

Soluja tappavan pneumolysiini- toksiinin tuhovaikutuksen estäminen polyfenoleilla

Pro gradu-tutkielma
Turun yliopisto
Biokemian laitos
Biokemian tutkinto-ohjelma
4/2020

Santeri Maatsola

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos

MAATSOLA, SANTERI: Soluja tappavan pneumolysiini-toksiinin tuho vaikutuksen estäminen polyfenoleilla

Pro gradu -tutkielma, 39 s.

Biokemia

Huhtikuu 2020

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Korva-, poskiontelo- ja aivokalvon tulehduksia sekä keuhkokuumetta aiheuttava ihmisen patogeeni *Streptococcus pneumoniae* tuottaa soluja tappavaa toksiinia pneumolysiiniä (Ply). Ply puhkoo kohdesolun kalvon ja on keskeinen pneumokokin tautia aiheuttava tekijä. Ply:n C-terminaalinen domeeni 4 välittää sitoutumista solukalvon kolesteroliin, ja soluun muodostuu halkaisijaltaan 250 Å suuruinen reikä. Ply:ä inhiboivia kasviperäisiä polyfenoliyhdisteitä seulottiin hemolyyysiaktiivisuuskokeella. Pentagalloylyyliglukoosin (PGG) ja gemiini A:n inhibitiokonsentraatiot (IC₅₀) olivat 18 ja 41 nM. Gemiini A puolestaan muodosti herkemmin (konsentraatiossa 6,2 µM) liukenemattoman kompleksin Ply:n kanssa kuin PGG (14 µM) turbidimetrisessä mittauksessa. Ply:n oligomerisaation estämistä PGG:llä tutkittiin inkuboimalla punasolujen tai liposomien kanssa ja analysoimalla nanorakennetta Western blottauksella. PGG inhiboi lisäksi Ply:n sytotoksisuutta A549-keuhkoepiteelisolulinjan kokeessa. Polyfenolit ovat siis potentiaalisia lääkeyhdisteitä tai kehityksen lähtömolekyylejä estämään pneumokokki-infektioita inhiboimalla Ply:n sytotoksisuutta.

Asiasanat: *Streptococcus pneumoniae*, pneumokokki, pneumolysiini, polyfenolit, sytotoksinen proteiini, solukalvon huokoset

SISÄLLYS

Lyhenteet	3
1 Kirjallisuuskatsaus	4
1.1 Pneumolysiini on bakteeriperäinen toksiiini.....	4
1.2 Pneumolysiinin rakenne ja synteesi	5
1.3 Solukalvolla Ply-monomeerit kokoontuvat isoksi renkaaksi.....	6
1.4 Pneumolysiiniä inhiboivat yhdisteet.....	9
1.5 Kasvien polyfenolit	10
1.6 Työn tavoitteet.....	14
2 Materiaalit ja menetelmät.....	15
2.1 Polyfenoliyhdisteet	15
2.2 Ply:n tuottaminen.....	15
2.3 Punasolujen valmistus.....	16
2.4 Hemolyysikoe	16
2.5 Turbidometria	16
2.6 Oligomerisoituneen Ply:n elektroforeesi ja Western blottaus.....	17
2.7 Liposomien valmistus ja käyttö Ply:n oligomerisoimiseksi.....	17
2.8 Toksiinin vaikutukset videomikroskopisesti	18
2.9 Ply:n sytotoksisuusmittaus	18
3 Tulokset	19
3.1 Polyfenolit inhiboivat hemolyysiä.....	19
3.2 Rekombinantti-Ply:n tuotto, puhdistus ja saanto.....	21
3.3 Ply muodostaa polyfenolien kanssa liukenemattoman kompleksin	23
3.4 Polyfenoli häiritsee Ply:n oligomerisaatiota	25
3.5 Ply oligomerisoituu kolesterolia sisältävien liposomien vaikutuksesta.....	28
3.6 Polyfenoli estää Ply:n sytotoksisen vaikutuksen A549-soluissa	29
4 Tulosten tarkastelu.....	33

4.1 Polyfenoliyhdisteiden vertailu	33
4.2 Kalvolle kokoontuvan rakenteen havaitseminen.....	33
4.3 Sytotoksisuus	34
4.4 Johtopäätökset.....	34
Lähdeluettelo	35

LYHENTEET

asn	asparagiini
asp	asparagiinihappo
CDC	kolesterolista riippuva sytolysiini, engl. <i>cholesterol-dependent cytolsin</i>
CHOL	kolesteroli
DHHDP-ryhmä	dehydroheksahydroksidifenoyyliryhmä, engl. <i>dehydrohexahydroxydiphenoyl group</i>
DMEM	kasvatusliuos, engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo, engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EM-kuva	elektronimikroskooppikuva
HB	heliksi-beetalaskos, engl. <i>helix-beta sheet</i>
HHDP-ryhmä	heksahydroksidifenoyyliryhmä engl. <i>hexahydroxydiphenoyl group</i>
HP	hiuspinni, engl. <i>hairpin</i>
HTH	heliksi-kääntö-heliksi, engl. <i>helix-turn-helix</i>
IC ₅₀	inhiboiva pitoisuus, engl. <i>inhibitory concentration</i>
IPTG	isopropyyli-β-D-1-tiogalaktopyranosidi
KO	poistogeeninen kanta, engl. <i>knock-out</i>
LB	kasvatusliuos, engl. <i>lysogeny broth</i>
LDH	laktaattidehydrogenaasi
MTS	3-(4,5-dimetyyliatsoli-2-yyli)-5-(3-karboksimetoksifenyli)-2-(4-sulfofenyyli)-2H-tetratsolisuoala
NAD ⁺ / NADH	nikotiiniamidiadeniininukleotidi (hapettunut/pelkistynyt)
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PGG	pentagalloyyliglukoosi
phe	fenyylialaniini
Ply	pneumolysiini
PVDF-kalvo	polyvinylideenifluoridikalvo
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigelelektroforeesi, engl. <i>sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
trp	tryptofaani

1 KIRJALLISUUSKATSAUS

1.1 Pneumolysiini on bakteeriperäinen toksiiini

Streptococcus pneumoniae on gram-positiivinen bakteeri, joka elää terveiden ihmisten lähengitysteissä tavallisesti oireettomana. *S. pneumoniae* eli pneumokokki voi kuitenkin päätyä välikorvaan, keuhkoihin, verenkiertoon tai aivoihin, ja aiheuttaa korva-, poskiontelo- tai aivokalvontulehduksen tai keuhkokuumeen. Nämä sairaudet ovat hengenvaarallisia pienille lapsille ja vanhuksille sekä esimerkiksi tiettyjä kroonisia sairauksia poteville (Robinson et al., 2001; Subramanian et al., 2019). Lisäksi sen on osoitettu aiheuttavan vaurioita sydänlihaksistossa pneumokokki-infektion seurauksena (Brown et al., 2014). Pneumokokista johtuvia alle viisivuotiaiden kuolemia on maailmanlaajuisesti 300 000 vuosittain. Rokotteilla on onnistuttu vähentämään infektioiden lukumäärää 2000-luvulla. (Wahl et al., 2018). Hoitoa valitettavasti vaikeuttaa antibioottiresistenttien bakteerikantojen esiintyminen, joka on huomattu jo muutama vuosikymmen sitten ja on realistinen uhka edelleen (Subramanian et al., 2019; Tomasz, 1997). Maailman terveysjärjestö on luokitellut *S. pneumoniae*en yhdeksi niistä 12 sairauksia aiheuttavasta bakteerista, joiden uusien antibioottien tutkimus ja kehitys on ensisijaista (WHO, 2017).

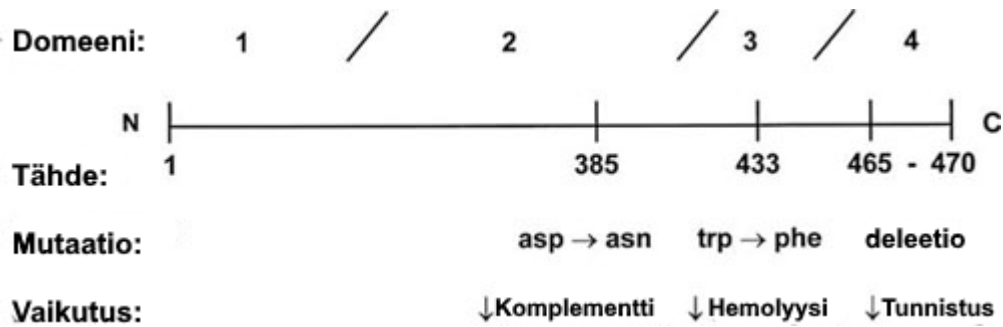
Mikrobin taudinaiheuttamiskykyyn liittyviä ominaisuuksia kutsutaan virulenssitekijöiksi. *S. pneumoniae*en virulenssitekijöitä ovat muun muassa polysakkarideista koostuva kapselipintarakenne, tarttumista välittävät adhesiinit ja isäntäorganismien soluja vaurioittava toksiiini pneumolysiini (Ply). On vielä selvittämättä yksityiskohtaisesti, kuinka tästä bakteerista harmittoman yhteiselon sijaan tulee taudinaiheuttaja eli patogeeni. Nenänielussa immuunijärjestelmä säätelee eri bakteerien populaatioita, eli infektion alkamiseksi pneumokokin täytyy siirtyä muualle elimistöön (Subramanian et al., 2019). Siirtymistä toisiin isäntiin edesauttaa Ply:stä johtuva bakteerien irtoaminen nenäeritteisiin (Zafar et al., 2017). Ply:llä on havaittu myös muita pneumokokin virulenssia lisääviä mekanismeja liittyen esimerkiksi immuunipuolustuksen välttämiseen (Quin et al., 2007).

Ply:n tutkimuksen sovelluksia voisivat olla kehittyneet hoidot *S. pneumoniae*en aiheuttamissa sairauksissa. Toksiinin vaikutusten estäminen toimisi osana hoitoa, ja nopeuttaisi paranemista. Virulenssitekijään kohdistuva

lääkestrategia olisi hyödyllinen sekä antibioottiherkille että -resistenteille kannoille, eikä häittäisi normaalia mikroflooraa (Escajadillo & Nizet, 2018; Song, Teng, et al., 2017). Perinteinen antibiootti häiritsee yleensä bakteerin peruselintoimintoja, joten se voi tuhota myös sivullisia bakteerilajeja. Ply-toksiini ei ole kasvulle välttämätön tekijä, joten evolutiivinen selektiopaine resistenssin syntymiseen ei ole yhtä suuri kuin antibiootilla. Toiset sovellukset liittyvät leviämisen ehkäisemiseen: kuten edellä mainittiin, Ply:ä ilmentävät *S. pneumoniae*-kannat leviävät tehokkaammin isännästä toiseen. Ply:in tai siitä muokattuun vaarattomaan versioon perustuvaa rokotetta on myös ehdotettu (Cockeran et al., 2005; Escajadillo & Nizet, 2018).

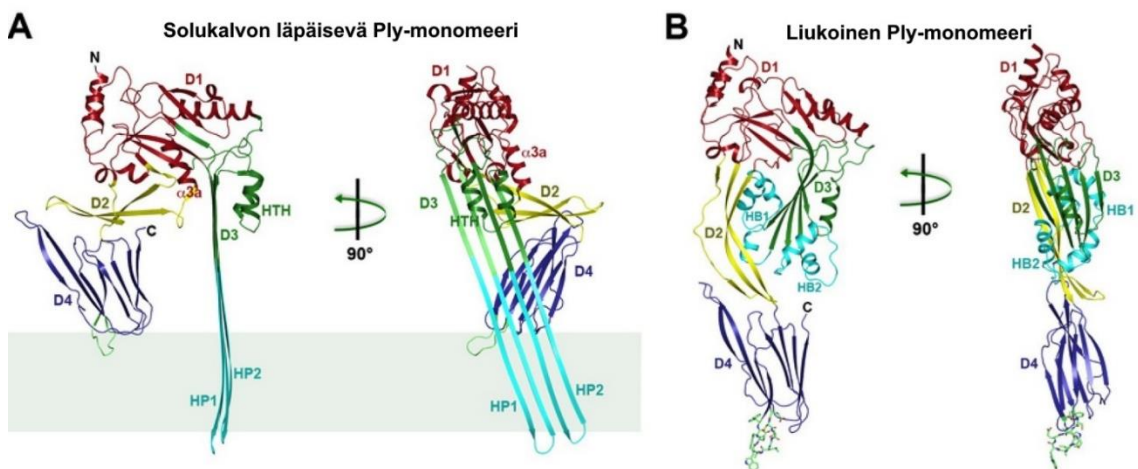
1.2 Pneumolysiinin rakenne ja synteesi

Ply-toksiini on proteiini, joka koostuu 471 aminohappotähteestä. Sen molekyylimassa on 53 kDa. Polypeptidiketju on laskostunut neljäksi domeeniksi, joilla on eri tehtäviä (kuva 1). Ply:n kaltaisia toksiineja tuottavat useat mikrobit, kuten *Listeria*-, *Bacillus*- ja *Clostridium*-sukujen bakteerit sekä streptolysiini O:ta ilmentävä *Streptococcus pyogenes*. Ply:n erikoisuutena on kuitenkin erityyseen liittyvän N-terminaalisen signaalisekvenssin puute. Koska Ply aiheuttaa vaurioita isäntäorganismien soluille, sen täytyy jotenkin päätyä bakteerisolun ulkopuolelle. Siksi esitettiin hypoteesi, jonka mukaan Ply vapautuu solulimasta bakteerin hajotessa autolyttisesti. *S. pneumoniae*-viljelmän kasvun logaritmisin vaiheen päättyessä ei tule pitkää stationäärivaihetta, vaan solujen määrä romahtaa nopeasti. Tunnetuilla bakteerikannoilla yleensä vasta tässä vaiheessa vapautuu Ply:ä kasvatusliuokseen (Balachandran et al., 2001). Muutamalla kannalla solunulkopuolista Ply:ä voidaan kuitenkin havaita jo aikaisin logaritmisin kasvun alkuvaiheessa, joten Ply:n erityistä tapahtua jollakin signaalisekvenssistä tai autolyysiksestä riippumattomalla tavalla (Balachandran et al., 2001; Price et al., 2012). Summattuna alkuperäinen näkemys on siis luultavasti epätäydellinen, ja pneumokokki tuottanee ainakin joissain olosuhteissa toksiinia myös solun ulkopuolelle.



Kuva 1. Kaavio Ply:n rakenteesta. Kohdistetuilla mutaatioilla eli pienin muutoksin voidaan saada selville tärkeitä aminohappotähteitä. Mutaatio domeenissa 2 heikentää vuorovaikutusta immuunijärjestelmän komplementin kanssa, domeenissa 3 punasolujen kanssa ja domeenissa 4 solukalvolle kiinnittymisessä. Muokattu artikkelista *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and inflammation (Loughran et al., 2019).

