

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Biofizikos magistro studijų programos II kurso studentė

Evelina JANKAITYTĖ

Magistro baigiamasis darbas

**S100A9 baltymo ir amiloido beta peptido sąveikos su dirbtiniais plazminės
membranos modeliais tyrimas**

Darbo vadovas:

Dr. R. Budvytytė

Vilnius 2021

**S100A9 baltymo ir amiloido beta peptido sąveikos su dirbtiniais plazminės
membranos modeliais tyrimas**

Darbas atliktas

Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre, Biochemijos institute.

Evelina JANKAITYTĖ _____

Darbo vadovas:

Dr. R. BUDVYTYTĖ _____

Turinys

Santrumpos	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Netvarkūs baltymai	7
1.1.1. Netaisyklingai susilanksčiusių baltymų šalinimas organizme	7
1.2. Baltymų agregacija.....	8
1.3. Alzheimerio liga.....	10
1.4. Amiloido beta peptidas	11
1.4.1. Amiloido beta susidarymas organizme	11
1.5. S100A9 baltymas	13
1.5.1. S100A9 Alzheimerio ligoje.....	14
1.6. Amiloidinių baltymų ir peptidų sąveikos su membrana būdai.....	15
1.6.1. Įsiterpimas į membraną	16
1.6.2. Jungimasis su membranos paviršiumi	17
1.7. Biologinės membranos.....	17
1.8. Membranos modeliai.....	19
1.8.1. Liposomos	19
1.8.2. Prie paviršiaus prikabintos lipidinės membranos	21
2. METODIKA	22
2.1. Prietaisai ir medžiagos	22
2.1.1. Reagentai	22
2.1.2. Tirpalai	23
2.1.3. Sorbentai.....	23
2.1.4. Kompetentinės ląstelės	24
2.1.5. Mitybinės terpės	24
2.1.6. Laboratorinė įranga ir priedai	24
2.2. Metodai	25
2.2.1. S100A9 baltymo gryninimas.....	25
2.2.1.1. Transformuotų ląstelių auginimas ir tikslinio baltymo raiška	25
2.2.1.2. S100A9 baltymo renatūracija ir dializė	25
2.2.1.3. Jonų mainų chromatografija	26
2.2.1.4. Gelfiltracija	26
2.2.1.5. Baltymų elektroforezė.....	26
2.2.2. S100A9 baltymo oligomerizacija skirtingomis sąlygomis.....	27
2.2.3. Dinaminė šviesos sklaida	27
2.2.3.1. Dinaminės šviesos sklaidos matavimai.....	28
2.2.4. Prie paviršiaus prikabintos dvisluoksnės lipidinės membranos formavimas	28
2.2.5. Elektrocheminio impedanso spektroskopija.....	29
2.2.5.1. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos matavimai	31
2.2.6. tBLM vizualizavimas fluorescencinės mikroskopijos metodu.....	31
2.2.7. Liposomų su inkapsuliuotu kalceinu paruošimas.....	32
2.2.8. Kalceino išlaisvinimo iš liposomų stebėjimas.....	33
2.2.9. Amiloido β peptido paruošimas eksperimentams.....	34
2.2.10. Atominės jėgos mikroskopija	34
2.2.10.1. Amiloido β mėginių paruošimas AJM vaizdinimui.....	35
2.2.11. Duomenų pateikimas ir analizė	35

3. REZULTATAI.....	36
3.1. Baltymo S100A9 gryninimas	36
3.2. Prie paviršiaus prikabintų membranų ir baltymo S100A9 sąveikos tyrimas	38
3.2.1. tBLM charakterizavimas EIS metodu	38
3.2.2. tBLM vizualizavimas fluorescencinės mikroskopijos metodu.....	39
3.2.3. Baltymo S100A9 charakterizavimas DLS metodu.....	40
3.2.4. tBLM laidumo pokyčiai po sąveikos su S100A9 monomerais	41
3.2.5. tBLM laidumo poslinkio priklausomybė nuo S100A9 oligomerų koncentracijos	42
3.2.6. tBLM pokyčiai po sąveikos su skirtingais S100A9 agregatais	43
3.3. Amiloido beta sąveikos su liposomomis tyrimas.....	46
3.3.1. Amiloido beta morfologijos nustatymas AJM metodu	46
3.3.2. A β ₁₋₄₂ sukeltų liposomų integralumo pokyčių tyrimas.....	47
REZULTATŲ APTARIMAS.....	50
IŠVADOS	53
SANTRAUKA.....	54
SUMMARY.....	55
LITERATŪROS SĄRAŠAS	56
Padėka.....	66

Santrumpos

- AA – akrilamidas;
AJM – atominės jėgos mikroskopija;
AL – Alzheimerio liga;
APP – amiloido beta pirmtakas
APR – agreguoti linkę regionai
APS – amonio persulfatas
A β – amiloido beta peptidas
BAA – bisakrilamidas
Chol – cholesterolis
Cy5 – cianinas 5
DLS – dinaminė šviesos sklaida
DOPC – 1,2-dioleoil-*sn*-glicerolio-3-fosfatidilcholinai
EIS – elektrocheminio impedanso spektroskopija
HC18 – 20-(Z-oktadecil-9-eniloksi)-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksatetra-31-konteno-1-olis
IKD – ištekėjusi kalceino dalis
LB – Luria broth mitybinė terpė
LRPE – 1,2-dioleoil-*sn*-glicerolio-3-fosfatidiletanolaminas-N-(lizamino rodamino B sulfonilas)
NDS – natrio dodecilsulfatas
NDS-PAAG – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė
PA – fosfatidinė rūgštis
PC – fosfatidilcholinai
PE – fosfatidiletanolaminai
PG – fosfatidilglicerolis
PI – fosfatidilinozitolis
PS – fosfatidilserinas
SLE – smegenų lipidų ekstraktas
SM – sfingomielinas
TBI – trauminis smegenų pažeidimas
tBLM – prie paviršiaus prikabinta dvisluoksnė lipidinė membrana
TEMED – *N,N,N',N'*-tetrametiletano-1,2-diaminas
Tris – tris(hidroksimetil)aminometanas
WC14 – 20-tetradeciloksi-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontan-1-tiolis

