

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Milda
ZILNYTĖ

Poras formuojančio *Gardnerella vaginalis* toksino vaginolizino apibūdinimas

DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA

Gamtos mokslai,
Biochemija N 004

VILNIUS 2019

Disertacija rengta 2014/10/01 – 2018/09/30 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre, Biotechnologijos institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (stipendijos už akademinis pasiekimus), Vilniaus universitetas (Erasmus+ stipendija stažuotei).

Mokslinės vadovės:

prof. dr. Aurelija Žvirblienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004, 2016/10/28 – 2018/09/30)

dr. Milda Plečkaitytė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004, 2014/10/01 – 2016/10/27)

Gynimo taryba:

Pirmininkė – **prof. dr. Vilmantė Borutaitė** (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Nariai:

dr. Susan Black (Oksfordo universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004);

dr. Rima Budvytytė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004);

prof. dr. Saulius Serva (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004);

dr. Mindaugas Zaremba (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2019 m. rugsėjo mėn. 25 d. 14 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, R401 auditorija, Vilnius, Lietuva; tel. +44 7708066565; el. paštas milda.zilnyte@gmail.com.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendarius>

VILNIUS UNIVERSITY

Milda
ZILNYTĖ

Characterization of Pore-forming
Toxin Vaginolysin from *Gardnerella
vaginalis*

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biochemistry N 004

VILNIUS 2019

This doctoral thesis work was performed from 01/10/2014 to 30/09/2018 at Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biotechnology. The research was supported by Research Council of Lithuania (promotional scholarships), Vilnius university (Erasmus+ funding for the internship).

Academic supervisors:

Prof. Dr Aurelija Žvirblienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004, 28/10/2016 – 30/09/2019)

Dr Milda Plečkaitytė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004, 01/10/2014 – 27/10/2016)

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – **Prof. Dr Vilmantė Borutaitė** (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biochemistry – N 004)

Members:

Dr Susan Black (University of Oxford, Natural Sciences, Biochemistry – N 004);

Dr Rima Budvytė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

Prof. Dr Saulius Serva (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004);

Dr Mindaugas Zaremba (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004)

The dissertation will be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 2 p.m. on the 25th of September 2019 in R401 auditorium of Life Sciences Center, Vilnius University.

Address: Saulėtekio av. 7, R401 auditorium, Vilnius, Lithuania
Tel. +44 7708066565; e-mail: milda.zilnyte@gmail.com.

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:
www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

PADĖKA

Esu dėkinga visiems, kurie vienaip ar kitaip padėjo man pabaigti šį darbą.

Nuoširdžiai dėkoju abiem vadovėms už pagalbą ir palaikymą doktoratūros studijų metu. Dėkoju Mildai Plečkaitytei už šio projekto inicijavimą, pagalbą planuojant ir atliekant eksperimentus bei bendradarbiavimo su Česlovu Venclovu užmezgimą. Dėkoju Aurelijai Žvirblienei už patikėjimą manimi ir palaikymą išvykstant į stažuotę tęsti doktorantūros darbus. Esu ypatingai dėkingai Aurelijai už žaibišką pagalbą taisant disertacijos tekstą.

Dėkoju Česlovui Venclovui už jo geranorišką pagalbą atliekant homologinio modeliavimo eksperimentus ir mutagenezės taikinių paiešką. Dėkoju Vilmai Michailovienei už patarimus ir pagalbą gryninant baltymus. Dėkoju Gintaro Valinčiaus grupei, ypatingai Tadiui Penkauskui už liposomų mėginius ir diskusijas. Taip pat dėkoju Elenai Manakovai už pagalbą atliekant kristalinimo ir kitus struktūrinius eksperimentus.

Dėkoju visiems savo kolegoms ILBS, kurie gyvenimą laboratorijoje dažnai paversdavo džiugiu. Šiltai dėkoju savo ofiso kaimynėms Indrei, Astai ir Jovitai už kasdienius pokalbius ir diskusijas. Dėkoju Indrei Dalgėdienei už vertingus patarimus tėkmės citometrijos ir fluorescencinės mikroskopijos klausimais ir, ypatingai, už tai, kad kruopščiai perskaitė šį darbą ir pateikė vertingų komentarų. Dėkoju Miglei Janulaitienei už bendradarbiavimą šiame projekte. Dėkoju Dovilei Stravinskienei, Indrei Kučinskaitėi-Kodzei, Martynui Simanavičiui, Aušrai Vaitiekaitei, Dainai Pamedytytei, Vilijai Rubinaitei, Ritai Lasickienei, Vaidai Simanavičienei už pagalbą atliekant įvairius eksperimentus. Taip pat dėkoju Liodziai Diglienei už praskaidrintus vakarus ir puikiai nuotaika pripildytą laboratoriją.

Esu dėkinga Simonui Masiuliui, kuris sugebėjo mane įkalbėti atvažiuoti į Oksfordą ir jo pagalbą man ten patenkant. Nuoširdžiai dėkoju Robert Gilbert ir Tao Ni už jų entuziazmą ir patikėjimą. Dėkoju Robert už nuolatinį palaikymą ir galimybę stažuotės metu tęsti

doktorantūros darbus. Dėkoju Robert už jo pagalbą atliekant analitinio ultracentrifugavimo eksperimentus ir analizuojant jų rezultatus. Šiltai dėkoju Tao, kuris labai daug prisidėjo prie to, kad ta stažuotė buvo ne tik nuotykinga, bet taip pat rezultatyvi bei prasminga. Esu dėkinga už jo begalinį kantrumą, pasidalinimą žiniomis, išvalgomis. Taip pat dėkoju visiems kolegoms Strubi, kurie man padėjo ir palaikė, ypatingai, Xiulian, Suzi, Monica, Margaret, Jesper, Sophie, Gergely.

Dėkoju Janinai Žiūkaitei ir Danutei Noreikienei už jų nuoširdžią pagalbą tvarkant dokumentus visos doktorantūros metu. Taip pat dėkoju Ginai Jagelavičiūtei už pagalbą ir geranoriškumą tvarkant dokumentus stažuotės finansavimo ir administravimo klausimais. Dėkoju Astai Abraitienei už pagalbą tvarkant dokumentus ir organizuojant gynimą.

Dėkoju Mindaugui Zarembai ir Sauliui Servai už tai, kad sutiko recenzuoti šį darbą ir už visus jų pateiktus komentarus ir klausimus. Taip pat dėkoju visoms kitoms komisijos narėms, Vilmantei Borutaitei, Rimai Budvytytei ir Susan Black, už tai kad geranoriškai sutiko jomis būti.

Dėkoju savo draugams, ypatingai, Jūratei, Eglei, Vytautui, Justinai, Justinai, Artiomui už tai kad buvo šalia, kai reikėjo. Dėkoju Jūratei Skerniškytei ir Eglei Kukcinavičiūtei už didžiulę pagalbą sklاندaus disertacijos bei su ja susijusių dokumentų pateikimo klausimais. Dėkoju savo brangiai draugei Justinai Bogdaitei už vertingus patarimus ir pagalbą vizualizuojant rezultatus. Taip pat dėkoju Miglei Kazlauskienei už empatišką palaikymą pačioje studijų pabaigoje.

Esu dėkinga savo sužadėtiniui Gedui, kuris mane žavi kaip ieškotojas ir atradėjas gražiausia šių žodžių prasme. Dėkoju jam už nuolatinę pagalbą ir palaikymą tiek planuojant eksperimentus, tiek juos atliekant ir juos aprašant. Esu ypatingai dėkinga už nesibaigiančias diskusijas atliekamų tyrimų bei mokslo plačiąja prasme temomis visus šiuos metus. Dėkoju savo tetai Kristinai už pagalbą ir palaikymą. Šiltai dėkoju savo tėvams, Remigijai ir Giedriui, bei broliui Mindaugui už tai, kad visada tikėjo ir skatino siekti daugiau bei buvo pasirengę padėti kada tik beprireiktų.

TURINYS

DISERTACIJOS STRUKTŪRA	9
ĮVADAS	9
METODAI	14
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	19
1 VLY pasižymi tropizmu žmogaus baltymą CD59 turinčioms ląstelėms	19
2 VLY geba oligomerizuotis cholesteroliu praturtintų liposomų paviršiuje	21
3 CD59 geba inicijuoti VLY oligomerizaciją, bet porai sudaryti būtinas cholesterolis	22
4 CD59 padidina VLY afiniškumą membranai ir pagreitina VLY poros formavimąsi	24
5 VLY monomero-monomero sąveikos sritis yra paremta β -lakšto pratęsimu gretimų VLY molekulių D3 domenuose.....	26
6 Sąveika tarp VLY ir CD59 yra paremta β -lakšto pratęsimu tarp VLY D4 domeno ir CD59	28
IŠVADOS.....	30
LITERATŪROS ŠALTINIAI.....	31
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS.....	33
PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE.....	34
SUMMARY	35
CV	36

DISERTACIJOS STRUKTŪRA

Disertaciją (anglų kalba) sudaro septynios pagrindinės dalys: įvadas, literatūros apžvalga, metodai, rezultatai, diskusija, išvados, literatūros sąrašas. Žemiau pateikiama disertacijos santrauka.