Ply on liuoksessa monomeerisena, ja sen muoto on pitkänomainen (kuva 2). Domeenit 1, 2 ja 3 ovat lähemmin yhteydessä toisiinsa, mutta domeeni 4 on hieman erillään muista. Liukoiset Ply-molekyylit etsiyvät tämän domeenin välityksellä kohdesolukalvolle, ja sitoutuvat kolesteroliin. Ply-toksiinia ja samankaltaisia muiden eliöiden tuottamia proteiineja kutsutaankin kolesterolista riippuviksi sytolysiineiksi (engl. *cholesterol-dependent cytolysin*, CDC).



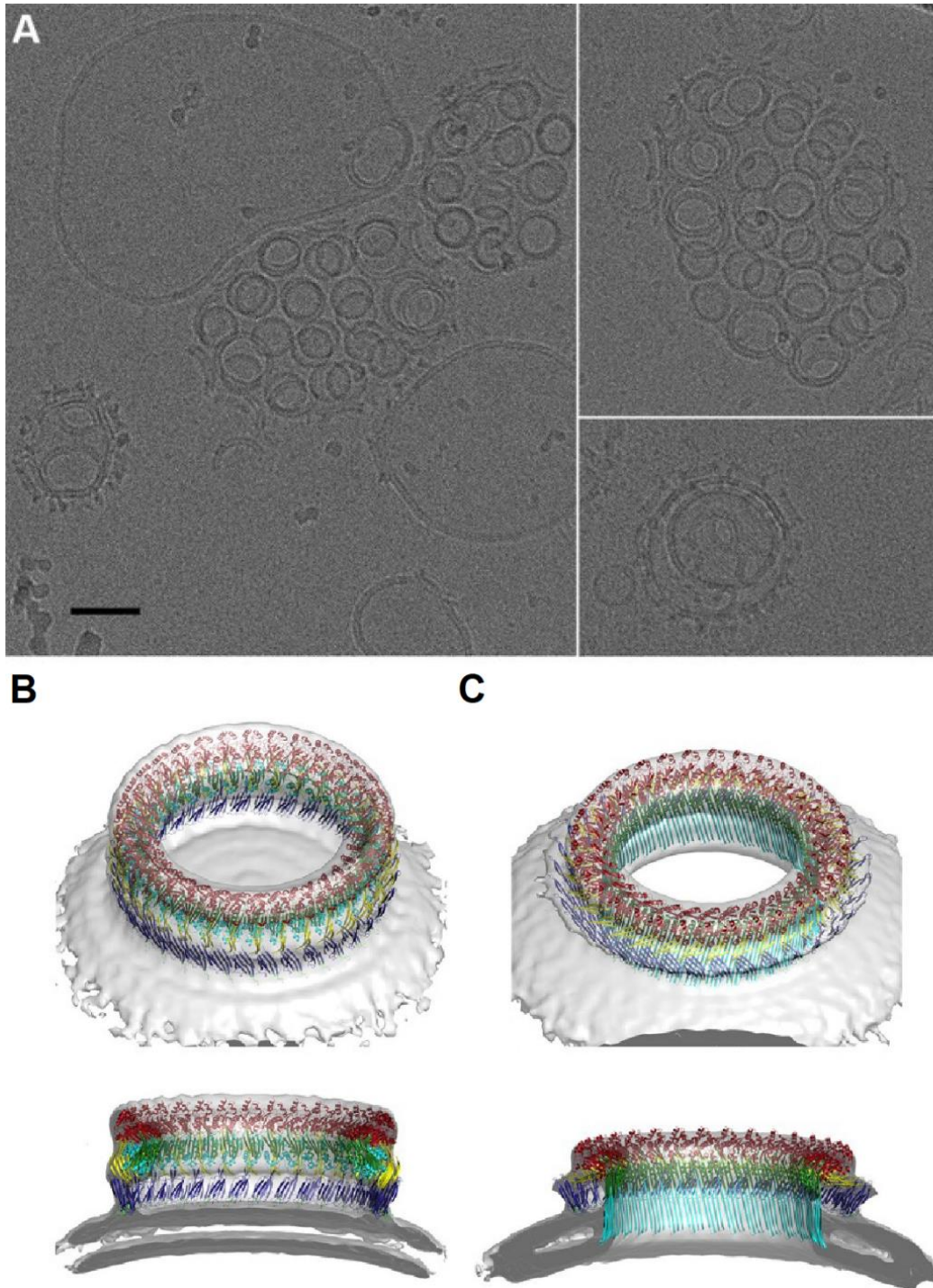
Kuva 2. Nauhamalli Ply:stä A) solukalvolla B) liuoksessa. Domeenit merkitty D1–D4, lisäksi joitakin yleisiä rakenteita (engl. *helix-turn-helix*, HTH, *hairpin 1 ja 2*, HP1–2, *helix-beta sheet 1 ja 2*, HB1–2). Muokattu artikkelista CryoEM structures of membrane pore and prepore complex reveal cytolytic mechanism of Pneumolysin (van Pee et al., 2017).

1.3 Solukalvolla Ply-monomeerit kokoontuvat isoksi renkaaksi

Ply ja muut CDC:t kuuluvat β -ryhmän huokosia (engl. *pore*) muodostaviin toksiineihin. Ne siis vaurioittavat kohdesolukalvon toimintaa muodostamalla suuren nanorakenteen ja aukon, josta aineet vuotavat läpi (kuva 3). α -ryhmän

toksiinit läpäisevät kalvon α -helikseillä, β -ryhmän toksiinit puolestaan muodostavat β -laskoksesta tynnyrin muotoisen sekundäärirakenteen. (Escajadillo & Nizet, 2018). Huokosen muodostuminen on nelivaiheinen prosessi. Ensimmäiseksi CDC:t hakeutuvat solukalvolle 4-domeenin tunnistusalueensa mukaisesti, sitten toisten monomeerien läheisyyteen. Kolmannessa vaiheessa solukalvon päällä on täysi rengas toksiinimolekyylejä, joiden 2- ja 3-domeenit muuttavat konformaatiotaan merkittävästi. Viimeisessä vaiheessa nanorakenne on valmis, ja tunkeutuu solukalvon läpi. (van Pee et al., 2017). Tapahtumasarjaa kutsutaan oligomerisaatioksi, mutta monomeereja todellisuudessa yhdistyy kymmenittäin muutaman sijaan, toisin kuin nimestä saattaisi päätellä.

Ply-huokosen molekyylimassa on paljon suurempi kuin liukoisen Ply-monomeerin. 42 alayksikköä (van Pee et al., 2017) sisältävän renkaan koko on 2,2 MDa, ulkoläpimitta 400 Å, korkeus 110 Å ja muodostuvan aukon halkaisija 250 Å. Tällaiset vauriot vahingoittavat solukalvon perustoimintaa, eli solu vuotaa tärkeitä yhdisteitä ulos ja päästää vääriä aineita sisään. Kalsium- ja kaliumionien säätelemätön kulku laukaisee nekroptoosin ja solu kuolee (González-Juarbe et al., 2015, 2017).



Kuva 3. A) Kryoelektronimikroskopiakuva ja BC) tietokonemallinnus Ply-huokosesta. EM-kuvassa vesikkeleille kokoontuneita huokosia, mittajana 50 nm. Mallinuksissa Ply ennen kalvoon tunkeutumista (B) ja tunkeutumisen jälkeen (C). Näkymä yläviistosta ja poikkileikkauksena. Muokattu artikkelista CryoEM structures of membrane pore and prepore complex reveal cytolytic mechanism of Pneumolysin (van Pee et al., 2017).

1.4 Pneumolysiiniä inhiboivat yhdisteet

Koska Ply on yksi tärkeimmistä *S. pneumoniae* virulenssitekijöistä, sitä on tutkittu paljon, ja sen toimintaan vaikuttavia yhdisteitä tunnetaan useita. Kolesteroli on odotetusti inhibiittori. Ei ole lainkaan yllättävää, että kolesteroli itse inhiboi Ply:n toimintaa: kyseessä on klassinen esimerkki kilpailevasta inhibitiosta. Jos kolesterolia on sekä vapaana että solukalvolla, osa Ply-monomeereista ei pysty sitoutumaan solukalvoon, sillä ne ovat jo sitoutuneet muuhun kolesteroliin. Kolesterolin kaltaiset steroliyhdisteet β -sitosteroli, stigmasteroli, kampesteroli ja brassikasteroli estävät Ply:n sytotoksisen vaikutuksen sitoutumalla samaan kohtaan Ply:n domeeni 4:ssä (Li et al., 2017).

Hiilihydraattiyhdisteiden on havaittu vuorovaikuttavan Ply:n kanssa (Lim et al., 2013; Shewell et al., 2014). Mannoosilla oli selkeä inhiboiva vaikutus kokeessa, jossa galaktoosi ja glukoosi eivät käytännössä vaikuttaneet Ply:n aktiivisuuteen (Lim et al., 2013). Tetrasakkaridi sialyyli-LewisX (Neu5Ac α 2–3Gal β 1–4(Fuc α 1–3)GlcNAc) seulottiin toisessa tutkimuksessa 120 glykaanista merkittävästi Ply:in sitoutuvaksi (Shewell et al., 2014). Isäntäsolut poikkeavat hieman toisistaan ulkoisesti esimerkiksi glykosylaation perusteella, joten on mahdollista, että näillä sokeri–Ply-vuorovaikutuksilla on biologista merkitystä. Kolesterolin ohella muut pintarakenteet kohdistaisivat Ply:n tai muun CDC:n juuri tiettyihin soluihin (Shewell et al., 2014).

Kolmas, melko heterogeeninen ryhmä Ply:ä inhiboivista yhdisteistä on kasvipiperäiset fenolit. Joukko kiinalaisia tutkijoita on yhteistyössä selvittänyt useita tällaisia inhibiittoreita ja julkaissut samankaltaiset artikkelit esimerkiksi verbaskosidista, apigeniinista, epigallokatekiinigallaatista ja juglonista (Song et al., 2016; Song, Lu, et al., 2017; Song, Teng, et al., 2017; Zhao et al., 2016). Nämä tutkimukset pyrkivät tuomaan esiin eri ehdokasmolekyylejä, joiden pohjalta on mahdollista suunnitella varsinaisia lääkkeitä. Kappaleessa luetellut yhdisteet on koottu taulukkoon 1.

Taulukko 1. Ply:ä inhiboivia yhdisteitä.

Sterolit		
Kolesteroli	Sitoutuvat Ply:n	Vaikuttavat
β -sitosteroli	domeeni 4:n	Ply:in
Stigmasteroli	kolesterolia	kilpailevana
Kampesteroli	tunnistavaan	inhibiittorina
Brassikasteroli	kohtaan	

Hiilihydraatit		
Mannoosi	Sitoutuvat domeeni	Voivat osallistua
Sialyyli-LewisX	4:n muuhun osaan	kohteen
		tunnistukseen

Kasviperäiset fenolit		
Verbaskosidi	Vaihtelevia	Estävät
Apigeniini	sitoutumismalleja	toiminnan mm.
Epigallokatekiinigallaatti		häiritsemällä
Jugloni		oligomerisaatiota

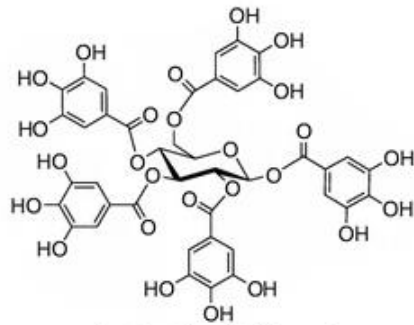
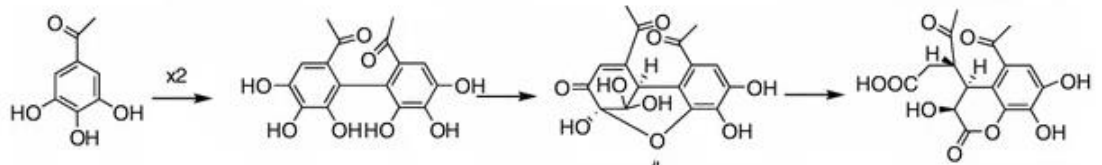
1.5 Kasvien polyfenolit

Kasvit tuottavat runsaasti yhdisteitä, jotka eivät ole välttämättömiä lisääntymiseen, kasvuun ja levittäytymiseen. Näihin sekundäärimetaboliitteihin kuuluvat myös polyfenolit, joiden oletetaan liittyvän kasvien suojausmekanismeihin biologisia ja fysikaalisia uhkia vastaan. Ne voivat lisäksi tukea primäärimetaboliala tai liittyä vuorovaikutuksiin sienten, mikrobien ja hyönteisten kanssa. (Quideau et al., 2011). Fysikaalista uhkaa, UV-B-säteilyä (280–315 nm), vastaan polyfenolit suojaavat absorboiden valoa noin 300 nm aallonpituudella. Suoja biologisia uhkia vastaan on puolestaan yhdisteiden antimikrobinen tai kasvinsyöjiin kohdistuva vaikutus – toisin sanoen kasvi pyrkii vähentämään ravintoarvoaan, jotta syöjä käyttäisi jotakin muuta ravinnonlähdetä.

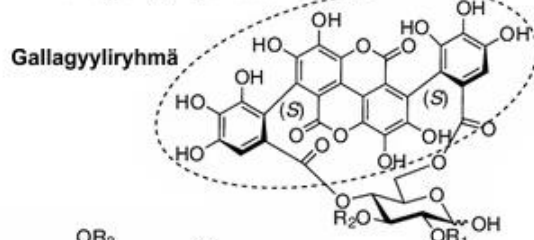
Koska yhdisteitä on niin monia erilaisia, niitä on luokiteltu ja nimetty eri perustein. Quideau et al. (2011) ehdottavat, että polyfenolien määritelmä olisi seuraava: polyfenolit ovat kasvien sekundäärimetaboliitteja, jotka ovat shikimaatti- ja/tai polyketidireaktiotien johdoksia ja jotka sisältävät useamman kuin yhden fenolirenkaan, mutta joissa ei ole yhtään tyyppiä sisältävää funktionaalista ryhmää rakenteen perusesityksessä. Tässä työssä keskityttiin polyfenolien alaluokkaan, hydrolysoituviin tanniineihin (kuva 4). Näiden

yhdisteiden voidaan katsoa olevan pentagalloyylyglukoosin (PGG) johdannaisia; galloyyliryhmien linkittyessä toisiinsa puhumme ellagitanniineista ja uusien galloyyliin liittyessä PGG:n galloyyleihin, puhumme gallotanniineista. PGG on siis näiden molempien hydrolysoituvien tanniinien alaryhmän biosynteettinen prekursori kuuluu itse alaluokkaan yksinkertaiset galloyylijohtannaiset.

