotiomycetes (10 vrst)	19	8	2	80
Orbiliomycetes (2 vrsti)	/	/	/	0
Pezizomycetes (7 vrst)	/	/	/	0
Sordariomycetes (46 vrst)	146	39	4	85
Xylonomycetes (1 vrsta)	/	/	/	0

Pri glivi *Glomerella cingulata*, kjer smo našli največ kopij proteinov NLP, smo preverili lego v genomu osmih kopij (preglednica 16), ki so bile najdene v podatkovni zbirki JGI (od skupnega števila 17). Na shemi gena so z rdečo označeni prevedeni in z modro neprevedeni eksoni. Vmesne regije so introni.

Preglednica 16: Položaj proteinov NLP v genomu glive *G. cingulata*

Oznaka proteina	Lega v genomu	Shema gena
1824425	ogrodje 3: 4099887-4100543	
1935020	ogrodje 4: 216062-217048	
1831794	ogrodje 7: 559403-560190	
1893093	ogrodje 9: 1631835-1632969	
38873	ogrodje 15: 666305-667309	
1775130	ogrodje 27: 608388-609560	
42121	ogrodje 28: 447420-448467	
1850930	ogrodje 36: 57990-59124	

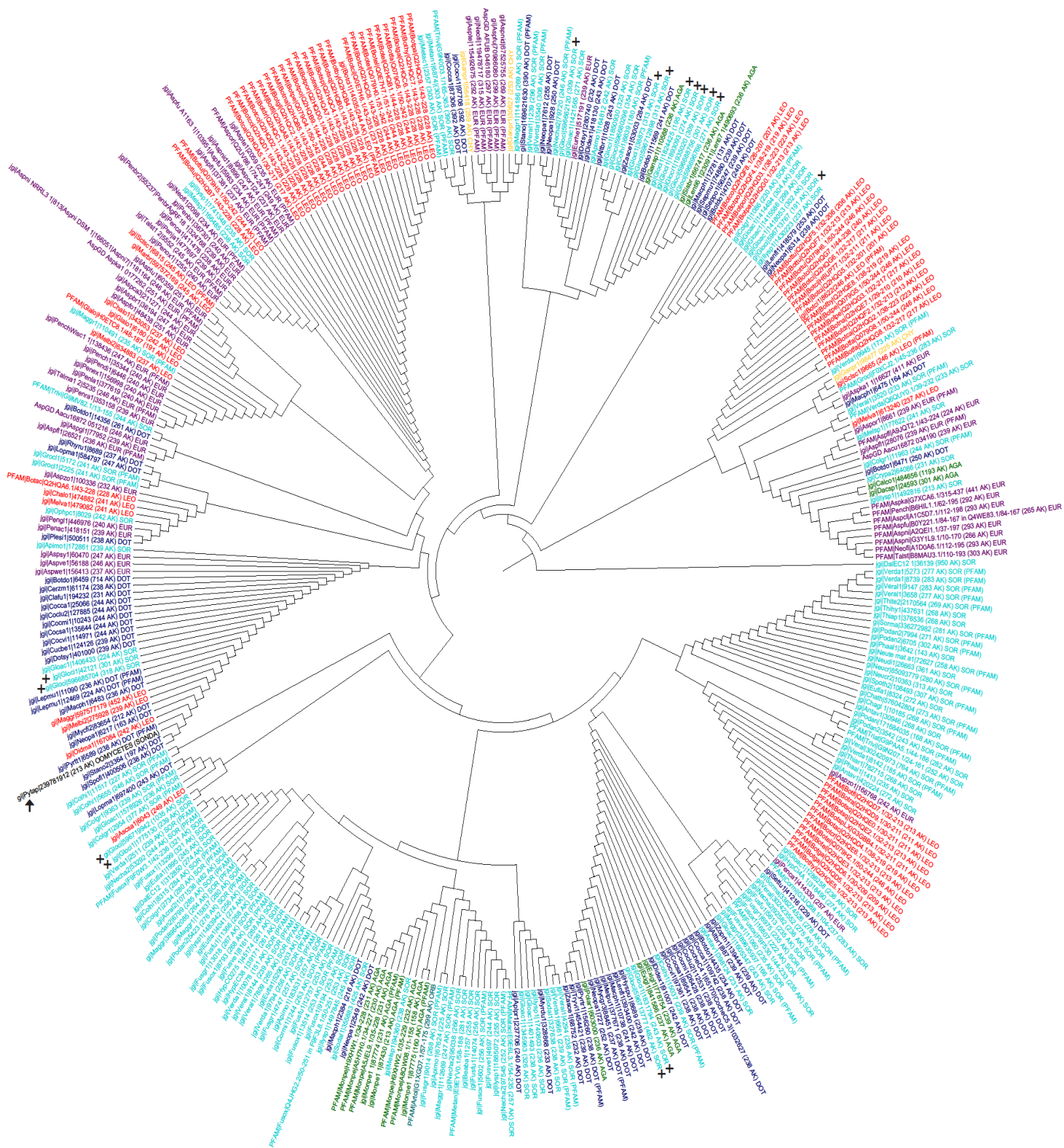
4.2.1.2 Filogenetska analiza proteinov NLP

Izrisali smo filogenetsko drevo (algoritem Maximum Likelihood) ter ga obdelali v programu FigTree (slika 15). Na drevesu so z različnimi barvami označena zaporedja, ki se pojavljajo v določenem taksonu. Zaporedja proteinov NLP iz organizma, kjer smo jih našli v najvišjem številu, so označena s plusom. S puščico sta označeni zaporedji, ki smo ju uporabili kot sonde.

Barvna legenda:

	<i>Agaricomycotina</i>
	<i>Dothideomycetes</i>
	<i>Eurotiomycetes</i>
	<i>Sordariomycetes</i>
	<i>Chytridiomycota</i>
	<i>Oomycetes</i>
	<i>Leotiomycetes</i>
	<i>Orbiliomycetes</i>

slika 15 se nadaljuje



Slika 15: Filogenetsko drevo proteinov NLP

4.2.1.3 Oznaka proteinov NLP

Pri proteinih NLP je zelo dobro ohranjen heptapeptid GHRHDWE, kar drži tudi za naš nabor proteinskih zaporedij (slika 16). Analizirali smo ga s programom WebLogo (Crooks in sod., 2004).



Slika 16: Ohranjenost oznake proteinov NLP

4.2.1.4 Izločanje proteinov NLP

Z algoritmom SecretomeP 1.0f smo analizirali 158 od 373 proteinskih zaporedij NLP. Ostalih zaporedij nismo mogli analizirati zaradi prevelike podobnosti v poimenovanjih, kar je zmotilo algoritem. Pri 13 proteinskih zaporedjih je predvidena nekonvencionalno izločanje, pri 135 pa konvencionalno izločanje s signalnim peptidom.

Od 13 proteinskih zaporedij, kjer je predvideno nekonvencionalno izločanje, je osem zaporedij iz taksona Sordariomycetes, štiri iz taksona Dothideomycetes in eno iz oomicete. Rezultati so v prilogi B.

4.2.2 Egerolizini

4.2.2.1 Zastopanost egerolizinov

Dne 8. 11. 2015 smo v podatkovni zbirki Pfam našli egerolizinsko domeno v 285 vrstah, od tega je bilo 22 % vrst glivnih (63 vrst). Od 352 najdenih proteinskih zaporedij z egerolizinsko domeno je bilo 27 % zaporedij glivnih (94 zaporedij).

Zastopanost egerolizinov v kraljestvu gliv smo preverili v podatkovni zbirki JGI. V oklepaju je navedeno število vrst znotraj taksonov, ki jih najdemo v tej zbirki. V taksonih, ki so odebeljeni, najdemo vsaj en egerolizin (preglednica 17).

Preglednica 17: Zastopanost egerolizinov v kraljestvu gliv

Glivne vrste iz JGI	Št. proteinskih zaporedij	Število vrst	Povprečno št. proteinskih zaporedij na vrsto	Zastopanost egerolizinov v taksonu (%)
Agaricomycotina (94 vrst)	51	20	3	21
Chytridiomycota (1 vrsta)	/	/	/	0
Cryptomycota (1 vrsta)	/	/	/	0
Dothideomycetes (50 vrst)	9	9	1	18
Eurotiomycetes (49 vrst)	73	34	2	69
Glomeromycota (1 vrsta)	/	/	/	0
Lecanoromycetes (2 vrsti)	/	/	/	0
Leotiomycetes (10 vrst)	/	/	/	0
Orbiliomycetes (2 vrsti)	/	/	/	0
Pezizomycetes (7 vrst)	1	1	1	14
Sordariomycetes (46 vrst)	13	12	1	26
Xylonomycetes (1 vrsta)	/	/	/	0

Pri glivi *Leucogyrophana mollusca*, kjer smo našli največ kopij egerolizinov, smo preverili lego v genomu vseh 11 kopij (preglednica 18). Na shemi gena so z rdečo označeni prevedeni in z modro neprevedeni eksoni. Vmesni predeli so introni.






Preglednica 18: Položaj egerolizinov v genomu glive *L. mollusca*

Oznaka proteina	Lega v genomu	Schema gena
1031757	ogrodje 40: 12717-13287	
1031743	ogrodje 40: 1607-2354	
1015671	ogrodje 130:17938-18415	
1130958	ogrodje 138: 62834-63310	
1097675	ogrodje 236: 39726-40774	
1040248	ogrodje 278: 28880-29641	
1041010	ogrodje 344: 6914-7867	
1133906	ogrodje 344: 11804-12273	
1099592	ogrodje 344: 17034-17692	
1133910	ogrodje 344: 21156-21626	
1042072	ogrodje 558: 6889-7481	

4.2.2.2 Filogenetska analiza egerolizinov

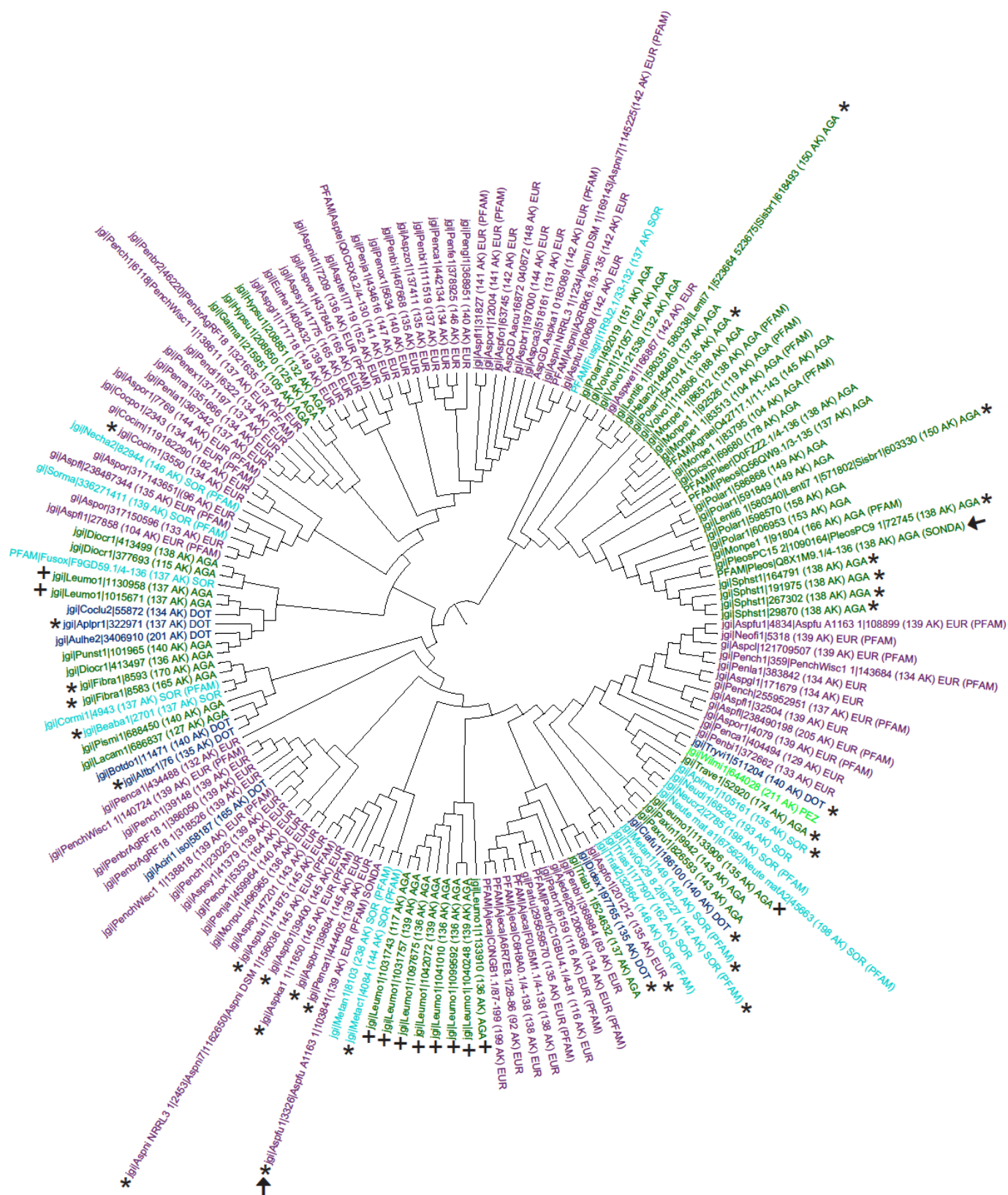
Izrisali smo filogenetsko drevo (algoritem Maximum Likelihood) in ga obdelali v programu FigTree (slika 17). Na drevesu so z različnimi barvami označena zaporedja, ki se pojavljajo v določenem taksonu. Z zvezdico so označena zaporedja, v katerih neposredni bližini se nahaja homolog PlyB. S plusom so označena zaporedja egerolizinov v organizmu, kjer so le-ta zastopana v najvišjem številu. S puščico sta označeni zaporedji, ki smo jih uporabili kot sonde.

Barvna legenda:

	<i>Agaricomycotina</i>
	<i>Dothideomycetes</i>
	<i>Eurotiomycetes</i>
	<i>Pezizomycetes</i>
	<i>Sordariomycetes</i>

slika 17 se nadaljuje

Belc S. Analiza razširjenosti in pridobivanje aktinoporinom ter perforinu podobnih glivnih proteinov.
Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2016



Slika 17: Filogenetsko drevo egerolinov

4.2.2.3 Izločanje egerolizinov

Z algoritmom SecretomeP 1.0f smo analizirali 90 od 160 proteinskih zaporedij egerolizinov. Ostala zaporedja nismo mogli analizirati zaradi prevelike podobnosti v poimenovanjih le-teh, kar je zmotilo algoritem. Pri 36 proteinskih zaporedjih je predvideno nekonvencionalno izločanje, pri devetih pa konvencionalno izločanje s signalnim peptidom.

Od 36 proteinskih zaporedij, kjer je predvideno nekonvencionalno izločanje, je 22 zaporedij iz taksona Eurotiomycetes, štiri iz taksona Sordariomycetes, dva iz taksona Dothideomycetes in osem iz taksona Agaricomycotina. Od devetih zaporedij, kjer je predvideno konvencionalno izločanje, je šest iz taksona Sordariomycetes, en iz taksona Eurotiomycetes in dva iz taksona Agaricomycotina. Rezultati analize so v prilogi C.

4.2.3 Proteini z domeno MACPF

4.2.3.1 Zastopanost proteinov z domeno MACPF

Dne 8. 11. 2015 smo v podatkovni zbirki Pfam našli domeno MACPF v 590 vrstah, od tega je bilo 12 % vrst glivnih (72 vrst). Od 2300 najdenih proteinskih zaporedij z egerolizinsko domeno je bilo šest odstotkov zaporedij glivnih (140 zaporedij).

Zastopanost proteinov z domeno MACPF v kraljestvu gliv smo preverili v podatkovni zbirki JGI. V oklepaju je navedeno število vrst znotraj taksonov, ki jih najdemo v tej zbirki. V taksonih, ki so odebeljeni, najdemo vsaj en protein z domeno MACPF (preglednica 19).

Preglednica 19: Zastopanost proteinov z domeno MACPF v kraljestvu gliv

Glivne vrste iz JGI	Št. proteinskih zaporedij	Število vrst	Povprečno št. proteinskih zaporedij na vrsto	Zastopanost proteinov z domeno MACPF (%)
Agaricomycotina (94 vrst)	59	18	3	19
Chytridiomycota (1 vrsta)	/	/	/	0
Cryptomycota (1 vrsta)	1	1	1	100
Dothideomycetes (50 vrst)	48	25	2	50
Eurotiomycetes (49 vrst)	70	28	3	57
Glomeromycota (1 vrsta)	1	1	1	100
Lecanoromycetes (2 vrsti)	3	1	3	50
Leotiomycetes (10 vrst)	3	3	1	30
Orbiliomycetes (2 vrsti)	7	2	4	100
Pezizomycetes (7 vrst)	5	4	1	57
Sordariomycetes (46 vrst)	43	20	2	43
Xylonomycetes (1 vrsta)	1	1	1	100

Pri glivi *Fusarium graminearum*, kjer smo našli največ kopij proteinov z domeno MACPF, smo preverili lego v genomu 5 kopij (preglednica 20), ki so bile najdene v podatkovni zbirki JGI (od skupnega števila 9) Na shemi gena so z rdečo označeni prevedeni in z modro neprevedeni eksoni. Vmesni predeli so introni.