ĮVADAS

Poros formavimasis yra plačiai paplitęs reiškinys įvairiuose gyvuose organizmuose. Jo taikiniu gali būti tiek ląstelės plazminė membrana, tiek ir ląstelės viduje esančios membranos. Membranoje susidaranti poros funkcijos gali būti labai skirtingos: homeostazės sutrikdymas abipus membranos, toksiškų molekulių transportas per membraną ar net patogenų išsilaisvinimas iš organelių.

Įvairios patogeninės bakterijos sekretuoja tirpius baltymus – poras formuojančius toksinus (PFT), kurie specifiskai sąveikauja su šeimininko ląstelės membrana ir susirenka į žiedo ar arkos formos oligomerines struktūras, kurios perveria membranos dvisluoksnį (Dal Peraro and Van der Goot, 2016). Nuo cholesterolio priklausomi citoliziniai (CDC) yra plačiai paplitęs ginklas žmogaus patogeninių bakterijų arsenale ir sudaro didžiulę PFT klasę. Įdomu tai, kad CDC priklauso tai pačiai baltymų superšeimai, kaip ir įgimtojo imuniteto komplemento veikime dalyvaujantis membranos atakos kompleksas baltymai (membranos atakos kompleksas-perforinų (MACPF) superšeima) (Rosado et al., 2008).

Sukaupti tyrimų duomenys rodo, kad bakterijos sekretuojamus CDC baltymus naudoja kaip vienus pagrindinių virulentiškumo veiksnių (Los et al., 2013). Pavyzdžiui, *Streptococcus pneumoniae* pneumolizinas atlieka svarbią funkciją sėkmingai *S. pneumoniae* pernašai iš vieno šeimininko į kitą (Zafar et al., 2017). *Clostridium perfringens* perfringolizinas padeda bakterijai išsilaisvinti iš makrofagų ir taip išvengti imuninio atsako (O'Brien and Melville, 2004). Fakultatyvios viduląstelinės bakterijos *Listeria monocytogenes* atveju jos sekretuojamas CDC listeriolizinas suteikia bakterijai

galimybę išsilaisvinti iš fagosomų ir toliau sėkmingai daugintis šeimnininko ląstelės citozolyje (Birmingham et al., 2008).

CDC baltymų priklausomybė nuo cholesterolio atakuojamos ląstelės membranoje parodo jų tropizmą eukariotinėms ląstelėms. Nors daugelio CDC atveju cholesterolis yra būtinas ir pakankamas membranos komponentas membranos poros susiformavimui, dalis CDC atstovų turi papildomus receptorių, kuriais gali būti tiek glikanai, tiek membraniniai baltymai (Farrand et al., 2008; Shewell et al., 2014; Soltani et al., 2007). Vienas iš tokių CDC yra šio tyrimo objektas – vaginolizinas (VLY) sekretuojamas bakterijos *Gardnerella vaginalis* (Gelber et al., 2008). Ši bakterija yra siejama su moters lyties takų mikrofloros pakitimais, dar vadinamais bakterine vaginoze (BV) (Catlin, 1992; Schellenberg et al., 2017). BV mechanizmas nėra aiškus, tačiau yra glaudžiai siejamas su anaerobinių bakterijų išvešėjimu, kurios išstumia įprastai dominuojančias *Lactobacillus* rūšis. Nepaisant galimos *G. vaginalis* sąsajos su BV, *G. vaginalis* yra aptinkama ir sveikų moterų lyties takuose (Ma et al., 2012; Schellenberg et al., 2017). Manoma, kad vaginalinę mikroflorą iš pusiausvyros išveda tam tikri *G. vaginalis* subtipai arba jų sąveika su kitomis anaerobinėmis bakterijomis. Tačiau konkretūs veiksniai, kurie galėtų prisidėti prie *G. vaginalis* fenotipo pokyčių, nulemiančių jos virulentiškumą, nėra žinomi. Pagal kitų CDC sąsajas su patogenų virulentiškumu, VLY yra laikomas vienu iš potencialių įrankių, kuriuos *G. vaginalis* panaudoja savo patogenezėje (Los et al., 2013).

Šiame darbe nagrinėjome VLY ir CD59 sąveiką ir šios sąveikos vaidmenį VLY tropizme žmogaus ląstelėms. Taip pat norėjome išsiaiškinti cholesterolio ir CD59 funkcijas VLY poros formavimesi. Galiausiai, siekėme apibūdinti kaip VLY monomerai sąveikauja tarpusavyje formuodami porą.

Tyrimo tikslas

Ištirti ir apibūdinti *Gardnerella vaginalis* vaginolizino savybes ir poros formavimosi mechanizmą *in vitro* sistemose.

Tyrimo uždaviniai

- Palyginti vaginolizino (VLY) ir kitų nuo cholesterolio priklausomų citolizinių citolizinių aktyvumą ir jų tropizmą žmogaus ląstelėms;
- Sukurti ir optimizuoti dirbtines modelines membranas VLY poros formavimosi dinamikai stebėti;
- Ištirti žmogaus CD59 baltymo vaidmenį VLY poros formavimesi;
- Ištirti membranoje esančio cholesterolio vaidmenį VLY poros formavimesi;
- Nustatyti VLY ir CD59 baltymo sąveikos sritį ir identifikuoti svarbiausias aminorūgštis, užtikrinančias VLY-CD59 sąveiką;
- Ištirti VLY monomero-monomero sąveikos prigimtį.

Mokslinis naujumas

Šio tyrimo metu praplėtėme supratimą apie *Gardnerella vaginalis* vaginolizino (VLY) veikimo mechanizmą eksperimentiniais duomenimis parodydami, kad žmogaus baltymas CD59 paspartina VLY poros formavimąsi. Sukūrėme ir optimizavome metodus, kurie leido įvertinti poros formavimosi dinamiką naudojant dirbtines modelines liposomų membranas, praturtintas cholesteroliu. Parodėme, kad VLY geba suformuoti poras be sąveikos su CD59, priešingai nei kitas nuo cholesterolio priklausomas citolizinas (CDC) – intermedilizinas. Taip pat, pakeisdami tam tikras aminorūgštis VLY, identifikavome sąveikos paviršius tarp VLY ir CD59 bei tarp gretimų VLY molekulių joms oligomerizuojantis. Abi šios sąveikos sritys yra parentos β -lakšto pratęsimu.

Šio tyrimo metu kita mokslininkų grupė išsprendė VLY kristalo struktūrą komplekse su CD59 (Lawrence et al., 2016), tačiau jos nepatvirtino mutageneze, kurią mes atlikome. Mutagenezės rezultatai patvirtino kristalo struktūroje atskleistus kontaktus tarp VLY ir CD59 ir taip pagrindė išspręstą kristalo struktūrą. Taip pat charakterizavome VLY tropizmą žmogaus ląstelėms. Pirmą kartą parodėme, kad membraninis receptorius – CD59 baltymas, turi didelę įtaką CDC poros formavimosi dinamikai. Tikėtina, kad fiziologinėmis sąlygomis net ir nedidelis poros formavimo aktyvumo sustiprinimas gali turėti didelės įtakos toksino veikimui.

Mūsų tyrimo metu buvo identifikuotas pirmas klinikinis atvejis, kuomet *G. vaginalis* sukėlė encefalopatiją. Įvertinome šio klinikinio kamieno savybes, atskleisdami aukštą VLY sekrecijos lygį, kuris galimai galėtų būti susijęs su stebėtu retu *G. vaginalis* infekcijos fenotipu. Tai indikuoja apie jau seniai egzistuojančią, tačiau vis dar nepatvirtintą, nuomonę apie VLY kaip virulentiškumo veiksnio svarbą *G. vaginalis* patogenezėje.

Ginamieji teiginiai

- VLY pasižymi tropizmu žmogaus ląstelėms ir efektyviau formuoja poras ląstelėse, turinčiose žmogaus baltymą CD59;
- Membranoje esantis CD59 inicijuoja VLY oligomerizaciją ir pagreitina VLY poros formavimąsi;
- Membranoje esantis cholesterolis yra būtinas ir pakankamas VLY poros susiformavimui;
- Sąveika tarp VLY ir CD59 yra paremta β -lakštų pratęsimu tarp VLY D4 domeno ir CD59;
- VLY monomero-monomero sąveika yra paremta VLY D3 domeno β -lakšto pratęsimu.