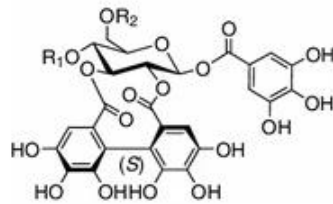
Galloyyliryhmä (G) HHDP-ryhmä DHHDP-ryhmä Tsebuloyyliryhmä



Pentagalloyylglukoosi

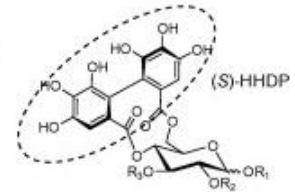
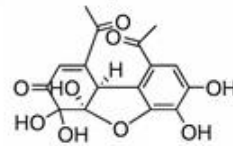


Gallagyliryhmä

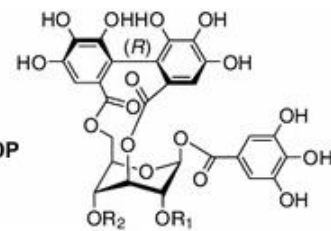


Punikalagiini $R_1, R_2 = (S)\text{-HHDP}$

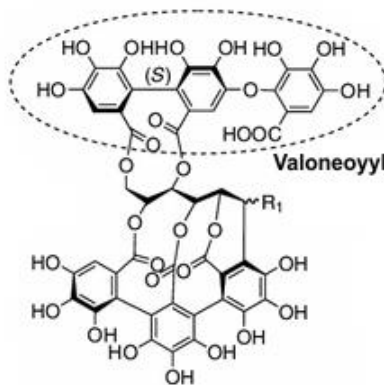
Kasuariktiini $R_1, R_2 = (S)\text{-HHDP}$



Pedunkulagiini $R_1 = H, R_2, R_3 = (S)\text{-HHDP}$
 Tellimagrandiini I $R_1 = H, R_2, R_3 = G$
 Tellimagrandiini II $R_1 = \beta\text{-G}, R_2, R_3 = G$

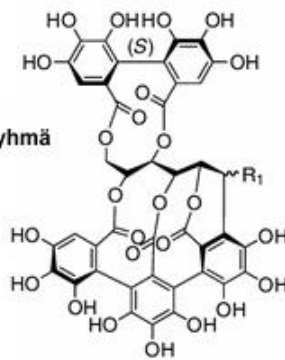


Geraniini $R_1, R_2 = \text{DHHDP-ryhmä}$
 Tsebulagihappo $R_1, R_2 = \text{Tsebuloyyliryhmä}$
 Tsebuliinihappo $R_1, R_2 = \text{Tsebuloyyliryhmä, ei hiili-hiili -sidosta kohdassa (R)}$

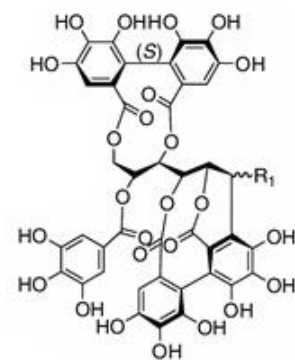


Valoneoyyliryhmä

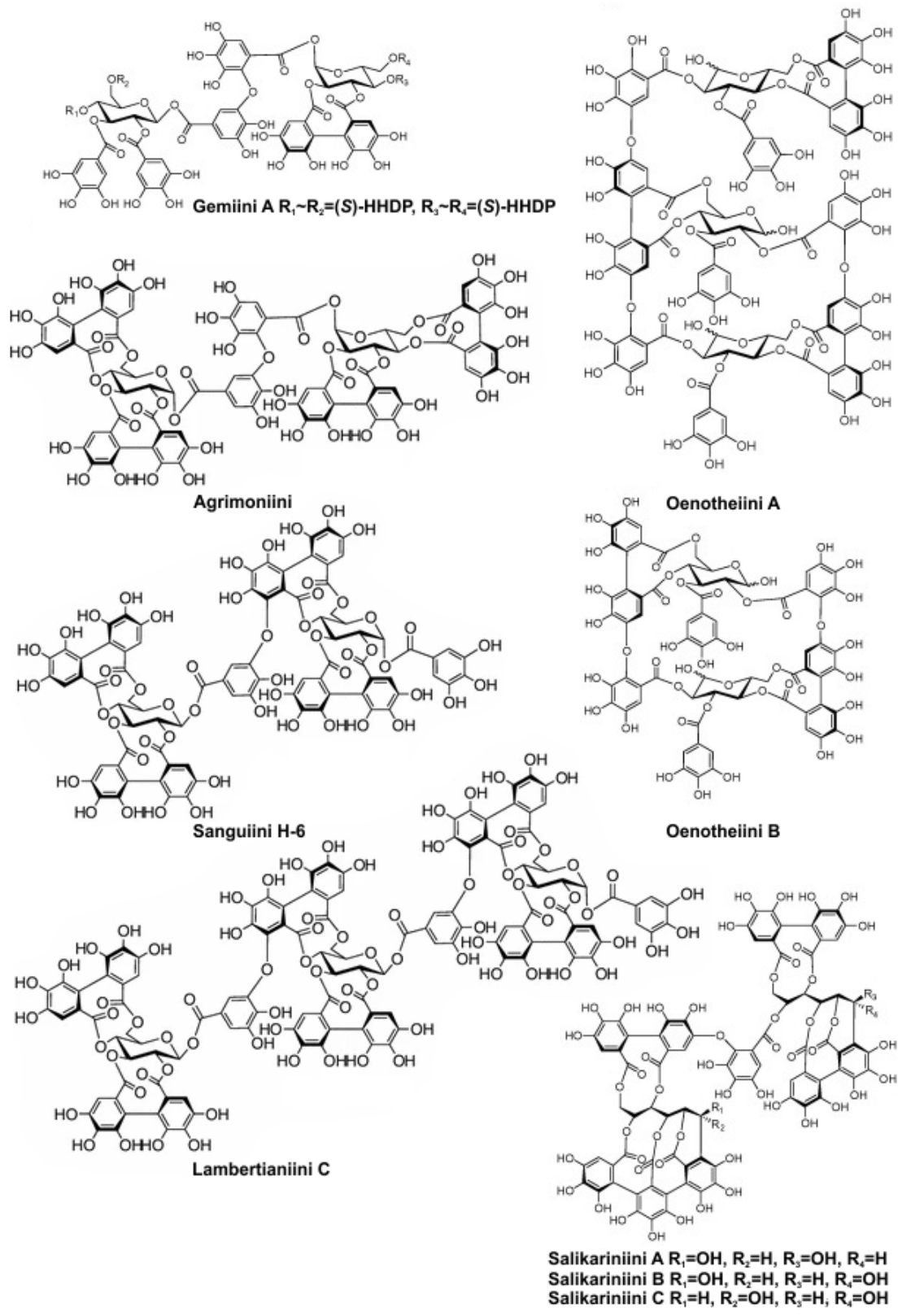
Veskavaloniinihappo $R_1 = \beta\text{-OH}$
 Kastavaloniinihappo $R_1 = \alpha\text{-OH}$



Veskalagiini $R_1 = \beta\text{-OH}$
 Kastalagiini $R_1 = \alpha\text{-OH}$



Stakhyuriini $R_1 = \beta\text{-OH}$
 Kasuariiniini $R_1 = \alpha\text{-OH}$



Kuva 4. Kokeellisessa osiossa käytetyt yhdisteet. HHDP-ryhmä = engl. *hexahydroxydiphenoyl group*, DHHDP-ryhmä = *dehydrohexahydroxydiphenoyl group*. Rakenteet artikkeleista *Characterization of bioactive plant ellagitannins by chromatographic, spectroscopic and mass spectrometric methods* ja *Distribution and content of ellagitannins in Finnish plant species* (Moilanen et al., 2013, 2015).

1.6 Työn tavoitteet

Työn tavoitteena oli osoittaa polyfenolien estävän Ply:n sytotoksisen vaikutuksen.

1) Tutkittiin, mitkä polyfenolit inhiboivat Ply:ä, ja selvitettiin, kuinka yhdisteet reagoivat toksiinin kanssa.

2) Polyfenoliyhdisteitä verrattiin toisiinsa ja tuotiin esiin ominaisuuksia, jotka olivat tärkeitä inhibiatiovaikutuksen saamiseksi. Esitettiin rakenteellisia tekijöitä inhibiotehon taustalla.

3) Ply visualisoitiin käyttämällä sekä punasoluihin perustuvia että soluttomia (liposomit) määrittämiä. Tutkittiin oligomerisaation inhibitiota.

4) Lisäksi Ply:ä ja polyfenoleiden estävää vaikutusta tutkittiin keuhkoepiteelisolulinjan avulla sytotoksisuuden selvittämiseksi *in vitro*.

2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 Polyfenoliyhdisteet

Jauhetusta kasvimateriaalista uutetut, preparatiivisella kromatografialla puhdistetut ja kylmäkuivatut polyfenolit liuotettiin 10 % etanolin vesiliuokseen. Tutkittujen polyfenolien rakenteet ovat kuvassa 4.

2.2 Ply:n tuottaminen

Rekombinantti-Ply tuotettiin ply2-pET46-EkLIC -plasmidilla transformoidussa *E. coli* BL21 (DE3) -kannassa. Yli yön kasvanutta viljelmää lisättiin 1:50 tuoreeseen LB-kasvatusliuokseen (ampisilliiniselektio, 100 µg/ml), ja soluja kasvatettiin 30 °C:ssa ravistelussa 250 rpm, kunnes $A_{600} = 0,6$. Ply:n tuotto indusoitiin 1 mM IPTG:lla, ja solut kerättiin 4 h jatkokasvatuksen jälkeen sentrifugoimalla 3000 x g, 20 min ja pakastettiin -84 °C:seen.

Pelletti sulatettiin jäällä, suspensoitiin lyysispuskuriin (50 mM natriumfosfaattipuskuri pH 8,0; 500 mM NaCl; 20 mM imidatsoli pH 8,0) ja materiaali hajotettiin entsyymaattisesti lysotsyymillä (0,2 mg/ml) ja DNAasilla (0,02 mg/ml) 30 min huoneenlämmössä sekä mekaanisesti sonikoimalla 10 s pulsseilla. Lysaatti sentrifugoitiin 16 000 x g, 20 min ja supernatantti suodatettiin 0,45 µm suodattimen läpi.

Rekombinantti-Ply:ssä on histidiinihantä, jonka avulla proteiini sitoutuu immobilisoituun nikkeliin. Puhdistuksessa käytettiin HisTrap HP -kromatografiapylvästä (GE Healthcare), joka tasapainotettiin lyysispuskurilla. Supernatantti ajettiin pylvään läpi ja kohdeproteiini eluoiattiin jatkuvalla imidatsoligradientilla 500 mM konsentraatioon asti lyysispuskurissa (Äkta Prime, GE Healthcare).

Keskeiset proteiinia sisältävät fraktiot (UV-absorptiodetektiio) yhdistettiin, konsentroidtiin Amicon Ultra 10K -suodattimella (Millipore) 3000 x g, kunnes tilavuus oli alle 400 µl, laimennettiin ajopuskurilla (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl) nelinkertaiseen tilavuuteen ja ajettiin geelisuodatuksessa HiLoad 16/600 Superdex 200 -pylväessä. Näytetilavuuden suhde pylvään tilavuuteen oli noin 1:100.

Eniten proteiinia sisältäneet fraktiot yhdistettiin, konsentroidtiin kuten edellä ja proteiinipitoisuus mitattiin fotometrisesti (NanoDrop One, Thermo Scientific)

A₂₈₀:n avulla käyttäen laskennallista molekyyliainoa 54590 Da ja molaarista ekstinktiokerrointa 72310 M⁻¹ cm⁻¹. Puhdistusta tarkkailtiin ja lopullisen preparaatin laatua arvioitiin SDS-PAGE:lla.

2.3 Punasolujen valmistus

Ihmisen EDTA-verta sentrifugoitiin (2000 x g, 10 min, 4 °C) ja huolellisesti pipetoiden erotettiin plasma ja muut solut erytrosyyteistä. Punasolut pestiin kolmesti moninkertaisessa tilavuudessa fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (engl. *phosphate buffered saline*, PBS; 0,15 M NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄), sentrifugoiden välillä 1400 x g, 5 min, 4 °C, ja käytettiin tuoreena tai viikon kuluessa.

2.4 Hemolyyssikoe

Ply:n hemolyyysiaktiivisuus titrattiin PBS-laimennoksissa pitoisuuteen, jossa lisättyjen 1 % (v/v) punasolujen lyyysis oli 25–50 % täydellisestä 30 min 37 °C -inkubaatiossa.

Polyfenolien inhibiitiovaikutusta Ply:n hemolyyysiaktiivisuuteen mitattiin pyöreäpohjaisissa 96-kuoppalevyissä, joissa ensin yhdistettiin PBS:ssa 1 nM Ply ja polyfenoli (pitoisuusväli 4 nM – 25 µM), jonka jälkeen lisättiin 1 % (v/v) punasolut. Seosta inkuboitiin 30 min 37 °C:ssa ja sentrifugoitiin 10 min 3000 x g supernatantin selkeyttämiseksi. Supernatantin A₅₇₀ mitattiin VICTOR X4 -kuoppalevylukijalla (PerkinElmer). Kontrolleissa Ply korvattiin 0,1 % Triton X-100:lla ja PBS:lla.

Samankaltaisesti tutkittiin *S. pneumoniae* (TIGR4) kasvatusliuokseen erittämän Ply:n aiheuttamaa hemolyyysiä. Villityypin ja ”knock out” -bakteerikannan (*S. pneumoniae* TIGR4Δply) (Lau et al., 2001) yli yön kasvanut (5 % CO₂, 35°C) viljelmä sentrifugoitiin 20 min 3000 x g, ja käytettyä kasvatusliuosta (Todd-Hewitt) sekoitettiin PBS:ssa 20 µM PGG:n kanssa ennen punasolujen lisäämistä. Mittaus tehtiin kuten edellä on kuvailtu.

2.5 Turbidometria

Toksiinin ja polyfenolien vuorovaikutusta tutkittiin kokeessa, jossa muodostui fotometrisesti havaittavia liukenemattomia Ply–polyfenoli -komplekseja. 10 µM Ply (75 µl) ja polyfenoli (pitoisuusväli 5–1000 µM, 75 µl) yhdistettiin natriumasettaattipuskurissa (200 mM NaCl, 50 mM CH₃COONa pH 5,0)

huoneenlämmössä. 30 min inkubaation aikana ravistelussa Multiskan Ascent -kuoppalevylukijassa (Labsystems) mitattiin absortiomaksimi aallonpituudella 414 nm.

