

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos ir geomokslų fakultetas



Biochemijos studijų programos IV k. studentas

Vytautas MICKEVIČIUS

Bakalauro baigiamasis darbas

**Monokloninių antikūnų prieš inerolizinaž kūrimas ir
apibūdinimas**

Darbo vadovas

dokt. Martynas Simanavičius

Vilnius, 2018

Monokloninių antikūnų prieš ineroliziną kūrimas ir apibūdinimas

Bakalauro baigiamasis darbas rengtas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje

Vytautas Mickevičius

Darbo vadovas

Dokt. Martynas Simanavičius

TURINYS

SANTRUMPOS	5
IVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Poras formuojantys toksinai	8
1.1.1 α -PFT	8
1.1.2 β -PFT	11
1.1.3 CDC porų formavimo mechanizmas	14
1.1.4 CDC baltymų aktyvumo priklausomybė nuo pH	15
1.2 Moterų lyties takų mikrobiota.	16
1.2.1 Bakterinė vaginozė: diagnostika, epidemiologija ir mikrobiologija	16
1.2.2 <i>Lactobacillus iners</i> vaidmuo moterų lyties takų mikrobiotoje.	19
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI	22
2.1. Medžiagos.....	22
2.1.1. Reagentai, antikūnai, antigenai ir rinkiniai.....	22
2.1.2. Buferiniai ir kiti tirpalai	24
2.1.3. Eksperimentiniai gyvūnai ir ląstelės	27
2.1.4. Prietaisai ir tyrimo priemonės.....	27
2.2. Metodai	28
2.2.1. Genų inžinerijos metodai.....	28
2.2.2. Imunologiniai tyrimo metodai.	32
2.2.3. Hemolizės testas	38
3. Eksperimentų rezultatai ir jų aptarimas	40
3.1. Rekombinantinio inerolizino sintezė <i>E. coli</i>	40
3.1.2. Raiškos vektoriaus konstravimas.....	41
3.1.3. Rekombinantinio INY baltymo sintezė.	43
3.1.4 Rekombinantinio INY baltymo aktyvumo tyrimas	44
3.2. Hibridomų kūrimas.....	45
3.3. Monokloninių antikūnų apibūdinimas.....	46
3.3.1. Hibridomų terpių titro, MAk klasių, poklasių ir lengvųjų grandinių tipų nustatymas	46
3.3.2. MAk prieš INY kryžminio specifiškumo tyrimas	47
3.3.3. MAk giminingumo INY tyrimas	49
3.3.4. MAk poveikio INY hemoliziniam aktyvumui tyrimas.....	50

3.3.5. INY antigeninės struktūros tyrimas	52
3.4. Kiekybinio INY nustatymo sistemos kūrimas.....	53
IŠVADOS.....	55
<i>Summary</i>	56
PADĖKA.....	57
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	58

SANTRUMPOS

APS – amonio peroksosulfatas.

BSA – jaučio serumo albuminas (angl. *bovine serum albumin*).

CD59 – diferenciacijos antigenas 59.

CDC – nuo cholesterolio priklausomas citolizinas.

Fc – antikūno dalis, kuri sąveikauja su ląstelės receptoriais.

HRP – krienų peroksidazė.

IB – imunoblotingas.

IFA – imunofermentinė analizė.

IgG – imunoglobulinas G.

IL-1 β – interleukinas-1 β .

IL-6 – interleukinas-6.

ClyA – citolizinas A.

LLO – listerolizinas O.

ILY – intermedilizinas.

INY – inerolizinas.

PLY – pneumolizinas.

SLO – streptolizinas O.

VLY – vaginolizinas.

PFO – perfringolizinas O.

Eq α II – ekvinatoksinas II.

StnII – sticholizinas II.

FraC – fragacetoksinas C.

Hbl – hemolizinas BL.

Hla – α -hemolizinas.

HlgAB – γ -hemolizinas.

LukED – leukotoksinas ED.

PFT – poras formuojantis toksinas.

CCR – CC-chemokinių receptorių.

MACPF – membranos atakos komplekso/perforino baltymų šeima.

BV – bakterinė vaginozė.

MAk – monokloninis antikūnas.

NDS – natrio dodecilsulfatas. .

OT – optinis tankis.

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas.

PBST – fosfatinis buferinis tirpalas su 0,1 % *Tween-20*.

PVDF – polivinildifluoridas.

IVADAS

Poras formuojantys toksinai yra didelė baltymų grupė. Šiai grupei priklausantys nuo cholesterolio priklausomi citolizinais dažnai būna svarbūs virulentiškumo veiksniai, kaip parodyta *Streptococcus pneumoniae* sintetinamui citolizinui pneumolizinui (Witzenrath *et al.* 2006). Inerolizinas yra nuo cholesterolio priklausomas citolizinas, sintetinamas *Lactobacillus iners* bakterijų. *L. iners* moterų lyties takų mikrobiotoje gali būti svarbus vystantis disbiozei. Moterų lyties takų mikrobiotos disbiozės yra tam tikri mikrobiotos sutrikimai, sukeliami pakitusios mikroorganizmų bendrijos. Disbiozėms priskiriama kandidozė, aerobinis vaginitas ir bakterinė vaginozė. Bakterinė vaginozė yra labai paplitusi būklė, sukelianti įvairius simptomus ir galimai susijusi su priešlaikiniu gimdymu. Didelė dalis bakterinės vaginozės atvejų yra nediagnozuojami, todėl būtina sukurti jautresnes diagnostikos priemones bakterinės vaginozės nustatymui. *L. iners* gali dalyvauti moterų lyties takų mikrobiotai pereinant į bakterinę vaginozę, nors įprastai *Lactobacillus* šeimos bakterijos sukuria nepalankią terpę patogeninėms bakterijoms vystytis. Bakterinės vaginozės metu gali padidėti *L. iners* populiacija, taip pat *L. iners* gali padidinti inerolizino geno raišką. Todėl inerolizino koncentracija gali būti mikrobiotos būklės rodiklis. Monokloniniai antikūnai prieš ineroliziną gali būti panaudoti kuriant kiekybines inerolizino nustatymo sistemas. Sukurtos sistemos gali būti svarbios priemonės nustatant moterų lyties takų mikrobiotos fenotipus. **Bakalauro baigiamojo darbo tikslas** yra sukurti monokloninių antikūnų kolekciją prieš rekombinantinį ineroliziną, juos apibūdinti ir panaudoti kiekybinio inerolizino nustatymo sistemos kūrimui.

Bakalauro baigiamojo darbo uždaviniai:

- susintetinti ineroliziną *Escherichia coli* raiškos sistemoje ir patikrinti baltymo hemolizinį aktyvumą;
- sukurti hibridomas, sintetinančias monokloninius antikūnus prieš rekombinantinį ineroliziną;
- ištirti sukurtų monokloninių antikūnų specifiškumą ir giminingumą antigenui, nustatyti kryžmiškai reaguojančius antikūnus;
- nustatyti monokloninius antikūnus, kurie slopina inerolizino hemolizinį aktyvumą;
- sugrupuoti monokloninių antikūnų kolekciją pagal atpažįstamas imunodominuojančias sritis inerolizine;
- sukurti ir optimizuoti inerolizino kiekybinio nustatymo sistemą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Poras formuojantys toksinai

Poras formuojantys toksinai (PFT) yra dažni patogeninių bakterijų virulentiškumo veiksniai (Los *et al.*, 2013). Šie baltymai sudaro poras taikinio membranose, todėl gali pažeisti epitelio barjerą, veikti imuninę sistemą ir sudaryti sąlygas patogeno plitimui. Poras formuojantys baltymai yra bendresnė baltymų grupė, kurios nariai randami ne vien prokariotuose, bet ir eukariotuose (Ros *et al.*, 2015). Vienas toks pavyzdys yra įgimto imuniteto komplemento sistemoje dalyvaujantys membranos atakos komplekso baltymai.

PFT randami įvairiose bakterijose ir gali lemti jų ekologinę nišą. PFT sintetinami žmogaus patogenų: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*. Šių bakterijų sintetinami PFT atlieka nevienodas funkcijas: *S. pneumoniae* sintetinamo pneumolizino (PLY) poros lizuoja ląsteles, membranoje turinčias cholesterolio, ir yra svarbus šio patogeno virulentiškumo veiksnys (Witzenrath *et al.*, 2006); dalis *S. aureus* išskiriamų PFT yra specifiški imuninės sistemos ląstelėms; *L. monocytogenes* išskiriamas listeriolizinas O (LLO) leidžia bakterijai ištrūkti iš fagolizosomų ir lokalizuotis taikinio ląstelių citozolyje (Iacovache *et al.*, 2010). Visais žinomais atvejais PFT monomerai atpažįsta tam tikras struktūras taikinio membranose, todėl gali būti specifiški skirtingoms ląstelėms (Perraro *et al.*, 2016). Taigi PFT gali lemti skirtingą patogenų ekologinę nišą ir sukelti įvairius padarinius infekuotam organizmui.

PFT gali būti skirstomi pagal tai, kokiomis antrinėmis struktūromis įsitvirtina taikinio membranoje (Leseur *et al.*, 1997). α -PFT taikinio membranoje įsitvirtina α -spiralės, o β -PFT – β -statinės struktūromis. PFT priklauso 6 baltymų šeimos: kolicinų, citolizinų A ir aktinoporinų šeimos priskiriamos α -PFT, o hemolizinų, aerolizinų ir nuo cholesterolio priklausomų citolizinų (CDC) šeimos priskiriamos β -PFT. Toliau pateikiama išsamesnė šioms grupėms priklausančių baltymų šeimų apžvalga.

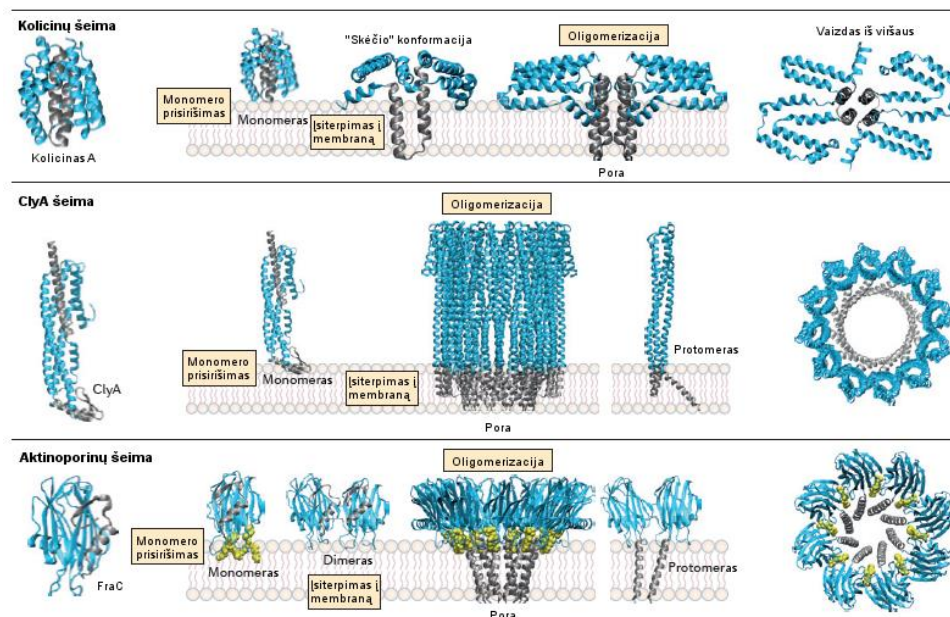
1.1.1 α -PFT

α -PFT grupės baltymai turi keletą panašumų. Skirtingi α -PFT domenai paprastai atsakingi už skirtingas biologines funkcijas: atpažinimo, translokacijos arba toksiškumo. Poras formuojantys domenai dažniausiai sudaryti iš keletos arba keliolikos hidrofobiškų spiralių. Nepaisant struktūrinių panašumų, tarp α -PFT grupės baltymų šeimų nėra aptinkamo aminorūgščių sekų panašumo. α -PFT grupės baltymams priskiriamos trys baltymų šeimos: kolicinų, ClyA ir aktinoporinų.

Kolicinai yra kai kurių *E. coli* kamienų sintetiniai bakteriocinai, toksiški kitoms *E. coli* bakterijoms (Cascale *et al.* 2007). Kolicinų struktūra susideda iš trijų domenų: N-galinis domenas susijęs su kolicino translokacija, vidurinis – svarbus receptoriaus atpažinimui, C-galinis – aktyvumą lemiantis domenas. Kolicinai veikia ląsteles prisijungdami prie išorinės membranos baltymų, susijusių su maistinių medžiagų pernaša. Tuomet kolicinai patenka į periplazmą ir, pasinaudodami pernašos sistemos baltymais, priartėja prie bakterijų vidinės membranos. Kolicinų toksinis poveikis kyla dėl suformuojamų įtampa valdomų kanalų vidinėje bakterijų membranoje arba dėl kolicinų endonukleazinio aktyvumo suardomos DNR ir RNR. Šioje apžvalgoje nagrinėjamas tik kolicinų porų formavimo mechanizmas.

Kolicinų veikimas nagrinėjamas kolicino A pavyzdžiu. Poras formuojantis kolicinas A (1.1 pav.) vandenyje yra tirpaus monomero formos. Kolicinas A išorinėje *E. coli* membranoje atpažįsta β statinės formos baltymus, pavyzdžiui, BtuB (Chai *et al.* 1982). Tuomet kolicinai yra pernešami baltymu OmpF į periplazmą, kur jie sąveikauja su Tol arba Ton pernašos baltymais ir nunešami iki bakterijų vidinės plazminės membranos (Zamaroczy *et al.* 2012). Kolicino A molekulė įgauna vadinamą „skėčio“ konformaciją (Padmavathi *et al.* 2008), hidroforinis α segtuko motyvas įsitvirtina membranoje. „Skėčio“ konformacija palengvina dimerų ir aukštesnės eilės oligomerų formavimą. Įvykus oligomerizacijai, susidaro įtampa valdomi kanalai, dėl kurių kyla ląstelių membranos potencialo depoliarizacija, ATP difunduoja iš ląstelės, ląstelė miršta (Ridleya *et al.* 2010).

Citolizinų A (ClyA) šeimai priklauso įvairūs bakteriniai PFT, pavyzdžiui: *E. coli*, *Salmonella enterica* bakterijų sintetinamas ClyA, *Bacillus cereus* gaminamas nehemolizinis trinaris enterotoxinas (Nhe) ir hemolizinas BL (Hbl). Šie toksinai lizuoja žinduolių ląsteles, kurių membranoje yra cholesterolio, suformuodami 25 Å skersmens poras (Hunt *et al.* 2010). ClyA yra pirmas PFT, kurio kristalinės struktūros nustatytos tiek tirpaus monomero, tiek membranoje įsitvirtinusio protomero, o tai padėjo geriau suprasti visų α -PFT poros formavimo etapą bendrai.



1.1 pav. α -PFT grupei priklausančių baltymų poros formavimo schema. (Pagal Perraro *et al.* 2016).

ClyA yra 34 kDa baltymas, tirpale esantis ilgos, daugiausiai iš α spiralių sudarytos formos, išskyrus trumpą β segtuko motyvą vadinamą β -liežuviu (1.1 pav.). Šalia cholesterolio turinčių membranų, β -liežuvis nutolsta nuo likusios baltymo molekulės ir įlenda į plazminę membraną. Šis etapas inicijuoja didžiulius konformacinius pokyčius, dėl kurių baltymo N-gale esanti amfipatinė α -spirale nusvyra iki plazminės membranos. Tuomet įvyksta oligomerizacijos etapas, kurio metu amfipatinės α spiralsės suformuoja statinės struktūrą ir įsistato į lipidų sluoksnį (Vaidyanathan *et al.* 2014).

Aktinoporinai yra eukariotų sintetiniai toksinai. Pirmi aktinoporinų nariai rasti aktinijose, tačiau struktūriškai panašių baltymų randama ir kituose organizmuose (Birck *et al.* 2004). Rentgenostruktūrinės analizės būdu gautos baltymų ekvinatoksino II (EqII), sticholizino II (StnII) ir fragacetoksino C (FraC) erdvinės struktūros. Aktinoporinų molekulinė masė siekia 20 kDa, juos sudaro vidinė β sumuštinio struktūra, kurią iš abiejų šonų remia α spiralsės. Baltymo N-gale esanti amfipatinė α spirale dalyvauja poros sudaryme (Črnigoj Kristan *et al.* 2009).

Aktinoporinų porų formavimo mechanizmas panašus į kitų α -PFT, ypač CryA šeimos baltymų. Visų pirma aktinoporino aromatinės aminorūgštys sąveikauja su sfingomielinu esančiu taikinio ląstelės membranoje (Anderluh *et al.* 2002). Tuomet N-galo amfipatinė α spiralsės nusvyra iki plazminės membranos, panašiai kaip ir CryA šeimos baltymų poros formavimo mechanizme. Įvykus 4-9 monomerų oligomerizacijai susidaro 20 Å pora.

Aktinoporinų šeimos baltymo FraC rentgenostruktūrinės analizės būdu gautos monomerų, dimerų ir oktamerų struktūros leido geriau suprasti porų sudarymo mechanizmą (Tanaka *et al.* 2015). FraC oktamerinė pora sudaryta iš FraC ir sfingomielino santykiu 1:1. Taigi sfingomielinas veikia ne tik kaip FraC receptorių, bet ir kaip kofaktorių, svarbus poros formavime (1.1 pav.).

1.1.2 β -PFT

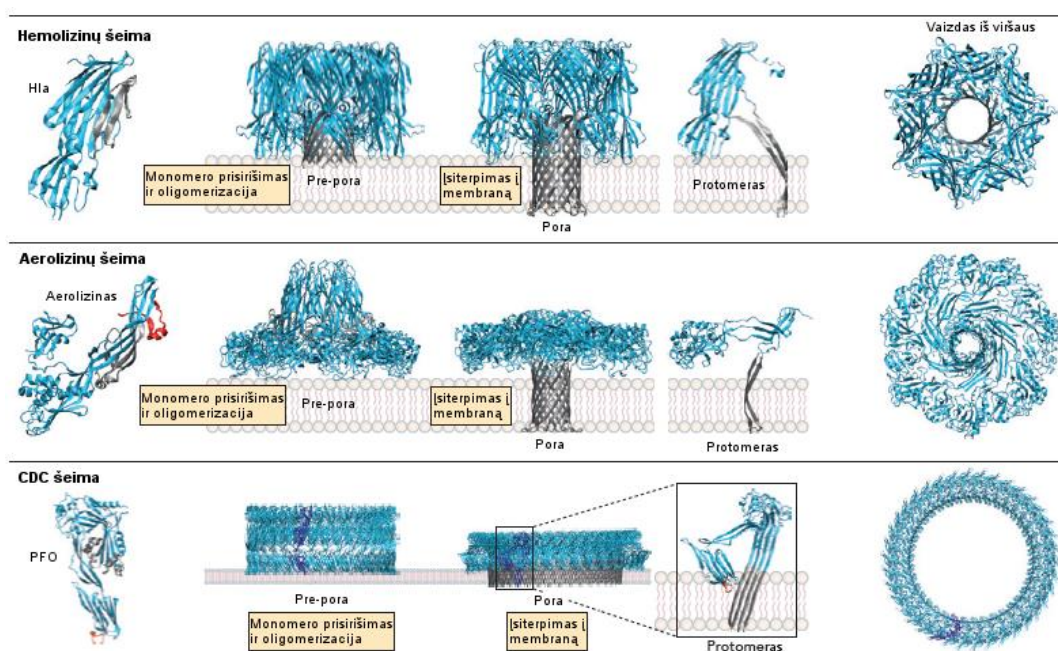
β -PFT taikinio membranoje sudaro β statinės struktūrą. β -PFT turi keletos domenų struktūrą, tačiau kitaip nei α -PFT, skirtingi domenai dažniausiai nėra atsakingi už skirtingas biologines funkcijas. β -PFT grupės baltymai nuo α -PFT skiriasi didesniu kiekiu β -struktūrų, pirminėje baltymų struktūroje nerandama ilgo hidrofobinio fragmento būdingo α -PFT, o poros formuojamos iš didesnio kiekio monomerų (Feil *et al.* 2010). β -PFT priklauso hemolizinių, aerolizinių ir CDC baltymų šeimos.

Hemolizinių baltymų šeimos nariai randami *S. aureus* kamienuose ir yra svarbūs virulentiškumo veiksniai. Hemolizinais būna sudaryti iš vieno komponento, tokie kaip α -hemolizinas (Hla), arba dviejų komponentų, pavyzdžiui, γ -hemolizinas AB (HlgAB), leukotoksinas ED (LukED) (DuMont *et al.* 2014). Hemolizinių aktyvumui svarbūs baltymai taikinio membranose, kuriais pasinaudodami toksinai sukelia įvairius padarinius. Pavyzdžiui, LukED veikia ląsteles, kurios turi 5 tipo CC-chemokinių receptorių (CCR5), todėl šis toksinas formuoja poras makrofaguose, dendritinėse ir T ląstelėse (Alonzo *et al.* 2013). Skirtingi stafilokokų hemolizinais veikia skirtingas imuninės sistemos ląsteles, taip pat leidžia patogeniui pažeisti epitelinius barjerus. Todėl *S. aureus* sintetinių PFT pagrindu sukurtos vakcinos yra perspektyvus būdas kovojant su meticiliniui atsparių kamienų sukeliamomis infekcijomis (Hu *et al.* 2014).