METODAI

Rekombinantinių baltymų sintezė ir gryninimas

VLY, PLY ir ILY genai buvo klonuoti į pET28a(+) (Thermo Fisher Scientific) plazmidinį vektorių ir susintetinti *E. coli* Tuner arba BL21(DE3) kamienuose jų N-galą suliejus su 6xHis žyme. Baltymai buvo išgryninti naudojant Ni²⁺ jonus cheluojančios afininės, jonų mainų chromatografijos bei gelfiltracijos metodus. Mutacijos VLY molekulėje buvo įvestos kryptingos mutagenezės metodu. Eksperimentams su liposomomis savo sudėtyje turinčiomis 18:1 DGS-NTA(Ni) lipidų CDC baltymų gryninimo protokolas buvo papildytas viena modifikacija, trombino proteaze nuskeliant 6xHis žymę. VLY ar jo mutantiniai baltymai buvo saugomi 20 mM natrio acetato pH 5,5 (25 °C) (arba 20 mM MES pH 5,5 (25 °C)), 100 mM amonio sulfato, 0,01 % Tween-80 buferiniame tirpale. PLY buvo saugomas 20 mM HEPES pH 7,5 (25 °C), 200 mM NaCl buferiniame tirpale. ILY buvo saugomas 20 mM natrio acetato pH 5,5 (25 °C), 100 mM amonio sulfato, 0,01 % Tween-80 buferiniame tirpale.

CD59 koduojantis genas buvo klonuotas į pHLsec(+) plazmidinį vektorių (Aricescu et al., 2006), suliejant baltymo N-galą su sekrecijos seka ir pašalinant C-gale esančią GPI inkaro prijungimo seką. CD59 sintezė buvo gauta atliekant laikiną žinduolių ląstelių HEK293T transfekciją. Baltymas buvo išgrynintas iš ląstelių augimo terpės pritaikant Ni²⁺ jonus cheluojančios afininės bei gelfiltracijos metodus.

CHO ląstelių linijos sintetinančios žmogaus baltymą CD59 gavimas

CD59 koduojantis genas buvo klonuotas į pFUSE vektorių (InvivoGen), kartu su C-gale esančia GPI inkaro prijungimo seka. Šiuo konstruktu transfekavus CHO ląsteles buvo atliekama atranka zeocinu, kuriam atsparumą suteikė įterptas vektorius. CD59 sintezė ir lokalizacija ląstelių paviršiuje buvo patvirtinta tėkmės citometrijos metodu, ląsteles žymint antikūnais prieš CD59, konjuguotais su FITC žyme. Buvo pasirinktos keturios ląstelių linijos, sintetinančios

skirtingą CD59 kiekį (CHO-CD59^{4A9}, CHO-CD59^{4A11}, CHO-CD59^{3E9}, CHO-CD59^{4F1}).

CDC hemolizinio aktyvumo nustatymas

Žmogaus eritrocitai buvo atskirti nuo kraujo plazmos centrifuguojant 200 RCF kambario temperatūroje (KT). Eritrocitai buvo resuspenduoti 950 µl PBS buferiniame tirpale kiekvienai reakcijai. Atlikus serijinius CDC baltymų skiedimus PBS buferiniame tirpale, 50 µl šių baltymų buvo sumaišyta su eritrocitų suspensija ir inkubuojama 15 min KT. Mėginius nucentrifugavus 200 RCF KT, supernatantai buvo analizuojami spektrofotometriškai, matuojant 415 nm bangos ilgio šviesos sugertį (A_{415nm}). PBS be CDC buvo naudojamas kaip neigiama kontrolė, o eritrocitai praskiesti dejon. H₂O – kaip teigiama kontrolė, kurios reikšmė buvo prilyginta 100 % eritrocitų lizės. Naudojantis GraphPad Prism programine įranga buvo pasirinktas eksperimentinius taškus aprašantis keturių parametų dozės-atsako modelis. Hemolizinis aktyvumas buvo įvertintas EC50 verte, žyminti CDC koncentraciją, kuria paveikus eritrocitus, gaunama 50 % maksimalios hemolizės.

CDC citolizinio aktyvumo nustatymas

Adhezinės CHO ir CHO-CD59^{4F1} ląstelės buvo kultivuojamos 96 šulinėlių plokštelėse DMEM:Ham's F12 (1:1) terpėje papildytoje 10 % FBS iki 70 % konfluentiškumo. Ląstelės buvo du kartus praplautos su beserumine DMEM terpe. Atlikus serijinius CDC baltymų skiedimus beseruminėje DMEM terpėje, 100 µl jų buvo užnešta į šulinėlius su ląstelėmis ir inkubuota 1 h 37 °C temperatūroje esant 5 % CO₂. Tuomet buvo pridedama 20 µl MTS reagento (Promega) ir ląstelės inkubuojamos dar 4 h 37 °C temperatūroje esant 5 % CO₂. Reakcijos mišinys be CDC buvo naudotas kaip neigiama kontrolė, o tušti šulinėliai (be ląstelių) – kaip teigiama kontrolė, prilyginta 100 % ląstelių lizės. Naudojantis GraphPad Prism programine įranga buvo pasirinktas eksperimentinius taškus aprašantis keturių parametų dozės-atsako modelis.

VLY sąveikos su ląstelių membrana tyrimas tėkmės citometrijos metodu

CHO ir CHO-CD59^{4F1} ląstelės buvo atkabintos nuo augimo paviršiaus paveikus StemPro Accutase fermentu (Gibco by Life Technologies), praplautos ir resuspenduotos PBS buferiniame tirpale. Kiekvienam matavimui buvo naudojama 1×10^5 ląstelių (40 μ l), kurios buvo sumaišytos su 10 μ l VLY mutantinių baltymų (galutinės koncentracijos – 15 nM, 30 nM, 100 nM) ir inkubuota 30 min 37 °C temperatūroje. Reakcijos mišinys be VLY baltymų buvo naudotas kaip neigiama kontrolė. Toliau ląstelės buvo žymėtos pirminiais (monokloniniais 9B4 arba 21A5 antikūnais prieš VLY) ir antriniais antikūnais konjuguotais su fluorescuojančia PE žyme. Po kiekvienos inkubacijos ląstelės buvo du kartus praplaunamos su inkubacijos buferiniu tirpalu (PBS su 1 % FBS ir 0,1% NaN₃) ir centrifuguojamos. Toliau ląstelės buvo fiksuotos naudojant BD CytoFix tirpalą (BD Biosciences) 10 min 4 °C temperatūroje ir analizuotos tėkmės citometrijos metodu naudojant CyFlow Space tėkmės citometrą (Partec). Tėkmės citometrijos duomenys buvo analizuojami FlowJo programine įranga. Fluorescencijos intensyvumo mediana (MFI) buvo normalizuota (nMFI) padalinant ją iš neigiamos kontrolės MFI vidurkio.

VLY sąveikos su cholesteroliu kiekybinis įvertinimas taškinio imunobloto metodu

Cholesterolis buvo ištirpintas chloroforme ir imobilizuotas ant polivinilfluorido membranos (0,45 μ m porų dydžio). Ant metanolyje suvilgytos membranos buvo užnešta 2 μ l cholesterolio tirpalo (serijiniai skiedimai nuo 32,5 iki 0,01 mM). Membraną išdžiovinus, ji buvo blokuojama 3 % pieno miltelių ištirpintų PBS tirpale 1 h KT. Tolimesnėms inkubacijoms baltymai buvo skiedžiami blokavimo tirpale papildytame 0,01 % Tween-20. Po blokavimo membrana buvo inkubuojama VLY tirpale 1 h KT. Nuplovus membraną PBS su 0,01 % Tween-20, membrana buvo inkubuojama pirminių

monokloninių 9B4 antikūnų prieš VLY tirpale 1 h KT. Nuplovus membraną, ji buvo inkubuojama antrinių antikūnų žymėtų krienų peroksidaze tirpale 1 h KT. Nuplovus membraną, ji buvo inkubuojama su TMB-substrato tirpalu (Sigma-Aldrich) 1 min, nuplaunama dejon. H₂O ir išdžiovinama.

Liposomų gamyba

Lipidai buvo ištirpinti chloroforme ir sumaišyti reikalingomis proporcijomis iki galutinio kiekio lygaus 2 mg (1 lentelė). Lipidų plėvelė buvo suformuota išgarinant chloroformą. Išdžiovinti lipidai buvo hidratuoti 1 ml 10 mM HEPES pH 7,5 (25 °C), 150 mM NaCl buferinio tirpalo intensyviai purtant 10 min. Po to buvo atliekami trys užšaldymo-atšildymo ciklai. Hidratuoti lipidai buvo 11 kartų perleisti per 100 nm polikarbonato membraną. Liposomų homogeniškumas buvo patvirtintas dinaminės šviešos sklaidos metodu.

1 lentelė. Naudotų liposomų sudėtis.