Preglednica 20: Proteini z domeno MACPF v genomu glive *F. graminearum*

Oznaka proteina	Lega v genomu	Shema gena
32	superogrodje 3.1: 73699-76964	
2090	superogrodje 3.1: 5924666-5925764	
10096	superogrodje 3.5: 2603531-2607042	
12228	superogrodje 3.7: 2335161-2337741	
12367	superogrodje 3.7: 2670683-2671887	

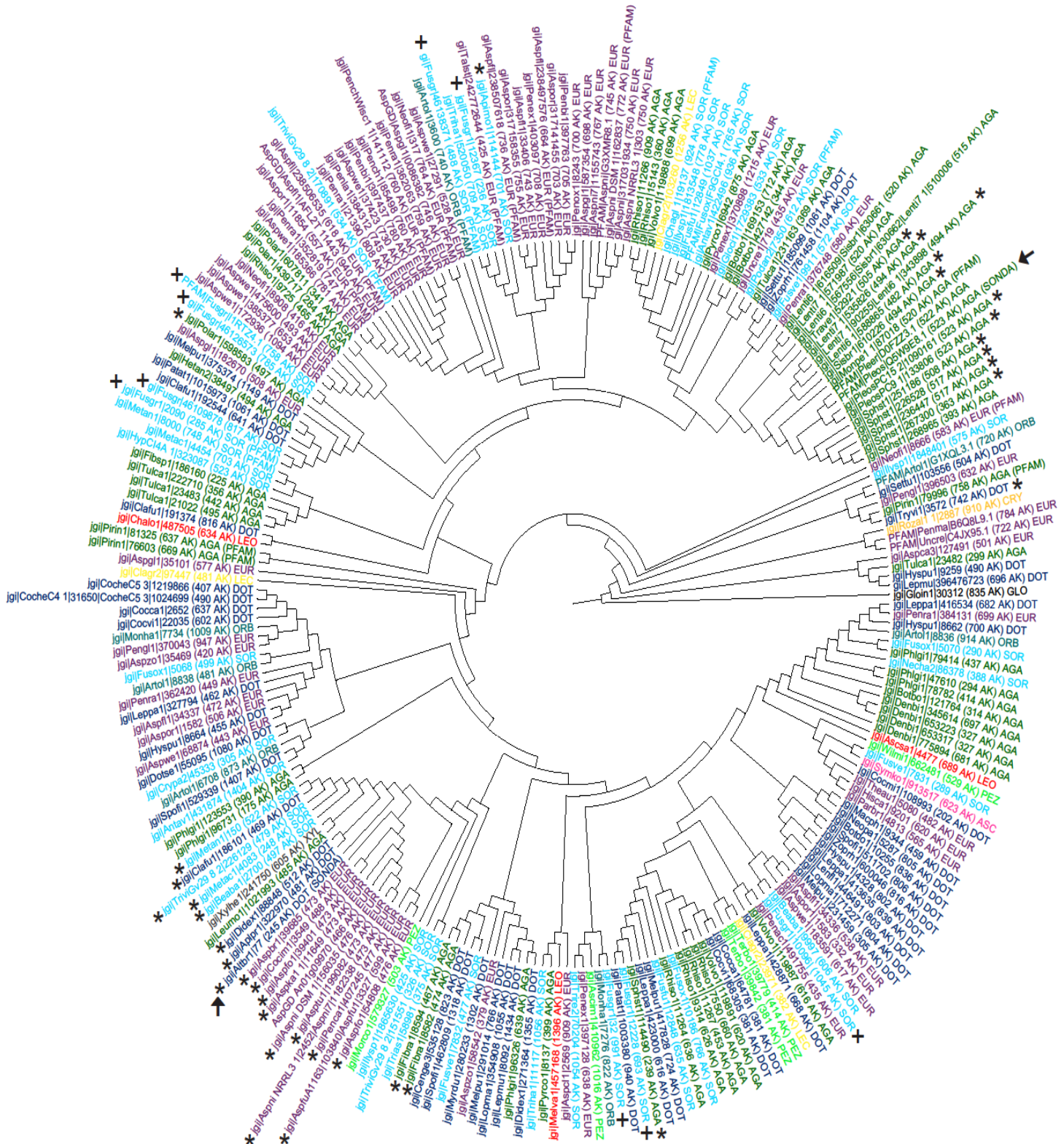
4.2.3.2 Filogenetska analiza proteinov z domeno MACPF

Izrisali smo filogenetsko drevo (algoritem Maximum Likelihood) in ga obdelali v programu FigTree (slika 18). Na drevesu so z različnimi barvami označena zaporedja, ki se pojavljajo v določenem taksonu. Z zvezdico so označena zaporedja, v katerih neposredni bližini se nahaja homolog PlyA. S plusom so označena zaporedja proteinov z domeno MACPF v organizmu, kjer so zastopane v najvišjem številu. S puščico sta označeni zaporedji, ki smo jih uporabili kot sonde.

Barvna legenda:

	<i>Agaricomycotina</i>
	<i>Dothideomycetes</i>
	<i>Eurotiomycetes</i>
	<i>Pezizomycetes</i>
	<i>Sordariomycetes</i>
	<i>Cryptomycota</i>
	<i>Glomeromycota</i>
	<i>Lecanoromycetes</i>
	<i>Leotiomycetes</i>
	<i>Orbiliomycetes</i>
	<i>Xylonomycetes</i>
	<i>Ascomycota</i>

slika 18 se nadaljuje



Slika 18: Filogenetsko drevo proteinov z domeno MACPF

4.2.3.3 Oznaka proteinov z domeno MACPF

S programom WebLogo smo analizirali oznako, ki ga najdemo v glivnih proteinih z MACPF domeno (slika 19).



Slika 19: Oznaka proteinov z domeno MACPF

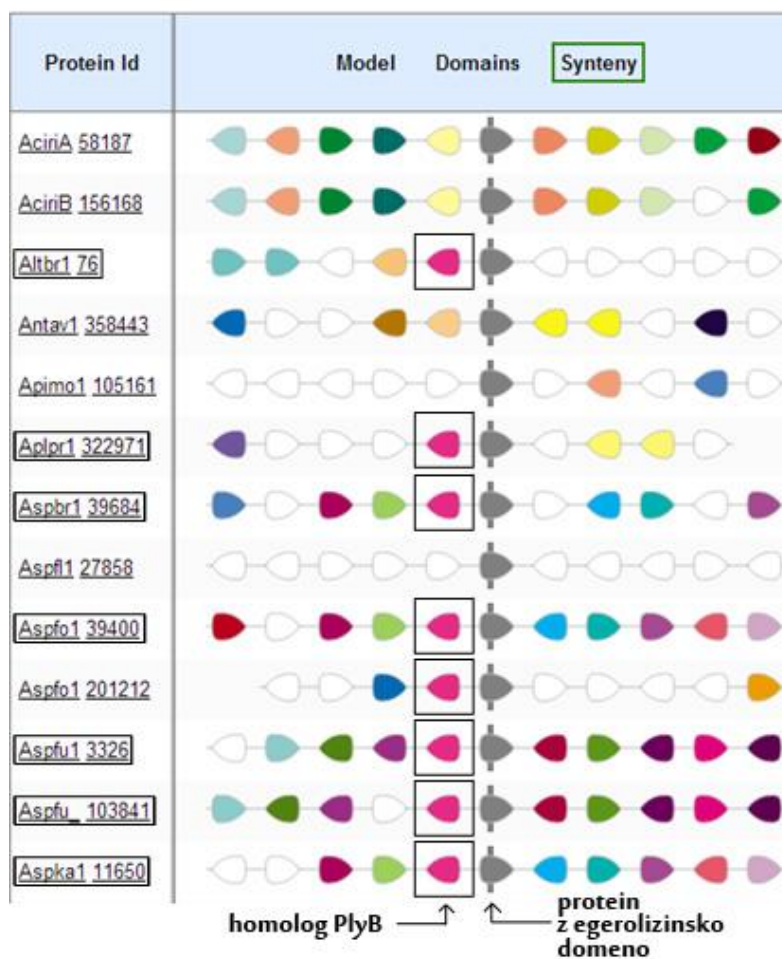
4.2.3.4 Izločanje proteinov z domeno MACPF

Z algoritmom SecretomeP 1.0f smo analizirali 124 od 245 proteinskih zaporedij proteinov z domeno MACPF. Ostala zaporedja nismo mogli analizirati zaradi prevelike podobnosti v poimenovanjih le-teh, kar je zmotilo algoritem. Pri osmih proteinskih zaporedjih proteinov z domeno MACPF je predvidena nekonvencionalna, pri treh pa konvencionalna izločanje s signalnim peptidom.

Od osmih proteinskih zaporedij, kjer je predvideno nekonvencionalno izločanje, je eno zaporedje iz taksona Eurotiomycetes, pet iz taksona Dothideomycetes, eno iz taksona Pezizomycetes in eno iz taksona Agaricomycotina. Od treh proteinskih zaporedij, kjer je predvideno konvencionalno izločanje, je eno iz taksona Sordariomycetes, eno iz taksona Eurotiomycetes in eno iz taksona Cryptomycota. Rezultati so v prilogi D.

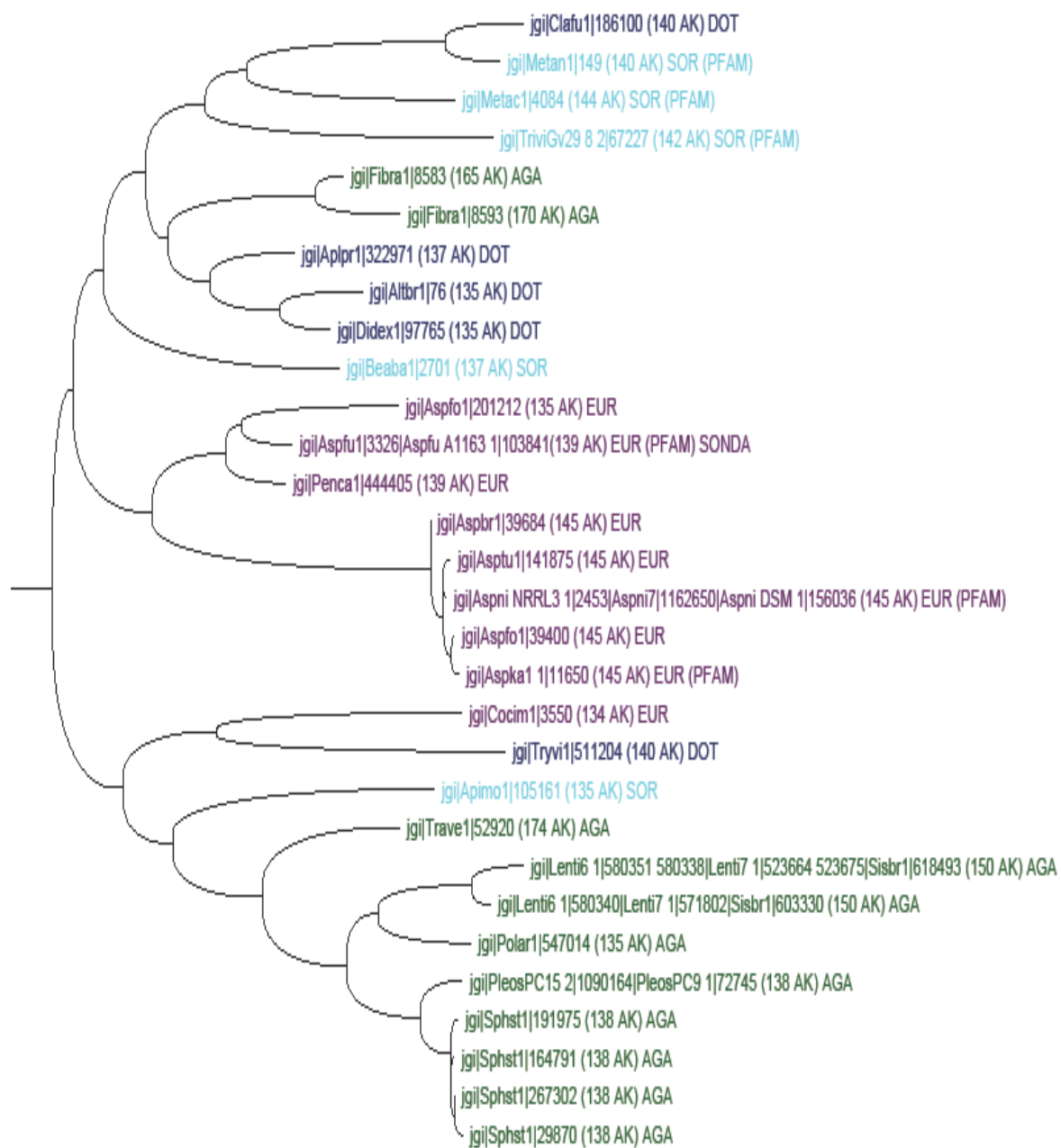
4.2.4 Sintenija homologov PlyA in PlyB

V primeru 39 proteinskih zaporedij smo našli sintenijo z orodjem Synteny zbirke JGI in pregledom položaja v genomu. Na sliki 20 je prikazan del rezultatov analize sintenije. S sivo barvo so označeni geni za protein z egerolizinsko domeno, z roza pa geni za homolog PlyB.

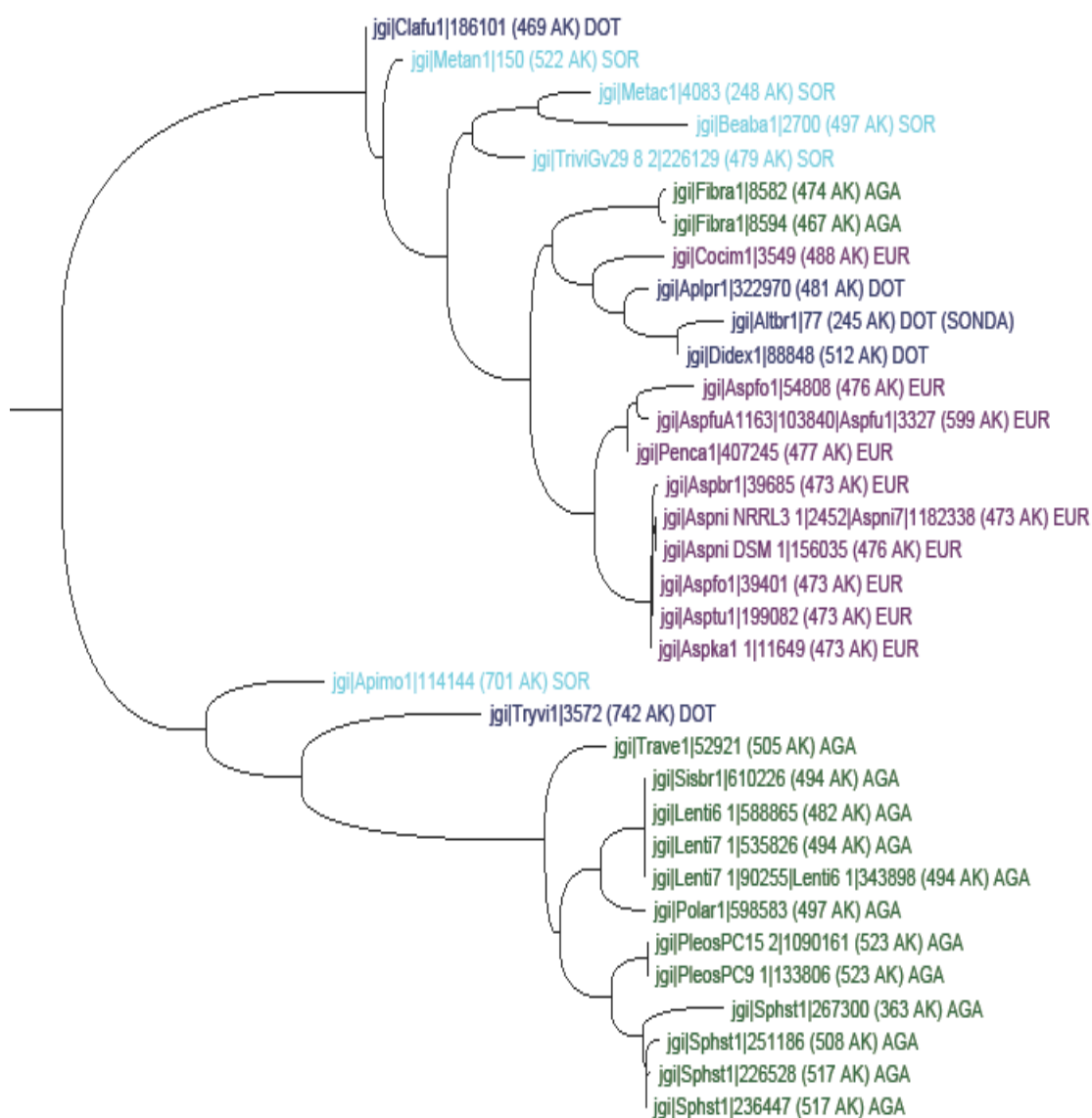


Slika 20: Sintenija genov za protein z egerolizinsko domeno in homolog PlyB

Po analizi smo ta proteinska zaporedja poravnali v programu MEGA6 in izrisali filogenetsko drevo z algoritmom Maximum Likelihood (sliki 21 in 22).