S. aureus hemolizinais yra būdingi β -PFT baltymai. *S. aureus* hemolizinais tirpioje formoje yra kompaktiški baltymai, daugiausiai sudaryti iš β struktūrų, o transmembraninį β segtuką formuojantis domenai yra baltymo išorėje (1.2 pav.). Hla, kaip ir kiti hemolizinais, sudaryti iš trijų domenų: kepurės, kraštinio ir kamieno domenų (DuMont *et al.* 2014). Prie membranos prisijungę monomerai oligomerizuoja į heptamerines arba oktamerines pre-poras, tuomet suformuojama amfipatinė β statinės struktūra, kurios išorė yra hidrofobinė. Susidariusi pre-pora iškart įsistato į membraną, sudaroma pora, pro kurią gali laisvai judėti mažos molekulinės masės junginiai. Panašus mechanizmas būdingas visiems β -PFT.

Aerolizinais yra daugiadomeniai baltymai, sintetinami gram-teigiamų *Aeromonas* šeimos bakterijų ir gram-neigiamų bakterijų, pavyzdžiui: *Clostridium septicus*, *Pseudomonas entomophila* (Iovache *et al.* 2015). Patogenų PFT, tokie kaip *Aeromonas hydrophila* sintetinamas aerolizinas, padeda bakterijai plisti užkrėstame organizme, pažeidžiant epitelio barjerą (Ballard *et al.* 1993).

Porų formavimo mechanizmas išaiškintas naudojant aerolizino mutantinius baltymus, turinčius aminorūgščių, atsakingų už skirtingus poros formavimo etapus, mutacijas. (Degiacomi *et al.* 2013). Tirpūs aerolizino monomerai turi dvi β lakšto struktūras, atskirtas pailgo kamieno domeno (1.2 pav.). Vienas aerolizino išskirtinumas yra tai, jog šie baltymai sintetinami kaip pro-toksinai, C-gale turintys peptidą, neleidžiantį monomerams per anksti oligomerizuotis (Iacovache *et al.* 2006). Proteazėmis paveikti aerolizino monomerai prisijungia prie membranos ir sudaro heptamerinę pre-poros struktūrą. Pora susiformuoja įvykus kamieno domeno konformaciniais pokyčiams, kurių metu susidaro ir į membraną įsiterpia β statinės struktūra. Dėl šių pokyčių ekstraląstelinė poros dalis tampa plokščio disko formos.

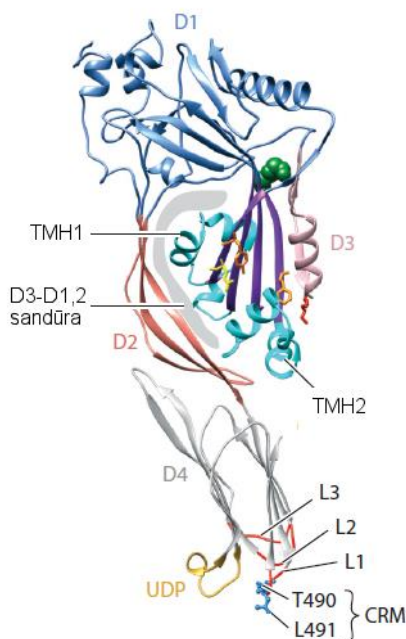


1.2 pav. β -PFT poros formavimo mechanizmų schema. (Pagal Perraro *et al.* 2016)

Nuo cholesterolio priklausomi citolizinais (CDC) yra didelė baltymų šeima, kurios nariai sintetinami daugiausiai gram-teigiamų bakterijų iš *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus* ir *Listeria* genčių (Hotze *et al.* 2012). Neseniai atrasti CDC baltymai ir gram-neigiamose bakterijose (Hotze *et al.* 2013). CDC leidžia patogenams prisitaikyti prie skirtingos aplinkos ir

užimti įvairias ekologines nišas: anksčiau minėto *L. monocytogenes* sintetinamas LLO lemia mikrobo gebėjimą kolonizuoti ląstelių citozolį, *S. pneumoniae* citolizinas PLY svarbus bakterijai patenkant į organizmą bei skatina uždegimą ir komplemento aktyvaciją (Hotze *et al.* 2012). Struktūriškai panašūs baltymai randami visuose organizmų domenuose. Membranos atakos komplekso/perforino (MACPF) baltymai randami eukariotų imuninėse sistemose, nors tarp CDC ir MACPF nerandama reikšmingo aminorūgščių sekų panašumo (Rosado *et al.* 2007).

Perfringolizinas (PFO) buvo pirmasis CDC šeimos narys, kurio erdvinis modelis buvo išspręstas remiantis rentgenostruktūrinės kristalografijos duomenimis (Rossjohn *et al.* 1997). CDC būdinga keturių domenų struktūra, sudaryta daugiausiai iš β struktūrų. Kiekvienas monomeras galutinėje poroje sudaro po du transmembraninius amfipatinius β segtukus, tuo tarpu aerolizinais ir hemolizinais – po vieną. Tirpioje monomerų formoje šios struktūros yra α spiralės, vadinamos transmembraninėmis spiralėmis (TMH) (1.3 pav.). CDC taip pat gali formuoti funkcionalias nepilno žiedo poras taikinio membranoje (Gilbert *et al.* 2005).



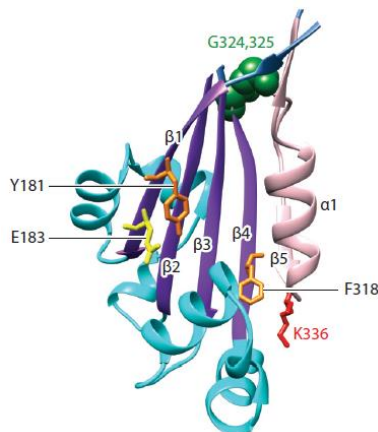
1.3 pav. PFO kristalinės struktūros nuotrauka. D1-4 – domenai 1-4, TMH – transmembraninė spiralė, UDP – undekapeptidas, CRM – cholesterolį atpažįstantis motyvas, L1-4 – kilpos 1-4, susijusios su poros formavimu (Pagal Tweten *et al.* 2015).

CDC porų formavimo mechanizmas primena kitų β -PFT mechanizmus: visų pirma monomerai prisijungia prie membraninio receptoriaus, tuomet įvyksta monomerų oligomerizacija membranos paviršiuje ir sudaroma pre-pora. Suformuota pre-pora įsiterpia į membraną dėl centrinio domeno konformacinių pokyčių ir susidaro membraninė pora (Czajkowsky *et al.* 2004). Šiai baltymų šeimai priklauso inerolizinas (INY), *Lactobacillus iners* sintetinamas citolizinas, todėl išsamesnis CDC porų formavimo mechanizmo aprašymas pateikiamas kitame skyrelyje.

1.1.3 CDC porų formavimo mechanizmas

CDC porų formavimas susideda iš keturių etapų: monomerų prisijungimo prie membranos, oligomerizacijos membranos paviršiuje, β statinės suformavimo ir įsiterpimo į membraną.

Pirmame etape vandenyje tirpūs monomerai (PFO atveju dimerai) prisijungia prie membranos per specifinius receptorius. Dažniausiai CDC prisijungia prie membraninio cholesterolio, tačiau intermedilizino (ILY) receptorius yra žmogaus CD59 (Giddings *et al.* 2004). CDC ketvirtame domene C-gale randama seka ECTGLAWWWWR, kuri yra labai konservatyvi (Alouf *et al.* 2005). Manoma, jog ši seka (dar vadinama triptofanu-gausi kilpa arba undekapeptidu) atsakinga už cholesterolio atpažinimą membranoje, nes šioje sekoje įvedant mutacijas gaunami neaktyvūs mutantiniai baltymai (Soltani *et al.* 2007). Vėliau buvo suprasta, jog UDP įsiterpia į membraną, stabilizuodamas monomerą. Dabar cholesterolį atpažįstančiu motyvu (CRM) laikoma treonino-leucino aminorūgščių pora, konservatyvi visuose žinomuose CDC (Farrand *et al.* 2010).



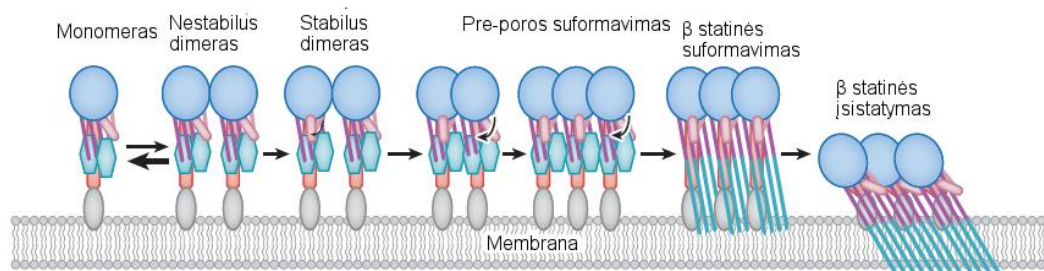
1.4 pav. PFO trečio domeno struktūra. (Pagal Tweten *et al.* 2015).

CDC monomerams prisijungus prie membranos, įvyksta oligomerizacija, susijungiant 30-50 monomerų. Per CRM prie membranos prisijungę monomerai įsitvirtina L2, L3 ir undekapeptido kilpomis (Ramachandran *et al.* 2002, 2004). Tuomet, dėl lateralinės lipidų difuzijos, monomerai gali sąveikauti vienas su kitu.

Oligomerizacijos mechanizmui paaiškinti yra sukurtos kelios hipotezės. Viena hipotezė oligomerizaciją paaiškina alosterinės aktyvacijos principu. CDC monomerui prisijungus prie cholesterolio, iš baltymo D4 domeno per D2 domeną konformaciniai virsmai perduodami D3

domenui. CDC D3 domenui būdingos penkios β struktūros (1.4 pav.). Dėl judraus glicino jungtuko $\beta 5$ pasitraukia nuo $\beta 4$ struktūros ir pastaroji gali sąveikauti su kito monomero $\beta 1$ struktūra, susidarant CDC dimerams.

Remiantis kita hipoteze, oligomerizacija yra grįžtamas procesas (Hotze *et al.* 2012). Membranoje įsitvirtinę monomerai nuolat sudaro nestabilius dimerus (1.5 pav.). Šiluminio judėjimo energija gali būti panaudojama pirmojo monomero $\beta 5$ struktūros disociacijai, taip susiformuojant ryšiams tarp pirmojo monomero $\beta 4$ ir antrojo monomero $\beta 1$ struktūrų. Konformacinė informacija perduodama antrajam monomerui susidariusiame stabiliaime dimere ir skatina $\beta 5$ struktūros disociaciją. Susidaro grandininė reakcija ir greitai oligomerizuojama daug monomerų, kol sudaroma pre-pora.



1.5 pav. CDC poros formavimo mechanizmo schema. (Pagal Tweten *et al.* 2015).

β statinės suformavime svarbios CDC D3 domene esančios glutamo rūgšties E183 ir lizino K336 aminorūgštys, kurios sudaro druskų tiltelį. Išsiskyrusi energija panaudojama domenų D3 ir D1,2 sandūros išardymui, taip išlaisvinant α spiralę, kuri tuomet gali sudaryti TMH1 (Sato *et al.* 2013). Manoma, jog E183 ir K336 suartėjimui reikalinga, jog baltymo molekulė palinktų apie 30° membranos atžvilgiu. Šiame procese gali dalyvauti tirozino Y181 ir fenilalanino F318 aminorūgščių sudaroma stekingo sąveika (1.4 pav.) (Wade *et al.* 2015). Susidariusi β statinės struktūra siekia membraną (1.5 pav.), tačiau poros sudarymui reikalinga, kad ši struktūra įsiterptų į membraną. Todėl reikalingas dar vienas etapas, kuriame pre-poros kompleksas nusileidžia vertikaliai apie $40 \text{ \AA}$, ir β statinė įsistato į membraną (Czajkowsky *et al.* 2004). Kaip šis etapas įvykdomas dar nėra tiksliai nustatyta, tačiau manoma, jog jame svarbų vaidmenį turi domenas D2 (Tilley *et al.* 2005).

1.1.4 CDC baltymų aktyvumo priklausomybė nuo pH

CDC baltymų aktyvumas dažnai priklauso nuo terpės pH. ILY yra aktyvus dideliame pH diapazone, žmogaus eritrocitų hemolizė stebima nuo pH 4,0 iki 8,0 (Nagamune *et al.*

1996). Daugumos citolizinių, tarp jų PLY ir vaginolizino (VLY), aktyvumo maksimumas yra neutralioje, apie 7,0 pH, terpėje. Vos keli CDC šeimos baltymai, LLO ir INY, yra aktyvūs rūgštinėje terpėje (Rampersaud *et al.* 2018).

LLO ir INY aktyvumas nuo pH reguliuojamas skirtingais būdais. *L. monocytogenes* citolizinas LLO yra aktyvus tik rūščioje terpėje, pH esant apie 4,5-6,0. Šis baltymas neutraliame pH negrįžtamai išsilanksto ir praranda savo aktyvumą. LLO aktyvumas glaudžiai susijęs su *Listeria* gyvenimo ciklu ir yra svarbus patogeno išlaisvinimui iš fagolizosomų. Taip pat, LLO turi PEST seką, todėl endoląstelinės bakterijos gali ilgai parazituoti šeiminko ląsteles ir jų nepažudyti. (Dramsi *et al.* 2002). *L.iners* citolizinas INY taip pat aktyvus rūgštiniame pH, bet skirtingai nei LLO, paveiktas neutralaus pH INY gali atgauti savo aktyvumą rūgštinėje terpėje (Rampersaud *et al.* 2018). Todėl INY aktyvumas yra reguliuojamas kitokiu būdu nei LLO.

1.2 Moterų lyties takų mikrobiota.

Moterų lyties takų mikrobiota yra sudėtinga mikroorganizmų bendrija, paprastai sudaryta iš daugelio rūšių bakterijų. Eubiotinėje (sveikos būklės) mikrobiotoje vyrauja *Lactobacillus* šeimos bakterijos, kurios sukuria nepalankią terpę patogeninėms bakterijoms vystytis, išskirdamos pieno rūgštį, vandenilio peroksidą ir bakteriocinus (Mendling *et al.* 2016). Moterų lyties takų disbiozėmis vadinami mikrobiotos sutrikimai: *Candida* genties mielių sukeliama kandidozė, aerobinių bakterijų sukeltas aerobinis vaginitas ir įvairių bakterijų sukeliama bakterinė vaginozė (BV). Pastarųjų metų tyrimai parodė, jog bakterijos *Lactobacillus iners* gali būti susijusios su BV (Borgdorff *et al.* 2016). Šioje literatūrinėje apžvalgoje bus nagrinėjama tik BV ir jos sąsaja su moterų lyties takų mikrobiotos bakterijomis, kurios gali dalyvauti šios būklės patogenezėje.

1.2.1 Bakterinė vaginozė: diagnostika, epidemiologija ir mikrobiologija

Bakterinė vaginozė skirtingose šalyse serga nuo 5 iki 50 % moterų (Klebanoff *et al.* 2004). Literatūroje vyrauja keletas skirtingų BV apibrėžimų, kas iliustruoja mokslinės bendruomenės nesutarimą dėl BV (Reid, 2018). Dažnai BV laikoma būkle, kurios metu moterų lyties mikrobiotoje vyrauja įvairūs anaerobiniai mikroorganizmai, įskaitant *Gardnerella* ir *Prevotella* šeimos organizmus. Vienas iš sunkumų diagnozuojant BV yra įprastų simptomų, tokių kaip niežėjimas, nemalonas kvapas ar skausmas šlapinantis, nebuvimas, todėl dauguma atvejų gali būti nediagnozuojami (Kenyon *et al.* 2013). BV yra susijusi su didesne rizika užsikrėsti lytiškai plintančiomis ligomis, sukeliomomis patogenų

Tichomonas vaginalis, *Chlamydia trachomatis* ir *Neisseria gonorrhoeae* (Brotman *et al.* 2010). Taip pat manoma, jog BV yra prieššlaikinio gimdymo rizikos veiksnys (Darwish *et al.* 2005). Asimptominė BV yra viena iš priežasčių, kodėl būtina sukurti jautresnius BV diagnostinius testus. Todėl visų pirma bus apžvelgta, kokios diagnostinės priemonės naudojamos BV nustatymui šiuo metu, pateikti epidemiologiniai duomenys ir BV metagenominiai tyrimai.

BV ilgą laiką buvo laikyta liga, sukeliamą *Gardnerella vaginalis* bakterijų (Gardner *et al.* 1954). Tačiau vėlesni tyrimai parodė, jog šios rūšies bakterijos randamos ir sveikų pacienčių lyties takų mikrobiotoje (Paramel *et al.* 2012). Plačiai naudojamas diagnostikos metodas BV nustatyti buvo Amselio kriterijai (Amsel *et al.* 1983). BV diagnozė būdavo skiriama toms moterims, kurios atitiko tris iš keturių Amselio kriterijų: lyties takų išskyry pH didesnis už 4,5; randamos baltos ar geltonos spalvos homogeniškos išskyros; mikroskopuojant epitelio mėginius randama epitelio ląstelių, kurias dengia prikibusios bakterijos; lyties takų išskyras paveikus 10 % kalio šarmo tirpalu jaučiamas nemalonus, žuvį primenantis kvapas. Vėliau naudota Nugent vertinimo sistema, kuri rėmėsi moterų lyties takų ėminių Gramo dažymo rezultatais (Nugent *et al.* 1991). Nugent vertinimo sistemoje mėginiai mikroskopuojami šviesiniu mikroskopu, naudojant aliejaus imersiją, esant 1000 kartų padidininui. Tuomet apskaičiuojamas vidutinis regėjimo lauke esančių skirtingų morfologijų bakterijų kiekis ir priskiriamos diskrečios vertės (1.1 lentelė).

1.1 lentelė. Nugent vertinimo sistema Gramo dažų nudažytiems moterų lyties takų ėminiams.

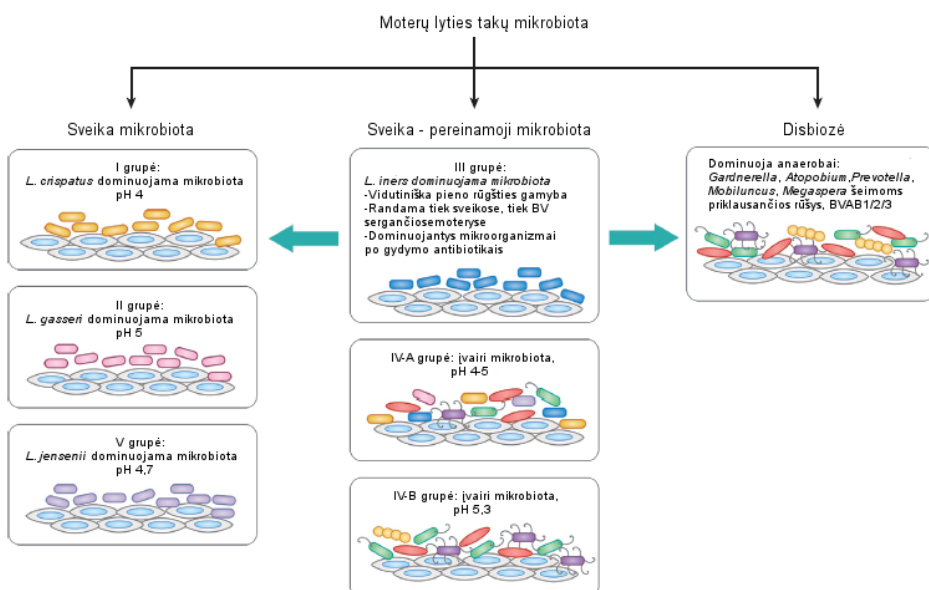
Vertinimas	<i>Lactobacillus</i> morfotipai	<i>Gardnerella</i> ir <i>Bacteroides</i> morfotipai	Išlinkusios Gram-variabilios lazdelės
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+
2	2+	2+	3+
3	1+	3+	-
4	0	4+	-

Morfotipai įvertinami apskaičiuojant vidutinį ląstelių skaičių regėjimo lauke. 0 – ląstelių nestebima; 1 – <1 ląstelės; 2 – stebimos 1-4 ląstelės; 3 – 5-30 ląstelių; 4 – 30 ir daugiau ląstelių. Galutinis įvertinimas apskaičiuojamas sudedant *Lactobacillus*, *Gardnerella* ir *Bacteroides*, ir gram-variabilių morfotipų vertinimus.