1	DOPC/cholesterolis	45/55 mol%
2		60/40 mol%
3		70/30 mol%
4	DOPC	100 mol%
5	POPC/POPS/DGS-NTA(Ni)/cholesterolis	49/10/1/40 mol%
6	POPC/POPS/DGS-NTA(Ni)	89/10/1 mol%

VLY poros formavimosi stebėjimas liposomų pralaidumo metodu

Liposomų pralaidumo nustatymui liposomos buvo ruošiamos analogiškai kaip aptarta aukščiau, tik hidratacijos metu lipidai buvo sumaišomi su buferiniu tirpalu turinčiu 50 mM sulforodamino B (SRB) dažo. Į liposomų vidų nepatekęs dažas buvo pašalinamas PD-10 kolonėle (GE Healthcare) pakeičiant buferinį tirpalą. Kur paminėta, prie liposomų buvo prijungtas CD59 baltymas. Siekiant tai padaryti, liposomos, savo sudėtyje turinčios DGS-NTA(Ni) lipidų, buvo inkubuojamos su 6xHis žymėtu CD59 per naktį 4 °C temperatūroje. Liposomų pralaidumo eksperimentas buvo atliekamas

96 šulinėlių plokštelėse 25 °C temperatūroje kas 10 s matuojant fluorescencijos intensyvumą. Neigiama kontrole buvo laikomas buferinis tirpalas be VLY, o teigiama – buferinis tirpalas su 1 % Tween-80, kuris pilnai suardo liposomas.

VLY oligomerų SDS agarozės gelio elektroforezė

CDC baltymai (53.7 pmol VLY, 54.6 pmol PLY or 52.4 pmol ILY) buvo inkubuojami su 15 nmol liposomų arba be liposomų 20 µl reakcijos mišinyje 30 min 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos reakcijos mišinys buvo sumaišytas su baltymų užnešimo buferiniu tirpalu (300 mM Tris-HCl pH 6,8 (4 °C), 0,05% bromfenolio mėlis 50 % glicerolis), į kurį buvo arba pridedama, arba ne, 2 % (*masės/tūrio*) SDS ir mėginys buvo arba kaitinamas 7 min 95 °C, arba ne. Mėginiai buvo išskirstyti 1,5 % agarozės gelyje (agarozė buvo ištirpinta Tris-glicino SDS buferiniame tirpale (Pierce, Thermo Fisher Scientific)). Gelis buvo nudažytas Kumasi mėlynojo dažu.

Transmisinė elektronų mikroskopija

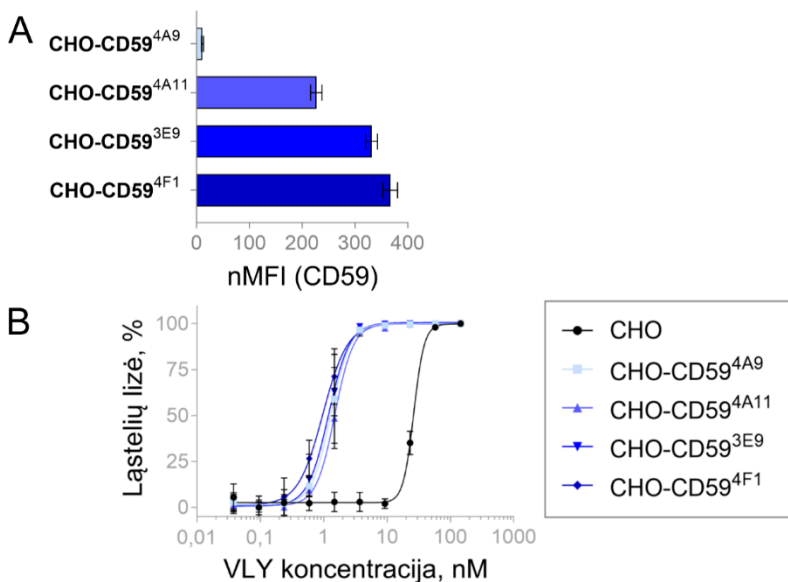
Dvidešimt µl liposomų mėginio (2 mg/ml) buvo inkubuota su 3 µg VLY (0.15 mg/ml galutinė koncentracija) 30 min 37 °C temperatūroje. Mėginys (3,5 µl) buvo užnešamas ant tinklelio (angl. *grid*) (Kat. Nr. CF300-Cu-50, Electron Microscopy Sciences) ir inkubuojamas 1 min. Tinklelį nusausinusi, jis buvo tris kartus nuplaunamas dejon. H₂O ir dažomas su uranilformiato tirpalu 1 min. Mėginys buvo mikroskopuotas transmisiniu elektronų mikroskopu FEI T12 120 kV režimu.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

1 VLY pasižymi tropizmu žmogaus baltymą CD59 turinčioms ląstelėms

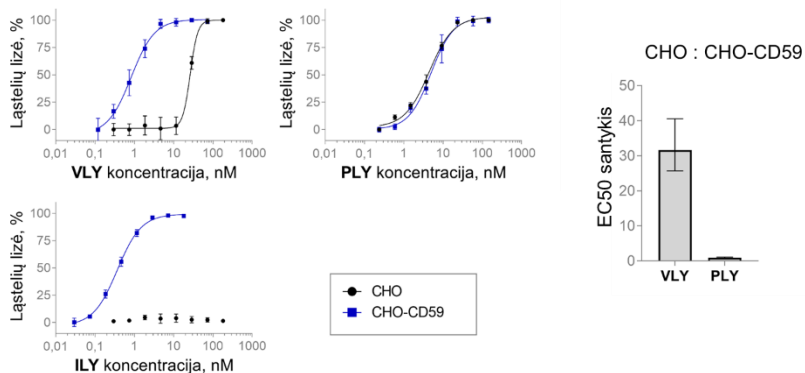
Siekdami iširti vaginolizino (VLY) tropizmą žmogaus ląstelėms, sukonstravome CHO ląstelių linijas, sintetinančias skirtingą kiekį žmogaus baltymo CD59 (CHO-CD59^{4A9}, CHO-CD59^{4A11}, CHO-CD59^{3E9}, CHO-CD59^{4F1}) (1 pav., A).

Parodėme, kad CD59 lemia efektyvesnę ląstelių, sintetinančių CD59, lizę nepriklausomai nuo CD59 kiekio ląstelių paviršiuje (1 pav., B).



1 pav. CD59 padidina vaginolizino (VLY) poros formavimosi efektyvumą nepriklausomai nuo CD59 kiekio ląstelių paviršiuje. A – santykinis CD59 kiekis CHO-CD59 ląstelių paviršiuje nustatytas tėkmės citometrijos metodu ląsteles žymint monokloniniais antikūnais prieš CD59, konjuguotais su FITC fluorescuojančia žyme; stulpelinė diagrama vizualizuoja normalizuotą fluorescencijos intensyvumo medianą (nMFI); paklaidos žymi standartinį nuokrypį; N=3. B – VLY citolizinis aktyvumas nustatytas MTS metodu matuojant ląstelių gyvybingumą. VLY buvo veikiamos CHO ir CHO-CD59 ląstelės, sintetinančios skirtingą CD59 kiekį; paklaidos žymi standartinį nuokrypį; N=3.

Palyginome, kaip keičiasi CHO ar CHO-CD59^{4F1} ląstelių gyvybingumas jas paveikus kitais giminingais CDC toksinais – pneumolizinu (PLY) ir intermedilizinu (ILY) (2 pav.). ILY lizavo tik CD59 sintetinančias ląsteles. Tai rodo sąveikos su CD59 svarbą šio toksino poros formavimesi. VLY ir PLY gebėjo lizuoti tiek CHO, tiek CHO-CD59^{4F1} ląsteles. VLY atveju CD59 ženkliai padidino poros formavimosi efektyvumą, ko nebuvo stebima ląsteles veikiant PLY (2 pav.).



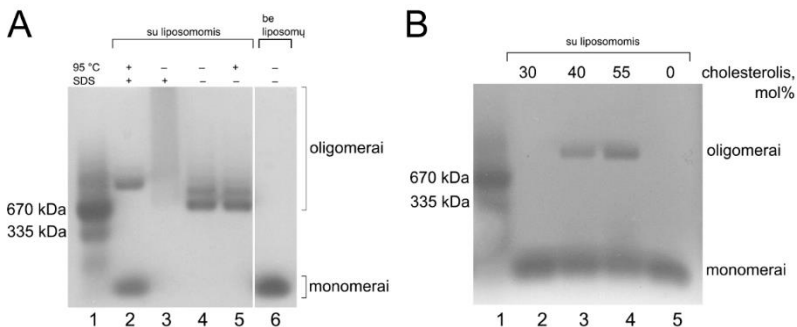
2 pav. Vaginolizino (VLY) ir intermedilizino (ILY) citolizinis aktyvumas pasižymi tropizmu CD59 sintetinančioms ląstelėms. VLY, ILY ir pneumolizino (PLY) citolizinis aktyvumas įvertintas MTS metodu veikiant CHO ir CHO-CD59^{4F1} ląsteles šiais toksinais; eksperimentiniams taškams buvo pritaikytas keturių parametru dozės-atsako modelis naudojantis GraphPad Prism; paklaidos žymi standartinį nuokrypį; N=3. Stulpelinė diagrama iliustruoja EC50 reikšmių santykį tarp CHO ir CHO-CD59^{4F1} ląstelių lizės, kurios buvo paveiktos VLY arba PLY; paklaidos žymi 95 % pasikliautinį intervalą; N=3.