ĮVADAS

Neurodegeneracinės ligos dažnai siejamos su netaisyklingai susilanksčiusių baltymų kaupimusi ir agregacija smegenyse. Pastarieji pasižymi toksišku efektu ir gali sutrikdyti neuronų funkcijas bei sukelti jų žūtį (Gandhi et al., 2018), tačiau tikslus to molekulinis mechanizmas iki šiol nėra aiškus. Vienos dažniausios demencijos formos – Alzheimerio ligos (AL) metu, smegenyse kaupiasi netirpios amiloidinės plokštelės, kurios pagrinde sudarytos iš amiloido beta peptido ($A\beta$). Pastebėta, kad svarbus patologijos veiksnys yra ir uždegiminis S100A9 baltymas. Šis baltymas pasižymi amiloidogeninėmis savybėmis ir smegenyse gali agreguoti į netirpias struktūras pats savaime arba kartu su $A\beta$ (Wang et al., 2018). Agregacijos proceso metu monomerai grįžtamai jungiasi į oligomerus, o vėliau seka netirpių fibrilių formavimasis (Stroo et al., 2017). Kuri agregacijos proceso forma yra toksiškiausia neuronams, iki galo nėra išsiaiškinta. Žinoma, kad dauguma amiloidinių baltymų gali sąveikauti su ląstelės plazmine membrana ir joje sukelti pažeidimus. Priklausomai nuo agregacijos proceso rūšies (monomerai, prefibriliniai dariniai, subrendusios fibrilės) sąveikos mechanizmas ir pažeidimo lygis skiriasi (Zhang et al., 2014). Šiame darbe tiriama skirtingo dydžio S100A9 ir $A\beta_{1-42}$ agregatų sąveika su lipidų dvisluoksniu. Paprastai plazminės membranos tyrimus apsunkina jos struktūros kompleksškumas, todėl yra sukurta įvairių membranos modelių, imituojančių pagrindines jos savybes. Šiame sąveikos tyrime naudojamos prie paviršiaus prikabintos fosfolipidinės membranos (tBLM) ir vienasluoksnės liposomos. Darbe atliekamas S100A9 baltymo gryninimas. S100A9 charakterizuojamas dinaminės šviesos sklaidos metodu (DLS), o sąveika su tBLM tiriama pasitelkiant elektrocheminio impedanso spektroskopiją (EIS). $A\beta_{1-42}$ peptido morfologija vertinama atominės jėgos mikroskopija (AJM). Jo poveikis lipidinio dvisluoksnio integralumui stebimas registruojant į liposomų vidų įterpto kalceino fluorescencijos intensyvumą.

Šio darbo tikslas yra ištirti skirtingos morfologijos S100A9 baltymo ir $A\beta$ peptido formų sąveiką su modelinėmis plazminės membranos sistemomis.

Darbo uždaviniai:

1. Išgryninti rekombinantinį S100A9 baltymą.
2. Nustatyti skirtingomis sąlygomis susiformavusių S100A9 baltymo ir $A\beta_{1-42}$ peptido formų morfologiją.
3. Ištirti kaip skirtingomis sąlygomis inkubuotas S100A9 baltymas sąveikauja su prie paviršiaus prikabintomis membranomis (tBLM).
4. Nustatyti skirtingų $A\beta_{1-42}$ agregacijos rūšių įtaką liposomų integralumui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Netvarkūs baltymai

Visi gyvų organizmų baltymai savaime arba dalyvaujant papildomiems baltymams susisuka į natyvią konformaciją. Tokioje būsenoje jie yra stabilūs ir tinkamai atlieka savo funkcijas. Dėl geno mutacijos ar savaiminių vyksmų baltymai gali susisukti netaisyklingai ir nesudaryti tvarkingos struktūros. Šie netvarkūs baltymai paprastai yra pašalinami, tačiau kartais to padaryti nepavyksta ir ląstelės viduje arba užląstelinėje erdvėje pradeda kauptis netaisyklingai susisukę baltymai. Kai kurie baltymai sudaro netirpias fibrilines sankaupas. Tokias struktūras galintys formuoti baltymai vadinami amiloidiniais ir yra siejami su neurodegeneracinėmis ligomis (Sweeney et al., 2017). 1.1 lentelėje yra pateiktas neurodegeneracinių ligų ir su jomis siejamų baltymų sąrašas. Kai kuriais atvejais pastebima, kad patologijos vystymesi dalyvauja ne vienas, o du ar daugiau tarpusavyje susijusių baltymų (Morales et al., 2013).

1.1 lentelė. Neurodegeneracinės ligos, susijusios su baltymų agregacija (Pritaikyta pagal Stroo et al., 2017).

	Agreguojantys baltymai	Agregatų lokalizacija	Paveikti smegenų regionai
Alzheimerio liga	Amiloidas beta, Tau, S100A9	Viduląstelinė, užląstelinė	Žievė, Hipokampus
Hantingtono liga	Hantingtinas	Viduląstelinė	Dryžuotasis kūnas (lot. <i>striatum</i>)
Parkinsono liga	Alfa-sinukleinas	Viduląstelinė	Juodoji medžiaga (lot. <i>substantia nigra</i>)
Prioninės ligos	Prionai	Užląstelinė	Galvos ir nugaros smegenys
Amilotropinė lateralinė skleroze	SOD, FUS, TDP-43	Viduląstelinė	Motoriniai neuronai

1.1.1. Netaisyklingai susilanksčiusių baltymų šalinimas organizme

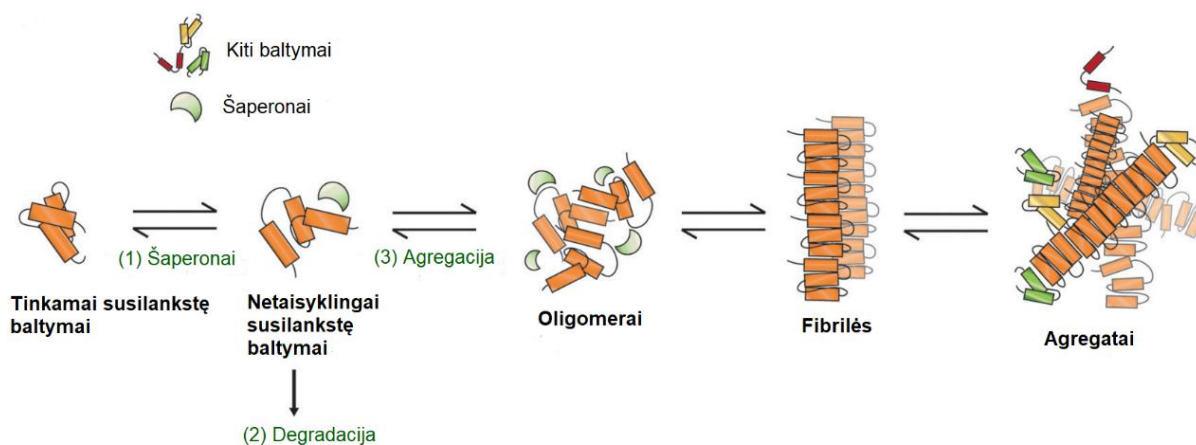
Normaliomis sąlygomis ląstelės kontrolės sistema palaiko baltymų homeostazę. Ši kontrolė yra svarbi baltymų biogenezei, stabilumui, teisingam susilankstymui, pernašai bei skaidymui. Visi procesai kontroliuojami siekiant užkirsti kelia netinkamai susilanksčiusių

baltymų kaupimuisi. Vienas iš ląstelės mechanizmų, kuris padeda baltymams susisukti į natyvią konformaciją yra molekuliniai šaperonai. Pastarieji apibrėžiami kaip baltymai, sąveikaujantys, stabilizuojantys ar padedantys kitiems baltymams įgyti funkciškai aktyvią konformaciją (Horwich, 2014). Baltymų degradacija yra dar vienas mechanizmas, kuriuo siekiama išvengti netaisyklingai susisukusių baltymų kaupimosi. Tai daroma 3 pagrindiniais skaidymo keliais: ubikvitino-proteasomų sistema, autofagija tarpininkaujant šaperonams ir makroautofagija (Ciechanover, 2006; Ciechanover ir Kwon, 2015). Tirpūs, netvarkingai susilankstę baltymai paprastai yra pašalinami ubikvitino-proteasomų sistemos. Autofagijos tarpininkaujant šaperonams metu selektyviai skaidomi baltymai, kurie savo struktūroje turi bent vieną aminorūgščių motyvą, atitinkantį pentapeptido KFERQ seką. Tokius regionus atpažįsta HSC70 baltymas (angl. heat-shock cognate 70), kuris sąveikauja su lizosomos paviršiaus receptoriais LAMP-2 (angl. lysosomal-associated membrane protein 2). Susidaręs kompleksas padeda degraduojamiems baltymams patekti į lizosomas, kur hidrolazės juo suskaido iki aminorūgščių (Alfaro et al., 2019). Baltymai arba jų agregatai, kurių nepavyko pašalinti dviem minėtais būdais, yra nukreipiami makroautofagijos keliu. Šiuo atveju skaidomus substratus apgaubia membraninė pūslelė – autofagosoma, kuri susilieja su lizosoma. Autofagosomos turinys yra degraduojamas rūgštinių lizosomos hidrolazių (Ghosh ir Pattison, 2018).