2.6 Oligomerisoituneen Ply:n elektroforeesi ja Western blottaus

100 nM Ply (3 µg), 1 % (v/v) punasolut ja 100 µM PGG yhdistettiin PBS:ssa, inkuboitii 2 min huoneenlämmössä ja sentrifugoitiin (30 min 16 000 x g). Punasolupelletti otettiin talteen ja resuspendoitiin puhtaaseen veteen ehjien punasolujen tuhoamiseksi. Uuden sentrifugoinnin jälkeen punasolujen kalvoista koostuva pelletti liuotettiin näytekupuriin (60 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 % SDS; 0,001 % Bromofenolisininen; 0,5 % β-merkaptotetanoli) ja erotettiin 6 % polyakryyliamidigeelillä. Geeli värjättiin Coomassie-värjäyksellä (40 % metanoli; 10 % etikkahappo; 0,25 % Brillantisininen R-250) 30 min ja ylimääräinen väri huuhdottiin pois (20 % metanoli, 5 % etikkahappo) yli yön.

Värjätyt geelin kanssa rinnakkain ajetun geelin proteiinit siirrostettiin 30 min, 25 V PVDF-kalvolle (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad), inkuboitii maitojauhepuskurissa (10 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween-20; 5 % (w/v) maitojauhe) 30 min epäspesifisen sitoutumisen vähentämiseksi, hiiren anti-His -vasta-aineella (1:5000 -laimennos, Sigma-Aldrich) 2 h ja piparjuuriperoksidaasileimatulla kanin anti-hiiri -vasta-aineella (1:10 000 -laimennos, DakoCytomation) 30 min. Kaikki inkubaatiot tehtiin huoneenlämmössä kevyessä ravistelussa ja vasta-ainekäsittelyiden jälkeen kalvo pestiin neljästi maitojauhetta sisältämättömällä puskuriliuoksella. Kalvolle lisättiin leimareagenssi (WesternBright Quantum, Labtech) kahdeksi minuutiksi ja kuvattiin ImageQuant LAS 4000 -laitteistolla (GE Healthcare).

2.7 Liposomien valmistus ja käyttö Ply:n oligomerisoimiseksi

1000 nmol lipidejä (palmitoyyli-oleyyli fosfadylylikoliini ja moolisuhteessa 0–50 % kolesteroli) sekoitettiin koeputkessa ja haihdutettiin liuotin typpivirtauksessa, kunnes lipidit muodostivat ohuen kalvon astian pohjalle. Lipidit hydratoitiin 30 min 60 °C:ssa Tris-puskurissa (10 mM Tris, 140 mM NaCl) 1 ml:n tilavuudessa, jolloin liposomien kokonaislipidikonsentraatio oli 1000 µM. Lyhyen vorteksoinnin jälkeen seokset ekstrusoiitiin 100 nm suodattimen läpi 37 °C:ssa 20 kertaa.

500 µM liposomeja ja 3,2 µM Ply yhdistettiin Tris-puskurissa, inkuboitii 5

min 37°C:ssa ja lisättiin 1:1 suhteessa näytepuskuria. Geelielektroforeesi ja Western blottaus tehtiin kuten edellä.

2.8 Toksiinin vaikutukset videomikroskopisesti

Ihmisen A549-keuhkoepiteelisoluja ylläpidettiin kasvatusliuoksessa (DMEM (Lonza), 2 mM L-glutamiini, 10 % naudan sikiön seerumi ja antibioottina streptomysiini/penisilliini), ja yksittäisten solujen mikroskopointia varten jaettiin kuoppalevylle 1×10^4 solua per kuoppa. 16 h kasvatuksen (5 % CO₂, 37 °C) jälkeen solut huuhdeltiin PBS:lla, ja lisättiin 100 nM Ply PBS:ssa. Soluja videoitiin AE2000 mikroskoopissa Moticam 5+ kameralla (Motic) huoneenlämmössä 30 min. Video käsiteltiin ja still-kuvat tehtiin OpenShot-ohjelmalla (OpenShot Studios).

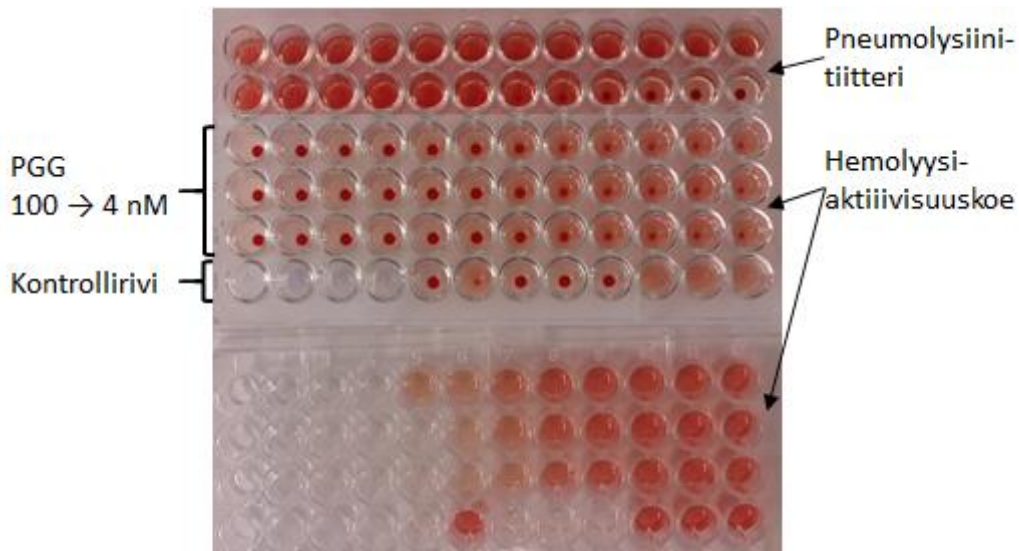
2.9 Ply:n sytotoksisuusmittaus

A549 -soluille tehtävään sytotoksisuusmittaukseen käytettiin Cytotoxicity Detection KitPLUS:a (Roche), joka perustuu solujen hajotessa vapautuvan laktaattidehydrogenaasin (LDH) mittaamiseen. 96-kuoppalevyllä kasvatettiin 48 h soluja (5000/kuoppa) ja huuhdeltiin PBS:lla. Lisättiin 2 nM Ply ja PGG (0, 125, 250, 500, 1000 ja 2000 nM) PBS:ssa 2 tunniksi 37 °C:ssa 5 % CO₂. Sytotoksisuus havaittiin valmistajan ohjeen mukaan lisäämällä värireagenssi 30 minuutiksi huoneenlämmössä, jonka jälkeen reaktio pysäytettiin pysäytysliuoksella, ja mitattiin A₄₉₀. Kontrolleina käytettiin detergentillä (0,02 % Triton X-100) hajotettuja soluja ja käsittelemättömiä soluja.

3 TULOKSET

3.1 Polyfenolit inhiboivat hemolyysiä

*S. pneumoniae*en erittämälle Ply-toksiinille on karakterisoitu useita inhibiittoreita, esimerkiksi epigallokatekiinigallaatti (Song, Teng, et al., 2017). Laajemman polyfenoliseulonnan toteuttamiseksi tässä tutkimuksessa vertailtiin hemolyyssikokeissa yli 20 yhdistettä, joiden avulla saatiin lisätietoa Ply:stä. Useimmat yhdisteet inhiboivat Ply:n aiheuttamaa hemolyyysiä kokeessa, jossa toksiinin aktiivisuutta mitattiin punasoluista vapautuvan hemoglobiinin avulla (Kuva 5). Tiitterin perusteella Ply-konsentraatioksi valittiin 1 nM. Tutkitut polyfenoliyhdisteet hapettuvat helposti fysiologisissa puskureissa, joten niiden stabiilius varmistettiin ennen kokeita. Massaspektrometrisesti yhdisteet säilyivät muuttumattomana kokeessa kuluvan puolen tunnin ajan (ei näytettyä dataa).



Kuva 5. Hemolyyssiaktiivisuuskoe. Pneumolysiiniitiitteri (kuvan yläosassa) selvitti varsinaisessa kokeessa käytettävän Ply-pitoisuuden. Ply laimennettiin PBS:ssä ja sekoitettiin punasolujen kanssa. Hemolyyysin inhibitiokokeessa (ylempi kuoppalevy) yhdistettiin polyfenoli (tässä PGG) ja Ply PBS:ssä, ja sekoitettiin punasolujen kanssa. Liuokseen vapautuneen hemoglobiinin absorbanssi mitattiin toisella kuoppalevyllä. Kontrollirivillä testattavia aineita yhdistettiin ilman punasoluja, polyfenolia tai Ply:ä, ja mitattiin spontaani (käsittelemättömät solut) ja maksimaalinen (detergentillä hajotetut solut) hemolyyysi.

Yhdisteiden seulonnan perusteella voitiin vertailla suuntaa-antavasti niiden IC₅₀-arvoja ja valita teholtaan vaihtelevia inhibiittoreita seuraaviin kokeisiin. IC₅₀ on se konsentraatio, jossa puolet hemolyyssistä estyy. Seulonnan tulokset on esitetty taulukossa 2. Jatkotutkimuksiin valittiin PGG, gemiini A, oenothiini B ja

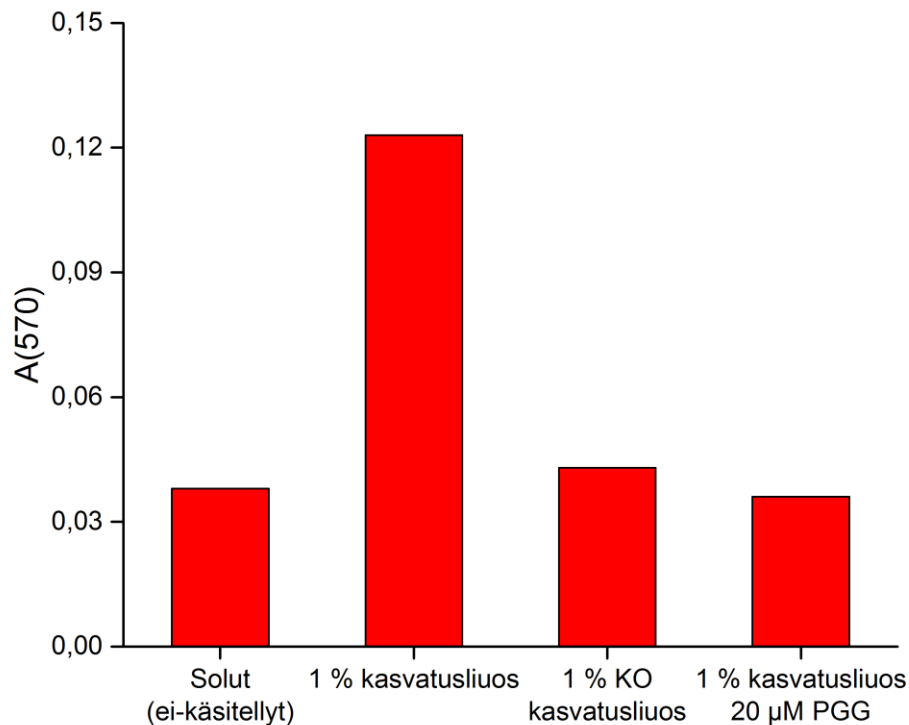
veskalagiini, koska ne edustivat voimakasta, keskivahvaa ja heikkoa inhibiittoria; toisin sanoen, PGG:n ja gemiini A:n IC₅₀ oli verrattain matala, oenothiini B:n keskivertoinen ja veskalagiinin korkea.

Taulukko 2. Polyfenoliseulonnan yhdisteiden vertailu. Yhdisteet on esitetty nousevan IC₅₀-arvon järjestyksessä, luvut ovat suuntaa-antavia mutta keskenään vertailukelpoisia. Voimakkaimmilla inhibiittoreilla on matala IC₅₀, heikommilla suuri, ja yhdisteistä kolme ei inhiboinut hemolyysiä. Korostetut polyfenolit valittiin inhibitiotehokkuuden perusteella jatkotutkimuksiin.

Polyfenoli	IC₅₀
PGG	10 nM
tellimagrandiini II	10 nM
gemiini A	20 nM
lambertianiini C	20 nM
sanguiini H-6	20 nM
agrimoniini	30 nM
gallotanniiniseos	40 nM
kasuariktiini	40 nM
oenothiini A	40 nM
salikariini B	50 nM
oenothiini B	60 nM
tellimagrandiini I	60 nM
punikalagiini	60 nM
tellimagrandiini I isomeeri	70 nM
salikariini A	80 nM
kastalagiini	80 nM
kasuariiniini	90 nM
geraniini	100 nM
salikariini C	100 nM
stakhyuriini	>100 nM
pedunkulagiini	>100 nM
veskalagiini	>100 nM
kastavaloniinihappo	>100 nM
tsebulagihappo	>100 nM
veskavaloniinihappo	ei ole tai hyvin suuri
tsebuliinihappo	ei ole tai hyvin suuri
monogalloyyglukoosi	ei ole tai hyvin suuri

Koska *S. pneumoniae* erittää Ply:ä bakteeriviljelmän kasvatusliuokseen, hemolyysikoetta käytettiin lisäksi varmistamaan, että polyfenolilla voi estää natiivi-Ply:n aiheuttaman hemolyysin. Villityypin (TIGR4) bakteerikannan ja "knock out" -kannan (TIGR4Δply) kasvatusliuoksen supernatanttia sekoitettiin PBS:ssa punasolujen kanssa, jolloin vain villityypin bakteerien liuos hajotti solut