Slika 21: Filogenetsko drevo za homologe PlyA, ki ležijo zraven homologov PlyB

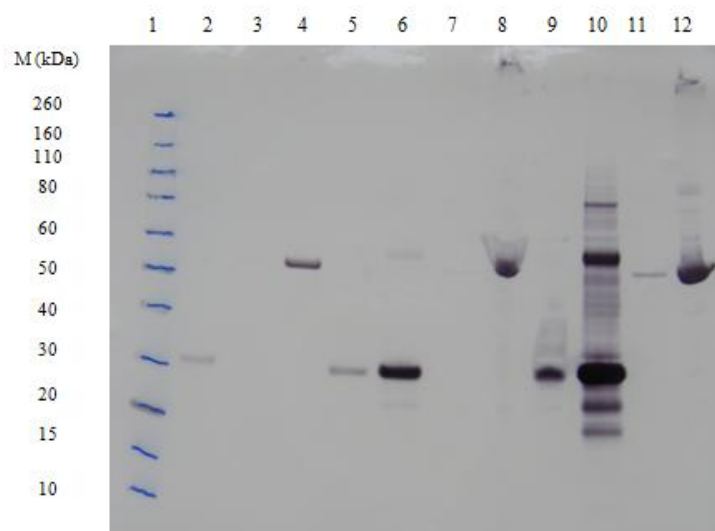


Slika 22: Filogenetsko drevo za homologe PlyB, ki ležijo zraven homologov PlyA

4.3 PRIDOBIVANJE IN ANALIZA PROTEINOV

4.3.1 Testiranje sevov bakterije *E. coli*

Na začetku laboratorijskega dela smo testirali štiri seve bakterije *E. coli* (na sliki 23 so trije) – BL21 (DE3), Origami (DE3), Rosetta-gami in Rosetta (DE3). Kot najboljši producent se je izkazal sev BL21 (DE3), ki smo ga izbrali za nadaljnje delo.



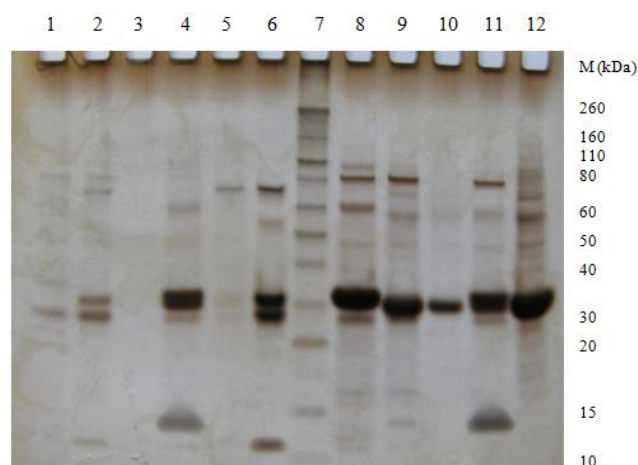
S številko 1 je označen velikostni standard. Od 2 do 4 so vzorci seva Rosetta (DE3). Številka 2 je topna frakcija celičnega lizata s proteinom NLP, 3 pa s proteinom B473. S številko 4 je označena netopna frakcija celičnega lizata s proteinom B473. Od 5 do 8 so vzorci seva Origami (DE3). Številka 5 je topna frakcija celičnega lizata s proteinom NLP, 7 pa s proteinom B473. Številka 6 je netopna frakcija celičnega lizata s proteinom NLP, 8 pa B473. Od 9 do 12 so vzorci seva BL21 (DE3). Številka 9 je topna frakcija celičnega lizata s proteinom NLP, 11 pa s proteinom B473. S številko 10 je označena netopna frakcija celičnega lizata s proteinom NLP, z 12 pa B473.

Slika 23: Prenos western za izbiro produkcijskega seva

4.3.2 Izolacija proteinov

4.3.2.1 Izolacija proteina NLP

Protein NLP smo pridobivali v citoplazmi in periplazmi z gojenjem bakterijske kulture BL21 (DE3) na 20 °C (slika 24). Izolirali in očistili smo ga z nikljevo afinitetno kromatografijo. Bolj uspešna je bila izolacija iz netopne frakcije, kjer smo pridobili dovolj proteina za nadaljnje analize.

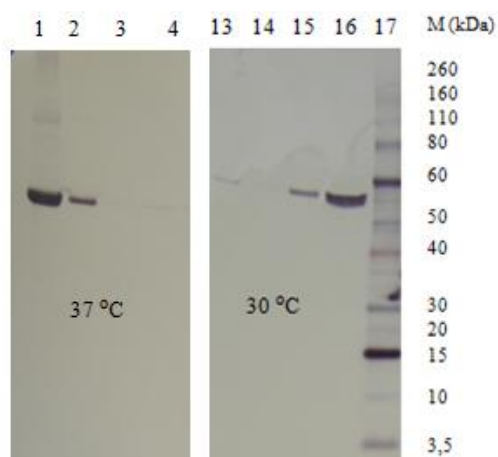


Del usedline bakterijske kulture BL21 (DE3) smo uporabili za izolacijo iz perioplazemske frakcije (vzorci od 1 do 5), del pa za izolacijo iz netopne frakcije (vzorci od 8 do 12). S številko 6 je označen vzorec proteaze TEV in s 7 velikostni marker. Številki 1 in 8 sta vzorca, vzeta po čiščenju na nikljevi koloni (eluat). S številka 2 in 9 sta označena vzorca, vzeta po cepitvi histidinskega repka s proteazo TEV. Številki 3 in 10 sta vzorca proteina po odstranjevanju proteaze TEV in histidinskega repka. Le -ta se ujmeta na nikljevo kolono (vzorca 4 in 11). Vzorca 5 in 12 sta izolirana proteina po koncentriranju.

Slika 24: Izolacija proteina NLP iz perioplazme in iz netopne frakcije

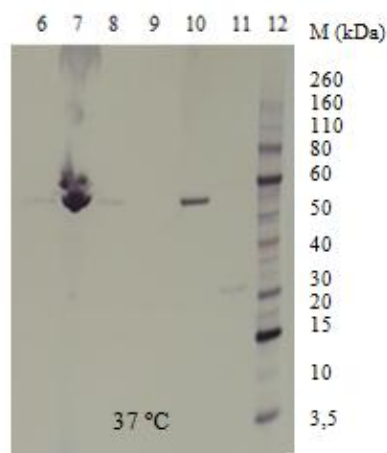
4.3.2.2 Izolacija proteina B473

Protein B473 smo izolirali na tri različne načine: iz inkluzijskih telesc (Ota in sod., 2013), topne ter netopne frakcije z renaturacijo na nikljevi afinitetni koloni (sliki 25 in 26). Izolacije so bile neuspešne, saj se nam je protein oboril oz. ostal v usedlini, zato ga nismo mogli pridobiti v topni obliki za nadaljnje analize.



Bakterijsko kulturo BL21 (DE3), iz katere so bili vzeti vzorci od 1 do 4, smo gojili pri 37 °C, kulturo, iz katere so vzorci od 13 do 16, pa pri 30 °C. Vzorca številka 1 in 16 prikazujeta količino proteina B473 v frakciji, ki se ni vezala na kolono (»flow through«). Številke 2 in 15 ter 3 in 14 prikazujejo vsebnost proteina v vzorcih po spiranju kolone s pufrom za lizo celic in pufrom za spiranje kolone. Številki 4 in 13 pa sta vzorca proteina, ki smo ga uspeli izolirati in očistiti na nikljevi afinitetni koloni.

Slika 25: Primerjava izolacij proteina B473 iz supernatanta



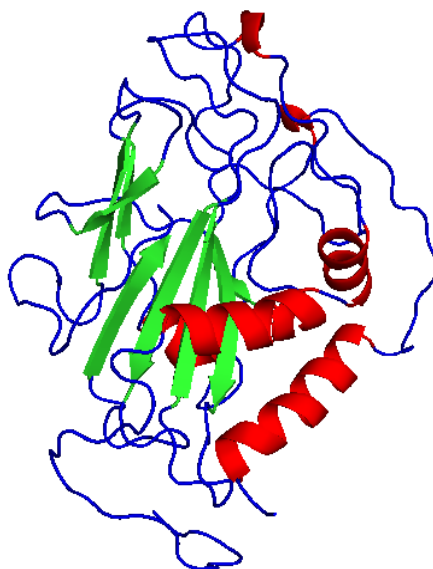
Vzorca številka 6 in 8 sta vzorca izolacije iz inkluzijski telesc. Vzorci od 9 do 11 pa so vzorci izolacije iz netopne frakcije z renaturacijo na koloni. Številka 7 je pozitivna kontrola in številka 12 velikostni standard. Vzorca številka 6 in 9 prikazujeta količino proteina B473 v nevezani frakciji (»flow through«). Številka 10 prikazuje vsebnost proteina v vzorcu po spiranju kolone s puflom za lizo celic. Številki 8 in 11 pa sta vzorca proteina, ki smo ga uspeli izolirati in očistiti na nikeljevi afinitetni koloni.

Slika 26: Prenos western vzorcev izolacij proteina B473

4.3.3 Analiza lastnosti proteina NLP

4.3.3.1 Predikcija 3D zgradbe proteina NLP

Z algoritmom Phyre² (ang. Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0) smo naredili predikcijo 3D zgradbe proteina NLP. Predloga za model je vnos PDB (ang. Protein Data Bank) toxin fold for microbial attack and plant defense s 100 % zaupanjem, da sta proteinski zaporedji homologni. Zgradbo smo izrisali v programu PyMOL (slika 27).

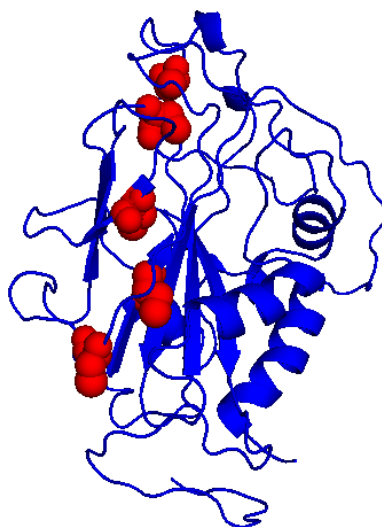


Alfa-vijačnice so označene z rdečo, beta-ploskve pa z zeleno barvo.

Slika 27: 3D model proteina NLP z označenimi sekundarnimi zgradbami

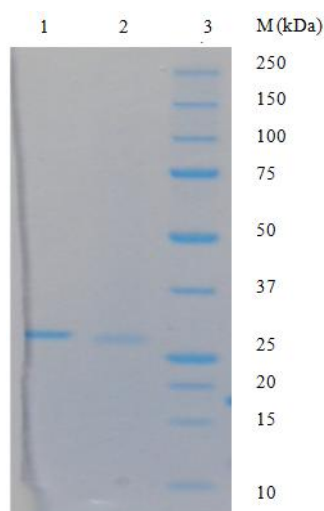
4.3.3.2 Analiza prisotnosti disulfidnega mostička

Protein NLP ima v svojem proteinskem zaporedju pet cisteinov (slika 28), zato smo želeli preveriti, če so v proteinu prisotni disulfidni mostički.



Slika 28: 3D model proteina NLP z označenimi cisteinskimi ostanki

Vzorca smo analizirali z metodo NaDS-PAGE v prisotnosti in odsotnosti reducenta (slika 29). Sprememba v velikosti vzorca bi lahko kazala na intramolekularni disulfidni mostiček.

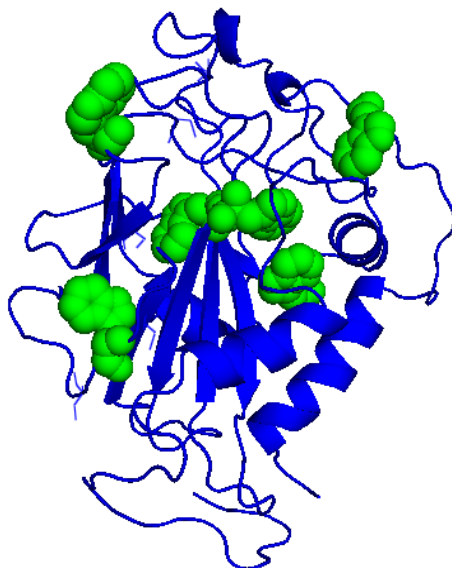


S številko 1 je označen vzorec proteina NLP z dodanim reducentom, s številko 2 pa brez reducenta. Številka 3 je velikostni marker.

Slika 29: Elektroforezna analiza proteina NLP z in brez reducenta

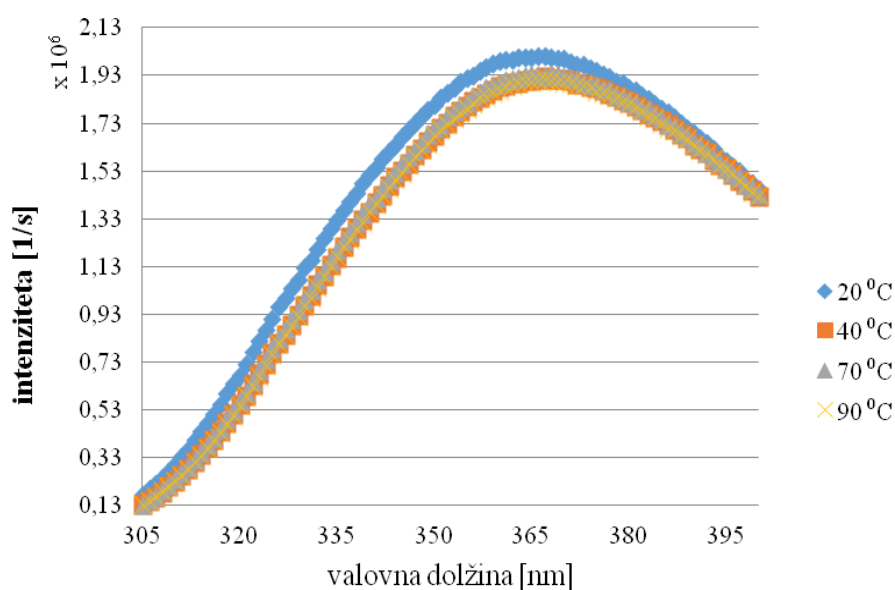
4.3.3.3 Stabilnost proteina NLP

V proteinu NLP se nahaja šest triptofanov (slika 30), zato smo se odločili s triptofansko fluorescenco preveriti stabilnost proteina (slika 31).



Slika 30: 3D model proteina NLP z označenimi triptofani

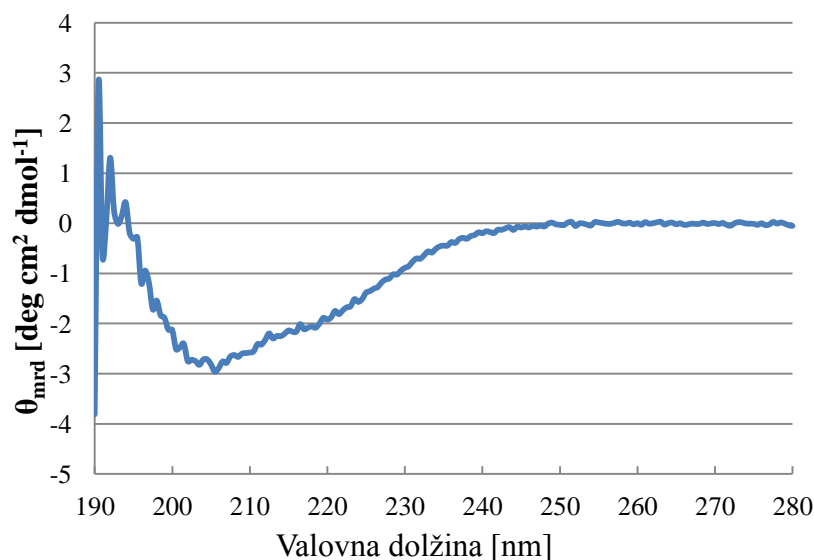
Z višanjem temperature naj bi prišlo do razlik v fluorescenci zaradi konformacijskih sprememb. V našem primeru se spekter ni spremenil, zato sklepamo, da so se nahajali vsi triptofani od vsega začetka na zunanji strani 3D zgradbe in da protein ni popolnoma pravilno zvit. To potrjuje tudi vrh emisije, ki ustreza vrednosti, ki jo dobimo pri merjenju raztopine proteinske molekule s povsem izpostavljenimi triptofani.



Slika 31: Graf triptofanske fluorescence proteina NLP

4.3.3.4 Analiza sekundarnih zgradb znotraj proteina NLP

Prisotnost sekundarnih zgradb smo določili s spektrom CD (slika 32). S programom DichroWeb (Whitmore in Wallace, 2004) smo preračunali meritev v deleže sekundarnih zgradb. Delež alfa-vijačnic je sedem odstotkov, beta-ploskev 38 %, obratov 22 % in kar 33 % neurejenih predelov (rezultati v prilogi E).