Baltymai, susiję su neurodegeneracinėmis ligomis, gali greitai agreguoti į netirpias formas ir taip išvengti suskaidymo. Agregatai ir tarpinės agregacijos proceso formos yra visiškai arba iš dalies atsparūs žinomiems degradacijos keliams (Ciechanover ir Kwon, 2015). Normaliomis sąlygomis organizme veikia minėti baltymų kokybės kontrolės mechanizmai. Senstant tampa vis sudėtingiau palaikyti tinkamą baltymų homeostazę. Galiausiai tai gali lemti netinkamai susilanksčiusių baltymų kaupimąsi ir agregaciją ląstelėje. Dėl to netvarkūs baltymai dažnai dalyvauja su amžiumi susijusių ligų vystymesi (Koga et al., 2011; Kakkar et al., 2016).

1.2. Baltymų agregacija

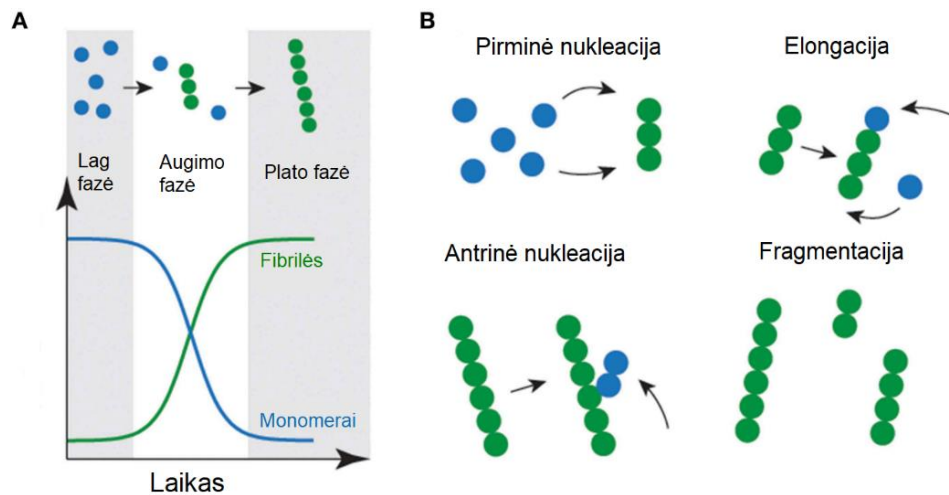
Baltymai ir peptidai, formuojantys agregatus neurodegeneracinių ligų metu, neturi akivaizdaus sekų, natyvių struktūrų ar funkcijų panašumo, tačiau jiems visiems yra būdingi struktūriniai persitvarkymai, kurių metu susidaro amiloidinės fibrilės (1.1 pav.). Jos pasižymi tvarkinga ir stabilia β -lakšto struktūra, orientuota vertikaliai fibrilių ašiai. Elektroninės mikroskopijos vaizduose fibrilės atrodo kaip išsišakojusios gijos, kurių skersmuo paprastai yra keli nanometrai, o ilgis gali siekti kelis mikrometrus (Stroo et al., 2017). Fibrilės jungiasi tarpusavyje ir suformuoja agregatus. Fibrilėse β -lakšto struktūra yra stabilizuojama vandenilinių ryšių susidarymo tarp jų sudarančių β -juostų CO ir NH grupių (Kadziauskas, 2012, p. 48).



1.1 pav. Baltymų agregacijos mechanizmas. Netaisyklingai susisukę baltymai gali būti iš naujo sulankstyti šaperonų pagalba (1), degraduoti (2) arba agreguoti (3). Pirmame agregacijos žingsnyje formuojasi oligomerai, kurie vėliau jungiasi į fibriles, tarpusavyje galinčias sudaryti didesnius agregatus (Pritaikyta pagal Stroo et al., 2017).

Norinti daugiau sužinoti apie tarpines agregacijos proceso rūšis, agregacijos procesą galima tirti *in vitro*. Atliekant matavimus, tokius, kaip šviesos sklaida ar tioflavino T fluorescencija, galima sekti baltymų agregacijos reakcijos kinetiką (1.2 pav.). Procesas prasideda nuo netvarkingai susilanksčiusių baltymų arba peptidų stabilių agregacijos branduolių susiformavimo. Prie tokių branduolių jungiasi monomerai ir vyksta fibrilių ilgėjimas. Agregaciją galima suskirstyti į tris pagrindines fazes. Pirmoji yra lag fazė, kaip manoma, atspindinti laiką, kurio reikia branduoliams susiformuoti (nukleacija) ir kur susidaręs fibrilių kiekis yra žemiau aptikimo ribos (Serio et al., 2000; Pedersen et al., 2004). Šios fazės metu tirpale vyrauja dvi rūšys: monomerai ir oligomerai (1.2 pav. A), o fibrilinių agregatų yra labai nedidelis kiekis (< 2 % visų rūšių). Augimo fazėje fibrilių koncentracija smarkiai padidėja, tuo tarpu monomerų kiekis sumažėja. Šiame etape vyksta labai spartus struktūrų ilgėjimas. Aktyviai augančios fibrilės skyla, sukuria naujus ilgėjimo galus ir antrinius branduolius (1.2 pav. B). Tokios fibrilių sritys katalizuoja naujų agregatų susidarymą (Arosio et al., 2014; Knowles et al., 2014). Galiausiai elongacijos procesas pasiekia pusiausvyrą ir didžioji dalis tirpių baltymų yra paverčiami fibrilėmis. Paskutinėje fazėje (plato) yra išsekvojami visi baltymo monomerai (Blanco et al., 2012).

Baltymo tendenciją agreguoti lemia trumpi APR regionai (angl. aggregation prone regions), kurie paprastai yra paslėpti hidrofobinėje baltymo dalyje. Dėl neteisingo baltymų susisukimo ar mutacijų šie regionai gali būti atidengiami ir lemti savaiminį agregatų susidarymą. APR paprastai yra trumpos sekos (5–15 aminorūgščių ilgio), pasižyminčios dideliu hidrofobiškumu ir turinčios tendenciją formuoti β -lakšto struktūras (Tartaglia et al., 2008).



1.2 pav. Amiloidinių fibrilių susidarymo schema. Fibrilių formavimasis gali būti suskirstytas į skirtingus etapus (A). Augimą skatina pirmininė (monomerų prisijungimas) arba antrinė (atskilusių fragmentų prisijungimas) nukleacija (B) (Pritaikyta pagal Zeineddine ir Yerbury, 2015).