Mūsų tyrimas atskleidė ryškius skirtumus tarp VLY ir kito nuo CD59 priklausomo citolizino – ILY. VLY geba lizuoti ir ne žmogaus kilmės ląsteles, nors ir mažesniu efektyvumu. Ši savybė leidžia postuliuoti, kad VLY priklausomybė nuo CD59 yra kitokios prigimties lyginant su ILY.

2 VLY geba oligomerizuotis cholesteroliu praturtintų liposomų paviršiuje

Siekdami ištirti VLY citolizinio aktyvumo mechanizmą, kai ląstelės yra lizuojamos be sąveikos su CD59, panaudojome dirbtines lipomas praturtintas cholesteroliu. Kadangi CDC poros formavimosi metu preparai subrendus oligomeras tampa atsparus SDS poveikiui, lipomas po inkubacijos su VLY vizualizavome SDS agarozės gelio elektroforezės metodu.

Priklausomai nuo to, kaip VLY mėginys po inkubacijos su DOPC:cholesterolio (60 mol%:40 mol%) liposomomis buvo paruoštas (pridedama SDS ar paveikiama karščiu), stebėjome skirtingai agarozės gelyje migruojančias oligomerų formas (3 pav., A). Keičiant cholesterolio kiekį liposomų sudėtyje nustatėme, kad egzistuoja ribinis cholesterolio kiekis (apie 40 mol%), kuris leidžia stebėti SDS atsparių VLY oligomerų susidarymą (3 pav., B).

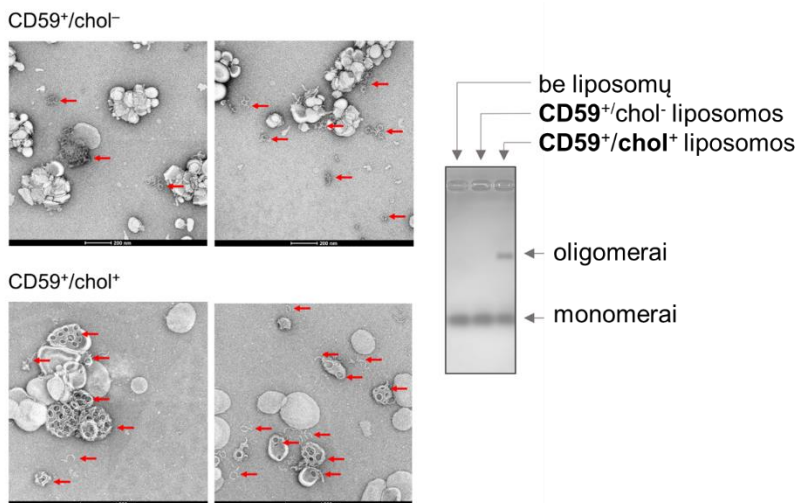


3 pav. Vaginolizinas (VLY) geba formuoti oligomeras atsparius SDS cholesteroliu turtingų liposomų membranoje. A – SDS agarozės gelio nuotrauka, vaizduojanti VLY oligomeras po inkubacijos su DOPC:cholesterolio (60 mol%:40 mol%) liposomomis; užrašai gelio nuotraukos viršuje pažymi kaip buvo veikiami mėginiai prieš atliekant elektroforezę. 1 takelis – tiroglobulinas buvo naudojamas kaip didelės molekulinės masės standartas (~670 kDa dimeras ir ~335 kDa monomeras). B – SDS agarozės gelio nuotrauka, vaizduojanti VLY oligomeras po inkubacijos su liposomomis turinčiomis skirtingą cholesterolio kiekį (30 mol%, 40 mol%, 55 mol%, 0 mol%). 1 takelis – tiroglobulinas buvo naudojamas kaip didelės molekulinės masės standartas (~670 kDa dimeras ir ~335 kDa monomeras).

Panaudodami dirbtines cholesteroliu praturtintas liposomas pademonstravome, kad VLY geba oligomerizuotis ir sudaryti SDS atsparius oligomerus, kurie indikuoja, kad susidaręs oligomeras yra subrendusi prepora arba membraną pervėrusi pora. Taip pat patvirtinome anksčiau pastebėtą dėsningumą, kad reikalingas pakankamas cholesterolio kiekis membranoje CDC porai susiformuoti (Christie et al., 2018).

3 CD59 geba inicijuoti VLY oligomerizaciją, bet porai sudaryti būtinas cholesterolis

Tiriant CD59 baltymo vaidmenį VLY poros formavimesi ir modeliuojant ląstelių paviršių, sukūrėme ir optimizavome dirbtines liposomas, kurios savo paviršiuje turėjo prijungtą CD59.

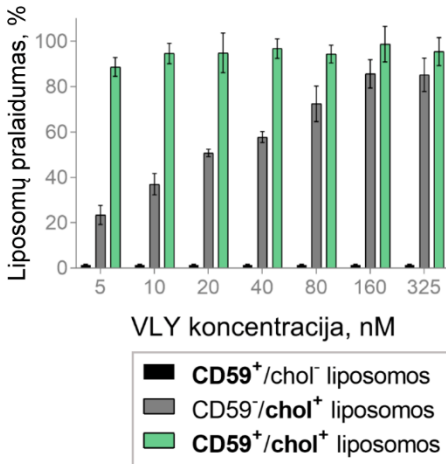


4 pav. CD59 geba inicijuoti vaginolizino (VLY) oligomerų atsparių SDS formavimąsi. Reprezentatyvios neigiamo dažymo elektronų mikroskopijos nuotraukos vaizduoja CD59⁺/chol⁻ ir CD59⁺/chol⁺ liposomas paveiktas VLY; SDS agarozės gelio nuotrauka vaizduoja liposomų, paveiktų VLY, mėginius.

Parodėme, kad CD59 gali inicijuoti VLY oligomerizaciją (4 pav.), bet tik tada, kai yra prijungtas liposomų paviršiuje. Analitinio ultracentrifugavimo metodu analizuojant VLY būsenas po inkubacijos

su tirpale esančiu CD59 nebuvo nustatyta didelės molekulinės masės oligomerų.

VLY oligomerai, susidarę ant liposomų, turinčių prijungtą CD59, bet neturinčių cholesterolio, nebuvo atsparūs SDS poveikiui ir tai indikuoja, kad susidaro ankstyvoji prepora (4 pav.). Tik tada, kai liposomų, turinčių prijungtą CD59, sudėtį papildėme cholesteroliu, elektronų mikroskopijos nuotraukose stebėjome porų susidarymą (4 pav.). Funkcionalių porų susidarymą patvirtinome ir liposomų pralaidumo eksperimentu, kurio metu, susidarius poroms, stebėjome fluorescuojančio dažo, sulforodamino B, atpalaidavimą iš liposomų (5 pav.).



5 pav. CD59 padidina sulforodamino B (SRB) atpalaidavimą iš liposomų, paveiktų vaginolizinu (VLY). Stulpelinė diagrama iliustruoja SRB atpalaidavimą iš liposomų paveiktų VLY (5-325 nM); eksperimente buvo naudotos CD59⁺/chol⁻, CD59⁻/chol⁺, CD59⁺/chol⁺ liposomos; paklaidos žymi standartinį nuokrypį; N=4.

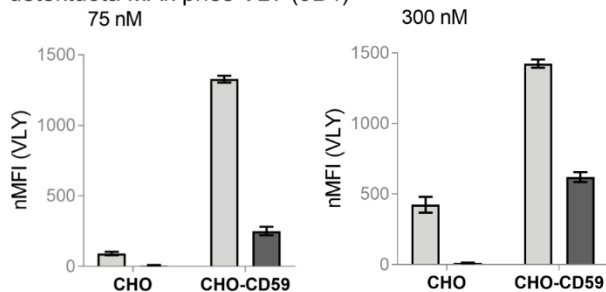
Mūsų gauti eksperimentiniai duomenys parodė, kad tik prie membranos prijungtas, bet ne laisvas CD59 inicijuoja VLY oligomerizaciją. Tai rodo, kad CD59 orientavimas membranos plokštumoje turi didelę svarbą jo funkcijai VLY poros formavimesi. Kadangi ląstelėse CD59 membranoje įsitvirtina GPI inkaru ir

lokalizuojasi lipidų plaustuose, kuriuose yra didelė cholesterolio koncentracija, manome, kad CD59 gali padėti nukreipti VLY molekules į lipidų plaustus ir taip jas sukongcentruoti bei orientuoti membranos plokštumoje.