Slika 32: Spekter cirkularnega dikroizma proteina NLP

4.3.4 Test delovanja proteina NLP


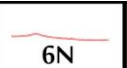







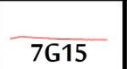
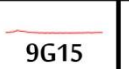






















Raztopino proteina NLP so na Biotehniški fakulteti infiltrirali v tobak. Po štirih dneh so preverili nekrotičnost tkiva testne rastline (slika 33). Na rastlini niso opazili nekroz, kar bi lahko pomenilo, da naš protein ne inducira nekroze ali pa ni pravilno zvit.



Slika 33: Infiltracija proteina NLP v list tobaka

4.3.5 Test delovanja proteina B473

Za test delovanja proteina B473 smo izvedli test hemolize brez in v prisotnosti proteina A145. Preizkusili smo topnost v 16 različnih pufrih. V prvih dveh vrsticah tabele so oznake pufrov (sestava je navedena v Preglednica 4), ki smo jih uporabili. V tretji in četrti vrstici se vrstni red pufrov ponovi. Prvih 16 vzorcev je brez prisotnosti proteina A145, drugih 16 vzorcev pa vsebuje tudi protein A145. Razen pri pozitivni kontroli ni nikjer prišlo do hemolize (slika 34).

								
								
								+ A145
								+ A145

Oznake 5N, 6N, 7N, 8N, 9N, 5G50, 9G50, 5G15, 7G15, 9G15, 7EG, 7GHCl, 7SOR, 7TAC in OTA predstavljajo pufre (preglednica 4). V tretji in četrti vrstici se vrstni red pufrov ponovi. Pozitivna kontrola je označena s + kontrola. V prvih dveh vrsticah se nahaja le raztopina proteina B473, v drugih dveh vrsticah pa je mu je dodan še protein A145.

Slika 34: Hemoliza v različnih pufrih

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Bioinformacijska analiza

5.1.1.1 Podatkovne zbirke

Bioinformatika je postala nepogrešljiv del biotehnoloških znanosti. Zaradi dostopnih cen določanja zaporedja celotnih genomov organizmov se pojavlja vedno več projektov, kot je tudi 1000 glivnih genomov, kjer generirajo ogromne količine podatkov. Le-ti so dostopni širši znanstveni javnosti, ki jih lahko s pridom uporabi v raziskavah. Marsikatero hipotezo lahko preverimo že z analizo obstoječih podatkovnih zbirk z genomi z določenim zaporedjem, kar lahko skrajša laboratorijsko delo in prihrani stroške reagentov.

Eden izmed namenov mojega raziskovalnega dela je bil, da bi z uporabo bioinformacijskih orodij in dostopnih informacij na internetu naredila analizo razširjenosti egerolizinov, proteinov z domeno MACPF ter proteinov NLP znotraj glivnega kraljestva. Čeprav se zdi to nezahtevna naloga, smo se hitro srečali z omejitvami podatkovnih zbirk in uporabljenih orodij ter problemi majhne podobnosti proteinov.

Podatkovni zbirki JGI in AspGD imata vnesene celotne genome organizmov, za razliko od zbirk Pfam in NCBI, kjer so vneseni posamezni proteini. Rezultate iz različnih zbirk ne moremo obdelati z istimi orodji, ker ima vsaka zbirka svoje. Za iskanje po njih se uporabljajo različni algoritmi oz. izpeljanke BLAST-a. Podatkovna zbirka NCBI omogoča uporabo že nekaj izboljšav BLAST-a (PSI-, delta BLAST), kar omogoča bolj kvalitetne zadetke, po drugi strani pa ima podatkovna zbirka JGI vnesenih največ celotnih glivnih genomov.

5.1.1.2 Iskanje zadetkov

Pri izbiri sond za iskanje homologov smo se oprli na raziskovalne članke. Hitro smo ugotovili, da je treba uporabiti več sond, saj je bil spekter zadetkov pri uporabi različnih sond precej različen. Pomembna omejitev je, da se po uporabljenih podatkovnih zbirkah išče po primarni zgradbi, podobnost teh proteinov pa je v zvitju in ne toliko v aminokislinski sestavi.

Pri proteinih z domeno MACPF je bilo to še najbolj problematično, zato smo vrednost E-ja dvignili na 2, kar je povečalo možnost lažnih zadetkov. Zadetke smo selekcionirali glede na prisotnost glivne oznake za MACPF. Selekcija rezultatov ni dopuščala nobenega odstopanja od uporabljene oznake za MACPF, zato smo v tej točki izgubili nekaj zadetkov, ki so odstopali, oz. v katerih oznake ni. Iz začetnih 1356 zadetkov smo prišli na končnih 373.

Za potrebe nadaljnjih raziskav bi bilo možno testirati še katero drugo sondo, povečati vrednost E-ja in selekcionirati zadetke glede na prisotnost oznake tudi pri drugih dveh proteinih. Še boljše bi bilo, če bi bilo možno izvesti iskanje na podlagi zvitja in če bi se tudi v druge podatkovne zbirke integriralo možnost iskanja z različicama PSI- in DELTA- BLAST.

5.1.1.3 Obdelava zadetkov

Na začetku smo preverili zastopanost proteinov v glivah v povezavi z življenjskim slogom. Ker je sistematika gliv zelo aktivno področje, se poimenovanja in klasifikacija gliv še vedno spreminjajo. Pri določenih glivah ne poznamo obeh oblik – telomorfa in anamorfa. V podatkovni zbirki JGI samo štirje taksoni vsebujejo več kot 10 glivnih genomov, zato je nemogoče predpostavljati zastopanost teh proteinov v ostalih taksonih. Pri iskanju značilnih življenjskih slogov smo ugotovili, da ima veliko število gliv širok spekter gostiteljev in lahko dobi hranila iz različnih virov. Opazili smo, da so proteini NLP visoko zastopani v taksonih Eurotiomycetes, Dothideomycetes in Sordariomycetes (od 67 % do 85 % vrst), za razliko s taksonom Agaricomycotina, kjer se nahajajo v le sedmih odstotkih vrst. Pri egerolizinih odstopa takson Eurotiomycetes, kjer jih najdemo v 69 % vrst. V ostalih treh taksonih so zastopani v od 18 % do 26 %. Proteini z domeno MACPF so nizko zastopani v taksonu Agaricomycotina, kjer jih najdemo v le 19% vrst, v ostali treh so zastopani v od 43 % do 57 % vrst. Vsi trije proteini so konstantno nizko zastopani v taksonu Agaricomycotina, na drugi strani pa je v taksonu Eurotiomycetes najnižja zastopanost 57 %. Zastopanost proteinov ne korelira z življenjskim slogom.

Nadalje smo preverili lego iskanih proteinov v glivah, kjer smo našli največje število kopij. Ugotovili smo, da so kopije genov z zapisi za iskane proteine razporejene po celotnem genomu in da proteine najdemo na različnih lokacijah v filogenetskem drevesu, kar lahko kaže na različne darovalce genov. Podobno je v primeru homologov PlyA in PlyB v taksonu Sordariomycetes, kjer so najdeni proteini razporejeni po celotnem filogenetskem drevesu in ne tvorijo večjih skupin.

Filogenetska analiza pri vseh treh proteinih je pokazala, da so redke veje popolnoma taksonomsko homogene. V večini primerov so veje taksonomsko heterogene oz. je prisoten vsaj en protein iz drugega taksona. Delno so za to lahko odgovorne napake pri določanju zaporedij in napake v avtomatski anotaciji. Po drugi strani pa je to razumljivo, saj vsi taksoni združujejo glive iz različnih geolokacij in slogov življenja. Ker se pojavljajo v vseh taksonih (z več kot 10 genomi), ne moremo graditi hipotez na ključnih razlikah med njimi. Opazili smo tudi, da se proteini patogenih ter neškodljivih organizmov nahajajo drug zraven drugega v filogenetskem drevesu. Po mojem mnenju to potrjuje ugotovitve Donga in sod. (2012) ter Zhoua in sod. (2012), da so nekateri izmed proteinov NLP preko evolucije prevzeli druge vloge in nimajo toksičnega učinka na rastlinske celice. Poleg tega so Bailey

in sod. (2002) dokazali, da odsotnost proteina NEP-1 ne vpliva na fitopatogenost glive *F. oxysporum*, kar poraja vprašanja o vlogi teh proteinov v fitopatogenezi.

Pri analizi sintenije smo opazili, da v 38 primerih homolog PlyA leži zraven homologa PlyB. Po pet primerov je bilo najdenih pri taksonih Dothideomycetes in Sordariomycetes. Zanimivo pa je bilo 15 primerov najdenih v taksonu Agaricomycotina, kjer je najnižji procent prisotnosti homologov PlyA in PlyB, ter 12 primerov v taksonu Eurotiomycetes, kjer so ti procenti najvišji. Pri taksonih Dothideomycetes in Sordariomycetes najdemo take primere v skoraj izključno patogenih vrstah (8 od 10). V taksonih Agaricomycotina in Eurotiomycetes pa jih najdemo večinoma v saprofitih. Pri primerjavi dreves smo opazili, da se 14 od 16 najdenih homologov PlyA in PlyB v taksonu Agaricomycotina združi v eno vejo drevesa, pri taksonu Eurotiomycetes pa 11 od 12. Blizu veje, v kateri najdemo proteine iz taksona Agaricomycotina, najdemo v obeh drevesih še proteina iz gliv *Apiospora montagnei* (Sordariomycetes) in *Trypethelium eluteriae* (Dothideomycetes). Ločeno vejo zraven taksona Eurotiomycetes tvorijo dva proteina iz glive *Fibroporia radiculosa* (Agaricomycotina), proteini iz gliv *Alternaria brassicicola*, *Didymella exigua* in *Aplosporella prunicola* (Dothideomycetes) in (v primeru proteinov z domeno MACPF) protein iz glive *Coccidioides immitis* (Eurotiomycetes).

Fitzpatrick (2012) je v svojem članku predstavil metode *in silico* detekcije HGT. Eden izmed načinov je detekcija genov iz dobro ohranjene sintenije, ki so prisotni le v nekaj vrstah, v ostalih sorodnih vrstah pa so odsotni. Na sliki 34 vidimo, da v sorodnih vrstah glive *A. niger* gena za homologa PlyA in PlyB manjkata. Na dnu slike 34 lahko vidimo tudi ponavljajoča se zaporedja, ki ležijo v neposredni bližini obeh genov. Tu se pojavlja vprašanje, če so povezani s transpozonsko aktivnostjo.

Z algoritmom SecretomeP 1.0f smo analizirali prisotnost signalnih peptidov oz. nekonvencionalnega izločanja proteinov. Izbrali smo algoritem za sesalčje celice, ker je edini prilagojen za evkarionte. Pri 85 % analiziranih proteinov NLP je predvidena konvencionalna izločanje s signalnim peptidom, kar se sklada z informacijami iz članka, ki sta ga napisala Gijzen in Nürnbergger (2006). V polovici analiziranih egerolizinov je predvidena izločanje, v večini nekonvencionalna. Novak in sod. (2015) v preglednem članku izpostavljajo kot potencial za aplikacije ravno močne promotorje egerolizinov za pridobivanje heterolognih proteinov. Pri proteinih z domeno MACPF smo našli le nekaj primerov (9 %), kjer je predvidena izločanje. To lahko nakazuje na intracelularno vlogo teh proteinov ali pa je algoritem neustrezen.

Labbe in sod. (2012) so predpostavili, da je veliko število transpozonov v glivi *Laccaria bicolor* povezano z njeno evolucijo iz saprofita v simbionta, kar bi lahko upoštevali pri nadaljnjih analizah. Zanimivo bi bilo tudi poiskati najbližje homologe iz drugih kraljestev, preveriti, kam bi se umestili v filogenetsko drevo, ter z analizo preveriti, kateri organizmi so bolj verjetni darovalci tega gena.

Hipotezo 1 lahko zavrnamo, saj analiza ni pokazala večje zastopanosti iskanih proteinov v patogenih glivah. Hipotezo 2 lahko potrdimo, saj smo odkrili vsaj en primer potencialnega HGT.

5.1.2 Heterologno izražanje

V laboratoriju smo poskušali pridobiti proteina B473 (homolog PlyB) in NLP, oba iz glive *A. niger*. Najprej smo testirali štiri različne seve bakterije *E. coli*. Ugotovili smo, da je sev BL21(DE3) najbolj produktiven, zato smo ga izbrali za nadaljnje delo.

Protein B473 smo pridobili v obliki inkluzijskih telesc. V mediju smo z metodo western blot zaznali topno obliko proteina, vendar v premajhni količini za izolacijo. Protein smo poskušali izolirati na dva načina. Prvi način je bil denaturacija netopne frakcije z gvanidinijevim kloridom in renaturacija na nikljevi koloni. Protein se je na koloni oboril, zato nismo bili uspešni. Drugi način je bil z uporabo protokola, opisanega v članku Ote in sod. (2013). Inkluzijska telesca smo izolirali, vendar opisani renaturacijski pufer ter protokol nista bila primerna za naš protein, tako da smo uspeli pridobiti le oborino proteina. Oborino smo poskušali raztopiti v 16 različnih pufrih in izvesti hemolizo. Test hemolize je bil negativen v vseh primerih. Produkcija v periplazmi je imela zelo nizek izkoristek, zato bi bilo potrebno precej optimizirati metode izolacije, da bi pridobili vsaj minimalno količino proteina za analize.

Protein NLP smo uspešno izolirali v topni obliki iz periplazme in citoplazme. Pri izolaciji proteina iz netopne frakcije (citoplazme) smo uporabili gvanidinijev klorid in protein renaturirali na koloni. V končnem produktu smo zaznali nečistoče, ki so bile vidne tudi na elektroforezi NaSD-PAGE. Z metodami, ki smo jih uporabili za analizo izoliranega proteina, nismo mogli potrditi pravilnega zvitja le-tega. Pri segrevanju raztopine proteina se triptofanska fluorescenca ni spremenila, kar naj bi se zgodilo kot posledica konformacijskih sprememb (Vivian in Callis, 2001). Cirkularni dikroizem pa je pokazal visok procent (33 %) neurejenih predelov. Pri testu na rastlinah nismo opazili nekroz. Razlogov za to je lahko več, kot so na primer prenizka koncentracija, prekratka izpostavljenost, napačna tarčna rastlina in denaturiran oz. nepopolno zvit protein. Prva dva razloga lahko ovržemo, saj je bila koncentracija proteina visoka in izpostavljenost primerno dolga za tak proces. Protein bi bilo potrebno testirati na kakšni drugi rastlini in optimizirati renaturacijo.

Za nadaljevanje raziskave bi bilo zanimivo zamenjati produkcijski organizem in v primeru proteina B473 dodati signalno zaporedje za izločanje. Protein NLP ima signalno zaporedje, vendar je možno, da jo bakterija ne prepozna, zato bi jo bilo dobro odstraniti in vstaviti bakterijsko signalno zaporedje. Nujno pa bi bilo testirati različne renaturacijske pufre in protokole, saj smo pri izolaciji inkluzijskih telesc dobili veliko količino proteina B473, vendar na žalost v obliki oborine. Tudi pri proteinu NLP smo pridobili zadostno količino proteina za analize, vendar je bil najverjetneje nepopolno zvit.

Hipotezo 3 ne moremo potrditi oz. ovreči, ker nam ni uspelo pridobiti proteina v nativni obliki.

5.2 SKLEPI

- ✓ Ni očitne povezave med življenjskim slogom glive ter zastopanostjo proteinov NLP, proteinov z domeno MACPF in egerolizinov.
- ✓ Večina vej v filogenetskem drevesu ni taksonomsko homogenih, kar kaže, da podobnost proteinov ni vezana oz. omejena na taksone.
- ✓ V organizmih z več kopijami genov za iskani protein, najdemo proteine, ki se razlikujejo v aminokislinskem zaporedju, kar bi lahko kazalo na različne darovalce genov.
- ✓ Z bioinformacijsko analizo smo našli 38 primerov, kjer ležita gena za homolog PlyB in PlyA drug zraven drugega podobno kot v glivi *Pleurotus ostreatus*.
- ✓ Na primeru glive *Aspergillus niger* smo z analizo *in silico* pokazali na možni HGT.

6 POVZETEK

Proteini, ki tvorijo pore, so soodgovorni za patogenost gliv, ki so prepoznane kot resna vsesvetovna grožnja prehranski varnosti (Fisher in sod., 2012) in zdravju ljudi (Pfaller in Diekema, 2004). V magistrski nalogi smo z bioinformacijsko analizo želeli raziskati, če obstaja povezava med številom proteinov z domeno MACPF, egerolizinov in proteinov NLP in patogenostjo gliv ter kako življenjski slog gliv vpliva na pojavnost le-teh. S pridobivanjem kandidatnih proteinov v bakteriji *E. coli* smo želeli preveriti naše rezultate bioinformacijske analize in okarakterizirati njune lastnosti.