Galutinė vertė Nugent vertinimo sistemoje yra lygi skaičiui nuo 0 iki 10. Vertės didesnės už 7 rodo, jog yra BV; vertės nuo 4 iki 6 laikomos tarpinėmis; vertės nuo 0 iki 3 laikomos normalia būkle. (Nugent *et al.* 1991). Nugent vertinimo sistema laikoma BV diagnozavimo „auksiniu standartu“ (Marazzo *et al.* 2008).

BV epidemiologija skirtinguose regionuose ir etninėse grupėse yra skirtinga, tai parodyta naudojantis Nugent vertinimo sistema (Kenyon *et al.* 2013). BV labiausiai paplitusi Afrikoje, mažiausiai – Azijoje ir Europoje. Tačiau kiekviename regione yra išimčių, pavyzdžiui: vakarų Europoje paprastai mažas BV paplitimas, išskyrus Lenkiją, Norvegiją ir Turkiją, kur BV yra stebima daugiau nei 30 % tirtų moterų. Taip pat, skirtingose etninėse grupėse gali labai skirtis BV paplitimas palyginus su šalies vidurkiu. Vienas iš keleto JAV vykdytų ilgalaikių tyrimų parodė, jog juodaodės moterys dažniau serga BV (51,4 %) nei baltaodės (23,2 %), tuo tarpu tarp Lotynų amerikiečių BV paplitimas buvo tarpinis (31,9 %) (Koumans *et al.* 2007). Kituose ilgalaikiuose tyrimuose šios tendencijos išliko (Yen *et al.* 2003).

Atsiradus naujos kartos sekoskaitos technologijoms buvo pritaikyti metagenominiai tyrimai moterų lyties takų mikrobiotai, atliekant 16S rRNR geno sekoskaitą (Petrova *et al.* 2017). Remiantis metagenominiais ir mikrobiologiniais tyrimais, asimptominių moterų lyties takų mikrobiotos buvo suskirstytos į 5 grupes pagal vyraujančius mikroorganizmus: I (26.2%) vyrauja *L. crispatus*, II (6.3%) - *L. gasseri*, III (34.1%) – *L. iners*, V(5.3%) – *L. jensenii*. Likę 27 % moterų priskiriamos heterogeniškai IV grupei, kurių lyties takų mikrobiotoje vyrauja įvairios anaerobinės bakterijos (Ravel *et al.* 2011). Ši grupė turbūt atspindi asimptominę BV mikrobiotą (1.4 pav.). Taip pat buvo pastebėta, jog skirtingų etninių grupių moterų lyties takų išskyrų pH buvo skirtingas: aukščiausias pH stebėtas Lotynų amerikietėse ($\text{pH } 5,0 \pm 0,59$) ir juodaodėse ($\text{pH } 4,7 \pm 1,04$), palyginus su azijietėmis ($\text{pH } 4,4 \pm 0,59$) ir baltaodėmis ($\text{pH } 4,2 \pm 0,3$) moterimis. Šie rezultatai atspindi etninius skirtumus moterų lyties mikrobiotoje.



1.6 pav. Moterų lyties takų mikrobiotų grupės. (Pagal Petrova *et al.* 2017).

Moterų lyties takų III grupės mikrobiotoje vyrauja *L. iners*, neįprastos *Lactobacillus* šeimos bakterijos, kurios randamos tiek sveikų moterų lyties takuose, tiek sergančių BV (Macklaim *et al.* 2011). Spėjama, jog maždaug 50 % moterų lyties takuose turėtų būti *L. iners* (Ma *et al.* 2012). Šių bakterijų kiekis taip pat išauga po BV gydymo metronidazolu, o kiti empiriniai duomenys rodo, jog *L. iners* gali būti susijusi su mikrobiotos perėjimu į BV (Vaneechoutte *et al.* 2017).

1.2.2 *Lactobacillus iners* vaidmuo moterų lyties takų mikrobiotoje.

L. iners yra neįprasta *Lactobacillus* šeimos bakterija, išsiskirianti iš kitų šios šeimos narių maža vandenilio peroksido ir pieno rūgšties gamyba ir mažu, apie 1 MB genomu, kai kitų *Lactobacillus* šeimos bakterijų genomai siekia 3-4 MB. Taip pat *L. iners* bakterijos neauga ant laktobaciloms išskirti skirtos Man Rogosa Sharp terpės, augimui reikalingas žinduolių kraujas. *L. iners* yra vienintelė žinoma *Lactobacillus* šeimos bakterija, sintetianti CDC – INY. Pastarųjų metų tyrimai rodo, jog *L. iners* gali dalyvauti BV patogenezėje. Šioje dalyje pateikiami duomenys apie *L. iners* vaidmenį moterų lyties takų mikrobiotoje, sąsajas su BV ir priešlaikiniu gimdymu.

L. iners vaidmuo moterų lyties takų mikrobiotoje nėra vienareikšmis. Šios bakterijos pirmą kartą išskirtos iš moterų urogenitalinių takų 1999 m. (Falsen *et al.* 1999). Kaip minėta anksčiau, *L. iners* yra viena iš labiausiai paplitusių bakterijų moterų lyties takų mikrobiotoje (Ravel *et al.* 2011). Kai kurie autoriai teigia, jog tai yra tiesiog labai paplitusi *Lactobacillus* bakterija, ir gali būti laikoma probiotiku (Saunders *et al.* 2007). Tačiau metagenominiai tyrimai rodo, jog yra tam tikra sąsaja tarp *L. iners* ir BV: viename tyrime *L. iners* buvo randama 86,3 % moterų, turinčių BV (Srinivasan *et al.* 2012). Taip pat, po BV gydymo antibiotiku metronidazolu *L. iners* yra dažniausiai randamos bakterijos (Ferris *et al.* 2007). Šie duomenys rodo, jog *L. iners* gali būti turėti parazitinį vaidmenį moterų lyties takų mikrobiotoje.

L. iners populiacija moterų lyties takų mikrobiotoje kinta mėnesinių ciklo metu, šios bakterijos užima tam tikrą ekologinę nišą. Pastebėta, jog moterų lyties takų mikrobiotoje *L. iners* dažniausiai nerandama kartu su *L. crispatus*, kita dažna *Lactobacillus* šeimos bakterija (De Becker *et al.* 2007). Galbūt šie duomenys gali būti paaiškinami tuo, jog *L. iners* ir *L. crispatus* konkuruoja dėl tos pačios ekologinės nišos (France *et al.* 2016). Tačiau kiti autoriai argumentuoja, jog būtent dėl skirtingų ekologinių nišų *L. iners* gali nukonkuruoti *L. crispatus*, ir atvirkščiai (Jaspers *et al.* 2012). Pavyzdžiui, *L. crispatus* gali vyrauti eubiozės metu, o *L.*

iners – BV ir menstruacijų metu. *L. iners* populiacija mikrobiotoje padidėja menstruacijų metu, tuo pačiu padidėja *G. vaginalis* ir *Atopobium vaginae* populiacijos, dėl ko kyla didesnė tikimybė susirgti BV (Srinivasan *et al.* 2010). Todėl moterų lyties takų mikrobiotos tyrimuose turėtų būti atsižvelgiama į tiriamųjų mėnesinių ciklo fazes.

Mikrobiota, kurioje vyrauja *L. iners*, dažniau pereina į disbiozę, tokio tipo mikrobiota mažiau atspari lytiškai plintančioms ligoms. Įvykus tam tikriems pokyčiams, vyraujančios bakterijos mikrobiotoje gali būti nukonkuruojamos kitos rūšies bakterijų. Tyrimai rodo, jog mikrobiota, kurioje vyrauja *L. iners*, yra mažiau stabili, nei *L. crispatus* (Macklaim *et al.* 2013). Taip pat padaryta išvada, jog *L. iners* mikrobiotoje suteikia mažesnę atsparumą ŽIV nei kitos *Lactobacillus* šeimos bakterijos (Borgdoff *et al.* 2016). Vieni autoriai teigė, jog ne žemesnis terpės pH eubiozės būklėje, bet didesnis D-pieno rūgšties kiekis gali veikti kaip apsauginis veiksnys nuo užsikrėtimo ŽIV (Nunn *et al.* 2015). Kadangi *L. iners* negeba sintetinti D-pieno rūgšties, šių bakterijų vyravimas moterų lyties takų mikrobiotoje gali būti užsikrėtimo ŽIV rizikos veiksnys (Witkin *et al.* 2013). Taigi mikrobiota, kurioje vyrauja *L. iners* yra mažiau stabili ir gali padidinti riziką užsikrėsti ŽIV.

L. iners gali būti susijusios su komplikacijomis nėštumo metu. Nėštumo metu moterų lyties takuose padidėja *Lactobacillus* šeimos bakterijų, todėl yra mažesnė rizika susirgti BV (Aagard *et al.* 2012). Tačiau, kaip minėta anksčiau, mikrobiota, kurioje vyrauja *L. iners* nėra stabili. Tiriant nėščias moteris, kurios patyrė priešlaikinį gimdymą (anksčiau nei 34 savaitė), buvo pastebėta, jog lyties takų mikrobiotoje vyravo *L. iners* (11 moterų iš 13, apie 85 %) (Petricevic *et al.* 2014). Buvo manyta, jog BV gali sukelti priešlaikinį gimdymą, tačiau BV turinčias moteris gydant metronidazolu nėštumo metu priešlaikinio gimdymo atvejų nesumažėjo (Donders *et al.* 2017). Taip pat yra nustatyta, jog *L. iners* moterų lyties takų mikrobiotoje būna atsparios metronidazolui, po BV gydymo metronidazolu šių bakterijų būna daugiausiai. Dėl šių duomenų kai kurie autoriai spėja, jog ne BV, bet *L. iners* sukelia priešlaikinį gimdymą, tačiau tokiai hipotezei patvirtinti reiktų daugiau tyrimų (Kindinger *et al.* 2017).

Epidemiologiniai tyrimai rodo, jog *L. iners* moterų lyties takų mikrobiotoje gali būti susijusi su daugeliu neigiamų reiškinių: padidėjusia rizika užsikrėsti lytiškai plintančiomis ligomis, didesne priešlaikinio gimdymo rizika, rizika mikrobiotai pereiti į disbiozės būseną. *L. iners* taip pat turi keletą gluminančių charakteristikų, kurios šias bakterijas išskiria iš kitų *Lactobacillus* bakterijų. Viena iš jų – ypatinga bakterijų morfologija. *L. iners* bakterijų

morfologija primena kokus, jos nesidažo Gramo dažu, nors filogenetiškai yra Gram-teigiamos bakterijos (Vanechoutte *et al.* 2017). *L. iners* taip pat geba stipriai prikibti prie ekstraląstelinio matrikso fibronektino, todėl gali būti svarbios formuojant biofilmus (McMillian *et al.* 2013). Šios bakterijos taip pat negeba sintetinti D-pieno rūgšties, pasižymi maža vandenilio peroksido ir L-pieno rūgšties produkcija (Witkin *et al.* 2013). *L. iners* disbiozės metu geba pakeisti maždaug 10 % genų raišką, padidindama INY, mucinų ir glicerolio pernašos sistemų baltymų kiekį (Witkin *et al.* 2013). Šios *L. iners* charakteristikos gali būti svarbios identifikuojant sutrikusią moterų lyties takų mikrobiotą.

Apibendrinant, *L. iners* yra vienos iš dažniausiai randamų bakterijų moterų lyties takų mikrobiotoje. Įvairūs tyrimai rodo, jog šios bakterijos gali lemti komplikacijas nėštumo metu, padidėjusią riziką užsikrėsti lytiškai pernešamomis ligomis, o taip pat būti vienas iš BV rizikos veiksnių. Todėl *L. iners* tyrimai gali būti svarbūs BV diagnostikai ir terapinių priemonių sukūrimui. Monokloniniai antikūnai prieš *L. iners* sintetinamą ineroliziną galėtų leisti identifikuoti skirtingus mikrobiotos fenotipus ir sukurti naujas BV diagnostikos priemones.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai, antikūnai, antigenai ir rinkiniai

Agarozė *TopVision* (Thermo Fisher Scientific);

DNR ilgio standartai: *GeneRuler™ 1kb Plus Ladder* ir *O' GeneRuler™ 1 kb DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific).

Etidžio bromidas (Desitin);

10X *DreamTaq* polimerazės *Green* buferinis tirpalas (su 20 mM MgCl₂) (Thermo Fisher Scientific);

dNTP 2 mM (Thermo Fisher Scientific);

DreamTaq DNR polimerazė (5 U/μl) (Thermo Fisher Scientific);

Izopropil-β-tiogalaktopiranozidas (IPTG) (Thermo Fisher Scientific);

Restrikcijos endonukleazės *NheI*, *XhoI*, *SspI* (Thermo Fisher Scientific);

T4 DNR ligazė (Thermo Fisher Scientific);

Mišinys PGR metodui 2X *Phusion* Flash PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific);

Vektorius pET28a(+) (Merck);

Vektorius pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific);

Serino proteazių slopiklis fenilmetilsulfonilfluoridas (PMSF) (Sigma-Aldrich);

Antiputokšlis (Sigma-Aldrich);

Pieno milteliai (Roth);

Rinkiniai: *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific), *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo Fisher Scientific), *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific), *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific);

Imunofermentinės analizės nebaltyminis blokavimo tirpalas *10X Roti®Block* (Roth);

Ožkos polikloniniai antikūnai prieš pelės IgG žymėti su krienų peroksidazė (BioRad);

Pelės imunoglobulinų izotipų nustatymo IFA rinkinys *Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit* (BD Biosciences)

TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidinas) imunofermentinei analizei *NeA-Blue* (Clinical Science Products Inc.);

TMB skirtas membranoms (Sigma);

4-chlornaftolis (Sigma);

Metanolis (Scharlau);

H₂O₂ (Roth);

50 kartų koncentruotas HAT (Hipoksantinas, aminopterinas, timidinas) (Sigma-Aldrich);

Ląstelių suliejimo agentas PEG-4000 (Sigma-Aldrich)

„rProtein A Sepharose Fast Flow“ (GE Healthcare);

„Sephadex G-25“ kolonėlė „PD-10“ (GE Healthcare);

Silikoninės žarnelės dializei (Roth)

Poliakrilamidinio baltymų gelio dažas: *PageBlue™ Protein Staining Solution* (Thermo Fisher Scientific);

Baltymų molekulinės masės standartas: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Mix* (Thermo Fisher Scientific);

Darbai buvo naudojami rekombinantiniai baltymai, sukurti Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje – inerolizinas (INY), pneumolizinas (PLY), vaginolizinas (VLY), streptolizinas O (SLO), intermedilizinas (ILY). Taip pat buvo naudojama karboanhidrazė XII (CAXII), sukurta Biotermodinamikos ir vaistų kūrimo skyriuje.

Darbe naudoti dr. Mildos Plečkaitytės sukurti pradmenys INY sekos padauginimui PGR. 3' pradmens 5' gale yra *NheI* endonukleazės atpažįstama seka (5'-G'CTAGC-3'). Likusi pradmens seka yra komplementari amplifikuojamos DNR 5' sekai:

3' pradmens seka: 5'-AGCTAGCAATACTGAGCCAAAAACAGCTAT-3'

5' pradmens 3' gale yra *XhoI* endonukleazės atpažįstama seka (5'-C'TCGAG-3'), už jos – transkripcijos pabaigos kodonas TAA. Likusi pradmens seka komplementari amplifikuojamos DNR 3' sekai:

5' pradmens seka: 5'-ACTCGAGTTAGTCATTTTTTACTTCTTCTTTG-3'

2.1.2. Buferiniai ir kiti tirpalai

Bakterijų cheminei transformacijai naudoti šie tirpalai:

LB terpė: 1% peptonas, 0,5% mielių ekstraktas, 1% NaCl;

Agarizuota LB: LB terpė su 2% agaro;

Na⁺ tirpalas: 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl, pH 7,5-8;

Ca²⁺ tirpalas: 100 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl, pH 7,5-8.

Bakterijų ląstelių lizatų paruošimui elektroforezei naudoti tirpalai:

PBS su 2 % natrio dodecilsulfato (NDS).

DNR elektroforezei naudoti šie tirpalai:

50 kartų koncentruotas Tris-acetato-EDTA (TAE) buferinis tirpalas (Thermo Fisher Scientific).

Imunofermentinei analizei naudoti šie tirpalai:

Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS) 10 kartų koncentruotas (1,37 M NaCl (Roth), 27 mM KCl (Roth), 81 mM Na₂HPO₄·12H₂O (Roth), 15 mM KH₂PO₄ (Roth), laikomas +4 °C, naudojamas skiestas 10 kartų distiliuotu vandeniu);

PBST (PBS su 0,1 % (w/v) *Tween-20* (Roth));

Plovimo tirpalas (PBST:H₂O, 1:1);

Imobilizacijos buferinis tirpalas (0,05 M Natrio karbonato buferinis tirpalas, pH 9,5, laikomas +4 °C);

Blokavimo tirpalas (10 kartų koncentruotas *Roti®-Block*(Roth), naudojamas skiestas 10 kartų distiliuotu vandeniu);

Baltymų elektroforezei denatūruojančiomis sąlygomis buvo naudoti šie tirpalai:

30 % akrilamido-bisakrilamido tirpalas (30 % (w/v) akrilamido (Sigma) ir 0,8 % (w/v) N,N'-metilenbisakrilamido (Sigma), laikomas +4 °C temperatūroje, tamsoje, neilgiau kaip 30 dienų);

1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8) buferinis tirpalas (laikomas +4 °C temperatūroje, tamsoje, neilgiau kaip 30 dienų);

0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8) buferinis tirpalas (laikomas +4 °C temperatūroje, tamsoje, neilgiau kaip 30 dienų);

10 % Natrio dodecilsulfato (NDS (Roth)) tirpalas (laikomas kambario temperatūroje);

10 % Amonio peroksosulfato (APS (Fluka)) tirpalas (naudojamas pagaminimo dieną);

Baltymų elektroforezės buferinis tirpalas (TRIS-Gly-NDS) 10 kartų koncentruotas (247 mM TRIS (Sigma), 1,92 M glicino (Roth), 35 mM NDS (Roth), pH 8,3-8,6, tirpalas naudojamas praskiestas 10 kartų);

12 % skiriamasis gelis (9,825 ml (1 geliui 4,9 ml tirpalo): 4 ml akrilamido-bisakrilamido, 2,5 ml TRIS-HCl pH 8,8, 100 µl 10 % NDS, 3,17 ml dej. H₂O, 50 µl 10 % APS, 5 µl TEMED);

4 % koncentruojantis gelis (5 ml (1 geliui 2,3 ml tirpalo): 670 µl akrilamido-bisakrilamido, 1,25 ml TRIS-HCl pH 6,8, 50 µl 10 % NDS, 3 ml dej. H₂O, 25 µl 10 % APS, 5 µl TEMED);

Baltymų mėginių užnešimo buferinis tirpalas: „Lane Marker Reducing Sample Buffer (5X)“ (Thermo Fisher Scientific);

Imunoblotinge buvo naudojami šie tirpalai:

Baltymų pernešimo buferinis tirpalas (TRIS-Gly) (25 mM TRIS (Sigma), 150 mM glicino (Roth));

Blokavimo tirpalas (2 % (w/v) pieno miltelių ištirpinta PBS).

Chlornaftolio tirpalas (1 tabletė 4-chlornaftolio tirpinama 10 ml metanolio; Membranos ryškinimui naudojamas tirpalas: 10 ml PBS, 2 ml chlornaftolio ištirpinto metanolyje, 30 μ l H_2O_2).

Antikūnų gryninime ir konjugavime naudoti šie tirpalai:

Užnešimo/plovimo tirpalas (1,5 M glicino, 3 M NaCl, pH 8,9);

Eliucijos tirpalas (100 mM glicino, pH 3,0);

1 mM Natrio acetatinis buferinis tirpalas (pH 4,5);

0,2 M Natrio karbonatinis buferinis tirpalas (pH 9,5);

0,01 M Natrio karbonatinis buferinis tirpalas (pH 9,5);

0,2 M Natrio perjodato tirpalas;

4 mg/ml Natrio borhidrido tirpalas;

Hemolizės tyrimams buvo naudoti šie tirpalai:

Buferinis tirpalas 35 mM NaCl, 125 mM Na_2HPO_4 , pH privedamas su ledine acto rūgštimi (4,5, 5,4, 6,8 pH).

Terpių sudėtys:

Hibridomų ir Sp2/0 ląstelių augimo terpė: DMEM terpė (Biochrom) su 2 mM L-glutamino (Roth), 200 μ g/ml gentamicino (Roth), 10-15 % (v/v) fetalinis veršiuko serumas (FBS) (Biochrom).

Neseruminė terpė: DMEM terpė (Biochrom) su 2 mM L-glutamino (Roth), 200 μ g/ml gentamicino (Roth).

HAT terpė: augimo terpė su HAT (Sigma).

HT terpė: augimo terpė su HT (Sigma).

Ląstelių šaldymo terpė (10 % (v/v) DMSO (dimetilsulfoksidas) ištirpintas FBS (Biochrom)).