1.3. Alzheimerio liga

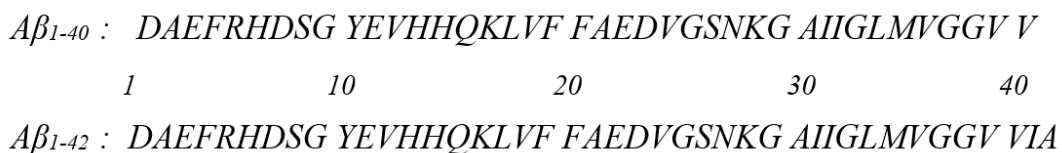
Alzheimerio liga (AL) yra labiausiai paplitusi demencijos rūšis, kuri pasireiškia laipsnišku kognityvinių funkcijų (atpažinimo, sprendimų priėmimo, kalbos, atminties ir kt.) blogėjimu, dažnai lydima elgesio sutrikimų, tokių, kaip apatija, agresyvumas ir depresija. Ši liga sudaro 60–70 % visų demencijos atvejų (Ferreira et al., 2014). Maždaug 70 % AL išsivystymo rizikos galima priskirti genetikai, tačiau riziką didina tokie veiksniai, kaip smegenų kraujagyslių ligos, diabetas, hipertenzija, nutukimas ir dislipidemija (Vinicius et al., 2019).

AL būdinga smegenų atrofija, kurią sukelia neuronų žūtis, tačiau to priežastis ir molekuliniai mechanizmai nėra iki galo aiškūs. Ligos metu smegenyse kaupiasi amiloidinės plokštelės, sudarytos iš amiloido beta ($A\beta$) peptido bei tarpląsteliniai Tau baltymo neurofibriliniai raizginiai (Hoozemans et al., 2006; Heneka et al., 2015). Manoma, kad šie veiksniai sukelia neuronų žūtį, atsirandančią dėl per didelio neuromediatorių receptorių stimuliavimo neuronų membranose, kalcio homeostazės sutrikdymo bei sukkelto uždegimo. Ūminis uždegimas smegenyse yra įprasta apsauga nuo infekcijos, toksinų ir sužalojimų, tačiau, AL metu prasideda lėtinis uždegimas (neurouždegimas). Tai lemia sutrikusi pusiausvyra tarp uždegiminių ir priešuždegiminių signalų. Uždegiminėmis sąlygomis mikroglijos ląstelės tampa aktyvios ir išskiria įvairius citokinus (Ferreira et al., 2014). Nustatyta, kad su AL patogenezė yra susiję ir S100 baltymų šeimos, atstovai, pvz., S100B (Gruden et al., 2007; Mori et al., 2010), S100A1 (Afanador et al., 2014), S100A8, S100A9 ir S100A8/A9 kompleksas (Chang et al., 2012), kurie dar vadinami neurouždegiminiais markeriais. Nerviniuose audiniuose S100A9

baltymas dalyvauja signalų perdavime uždegimo metu bei yra randams amiloidinėse plokštelėse ir aktyvioje glijoje (Wang et al., 2014).

1.4. Amiloido beta peptidas

Amiloidas beta yra trumpas peptidas, kuris gali būti sudarytas iš 39–43 aminorūgščių (Qiu et al., 2015). Iš visų A β izoformų, reikšmingiausios yra A β ₁₋₄₀ (40 aminorūgščių) ir A β ₁₋₄₂ (42 aminorūgštys) (Gupta et al., 2010). A β ₁₋₄₀ ir A β ₁₋₄₂ yra gana panašūs savo sekomis (1.3 pav.). Skirtumas tarp jų yra papildomas izoleucinas ir alaninas A β ₁₋₄₂ C-gale. A β ₁₋₄₂ yra labiau amiloidogeninis nei A β ₁₋₄₀ ir žymiai greičiau fibrilizuojasi (Teplow, 1998). Be to, A β ₁₋₄₀ gali slopinti A β ₁₋₄₂ agregaciją (Bate ir Williams, 2010). Kadangi A β ₁₋₄₂ C-galiniame regione yra dvi papildomos aminorūgštys, manoma, kad šis regionas nulemia skirtingus agregacijos mechanizmus (Socher et al., 2014). A β ₁₋₄₂ pasižymi didesniu toksiškumu ląstelėms ir yra tiesiogiai susijęs su Alzheimerio liga (Iwatsubo et al., 1994).



1.3 pav. Skirtingų A β izoformų aminorūgščių seka.

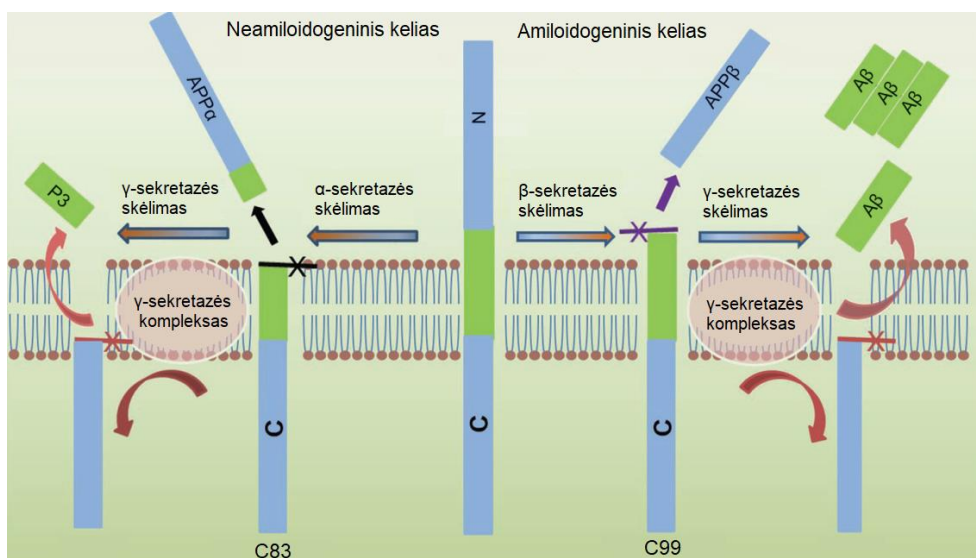
A β yra gaunamas β -sekretazei atskeliant amiloido pirmatako baltymą (APP) (angl. amyloid precursor protein). Minėti trys baltymai yra randami visuose stuburiniuose. Paukščių, roplių ir varliagyvių A β seka pasižymi didesniu nei 90 % homologiškumu su žmogaus A β , o žinduolių sekų homologija viršija 95 % (Tharp ir Sarkar, 2013). A β sekos konservatyvumas stuburinių evoliucijos eigoje rodo, kad jis yra reikalingas rūšių išlikimui. A β fiziologinė svarba patvirtinta eksperimentais, kurių metu endogeninio A β trūkumas sukelia neigiamas pasekmes įvairioms rūšims ir gyvūnų modeliams (Brothers et al., 2018). Nors yra žinoma apie A β neurotoksinį potencialą AL metu, sukaupta pakankamai įrodymų, leidžiančių manyti, kad A β pasižymi organizmui reikalingomis funkcijomis. Esant didelėms koncentracijoms (nM– μ M) A β sukelia ląstelių žūtį, tačiau buvo pasiūlyta, kad mažos šio peptido koncentracijos (pM) gali reguliuoti sinapsių plastiškumą (Aguayo et al., 2014) bei pasižymėti antimikrobiniu aktyvumu (Moir et al., 2018).

1.4.1. Amiloido beta susidarymas organizme

Amiloidas beta organizme susidaro skaidant jo pirmtaką – APP baltymą. APP yra integralusis membranos baltymas, randamas daugelyje audinių ir organų, įskaitant smegenis.