Pri iskanju značilnih življenjskih slogov smo ugotovili, da veliko število gliv lahko hranila dobi iz različnih virov in ima širok spekter gostiteljev. Zastopanost proteinov ne korelira z življenjskim slogom. Vsi trije proteini so konstantno nizko zastopani v taksonu Agaricomycotina (največ 21 %). V taksonu Eurotiomycetes je najnižja zastopanost proteinov v 57 % vrst.

Preverili smo lego iskanih proteinov v glivah, kjer smo našli največ kopij genov za iskane proteine. Ugotovili smo, da so geni razporejeni po celotnem genomu in da jih najdemo tudi na različnih lokacijah v filogenetskem drevesu, kar lahko kaže na različne darovalce. Filogenetska analiza pri vseh treh proteinih je pokazala, da so zelo redke veje drevesa popolnoma taksonomsko homogene.

Pri analizi sintenije smo opazili, da v 38 primerih homolog PlyA leži zraven homologa PlyB. Pri taksonih Dothideomycetes in Sordariomycetes najdemo take primere večinoma v patogenih vrstah (80 %). V taksonih Agaricomycotina in Eurotiomycetes pa jih najdemo večinoma v saprofitih.

V glivi *A. niger* smo našli z metodami *in silico* potencialni HGT, saj gena za homologa PlyA in PlyB manjkata v sorodnih vrstah. V neposredni bližini obeh genov smo opazili ponavljajoča se zaporedja, ki bi bila lahko povezana s transpozonsko aktivnostjo. Do sedaj niso odkrili veliko primerov HGT v glivah, vendar pa v znanih primerih HGT pomembno vpliva na pojav novih bolezni (Fitzpatrick, 2012) in širjenje spektra gostiteljev patogenih gliv (Mehrabi in sod., 2011).

V laboratoriju smo poskušali pridobiti proteina B473 (homolog PlyB) in NLP iz glive *A. niger* v bakteriji *E. coli*. Oba proteina sta tvorila inkluzijska telesca. Zataknilo se je pri renaturaciji, saj v primeru proteina NLP nismo uspeli potrditi pravilnega zvitja, v primeru proteina B473 pa smo pridobili oborino. Za nadaljnje raziskave bi bilo potrebno najti učinkovit protokol in pufer za renaturacijo ali pa zamenjati produkcijski organizem.

7 VIRI

- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 3: 403–410
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 17: 3389–3402
- Anderluh G., Kisovec M., Kraševc N., Gilbert R. J. C. 2014. Distribution of MACPF/CDC Proteins. V: MACPF/CDC Proteins - Agents of defence, attack and invasion. Anderluh G., Gilbert R. J. C. (ur.) Dordrecht, Springer: 7–31
- Anderluh G., Lakey J. H. 2008. Disparate proteins use similar architectures to damage membranes. *Trends in Biochemical Sciences*, 33, 10: 482–490
- Arnaud M. B., Cerqueira G. C., Inglis D. O., Skrzypek M. S., Binkley J., Chibucos M. C., Crabtree J., Howarth C., Orvis J., Shah P., Wymore F., Binkley G., Miyasato S. R., Simison M., Sherlock G., Wortman J. R. 2012. The *Aspergillus* genome database (AspGD): Recent developments in comprehensive multispecies curation, comparative genomics and community resources. *Nucleic Acids Research*, 40, D1: 653–659
- Bailey B. 1995. Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology*, 85, 10: 1250-1255
- Bailey B., Apel-Birkhold P. C., Luster D. G. 2002. Expression of NEP1 by *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli* after gene replacement and overexpression using polyethylene glycol-mediated transformation. *Phytopathology*, 92, 8: 833–841
- Bakrač B., Gutiérrez-Aguirre I., Podlesek Z., Sonnen A. F., Gilbert R. J., Maček P., Lakey J. H., Anderluh G. 2008. Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 27: 18665-18677
- Bando H., Hisada H., Ishida H., Hata Y., Katakura Y., Kondo A. 2011. Isolation of a novel promoter for efficient protein expression by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 3: 561–569
- Basulto A., Pérez V. M., Noa Y., Varela C., Otero A. J., Pico M. C. 2006. Immunohistochemical targeting of sea anemone cytolytins on tentacles, mesenteric filaments and isolated nematocysts of *Stichodactyla helianthus*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 305, 3: 253–258
- Bendtsen J. D., Jensen L. J., Blom N., Von Heijne G., Brunak S. 2004. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering, Design and Selection*, 17, 4: 349–356
- Berne S., Križaj I., Pohleven F., Turk T., Maček P., Sepčič K. 2002. *Pleurotus* and *Agrocybe* hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1570, 3: 153–159
- Berne S., Lah L., Sepčič K. 2009. Aegerolysins: Structure, function, and putative biological role. *Protein Science*, 18, 4: 694–706

- Berne S., Sepčić K., Anderluh G., Turk T., Maček P., Poklar Ulrih N. 2005. 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*, 44, 33: 11137–11147
- Boratyn G. M., Schäffer A. A., Agarwala R., Altschul S. F., Lipman D. J., Madden T. L. 2012. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biology Direct*, 7, 1: 12, doi: 10.1186/1745-6150-7-12: 14 str.
- Budzko D. B., Negroni R. 1976. Depletion of complement in vivo and in vitro by extracts of *Aspergillus fumigatus*. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 51, 4: 518–524
- Crooks G., Hon G., Chandonia J., Brenner S. 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*, 14: 1188–1190
- Dong S., Kong G., Qutob D., Yu X., Tang J., Kang J., Dai T., Wang H., Gijzen M., Wang Y. 2012. Includes rapidly evolving groups that lack necrosis-inducing activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 7: 896–909
- Dunstone M. A., Tweten R. K. 2012. Packing a punch: the mechanism of pore formation by cholesterol dependent cytolysins and membrane attack complex/perforin-like proteins. *Current opinion in structural biology*, 22, 3: 342–349
- Ebina K., Sakagami H., Yokota K., Kondo H. 1994. Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1219, 1: 148–150
- Edgar R. C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 5: 1792–1797
- Fellbrich G., Romanski A., Varet A., Blume B., Brunner F., Engelhardt S., Felix G., Kemmerling B., Krzymowska M., Nürnberger T. 2002. NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 32, 3: 375–390
- Feng Y., Zhang Y., Ying C., Wang D., Du C. 2015. Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13, 1: 4–16
- Fisher M. C., Henk D. A., Briggs C. J., Brownstein J. S., Madoff L. C., McCraw S. L., Gurr S. J. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484, 7393: 186–194
- Fitzpatrick D. A. 2012. Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 329, 1: 1–8
- Friesen T. L., Stukenbrock E. H., Liu Z., Meinhardt S., Ling H., Faris J. D., Rasmussen J. B., Solomon P. S., McDonald B. A., Oliver R. P. 2006. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature Genetics*, 38, 8: 953–956
- Fukuchi Y., Kudo Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K. 1996a. Binding assay of low density lipoprotein to Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19, 10: 1380–1381

- Fukuchi Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K. 1996b. Apolipoprotein B inhibits the hemolytic activity of asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19, 4: 547–550
- Fukuchi Y., Kudo Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K. 1998. Oxidized low density lipoprotein inhibits the hemolytic activity of Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 167, 2: 275–280
- Galagan J. E., Henn M. R., Ma L. J., Cuomo C., Birren B. 2005. Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology. *Genome Research*, 15, 12: 1620–1631
- Geiser D. M., Gueidan C., Miadlikowska J., Lutzoni F., Kauff F., Hofstetter V., Fraker E., Schoch C. L., Tibell L., Untereiner W., Aptroot A. 2006. Eurotiomycetes: Eurotiomycetidae and Chaetothyriomycetidae. *Mycologia*, 98, 6: 1053–1064
- Georgopapadakou N. H. 1998. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Current Opinion in Microbiology*, 1, 5: 547–557
- Gijzen M., Nürnberger T. 2006. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry*, 67, 16: 1800–1807
- Gilbert R. J. C. 2005. Inactivation and activity of cholesterol-dependent cytolysins: what structural studies tell us. *Structure*, 13, 8: 1097–1106
- Gilbert R. J. C., Mikelj M., Dalla Serra M., Froelich C. J., Anderluh G. 2013. Effects of MACPF/CDC proteins on lipid membranes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 12: 2083–2098
- Grigoriev I. V., Nikitin R., Haridas S., Kuo A., Ohm A. R., Otilar R., Riley R., Salamov A., Zhao X., Korzeniewski F., Smirnova T., Nordberg H., Dubchak I., Shabalov I. 2014. MycoCosm portal: Gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research*, 42, D1: 1–6
- Grigoriev I. V., Nordberg H., Shabalov I., Aerts A., Cantor M., Goodstein D., Kuo A., Minovitsky S., Nikitin R., Ohm A. R., Otilar R., Poliakov A., Ratnere I., Riley R., Smirnova T., Rokhsar D., Dubchak I. 2011. The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic acids research*, 1–7
- Haag E. S., Sly B. J., Andrews M. E., Raff R. A. 1999. Apexrin, a novel extracellular protein associated with larval ectoderm evolution in *Heliocidaris erythrogramma*. *Developmental Biology*, 211, 1: 77–87
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews. Microbiology*, 2, 1: 43–56
- Henrici A. T. 1939. An Endotoxin from *Aspergillus Fumigatus*. *The Journal of Immunology*, 36, 4: 319–338
- Hibbett D. S. 2007. Agaricomycotina. Jelly Fungi, Yeasts, and Mushrooms. The Tree of Life Web Project. <http://tolweb.org/Agaricomycotina/> (18. jun. 2015)
- Hinds M. G., Zhang W., Anderluh G., Hansen P. E., Norton R. S. 2002. Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytolysin Equinatoxin II: implications for pore formation. *Journal of Molecular Biology*, 315, 5: 1219–1229

- Hong Q., Gutierrez-Aguirre I., Barlič A., Malovrh P., Kristan K., Podlesek Z., Maček P., Turk D., Gonzalez-Manas J. M., Lakey J. H., Anderluh G. 2002. Two-step membrane binding by Equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 44: 41916–41924
- Huang S., Yuan S., Guo L., Yu Y., Li J., Wu T., Liu T., Yang M., Wu K., Liu H., Ge J., Yu Y., Huang H., Dong M., Yu C., Chen S., Xu A. 2008. Genomic analysis of the immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity. *Genome Research*, 18, 7: 1112–1126
- Iwata K., Matsuda A., Wakabayashi K., Fukunaga N. 1962. Endotoxin-like substance from *Aspergillus fumigatus*. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 3, 2: 66–73
- Kadota K., Ishino T., Matsuyama T., Chinzei Y., Yuda M. 2004. Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 46: 16310–16315
- Kawano H., Nakatani T., Mori T., Ueno S., Fukaya M., Abe A., Kobayashi M., Toda F., Watanabe M., Matsuoka I. 2004. Identification and characterization of novel developmentally regulated neural-specific proteins, BRINP family. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 125, 1-2: 60–75
- Kelly S. M., Jess T. J., Price N. C. 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1751, 2: 119–39
- Kudo Y., Ootani T., Kumagai T., Fukuchi Y., Ebin K., Yokota K. 2002. A novel oxidized low-density lipoprotein-binding protein, Asp-hemolysin, recognizes lysophosphatidylcholine. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25, 6: 787–790
- Kumagai T., Nagata T., Kudo Y., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K. 2001. Cytotoxic activity and cytokine gene induction of Asp-hemolysin to vascular endothelial cells. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 121, 4: 271–275
- Labbé J., Murat C., Morin E., Tuskan G. A., Le Tacon F., Martin F. 2012. Characterization of transposable elements in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *PloS One*, 7, 8: e40197, doi: 10.1371/journal.pone.0040197: 9 str.
- Lakowicz R. J. 2006. Protein Fluorescence. V: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Lakowicz R. J. (ur.). Boston. Springer, 529–575
- Law R. H. P., Lukoyanova N., Voskoboinik I., Caradoc-Davies T. T., Baran K., Dunstone M. A., D'Angelo M. E., Orlova E. V., Coulibaly F., Verschoor S., Browne K. A., Ciccone A., Kuiper M. J., Bird P. I., Trapani J. A., Saibil H. R., Whisstock J. C. 2010. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature*, 468, 7322: 447–451
- Lichtenheld M. G., Olsen K. J., Lu P., Lowrey D. M., Hameed A., Hengartner H., Podack E. R. 1988. Structure and function of human perforin. *Nature*, 335, 6189: 448–451
- Loughran S. T., Walls D. 2011. Purification of poly-histidine-tagged proteins. *Methods in Molecular Biology*, 681, 311–335
- Lukoyanova N., Kondos S. C., Farabella I., Law R. H. P., Reboul C. F., Caradoc-Davies T. T., Spicer B. A., Kleifeld O., Traore D. A. K., Ekkel S. M., Voskoboinik I., Trapani J.

- A., Hatfaludi T., Oliver K., Hotze E. M., Tweten R. K., Whisstock J. C., Topf M., Saibil H. R., Dunstone M. A. 2015. Conformational changes during pore formation by the perforin-related protein Pleurotolysin. *PLoS Biology*, 13, 2: e1002049, doi: 10.1371/journal.pbio.1002049: 15 str.
- Mahmood T., Yang P. C. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4, 9: 429–434
- Majd S., Yusko E. C., Billeh Y. N., Macrae M. X., Yang J., Mayer M. 2010. Applications of biological pores in nanomedicine, sensing, and nanoelectronics. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 4: 439–476
- Mancheño J. M., Martín-Benito J., Martínez-Ripoll M., Gavilanes J. G., Hermoso J. 2003. Crystal and electron microscopy structures of Sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure*, 11, 11: 1319–1328
- Mehrabi R., Bahkali A. H., Abd-Elsalam K. A., Moslem M., Ben M'barek S., Gohari A. M., Jashni M. K., Stergiopoulos I., Kema G. H. J., de Wit P. J. G. M. 2011. Horizontal gene and chromosome transfer in plant pathogenic fungi affecting host range. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 3: 542–554
- Myung I. J. 2003. Tutorial on maximum likelihood estimation. *Journal of Mathematical Psychology*, 47, 1: 90–100
- Ngai P. H. K., Ng T. B. 2006. A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 6: 1185–1191
- Novak M., Kraševc N., Skočaj M., Maček P., Anderluh G., Sepčič K. 2015. Fungal aegerolysin-like proteins: distribution, activities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 2: 601–610
- Ohm A. R., Feau N., Henrissat B., Schoch C. L., Horwitz B., Barry K. W., Condon B. J., Copeland A. C., Dhillon B., Glaser F., Hesse C. N., Kosti I., LaButti K., Lindquist E., Lucas S., Salamov A., Bradshaw R. E., Ciuffetti L., Hamelin R. C., Kema G. H. J., Lawrence C., Scott J., Spatafora J. W., Turgeon B. G., de Wit P. J. G. M., Zhong S., Goodwin S. B., Grigoriev I. V. 2012. Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen Dothideomycetes fungi. *PLoS Pathogens*, 8, 12: e1003037, doi: 10.1371/journal.ppat.1003037: 26 str.
- Oome S., Van den Ackerveken G. 2014. Comparative and functional analysis of the widely occurring family of Nep1-like proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27, 10: 1081–1094
- Ota K., Leonardi A., Mikelj M., Skočaj M., Wohlschlager T., Künzler M., Aebi M., Narat M., Križaj I., Anderluh G., Sepčič K., Maček P. 2013. Membrane cholesterol and sphingomyelin, and ostreolysin A are obligatory for pore-formation by a MACPF/CDC-like pore-forming protein, pleurotolysin B. *Biochimie* 95, 10: 1855–1864
- Ottmann C., Luberacki B., Küfner I., Koch W., Brunner F., Weyand M., Mattinen L., Pirhonen M., Anderluh G., Seitz H. U., Nürnberger T., Oecking C. 2009. A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 25: 10359–10364

- Pemberton C. L., Salmond G. P. C. 2004. The Nep1-like proteins - A growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Molecular Plant Pathology*, 5, 4: 353–359
- pET System Manual. 2006. 11. izd. ZDA, Novagen: 68 str.
- Pfaller M. A., Diekema D. J. 2004. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of clinical microbiology*, 42, 10: 4419–4431
- Ponting C. P. 1999. Chlamydial homologues of the MACPF (MAC/perforin) domain. *Current Biology*, 9, 24: 911–913
- Provoda C. J., Lee K. D. 2000. Bacterial pore-forming hemolysins and their use in the cytosolic delivery of macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 41, 2: 209–221
- Provoda C. J., Stier E. M., Lee K. D. 2003. Tumor cell killing enabled by listeriolysin O-liposome-mediated delivery of the protein toxin gelonin. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 37: 35102–35108
- Punta M., Coghill P. C., Eberhardt R. Y., Mistry J., Tate J., Boursnell C., Pang N., Forslund K., Ceric G., Clements J., Heger A., Holm L., Sonnhammer E. L. L., Eddy S. R., Bateman A., Finn R. D. 2011. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 40, D1: 290–301
- Qutob D., Kemmerling B., Brunner F., Küfner I., Engelhardt S., Gust A. A., Lubracki B., Seitz H. U., Stahl D., Rauhut T., Glawischnig E., Schween G., Lacombe B., Watanabe N., Lam E., Schlichting R., Scheel D., Nau K., Dodt G., Hubert D., Gijzen M., Nürnberger T. 2006. Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *The Plant Cell*, 18, 12: 3721–3744
- Ramachandran R., Heuck A. P., Tweten R. K., Johnson A. E. 2002. Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nature Structural Biology*, 9, 11: 823–827
- Rebolj K., Batista U., Sepčič K., Cestnik V., Maček P., Frangež R. 2007. Ostreolysin affects rat aorta ring tension and endothelial cell viability in vitro. *Toxicon*, 49, 8: 1211–1213
- Rosado C. J., Buckle A. M., Law R. H. P., Butcher R. E., Kan W. T., Bird C. H., Ung K., Browne K. A., Baran K., Bashtannyk-Puhalovich T. A., Faux N. G., Wong W., Porter C. J., Pike R. N., Ellisdon A. M., Pearce M. C., Bottomley S. P., Emsley J., Smith A. I., Rossjohn J., Hartland E. L., Voskoboinik I., Trapani J. A., Bird P. I., Dunstone M. A., Whisstock J. C. 2007. A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science*, 317, 5844: 1548–1551
- Rossjohn J., Feil S. C., McKinstry W. J., Tweten R. K., Parker M. W. 1997. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell*, 89, 5: 685–692
- Rubinfeld M., Nolling J., Deloughery C., Bush D. 2007. Nucleic acid and amino acid sequences relating to *Pseudomonas aeruginosa* for diagnostics and therapeutics. US 20070020624 A1: 30 str.