2.1.3. Eksperimentiniai gyvūnai ir ląstelės

Eksperimentams buvo naudojamos BALB/c linijos pelės (Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto Vivariumas). Pelių imunizavimas ir eutanazija stuburo slankstelių dislokavimo būdu buvo atliekami asmens, turinčio FELASA reikalavimus atitinkantį sertifikatą dirbti su laboratoriniais gyvūnais.

Rekombinantinį ineroliziną koduojančių vektorių kūrimui ir jų raiškai naudoti *Escherichia coli* DH5α ir DE3 kamienai (Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos institutas Imunologijos ir ląstelės biologijos skyrius).

Hibridomų kūrimui naudota Sp2/0 ląstelių linija, nesintetinti imunoglobulinų. Šios ląstelės turi hipoksantinguaninfosforiboziltransferazės geno mutaciją, todėl neauga selektyvioje HAT terpėje (Shulman *et al.* 1978).

Hemolizės testui naudoti žmogaus eritrocitai. Kraujas surinktas iš sveiko savanorio venos.

2.1.4. Prietaisai ir tyrimo priemonės

CO₂ inkubatoriai „Galaxy R“ (RS Biotech), „MIDI 40“ (Thermo Scientific);

Vienkanaliai, 8- ir 12-kanaliai dozatoriai (Thermo Scientific, Eppendorf, Finnpiette Campus);

0,5 ml, 1,5 ml ir 2 ml mėgintuvėliai (Eppendorf);

Vienkartiniai dozatorių antgaliai (200 µl, 1 ml, 5 ml, 10 ml) (Nerbe Plus);

Laminarinis boksas „MSC-Advantage™“ (Thermo Scientific);

Šaldytuvai: -70 °C , -20 °C, +4 °C;

Vandens termostatas „Mettler“ (Thermo Fisher Scientific);

Šaldanti centrifuga „5424R“ (Eppendorf);

Goriajevo ir Buerker ląstelių skaičiavimo kameros (Sigma);

Plastikiniai loveliai (Titertek);

Audinių kultūroms skirti indai: 6, 24 ir 96 šulinėlių plokštelės, 25 cm² ir 75 cm² flakonai (TPP);

Kriokonservavimo ampulės (1,5-2,0 ml) (Nunc);

Purtyklė bakterijų auginimui „Certomat IS“ (B. Braun Biotech International);

Vorteksas (Fisher Scientific);

Termocikleris „2720“ (Applied Biosystems);

Ultragarsinis homogenizatorius „CY-500“ (J. P. Selecta);

Elektros šaltinis elektroforezei (Biometra);

Mėgintuvėlių šildymo įrenginys (Hettich);

Plokštelės imunofermentinei analizei „MaxiSorp“ (Nunc);

Plokštelės imunofermentinei analizei (Nerbe plus);

Spektrofotometras plokštelėms „Multiskan GO™“ (Thermo Scientific);

Purtyklė plokštelėms – „Titertek“ (Flow Laboratories);

Polivinildifluorido (PVDF) membrana (Roth);

Imunoblotingo popierius (Whatman);

Spektrofotometras „NanoDrop“ (Thermo Scientific);

Programinė įranga: „OriginPro 8.5“ (OriginLab), „GNU Image Manipulation Program“ (<http://gimp.org>).

2.2. Metodai

2.2.1. Genų inžinerijos metodai

2.2.1.1. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) INY DNR sekų pagausinimui

INY DNR be signalinės sekos padauginamos polimerazinės grandininės reakcijos metodu (PGR). PGR vykdoma galutiniame 25 µL tūryje. Mišinį sudaro *Phusion* polimerazės PGR mišinys *PCR Master Mix*, skiestas 2 kartus vandeniu, su 0,4 µM 3' pradmens, 0,4 µM 5' pradmens, 3 µL DNR matricos ir vandens iki 25 µL tūrio. DNR matrica gauta iš moterų lyties

takų ėminio (leidimas atlikti biomedicininį tyrimą Nr. 158200-13-697-223, 2013-11-12), išgryninus genominę DNR rinkiniu *GeneJET Genomic DNA purification Kit*. Reakcijos režimas 10 s 98 °C, 30 ciklų: 2 s 98 °C, 30 s 60 °C, 30 s 77 °C; užbaigiama 1 min 72 °C. PGR produktai analizuojami 1 % agarozės gelyje, elektroforezė vykdoma esant 125 V įtampai. Gelis dažomas etidžio bromido tirpalu.

2.2.1.2. Rekombinantinio klonavimo vektoriaus konstravimas

PGR metu pagausinta INY DNR seka iš PGR mišinio įklonuojama į pJET1.2/blunt klonavimo vektorių, naudojant rinkinį *CloneJET PCR Cloning Kit*. Polimeraze *Phusion* pagausinta INY DNR seka yra bukais galais, įvedimui į pJET1.2/blunt vektorių naudojama T4 DNR ligazė. Sukonstruotu pJET/INY vektoriumi transformuojamos *E. coli* DH5α kamieno ląstelės. Transformuotos ląstelės išsėjamos ant agarizuotos LB terpės lėkštelėse su ampicilinu (100 µg/mL) ir auginamos +37 °C per naktį. Teigiamos kolonijos atrenkamos PGR pagausinant tikslinio fragmento DNR, į PGR mišinį užnešant bakterijų kolonijos nuo kilpelės. PGR mišinio sudėtis: *DreamTaq* DNR polimerazės *Green* buferinis tirpalas skiestas 10 kartų, su 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 µM 5' pradmens, 0,4 µM 3' pradmens, 1,25 vieneto *DreamTaq* DNR polimerazės, ir vandens iki galutinio 25 µL tūrio. Reakcijos režimas yra 3 min 94 °C, 30 ciklų: 30 s 94 °C, 30 s 60 °C, 1 min 72 °C; užbaigiama 10 min 72 °C. Teigiamų kolonijų plazmidinė DNR išgryninama iš naktinės kultūros *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* rinkiniu ir saugoma -20 °C.

2.2.1.3. DNR sekoskaita

Rekombinantinis klonavimo vektorius pJET/INY analizuotas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto DNR Sekoskaitos centre. Tiriamosios DNR seka nustatyta automatinio 16 kapiliarų genetiniu analizatoriumi 3130xl (Applied Biosystems), kuriuo atliekama fluorescentiniais dažais žymėtų DNR fragmentų elektroforezė, jų detekcija lazeriu ir kompiuterinė analizė.

2.2.1.4. Rekombinantinio raiškos vektoriaus konstravimas

Rekombinantinis raiškos vektorius sudaromas iš *NheI* ir *XhoI* endonukleazėmis kirptų pET28a(+) ir pJET/INY vektorių. Reakcijos mišinys susideda iš 2 µg pET28a(+) arba 1 µg pJET/INY vektoriaus, 4 µL *FastDigest* buferinio tirpalo, po 1 µl (10 U/µL) endonukleazių *NheI* ir *XhoI*, ir vandens iki galutinio 40 µL tūrio. Reakcija vykdoma 30 min +37 °C ir stabdoma 5 min +65 °C. Produktai frakcionuojami elektroforezės būdu 1 % agarozės gelyje.

Iškirptų DNR fragmentų išgryninimui iš 1 % agarozės gelio naudojamas *GeneJET Gel Extraction Kit* rinkinys. Paruoštos pET28a(+) plazmidės ir fragmento DNR sujungimo reakcijos mišinį sudaro pET28a(+) ir fragmento DNR santykiu 1:2-1:5, *T4* DNR ligazės buferinis tirpalas, 1 μ L *T4* DNR ligazės (5 U/ μ L) ir vanduo iki galutinio 20 μ L tūrio. Reakcija vykdoma +4 °C per naktį. Rekombinantiniais pET28/INY vektoriais transformuojamos *E. coli* kamieno DH5 α ląstelės, skirtos padauginti rekombinantinio raiškos vektoriaus kiekiui. Teigiamos kolonijos atrenkamos PGR padauginant tikslinio fragmento DNR ir elektroforeze 1 % agarozės gelyje. Išgryninti raiškos vektoriai papildomai patikrinami DNR restrikcijos analize. DNR restrikcijos analizė atliekama pagal pasirinktų restrikcijos endonukleazų gamintojo rekomendacijas.

2.2.1.5. DNR restrikcijos analizė

pET28/INY vektorių DNR restrikcijos analizė atlikta naudojant tokias restrikcijos endonukleazes, kad po reakcijos DNR produktų ilgiai parodytų, ar INY DNR fragmentas į vektorių įsistatęs reikiama kryptimi. Visos reakcijos atliktos pagal gamintojo rekomendacijas. Rekombinantinis pET28/INY vektorius naudojamas trijose skirtingose reakcijose su endonukleazėmis *NheI*, *SpeI* ir *SspI*. Įvykus reakcijai mišiniai frakcionuojami 1 % agarozės gelyje. Tinkamai įsistatęs INY DNR fragmentas pET28-INY vektoriuje po inkubacijos su endonukleazėmis sudarytų trumpesnio ilgio produktus. Inkubuojant su *NdeI* susidaro 6763 bp, su *SpeI* – 6367 bp ir 396 bp, su *SspI* – 5238 bp, 957 bp ir 568 bp produktai.

2.2.1.6. *E. coli* bakterijų transformacija

E. coli DH5 α ir DE3 kamienų ląstelės auginamos 5 mL LB terpės 2-2,5 h, +37 °C, 220 aps./min, augimą stabdant lede. Ląstelės centrifuguojamos 5 min 3000 aps./min +4 °C, nusėdusios ląstelės suspenduojamos 5 mL Na⁺ tirpalo, inkubuojamos +4 °C 5 min ir centrifuguojamos 10 min 3000 aps./min +4 °C. Nupylus supernatantą ląstelės suspenduojamos 3 mL Ca²⁺ tirpalo, inkubuojamos +4 °C 30 min, nucentrifugavus 5 min 3000 aps./min supernatantas nupilamas. Ląstelės suspenduojamos likusiame tirpale, laikoma lede.

Transformacijai imama 50 μ L kompetentinių ląstelių ir 5 μ L ligato DH5 α arba 1 μ L ligato DE3 kamieno ląstelėms. Mišinys laikomas lede 30 min, inkubuojama 1,5 min +42 °C, 2 min lede. Ant mišinio užpilama 1 mL LB terpės, inkubuojama 30 min +37 °C. Mišinys centrifuguojamas 5 min 3000 aps./min, supernatantą nupylus ląstelės išsėjamos į 2 agarizuotos LB terpės lėkšteles su ampicilinu (100 μ g/mL) ir auginamos +37 °C per naktį.

2.2.1.7. INY sintezė pET raiškos sistemoje

E. coli DE3 kamieno bakterijų, transformuotų rekombinantiniu pET28/INY vektoriumi, kultūra auginama 5 mL LB terpės su ampicilinu 2,5-3 h +37 °C 220 aps./min. Prieš baltymų sintezės indukavimą paimamas 1 mL ląstelių kultūros, nucentrifuguojama 5 min 3000 aps./min, supernatantas nusiurbiamas, ląstelės saugomos -20 °C ir naudojamos ląstelių lizato paruošime. INY geno raiška indukuojama IPTG, kuris blokuoja *lac* operatoriaus represorių LacI. Į bakterijų kultūrą pripilama IPTG iki galutinės 0,1 mM koncentracijos ir auginama 2 h +37 °C 220 aps./min. Paimamas dar vienas ląstelių mėginys ląstelių lizato paruošimui.

Surinktų ląstelių kultūrų lizatai naudojami baltymų elektroforezėje denatūruojančiomis sąlygomis. Ląstelės suspenduojamos 40 µL PBS su 2 % SDS ir inkubuojama 10 min 100 °C. Į mišinį įdedama 10 µL *5X Reducing Sample Buffer* ir inkubuojama 10 min 100 °C. Paruoštų lizatų į gelio šulinėlį nešama po 4-6 µL. Baltymų sintezės indukcija IPTG įvertinama poliakrilamidiniame gelyje lyginant INY molekulinę masę atitinkačios juostelės dydį mėginiuose be IPTG ir su IPTG. Atliekamas imunoblotingas, naudojant antikūnus prieš heksahistidino žymę.

2.2.1.8. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis.

Baltymų elektroforezei denatūruojančiomis sąlygomis naudoti dvisluoksniai poliakrilamido geliai su natrio dodecilsulfatu, sudaryti iš 12 % apatinio (skiriamąjo) ir 4 % viršutinio (koncentruojamojo) gelio. Surenkama elektroforezės kasetė, į ją supilami sumaišyti skiriamąjo gelio komponentai (galutinis tūris 4,9 mL) ir gelio paviršius lyginamas 1 mL 70 % izopropanolio sluoksniu. Inkubuojama 20 min kambario temperatūroje, kol skiriamasis gelis sustingsta. Skiriamajam geliui sustingus, paaviršius nusausinamas ir užpilami sumaišyti koncentruojančio gelio komponentai (galutinis tūris 2,9 mL). Šulinėliai formuojami įstatant šulinėlių trafaretus. Koncentruojančio gelio sluoksnis sustingsta inkubuoiant 40 min kambario temperatūroje. Sustingus geliui, nuo kasečių pašalinamos guminės tarpinės, kasetės įstatomos į elektroforezės aparatą, užpilama elektroforezės buferinio tirpalo, ištraukiami šulinėlių trafaretai ir užnešami mėginiai po 1-2 µg baltymų takelį, 4-15 µL tūryje. Prieš atliekant elektroforezę baltymų mėginiai sumaišomi su *5X Reducing Sample Buffer* ir inkubuojami 10 min +100 °C. Elektroforezė vykdoma 80 V įtampoje, kol baltymai pereina į skiriamąjį gelį, po to tęsiama 140-200 V įtampoje. Po elektroforezės gelis įmerkiamas į stiklinę su dažu ir inkubuojamas 1,5 min 800 W mikrobangų krosnelėje. Nupylus dažą, gelis plaunamas

distiliuotu vandeniu, inkubuojant 800W mikrobangų krosnelėje. Keičiamas vanduo, kartojamas plovimas iki norimo ryškumo ir skenuojama.

2.2.1.9. Bakterinių ląstelių ardymas ultragarsu

E. coli bakterijų DE3 kamieno ląstelės, transformuotos rekombinantiniu vektoriumi pET28/INY, lizuotos naudojant ultragarsinį homogenizatorių („CY-500“). 150 µL naktinės kultūros pridėta į 30 mL LB terpės su kanamicinu (50 µg/mL), auginta 37 °C 220 aps./min greičiu 2-2,5 h Baltymų sintezė indukuota pridedant IPTG iki galutinės koncentracijos 0,5 mM ir inkubuojama 37 °C 220 aps./min greičiu. Praėjus 2 h, kas 30 min paimamas ląstelių suspensijos mėginys ir matuojama šviesos sugertis 600 nm šviesos bangos ilgyje. Ląstelės auginamos iki $OT_{600}=1$, paimamas 1 mL mėginys ląstelių lizato paruošimui. Ląstelių suspensija centrifuguojama 5 min 3000 aps./min, nupilamas supernatantas. Ląstelių nuosėdos suspenduojamos 3 mL PBS su serino proteazių inhibitoriumi PMSF (galutinė koncentracija 1mM) ir 1-2 µL antiputokšlio. Laikoma leduose, ląstelės lizuojamos ultragarsiniu homogenizatoriumi. Lizatas centrifuguojamas 5 min 3000 aps./min. Atskiriama skysta frakcija nuo kietos, paimami mėginiai baltymų elektroforezei.

2.2.2. Imunologiniai tyrimo metodai.

2.2.2.1. Imunofermentinė analizė

Imunofermentinė analizė (IFA) skirta peptidų, baltymų ar kitų molekulių aptikimui mėginiuose. Pagrindinis IFA principas – specifiška antikūno sąveika su antigenu ir antikūno-antigeno komplekso susidarymas. Darbe buvo naudojami keturi IFA variantai: netiesioginė, tiesioginė, konkurencinė ir dviepitopė.

Netiesioginės IFA metu antigenai sorbuojami plokščiadugnėse 96 šulinėlių plokštelėse. Antigenai (3 ng/µL) imobilizacijos buferiniame tirpale išpilstomi į plokšteles po 50 µL į šulinėlį. Inkubuojama +4 °C 16 h arba +37 °C 1 h. Laisvas šulinėlių paviršius blokuojamas 150 µL 10 kartų distiliuotu vandeniu skiestu *Roti*[®]-*block*, inkubuojama 1 h ant purtyklės. Blokavimo tirpalas išpurtomas, plokštelių šulinėliai praplaunami distiliuotu vandeniu. Po blokavimo užpilami tiriamieji mėginiai (antikūnai hibridomų augimo terpėje ar pelių kraujas). Inkubuojama kambario temperatūroje 1 h ant purtyklės. Tiriamieji mėginiai išpurtomi, 3 kartus praplaunama PBST:H₂O 1:1 tirpalu, 2 kartus distiliuotu vandeniu. Antikūno-antigeno kompleksams aptikti naudojami ožkos antikūnai prieš pelės IgG žymėti krienų peroksidaze. Antriniai antikūnai skiedžiami PBST pagal gamintojo rekomendacijas, išpilstoma po 50 µL į

šulinėlį. Inkubuojama 1 h ant purtyklės. Išpurčius antrinius antikūnus 3 kartus plaunama PBST:H₂O 1:1 tirpalu ir 2 kartus distiliuotu vandeniu. Užpilama 50 µL krienų peroksidazės substrato TMB, ryškinama iki 15 min Reakcija stabdoma 25 µL 3,6% H₂SO₄ tirpalu. Plokštelių spektrofotometru matuojama absorbcija 450 nm bangos ilgyje.

Tiesioginė IFA naudota nustatyti antikūno, žymėto fermentino žyme, darbiniam skiedimams. Viskas atliekama kaip ir netiesioginės IFA atveju, bet po blokavimo iškart užpilami antikūnai žymėti krienų peroksidaze. Darbiniai skiedimai pasirenkami iš OT₄₅₀ priklausombės nuo antikūnų mėginio skiedimo grafiko.

Konkurencinė IFA leidžia įvertinti, kaip antikūnai konkuruoja dėl sąveikos su antigeno epitopais. Po blokavimo šulinėliai užpilami 50 µL antikūnų hibridomų augimo terpėje ir inkubuojami 1 h kambario temperatūroje. Nepraplovus šulinėlių pripilama kito antikūno žymėto krienų peroksidaze ir inkubuojama 1 h. Toliau viskas vykdoma kaip netiesioginėje IFA. Konkurencija stebima tuose šulinėliuose, kur optinis tankis sumažėjęs, lyginant su kontroliniu šulinėliu, kuriame vietoj konkuruojančių antikūnų užpilta terpė. Rezultatai išreiškiami procentine konkurencija.

Dviepitopė IFA naudojama sudarinėjant rekombinantinio inerolizino (INY) kiekybines kalibracines kreives, kurias būtų galima panaudoti nustatant baltymo koncentraciją tiriamuosiuose mėginiuose. Šiame metode visų pirma imobilizuojamas vienas iš nekonkuruojančios poros MAk 10 µg/mL PBS tirpale po 50 µL į šulinėlį. Plokštelės paviršius blokuojamas, užpilama 100 µL tam tikros koncentracijos antigeno ir inkubuojama 1 h ant purtyklės. Sorbuoto antikūno prijungti antigenai atpažįstami optimalaus darbinio skiedimo MAk su krienų peroksidazės žyme, po 50 µL į šulinėlį. Ryškinama taip pat kaip ir kitais IFA metodais.

2.2.2.2. IFA rinkiniai

Monokloninių antikūnų klasės, poklasiai ir lengvųjų grandinių tipai nustatyti naudojant „BD PharmigenTM“ pelės imunoglobulinų izotipavimo IFA rinkinį. „MaxiSorp“ 96 šulinėlių plokštelėje 20 kartų PBS skiesti antikūnai prieš pelės antikūnų Fc fragmentus supilami po 50 µL į šulinėlį, inkubuojama 2 h + 37 °C. Šulinėlių laisvas paviršius blokuojamas PBS ištirtu 1 % BSA tirpalu, išpilstoma po 200 µL į šulinėlį. Inkubuojama 1 h kambario temperatūroje. Antikūnai skirtingų hibridomų augimo terpėse užpilami po 50 µL į šulinėlį, neigiama kontrolė

naudota seruminė ląstelių augimo terpė DMEM. Tolimesni žingsniai atlikti taip pat kaip ir netiesioginės IFA metodu.