Šis baltymas sudarytas iš transmembraninio domeno, ilgo užląstelinio glikozilinto N-galo ir trumpesnio citoplazminio C-galo. APP reguliuoja sinapsių formavimąsi (Priller et al., 2006) bei dalyvauja geležies pernešime (Duce et al., 2011). Smegenyse APP yra randamas skirtingų izoformų, kurių ilgis svyruoja nuo 695 iki 770 aminorūgščių. Neuronai daugiausia sintetina trumpiausią iš šių formų – APP695 (Guerreiro et al., 2012), o glijos ląstelėse dažniausiai aptinkamos APP751 ir APP770 formos (De Silva et al., 1997). APP molekulė yra atskeliama β -sekretazės ir taip susidaro 39–49 aminorūgščių peptidas, amiloidas beta (Nunan ir Small, 2000).

Žmogaus organizme APP gali būti apdorojamas dviem būdais: amiloidogeniniu ir neamiloidogeniniu (1.4 pav.). APP pirmiausia yra atskeliamas α -sekretazės (neamiloidogeninis kelias) arba β -sekretazės (amiloidogeninis kelias). Tai lemia prie membranos prisikabinusių α - arba β -C galinių fragmentų susidarymą. APP skėlimas α -sekretaze ląstelės paviršiuje suformuoja tirpų APP α fragmentą, o viduje palieka 83 aminorūgščių ilgio APP C-galo fragmentą (C83). Kai APP baltymą nuskelia β -sekretazė, išorinėje membranos pusėje susidaro tirpus APP β , o vidinėje 99 aminorūgščių peptidas (C99). Tirpus APP α kiekis didėja reaguojant į muskarininių acetilcholino receptorių aktyvaciją, o tai rodo, kad neuronų aktyvumas skatina APP skėlimą α -sekretaze (Chen et al., 2017). Toliau vyksta transmembraninių fragmentų skėlimas γ -sekretaze, kurio metu susidaro P3 (3 kDa) arba A β (4,5 kDa) peptidai, priklausomai nuo to, kuriuo keliu prasidėjo APP apdorojimas (Iwatsubo, 2004). A β peptidas susiformuoja iš C99 fragmento.



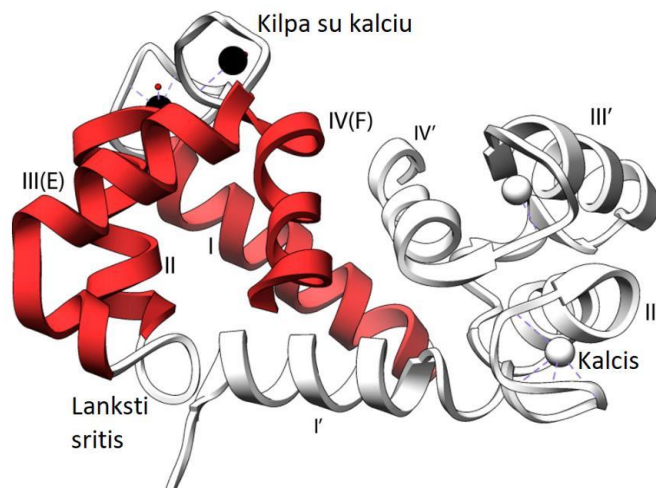
1.4 pav. Žmogaus APP proteolitinis skaidymas (Pritaikyta pagal Chen et al., 2017).

Paprastai A β iš smegenų yra pašalinamas per cerebrospinalinį skystį arba mikroglijos ląstelių ir astrocitų fagocitozės metu (Yoon ir Jo, 2012). Tirpios A β molekulės gali jungtis tarpusavyje į oligomerus, kurie iš smegenų yra pašalinami lėčiau ir sudaro netirpias sanaukas.

Šis kaupimasis prasideda sutrikus pusiausvyrai tarp A β gamybos ir šalinimo. Daugumos *in vivo* ir *in vitro* eksperimentų metu pademonstruota, kad oligomerinės ir netirpios A β formos pasižymi toksiniu efektu neuronams. Šie rezultatai leido suprasti, kad A β oligomerų ir agregatų formavimasis tiesiogiai prisideda prie AL patogenezės. Dėl šios priežasties A β tapo vienu pagrindiniu taikiniu Alzheimerio ligos gydyme (Masters ir Selkoe, 2012).

1.5. S100A9 baltymas

Baltymas S100A9 (1.5 pav.) yra S100 baltymų šeimos atstovas. Šiai šeimai priklauso citozoliniai, kalcį surišantys baltymai, kurie atlieka įvairias viduląstelines ir užląstelines funkcijas: reguliuoja ląstelių apoptozę, proliferaciją, diferenciaciją, migraciją, energijos apykaitą, kalcio pusiausvyrą, baltymų fosforilinimą, dalyvauja uždegiminiuose procesuose ir imuniniame atsake (Marenholz et al., 2004; Leclerc et al., 2009; Gross et al., 2014).



1.5 pav. S100A9 homodimero struktūra. Monomerą sudaro I spiralė, II spiralė, lanksti sritis, III spiralė (EF rankos struktūros spiralė E), kalcį surišanti kilpa, IV spiralė (EF rankos struktūros spiralė F) (Pritaikyta pagal Markowitz ir Carson, 2013).

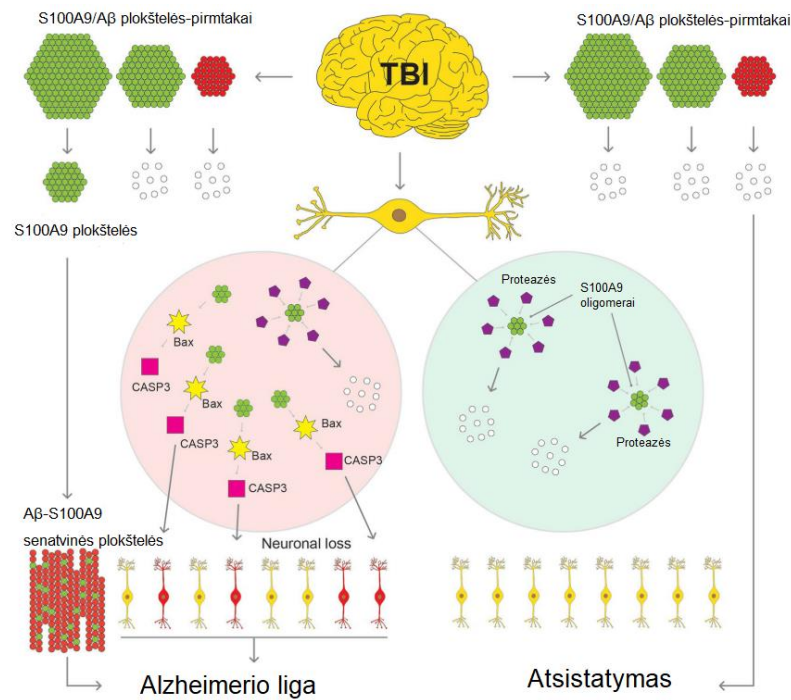
S100 baltymai vis dažniau įvardijami kaip svarbūs neurodegeneracijos ir senėjimo veiksniai. Įrodyta, kad S100A8 ir S100A9 iRNR žinduolių audiniuose, įskaitant ir CNS yra senėjimo požymis (Swindell et al., 2013). Be to, pastebėta, kad S100A9 yra specifiskai susijęs su neurodegeneracinėmis ligomis. Alzheimerio ligos metu padidėja S100A9 ekspresija mikroglijos ląstelėse (Shepherd et al., 2006). S100A9 taip pat buvo rastas hipokampo ir smegenų žievės neuronuose AL metu. Tose pačiose vietose buvo lokalizuotas ir A β peptidas. Įdomu tai, kad kitas S100 šeimos atstovas, S100A8 baltymas, galintis sudaryti heterokompleksą su S100A9, nebuvo pastebėtas dalyvaujantis neurouždegiminiuose procesuose AL smegenyse (Wang et al., 2014). S100A9 baltymas jungiasi su galutinių glikacijos produktų receptoriais (RAGE) ir Toll-Like receptoriais (TLR4). Pastarieji dalyvauja endogeninių molekulių, išsiskiriančias lėtinio uždegimo metu, atpažinime (Katte ir Yu, 2018; Ehrchen et al., 2009).