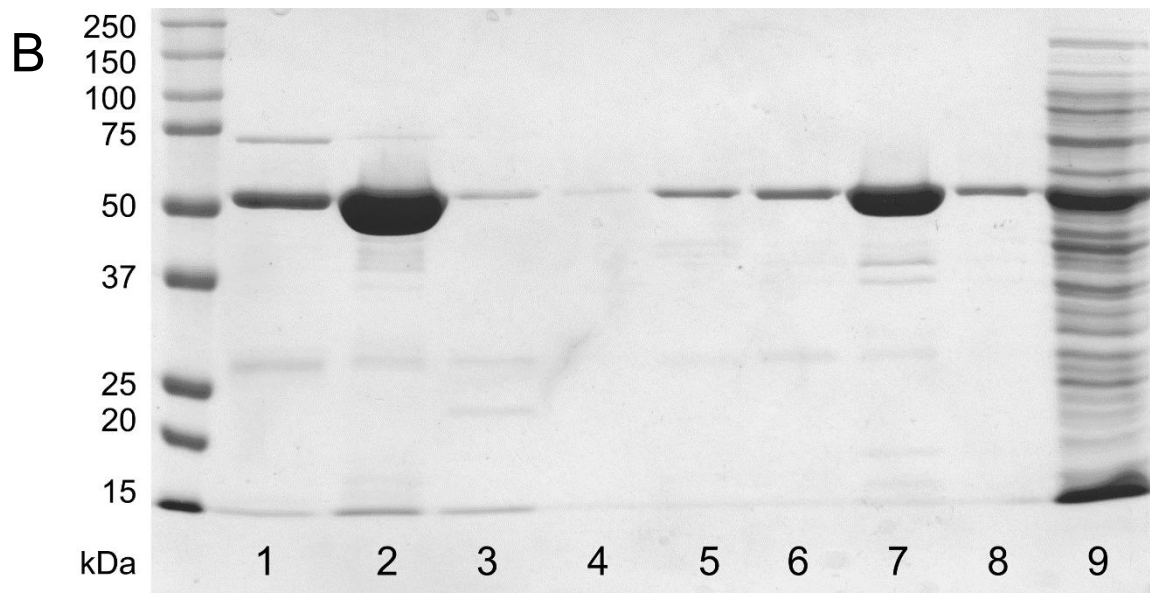
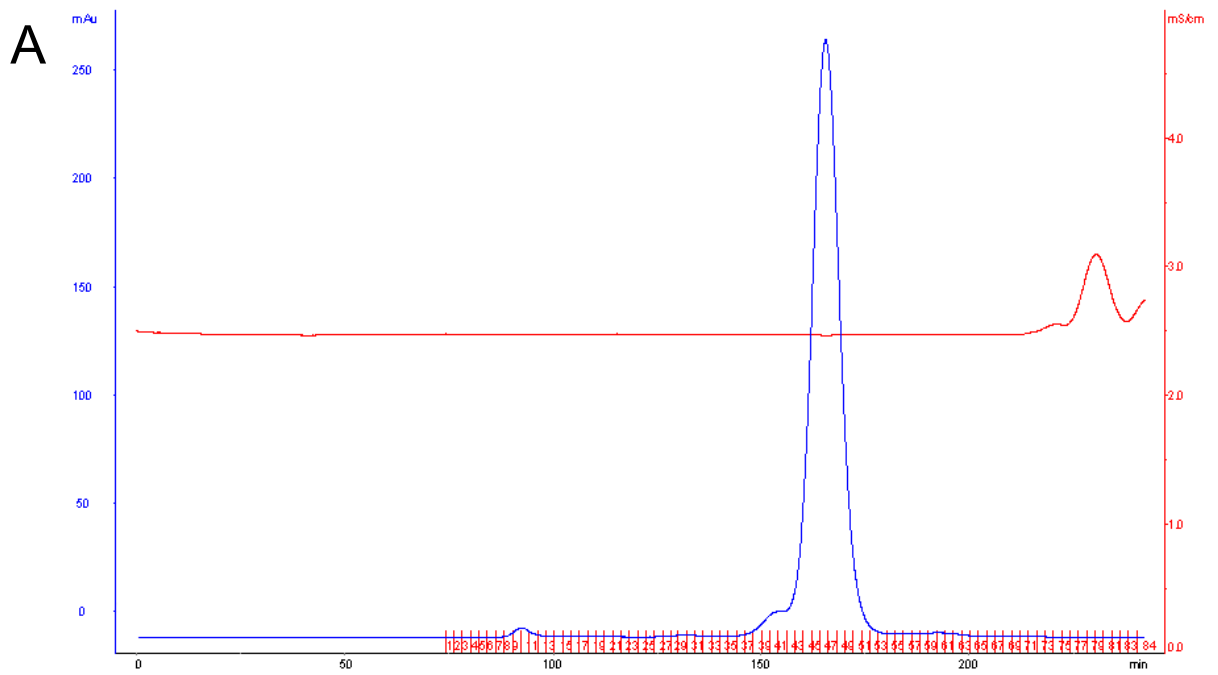
ja kasvatti punaisen aallonpituuden (570 nm) absorbanssia (Kuva 6). 20 μ M PGG:tä reaktiossa esti hemolyysin. Polyfenolit inhiboivat siis sekä natiivi-Ply:n että heterologisesti tuotetun Ply:n toimintaa.



Kuva 6. Natiivi-Ply ja hemolyysi. Yli yön kasvanut bakteeriviljelmä sentrifugoitiin ja käytettyä kasvatusliuosta sekoitettiin punasolujen kanssa PBS:ssa. Punasolut ja solujäämät eroteltiin sentrifugoinnilla, ja liuoksen absorbanssi mitattiin 570 nm:ssä. ”Knock out”-bakteerikannan pneumokokit (*S. pneumoniae* TIGR4 Δ ply) eivät tuota Ply:ä, eikä tällaisen viljelmän kasvatusliuos (KO kasvatusliuos) aiheuttanut hemolyysiä. Samoin 20 μ M PGG:tä reaktiossa estää hemolyysin.

3.2 Rekombinantti-Ply:n tuotto, puhdistus ja saanto

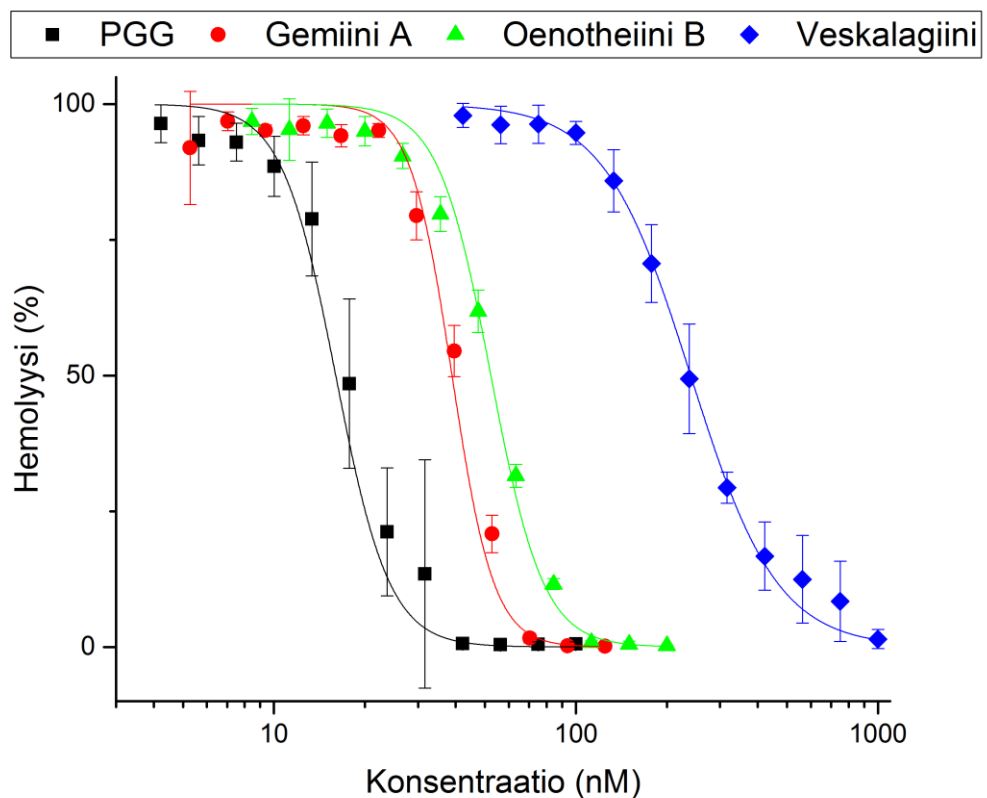
Rekombinantti-Ply:ä tarvittiin huomattavasti enemmän (useita milligrammoja) muissa kokeissa, joten toksiinia tuotettiin *E. colissa* ja eristettiin solulysaatista affiniteettikromatografisesti sekä koon perusteella geelisuodatuksella. Geelisuodatuksen kromatogrammin ja SDS-PAGE:n perusteella kohdeproteiini oli selkeästi preparaatin pääkomponentti ja muita proteiineja oli suhteessa vähän (Kuva 7). Ply tuottui myös hyvin suhteessa muihin lysaatin proteiineihin. 100 mg:sta bakteeriviljelmää (märkäpunnitus) saatiin 3 mg puhdistettua proteiinia.



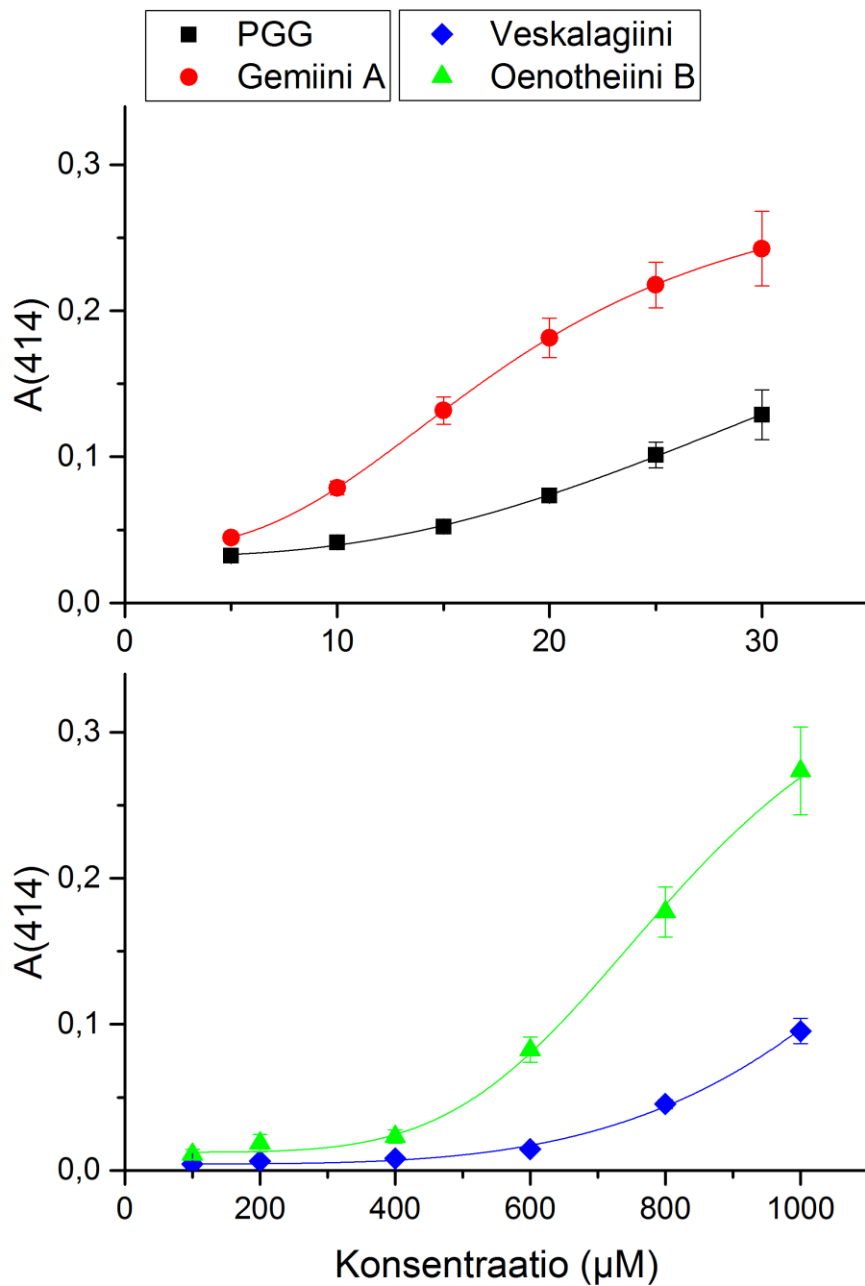
Kuva 7. Rekombinantti-Ply:n puhdistuksen seuranta. Geelisuodatuksen kromatogrammin (A) UV-absorptiokäyrän perusteella valtaosa proteiinista eluoiutui pylvästä kerralla. Puhdistuksesta kerätyt fraktiot (B) sisälsivät pääasiallisen komponentin hieman 50 kDa kokomarkkerin yläpuolella, joka sopii yhteen rekombinantti-Ply:n laskennallisen koon (54,6 kDa) kanssa. 1–3: Ni-affiniteettikromatografian eniten proteiinia sisältäneet fraktiot. 4: Geelisuodatuksen huippua edeltänyt fraktio 10. 5–8: Geelisuodatuksen keskeiset fraktiot 40, 43,46 ja 50. 9: Lysaatti.

3.3 Ply muodostaa polyfenolien kanssa liukenemattoman kompleksin

Tarkempaan tarkasteluun valittiin PGG, gemiini A, oenothiini B ja veskalagiini. Näille neljälle yhdisteelle määritettiin toistoilla ja rinnakkaisilla hemolyysiaktiivisuuskokeilla (Kuva 6) IC₅₀ sovittamalla mittaustuloksiin logistinen käyrä (Kuva 8). Yhdisteiden vertailu on koottuna taulukkoon 3. Ply:n ja polyfenolien vuorovaikutusta tutkittiin lisäksi kokeessa, jossa polyfenoli muodostaa proteiinin kanssa fotometrisesti havaittavan liukenemattoman kompleksin (Kuva 9). Nämäkin tulokset ovat esitettynä taulukossa 3.



Kuva 8. Polyfenolien vaikutus Ply:n hemolyysiaktiivisuuteen. Ply, polyfenoli ja punasolut sekoitettiin PBS:ssa ja inkuboitin 30 min 37 °C:ssa. Hemolyysi mitattiin liuoksen absorbanssina 570 nm:ssä ja ilmoitettiin siten, että 100 % hemolyysi vastasi täysin tuhoutuneita punasoluja ja 0 % vain PBS:lla käsiteltyjä soluja. Rinnakkaisia kokeita tehtiin kolme, ja tuloksissa esitettiin keskihajonta.



Kuva 9. Liukenemattomien Ply–polyfenoli -kompleksien muodostuminen. Ply ja polyfenoli sekoitettiin natriumasetaattipuskurissa ja 30 min inkubaation aikana mitattiin absorptiomaksimi 414 nm:n aallonpituudella. Rinnakkaisia kokeita tehtiin kuusi, ja tuloksissa esitettiin keskihajonta. Kompleksoituminen PGG:n ja gemiini A:n kanssa havaittiin kapeammalla konsentraatiovälillä kuin oenotheiini B:llä ja veskalagiinilla, joten x-akselit poikkeavat toisistaan.

Taulukko 3. Seulonnasta valittujen polyfenolien inhibiitoteho ja liukenemattoman kompleksin muodostumisen kynnysarvo. Yhdisteiden teho on verrattu veskalagiiniin, jolle on asetettu arvoksi 1.