2.2.2.3. Imunoblotingas

Atliekama baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis kaip aprašyta anksčiau. Baltymai poliakrilamidiniame gelyje pernešami ant PVDF membranos. Geliai ir filtriniai popieriai mirkomi baltymų pernešimo buferiniame tirpale. PVDF membranos pirmiausiai įmerkiamos į metanolį, o po to perkeliama į baltymų pernešimo buferinį tirpalą. Priemonėms išmirkus vykdomas pusiau sausas baltymų pernešimas ant PVDF membranos. Ant baltymų pernešimo katodo padedami išmirkę baltymų pernešimo buferyje filtrinio popieriaus lakštai, ant jų uždedamas PVDF membranos, gelis ir dar vienas filtrinio popieriaus lapas. Viskas iš viršaus prislegiama aparato anodiniu padu ir 1 h vykdomas baltymų pernešimas, esant 1 mA srovės stipriui į 1 cm² gelio. Po pernešimo membrana plaunama PBST ir blokuojama 2 % (w/v) pieno miltelių ištirpintų PBST per naktį +4 °C. Po blokavimo membrana plaunama 4 kartus PBST. Hibridomų augimo terpė su tiriamaisiais antikūnais skiedžiama 4-8 kartus 2 % (w/v) pieno miltelių ištirpintų PBST. Užpilama skiesta hibridomų augimo terpė, inkubuojama 1 h kambario temperatūroje ant purtyklės. Membrana plaunama 4 kartus PBST. Skiedžiamas antikūnų prieš pelės IgG žymėtų krienų peroksidaze tirpalas santykiu 1:4000 PBST su 2 % (w/v) pieno miltelių ir inkubuojama 1 h kambario temperatūroje. Po inkubacijos su antriniais antikūnais membrana plaunama 6 kartus PBST, 2 kartus inkubuoiant 5 min ant purtyklės. Ryškinama TMB substratu membranoms arba chlornaftolis, reakcija stabdoma perkeliant membraną iš ryškinimo tirpalo į vandenį. Membrana džiovinama ant filtrinio popieriaus ir skenuojama.

2.2.2.4. Antikūnų titro nustatymas imunizuotų pelių kraujo serume

Antikūnų titrai nustatomi netiesioginės IFA metodu, naudojant INY. Antigenai skiedžiami iki 5 µg/mL imobilizacijos buferiniame tirpale ir išpilstomi 96 šulinėlių plokščiadugnėse plokštelėse po 50 µL į šulinėlį. Imunizuotų pelių kraujas skiedžiamas PBST ir atliekami serijiniai skiedimai nuo 1:100 iki 1:72900, išpilstant po 100 µl mėginių į šulinėlį. Inkubuojama 1 h, antigeno-antikūno kompleksai aptinkami taip pat kaip ir netiesioginės IFA metodu.

2.2.3. Hibridomų ir monokloninių antikūnų kūrimas

Hibridomų kūrimas vyksta šiais etapais: BALB/c pelių imunizacija, ląstelių hibridizacija, atranka, klonavimas, sukurtų MAk specifiškumo antigenui tyrimas, klasių ir poklasių nustatymas, hibridomų (B limfocitų ir mielominių ląstelių hibridų) kriokonservavimas ir antikūnų gryninimas.

2.2.3.1. BALB/c pelių imunizavimas

Imunizuotos 8 savaičių BALB/c linijos pelės, auginamos Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto vivariume. Rekombinantiniu INY imunizuotos 3 pelės, atliekant podinę injekciją tris kartus kas 28 dienas. Kiekvienai imunizacijai naudota 50 µg antigeno pelei. Pirmos imunizacijos metu suleistas antigenas ištirpintas PBS ir lygiu tūriu sumaišytas su pilnu Freund adjuvantu. Antrosios imunizacijos metu suleistas antigenas ištirpintas PBS ir lygiu tūriu sumaišytas su nepilnu Freund adjuvantu. Trečiosios imunizacijos metu suleistas antigenas ištirpintas PBS. Prieš kiekvieną imunizaciją paimti kraujo mėginiai, užšaldyti -20 °C ir naudoti kraujo titro nustatymui. Imunizacijos atliktos žmogaus, turinčio leidimą dirbti su laboratoriniais gyvūnais.

2.2.3.2. Mielominės ląstelių linijos Sp2/0 kultivavimas

Hibridomų gavimui naudota Sp2/0 mielominių ląstelių linija. Ši pelių ląstelių linija nesintetina imunoglobulinų, hipoksantinguanosinfosforiboziltransferazės (HGPRT) genų mutacijas. Dėl HGPRT mutacijos jos žūsta HAT (hipoksantino, aminopterino ir timidino) tuinčioje terpėje. Sp2/0 mielominės ląstelės auginamos DMEM terpėje, turinčioje 9 % fetalinio veršiuko serumo. Iki hibridizacijos atgaivintos Sp2/0 ląstelės persėjamos 3 kartus. Persėjimo tikslas yra suliejimui naudoti gyvas, vienodo dydžio ląsteles logaritminėje augimo fazėje.

2.2.3.3. Hibridizacija

Surinktas imunizuotų pelių kraujas analizuotas IFA metodu, nustatytas antikūnų prieš INY kraujo titras. Imunizuota pelė, turinti didžiausią kraujo titrą, tris dienas prieš hibridizaciją dar kartą imunizuojama 50 µg INY ištirpintu PBS. Taip aktyvuojama blužnies ląstelių proliferacija.

Prieš suliejimą mielominės ląstelės surenkamos ir centrifuguojamos 5 min 200×g. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 30 mL niseruminės terpės. INY imunizuotos pelės peritoniniai makrofagai surenkami praplaunant niserumine DMEM terpe.

Blužnis steriliai pašalinama ir merkiama į nesoruminę DMEM terpę. Sutraiškoma blužnis, suspenduojama terpėje ir centrifuguojama 5 min 200×g. Blužnies ląstelių suspensija nupilama, ląstelės suspenduojamos 10 mL nesoruminės terpės. Mielominių ir blužnies ląstelių kiekis skaičiuojamas su Gorjajevo kamera. Suliejimui mielominės ir blužnies ląstelės sumaišytos santykiu 2:5. Ląstelės centrifuguotos 5 min 200×g. Supernatantas nupilamas, ląstelės maišomos 1 min su 1 mL PEG-4000 ir inkubuojama 2 min. Ant ląstelių suspensijos per 2 min užlašinama 10 mL nesoruminės terpės. Pripilama nesoruminės terpės iki 50 mL, centrifuguojama 5 min 200×g. Pašalinamas supernatantas, ląstelės suspenduojamos HAT praturtintoje DMEM terpėje su 15 % FBS. Supilami surinkti pelės peritoniniai makrofagai, išpilstoma į 96 šulinėlių plokštelę skirtas audinių kultūroms po 200 µL (212 tūkst. ląstelių) į šulinėlį.

Praėjus 7 ir 11 dienų po hibridizacijos keičiama hibridomų augimo terpė. Iš šulinėlių nusiurbiamas 100 µL terpės ir užpilama 120 µL ląstelių augimo terpės, turinčios HT (Sigma).

2.2.3.4. Makrofagų sluoksnio paruošimas

Hibridomų auginimą pagerina maitinančios ląstelės, išskiriančios tam tikrus citokinus, pvz. interleukiną-6, kuris skatina B ląstelių proliferaciją, diferenciaciją ir antikūnų sekreciją (Zhu Y, *et al.*, 1993). Šiame darbe naudotas pelės peritoninių makrofagų sluoksnis. Makrofagai išskiria citokinus, fagocituoja ląstelių nuolaužas ir kitas atliekas, pagerindami hibridomų augimą.

Peritoniniai makrofagai surenkami iš pelės pilvo ertmės. Pradūrus pelės pilvaplėvę pilvo ertmė praplaunama 10 mL nesoruminės DMEM terpės ir surenkama į sterilų mėgintuvėlį. Centrifuguojama 5 min 200×g, supernatantas pašalinamas, ląstelės suspenduojamos 3 mL seruminės DMEM terpės. Ląstelių kiekis skaičiuojamas Gorjajevo kamera. Ląstelės atskiedžiamos serumine DMEM terpe iki reikiamos koncentracijos ir išsėjamos 1000 ląstelių į 0,5 cm² tankiu. Makrofagai kultivuojami CO₂ inkubatoriuje 0,5h, prieš užpilant hibridomas. Paruošta makrofagų kultūra naudojama hibridomų kultivavimui.

2.2.3.5. Hibridomų atranka ir klonavimas.

Hibridomos klonuojamos, siekiant iš vienos ląstelės užauginti monokloninę hibridomų kultūrą. Hibridomos klonuojamos 96 šulinėlių plokštelėse su makrofagų sluoksniu. Hibridomų ląstelės suspenduojamos pradiniam šulinėlyje ir perkeliamos į plokštelę su makrofagų sluoksniu. Atliekami serijiniai skiedimai, kol šulinėliuose lieka tik po vieną

hibridomų ląstelę. Išklonuotos hibridomos (klonai) auginamos inkubatoriuje 5-7 dienas. Klonams išaugus, jų kiekis šulinėliuose įvertinamas mikroskopu. Tuose šulinėliuose, kur matoma homogeniška ląstelių masė išaugusi iš vienos ląstelės, antikūnų sekrecija įvertinama netiesioginės IFA metodu. Nustatoma, kurie klonai sekretuoja antikūnus prieš reikiamą antigeną.

Hibridomų klonų linija laikoma stabili, jei visi reklonai sintetina specifinius antikūnus. Turint nestabilų hibridomos kloną, atrenkamas reklonas, kuris auga greičiausiai ir kurio augimo terpėje sekretuojami specifiški antikūnai prieš antigeną. Klonavimas kartojamas, kol gaunamas stabilus hibridomos klonas. Stabilių hibridomų klonų, sintetinančių specifinius antikūnus, ląstelės perkeliama į audinių kultūroms skirtas 24 šulinėlių plokšteles, kultivuojamos ir užšaldomos.

2.2.3.6. Ląstelių kriokonservavimas

Hibridomų šaldymas atliekamas fetalinio veršiuko serume, su 10 % kriokonservanto dimetilsulfoksido (DMSO). DMSO yra medžiaga, apsauganti ląsteles nuo šalčio poveikio krentant šaldymo terpės temperatūrai. Ši medžiaga taip pat yra toksiška ląstelėms, todėl naudojama kuo mažesnė efektyvi DMSO koncentracija. Hibridomų ląstelės gyvybingumas išlieka didesnis, jei šaldoma 1-2 °C per minutę, naudojama šaldymo terpė yra 4 °C temperatūros, šaldymo terpėje suspenduotos hibridomų ląstelės kuo greičiau įdedamos į – 70 °C šaldiklį.

Hibridomų ląstelių, kurių konfluencija yra daugiau nei 90 %, šulinėlių turinys surenkamas į atskirą mėgintuvėlį. Ląstelių suspensija centrifuguojama 5 min 200×g. Supernatantas pašalinamas, ląstelių nuosėdos suspenduojamos 700 µL šaldymo terpės su 10 % DMSO ir perkeliama į kriokonservavimo ampules. Ampulės įdedamos į polistirolo dėžutes šaldymui ir tik tuomet perkeliama į – 70 °C šaldytuvą. Taip ląstelės šaldomos palaipsniui, krentant temperatūrai 1-2 °C/min Ilgam saugojimui ampulės su užšaldytais ląstelėmis perkeliama į skysto azoto diuarus.

2.2.3.7. Antikūnų gryninimas iš hibridomų augimo terpės.

Antikūnai gryninami atliekant afiniškumo chromatografiją. Naudojant šį metodą antikūnai taip pat yra sukonzentruojami buferiniame tirpale. Afiniškumo chromatografijoje naudojami sefarozės rutuliukai su baltymu A, kuris sąveikauja su antikūnų Fc fragmentu. Gryninimas atliekamas naudojant kolonėles, į kurias užnešama sefarozės su baltymu A. Kolonėlė prieš gryninimą kalibruojama: užpilamas 10 kartų didesnis nei sefarozės su baltymu

A tūris užnešimo/plovimo buferinio tirpalo. Hibridomų augimo terpė sumaišoma su užnešimo/plovimo buferiniu tirpalu santykiu 1:2 ir pilama į kolonėlę. Po chromatografijos kolonėlė plaunama 20 kartų didesniu nei sefarozės su baltymu A tūriu užnešimo/plovimo buferiniu tirpalu. Tuomet vykdoma eliacija: pilama po 200-300 μ L eliacijos tirpalo, pratekėjęs pro kolonėlę skystis surenkamas į mėgintuvėlius su 30-40 μ L 1 M Tris-HCl pH 8 tirpalu. Nustatoma imunoglobulinų koncentracija spektrofotometru „NanoDrop“. Didžiausias imunoglobulinų koncentracijas turinčios frakcijos supilamos į silikonines žarneles dializei ir dializuojama PBS tirpale per naktį +4 °C. Išgryninti antikūnai naudojami konjugavimui su krienų peroksidaze.

2.2.3.8. Antikūnų konjugavimas su krienų peroksidaze.

IFA dažnai naudojami antikūnai žymėti fermentais, reaguojančiais su chromogeniniais substratais, tokiu būdu sukuriantys spektrofotometru išmatuojamą analizinį signalą. Šiame darbe sukurti monokloniniai antikūnai konjuguojami su krienų peroksidaze, naudojant natrio perjodatinį metodą. Šiuo metodu krienų peroksidazės monosacharidų molekulės oksiduojamos natrio perjodatu, susidariusios aldehido grupės susijungia su antikūnų aminorūgščių amino grupėmis. Susidarę aldiminai (Šifo bazės) redukuojami natrio borhidridu (Wisdom, 2005).

Išgryninti antikūnai dializuojami 10 mM natrio karbonato buferiniame tirpale per naktį +4 °C. Pasiruošiami krienų peroksidazės (5 mg/mL), natrio perjodato (0,2 M) ir natrio borhidrido (4 mg/mL) tirpalai. Pridedama natrio perjodato į krienų peroksidazės tirpalą iki galutinės 40 mM koncentracijos. Inkubuojama kambario temperatūroje 20 min tamsoje. Aktyvuota krienų peroksidazė nudruskinama kolonėlėje „PD-10“ su „Sephadex G-25“. Į antikūnų tirpalą pridedama aktyvuotos krienų peroksidazės masės santykiu 1:1 ir natrio karbonato buferinio tirpalo iki galutinės 20 mM koncentracijos. Inkubuojama 2 h kambario temperatūroje tamsoje. Į mišinį pridedama natrio borhidrido iki galutinės 0,2-0,4 mg/mL koncentracijos, inkubuojama 2 h +4 °C. Mišiniai dializuojami tamsoje PBS tirpale +4 °C temperatūroje per naktį. Po dializės į antikūnų, žymėtų krienų peroksidaze, tirpalus pripilama BSA iki galutinės 2 % koncentracijos ir glicerolio iki galutinės 50 % koncentracijos. Laikoma -20 °C.

2.2.3. Hemolizės testas

Žmogaus kraujas surinktas iš sveiko suaugusiojo savanorio venos į vakuuminį mėgintuvėlį su heparino sulfatu. Eritrocitai atskirti centrifuguojant 5 min 200×g ir suspenduoti steriliame, kambario temperatūros buferiniame tirpale (35 mM Na₂HPO₄, 125

mM NaCl, pH 4,5-6,8). Hemolizės reakcija vykdyta 1 mL tūryje. Nustatyta optimali eritrocitų koncentracija suspensijoje. Tam tikslui skirtingos eritrocitų koncentracijos tirpalai lizuoti dejonizuotame vandenyje ir matuojama laisvo hemoglobino šviesos sugertis 415 nm bangos ilgyje spektrofotometru. Pasirinktas eritrocitų suspensijos skiedimas, kuriam esant $OT_{415} = 2,5$. INY citolizinio aktyvumo kreivė sudaryta matuojant OT_{415} priklausomybę nuo INY kiekio reakcijos mišinyje. Tolesniems eksperimentams naudojamas mažiausias kiekis INY, kuris pilnai lizuoja eritrocitus. Išgryninti antikūnai atskiedžiami iki 10 ng/μL 4,5 pH buferiniu tirpalu. Į reakcijos mišinį pridedama MAk, inkubuojama 30 min kambario temperatūroje su INY, tuomet pridedama eritrocitų suspensijos ir inkubuojama dar 30 min kambario temperatūroje. Mėginiai centrifuguojami 5 min 200×g, matuojamas OT_{415} . Rezultatai išreiškiami procentine hemolize, pagal formulę:

$$\text{Procentinė hemolizė} = \frac{OT_{m\acute{e}ginio} - OT_{buf.tirp.}}{OT_{vandens} - OT_{buf.tirp.}} \times 100 \%$$

3. Eksperimentų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Rekombinantinio inerolizino sintezė *E. coli*.

Rekombinantinio inerolizino (INY) sintezei naudojama *E. coli* pET raiškos sistema. Visų pirma PGR pagausinta DNR seka įvedama į klonavimo vektorių ir patikrinama sekoskaitos būdu. Tuomet naudojant restrikcijos endonukleazes iškerpama tikslinį baltymą koduojanti DNR seka ir įklonuojama į raiškos vektorių.

PGR naudoti pradmenys pateikti 3.1 lentelėje. DNR matrica naudota rinkiniu *Genomic DNA Purification Kit* išskirta genomine DNR iš moters lyties takų ėminio, gauto iš Nacionalinės visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijos, DNR išskirta Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje (dr. M. Plečkaitytė).

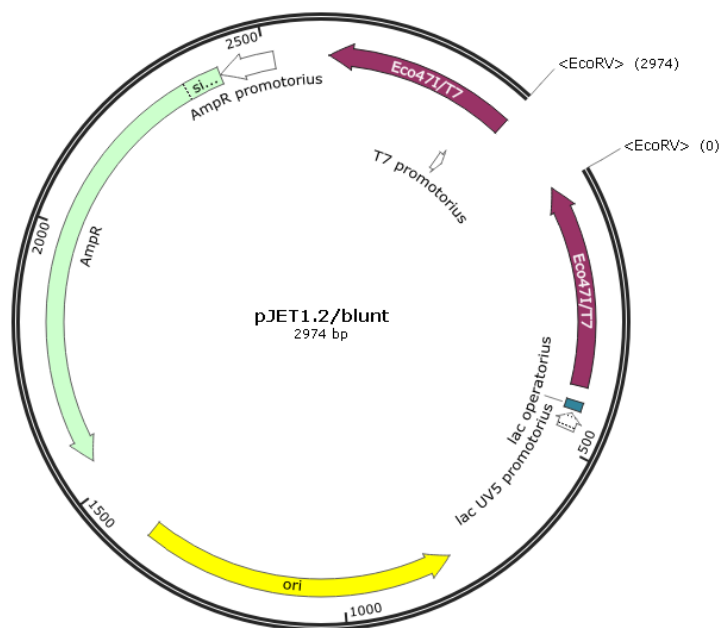
3.1 lentelė. Pradmenys naudoti INY DNR pagausinimui PGR metodu.

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka
INY_F	5'-AGCTAGCAATACTGAGCCAAAAACAGCTAT-3'
INY_R	5'-ACTCGAGTTAGTCATTTTTTACTTCTTCTTTG-3'

3.1.1. Klonavimo vektoriaus konstravimas

PGR pagausinta DNR seka įvesta į klonavimo vektorių pJET1.2/blunt (3.1 pav.) naudojant rinkinį *CloneJET PCR Cloning Kit* pagal gamintojo rekomendacijas. pJET1.2/blunt vektorius pasižymi atsparumo ampicilinui genu *ampR* ir *E. coli* ląstelėms mirtinu genu *eco47I/T7*, kurio seka pažeidžiama į vektorių įterpus DNR seką.

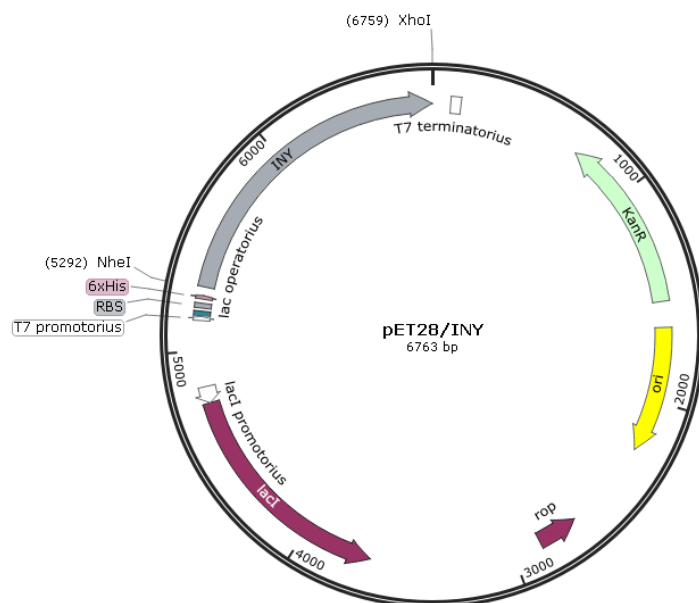
Sukonstruotu rekombinantiniu klonavimo vektoriumi pJET/INY transformuotos *E. coli* kamieno DH5α ląstelės. Įterpto DNR fragmento sekoskaita atlikta Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Sekoskaitos centre. Vektoriai, kuriose įterptos DNR sekos atitiko palyginamąją seką ir nepakito *NheI* ir *XhoI* restrikcijos endonukleazių atpažinimo sritys, naudoti raiškos vektoriaus konstravime.



3.1 pav. pJET1.2/blunt klonavimo vektorius. *ampR* – atsparumo ampicilinui genas, *eco47I/T7* – *E. coli* ląstelėms mirtinas genas.