S100A9 monomeras turi didelio ir mažo giminingumo kalciui sritis, atitinkamai C-gale ir N-gale. Kalcio prisijungimas sukelia konformacinius pokyčius, kurių metu pasisuka alfa spiralinė ir yra atidengiamas hidrofobinis plyšys, reikalingas makromolekulinėms sąveikoms (Markowitz ir Carson, 2013). S100A9 paprastai sudaro homodimerus bei heterodimerus ir heterotetramerus kartu su S100A8 (Riva et al., 2013).

1.5.1. S100A9 Alzheimerio ligoje

Horvath ir kt. (2016) pademonstravo, kad S100A9 pasižymi amiloidogeninėmis savybėmis ir *in vitro* formuoja citotoksiškus amiloidinius oligomerus, protofibriles ir fibriles taip pat lengvai kaip A β ₁₋₄₂ peptidas. Taip pat, S100A9 ir A β gali agreguoti tarpusavyje *in vitro* ir *in vivo*. *In vitro*, priklausomai nuo jų molinio santykio, jie sudaro žymiai didesnius fibrilinius, sferinius ir nestruktūrizuotus agregatus, palyginus su kiekvieno jų atskirais agregatais. S100A9 protofilamentai yra neurotoksiški ir sukelia neuronų pažeidimus ar net žūtį. S100A9 agregacija kartu su A β gali veikti kaip mechanizmas, panaikinantis tirpias neurotoksines jų abiejų rūšis bei sutrikdantis uždegimines S100A9 signalines savybes. Šio proceso pasekmė yra amiloidinių plokštelių kaupimasis AL smegenyse. Nustatyta, kad AL smegenų audiniuose A β ir S100A9 yra lokalizuoti kartu daugumoje amiloidinių plokštelių, o tai rodo, kad S100A9 gali prisidėti prie amiloidinių plokštelių formavimosi. Dėl savo amiloidogeniškumo ir uždegiminių savybių, S100A9 yra svarbus faktorius AL amiloidinėje-neurouždegiminėje kaskadoje ir neurodegeneracijoje. S100A9, A β ₁₋₄₂ ir kitų biožymenų kiekio pokyčiai cerebrospinaliniame skystyje gali atspindėti jų dalyvavimą patologiniuose AL mechanizmuose ir ligos progresavime (Sharma ir Singh, 2016; Horvath et al., 2016).

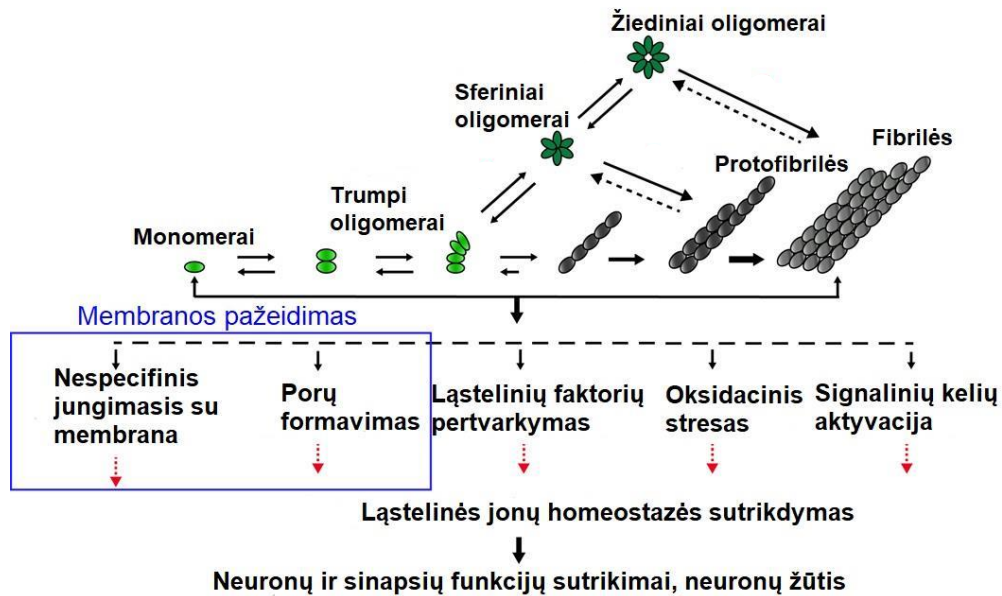
Trauminis smegenų pažeidimas (TBI, angl. traumatic brain injury) yra laikomas vienu iš veiksnių, kurie gali prisidėti prie AL vystymosi. Wang ir kt. (2018) pademonstravo, kad amiloidų-neurouždegiminė kaskada, kurioje dalyvauja S100A9 jungia TBI ir AL. Analizuojant galvos traumas patyrusių pacientų smegenų audinius, pastebėtas amiloidinių plokštelių formavimasis. Jose nustatytas didelis S100A9 baltymo kiekis, lyginant su A β . TBI metu susidariusios uždegiminės sąlygos, tokios kaip padidėjusi S100A9 koncentracija, pH sumažėjimas ir pakilusi temperatūra, skatina S100A9 agregaciją. S100A9 gali būti pašalintas proteazių, tačiau didesni oligomerai ir agregatai tampa joms atsparūs ir pradeda kauptis ląstelėje. A β peptidas gali agreguoti kartu su S100A9 ir sudaryti struktūras, kurios tampa AL būdingų senatvinių plokštelių pirmtakais.



1.6 pav. Ryšys tarp trauminio smegenų pažeidimo (TBI) ir Alzheimerio ligos. TBI metu, padidėjus S100A9 kiekiui, formuojasi amiloidinės plokštelės, kurios gali būti pašalintos proteazių arba, sutrikus šiam šalinimo mechanizmui, pasitarnauti kaip Alzheimerio ligos senatvinių plokštelių pirmtakai. Proteazių nepašalinti viduląsteliniai S100A9 oligomerai skatina apoptozinę kaskadą, prisidedančią prie neurodegeneracijos. Paveiksle žalios spalvos plokštelės sudarytos iš S100A9, raudonos – iš Aβ (Pritaikyta pagal Wang et al., 2018).