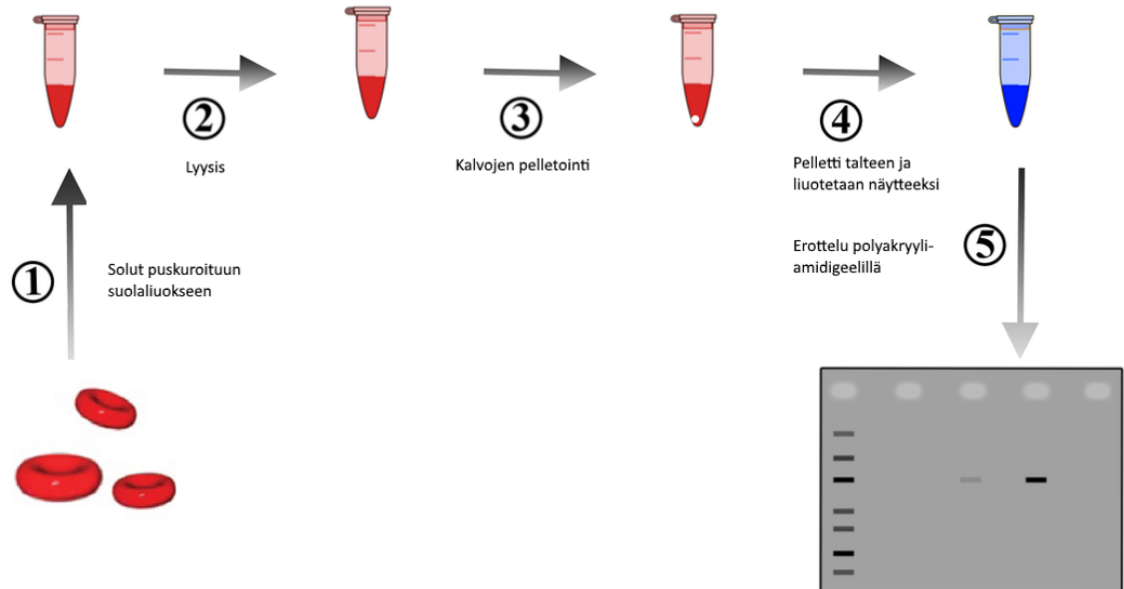
Polyfenoli	IC ₅₀ (nM)	Teho	Liukenematon kompleksi, kynnysarvo (μM)	Teho
PGG	18 ±0,7	13	14	58
Gemiini A	41 ±1,0	5,9	6,2	130
Oenothiini B	55 ±2,1	4,4	510	1,6
Veskalagiini	240 ±5,3	1	820	1

3.4 Polyfenoli häiritsee Ply:n oligomerisaatiota

S. pneumoniae virulenssille tärkeä Ply:n sytolyttinen aktiivisuus etenee siten, että liukoiset Ply-monomeerit oligomerisoituvat kohdesolun kalvolla. Oligomerisaation estäminen inhiboisi merkittävästi Ply:n sytolyysiaktiivisuutta.

Oligomerisaation havaitsemiseksi kehitettiin koe, jonka avulla tutkittiin polyfenolin (PGG) vaikutusta Ply:n aiheuttamiin soluvaurioihin (Kuva 10). Kokeessa punasolut lisättiin liukseen, joka sisälsi Ply:ä testattavissa olosuhteissa tai kontrollissa puhdasta vettä. Puhtaassa vedessä solut hajoavat, kun niihin virtaa vettä osmoosin vuoksi. Pelkässä suolaliuoksessa solut säilyvät ehjinä, mutta Ply hajottaa oligomerisoiduttuaan tällaisessa liuoksessa solut.

Hajonneiden solujen kalvot voitiin erottaa sentrifugoimalla. Ensin pelletit liuotettiin puhtaaseen veteen, jotta jokaisessa näytteissä kaikki solut tuhoutuisivat. Toisen pelletoinnin jälkeen solukalvot liuotettiin lievästi denaturoivaan puskuriin ja eroteltiin välittömästi polyakryyliamidigeelillä lukuun ottamatta kontrollinäytettä, joka kuumennettiin ennen geeliajtoa kuten tavallisessa SDS-PAGE:ssa. Tällöin heikoilla vuorovaikutuksilla kokoontuneet proteiini-kompleksit purkautuvat monomeereiksi.

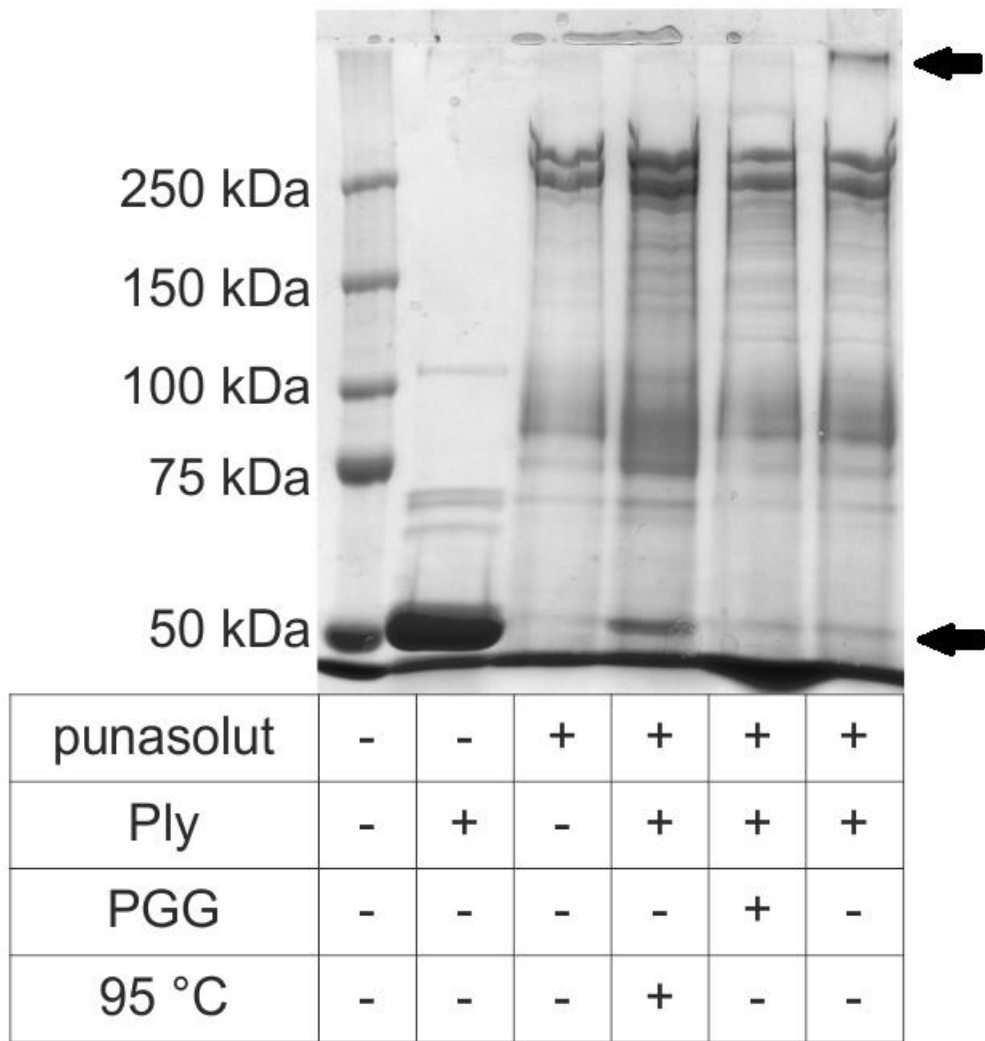


Kuva 10. Ply-oligomeerin valmistaminen. Ply oligomerisoituu punasolujen kalvolla, jolloin solu hajoaa. Sentrifugoimalla eroteltiin kalvot, joiden proteiinit kulkeutuivat geelياجossa kokonsa mukaan.

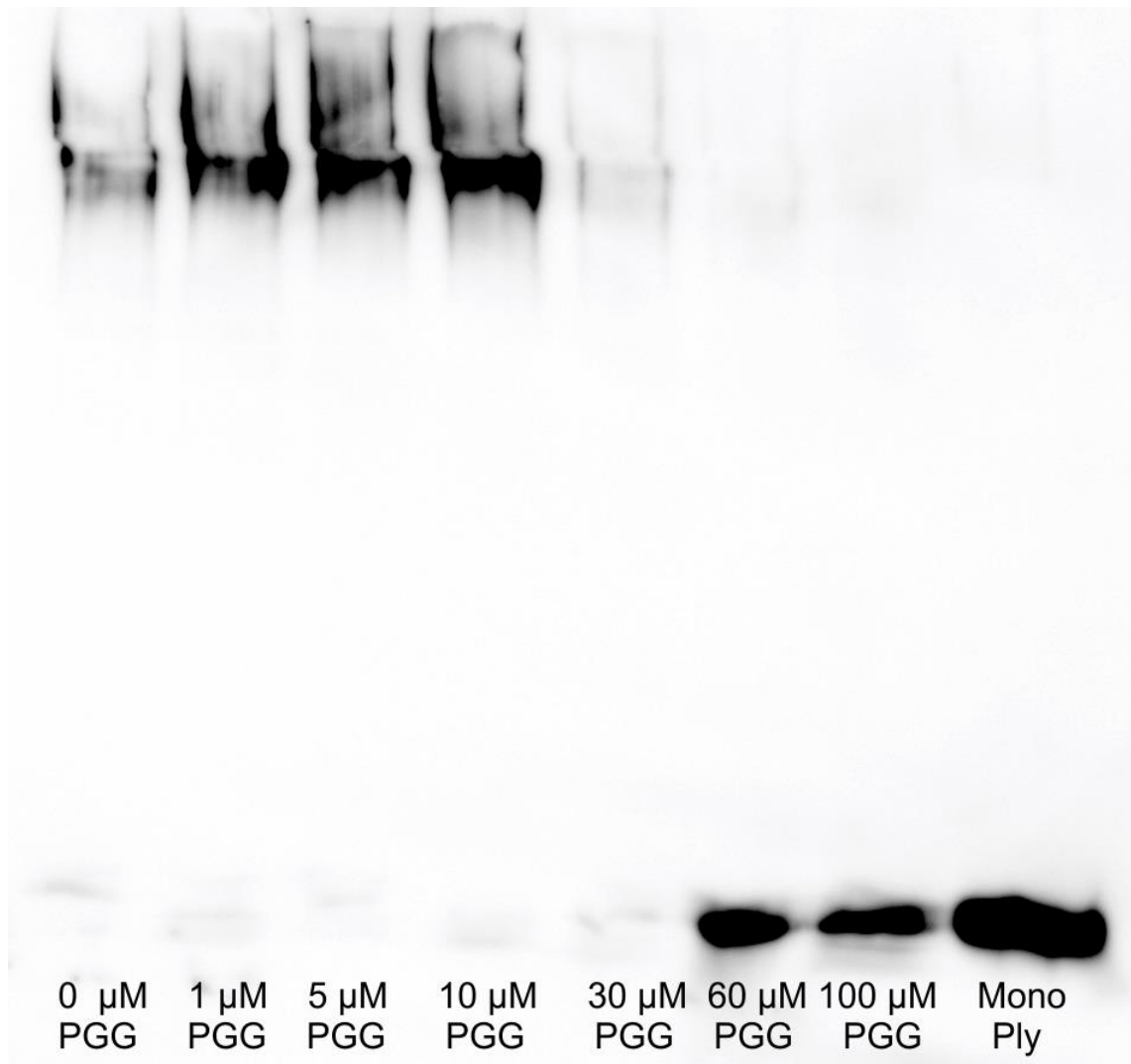
Koska Ply-oligomeeri on molekyyllipainoltaan hyvin suuri, se etenee polyakryyliamidigeelissä vain vähän. Vaihtoehtoisesti käytettiin agarosigeelejä, mutta niiden erottelukyky ei ollut riittävä, ja lisäksi niiden värjäämismenetelmät eivät onnistuneet yhtä hyvin kuin polyakryyliamidigeelien.

100 μM PGG esti kokeessa Ply-oligomeerin muodostumisen (Kuva 11). Solukalvon muut proteiinit ajautuivat pitkälti samalla tavalla kaikissa näytteissä, mikä muodostaa hyvän sisäisen kontrollin. Eriyksen tunnistettavat ovat 250 kDa:n kohdalla kulkeutuvat, punasoluille tyypilliset spektriinit. Toisena kuriositeettina hieman 100 kDa:n kokomarkkeria ylempänä näkyy todennäköisesti Ply-dimeeri pelkkää Ply:ä sisältäneessä näytteessä. Ply voi muodostaa spontaanisti liuoksessa oligomeereja (Gilbert et al., 1998).

Rekombinantti-Ply:n puhdistuksessa hyödynnettyä histidiinihäntää voitiin käyttää oligomerisaation todentamiseen; proteiinit siirrostettiin geeliltä polyvinylideenifluoridikalvolle (PVDF) ja tunnistettiin anti-His -vasta-aineella (Kuva 12). Samalla tutkittiin oligomerisaation riippuvuutta PGG:n konsentraatiosta.