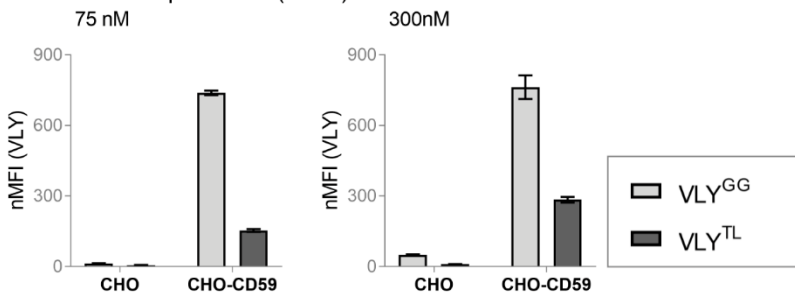
4 CD59 padidina VLY afiniškumą membranai ir pagreitina VLY poros formavimąsi

Siekėme išsiaiškinti, ar CD59 baltymo buvimas cholesteroliu praturtintoje membranoje padidina VLY afiniškumą membranai.

detekuota MAK prieš VLY (9B4)



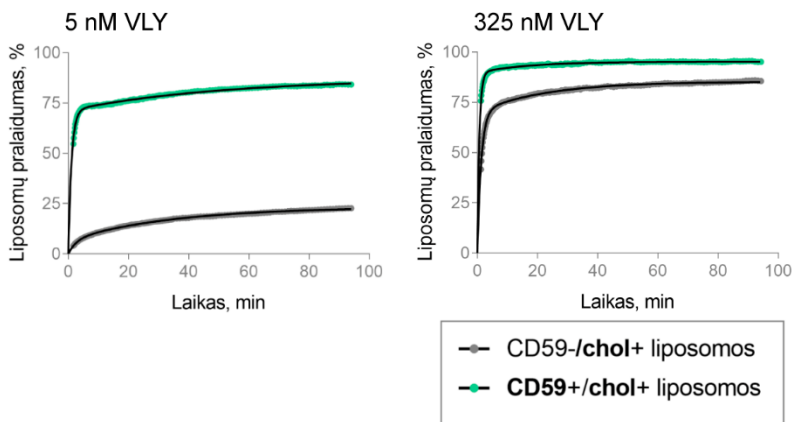
detekuota MAK prieš VLY (21A5)



6 pav. CD59 padidina vaginolizino (VLY) afiniškumą membranai. VLY mutantinių baltymų (VLY^{GG} ir VLY^{TL}) sąveika su ląstelių membrana buvo įvertinta tėkmės citometrijos metodu prisijungusių VLY detektuojant pirminiais monokloniniais 9B4 arba 21A5 antikūnais prieš VLY ir antrinais antikūnais žymėtis fluorescuojančia PE žyme; stulpelinės diagramos vaizduoja santykinę VLY mutantinių baltymų, prisijungusių prie CHO arba CHO-CD59^{4F1} ląstelių, kiekį, išreikštą normalizuota fluorescencijos intensyvumo mediana (nMFI); N=3.

Šiuo tikslu atlikome VLY sąveikos su ląstelėmis eksperimentus. Inkubavome ląsteles su mutantiniais VLY baltymais ir prisijungusias VLY molekules žymėjome pirminiais ir antriniais antikūnais su fluorescuojančia PE žyme. Rezultatus analizavome tėkmės citometrijos metodu.

Šiems eksperimentams panaudojome du VLY mutantinius baltymus, VLY^{GG} ir VLY^{TL}. VLY^{GG} turėjo konservatyvaus dviejų glicinų motyvo mutaciją D3 domene, kuri išjungia VLY oligomerizacijos aktyvumą. VLY^{TL} turėjo dviejų konservatyvių treonino ir leucino aminorūgščių mutaciją D4 domene, kuri suardo VLY sąveiką su cholesteroliu. Parodėme, kad VLY^{GG} mutantinis baltymas sąveikauja tiek su CHO, tiek su CHO-CD59 ląstelėmis, tačiau su pastarosiomis sąveika buvo žymiai stipresnė (6 pav.). VLY^{TL}, kaip ir tikėtasi, nesąveikavo su CHO ląstelėmis, tačiau sąveika su CHO-CD59 ląstelėmis buvo stebima (6 pav.).



7 pav. CD59 pagreitina sulforodamino B (SRB) atpalaidavimą iš liposomų jas paveikus vaginolizinu (VLY). Reprezentatyvios liposomų pralaidumo (SRB atpalaidavimo iš liposomų) priklausomybės nuo laiko kreivės po poveikio 5 nM ir 325 nM VLY; eksperimentiniams taškams buvo pritaikytas dviejų fazių eksponentinis modelis naudojantis GraphPad Prism.

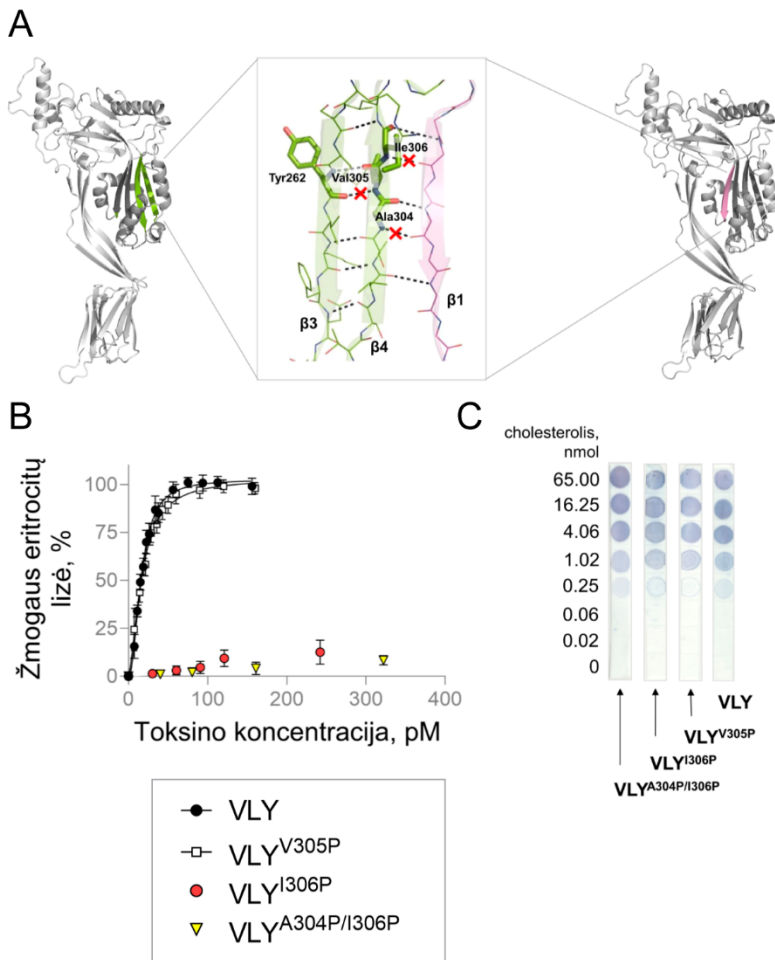
Du pagrindinius membranos komponentus, cholesterolį ir CD59, perkėlus į dirbtines liposomas, atlikome liposomų pralaidumo

stebėjimo laike eksperimentus. Parodėme, kad CD59 buvimas liposomų paviršiuje pagreitina liposomų, paveiktų VLY, lizę (7 pav.). Tačiau PLY atveju, šio nuo CD59 nepriklausančio CDC, poveikis liposomoms ir liposomų lizės dinamika nepriklausė nuo CD59 buvimo membranoje.

5 VLY monomero-monomero sąveikos sritis yra paremta β -lakšto pratęsimu gretimų VLY molekulių D3 domenuose

Siekėme ištirti, ar VLY oligomerizuojasi per tą pačią sritį kaip ir prototipinis CDC atstovas – perfringolizinas. Pasirinkome aminorūgštis D3 domeno β 4-grandinėje, kurios, tikėtina, atlieka svarbų vaidmenį pratęsiant β -lakštą tarp D3 domeno β 4- ir β 1-grandinių gretimose VLY molekulėse (8 pav., A). Šias aminorūgštis pakeitėme į proliną, neturintį pagrindinėje grandinėje vandenilio, kuris turėtų dalyvauti β -grandinių tarpusavio sąveikoje.

Parodėme, kad VLY^{I306P} ir VLY^{A304P/I306P} mutantinių baltymų hemolizinis aktyvumas žymiai susilpnėjo (8 pav., B), nors sąveika su cholesteroliu nebuvo sutrikdyta (8 pav., C). Kontrolinė mutacija, pakeičianti Val-305 į Pro, kuris yra nukreiptas į β 3-grandinę, įtakos hemoliziniam aktyvumui neturėjo.