1.6. Amiloidinių baltymų ir peptidų sąveikos su membrana būdai

Smegenyse besikaupiantys amiloidiniai peptidai ir baltymai pasižymi neurotoksiškumu. Mokslinėje literatūroje dažnai diskutuojama apie amiloidų toksiškumo mechanizmą. Anksčiau buvo manoma, kad fibrilės ir dideli baltymų agregatai yra toksiški neuronams. (Davies et al., 1997; Kim et al., 1999). Vėliau buvo iškelta hipotezė, kad baltymų fibrilių susidarymas veikia kaip mechanizmas, apsaugantis nuo mažesnių tarpinių rūšių – oligomerų, kurie yra žalingiausi. Tokių mažų oligomerų toksiškumą galima paaiškinti dėl jų paviršiuje atidengiamų hidrofobinių grupių, kurios normaliomis fiziologinėmis sąlygomis yra paslėptos baltymo viduje (Campioni et al., 2010). Lengvai pasiekiamos baltymų hidrofobinės sritys gali lemti sąveiką su daugeliu funkcinų ląstelių komponentų, pavyzdžiui, plazmine membrana (Bucciantini et al., 2012). Vis dėlto iki galo nėra aišku, kokių efektų pasižymi tam tikra baltymo agregacijos proceso forma. Yra pasiūlyti keli toksiškumo mechanizmai, pavyzdžiui, sinapsinio perdavimo ir mitochondrijų funkcijų sutrikdymas, oksidacinis stresas, ląstelių signalų perdavimo pokyčiai. Taip pat neuronai gali būti pažeisti amiloidiniams baltymų agregatams sąveikaujant su plazmine membrana ir sukeliant pažeidimus joje (1.7 pav.) (Butterfield ir Lashuel, 2010; Kotler et al., 2014).



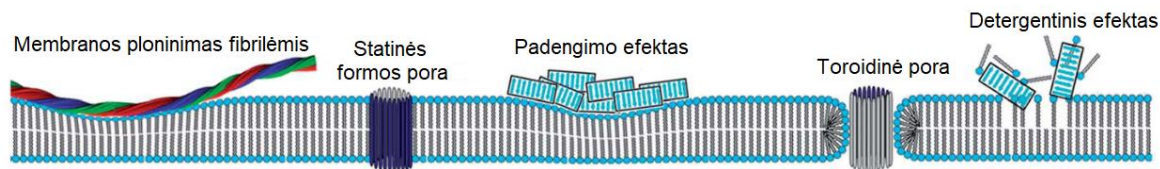
1.7 pav. Galimi neuronų funkcijų sutrikdymo būdai, sukelti amilodinių baltymų ir peptidų. Viena iš vyraujančių toksiškumo hipotezių – membranos pažeidimas (Pritaikyta pagal Kotler et al., 2014).

Tiesioginę amiloidų sąveiką su fosfolipidų dvisluoksniu galima suskirstyti į dvi pagrindines rūšis. Pirmuoju atveju baltymas įsiterpia į membraną ir joje formuoja poras. Įsiterpimas padidina membranos laidumą ir gali sukelti ląstelės žūtį. Antruoju atveju baltymai jungiasi prie membranos paviršiaus (1.8 pav.). Prisijungimo vietoje membrana yra suspaudžiama ir suploninama. Abu sąveikos tipai nėra visiškai atskirti. Kuris iš jų vyraus, priklausys nuo įvairių faktorių (Niu et al., 2018). Pavyzdžiui, $A\beta$ α -spirale prisijungia prie membranos paviršiaus esant dideliame lipidų/baltymų santykiui, o jam mažėjant sudaro oligomeras, kurie formuoja transmembranines poras. Svarbu paminėti, kad ne tik baltymas gali paveikti membranos savybes ir būseną, tačiau ir pati membrana gali turėti įtakos jo agregacijai. Įsiterpimas dažnai slopina fibrilių formavimąsi, tačiau lemia jonų kanalų tipo struktūrų susidarymą (Wong et al., 2009).

1.6.1. Įsiterpimas į membraną

Įsiterpimo į lipidų dvisluoksnį metu amiloidai formuoja dviejų rūšių poras: statinės formos ir toroidines poras (1.8 pav.). Šie toksiški jonų kanalai ląstelių membranose sukelia kalcio homeostazės sutrikdymą, membranos depoliarizaciją, kai kuriais atvejais apoptozę (Zhang et al., 2014). Dauguma tyrimų yra sutelkti į kanalų struktūrų ypatumus ir jų susidarymo mechanizmą. Atominės jėgos mikroskopijos vaizduose užfiksuotos $A\beta_{1-40}$ poros, sudarytos iš keturių ir šešių subvienetų (Quist et al., 2005). Molekulinės dinamikos eksperimentais pademonstruota, kad $A\beta_{1-42}$ peptido N- ir C-galai sąveikauja su skirtingomis lipidų sritimis.

C-galas yra linkęs įsiterpti į hidrofobinę dalį, o N-galas pirmenybę teikia sąveikai su lipido hidrofiline grupe (Zhao et al., 2011). Monomerinės ir mažos oligomerinės formos gali įsiterpti į fosfolipidų dvisluoksnį nesudarant transmembraninių porų, tačiau sukeldami lipidų persitvarkymus, kurie lems padidėjusį membranų pralaidumą (Zhang et al., 2014).



1.8 pav. Skirtingų agregatų sukelti membranų pažeidimai (Pritaikyta pagal Zhang et al., 2014).

1.6.2. Jungimasis su membranų paviršiumi

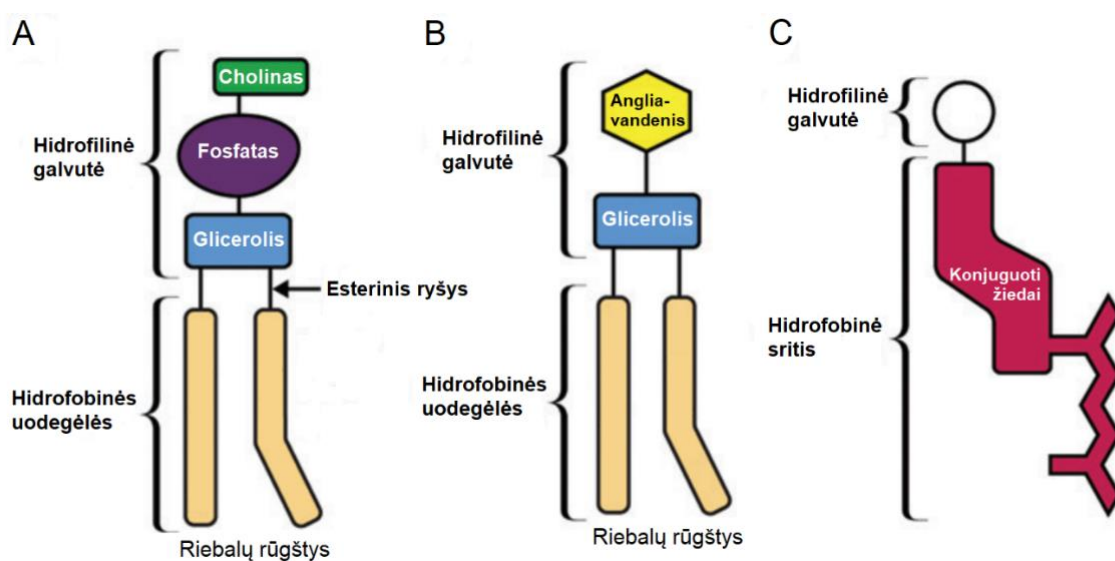
Membranų fluidiškumo ir morfologijos pokyčiai gali priklausyti nuo prie jos prisijungusių peptidų masės (1.8 pav.). Didelės fibrilės ir agregatai sukelia didelę įtampą membranų paviršiuje, iškreipia formą bei ją suplonina (Sasahara et al., 2012). Taip pat amiloidiniai peptidai ir baltymai gali pasižymėti detergentiniu efektu. Dvisluoksnio paviršiuje kaupiantis tarpinėms agregacijos formoms, jos gali atplėšti lipidus iš dvisluoksnio, formuodamos peptidų-lipidų vezikules (Sciaccia et al., 2012). Šiame mechanizme lipidinė membrana pasitarnauja kaip katalitinis pagrindas, skatinantis peptido agregaciją. Tai padidina vietinę peptidų koncentraciją ant membranų, todėl prie membranų prisijungę monomerai ir oligomerai gali tarpusavyje formuoti fibriles ir didesnius agregatus. Toks intensyvus struktūrų kaupimas paviršiuje sumažina membranų paviršiaus įtempį ir sukelia jos fragmentaciją, pašalinant lipidų molekules. Šiuo membranų sutrikdymu gali pasižymėti oligomerai ir fibrilės (Zhang et al., 2014).