- Sakaguchi O., Shimada H., Yokota K. 1975. Proceedings: Purification and characteristics of hemolytic toxin from *Aspergillus fumigatus*. Japanese Journal of Medical Science & Biology, 28, 5-6: 328–331
- Schmick M., Bastiaens P. I. H. 2014. The interdependence of membrane shape and cellular signal processing. Cell, 156, 6: 1132–1138
- Shapiro A. L., Viñuela E., Maizel J. V. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochemical and Biophysical Research Communications, 28, 5: 815–820
- Shinkai Y., Takio K., Okumura K. 1988. Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). Nature, 334, 6182: 525–527
- Stevens L. M., Frohnhöfer H. G., Klingler M., Nüsslein-Volhard C. 1990. Localized requirement for torso-like expression in follicle cells for development of terminal anlagen of the *Drosophila* embryo. Nature, 346, 6285: 660–663
- Strange R. N., Scott P. R. 2005. Plant disease: a threat to global food security. Annual Review of Phytopathology, 43, 1: 83–116
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28, 10: 2731–2739
- Tomita T., Noguchi K., Mimuro H., Ukaji F., Ito K., Sugawara-Tomita N., Hashimoto Y. 2004. Pleurotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, assembles into a transmembrane pore complex. The Journal of Biological Chemistry, 279, 26: 26975–26982
- Tweten R. K. 2005. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. Infection and Immunity, 73, 10: 6199–6209
- Vivian J. T., Callis P. R. 2001. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. Biophysical Journal, 80, 5: 2093–2109
- Wang Z., Binder M., Schoch C. L., Johnston P. R., Spatafora J. W., Hibbett D. S. 2006a. Evolution of helotialean fungi (Leotiomyces, Pezizomycotina): a nuclear rDNA phylogeny. Molecular Phylogenetics and Evolution, 41, 2: 295–312
- Wang Z., Johnston P. R., Takamatsu S., Spatafora J. W., Hibbett D. S. 2006b. Toward a phylogenetic classification of the Leotiomyces based on rDNA data. Mycologia, 98, 6: 1065–1075
- Weinstock G. K., Bush D. 2009. Nucleic acid and amino acid sequences relating to *Aspergillus fumigatus* for diagnostics and therapeutics. US 7504490 B1: 27 str.
- Whitmore L., Wallace B. A. 2004. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. Nucleic Acids Research, 32: 668–673
- Wright K. O., Messing E. M., Reeder J. E. 2004. DBCCR1 mediates death in cultured bladder tumor cells. Oncogene, 23, 1: 82–90

Zhang N., Castlebury L. A., Miller A. N., Huhndorf S. M., Schoch C. L., Seifert K. A., Rossman A. Y., Rogers J. D., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Sung G. H. 2006. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*, 98, 6: 1076–1087

Zhou B. J., Jia P. S., Gao F., Guo H. S. 2012. Molecular characterization and functional analysis of a necrosis- and ethylene-inducing, protein-encoding gene family from *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 7: 964–975

ZAHVALA

Najprej bi se zahvalila somentorici dr. Nadi Kraševc, ki me je strokovno in moralno podpirala med celotno potjo. Hvala za vse »brce v rit« v pravem trenutku in skrb, da nisem preveč zašla s poti.

Zahvalila bi se mentorju prof. dr. Gregorju Anderluhu, da je sprejel mentorstvo in mi omogočil delo v L-11. Hvala za vso strokovno podporo med delom v laboratoriju in nastankom magistrske naloge.

Zahvalila bi se Jelki in Maruši za uvajanje v delo v laboratoriju. Hvala za vso potrpežljivost ter deljenje znanja in izkušenj.

Zahvalila bi se Maticu, Saši, Tei T., Tei L., Omarju, Tini, Davorju, Mirijam in ostalim sodelavcem za vse nasvete in pomoč pri lociranju reagentov ter učenju novih metod. Čas, preživet z vami, je bil dragocen.

Hvala recenzentu prof. dr. Petru Mačku za hiter in strokoven pregled magistrske naloge.

Hvala Vesni Hodnik iz Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti za izvedbo testa nekroze.

Zahvalila bi se staršem (še posebej mami in očetu ☺), bratu, teti ter prijateljem, ker so me prenašali, tudi ko sem bila razdražljiva in pod stresom. Hvala, ker ste!

PRILOGE

Priloga A

Življenjski slog gliv ter pojavnost proteinov z domeno MACPF, egerolizinov in proteinov NLP

Glive	poddeblo/razred	življenjski slog	PlyA	PlyB	NLP
<i>Agrocybe aegerita</i>	Agaricomycotina	saprofit (zemlja)	1		
<i>Botryobasidium botryosum v1.0</i>	Agaricomycotina	saprofit		3	
<i>Calocera cornea v1.0</i>	Agaricomycotina	saprofit			1
<i>Dacryopinax</i> sp. DJM 731 SSP1 v1.0	Agaricomycotina	saprofit			1
<i>Dendrothele bispora CBS 962.96 v1.0</i>	Agaricomycotina	saprofit		4	
<i>Dichomitus squalens LYAD-421 SS1</i>	Agaricomycotina	saprofit	1		
<i>Dioszegia cryoxerica v1.0</i>	Agaricomycotina	saprofit (psihrofilen)	3		
<i>Exidia glandulosa v1.0</i>	Agaricomycotina	saprofit			2
<i>Fibroporia radiculosa TFFH 294</i>	Agaricomycotina	saprofit	2	2	
<i>Fibulorhizoctonia</i> sp. CBS 109695 v1.0	Agaricomycotina	saprofit		1	
<i>Galerina marginata CBS 339.88</i>	Agaricomycotina	saprofit	1		
<i>Ganoderma</i> sp. 10597 SS1	Agaricomycotina	saprofit			1
<i>Heterobasidium irregulare TC 32-1 (annosum v2.0)</i>	Agaricomycotina	rastlinski patogen	1	1	
<i>Hypholoma sublateritium</i>	Agaricomycotina	saprofit	2		
<i>Laccaria amethystina LaAM-08-1 v1.0</i>	Agaricomycotina	simbiont	1		
<i>Lentinus tigrinus ALCFSS1 (-6 ali -7 ali sp.)</i>	Agaricomycotina	saprofit	2	7	2
<i>Leucogyrophana mollusca KUC20120723A-06 v1.0</i>	Agaricomycotina	saprofit	11	1	
<i>Moniliophthora perniciosa FA553</i>	Agaricomycotina	rastlinski patogen (hemibiotrof)	5	1	8
<i>Paxillus involutus ATCC 200175 v1.0</i>	Agaricomycotina	simbiont (ektomikoriza)	1		
<i>Paxillus rubicundulus Ve08.2h10 v1.0</i>	Agaricomycotina	simbiont (ektomikoriza)	1		

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

Glive	poddeblo/razred	življenjski slog	PlyA	PlyB	NLP
<i>Phlebiopsis gigantea</i> 11061_1 CR5-6	Agaricomycotina	saprofit, biokontrola		6	
<i>Piriformospora indica</i> DSM 11827 from MPI	Agaricomycotina	simbiont (endofit)		3	
<i>Pisolithus microcarpus</i> 441 v1.0	Agaricomycotina	simbiont	1		
<i>Pleurotos eryngii</i>	Agaricomycotina	rastlinski patogen (šibek)	1	1	
<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15 v2.0	Agaricomycotina	saprofit	3	3	
<i>Pleurotus ostreatus</i> PC9 v1.0	Agaricomycotina	saprofit			
<i>Polyporus arcularius</i> v1.0	Agaricomycotina	saprofit	6	3	1
<i>Punctularia strigosozonata</i> HHB-11173 SS5	Agaricomycotina	saprofit	1		
<i>Pycnoporus coccineus</i> BRFM 310 v1.0	Agaricomycotina	saprofit		2	
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IB	Agaricomycotina	rastlinski patogen		7	
<i>Sphaerobolus stellatus</i> SS14	Agaricomycotina	saprofit	4	6	
<i>Trametes versicolor</i> SS1	Agaricomycotina	saprofit	1	1	
<i>Trichaptum abietinum</i> v1.0	Agaricomycotina	saprofit	1		
<i>Tulasnella calospora</i> AL13/4D v1.0	Agaricomycotina	simbiont		5	
<i>Volvariella volvacea</i> V23	Agaricomycotina	saprofit	3	3	
<i>Symbiotaphrina kochii</i> v1.0	Ascomycota	simbiont (endofit - hrošči)		1	
<i>Gonapodya prolifera</i> v1.0	Chytridiomycota	saprofit (vodni org.)			3
<i>Rozella allomyces</i> CSF55	Cryptomycota	glivni parazit		1	
<i>Acidomyces richmondensis</i> BFW	Dothideomycetes	saprofit	1		
<i>Alternaria brassicicola</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen	1	1	2
<i>Aplosporella prunicola</i> CBS 121.167 v1.0	Dothideomycetes	rastlinski patogen	1	1	1
<i>Aulographum hederæ</i> v2.0	Dothideomycetes	saprofit	1		
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen	1	1	6
<i>Cenococcum geophilum</i> 1.58 v2.0	Dothideomycetes	simbiont (ektomikoriza)		1	
<i>Cercospora zea-maydis</i> SCOH1-5	Dothideomycetes	rastlinski patogen			1

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

Glive	poddeblo/razred	življenjski slog	PlyA	PlyB	NLP
<i>Cladosporium fulvum v1.0</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen (biotrof)	1	3	1
<i>Cochliobolus carbonum 26-R-13</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen		2	3
<i>Cochliobolus heterostrophus C4, ATCC 48331</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen (nekrotrof)		2	1
<i>Cochliobolus heterostrophus C5</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen (nekrotrof)			
<i>Cochliobolus lunatus m118</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen	1		2
<i>Cochliobolus miyabeanus WK-1C, ATCC 44560</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen		1	2
<i>Cochliobolus sativus ND90Pr</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen (hemibiotrof)			2
<i>Cochliobolus victoriae FI3</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen		2	3
<i>Cucurbitaria berberidis CBS 394.84 v1.0</i>	Dothideomycetes	saprofit			1
<i>Didymella exigua CBS 183.55 (Phoma exigua)</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen	1	2	2
<i>Dothidotthia symphoricarpi v1.0</i>	Dothideomycetes				2
<i>Dothistroma septosporum NZE10 v1.0</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen (hemibiotrof)		1	1
<i>Hysterium pulicare</i>	Dothideomycetes	saprofit		4	1
<i>Lentithecium fluviatile v1.0</i>	Dothideomycetes	saprofit (vodni org.)		1	2
<i>Lepidopterella palustris v1.0</i>	Dothideomycetes	saprofit (vodni org.)		5	
<i>Leptosphaeria maculans JN3</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen (hemibiotrof)		2	2
<i>Lophiostoma macrostomum v1.0</i>	Dothideomycetes	saprofit		2	2
<i>Macrophomina phaseolina MS6</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen		1	5
<i>Melanomma pulvis-pyrius v1.0</i>	Dothideomycetes	saprofit		4	1
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen (hemibiotrof)			1
<i>Mycosphaerella graminicola (Zymoseptoria tritici IPO323)</i>	Dothideomycetes	rastlinski patogen (hemibiotrof)			1

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

Glive	poddeblo/razred	življenjski slog	PlyA	PlyB	NLP
<i>Myriangiium duriaei</i> CBS 260.36 v1.0	Dothideomycetes	živalski patogen (insekti)		1	1
<i>Neofusicoccum parvum</i> UCRNP2	Dothideomycetes	rastlinski patogen		1	6
<i>Patellaria atrata</i> v1.0	Dothideomycetes	saprofit		2	
<i>Pleomassaria siparia</i> v1.0	Dothideomycetes	saprofit			1
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i> 0-1	Dothideomycetes	rastlinski patogen (nekrotrof)			1
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	Dothideomycetes	rastlinski patogen (nekrotrof)			1
<i>Rhynchostroma rufulum</i>	Dothideomycetes	saprofit, rastlinski patogen			1
<i>Septoria musiva</i> SO2202 v1.0	Dothideomycetes	rastlinski patogen			1
<i>Septoria populicola</i> v1.0	Dothideomycetes	rastlinski patogen			1
<i>Setosphaeria turcica</i> Et28A	Dothideomycetes	rastlinski patogen (hemibiotrof)		2	1
<i>Sporormia fimetaria</i> v1.0	Dothideomycetes	saprofit (živalsko blato)		3	1
<i>Stagonospora nodorum</i> SN15 v2.0 (<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15)	Dothideomycetes	rastlinski patogen (nekrotrof)			2
<i>Trypethelium eluteriae</i> v1.0	Dothideomycetes	simbiont (mutualist z glivo in fotosintetznim partnerjem)	1	1	1
<i>Zasmidium cellare</i> ATCC 36951 v1.0	Dothideomycetes	saprofit			2
<i>Zopfia rhizophila</i> v1.0	Dothideomycetes	rastlinski patogen		2	1
<i>Ajellomyces capsulatus</i> NAM1 (<i>Histoplasma capsulatum</i>)	Eurotiomycetes	živalski patogen	4	1	
<i>Ajellomyces dermatitidis</i> SLH14081	Eurotiomycetes	živalski patogen	1		
<i>Aspergillus acidus</i> (foetidus)	Eurotiomycetes	saprofit	3	2	1
<i>Aspergillus aculeatus</i> (ATCC16872 v1.1)	Eurotiomycetes	saprofit	1		2
<i>Aspergillus brasiliensis</i> CBS 101740	Eurotiomycetes	saprofit	2	1	1
<i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010	Eurotiomycetes	saprofit	1	1	1
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	Eurotiomycetes	saprofit	1	1	3

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

Glive	poddeblo/razred	življenjski slog	PlyA	PlyB	NLP
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3557	Eurotiomycetes	saprofit, rastlinski patogen, op. živalski patogen	5	7	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	Eurotiomycetes	saprofit, živalski patogen	2	1	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	Eurotiomycetes	saprofit, živalski patogen			
<i>Aspergillus glaucus</i> CBS 516.65	Eurotiomycetes	saprofit, halofil	2	4	1
<i>Aspergillus kawachii</i>	Eurotiomycetes	saprofit	2	1	3
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	Eurotiomycetes	saprofit	1		2
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015 v3.0	Eurotiomycetes	saprofit, rastlinski patogen	3	8	3
<i>Aspergillus niger</i> NRRL3	Eurotiomycetes	saprofit, rastlinski patogen			
<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	Eurotiomycetes	saprofit, rastlinski patogen			
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	Eurotiomycetes	saprofit	5	5	3
<i>Aspergillus sydowii</i>	Eurotiomycetes	saprofit, živalski patogen	3		1
<i>Aspergillus terreus</i> NIH 2624	Eurotiomycetes	saprofit, op. živalski patogen	2		2
<i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 134.48	Eurotiomycetes	saprofit	2	1	1
<i>Aspergillus versicolor</i>	Eurotiomycetes	saprofit, op. živalski patogen	1		1
<i>Aspergillus wentii</i> DTO 134E9	Eurotiomycetes	saprofit	1	8	1
<i>Aspergillus zonatus</i>	Eurotiomycetes	saprofit	1	2	2
<i>Coccidioides immitis</i> RS	Eurotiomycetes	živalski patogen	2	1	
<i>Coccidioides posadasii</i> C738 delta SOWgp	Eurotiomycetes	živalski patogen	1		
<i>Eurotium rubrum</i>	Eurotiomycetes	simbiont (endofit), halofil	1		1
<i>Monascus purpureus</i> v1.0	Eurotiomycetes	saprofit	1		
<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	Eurotiomycetes	saprofit, op. živalski patogen	1	3	3
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (2 seva)	Eurotiomycetes	živalski patogen	2	1	
<i>Paracoccidioides</i> sp. 'lutzii' PB01	Eurotiomycetes	živalski patogen	1		