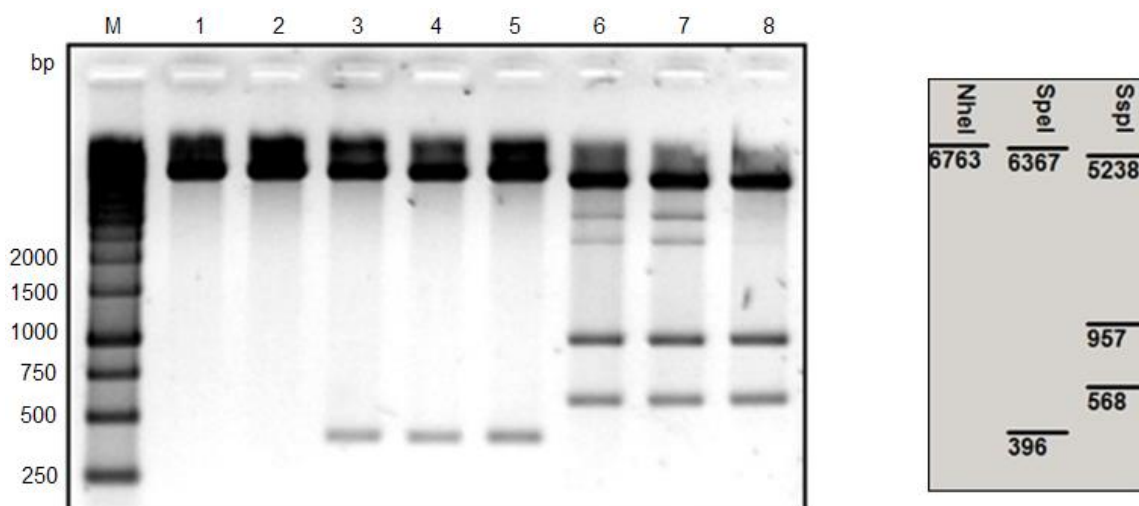
3.1.2. Raiškos vektoriaus konstravimas

Tikslinio baltymo sintezei naudojamas raiškos vektorius pET28a(+), turintis *T7* RNR polimerazės promotoriaus seką, atsparumo kanamicinui geną *kanR* ir laktoze indukuojamą tikslinio baltymo sintezę. INY DNR seka perkelta iš rekombinantinio klonavimo vektoriaus pJET/INY į raiškos vektorių pET28a(+) naudojant restrikcijos endonukleazių *NheI* ir *XhoI* atpažinimo sekas vektoriuose pJET/INY ir pET28a(+). Vektoriai pJET/INY ir pET28a(+) veikti restrikcijos endonukleazėmis *NheI* ir *XhoI*, susidarę produktai išgryninti iš 1 % agarozės gelio naudojant rinkinį *GeneJET Gel Extraction Kit*. Iškirpto INY DNR fragmento ir linearizuoto pET28a(+) grynumas patikrintas elektroforeze. Paruoštos pET28a(+) plazmidės ir INY DNR fragmento sujungimo reakcija atlikta naudojant *T4* DNR ligazę. Sukonstruota plazmidė (3.2 pav.) transformuotos *E. coli* kamieno DH5α ląstelės, kurias naudojant pagauginamas rekombinantinio vektoriaus pET28/INY kiekis. Užaugusios kolonijos tikrinamos PGR metodu ir frakcionuojant PGR produktus 1 % elektroforezės gelyje. Kolonijose, kuriose buvo rekombinantinis vektorius pET28/INY, PGR produktų elektroforezės gelyje matomas INY koduojančios DNR masės fragmentas. Iš teigiamų kolonijų naktinės kultūros išskiriama pET28/INY plazmidė rinkiniu *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*.



3.2 pav. pET28/INY raiškos vektorius. *kanR* – atsparumo kanamicinui genas. 6xHis – heksahistidino žymę koduojanti DNR seka. *rop* – baltymo, atsakingo už mažakopijinio vektoriaus kiekį ląstelėje, genas. RBS – ribosomos prisijungimo sritis.

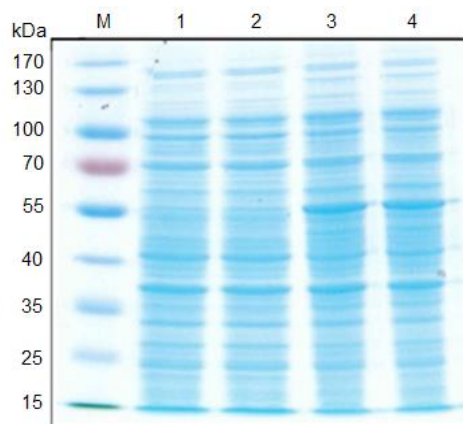
Atlikta sukonstruoto pET28/INY vektoriaus analizė restrikcijos endonukleazėmis *NheI*, *SpeI* ir *SspI* (3.3 pav.). Teoriškai apskaičiuotos vertės atitiko empiriškai gautas vertes, todėl INY DNR fragmentas vektoriuje įterptas reikiama kryptimi. Toks vektorius tinkamas naudoti INY baltymo sintezei *E. coli* ląstelėse, todėl juo transformuojamas *E. coli* kamieno DE3 ląstelės, turinčios T7 RNR polimerazę.



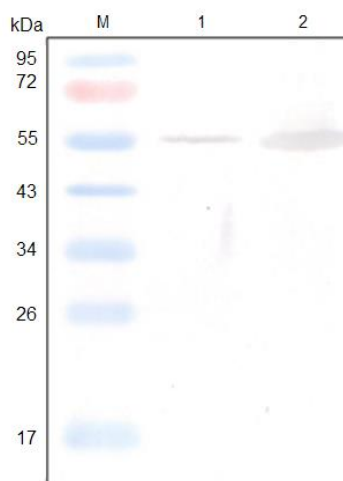
3.3 pav. pET28/INY vektoriaus analizė restrikcijos endonukleazėmis. Kairėje – empiriškai gauti rezultatai, dešinėje – *in silico* apskaičiuoti DNR fragmentų dydžiai. M – DNR ilgio standartas (*O' GeneRuler™ 1 kb DNA ladder*). 1-2 – pET28/INY veikta *NheI*. 3-5 – pET28/INY veikta *SpeI*. 6-8 – pET28/INY veikta *SspI*.

3.1.3. Rekombinantinio INY baltymo sintezė.

Rekombinantinio INY baltymo sintezė gauta *E. coli* kamieno DE3 ląstelėse, kurios transformuotos vektoriumi pET28/INY. Naktinė kultūra atskiesta 200 kartų ir auginta 2,5 – 3 h. Baltymų sintezė indukuota įpilant laktozės analogo IPTG iki galutinės koncentracijos 0,1 mM ir auginant dar 2 h. Tikslinio baltymo sintezė patikrinta ląstelių lizatų baltymų elektroforeze denatūruojančiomis sąlygomis (3.4 pav.) ir imunoblotingu (3.5 pav.), naudojant antikūnus prieš heksahistidino žymę. Tikslinio baltymo molekulinė masė apie 56 kDa, todėl iš elektroforezės ir imunoblotingo nuotraukų galima spręsti, jog rekombinantinio INY baltymo su heksahistidino žyme sintezė sėkmingai indukuota bakterijų raiškos sistemoje.



3.4 pav. Ląstelių lizatų baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis nuotrauka. M - baltymų molekulinės masės standartas (*PageRulerTM Prestained Protein Ladder*). 1-2 - *E. coli* kamieno DE3 ląstelių, transformuotų pET28/INY, lizatas. 3-4 - *E. coli* kamieno DE3 ląstelių, transformuotų pET28/INY, lizatas po indukcijos IPTG.



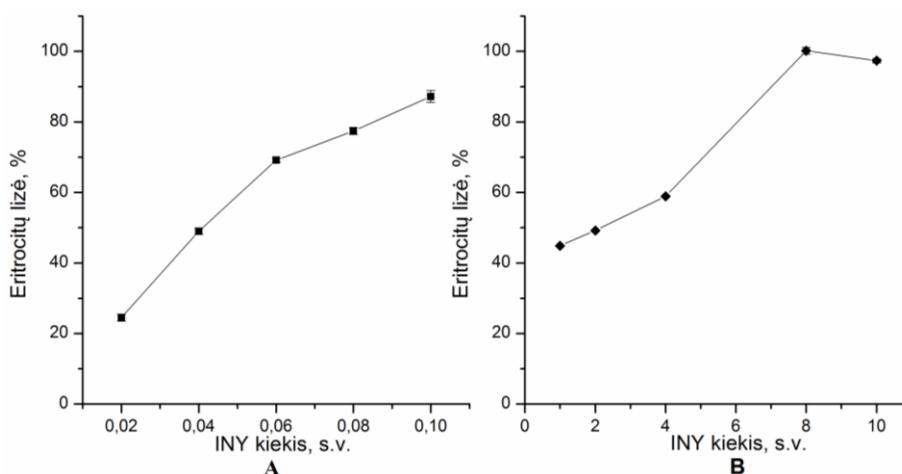
3.5 pav. Imunoblotingo su antikūnais prieš heksahistidino žymę nuotrauka. M - baltymų molekulinės masės standartas (*PageRulerTM Prestained Protein Ladder*). 1 - *E. coli* kamieno DE3 ląstelių, transformuotų pET28/INY, lizatas. 2 - *E. coli* kamieno DE3 ląstelių, transformuotų pET28/INY, lizatas po indukcijos IPTG.

Sintetinas tikslinis baltymas galėjo būti netirpus, todėl atlikta elektroforezė ir imunoblotingas naudojant ląstelių lizatų tirpias ir netirpias frakcijas. Ląstelės buvo ardamos ultragarsu, atskirta tirpi frakcija nuo netirpios ir paruošiami mėginiai kaip aprašyta 2. skyriuje. Elektroforezės ir imunoblotingo nuotraukose buvo matoma, jog INY baltymas buvo tirpioje ląstelių frakcijoje (rezultatai nepateikiami).

3.1.4 Rekombinantinio INY baltymo aktyvumo tyrimas

INY priklauso CDC baltymų šeimai, kurios nariai pasižymi hemoliziniu aktyvumu. Siekiant išsiaiškinti, ar sintetinas baltymas yra natyvos, funkciškai aktyvios konformacijos, atlikti hemolizės eksperimentai naudojant sveiko savanorio kraują, surinktą į Li heparino turintį vakuuminį mėgintuvėlį.

INY hemolizinis aktyvumas rūgštiniame (4,5-6,0) pH didesnis, nei neutraliame pH (Rampersaud *et al.*, 2010). Siekiant ištirti sintetino rekombinantinio INY hemolizinį aktyvumą, naudoti 5,4 ir 6,8 pH buferiniai tirpalai (35 mM NaCl, 125 mM Na₂HPO₄). Skirtingų pH buferiniuose tirpaluose paruošta eritrocitų suspensija veikiama tam tikru tūriu ląstelių lizato skystos frakcijos, kurioje yra randamas INY (3.6 pav.)



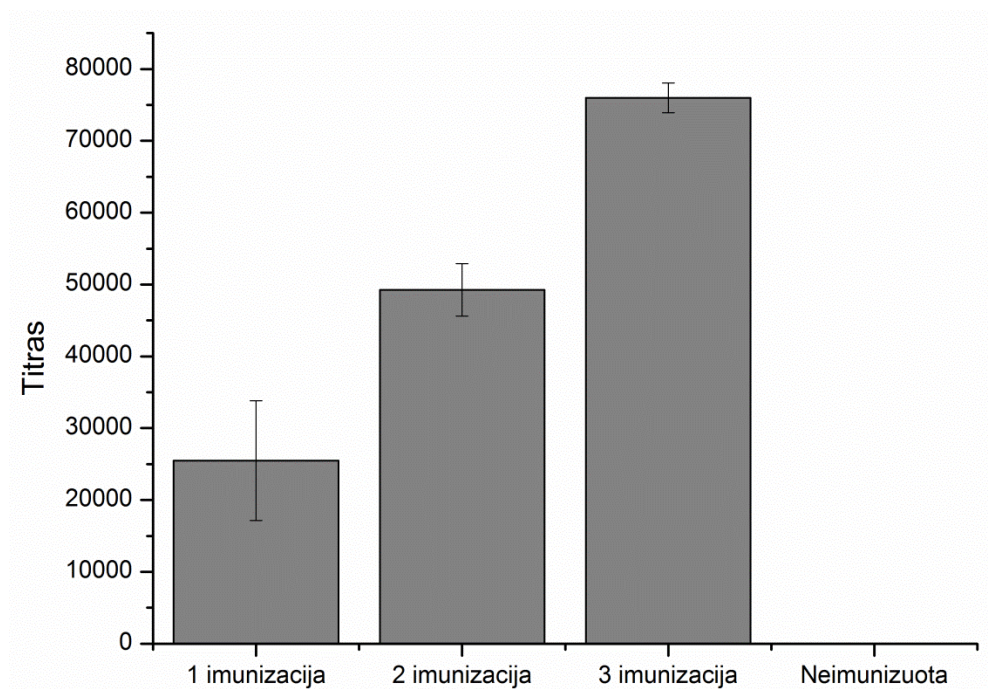
3.6 pav. Sintetino INY baltymo hemolizinis aktyvumas. A – hemolizės reakcija vykdyta 5,4 pH buferiniame tirpale, B – 6,8 pH buferiniame tirpale.

INY buvo aktyvus, kai reakcijos mišinio pH buvo 5,4 ir stebėtas apie 100 kartų mažesnis aktyvumas, esant pH 6,8. Gauti rezultatai atitiko anksčiau skelbtus duomenis apie INY hemolizinio aktyvumo priklausomybę nuo pH, todėl susintetintas baltymas buvo naudotas kuriant monokloninius antikūnus prieš ineroliziną.

INY baltymo gryninimas atliktas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje (V. Michailovienės), naudojant afininę chromatografiją.

3.2. Hibridomų kūrimas

MAk prieš ineroliziną sukurti naudojant hibridomų technologija (Kohler ir Milstein, 1975). Visų pirma 3 BALB/c linijos pelės imunizuotos tris kartus kas 28 dienas po 50 µg antigeno. Pirma imunizacija atlikta naudojant pilną Freund adjuvantą, antra – nepilną Freund adjuvantą, o trečia – antigeną ištirpintą PBS tirpale. Specifinių antikūnų titrai pelių kraujo plazmoje po imunizacijų nustatyti atliekant netiesioginę IFA (3.7 pav.). Stulpelinėse diagramose matoma, jog specifiskų INY antikūnų titras didėjo atliekant papildomas imunizacijas. Taigi, susintetintas INY baltymas yra imunogeniškas BALB/c pelių imuninėje sistemoje. Trys dienos prieš hibridizaciją pelė su aukščiausiu specifinių antikūnų titru kraujo plazmoje dar kartą imunizuota antigenu ištirpintu PBS tirpale siekiant padidinti antigenui specifinius antikūnus gaminančių B ląstelių proliferaciją.



3.7 pav. Specifinių antikūnų pelių kraujyje titro didėjimas imunizacijos metu.

Imunizuotos pelės blužnies ląstelės sulietos su mielominėmis ląstelėmis santykiu 5:2, suliejimui naudojant polietilenglikolį (PEG-4000). Ląstelės augintos selektyvioje terpėje su hipoksantinu, aminopterinu ir timidinu (HAT). Aminopteras slopina dihidrofolato reduktazę, DNR *de novo* sintezės kelyje dalyvaujantį fermentą. Alternatyviai DNR sintezės kelyje naudojamas hipoksantinas ir timidinas. Mielominių Sp2/0 ląstelių

hipoksantinguaninfosforiboziltransferazės (HGPRT) genas mutavęs, todėl jos negali alternatyviu keliu iš hipoksantino sintetinti inozitolio monofosfato (IMP), reikalingo guanozino ir adenozino trifosfatų sintezei, todėl žūva. Susidarę hibridai vien iš mielominių ląstelių neturi HGPRT, todėl neauga HAT atrankioje terpėje. Blužnies ląstelės ir jų tarpusavio hibridai miršta ląstelių augimo terpėje po keletos dienų. Atrankioje HAT turinčioje terpėje išgyvena blužnies ir mielominių ląstelių hibridai. Po hibridizacijos praėjus 7 ir 11 dienų hibridomų augimo terpė pakeista į ląstelių augimo terpę su HT. Praėjus 14 dienų nuo hibridizacijos atlikta netiesioginė IFA, naudojant hibridomų augimo terpę. Nustatyti šulinėliai, kuriuose hibridomos sintetina specifinius antikūnus prieš INY. Ląstelės iš šių šulinėlių reklonuotos.

Ląstelės klonuotos 96 šulinėlių audinių kultūrų plokštelėse. Praėjus savaitei klonai apžiūrėti šviesiniu mikroskopu. Šulinėliai, kuriuose buvo matomos ląstelių sankaupos, išaugusios iš vienos ląstelės (reklonai), dar kartą tikrinami netiesiogine IFA. Jeigu visi klono reklonai sintetino specifinius antikūnus prieš INY, jie perkelti į 24 šulinėlių plokšteles, surinkta ląstelių augimo terpė tolesniam antikūnų apibūdinimui ir ląstelės užšaldytos. Klonai, kurių reklonai nebuvo stabilūs, klonuoti pakartotinai, kol gautos stabilios ląstelių linijos. Po klonavimo pavyko stabilizuoti 9 hibridomas, gaminančias specifinius antikūnus prieš INY.

3.3. Monokloninių antikūnų apibūdinimas

MAk apibūdinti keliais būdais. Visų pirma hibridomų augimo terpė patikrinta netiesiogine IFA, nustatyti terpių titrai, nustatytos MAk klasės, poklasiai ir lengvosios grandinės tipai. Tada įvertintas antikūnų gimingumas antigenui ir nustatytas kryžminis specifiskumas su kitais baltymais. Po to ištirtas MAk gebėjimas neutralizuoti INY hemolizinį aktyvumą. Galų gale atlikta MAk kolekcijos konkurencinė analizė siekiant ištirti INY antigeninę struktūrą ir sukurti dviepitopės IFA sistema kiekybiniam INY nustatymui.

3.3.1. Hibridomų terpių titro, MAk klasių, poklasių ir lengvųjų grandinių tipų nustatymas

Antikūnų apibūdinimas pradėtas nustatant hibridomų augimo terpių titrus netiesioginės IFA metodu (3.2 lentelė). Terpės titras didesnis, jeigu joje yra didelė koncentracija antikūnų ir (arba) jų gimingumas antigenui didesnis. Klonų 1C9 ir 8A6 augimo terpių titras yra didžiausias (1:8100), o 4G5, 1F9, 13F9, 3D10 ir 2G10 yra mažiausias (1:900). Šie rezultatai rodo, jog skirtingų klonų hibridomų antikūnų sintezės efektyvumas ir gaminamų antikūnų gimingumas antigenui skiriasi.

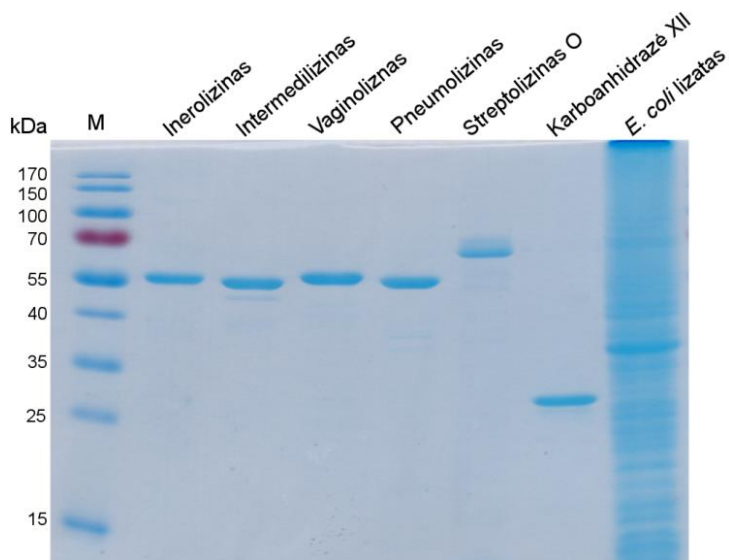
Sukurti MAk analizuoti naudojantis rinkiniu *BDTM Pharmigen Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit*. Visi 9 MAk yra IgG₁ poklasio, o jų lengvosios grandinės tipas yra κ (3.3 lentelė). Rezultatai rodo, jog imunizacijų metu INY aktyvavo nuo T limfocitų priklausomą imuninį atsaką, kuris yra būdingas imuninės sistemos atsakas į ekstraląstelinius antigenus (Kracker ir Radbruch, 2004).

3.2 lentelė. MAk kolekcijos terpių titrai, antikūnų klasės, poklasiai ir lengvosios grandinės tipai.