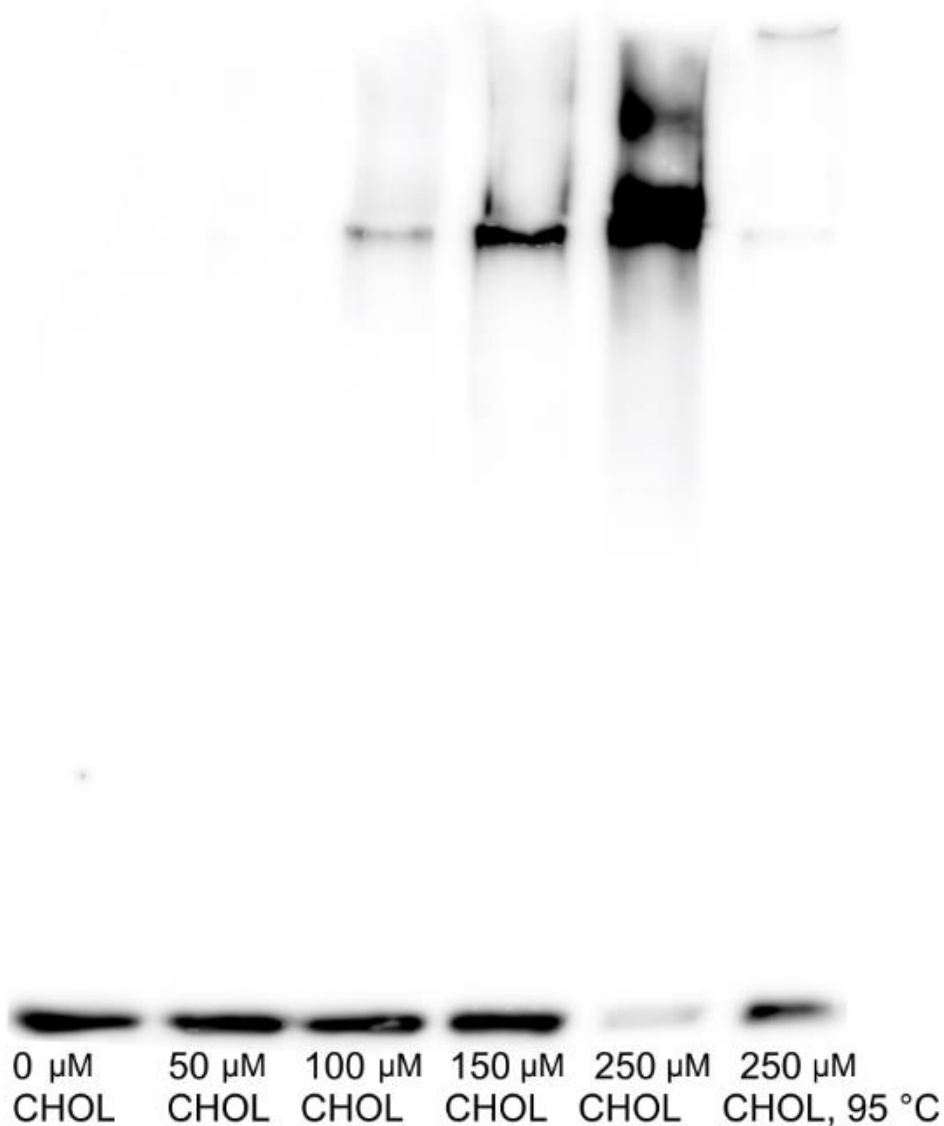
Kuva 11. Ply-oligomeeri. Punasolukalvoille kokoontunut Ply-oligomeeri eristettiin sentrifugoimalla kalvot pelletiksi ja elektroforeettisesti polyakryyliamidigeelillä. Nuolet osoittavat Ply:n etenemisen. Näytteen lämmittäminen 95 °C:seen ennen elektroforeesia denaturoi oligomeerin, ja Ply ajautuu monomeerin tavoin noin 50 kDa:n kokomarkkerin kohdalla.



Kuva 12. PGG estää Ply:n oligomerisaation. Punasoluihin sitoutunut Ply ajettiin geelillä ja siirrostettiin PVDF-kalvolle. Vasta-ainekäsittelyjen jälkeen PVDF-kalvolle lisättiin kemiluminesenssisubstraatti ja skannattiin kuvantamislaitteistolla. Korkeassa polyfenolikonsentraatiossa Ply pysyy monomeerisena. Näyte "Mono Ply": ainoastaan Ply:ä sisältänyt kontrolli.

3.5 Ply oligomerisoituu kolesterolia sisältävien liposomien vaikutuksesta

Ply:n oligomerisoituminen punasoluilla osoittautui tuloksekkaaksi menetelmäksi, ja sen pohjalta tavoiteltiin solutonta ja yksinkertaista mallia. Oligomerisoitumista tapahtuu myös ilman kohdemolekyylä, mutta jäljitellen luonnollisia olosuhteita Ply-monomeerit tarttuvat toisiinsa tehokkaammin fosfolipidikaksoiskalvolla. Kolesterolia sisältävät liposomit aiheuttivat oligomerisaation (Kuva 13).



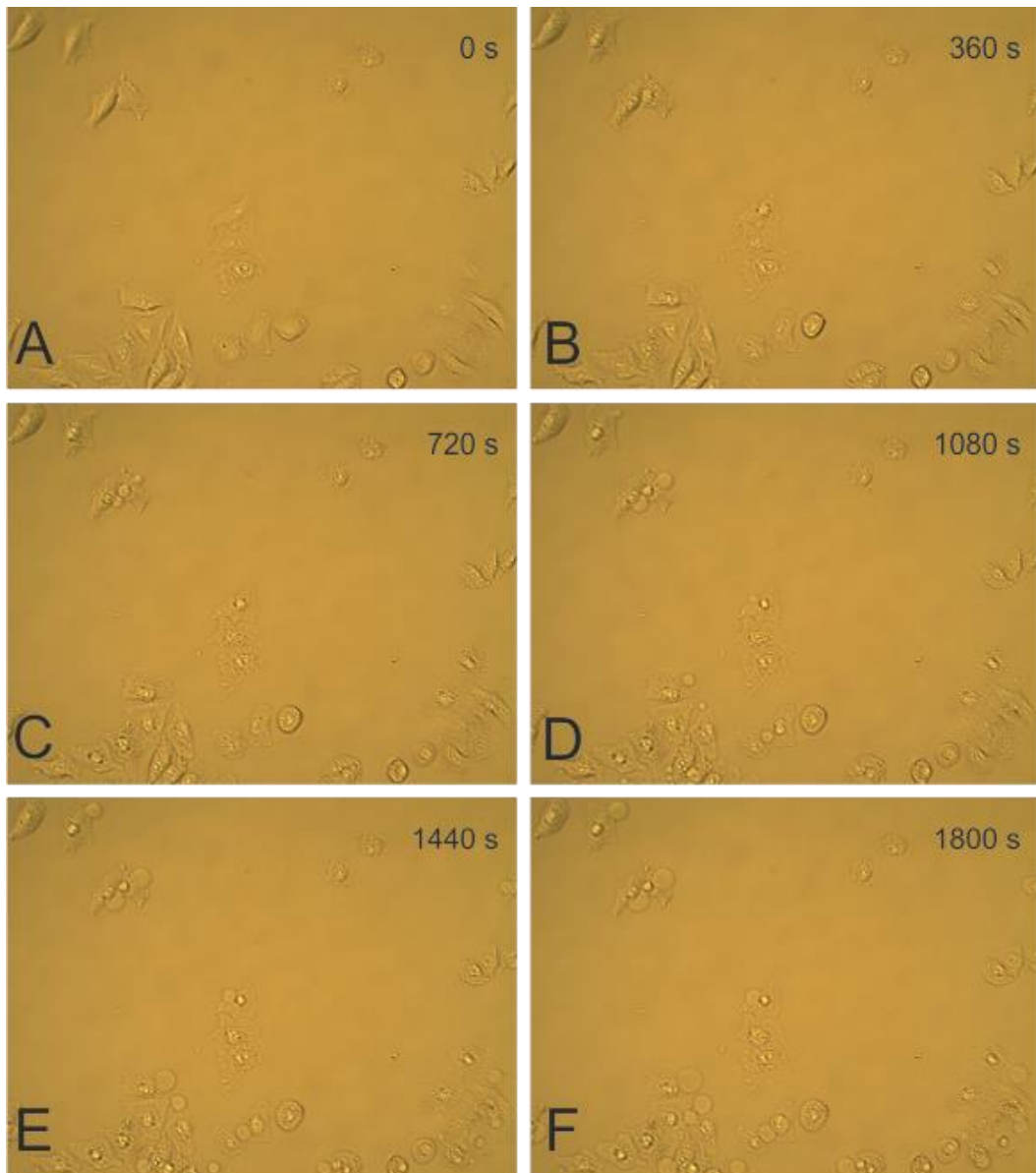
Kuva 13. Ply:n oligomerisaatio liposomeilla. Palmitoyyli-oleyylifosfadityylikoliinia ja kolesterolia sisältävät liposomit ja Ply yhdistettiin Tris-puskurissa, inkuboitui hetken 37 °C:ssa, eroteltiin geelillä ja havaittiin Western blotilla. Mitä suurempi osuus liposomien lipideistä on kolesterolia, sitä enemmän Ply-oligomeeria havaitaan. Näytteen lämmittäminen 95 °C:seen ennen geelijaota denaturoi oligomeerin kuten edellä.

3.6 Polyfenoli estää Ply:n sytotoksisen vaikutuksen A549-soluissa

Ply:n tutkimiseksi kehittyneemmässä mallissa hyödynnettiin A549-keuhkoepiteelisolulinjaa. Toisin kuin punasoluilla, tällä solulinjalla on monimutkainen eukaryoottisolun rakenne: tuma, erikoistuneet soluelimet, tukiranka. Punasolun voidaan ajatella tuhoutuvan täysin (hemolyysi) Ply:n vaikutuksesta, mutta A549-solut sietävät reikiä aiheuttavaa toksiinia ja

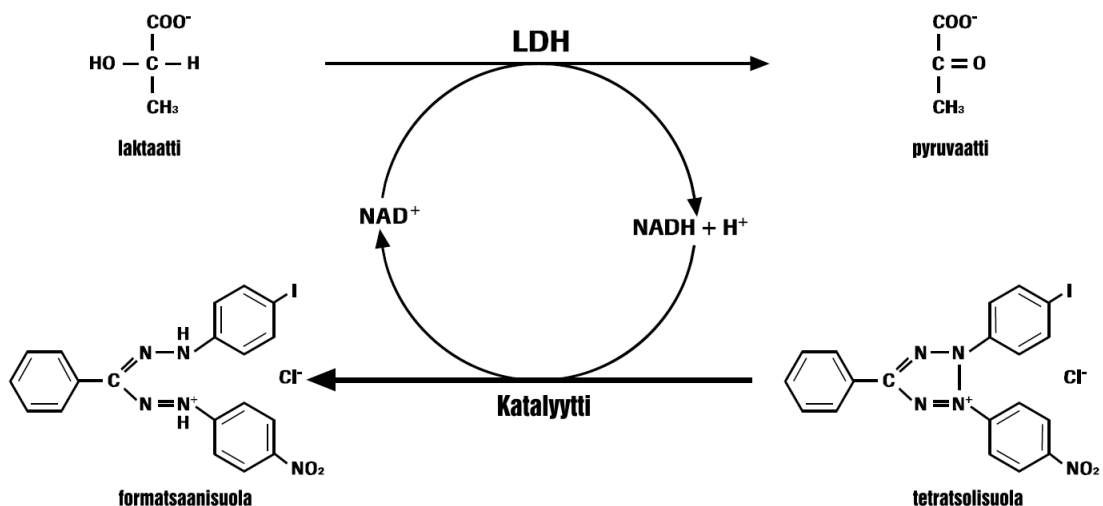
epäsuotuisia fyysisiä olosuhteita (osmoottinen paine) hieman paremmin. Ne säilyttävät pitkälti muotonsa ja kuolevat todennäköisesti pikemminkin aineenvaihdunnan häiriintymiseen kuin osiensa hajoamiseen.

Väljästi yli yön kasvaneita A549-soluja mikroskojettiin 30 min ajan Ply/PBS-käsittelyssä, jotta nähtäisiin helposti yksittäisen solun vaste toksiiniin (Kuva 14). Kuten edellä mainittiin, solut pysyivät aloillaan, mutta niiden ulkomuodossa tapahtui nähtäviä muutoksia, esimerkiksi niiden tumat tiivistyivät.



Kuva 14. Ply:n sytotoksinen vaikutus A549-soluihin. Soluja altistettiin Ply:lle PBS:ssa ja videoitiin ulkoiset muutokset. (A) Still-kuva lisäyshetkestä. (B-F) Solut 6 minuutin aikavälein. Varhaiset näkyvät muutokset ovat solujen pyöristyminen ja tumien tiivistyminen. 30 min aikana lisäksi solulimaan tulee näkyviin jyväsiä ja solukalvolta laajenee suuri rakkula.

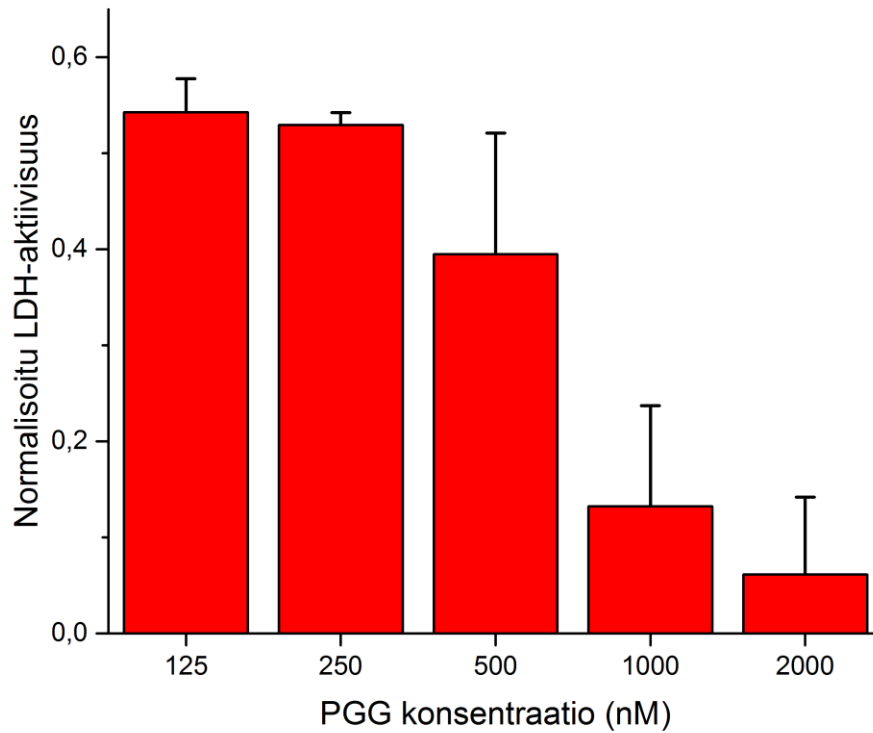
Sytotoksisuutta pyrittiin kvantitoimaan useilla menetelmillä. Polyfenolin suojaavaa vaikutusta ei voitu havaita värillisen tetratsolihdisteen (MTS) absorbanssin muutokseen perustuvalla kokeella. Samoin trypan blue -väriaineen eksklusioon perustuva määrittäminen ei tuottanut toivottua tulosta. Kolmanneksi yritettiin vielä määrittää solujen irtoamista – vaurioituneet solut oletettavasti irtoavat kuoppalevyn pohjasta. Irtoamattomat solut käsiteltiin kristallivioletilla, joten suurempi määrä väriä viittaisi suurempaan määrään kiinnipysyneitä soluja. Ply-käsittelyn tuhoamat solut eivät kuitenkaan todennäköisesti irronneet, ja sytotoksisuuden kvantitointiin tuli kokeilla toista lähestymistapaa. Hajonneista soluista vapautuvaan laktaattidehydrogenaasiin (LDH) toimintaan perustuva sytotoksisuusmäärittäminen puolestaan näytti PGG:n ja solujen selviytymisen välillä yhteyden. Tämä määrittäminen muistuttaa siis edellä mainittua MTS-proliferaatiokokeetta, mutta sytotoksisuus mitataan hajoavien solujen kautta, eikä elossa olevien solujen perusteella. LDH kytkeytyy tetratsolisoolan [2-(4-jodofenyyl)-3-(4-nitrofenyyli)-5-fenyylitetratsolikloridi] pelkistymisreaktioon (Kuva 15), jonka seurauksena yhdisteen absorbanssi muuttuu.