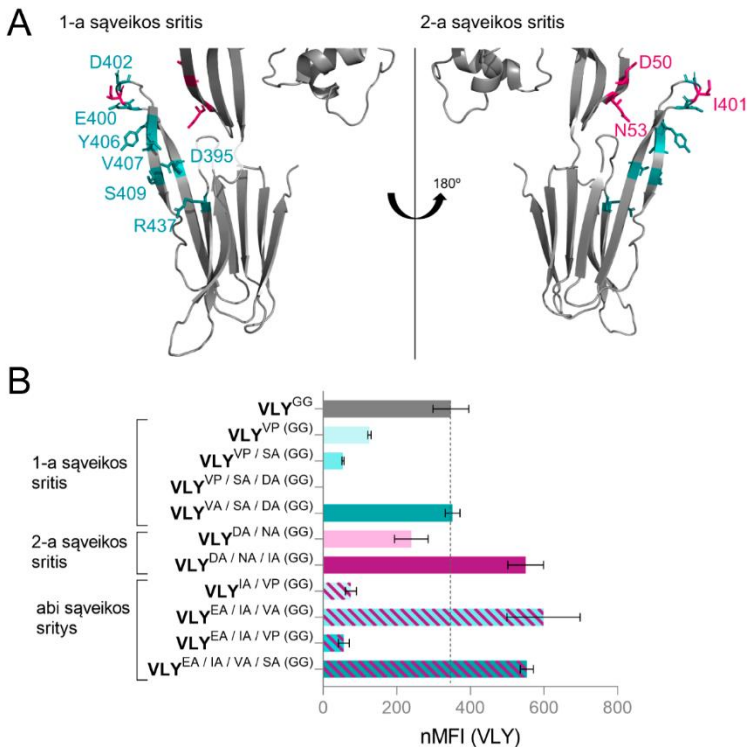


8 pav. Vaginolizino (VLY) monomero-monomero sąveika yra paremta β -lakšto pratęsimu tarp D3 domenų β 1- ir β 4-grandinių. A – schematinis sąveikos atvaizdavimas tarp dviejų VLY monomerų išryškinant sąveiką tarp D3 domenų β 1- ir β 4-grandinių; vandeniliniai ryšiai, kurie buvo pasirinkti suardymui aminorūgštis pakeičiant į proliną β 4-grandinės 304-306 pozicijose yra pažymėti raudonais kryžiuokais. B – VLY, VLY^{V305P}, VLY^{I306P}, VLY^{A304P/I306P} baltymų hemolizinis aktyvumas nustatytas jais veikiant žmogaus eritrocitus; eksperimentiniams taškams buvo pritaikytas keturių parametrų dozės-atsako modelis naudojantis GraphPad Prism; paklaidos žymi standartinį nuokrypį; N=3

Eksperimentiniais duomenimis pagrindėme, kad VLY monomero-monomero sąveikos sritis yra paremta β -lakšto pratęsimu sąveikaujant gretimų molekulių D3 domenams.

6 Sąveika tarp VLY ir CD59 yra paremta β -lakšto pratęsimu tarp VLY D4 domeno ir CD59

Kitas mūsų uždavinys buvo išanalizuoti VLY sąveiką su CD59. VLY sąveika su CD59 buvo sumodeliuota remiantis iki tol vienintele išspręsta CDC-CD59 komplekso kristalo struktūra – ILY su CD59 (Johnson et al., 2013).



9 pav. Sąveika tarp vaginolizino (VLY) ir CD59 yra paremta β -lakšto pratęsimu.

A – dviejų spėjamų VLY-CD59 sąveikos sričių vizualizacija; aminorūgštys, kurios buvo pasirinktos mutagenės eksperimentams yra pavaizduotos „sticks“ modeliu naudojantis PyMOL (1-os sąveikos srities aminorūgštys pažymėtos mėlyna spalva, o 2-os sąveikos srities – violetine). B – stulpelinė diagrama vaizduoja santykinius VLY

mutantinių baltymų, prisijungusių prie CHO-CD59^{4F1} ląstelių, kiekius išreikštus normalizuota fluorescencijos intensyvumo mediana (nMFI) nustatyta tėkmės citometrijos metodu; VLY^{GG} buvo naudotas kaip standartas; paklaidos žymi standartinį nuokrypį; N=3.

Remiantis VLY sekos homologija su ILY ir dviem parodytomis ILY sąveikos sritimis su CD59, pasirinkome rinkinį aminorūgščių, kurių pakeitimai suardytą vieną iš dviejų arba abi sąveikos sritis (9 pav., A).

Panaudodami tėkmės citometrijos metodą galėjome įvertinti, kad pasirinktos mutacijos leido suardyti 1-ąją sąveikos sritį, bet 2-osios sąveikos srities suardymas neturėjo įtakos VLY sąveikai su ląstelėmis (9 pav., B). Didžiausią įtaką VLY sąveikai su ląstelėmis turėjo Val-407 pakeitimas į Pro (V407P, sutrump. VP), Ser-409 pakeitimas į Ala (S409A, sutrump. SA), Asp-395 pakeitimas į Ala (D395A, sutrump. DA) (9 pav., B).

Šie eksperimentai rodo, kad tik 1-a sąveikos sritis iš dviejų, kurios buvo parodytos ILY kristalo struktūroje (Johnson et al., 2013), atlieka svarbų vaidmenį VLY sąveikoje su CD59 pratęsiant β -lakštą tarp VLY D4 domeno ir CD59.

IŠVADOS

- Vaginolizinas (VLY), kaip ir pneumolizinas, gali lizuoti ne tik žmogaus kilmės ląsteles. VLY citoliziniam aktyvumui žmogaus baltymas CD59 nėra būtinas, priešingai nei intermedilizinui.
- Sukurtos ir optimizuotos dirbtinės liposomos, turinčios cholesterolio ir prijungtą CD59 baltymą, yra tinkamas membranos modelis VLY poros formavimosi dinamikai stebėti.
- CD59 padidina cholesterolio turinčios membranos afiniškumą VLY bei pagreitina VLY poros formavimąsi. CD59, prijungtas prie membranos, geba inicijuoti VLY oligomerizaciją, tačiau poros formavimuisi reikalingas cholesterolis.
- Cholesterolis yra būtinas ir pakankamas VLY porai susiformuoti, tačiau tam pačiam poros formavimosi efektyvumui pasiekti CD59 neturincioje membranoje reikia žymiai daugiau VLY.
- VLY monomero-monomero sąveika yra paremta vandeniliniaisiais ryšiais tarp gretimų molekulių D3 domenu β 1- ir β 4-grandinių pratęsiant β -lakštą.
- VLY ir CD59 sąveika yra paremta vandeniliniaisiais ryšiais, susidaranciais tarp VLY D4 domeno ir CD59 pratęsiant β -lakštus. Svarbiausios sąveikoje dalyvaujančios VLY aminorūgštys yra Val-407, Ser-409, Asp-395.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Aricescu, A.R., Lu, W., and Jones, E.Y. (2006). A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* *62*, 1243–1250.
2. Birmingham, C.L., Canadien, V., Kaniuk, N.A., Steinberg, B.E., Higgins, D.E., and Brumell, J.H. (2008). Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles. *Nature* *451*, 350–354.
3. Catlin, B.W. (1992). *Gardnerella vaginalis*: Characteristics, Clinical Considerations, and Controversies. *Clin. Microbiol. Rev.* *5*, 213–237.
4. Christie, M.P., Johnstone, B.A., Tweten, R.K., Parker, M.W., and Morton, C.J. (2018). Cholesterol-dependent cytolysins: from water-soluble state to membrane pore. *Biophys. Rev.* *10*, 1337–1348.
5. Dal Peraro, M., and Van der Goot, F.G. (2016). Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat. Rev. Microbiol.* *14*, 77–92.
6. Farrand, S., Hotze, E., Friese, P., Hollingshead, S.K., Smith, D.F., Cummings, R.D., Dale, G.L., and Tweten, R.K. (2008). Characterization of a Streptococcal Cholesterol-Dependent Cytolysin with a Lewis y and b Specific Lectin Domain †. *Biochemistry* *47*, 7097–7107.
7. Gelber, S.E., Aguilar, J.L., Lewis, K.L.T., and Ratner, A.J. (2008). Functional and phylogenetic characterization of vaginolysin, the human-specific cytolysin from *Gardnerella vaginalis*. *J. Bacteriol.* *190*, 3896–3903.
8. Johnson, S., Brooks, N.J., Smith, R.A.G.G., Lea, S.M., and Bubeck, D. (2013). Structural Basis for Recognition of the Pore-Forming Toxin Intermedilysin by Human Complement Receptor CD59. *Cell Rep.* *3*, 1369–1377.
9. Lawrence, S.L., Gorman, M.A., Feil, S.C., Mulhern, T.D., Kuiper, M.J., Ratner, A.J., Tweten, R.K., Morton, C.J., and Parker, M.W. (2016). Structural Basis for Receptor Recognition by the Human CD59-Responsive Cholesterol-Dependent Cytolysins. *Structure* *24*, 1–11.