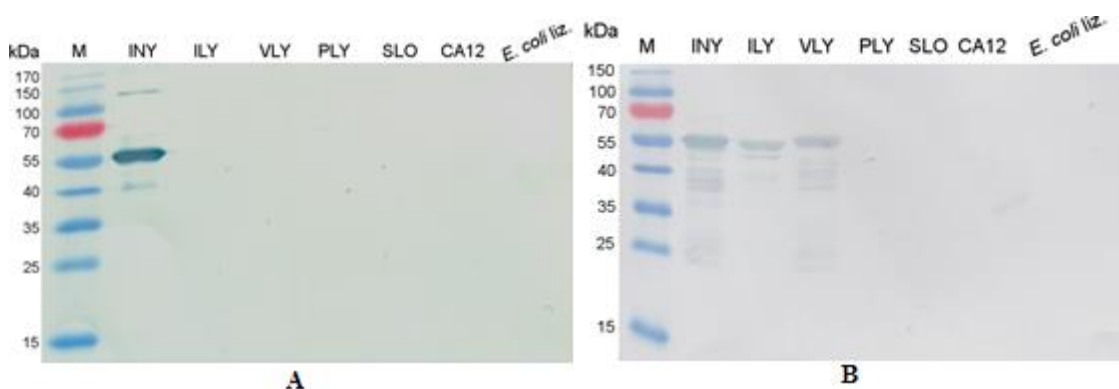
Klono pavadinimas	Terpės titras	MAk klasė, poklasis ir lengvosios grandinės tipas
1E2	1:2700	IgG ₁ , κ
4G5	1:900	IgG ₁ , κ
1F9	1:900	IgG ₁ , κ
1C9	1:8100	IgG ₁ , κ
13F9	1:900	IgG ₁ , κ
8A6	1:8100	IgG ₁ , κ
11E2	1:2700	IgG ₁ , κ
3D10	1:900	IgG ₁ , κ
2G10	1:900	IgG ₁ , κ

3.3.2. MAk prieš INY kryžminio specifiškumo tyrimas

INY priklauso CDC baltymų šeimai, todėl tikėtina, kad gauti MAk prieš INY gali ir kitus šios šeimos baltymus. Taip pat, rekombinantinis INY baltymas N-gale turi heksahistidino žymę, todėl reikėjo patikrinti, ar MAk nesusidarė būtent prieš ją. Norint tai išsiaiškinti, buvo atlikti sukurtų MAk kryžminių reakcijų tyrimai prieš kitus antigenus, N-gale turinčius heksahistidino žymę. Kryžmiškas antikūnų specifiškumas tirtas netiesioginės IFA ir imunoblotingo metodais. Naudoti nuo cholesterolio priklausomų citolizinių šeimos nariai: inerolizinas (INY), vaginolizinas (VLY), pneumolizinas (PLY), intermedilizinas (ILY) ir streptolizinas (SLO). Taip pat naudotas *E. coli* sintetintas nehomologiškas baltymas karboanhidrazė XII (CAXII).



3.8 pav. MAk kryžminio specifiškumo tyrimui naudotų antigenų baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis nuotrauka. M – baltymų molekulinės masės standartas *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Mix*.



3.9 pav. MAk kryžminio specifiškumo tyrimo imunoblotingu rezultatai. A - imunoblotingu su kryžmiškai nereaguojančiu MAk 1E2 nuotrauka; B – imunoblotingu su kryžmiškai reaguojančiu MAk 2G10 nuotrauka. M – baltymų molekulinės masės standartas *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Mix*.

Visi kolekcijos MAk atpažino INY naudojant netiesioginės IFA ir IB metodus.

Vienintelis MAk 2G10 kryžmiškai reagavo tiek netiesioginėje IFA, tiek IB su antigenais ILY ir VLY (3.9 pav. B), kurie yra homologiški INY baltymai (3.4 lentelė). Baltymų sekų palyginimas atliktas naudojantis Clustal Omega programa.

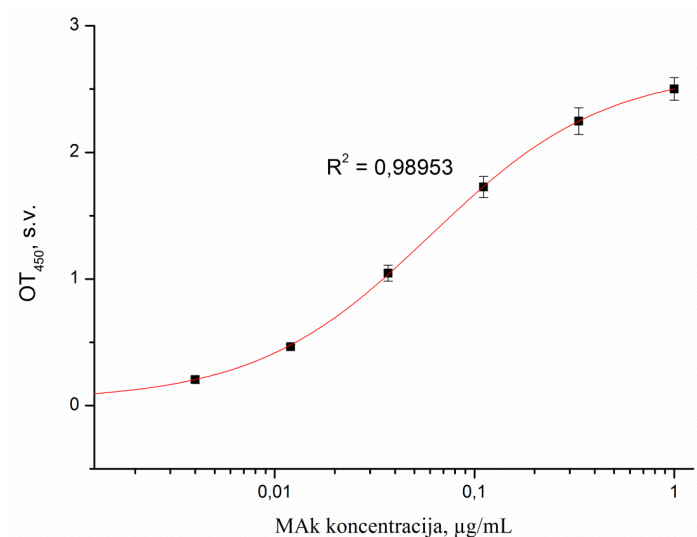
3.3 lentelė. Naudotų CDC šeimos baltymų sekų palyginimas Clustal Omega programa.

Pavadinimas	Baltymo ilgis, aminorūgštys	Pavadinimas	Baltymo ilgis, aminorūgštys	Sekų identiškumas, %
INY	519	ILY	535	51,95 %
INY	519	VLY	490	54,23 %
INY	519	PLY	474	53,38 %
INY	519	SLO	574	37,97 %

MAk nereagavo su kitais baltymais, N-gale turinčiais heksahistidino žymę. Tai patvirtina, kad MAk susidarę ne prieš heksahistidino žymę, bet prieš likusią baltymo seką ir turėtų atpažinti natūralų INY baltymą.

3.3.3. MAk giminingumo INY tyrimas

MAk gimingumas INY apibūdintas tariamosiomis disociacijos konstantomis (K_D), nustatytomis netiesioginės IFA būdu. Tariamoji K_D apskaičiuota iš OT_{450} priklausomybės nuo antikūnų koncentracijos kreivių, naudojant keturių parametų logistinį modelį (O'Connell *et al.* 1992). Iš 3.9 paveiksle pavaizduotos kreivės nustatoma MAk koncentracija, atitinkanti pusę maksimalios OT_{450} vertės, kuri yra lygi tariamajai K_D .



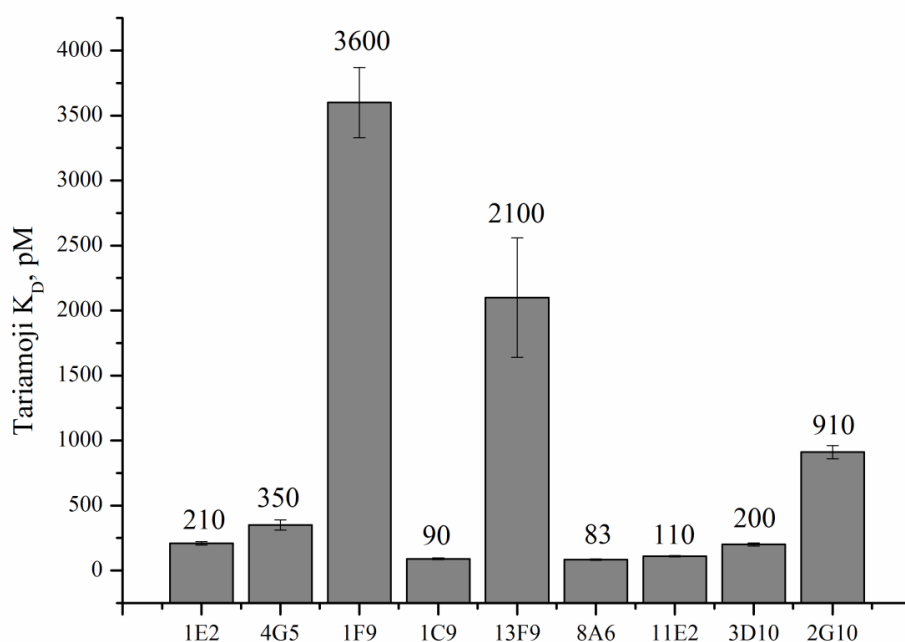
3.10 pav. MAk 1E2 keturių parametų logistinė kreivė tariamosios K_D nustatymui.

Tariamoji K_D taip pat yra lygi parametrai c logistinio modelio kreivės formulėje:

$$y = \frac{d + (d - a)}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

d – maksimali reikšmė (asimptotė, kai $x \rightarrow \infty$), a – minimali reikšmė (asimptotė, kai $x \rightarrow 0$), b – koeficientas, nusakantis kreivės nuožulnumą.

Antikūnų giminingumas antigenui yra atvirkščiai proporcingas tariamajai K_D : kuo mažesnė K_D , tuo didesnis giminingumas. MAk kolekcijos antikūnų giminingumas INY svyruoja nuo 82 iki 3590 pM (3.11 pav.). Didžiausio giminingumo antigenui yra MAk 8A6 (82 pM), 1C9 (90 pM) ir 11E2 (112 pM). Mažiausiai giminingas – MAk 1F9 (3590 pM). Antikūnai yra laikomi aukšto giminingumo, kai jų K_d yra nM eilės, o gautieji antikūnai yra pM eilės, išskyrus 3 MAk, todėl gauti MAk labai stipriai susiriša su antigenu.

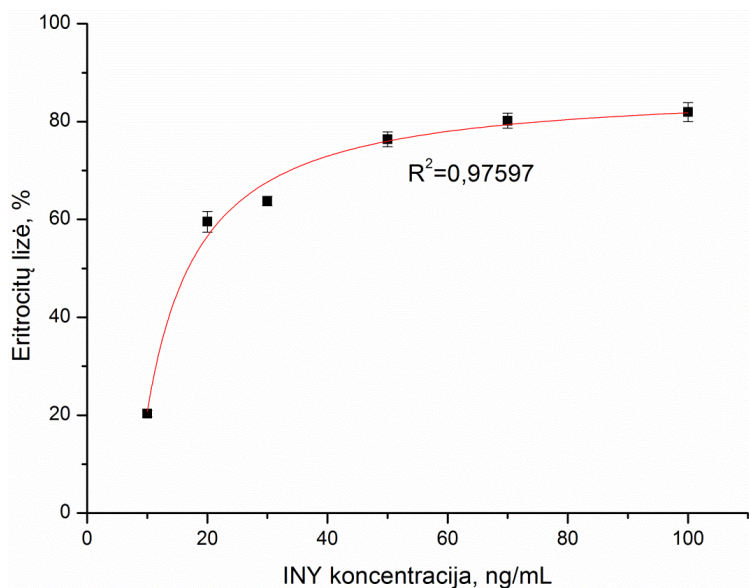


3.11 pav. MAk giminingumas INY.

3.3.4. MAk poveikio INY hemoliziniam aktyvumui tyrimas

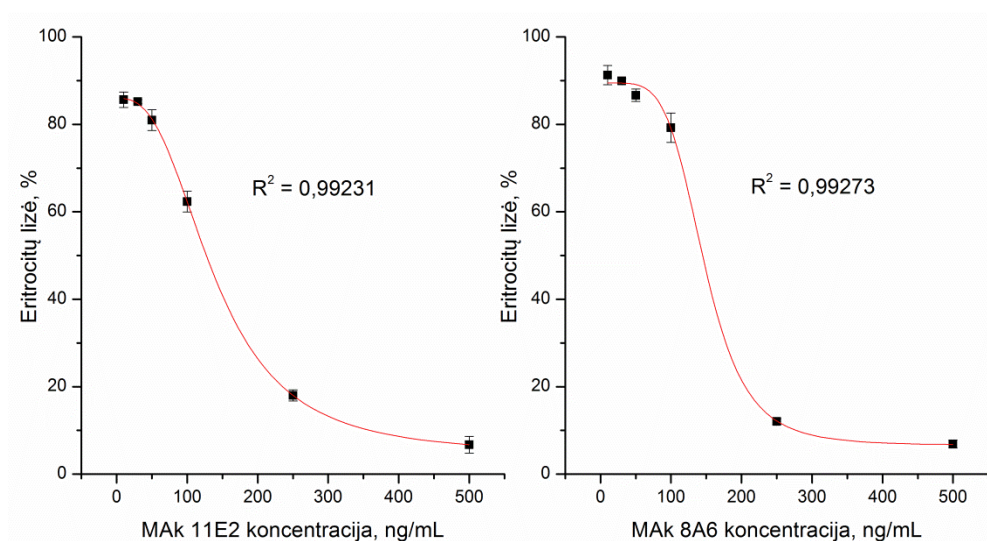
MAk gali jungtis prie baltymo epitopo, kuris yra svarbus jo funkciniam aktyvumui. Antikūnų apibūdinimui svarbu yra ištirti, ar antigeno-antikūno sąveika slopina arba neutralizuoja toksino aktyvumą. Sukurti MAk naudoti INY hemolizinio slopinimo tyrimuose. INY pasižymi hemoliziniu aktyvumu rūgštiniame (4,5-6,0) pH (Rampersaud *et al.*, 2010). Hemolizės eksperimentai atlikti 4,5 pH buferiniame tirpale (35 mM NaCl, 125 mM Na_2HPO_4). Aktyvumo tyrimams naudotas sveiko savanorio veninis kraujas, surinktas į vakuuminį mėgintuvėlį su Li heparinu.

Hemolizės reakcija vykdyta eritrocitus veikiant tiksliai INY kiekiu ir matuojant laisvo hemoglobino sugertį 415 nm bangos ilgyje. Pirmiausiai nustatomas minimalus INY kiekis, lizuojantis eritrocitus iš OT_{415} priklausomybės nuo INY kiekio kreivės (3.12. pav.).



3.12 pav. Hemolizės priklausomybė nuo INY kiekio.

Mažiausias INY kiekis pilnai lizuojantis eritrocitus hemolizės reakcijoje yra 50 ng. Siekiant ištirti MAk neutralizacinį poveikį INY hemoliziniam aktyvumui, INY prieš hemolizės reakciją veiktas tiksliai MAk kiekiu. Tuomet į reakcijos mišinį pridedama eritrocitų suspensijos ir apskaičiuojama eritrocitų lizė. MAk kolekcijoje 7 MAk nepasižymėjo INY hemolizės slopinimu esant 1000 ng MAk reakcijos mišinyje (duomenys nepateikiami). MAk 8A6 ir 11E2 parodė neutralizacinį poveikį INY (3.13 pav.). MAk neutralizacinis poveikis INY palyginimas apskaičiuojant MAk koncentraciją, kurioje eritrocitų lizė sumažėja 50 % (IC_{50}).



3.13 pav. INY hemolizinį aktyvumą neutralizuojančių MAk efektyvumas.

IC_{50} yra tiriamosios medžiagos (šiuo atveju antikūnų) gebėjimo slopinti tam tikrą biocheminį procesą (šiuo atveju hemolizę) matas. IC_{50} lygi MAk koncentracijai, kuri slopina

hemolizę 50 %. Sukurtoje MAk kolekcijoje yra 2 MAk, neutralizuojantys INY hemolizinį aktyvumą. MAk 11E2 stipriau neutralizuoja INY hemolizinį aktyvumą ($IC_{50} = 147,5 \text{ ng/mL}$), palyginus su MAk 8A6 ($IC_{50} = 138,9 \text{ ng/mL}$).

3.3.5. INY antigeninės struktūros tyrimas

Baltymo antigeninė struktūra gali būti apibūdinama nustatant imunodominuojančias sritis ar epitopus baltymo erdvinėje struktūroje, kuriuos atpažįsta imuninio atsako metu susidarę antikūnai. Konkurencinė IFA leidžia sugrupuoti visus kolekcijos MAk pagal atpažįstamus epitopus. Konkurencinėje IFA naudojami MAk konjugatai su krienų peroksidaze ir nemodifikuoti MAk. MAk prieš tą patį ar panašų epitopą konkuruoja dėl sąveikos su antigenu. Atliekant konkurencinę IFA krienų peroksidaze žymėtų MAk ir nežymėtų MAk konkurencija įvertinama signalo sumažėjimu. Esant signalo sumažėjimui lyginant su kontroliniu mėginiu (be konkuruojančio nežymėto MAk) laikoma, jog nežymėtas MAk konkuruoja dėl sąveikos su antigenu. Šio darbo metu buvo sukurti 9 MAk, iš kurių trys MAk išsiskyrė savo savybėmis: 2G10 reagavo kryžmiškai su kitais antigenais; 8A6 ir 11E2 neutralizavo INY hemolizinį aktyvumą. Šių MAk atpažįstami epitopai funkciškai skiriasi nuo likusių antikūnų.

3.4 lentelė. Konkurencinės IFA rezultatai.

Žymėti MAk Nežymėti MAk	1E2*	4G5* 1F9* 3D10*	13F9*	1C9*	8A6*	11E2*	2G10*	Grupė
1E2	++	-	-	-	-	-	-	I
4G5, 3D10 1F9	-	++	-	+	-	-	-	II
13F9	-	-	++	+	-	-	-	III
1C9	-	+	+	++	-	-	+	IV
8A6	-	+	-	+	++	-	+	V
11E2	+	-	+	-	-	++	-	VI
2G10	-	-	-	+	-	-	++	VII

„++“ – stipri (daugiau už 70 %) konkurencija; „+“ – silpna (nuo 50 iki 70 %) konkurencija; „-“ – nėra konkurencijos.

Atlikus konkurencinę IFA MAK sugrupuoti į 7 grupes. MAK konkurencija suskirstyta į tris kategorijas: 70 % ir daugiau – stipri konkurencija, nuo 50 % iki 70 % – silpna konkurencija, mažiau už 50 % – nėra konkurencijos. Neutralizuojantys INY hemolizinį aktyvumą MAK 8A6 ir 11E2 tarpusavyje nekonkuravo. Kryžmiškai reaguojantis MAK 2G10 pateko į atskirą grupę. Didžiausia grupė yra II, jai priklauso MAK 4G5, 3D10 ir 1F9. Kai kuriais atvejais vieno klonų nežymėtas MAK konkuravo su kito klonų žymėtu MAK, bet ne atvirkščiai. Tokie rezultatai gali būti paaiškinti tuo, jog MAK giminingumas skiriasi ir didesnio giminingumo MAK nukonkuruoja mažesnio giminingumo MAK. Pavyzdžiui, 11E2 sumažina 1E2* signalą, bet 1E2 nesumažina 11E2* signalo. Šių MAK giminingumai skiriasi: 11E2 didesnis ($K_D = 112 \text{ pM}$) už 1E2 ($K_D = 213 \text{ pM}$). Taip pat, vieno klonų MAK sudarydamas antikūno-antigeno kompleksą gali trukdyti antrojo klonų MAK sąveikai dėl sterinių trukdžių, bet esant atvirkščiai situacijai, t.y. antrajam MAK sudarius antikūno-antigeno kompleksą, pirmojo antikūno atpažįstamas epitopas lieka prieinamas.

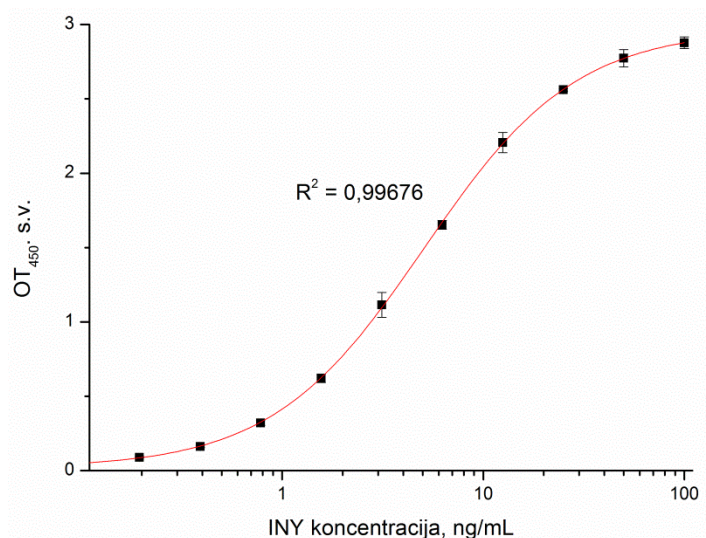
Gauti rezultatai rodo, kad INY antigeninė struktūra sudaryta iš bent 7 imunodominuojančių sričių. Iš šių rezultatų galima spėti, kad baltymo erdvinėje struktūroje, ko gero, yra daug kilpų, kurios yra lengvai prieinamos B ląstelių receptoriams imuninio atsako metu ir gali juos aktyvinti.

3.4. Kiekybinio INY nustatymo sistemos kūrimas

MAK plačiai naudojami diagnostikos tyrimams, nustatant mėginiuose esančių medžiagų kiekį. Gautas MAK prieš INY kolekcijos antikūnai naudoti dviepitopės IFA sistemos sukūrimui, skirtos nustatyti INY kiekį įvairiuose mėginiuose.

Dviepitopei IFA reikalinga MAK pora, kuri atpažįsta skirtingus baltymo epitopus. Vienas iš MAK sorbuojamas plokštelės paviršiuje ir sudaro antikūno-antigeno kompleksus su mėginiuose esančiu antigenu. Antrasis poros MAK, žymėtas krienų peroksidaze, sąveikauja su antigenu susidariusiame pirmojo antikūno-antigeno komplekse. Antigeną prisijungusių MAK, žymėtų krienų peroksidaze, sukuriamas signalas yra proporcingas antigeno koncentracijai tiriamajame mėginyje. Šis metodas leidžia tiksliai nustatyti mėginiuose esančių tiriamųjų antigenų koncentraciją.