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

Glive	poddeblo/razred	življenjski slog	PlyA	PlyB	NLP
<i>Penicillium bilaiae</i> ATCC 20851 v1.0	Eurotiomycetes	saprofit, simbiont	4	2	1
<i>Penicillium brevicompactum</i> (2 seva)	Eurotiomycetes	saprofit	3		1
<i>Penicillium canescens</i> ATCC 10419 v1.0	Eurotiomycetes	saprofit, simbiont	4	1	2
<i>Penicillium chrysogenum</i> v1.0	Eurotiomycetes	saprofit	7	2	3
<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	Eurotiomycetes	saprofit			
<i>Penicillium digitatum</i> PHI26	Eurotiomycetes	rastlinski patogen	1		1
<i>Penicillium expansum</i> ATCC 24692 v1.0	Eurotiomycetes	rastlinski patogen	1	3	1
<i>Penicillium fellutanum</i> ATCC 48694 v1.0	Eurotiomycetes	saprofit, rastlinski patogen	1		
<i>Penicillium glabrum</i> DAOM 239074 v1.0	Eurotiomycetes	rastlinski patogen	1	2	1
<i>Penicillium janthinellum</i> ATCC 10455 v1.0	Eurotiomycetes	simbiont (endofit)	2		1
<i>Penicillium lanosocoeruleum</i> ATCC 48919 v1.0	Eurotiomycetes	rastlinski patogen	2	1	1
<i>Penicillium marneffei</i>	Eurotiomycetes	op. živalski patogen		1	
<i>Penicillium oxalicum</i> 114-2	Eurotiomycetes	saprofit	2	1	1
<i>Penicillium raistrickii</i> ATCC 10490 v1.0	Eurotiomycetes	saprofit	1	6	1
<i>Talaromyces aculeatus</i> ATCC 10409 v1.0	Eurotiomycetes	simbiont (endofit), saprofit		1	1
<i>Talaromyces marneffei</i> ATCC 18224	Eurotiomycetes	živalski patogen			1
<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	Eurotiomycetes	saprofit		1	2
<i>Thermoascus aurantiacus</i> v1.0	Eurotiomycetes	saprofit (termofil)		1	
<i>Uncinocarpus reesii</i> 1704	Eurotiomycetes	saprofit		2	
<i>Rhizopagus irregularis</i> DAOM 181602	Glomeromycota	simbiont		1	
<i>Cladonia grayi</i> Cgr/DA2myc/ss v1.0	Lecanoromycetes	simbiont		3	
<i>Ascocoryne sarcoides</i> NRRL 50072	Leotiomycetes	saprofit		1	1
<i>Botryotinia calthae</i>	Leotiomycetes	rastlinski patogen			2
<i>Botryotinia convoluta</i>	Leotiomycetes	rastlinski patogen			3
<i>Botryotinia draytonii</i>	Leotiomycetes	rastlinski patogen			2

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

Glive	poddeblo/razred	življenjski slog	PlyA	PlyB	NLP
<i>Botryotinia ficariarum</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			2
<i>Botryotinia globosa</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			2
<i>Botryotinia narcissicola</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			2
<i>Botryotinia pelargonii</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			3
<i>Botryotinia polyblastis</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			2
<i>Botryotinia porri</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			2
<i>Botryotinia ranunculi</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			2
<i>Botryotinia sphaerosperma</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			2
<i>Botryotinia squamosa</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			3
<i>Botrytis</i> sp. <i>LXP-2011</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			1
<i>Botrytis aclada</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			2
<i>Botrytis byssoidea</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			2
<i>Botrytis cinerea</i> v1.0 (<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10)	Leotiomyces	rastlinski patogen (nekrotrof)			7
<i>Botrytis croci</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			2
<i>Botrytis elliptica</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			5
<i>Botrytis fabae</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			3
<i>Botrytis galanthina</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			3
<i>Botrytis hyacinthi</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			2
<i>Botrytis paeoniae</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			2
<i>Botrytis tulipae</i>	Leotiomyces	rastlinski patogen			5
<i>Chalara longipes</i> BDJ v1.0	Leotiomyces	saprofit		1	2
<i>Glarea lozoyensis</i> ATCC 20868	Leotiomyces	saprofit			2
<i>Marssonina brunnea</i> f. sp. <i>multigermtubi</i> MB m1	Leotiomyces	rastlinski patogen			2
<i>Meliniomyces bicolor</i> E v2.0	Leotiomyces	simbiont			2

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

Glive	poddeblo/razred	življenjski slog	PlyA	PlyB	NLP
<i>Meliniomyces variabilis F v1.0</i>	Leotiomycetes	simbiont		1	2
<i>Oidiodendron maius (Zn v1.0)</i>	Leotiomycetes	simbiont			1
<i>Sclerotinia sclerotiorum v1.0</i>	Leotiomycetes	rastlinski patogen (nekrotrof)			2
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Oomycetes	rastlinski patogen			1
<i>Arthrobotrys oligospora ATCC 24927</i>	Orbiliomycetes	živalski patogen (nematode)		5	1
<i>Monacrosporium haptotylum CBS 200.50</i>	Orbiliomycetes	živalski patogen (nematode)		2	
<i>Ascobolus immersus RN42 v1.0</i>	Pezizomycetes	saprofit (živalsko blato)		1	
<i>Morchella conica CCBAS932 v1.0</i>	Pezizomycetes	simbiont, saprofit		1	
<i>Terfezia boudieri S1 v1.0</i>	Pezizomycetes	simbiont		2	
<i>Wilcoxina miklae CBS 423.85 v.1.0</i>	Pezizomycetes	simbiont	1	1	
<i>Acremonium alcalophilum v2.0</i>	Sordariomycetes	saprofit			1
<i>Anthostoma avocetta NRRL 3190 v1.0</i>	Sordariomycetes			2	3
<i>Apiospora montagnei NRRL 25634</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen, saprofit	1	1	4
<i>Beauveria bassiana ARSEF 2860</i>	Sordariomycetes	živalski patogen (insekti)	1	2	1
<i>Chaetomium globosum v1.0</i>	Sordariomycetes	živalski patogen, saprofit		1	1
<i>Chaetomium thermophilum var. thermophilum DSM 1495</i>	Sordariomycetes	sekundarni saprofit			1
<i>Colletotrichum graminicola M1.001</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen			5
<i>Colletotrichum higginsianum IMI 349063</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen			5
<i>Cordyceps militaris CM01</i>	Sordariomycetes	živalski patogen (parazit)	1		2
<i>Cryphonectria parasitica EP155</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen		1	1
<i>Daldinia eschscholzii EC12 v1.0</i>	Sordariomycetes	simbiont (endofit)			2
<i>Eutypa lata UCREL1</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen			4
<i>Fusarium fujikuroi IMI 58289</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen		2	4

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

Glive	poddeblo/razred	življenjski slog	PlyA	PlyB	NLP
<i>Fusarium graminearum v1.0 (Gibberella zeae PH-1)</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen (nekrotrof)	1	9	4
<i>Fusarium oxysporum v1.0</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen (nekrotrof), simbiot (endofit), saprofit	1	4	9
<i>Fusarium verticillioides 7600</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen		3	3
<i>Glomerella acutata (Colletotrichum fiorinae MH 18) v1.0</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen			10
<i>Glomerella cingulata 23 (Colletotrichum gloeosporoides 23) v1.0</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen		1	17
<i>Grosmannia clavigera kw1407</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen (hemibiotrof)			3
<i>Hypoxylon sp. Cl-4A</i>	Sordariomycetes	saprofit		1	3
<i>Hypoxylon sp. CO27-5</i>	Sordariomycetes	saprofit			
<i>Hypoxylon sp. EC38 v1.0</i>	Sordariomycetes	saprofit			
<i>Ilyonectria sp. v1.0</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen		3	7
<i>Magnaporthe grisea v1.0</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen (hemibiotrof)			6
<i>Melanconium sp. NRRL 54901</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen			3
<i>Metarhizium acridum CQMa 102</i>	Sordariomycetes	živalski patogen (kobilice)	1	2	2
<i>Metarhizium robertsii ARSEF 23</i>	Sordariomycetes	živalski patogen (insekti)	2	2	2
<i>Myceliophthora thermophila v2.0 (Sporotrichum thermophile)</i>	Sordariomycetes	saprofit			1
<i>Nectria haematococca MPV1, 77-13-4 (Fusarium solani)</i>	Sordariomycetes	rastlinski patogen (nekrotrof), saprofit, op. živalski patogen	1	1	5
<i>Neurospora crassa OR74A</i>	Sordariomycetes	saprofit	1		2
<i>Neurospora discreta FGSC 8579 matA</i>	Sordariomycetes	saprofit	1		1
<i>Neurospora tetrasperma FGSC 2509 mat a</i>	Sordariomycetes	saprofit	1		1
<i>Ophiostoma piceae UAMH 11346</i>	Sordariomycetes	saprofit			1

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

Glive	poddeblo/razred	živiljenjski slog	PlyA	PlyB	NLP
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i> UCRPA7	Sordariomycetes	rastlinski patogen			2
<i>Podospora anserina</i> S mat+	Sordariomycetes	saprofit		1	6
<i>Sodiomyces alkalinus</i> v1.0	Sordariomycetes	saprofit (alkalofil)			2
<i>Sordaria macrospora</i> k-hell	Sordariomycetes	saprofit	1		2
<i>Thielavia appendiculata</i> CBS 731.68 v1.0	Sordariomycetes	saprofit			1
<i>Thielavia arenaria</i> CBS 508.74 v1.0	Sordariomycetes	saprofit (termofil)			1
<i>Thielavia hyrcaniae</i> CBS 757.83 v1.0	Sordariomycetes	saprofit			1
<i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126	Sordariomycetes	saprofit (termofil), živalski patogen			1
<i>Trichoderma asperellum</i>	Sordariomycetes	saprofit, op. simbiot, mikoparazit	1	1	
<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040	Sordariomycetes	saprofit, glivni patogen (biokontrola)	1		1
<i>Trichoderma harzianum</i> CBS 226.95 v1.0	Sordariomycetes	saprofit, op. simbiot, mikoparazit		2	
<i>Trichoderma reesei</i>	Sordariomycetes	saprofit		1	
<i>Trichoderma virens</i> Gv29-8	Sordariomycetes	simbiot, glivni patogen, saprofit	1	3	3
<i>Verticillium alfalfae</i> VaMs.102	Sordariomycetes	rastlinski patogen (nekrotrof)			9
<i>Verticillium dahliae</i> v1.0	Sordariomycetes	rastlinski patogen (nekrotrof)			10
<i>Xylona heveae</i> TC161 v1.0	Xylonomycetes			1	

160 245 373

Priloga B

Analiza izločanja proteinov NLP

Z rumeno barvo so označene proteinska zaporedja, kjer je predvidena konvencionalna izločanje s signalnim zaporedjem. Z rdečo pa tiste, kjer je predvidena nekonvencionalna izločanje.

SecretomeP 1.0f predictions

# Name	NN-score	Odds	Weighted	Warning
#			by prior	
#	=====			
jgi_Chalo1_	0.964	4.936	0.010	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Thiap1_	0.962	7.264	0.015	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Mycgr3_	0.962	7.260	0.015	signal peptide predicted by SignalP
gi_59757216	0.960	7.265	0.015	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Myrdu1_	0.959	7.130	0.014	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Thihy1_	0.958	7.263	0.015	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Thite2_	0.957	7.182	0.014	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Eutla1_	0.955	7.139	0.014	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Sodal1_	0.954	7.267	0.015	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Ophpc1_	0.952	7.047	0.014	signal peptide predicted by SignalP
gi_30242355	0.951	3.552	0.007	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspve1_	0.949	6.872	0.014	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Pengl1_	0.947	7.114	0.014	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Penac1_	0.946	5.120	0.010	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Thiar1_	0.945	6.987	0.014	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspsy1_	0.945	6.675	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Exigl1_	0.944	7.008	0.014	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Cocca1_	0.944	6.837	0.014	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Talma1_	0.943	6.975	0.014	signal peptide predicted by SignalP
gi_33627298	0.942	6.865	0.014	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspgl1_	0.941	6.742	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Penbr2_	0.939	6.913	0.014	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspve1_	0.938	6.747	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspcl1_	0.936	6.832	0.014	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspbr1_	0.936	6.654	0.013	signal peptide predicted by SignalP
PFAM	0.936	6.693	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Lenti6_	0.934	6.521	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Melva1_	0.932	6.676	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspzo1_	0.932	6.568	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Melbi2_	0.930	6.585	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Maggr1_	0.929	6.613	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspwe1_	0.929	3.210	0.006	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Talst1_	0.926	6.489	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Neofi1_	0.926	6.598	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Sepmu1_	0.925	5.309	0.011	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Apimo1_	0.925	6.350	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspnid1	0.923	6.436	0.013	signal peptide predicted by SignalP

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

jgi_Aspor1_	0.922	6.498	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Sisbr1_	0.921	6.196	0.012	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Chagl_1	0.921	6.362	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Seppo1_	0.919	6.308	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspfu_A	0.919	6.388	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Colhi1_	0.918	6.305	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Eurhe1_	0.915	6.245	0.012	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Gloci1_	0.913	6.162	0.012	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Settu1_	0.912	6.059	0.012	signal peptide predicted by SignalP
jgi_CocheC4	0.910	5.992	0.012	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Oidma1_	0.909	6.054	0.012	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Penbi1_	0.908	5.993	0.012	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Lepmu1_	0.906	5.922	0.012	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Spoth2_	0.903	5.859	0.012	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Polar1_	0.902	5.950	0.012	signal peptide predicted by SignalP
AspGD	0.898	5.670	0.011	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Sclsc1_	0.895	5.684	0.011	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Botci1_	0.895	5.553	0.011	signal peptide predicted by SignalP
jgi_HypCI4A	0.893	5.577	0.011	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Ganpr1_	0.891	5.464	0.011	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Lenfl1_	0.890	5.426	0.011	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Penla1_	0.888	5.312	0.011	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Tryvi1_	0.887	6.443	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspu1_	0.887	5.545	0.011	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspfo1_	0.887	5.545	0.011	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Zasce1_	0.886	5.352	0.011	-
gi_70986080	0.885	5.455	0.011	signal peptide predicted by SignalP
gi_67525755	0.883	0.907	0.002	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Melpu1_	0.882	5.232	0.010	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aplpr1_	0.882	5.205	0.010	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Phaal1_	0.881	5.117	0.010	signal peptide predicted by SignalP
jgi_DalEC12	0.881	5.209	0.010	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Podan2_	0.877	5.087	0.010	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspni_N	0.876	5.301	0.011	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Ascsa1_	0.876	6.990	0.014	signal peptide predicted by SignalP
jgi_PenchWi	0.875	4.905	0.010	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Botdo1_	0.871	5.018	0.010	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Antav1_	0.868	3.224	0.006	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Cerzm1_	0.866	4.848	0.010	signal peptide predicted by SignalP
gi_59671377	0.865	7.274	0.015	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Macph1_	0.864	4.843	0.010	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Coclu2_	0.864	4.844	0.010	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Pench1_	0.863	4.536	0.009	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Rhyru1_	0.862	4.648	0.009	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Penra1_	0.862	4.519	0.009	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspfl1_	0.857	4.513	0.009	signal peptide predicted by SignalP

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

jgi_Glalo1_	0.856	4.569	0.009	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Necha2_	0.854	4.402	0.009	signal peptide predicted by SignalP
gi_11947871	0.854	4.581	0.009	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Plesi1_	0.851	4.284	0.009	signal peptide predicted by SignalP
gi_57604280	0.850	4.352	0.009	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Cucbe1_	0.849	4.220	0.008	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Crypa2_	0.847	4.106	0.008	-
HOETC8.1_48	0.847	4.314	0.009	signal peptide predicted by SignalP
gi_11549267	0.846	4.446	0.009	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Fusgr1_	0.845	4.388	0.009	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Penox1_	0.843	4.037	0.008	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Penja1_	0.842	4.186	0.008	signal peptide predicted by SignalP
gi_38963593	0.842	4.305	0.009	signal peptide predicted by SignalP
gi_85093779	0.839	4.159	0.008	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Gansp1_	0.836	3.858	0.008	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Pyrtr1_	0.827	3.722	0.007	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Hyspu1_	0.823	3.778	0.008	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Grocl1_	0.820	3.695	0.007	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Altbr1_	0.819	3.538	0.007	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Pytr1_	0.818	7.191	0.014	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Cocsa1_	0.817	3.502	0.007	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Neucr2_	0.816	4.002	0.008	-
jgi_Cocmi1_	0.816	3.481	0.007	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspka1_	0.808	3.707	0.007	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Beaba1_	0.804	3.377	0.007	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Didex1_	0.803	3.232	0.006	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Clafu1_	0.803	3.232	0.006	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Zoprh1_	0.802	3.309	0.007	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Stano2_	0.801	4.980	0.010	signal peptide predicted by SignalP
gi_59668570	0.801	3.279	0.007	signal peptide predicted by SignalP
gi_33627452	0.801	6.599	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Penca1_	0.794	3.143	0.006	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Cormi1_	0.791	3.222	0.006	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Cocvi1_	0.783	2.936	0.006	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Fusve1_	0.774	2.829	0.006	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Neopa1_	0.767	2.754	0.006	signal peptide predicted by SignalP
jgi_HypEC38	0.762	2.681	0.005	-
jgi_HypCO27	0.761	2.680	0.005	-
jgi_Melsp1_	0.750	2.992	0.006	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Metac1_	0.742	2.425	0.005	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Penex1_	0.737	1.173	0.002	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Pendi1_	0.736	2.511	0.005	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Neudi1_	0.733	2.277	0.005	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspca3_	0.718	2.218	0.004	signal peptide predicted by SignalP
gi_59668875	0.708	2.200	0.004	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Dotse1_	0.707	2.560	0.005	-