10. Los, F.C.O., Randis, T.M., Aroian, R. V., and Ratner, A.J. (2013). Role of Pore-Forming Toxins in Bacterial Infectious Diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *77*, 173–207.
11. Ma, B., Forney, L.J., and Ravel, J. (2012). Vaginal Microbiome: Rethinking Health and Disease. *Annu. Rev. Microbiol.* *66*, 371–389.
12. O’Brien, D.K., and Melville, S.B. (2004). Effects of *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin (PLC) and Perfringolysin O (PFO) on Cytotoxicity to Macrophages, on Escape from the Phagosomes of Macrophages, and on Persistence of *C. perfringens* in Host Tissues. *Infect. Immun.* *72*, 5204–5215.
13. Rosado, C.J., Kondos, S., Bull, T.E., Kuiper, M.J., Law, R.H.P., Buckle, A.M., Voskoboinik, I., Bird, P.I., Trapani, J.A., Whisstock, J.C., et al. (2008). The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cell. Microbiol.* *10*, 1765–1774.
14. Schellenberg, J.J., Patterson, M.H., and Hill, J.E. (2017). *Gardnerella vaginalis* diversity and ecology in relation to vaginal symptoms. *Res. Microbiol.* *168*, 837–844.
15. Shewell, L.K., Harvey, R.M., Higgins, M.A., Day, C.J., Hartley-Tassell, L.E., Chen, A.Y., Gillen, C.M., James, D.B.A., Alonzo, F., Torres, V.J., et al. (2014). The cholesterol-dependent cytolysins pneumolysin and streptolysin O require binding to red blood cell glycans for hemolytic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E5312–E5320.
16. Soltani, C.E., Hotze, E.M., Johnson, A.E., and Tweten, R.K. (2007). Structural elements of the cholesterol-dependent cytolysins that are responsible for their cholesterol-sensitive membrane interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 20226–20231.
17. Zafar, M.A., Wang, Y., Hamaguchi, S., and Weiser, J.N. (2017). Host-to-Host Transmission of *Streptococcus pneumoniae* Is Driven by Its Inflammatory Toxin, Pneumolysin. *Cell Host Microbe* *21*, 73–83.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Publikacijos, įtrauktos į disertaciją

Zilnyte, M., Venclovas, Č., Zvirbliene, A., Pleckaityte, M. (2015) The cytolytic activity of vaginolysin strictly depends on cholesterol and is potentiated by human CD59. *Toxins*, 7, 110-128.

Tankovic, J., Timinskas, A., Janulaitiene, M., **Zilnyte, M.**, Baudel, J.L., Maury, E., Zvirbliene, A., Pleckaityte, M. (2017) *Gardnerella vaginalis* bacteremia associated with severe acute encephalopathy in a young female patient. *Anaerobe*, 47, 132-134.

Publikacija, neįtraukta į disertaciją

Kuncinskaite-Kodze, I., Pleckaityte, M., Bremer, C.M., Seiz, P., **Zilnyte, M.**, Bulavaite, A., Mickiene, G., Zvirblis, G., Sasnauskas, K., Glebe, D., Zvirbliene, A. (2015) New broadly reactive neutralizing antibodies against hepatitis B virus surface antigen. *Virus research*, 211, 209-211.

PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE

Zilnytė, M., Plečkaitytė, M., Žvirblienė, A. Bakterinio toksino vaginolizino citolizinio veikimo mechanizmo tyrimas. LMA jaunųjų mokslininkų konferencija „Tarpdalykiniai tyrimai fiziniuose ir technologijos moksluose – 2014“, Vilnius. 2014; Vilnius, Lietuva, 2014 m. gruodžio mėn. 9 d. (žodinis pranešimas).

Zilnyte, M., Venclovas, Č., Zvirbliene, A., Pleckaityte, M. The Cytolytic Activity of Vaginolysin Strictly Depends on Cholesterol and Is Potentiated by Human CD59. The 3rd Prato Conference On Pore Forming Proteins. Prato, Italija, 2015 m. gegužės mėn. 11-14 d. (stendinis pranešimas).

Zilnyte, M., Venclovas, Č., Penkauskas, T., Valincius, G., Zvirbliene, A., Pleckaityte, M. Probing the functional basis for pore-forming activity of cholesterol-dependent cytolysin vaginolysin. 18th World Congress of the International Society on Toxinology. Oksfordas, Jungtinė karalystė, 2015 m. rugsėjo 25-30 d. (stendinis pranešimas).

Zilnyte, M., Ni, T., Gilbert, RJC. Insights into the role of CD59 in vaginolysin pore formation. The 4th Prato Conference On Pore Forming Proteins. Prato, Italija, 2018 m. rugsėjo mėn. 24-27 d. (stendinis pranešimas).

SUMMARY

Vaginolysin (VLY) secreted by *Gardnerella vaginalis* is a cholesterol-dependent cytotoxin (CDC). Secreted as soluble monomers, CDC molecules target cholesterol in the cell membrane. Upon interaction with cholesterol, CDC monomers oligomerise to form giant pores that reach 30-50 nm in diameter. Pore formation is a powerful and widespread mechanism engaged by many pathogenic bacteria. Thus, VLY is thought to be responsible for the virulence of *G. vaginalis*. During our study, we identified, to date, the only patient, who developed a *G. vaginalis* related encephalopathy and provided indirect evidence, that the level of secreted vaginolysin correlates with the virulence of *G. vaginalis*, giving credence to the long-proposed importance of VLY in the pathogenesis of *G. vaginalis*.

The aim of this study was to investigate and characterise the features of *G. vaginalis* toxin VLY and its pore-forming mechanism using *in vitro* systems. We advanced the experimental frontier to reveal that CD59 pre-concentrates VLY to enable an efficient pore formation in cholesterol-containing membranes. We developed an experimental system to measure the kinetics of pore formation on artificial membrane models of liposomes containing cholesterol. Even though the human protein CD59 is not necessary for VLY pore formation, it markedly promotes this process. The interaction between VLY and CD59 is based on the β -sheet extension between the two proteins. CD59 enhances VLY affinity for the cell membrane and expedites the rate of pore formation. Moreover, membrane-bound CD59 can trigger VLY oligomerisation, although, without cholesterol the oligomers cannot perforate the membrane. Finally, we showed that VLY follows the typical monomer-monomer interface which is based on the β -sheet extension between β 1- and β 4-strands in D3 domains of the two adjacent VLY monomers.

CV

Milda Zilnytė

Gimimo data: 1989-02-18

Tel. nr. +447708 066565

El. paštas: milda.zilnyte@magd.ox.ac.uk, milda.zilnyte@gmail.com

Adresas: 186-3 Iffley road, OX4 1SD, Oksfordas, Jungtinė karalystė

IŠSILAVINIMAS

- 2017-2018 **13-os mėnesių stažuotė doktorantūros studijų metu** prof. dr. Robert Gilbert grupėje, Oksfordo universitete, Jungtinėje karalystėje
Vadovas: prof. dr. Robert Gilbert
- 2014-2018 **Biochemijos doktorantūros studijos Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre, Biotechnologijos institute, Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje**
Magistro darbo pavadinimas: “Bakterinio toksino vaginolizino citolizinio veikimo mechanizmo tyrimas”
Vadovės: prof. dr. Aurelija Žvirblienė (2016-2018), dr. Milda Plečkaitytė (2014-2016)
- 2012-2014 **Biochemijos magistro studijos Vilniaus universitete, Biotechnologijos institute, Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje**
Magistro darbo pavadinimas: “Bakterinio toksino vaginolizino citolizinio veikimo mechanizmo tyrimas”
Vadovė: dr. Milda Plečkaitytė
- 2008-2012 **Biochemijos bakalauro studijos Vilniaus universitete, Biotechnologijos institute, Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje**
Bakalauro darbo pavadinimas: “Bakterijos *Gardnerella vaginalis* CRISPR rajonų paieška ir analizė”
Vadovė: dr. Milda Plečkaitytė

DARBO PATIRTIS

- Nuo 2019-04-01 Postdoctoral Research Associate, Oksfordo universitetas, Magdalen College, Calvea Research centras
- 2018-07-01 - Jaunesnioji mokslo darbuotoja, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biotechnologijos institutas, Imunologijos ir ląstelės biologijos skyrius
- 2019-03-22
- 2011-08-01 - Laborantė, Vilniaus universitetas, Biotechnologijos institutas, Imunologijos ir ląstelės biologijos skyrius
- 2018-06-30

APDOVANOJIMAI

- 2018 LMT stipendija išvykai į konferenciją Prato, Italijoje.
- 2017-2018 12 mėnesių Erasmus+ stipendija stažuotei Oksfordo universitete, Jungtinėje karalystėje
- 2016, 2018 LMT stipendijos už akademinis pasiekimus
- 2015 1-os vietos laimėtojos prizas stendinių pranešimų sesijoje Poras formuojančių baltymų konferencijoje, Prato, Italijoje

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius

El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt

Tiražas 15 egz.