Dviepitopės IFA sistemai sukurti naudotos MAK poros, kurios atpažįsta skirtingus INY baltymo epitopus ir pasirinkta MAK pora, turinti žemiausią aptikimo ribą. Jautriausia dviepitopės IFA sistema sudaroma sorbuojant MAK 1C9 ir naudojant MAK 11E2, žymėtus krienų peroksidaze signalo gavimui (3.14 pav.). Šios sistemos jautrumas yra apie 0,8 ng/mL.



3.14 pav Dviepitopės IFA INY kiekybinio nustatymo kalibracinė kreivė.

Tolesniuose tyrimuose sudaryta dviepitopės IFA sistema kiekybiniam INY nustatymui bus optimizuojama ir naudojama INY koncentracijos nustatymui biologiniuose mėginiuose.

Taigi, šiame bakalauro darbe pirmiausia buvo susintetintas funkciškai aktyvus rekombinantinis INY, kuris buvo panaudotas kaip antigenas MAk kolekcijos sukūrimui. Sukurtieji MAk buvo išsamiai apibūdinti įvairiais metodais ir pritaikyti INY funkciniam tyrimams bei jo kiekybiniam nustatymui.

IŠVADOS

1. Susintetintas rekombinantinis inerolizinas *E. coli* pET baltymų raiškos sistemoje, kuris turėjo hemolizinį aktyvumą. Tai rodo, kad rekombinantinis inerolizinas yra taisyklingos konformacijos ir tinka funkciniam tyrimams bei antikūnų kūrimui;
2. Sukurtos 9 hibridomų linijos, gaminančios aukšto giminingumo IgG₁ poklasio monokloninius antikūnus prieš rekombinantinį ineroliziną. Tai rodo, kad rekombinantinis inerolizinas yra imunogeniškas ir sukelia nuo T ląstelių priklausomą imuninį atsaką.
3. Tiriant monokloninių antikūnų kolekciją imunofermentinės analizės ir imunoblotingo metodais, identifikuotas kryžmišku specifiskumu pasižymintis klonas 2G10, reaguojantis su inerolizinui homologiškais baltymais intermedilizinu ir vaginolizinu, todėl šį monokloninį antikūną būtų galima panaudoti minėtų baltymų bendrų epitopų tyrimams.
4. Atlikti inerolizino hemolizinio aktyvumo slopinimo monokloniniais antikūnais tyrimai parodė, jog du klonai 8A6 ir 11E2 slopino inerolizino hemolizinį aktyvumą. Tai rodo, kad inerolizino hemolizinį aktyvumą lemiančios sritys yra eksponuotos inerolizino molekulės paviršiuje ir yra prieinamos B limfocitams.
5. Ištyrus monokloninių antikūnų kolekciją konkurencinės imunofermentinės analizės metodu, sukurtieji antikūnai sugrupuoti pagal jų atpažįstamus epitopus į 7 grupes. Skirtingų grupių antikūnus galima panaudoti kiekybinio inerolizino nustatymo sistemos kūrimui.
6. Sukurta ir optimizuota dviepitopės imunofermentinės analizės sistema inerolizino kiekybiniam nustatymui, kuri gali būti pritaikyta inerolizino nustatymui biologiniuose mėginiuose.

VILNIUS UNIVERSITY

FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

Vytautas Mickevičius

Development and Characterisation of Monoclonal Antibodies against Inerolysin

Bachelor Thesis

Summary

Lactobacillus iners is present in women vaginal microbiota. This bacterium was shown to be a key factor in the development of bacterial vaginosis and it might play a role in premature birth. *L. iners* is the only known *Lactobacillus* bacterium, which releases cholesterol-dependent cytolysin inerolysin (INY), a pore-forming toxin. This study was aimed at development of monoclonal antibodies (MAbs) against INY and MAb-based INY quantitation system. Recombinant INY was expressed in *E. coli* pET system. It showed an increased haemolytic activity in acidic (pH 5.4) compared to neutral (pH 6.8) solution. Following immunisation of BALB/c mice, recombinant INY was shown to induce a strong humoral immune response. After immunisation, development of IgG antibodies was observed suggesting that recombinant INY activated antigen presenting cells and T cells. Using hybridoma technology, nine MAb-producing hybridoma cell lines were generated. MAb specificity was investigated using Western Blot and ELISA methods. One MAb was cross-reactive against intermedilysin and vaginolysin. Eight out of 9 MAbs were reactive exclusively with INY. The results of a competitive ELISA allowed to classify the generated MAbs into 7 groups, directed to different immunogenic regions of INY. MAbs selected from different groups were used to develop sandwich ELISA for INY quantification. The MAb-based immunoassay was suitable for detection of recombinant INY. Generated MAbs were investigated for their ability to inhibit haemolytic activity of INY *in vitro*. Two out of 9 MAbs were able to inhibit INY haemolytic activity. In conclusion, the MAbs generated and described in the current study may be useful for structural and functional studies of INY as well as detection of INY in biological specimens.

PADĖKA

Dėkoju savo darbo vadovui dokt. Martynui Simanavičiui už kantrybę, palaikymą, pasitikėjimą bei vertingus patarimus ir pastabas, dr. Mildai Plečkaitytei už pradmenis inerolizino padauginimui PGR, patarimus genų inžinerijos klausimais ir visokeriopą pagalbą sintetinant rekombinantinį ineroliziną. Taip pat esu dėkingas dokt. Mildai Zilnytei už technines ir teorinės konsultacijas, prof. Aurelijai Žvirblienei už bakalauro baigiamojo darbo idėją, vertingus patarimus ir suteiktas puikias darbo sąlygas bei visam VU Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriaus kolektyvui už įkvepiančią ir malonią darbinę aplinką.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta T-A, Coarfa C, et al. A Metagenomic Approach to Characterization of the Vaginal Microbiome Signature in Pregnancy. Ratner AJ, editor. PLoS One. 2012;7(6):e36466.
2. Alonzo F, Kozhaya L, Rawlings SA, Reyes-Robles T, DuMont AL, Myszkowski DG, et al. CCR5 is a receptor for Staphylococcus aureus leukotoxin ED. Nature. 2013;493(7430):51–55.
3. Alouf JE, Billington SJ, Jost BH. Repertoire and general features of the cholesterol-dependent cytolysins. Bacterial Toxins: A Comprehensive Sourcebook. London: Academic Press; 2005;3:643–658.
4. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen K, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. Amer J Med. 1983;74(1):14–22.
5. Anderluh G, Maček P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). Toxicon 2002; 40:111-124.
6. Ballard J, Sokolov Y, Yuan WL, Kagan BL, Tweten RK. Activation and mechanism of Clostridium septicum alpha toxin. Mol Microbiol. 1993;10(3):627–634.
7. Benedetti H, Llobes R, Lazdunski C et al. Colicin A unfolds during its translocation in Escherichia coli cells and spans the whole cell envelope when its pore has formed. EMBO J 1992; 11:441-447.
8. Birck C, Damian L, Marty-Detraves C et al. A new lectin family with structure similarity to actinoporins revealed by the crystal structure of Xerocomus chrysenteron lectin XCL. J Mol Biol 2004;344:1409-1420.
9. Borgdorff H, Armstrong SD, Tytgat HLP, Xia D, Ndayisaba GF, Wastling JM, et al. Unique Insights in the Cervicovaginal Lactobacillus iners and L. crispatus Proteomes and Their Associations with Microbiota Dysbiosis. PLoS One. 2016;11(3):e0150767.
10. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, et al. Bacterial vaginosis assessed by Gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. J Infect Dis 2010;202:1907-15.
11. Chai T, Wu V, Foulds J. Colicin A receptor: role of two Escherichia coli outer membrane proteins (OmpF protein and btuB gene product) and lipopolysaccharide. J Bacteriol. 1982;151(2):983–988.
12. Czajkowsky DM, Hotze EM, Shao Z, Tweten RK. Vertical collapse of a cytolysin prepore moves its transmembrane beta-hairpins to the membrane. EMBO J. 2004;23(16):3206–3215.
13. Czajkowsky DM, Hotze EM, Shao Z, Tweten RK. Vertical collapse of a cytolysin prepore moves its transmembrane beta-hairpins to the membrane. EMBO J. 2004;23(16):3206–15
14. Dal Peraro M, van der Goot FG. Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. Nat Rev Microbiol. 2016;14(2):77-92.

15. Darwish AM, Makarem MH, Alnashar EM, Hamadeh SM. Screening for bacterial vaginosis in high-risk pregnancy: the experience of a developing country. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84:483-5.
16. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, Tagg JR, et al. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus* species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. *BMC Microbiol.* 2007;7:115.
17. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, Tagg JR. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus* species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*.
18. de Zamaroczy M, Mora L. Hijacking cellular functions for processing and delivery of colicins E3 and D into the cytoplasm. *Biochem Soc Trans*;40(6):1486–1491.
19. Degiacomi MT, Iacovache I, Pernot L, Chami M, Kudryashev M, Stahlberg H, et al. Molecular assembly of the aerolysin pore reveals a swirling membrane-insertion mechanism. *Nat Chem Biol.* 2013;9(10):623–629.
20. Donders GGG, Bellen G, Grinceviciene S, Ruban K, Vieira-Baptista P. Aerobic vaginitis: no longer a stranger. *Res Microbiol.* 2017;168(9–10):845–58.
21. Dramsi S, Cossart P. Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. *J Cell Biol.* 2002;156(6):943–6.
22. DuMont AL, Torres VJ. Cell targeting by the *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: it's not just about lipids. *Trends Microbiol.* 2014;22(1):21–27.
23. Eric Cascales E., Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Lloubès R, Postle K, Riley M, Slatin S, Cavard D. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71(1):158–229.
24. Falsen E, Pascual C, Sjoden B, Ohlen M, Collins MD. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49(1):217–21.
25. Farrand AJ, LaChapelle S, Hotze EM, Johnson AE, Tweten RK. Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(9):4341–6.
26. Feil SC, Polekhina G, Gorman MA, Parker MW. Introduction. *Proteins Membrane Binding and Pore Formation*. New York: Springer Nature; 2010;1-9.
27. France MT, Mendes-Soares H, Forney LJ. Genomic Comparisons of *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus iners* Reveal Potential Ecological Drivers of Community Composition in the Vagina. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(24):7063–7073.
28. Gardner HL, Dukes CD. New etiologic agent in nonspecific bacterial vaginitis. *Science.* 1954;120(3125):853
29. Giddings KS, Zhao J, Sims PJ et al. Human CD59 is a receptor for the cholesterol-dependent cytolysin intermedilysin. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11:1173-1178.
30. Gilbert RJ. Inactivation and activity of cholesterol-dependent cytolysins: what structural studies tell us. *Structure.* 2005; 13:1097-1106.

31. Hotze EM, Le HM, Sieber JR, Bruxvoort C, McInerney MJ, Tweten RK. Identification and characterization of the first cholesterol-dependent cytolysins from Gram-negative bacteria. *Infect Immun*. 2013;81(1):216–225.
32. Hotze EM, Tweten RK. Membrane assembly of the cholesterol-dependent cytolysin pore complex. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2012;1818(4):1028–1038.
33. Hotze EM, Wilson-Kubalek E, Farrand AJ, Bentsen L, Parker MW, Johnson AE, et al. Monomer-Monomer Interactions Propagate Structural Transitions Necessary for Pore Formation by the Cholesterol-dependent Cytolysins. *J Biol Chem*. 2012;287(29):24534–43.
34. Hu C-MJ, Zhang L. Nanotoxoid vaccines. *Nano Today*. 2014;9(4):401–404.
35. Hunt S, Green J, Artymiuk PJ. Hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA) and Related Toxins. New York: Springer Nature. 2010;116–126.
36. Iacovache I, Bischofberger M, van der Goot FG. Structure and assembly of pore-forming proteins. *Curr Opin. Struct. Biol*. 2010;20:241–246.
37. Iacovache I, Dal Peraro M, van der Goot F G. The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. New York: Elsevier. 2015;4:677-683.
38. Iacovache I, Paumard P, Scheib H, Lesieur C, Sakai N, Matile S, et al. A rivet model for channel formation by aerolysin-like pore-forming toxins. *EMBO J*. 2006;25(3):457–466.
39. Yen S, Shafer MA, Moncada J, Campbell CJ, Flinn SD, Boyer CB. Bacterial vaginosis in sexually experienced and nonsexually experienced young women entering the military. *Obstet Gynecol*. 2003;102:927.
40. Yokoyama WM, Thompson ML, Ehrhardt ROY. Cryopreservation and thawing of cells. *Curr Protoc Immunol*. 2012; 99(1):. A.3G.1-A.3G.5.
41. Jespers V, Menten J, Smet H, Poradosu S, Abdellati S, Verhelst R. Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. *BMC Microbiol*. 2012;12:83.
42. Kindinger LM, Bennett PR, Lee YS, Marchesi JR, Smith A, Cacciatore S, et al. The interaction between vaginal microbiota, cervical length, and vaginal progesterone treatment for preterm birth risk. *Microbiome* 2017;5(1):6.
43. Klebanoff MA, Schwebke JR, Zhang J, Nansel TR, Yu K-F, Andrews WW. Vulvovaginal Symptoms in Women With Bacterial Vaginosis. *Obstet Gynecol*. 2004;104(2):267–72.
44. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature*. 1975;256:495–497.
45. Koumans EH, Sternberg M, Bruce C, et al. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis*. 2007;34:864-9.
46. Kracker S, Radbruch A. Immunoglobulin Class Switching. *B Cell Protocols*. 2004;271:149-159.
47. Lesieur C, Vecsey-Semjn B, Abrami L, Fivaz M, van der Goot FG. Membrane insertion: the strategy of toxins. *Mol. Membrane Biol*. 1997;14:45-64.
48. Los, F. C., Randis, T. M., Aroian, R. V. & Ratner, A. J. Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*.

49. Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal Microbiome: Rethinking Health and Disease. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66(1):371–389.
50. Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond J-A, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome* 2013;1:12.
51. Macklaim, JM et al. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1. *Proc.Natl. Acad.Sci.* 2011;108:4688–4695.
52. Marrazzo JM, Martin DH, Watts DH, et al. Bacterial vaginosis: identifying research gaps proceedings of a workshop sponsored by DHHS/NIH/NIAID. *Sex Transm Dis.* 2010;37:732.
53. McMillan A, Macklaim JM, Burton JP, Reid G. Adhesion of *Lactobacillus iners* AB-1 to human fibronectin: a key mediator for persistence in the vagina? *Reprod Sci.* 2013;20:791e6.
54. Mendling W. Vaginal Microbiota. *Advances in experimental medicine and biology.* 2016;902:83–93.
55. Mendling W. Vaginal Microbiota. *Advances in experimental medicine and biology.* 2016;102: 83–93.
56. Mitchell C, Marrazzo J. Bacterial vaginosis and the cervicovaginal immune response. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(6):555–563.
57. Mitchell TJ, Dalziel CE. The Biology of Pneumolysin. *Sub-cellular biochemistry.* 2014;80:145–60.
58. Nagamune H, Ohnishi C, Katsuura A, Fushitani K, Whiley RA, Tsuji A, et al. Intermedilysin, a novel cytotoxin specific for human cells secreted by *Streptococcus intermedius* UNS46 isolated from a human liver abscess. *Infect Immun.* 1996;64(8):3093–100.
59. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991;29(2):297–301.
60. Nunn KL, Wang Y-Y, Harit D, Humphrys MS, Ma B, Cone R, et al. Enhanced Trapping of HIV-1 by Human Cervicovaginal Mucus Is Associated with *Lactobacillus crispatus*-Dominant Microbiota. *MBio.* 2015;6(5):e01084-15.
61. O'Connell MA, Belanger BA, Haaland Calibration and assay development using the four-parameter logistic model. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 1993;20(2):97-114.
62. Padmavathi PVL, Steinhoff HJ. Conformation of the Closed Channel State of Colicin A in Proteoliposomes: An Umbrella Model. *J Mol Biol.* 2008;378(1):204–214.
63. Paramel Jayaprakash T, Schellenberg JJ, Hill JE. Resolution and characterization of distinct *cpn60*-based subgroups of *Gardnerella vaginalis* in the vaginal microbiota. *PLoS One.* 2012;(8):43009.
64. Petricevic L, Domig KJ, Nierscher FJ, Sandhofer MJ, Fidesser M, Krondorfer I. Characterisation of the vaginal *Lactobacillus* microbiota associated with preterm delivery. *Sci Rep.* 2014;4:5136.
65. Petrova MI, Reid G, Vaneechoutte M, Lebeer S. *Lactobacillus iners* : Friend or Foe? *Trends Microbiol.* 2017;25(3):182–91.

66. Ramachandran R, H.A., Tweten RK, Johnson AE, Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nat Struct Biol.* 2002. 9(11):5.
67. Ramachandran, R., Tweten, R. K., & Johnson, A. E. (2004). Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit β -strand alignment. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(8), 697.
68. Rampersaud R, Lewis EL, LaRocca TJ, Ratner AJ. Environmental pH modulates inerolysin activity via post-binding blockade. *Sci Rep.* 2018;8(1):1542.
69. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108:4680–7.
70. Ridleya H, Johnson CL, Lakey JH. Interfacial Interactions of Pore-Forming Colicins. *Proteins Membrane Binding and Pore Formation.* New York: Springer Nature; 2010;81–90.
71. Rosado CJ, Buckle AM, Law RHP, Butcher RE, Kan W-T, Bird CH, et al. A Common Fold Mediates Vertebrate Defense and Bacterial Attack. *Science.* 2007;317(5844):1548–1551.
72. Rossjohn J, Feil SC, McKinsty WJ, Tweten RK, Parker MW. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell.* 1997;89(5):685–92.
73. Sato TK, Tweten RK, Johnson AE. Disulfide-bond scanning reveals assembly state and β -strand tilt angle of the PFO β -barrel. *Nat. Chem. Biol.* 2013;9:383–389.
74. Shepard LA, Shatursky O, Johnson AE, Tweten RK. The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane beta-hairpins. *Biochemistry.* 2000;39(33):10284–10293.
75. Soltani CE, Hotze EM, Johnson AE et al. Structural elements of the cholesterol-dependent cytolysin that are responsible for their cholesterol-sensitive membrane interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:20226-20231.
76. Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT, Matsen FA, Fiedler TL, Hall RW. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One.* 2012;7:e37818
77. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ, et al. Temporal Variability of Human Vaginal Bacteria and Relationship with Bacterial Vaginosis. *PLoS One.* 2010;5(4):e10197.
78. Tanaka K, Caaveiro JMM, Morante K, González-Mañas JM, Tsumoto K. Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid. *Nat Commun.* 2015;6(1):6337.
79. Tilley SJ, Orlova EV, Gilbert RJ, Andrew PW, Saibil HR. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell.* 2005;121:247–256.
80. Tweten RK, Hotze EM, Wade KR. The Unique Molecular Choreography of Giant Pore Formation by the Cholesterol-Dependent Cytolysins of Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69(1):323–40.
81. Uris Ros, Ana J Garcia-Saez. More Than a Pore: The Interplay of Pore-Forming Proteins and Lipid Membranes. *J Membrane Biol.* 2015;248(3):545-561

82. Vaidyanathan MS, Sathyanarayana P, Maiti PK, Visweswariah SS, Ayappa KG. Lysis dynamics and membrane oligomerization pathways for Cytolysin A (ClyA) pore-forming toxin. *RSC Adv.* 2014;4(10):4930.
83. Vaneechoutte M. *Lactobacillus iners* , the unusual suspect. *Res Microbiol.* 2017;168(9–10):826–36.
84. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L, et al. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol* 2004;4:16.
85. Wade KR, Hotze EM, Kuiper MJ, Morton CJ, Parker MW, Tweten RK. 2015. An intermolecular electrostatic interaction controls the prepore to pore transition in a cholesterol-dependent cytolysin. *PNAS.* 2005;112(7):2204–2209.
86. Wisdom GB. Conjugation of antibodies to horseradish peroxidase. *Methods Mol Biol.* 2005;295:127-130.
87. Witkin SS, Mendes-Soares H, Linhares IM, Jayaram A, Ledger WJ, Forney LJ. Influence of Vaginal Bacteria and D- and L-Lactic Acid Isomers on Vaginal Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer: Implications for Protection against Upper Genital Tract Infections. *MBio.* 2013;4(4):e00460-13-e00460-13.
88. Witkin SS, Mendes-Soares H, Linhares IM, Jayaram A, Ledger WJ, Forney LJ. Influence of Vaginal Bacteria and D- and L-Lactic Acid Isomers on Vaginal Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer: Implications for Protection against Upper Genital Tract Infections. *MBio.* 2013;4(4):460-413
89. Witzernath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, et al. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med.* 2006;34(7):1947–1954.
90. Zhu Y, Jin B, Sun C, Huang C, Liu X., The effects of hybridoma growth factor in conditioned media upon the growth, cloning, and antibody production of heterohybridoma cell lines. *Hum Antibodies Hybridomas.* 1993; 4(1):31-35.