Kuva 15. Laktaattidehydrogenaasi ja väriyhdisteen reaktio. Vahingoittuneesta solusta vapautuu LDH:ta, joka entsymaattisesti hapettaa laktaatti-ionin pyruvaatti-ioniksi. Elektronit kulkeutuvat tetratsolisoolalle, nikotiiniamidiadeniinidinukleotidin (NAD^+ ja $\text{NADH} + \text{H}^+$) toimiessa vedynkantajana, jolloin se pelkistyy katalysoituna (diaforaasi) formatsaanisuolaksi. Muokattu valmistajan käyttöohjeesta (Roche).

A549-soluja altistettiin PBS:ssa Ply:lle, jota oli esi-inkuboitu eri PGG-pitoisuuksissa, ja mitattiin LDH-aktiivisuutta soluvaurioiden kvantitoimiseksi

(Kuva 16). Korkeahkoissa pitoisuuksissa (>500 nM) PGG inhiboi Ply:n aiheuttamia vaurioita, jolloin LDH:a vapautui vähemmän.



Kuva 16. Sytotoksisuusmääritys. A549-soluja altistettiin Ply:lle 2 h PBS:ssa eri PGG-konsentraatioissa ja mitattiin vapautuneen LDH:n aktiivisuutta suhteessa detergentillä hajotettuihin ja käsittelemättömiin soluihin. Rinnakkaisia kokeita tehtiin kolme, ja tuloksissa esitettiin keskihajonta.

4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Polyfenoliyhdisteiden vertailu

Hemolyysikokeiden perusteella polyfenolit inhiboivat Ply:ä. Seulonnassa tehokkaimmat yhdisteet olivat lipofiilisimpia tai oligomeerisia. Kaikki oligomeeriset ellagitanniinit eivät kuitenkaan olleet tehokkaita, vaan rakenteellisesti jäykimmät oenothiinit ja salikariniinit kuuluivat keskinkertaisiin ja heikkoihin inhibiittoreihin. Sama molekyylin rakenteen joustavuuteen perustuva selitys koskee myös monomeerisia hydrolysoituvia tanniineja: PGG:n galloyyliryhmät voivat pyöriä vapaammin kuin hiili–hiili-sidoksin kiinnittyneet ryhmät, jolloin PGG voi myös joustavammin asettua sitoutumiskohtaan.

Liukenemattoman kompleksin muodostumisen tulokset ja IC_{50} -arvot olivat samansuuntaisia keskenään PGG:lla, gemiini A:lla ja oenothiini B:llä sekä veskalagiinilla. Polyfenoleilla on yleistä ja spesifistä proteiiniaffiniteettia, eli tietty yhdiste voi sitoutua proteiineissa toistuviin rakenteisiin tai vain hyvin tarkkaan yhteen kohtaan, jossa aminohappotähteet ovat juuri sopivat ja juuri sopivassa asennossa. Epigallokatekiinigallaatti voi sitoutua Ply:n 3- ja 4-domeenien väliin (Song, Teng, et al., 2017), joten tässä työssä tutkituilla yhdisteillä voisi olla samanlainen spesifinen sitoutumiskohta.

4.2 Kalvolle kokoontuvan rakenteen havaitseminen

Ply-oligomeeri eroteltiin elektroforeettisesti liposomiseoksesta ja punasolukalvoilta. Hieman samankaltaista koejärjestelyä on käytetty sarveiskalvosolulinjan ja myös toisen CDC-toksiinin, intermedilysiinin kanssa (Soltani et al., 2007; Taylor et al., 2013). Tässä työssä kuitenkin lisäksi käytettiin PGG:a estämään oligomerisaatio. Tulos on vakuuttavampi kuin kokeessa, jossa inhibiittorin vaikutusta oligomerisaatioon tutkitaan ainoastaan auto-oligomerisaatioon perustuen (vrt. (Song, Teng, et al., 2017)). Tässä Ply-oligomeeri saadaan kokonaan näkyviin ja pois näkyvistä, eikä vain vähennettyä vyöhykkeiden intensiteettiä. Liposomeilla tehtiin vain suppeasti kokeita, mutta samankaltaisella määrityksellä voisi tutkia oligomerisaation estämistä soluttomassa mallissa.

4.3 Sytotoksisuus

Yksinkertainen videomikroskopointi valomikroskoopissa näytti Ply:n vaikutuksia A549-soluihin, eli suuria muutoksia muodossa, sisällä havaittavia jyväsiä ja lopulta solukalvon vauriosta johtuva rakkulan kasvaminen solun pinnalta. Vaikka menetelmä onkin vähemmän hienostunut kuin fluoresoiviin leimoihin perustuvat tekniikat, sillä on mahdollista havaita Ply:n sytotoksisuus. Sytotoksisuuden kvantitointi oli puolestaan haastavaa, ja monet koejärjestelyt eivät antaneet järkeviä tuloksia. Eläviä soluja hyödyntävä proliferaatiokoe epäonnistui ehkä siksi, että seerumia sisältävä solujen kasvatusliuos ei ollut yhteensopiva Ply:n, PGG:n ja reagenssien kanssa. Trypan blue -väriaineen antamat tulokset eivät olleet tasalaatuisia. Kristallivioletin kanssa tehtävät määritykset edellyttivät, että kuolleet solut irtoaisivat, mutta käytännössä tulokset eivät olleet toistettavia. LDH-mittaus onnistui, ja sitä on sovellettu samankaltaisissa tutkimuksissa (Zhao et al., 2016). PGG vähensi LDH-aktiivisuutta, oletettavasti siten, ettei inhiboitunut Ply vapauttanut entsyymiä soluista. Periaatteessa PGG voisi reagoida suoraan LDH:n kanssa, mutta kontrollinäytteessä käytettiin suurempaa PGG-pitoisuutta, joka ei vaikuttanut LDH:in. Tuloksen ei siis pitäisi olla artefakti.

4.4 Johtopäätökset

Polyfenolit estävät Ply:n sytotoksisuuden estämällä sen oligomerisaation. Tehokkaimpien yhdisteiden rakenne oli sellainen, että molekyylin liike oli vapaampaa eli substituenttiryhmät eivät olleet kiinni toisissaan. Yhdisteet reagoivat suoraan sytolysiinin kanssa. Tiedot voivat olla hyödyksi lääketutkimuksessa, kun suunnitellaan hoitoa bakteerin aiheuttamaan sairauteen. Lääke voisi myös ehkäistä patogeenin leviämistä esimerkiksi perheenjäseneltä toiselle.

KIRJALLISUUS

- Balachandran, P., Hollingshead, S. K., Paton, J. C., & Briles, D. E. (2001). The autolytic enzyme *lytA* of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *Journal of Bacteriology*, *183*(10), 3108–3116. <https://doi.org/10.1128/JB.183.10.3108-3116.2001>
- Brown, A. O., Mann, B., Gao, G., Hankins, J. S., Humann, J., Giardina, J., Faverio, P., Restrepo, M. I., Halade, G. V, Mortensen, E. M., Lindsey, M. L., Hanes, M., Happel, K. I., Nelson, S., Bagby, G. J., Lorent, J. A., Cardinal, P., Granados, R., Esteban, A., ... Orihuela, C. J. (2014). *Streptococcus pneumoniae* translocates into the myocardium and forms unique microlesions that disrupt cardiac function. *PLoS Pathogens*, *10*(9), e1004383–e1004383. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004383>
- Cockeran, R., Anderson, R., & Feldman, C. (2005). Pneumolysin as a vaccine and drug target in the prevention and treatment of invasive pneumococcal disease. In *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (Vol. 53, Issue 3, pp. 189–198).
- Escajadillo, T., & Nizet, V. (2018). Pharmacological targeting of pore-forming toxins as adjunctive therapy for invasive bacterial infection. *Toxins*, *10*(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/toxins10120542>
- Gilbert, R. J. C., Rossjohn, J., Parker, M. W., Tweten, R. K., Morgan, P. J., Mitchell, T. J., Errington, N., Rowe, A. J., Andrew, P. W., & Byron, O. (1998). Self-interaction of pneumolysin, the pore-forming protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology*, *284*(4), 1223–1237. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2258>
- González-Juarbe, N., Bradley, K. M., Shenoy, A. T., Gilley, R. P., Reyes, L. F., Hinojosa, C. A., Restrepo, M. I., Dube, P. H., Bergman, M. A., & Orihuela, C. J. (2017). Pore-forming toxin-mediated ion dysregulation leads to death receptor-independent necroptosis of lung epithelial cells during bacterial pneumonia. *Cell Death and Differentiation*, *24*(5), 917–928. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.49>

- González-Juarbe, N., Gilley, R. P., Hinojosa, C. A., Bradley, K. M., Kamei, A., Gao, G., Dube, P. H., Bergman, M. A., & Orihuela, C. J. (2015). Pore-Forming Toxins Induce Macrophage Necroptosis during Acute Bacterial Pneumonia. *PLOS Pathogens*, *11*(12), e1005337. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005337>
- Lau, G. W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S. E., Marra, A., Bryant, A. P., McDevitt, D., Morrison, D. A., & Holden, D. W. (2001). A functional genomic analysis of type 3 *streptococcus pneumoniae* virulence. *Molecular Microbiology*, *40*(3), 555–571. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02335.x>
- Li, H., Zhao, X., Deng, X., Wang, J., Song, M., Niu, X., & Peng, L. (2017). Insights into structure and activity of natural compound inhibitors of pneumolysin. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep42015>
- Lim, J. E., Park, S. A., Bong, S. M., Chi, Y. M., & Lee, K. S. (2013). Characterization of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae*, interacting with carbohydrate moiety and cholesterol as a component of cell membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *430*(2), 659–663. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.095>
- Loughran, A. J., Orihuela, C. J., & Tuomanen, E. I. (2019). *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and Inflammation. *Microbiology Spectrum*, *7*(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0004-2018>
- Moilanen, J., Koskinen, P., & Salminen, J. P. (2015). Distribution and content of ellagitannins in finnish plant species. *Phytochemistry*, *116*(1), 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.002>
- Moilanen, J., Sinkkonen, J., & Salminen, J. P. (2013). Characterization of bioactive plant ellagitannins by chromatographic, spectroscopic and mass spectrometric methods. *Chemoecology*, *23*(3), 165–179. <https://doi.org/10.1007/s00049-013-0132-3>
- Price, K. E., Greene, N. G., & Camilli, A. (2012). Export requirements of pneumolysin in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, *194*(14), 3651–3660. <https://doi.org/10.1128/JB.00114-12>

- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, *50*(3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Quin, L. R., Moore, Q. C., & McDaniel, L. S. (2007). Pneumolysin, PspA, and PspC contribute to pneumococcal evasion of early innate immune responses during bacteremia in mice. *Infection and Immunity*, *75*(4), 2067–2070. <https://doi.org/10.1128/IAI.01727-06>
- Robinson, K. A., Baughman, W., Rothrock, G., Barrett, N. L., Pass, M., Lexau, C., Damaske, B., Stefonek, K., Barnes, B., Patterson, J., Zell, E. R., Schuchat, A., & Whitney, C. G. (2001). Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998 opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *Journal of the American Medical Association*, *285*(13), 1729–1735. <https://doi.org/10.1001/jama.285.13.1729>
- 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., Walker, M. J., Paton, A. W., Paton, J. C., & Jennings, M. P. (2014). The cholesterol-dependent cytolysins pneumolysin and streptolysin O require binding to red blood cell glycans for hemolytic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(49), E5312–E5320. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412703111>
- Soltani, C. E., Hotze, E. M., Johnson, A. E., & Tweten, R. K. (2007). Specific protein-membrane contacts are required for prepore and pore assembly by a cholesterol-dependent cytolysin. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(21), 15709–15716. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701173200>
- Song, M., Li, L., Li, M., Cha, Y., Deng, X., & Wang, J. (2016). Apigenin protects mice from pneumococcal pneumonia by inhibiting the cytolytic activity of pneumolysin. *Fitoterapia*, *115*, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.017>
- Song, M., Lu, G., Li, M., Deng, X., & Wang, J. (2017). Juglone alleviates

- pneumolysin-induced human alveolar epithelial cell injury via inhibiting the hemolytic activity of pneumolysin. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(8), 1069–1075. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0880-0>
- Song, M., Teng, Z., Li, M., Niu, X., Wang, J., & Deng, X. (2017). Epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus pneumoniae* virulence by simultaneously targeting pneumolysin and sortase A. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(10), 2586–2598. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13179>
- Subramanian, K., Henriques-Normark, B., & Normark, S. (2019). Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: From nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen. *Cellular Microbiology*, 21(11), 1–10. <https://doi.org/10.1111/cmi.13077>
- Taylor, S. D., Sanders, M. E., Tullos, N. A., Stray, S. J., Norcross, E. W., McDaniel, L. S., & Marquart, M. E. (2013). The Cholesterol-Dependent Cytolysin Pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* Binds to Lipid Raft Microdomains in Human Corneal Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 8(4), e61300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061300>
- Tomasz, A. (1997). Antibiotic Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical Infectious Diseases*, 24(Supplement_1), S85–S88. https://doi.org/10.1093/clinids/24.Supplement_1.S85
- van Pee, K., Neuhaus, A., D’Imprima, E., Mills, D. J., Kühlbrandt, W., & Yildiz, Ö. (2017). CryoEM structures of membrane pore and prepore complex reveal cytolytic mechanism of Pneumolysin. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.23644>
- Wahl, B., O’Brien, K. L., Greenbaum, A., Majumder, A., Liu, L., Chu, Y., Lukšić, I., Nair, H., McAllister, D. A., Campbell, H., Rudan, I., Black, R., & Knoll, M. D. (2018). Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000-15. *The Lancet. Global Health*, 6(7), e744–e757. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30247-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30247-X)
- WHO. (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research*,

discovery, and development of new antibiotics. WHO Publications.
<https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1>. (Luettu 21.2.2020)

Zafar, M. A., Wang, Y., Hamaguchi, S., & Weiser, J. N. (2017). Host-to-Host Transmission of *Streptococcus pneumoniae* Is Driven by Its Inflammatory Toxin, Pneumolysin. *Cell Host and Microbe*, 21(1), 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.005>

Zhao, X., Li, H., Wang, J., Guo, Y., Liu, B., Deng, X., & Niu, X. (2016). Verbascoside Alleviates Pneumococcal Pneumonia by Reducing Pneumolysin Oligomers. *Molecular Pharmacology*, 89(3), 376–387. <https://doi.org/10.1124/mol.115.100610>