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

gi_23978191	0.707	2.301	0.005	-
jgi_Veral1_	0.705	2.240	0.004	-
jgi_Spofi1_	0.695	2.086	0.004	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Neute_m	0.670	1.800	0.004	-
jgi_Mycfi2_	0.665	1.811	0.004	-
gi_59671376	0.659	1.773	0.004	-
gi_30242097	0.624	1.578	0.003	-
jgi_Dotsy1_	0.620	1.611	0.003	-
jgi_Verda1	0.616	1.462	0.003	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Metan1_	0.592	1.332	0.003	signal peptide predicted by SignalP
gi_59669676	0.585	1.310	0.003	signal peptide predicted by SignalP
gi_16962163	0.556	1.243	0.002	signal peptide predicted by SignalP
gi_59671289	0.552	1.181	0.002	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Colgr1_	0.535	2.406	0.005	-
jgi_Fusfu1_	0.505	1.024	0.002	signal peptide predicted by SignalP
gi_59666212	0.490	1.015	0.002	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Monpe1_	0.466	5.389	0.011	-
jgi_Ilysp1_	0.455	0.871	0.002	-
gi_59668029	0.403	0.795	0.002	signal peptide predicted by SignalP
gi_59757717	0.400	0.756	0.002	-
gi_38964208	0.372	0.691	0.001	-
gi_17168403	0.369	0.703	0.001	-
jgi_Lopma1_	0.347	0.704	0.001	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Gloac1_	0.333	0.620	0.001	-
jgi_Acra12_	0.292	0.541	0.001	signal peptide predicted by SignalP
gi_59671994	0.291	0.544	0.001	-
jgi_Calco1_	0.118	0.255	0.001	-
jgi_Dacsp1_	0.069	0.162	0.000	-
jgi_Fusox1_	0.055	0.133	0.000	signal peptide predicted by SignalP

=====

Priloga C

Analiza izločanja egerolizinov

Z rumeno barvo so označene proteinska zaporedja, kjer je predvidena konvencionalna izločanje s signalnim zaporedjem. Z rdečo pa tiste, kjer je predvidena nekonvencionalna izločanje.

SecretomeP 1.0f predictions

# Name	NN-score	Odds	Weighted	Warning
#			by prior	
jgi_Neute_m	0.966	1.184	0.002	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Pencal_	0.945	6.952	0.014	-
jgi_Aspgl1_	0.938	6.828	0.014	-
jgi_Neucr2_	0.931	6.428	0.013	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Neudi1_	0.922	6.312	0.013	signal peptide predicted by SignalP
gi_25595295	0.877	5.109	0.010	-
jgi_Aspu1_	0.873	4.865	0.010	-
jgi_Galma1_	0.860	4.650	0.009	-
jgi_Beaba1_	0.857	4.747	0.009	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspka1_	0.849	4.283	0.009	-
jgi_Pendi1_	0.822	3.955	0.008	-
gi_29565957	0.814	3.446	0.007	-
jgi_Parbr1_	0.813	3.531	0.007	-
jgi_Eurhe1_	0.809	3.958	0.008	-
jgi_Paxru1_	0.790	3.237	0.006	-
jgi_Cormi1_	0.786	3.116	0.006	signal peptide predicted by SignalP
gi_23849019	0.753	2.591	0.005	-
gi_12170950	0.751	1.606	0.003	-
jgi_Leumo1_	0.742	3.068	0.006	-
jgi_Aspu1_	0.741	2.941	0.006	-
jgi_TriviGv	0.732	2.447	0.005	-
gi_23848734	0.729	2.416	0.005	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Penbr2_	0.727	2.595	0.005	-
jgi_Penfel_	0.726	2.396	0.005	-
jgi_Volvo1_	0.692	2.154	0.004	-
jgi_Penja1_	0.690	2.155	0.004	-
jgi_Aspni_N	0.688	2.126	0.004	-
jgi_Aspor1_	0.678	2.133	0.004	-
jgi_Polar1_	0.676	1.828	0.004	-
jgi_Penox1_	0.667	1.891	0.004	-
gi_26120636	0.664	1.720	0.003	-
jgi_Fibra1_	0.663	1.862	0.004	-
jgi_Diocr1_	0.662	1.983	0.004	-
jgi_Aspca3_	0.655	1.844	0.004	-
jgi_Triat2_	0.638	1.720	0.003	-
jgi_Metan1_	0.638	1.589	0.003	-
gi_33627141	0.628	1.755	0.004	-
jgi_Paxin1_	0.627	1.687	0.003	-
jgi_Aciri1_	0.621	1.911	0.004	-
jgi_Tryvi1_	0.613	2.619	0.005	-
gi_31714365	0.610	1.558	0.003	-
gi_11918229	0.610	1.576	0.003	-
jgi_Neofi1_	0.593	1.587	0.003	-
jgi_Hetan2_	0.593	1.567	0.003	signal peptide predicted by SignalP

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C

jgi_Penbi1_	0.580	1.050	0.002	-
jgi_Trias1_	0.564	1.336	0.003	signal peptide predicted by SignalP
jgi_PenbrAg	0.548	1.202	0.002	-
jgi_Clafu1_	0.548	1.198	0.002	-
jgi_Aspfo1_	0.548	7.311	0.015	-
jgi_Aspzo1_	0.541	1.221	0.002	-
jgi_Penra1_	0.530	1.178	0.002	-
jgi_Necha2_	0.505	1.042	0.002	-
jgi_Aspbr1_	0.500	1.054	0.002	-
gi_31715059	0.500	1.030	0.002	-
jgi_Cocpo1_	0.496	0.546	0.001	-
jgi_Aspsy1_	0.473	0.967	0.002	-
jgi_Aspfu1_	0.472	0.983	0.002	-
jgi_Cocim1_	0.471	0.963	0.002	-
jgi_Aspve1_	0.471	0.925	0.002	-
jgi_Punst1_	0.469	0.915	0.002	-
jgi_Aplpr1_	0.461	0.939	0.002	-
jgi_Dicsq1_	0.459	0.650	0.001	-
jgi_Sphst1_	0.457	0.939	0.002	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Triab1_	0.446	0.893	0.002	-
jgi_Hypsu1_	0.438	0.867	0.002	-
jgi_Didex1_	0.434	0.838	0.002	-
jgi_Monpu1_	0.433	0.860	0.002	-
jgi_Apimo1_	0.432	0.881	0.002	-
jgi_Altbr1_	0.425	0.838	0.002	-
jgi_Lacam1_	0.422	0.819	0.002	-
jgi_Botdo1_	0.419	0.821	0.002	-
jgi_Lenti6_	0.417	0.789	0.002	-
jgi_Aspwe1_	0.417	0.796	0.002	-
AspGD	0.414	0.793	0.002	-
PFAM	0.400	0.779	0.002	-
jgi_Wilmi1_	0.380	0.711	0.001	-
jgi_Coclu2_	0.367	0.691	0.001	-
jgi_Pench1_	0.362	0.676	0.001	-
jgi_Pismi1_	0.351	0.659	0.001	-
jgi_Aspfl1_	0.349	0.657	0.001	-
jgi_PenchWi	0.348	0.904	0.002	-
jgi_Metac1_	0.340	0.638	0.001	-
jgi_PleosPC	0.336	0.629	0.001	-
jgi_Monpe1_	0.312	0.588	0.001	-
jgi_Trave1_	0.292	1.434	0.003	-
jgi_Pengl1_	0.277	0.535	0.001	-
jgi_Penex1_	0.253	0.490	0.001	-
jgi_Penla1_	0.243	0.477	0.001	-
jgi_Aspnid1	0.169	0.345	0.001	-
jgi_Aulhe2_	0.074	0.171	0.000	-

Priloga D

Analiza izločanja proteinov z domeno MACPF

Z rumeno barvo so označene proteinska zaporedja, kjer je predvidena konvencionalna izločanje s signalnim zaporedjem. Z rdečo pa tiste, kjer je predvidena nekonvencionalna izločanje.

SecretomeP 1.0f predictions

# Name	NN-score	Odds	Weighted	Warning
#			by prior	
jgi_Cocmi1_	0.746	2.685	0.005	-
jgi_Terbo1_	0.710	2.109	0.004	-
jgi_Theau1_	0.697	1.087	0.002	-
jgi_Macph1_	0.649	1.671	0.003	-
jgi_Melpu1_	0.633	1.574	0.003	-
jgi_Trave1_	0.615	0.474	0.001	-
jgi_Cocvi1_	0.610	1.432	0.003	-
jgi_Cocca1_	0.603	1.379	0.003	-
jgi_Lenfl1_	0.597	1.397	0.003	-
jgi_Chalo1_	0.593	0.373	0.001	-
jgi_Parbr1_	0.589	1.322	0.003	-
jgi_TriviGv	0.581	1.331	0.003	-
jgi_Beaba1_	0.570	1.268	0.003	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Fibra1_	0.556	1.205	0.002	-
jgi_Settu1_	0.553	1.234	0.002	-
jgi_Aspu1_	0.551	1.163	0.002	-
jgi_Zoprh1_	0.548	1.207	0.002	-
jgi_Fibsp1_	0.547	1.208	0.002	-
jgi_Clafu1_	0.540	1.113	0.002	-
jgi_Phlg1_	0.538	1.127	0.002	-
jgi_Symko1_	0.533	1.097	0.002	-
jgi_CocheC5	0.533	1.136	0.002	-
jgi_Pengl1_	0.531	1.089	0.002	-
jgi_Rozal1_	0.528	1.122	0.002	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspni_N	0.528	2.006	0.004	-
jgi_Trias1_	0.524	1.129	0.002	-
jgi_Rhiso1_	0.518	1.031	0.002	-
jgi_Aspka1_	0.514	1.036	0.002	-
jgi_Aspfu_A	0.512	1.053	0.002	signal peptide predicted by SignalP
jgi_Aspfo1_	0.512	1.030	0.002	-
jgi_Sisbr1_	0.510	0.585	0.001	-
jgi_Monpe1_	0.509	0.774	0.002	-
jgi_Lenti7_	0.502	1.067	0.002	-
jgi_Podan2_	0.500	0.987	0.002	-
jgi_Aspbr1_	0.499	0.986	0.002	-
jgi_Volvo1_	0.498	0.988	0.002	-
jgi_Fusfu1_	0.497	0.994	0.002	-
jgi_Fusox1_	0.496	1.020	0.002	-
jgi_Chagl_1	0.496	0.981	0.002	-
jgi_Cenge3_	0.495	0.986	0.002	-
jgi_Lenti6_	0.493	1.032	0.002	-
jgi_Aspzo1_	0.493	0.986	0.002	-
jgi_Gloci1_	0.490	0.994	0.002	-
jgi_Morco1_	0.483	0.947	0.002	-

se nadaljuje

nadaljevanje priloge D

jgi_Aspor1_	0.476	0.924	0.002	-
jgi_Altbr1_	0.470	0.911	0.002	-
jgi_Botbo1_	0.461	0.890	0.002	-
jgi_Crypa2_	0.460	0.885	0.002	-
jgi_Hetan2_	0.459	0.886	0.002	-
jgi_Denbi1_	0.459	0.876	0.002	-
jgi_Metan1_	0.455	0.885	0.002	-
gi_24277264	0.452	0.810	0.002	-
jgi_Gloin1_	0.449	0.857	0.002	-
jgi_Metac1_	0.446	0.853	0.002	-
jgi_Penac1_	0.444	0.788	0.002	-
jgi_Pirin1_	0.442	0.877	0.002	-
jgi_Ascim1_	0.442	0.871	0.002	-
jgi_Tulca1_	0.436	0.840	0.002	-
jgi_Aspfl1_	0.436	0.835	0.002	-
jgi_Leumo1_	0.434	0.527	0.001	-
jgi_Xylhe1_	0.431	0.815	0.002	-
jgi_Leppa1_	0.429	0.864	0.002	-
jgi_Penca1_	0.426	0.803	0.002	-
jgi_Hyspu1_	0.426	0.795	0.002	-
jgi_Necha2_	0.416	0.793	0.002	-
jgi_Ascsa1_	0.414	1.357	0.003	-
jgi_Fusve1_	0.412	0.769	0.002	-
PFAM	0.412	0.776	0.002	-
jgi_Antav1_	0.407	0.761	0.002	-
jgi_Triha1_	0.396	1.080	0.002	-
jgi_Fusgr1_	0.392	0.767	0.002	-
jgi_Cocim1_	0.392	0.733	0.001	-
jgi_Hisca1_	0.378	0.718	0.001	-
jgi_HypCI4A	0.361	0.667	0.001	-
jgi_Ilysp1_	0.359	0.662	0.001	-
jgi_Clagr2_	0.356	0.662	0.001	-
jgi_Melva1_	0.354	0.658	0.001	-
jgi_Trire2_	0.333	0.629	0.001	-
gi_23850653	0.332	0.619	0.001	-
jgi_Penla1_	0.325	0.627	0.001	-
jgi_Aplpr1_	0.319	0.592	0.001	-
jgi_Penex1_	0.317	0.518	0.001	-
jgi_CocheC4	0.317	1.180	0.002	-
jgi_Aspcl1_	0.315	0.593	0.001	-
jgi_Wilmi1_	0.311	0.582	0.001	-
jgi_PleosPC	0.306	0.570	0.001	-
jgi_PenchWi	0.296	0.550	0.001	-
jgi_Pench1_	0.296	0.550	0.001	-
jgi_Polar1_	0.293	0.543	0.001	-
gi_23850761	0.291	0.541	0.001	-
jgi_Tryvi1_	0.282	0.843	0.002	-
jgi_Aspca3_	0.282	0.527	0.001	-
jgi_Monha1_	0.275	0.588	0.001	-
gi_31715835	0.269	0.505	0.001	-
jgi_Neopa1_	0.256	0.484	0.001	-
jgi_Didex1_	0.254	0.486	0.001	-
jgi_Penbi1_	0.250	1.466	0.003	-
jgi_Neofi1_	0.248	0.472	0.001	-

se nadaljuje

nadaljevanje priloge D

gi_46109878	0.242	0.461	0.001	-
jgi_Pyrco1_	0.236	0.451	0.001	-
jgi_Penra1_	0.230	0.442	0.001	-
jgi_Penox1_	0.226	0.437	0.001	-
jgi_Artol1_	0.226	0.445	0.001	-
jgi_Uncre1_	0.224	0.431	0.001	-
jgi_Aspgl1_	0.207	0.405	0.001	-
gi_31714145	0.207	0.404	0.001	-
jgi_Apimo1_	0.205	0.401	0.001	-
gi_46126573	0.205	0.401	0.001	-
jgi_Dotse1_	0.201	0.394	0.001	-
AspGD	0.194	0.384	0.001	-
jgi_Aspni7_	0.191	0.379	0.001	-
gi_23849757	0.190	0.376	0.001	-
jgi_Spofi1_	0.189	0.376	0.001	-
jgi_Aspni_D	0.188	0.858	0.002	-
gi_31703193	0.186	0.371	0.001	-
jgi_Myrdu1_	0.181	0.361	0.001	-
jgi_Botdo1_	0.175	0.352	0.001	-
gi_46138371	0.175	0.352	0.001	-
jgi_Patat1_	0.173	0.349	0.001	-
jgi_Lepmu1_	0.165	0.336	0.001	-
jgi_Sphst1_	0.161	0.331	0.001	-
gi_39647672	0.157	0.320	0.001	-
jgi_Lopma1_	0.137	0.289	0.001	-
jgi_Aspwe1_	0.131	0.278	0.001	-

=====

Priloga E

Rezultati analize spektra CD s programom DichroWeb

NLP

Provencher & Glockner Method

Solutions using reference database: 7

Result	Helix1	Helix2	Strand1	Strand2	Turns	Unordered	Total
1	0.000	0.048	0.237	0.118	0.187	0.410	1
2	0.003	0.023	0.272	0.137	0.194	0.370	0.999

- 1: Closest matching solution with all proteins
- 2: Average of all matching solutions

NLP

Provencher & Glockner Method

Solutions using reference database: 4

Result	Helix1	Helix2	Strand1	Strand2	Turns	Unordered	Total
1	0.000	0.066	0.256	0.127	0.221	0.329	0.999
2	0.002	0.035	0.285	0.145	0.213	0.319	0.999

- 1: Closest matching solution with all proteins
- 2: Average of all matching solutions