1.7. Biologinės membranų

Biologinės membranų atlieka gyvybiškai svarbias funkcijas. Jos gaubia ląsteles, atskiria jų vidinę terpę nuo išorės, kontroliuoja selektyvų medžiagų transportą. Abipus membranų sukuriama jonų gradientas yra gyvų organizmų energijos šaltinis, reikalingas aktyviai medžiagų pernašai per membraną bei nervinio impulso perdavimui. Be to, jos yra svarbios komunikacijai tarp ląstelių (siunčiant, priimant ir apdorojant informaciją cheminių ir elektrinių signalų pavidalu) (Watson, 2015). Biologinės membranų yra sudarytos iš dvigubo lipidų molekulių sluoksnio, kuriame taip pat įsiterpę baltymai bei angliavandeniai. Membraniniai baltymai padeda išlaikyti membranų struktūrinį integralumą bei leidžia per ją judėti įvairioms medžiagoms. Angliavandenių yra tik išorinėje dvisluoksnio pusėje, paprastai

kovalentiniu ryšiu prisijungusių prie kai kurių lipidų ir baltymų. Jie yra svarbūs ląstelių atpažinimui. Angliavandeniai sudaro mažiausią membranos komponentų dalį (< 5 %) (Casares et al., 2019).

Membranose yra randami trijų tipų lipidai: fosfolipidai, glikolipidai ir steroliai. Fosfolipidų pagrindą sudaro glicerolis, prie kurio vieno anglies atomo yra prijungtas fosfatas su cholino, serino arba etanolamino pakaitu. Likę du anglies atomai yra esteriniu ryšiu susijungę su riebalų rūgštimis. Fosfolipidai, savo sudėtyje turintys glicerolio yra priskiriami glicerofosfolipidams. Iš visų glicerofosfolipidų gyvūnų ląstelių membranose daugiausia randama fosfatidilcholino (PC) (1.9 pav. A). Choliną gali būti pakeistas serinu arba etanolaminu ir atitinkamai susidaryti fosfatidilserinas (PS) ir fosfatidiletanolaminas (PE). Glikolipidai vietoj fosfato grupės turi angliavandenį, pavyzdžiui, glikozę (1.9 pav. B). Sterolių nėra daugelyje bakterijų membranų, tačiau jie yra svarbūs gyvūnų (cholesterolis) ir augalų (stigmasterolis) membranų komponentai. Cholesterolio struktūra labai skiriasi nuo fosfolipidų ir glikolipidų. Jį sudaro hidroksi grupė (hidrofilinė sritis), keturių žiedų steroidinė struktūra (hidrofobinė sritis) ir trumpa šoninė angliavandenilių grandinė (1.9 pav. C) (Watson, 2015). Visi membranų lipidai yra amfipatiniai – savo sudėtyje turi tiek hidrofilines, tiek hidrofobines sritis. Hidrofilinei galvutei palankiausia yra vandeninė aplinka, o hidrofobinė uodega yra stabilesnė lipidinėje aplinkoje. Amfipatiškas membranų lipidų pobūdis bei hidrofobinės traukos ir hidrofilinės stūmos jėgos, lemia tai, kad jie natūraliai formuoja dvisluoksnius, kuriuose hidrofilinės galvutės nukreiptos į išorę link vandeninės aplinkos, o hidrofobinės uodegos į vidų (Casares et al., 2019).



1.9 pav. Trijų tipų membranų lipidai. A – fosfolipidai; B – glikolipidai; C – steroliai (Pritaikyta pagal Watson, 2015).

Skirtingiems ląstelių tipams yra būdinga skirtinga jų plazminės membranos lipidų ir baltymų kompozicija. Eukariotinėse ląstelėse daugiausia yra fosfatidilcholino. Smegenų audinio membranose randama daug fosfatidilserino ir sfingolipidų. Širdies ir plaučių membranoms būdingas didelis kiekis fosfatidilglicerolio. Nervinių skaidulų mielino dangale ypač daug cerebrozidų ir jų sulfato esterių. Membranos sudėtis varijuoja ir tarp ląstelių sudarančių organelių. Endoplazminio tinklo, mitochondrijų ir branduolio membranose beveik nėra sfingomielino (Kadziauskas, 2012, p. 245; Casares et al., 2019). Eukariotuose abi plazminės membranos dvisluoksnio pusės pasižymi specifiška lipidų kompozicija ir asimetriškumu. Išorinis sluoksnis daugiausia sudarytas iš fosfatidilcholino ir sfingolipidų. Vidinis savo sudėtyje turi fosfatidiletanolamino, neigiamai įkrauto serino ir fosfatidilinozitolio. Šią membranos asimetriją sukuria ir palaiko dviejų tipų ATPazės: flipazės ir flopazės (Marquardt et al., 2015).

Plazminėje membranoje yra randami mikrodomenai, turintys specifinių fizikinių ir cheminių savybių. Pavyzdžiui, signalosomos yra sritys, kuriose susikaupę baltymų kompleksai leidžia vykdyti signalo perdavimą. Tokiems mikrodomenams yra būdinga specifinio tipo lipidų ir baltymų gausa. Jie dar vadinami lipidiniais plaustais. Lipidiniuose plaustuose yra gausu sfingomielino, glikosfingolipidų ir cholesterolio, kurie palaiko tvarkingą skystakristalę būseną toje srityje. Heterogeninis lipidų pasiskirstymas leidžia susidaryti tiek trumpalaikiams, tiek stabiliems membranos mikrodomenams. Prie laikinų membraninių mikrodomenų yra priskiriamos tokios sritys kaip lipidų plaustai ar kalveolės, o stabilių mikrodomenų pavyzdžiai yra glaudžiosios jungtys bei sinaptosomos. Skirtumus tarp laikinų ir stabilių membranos domenų nulemia specifinių baltymų ir lipidų išsidėstymas (Casares et al., 2019).

1.8. Membranos modeliai

Dėl biologinių membranų sudėtingumo bei sąveikos su vidiniais ir užląsteliniais komponentais kyla daug problemų jų tiesioginiuose tyrimuose. Išspręsti šiai problemai buvo sukurti dirbtiniai supaprastinti modeliai, savo struktūra ir sudėtimi atitinkantys ląstelių membranas. Dabar yra naudojamos įvairios modelinės sistemos, kurių tikslas imituoti pagrindines ląstelės membranos funkcijas (Rebaud et al., 2014). Toliau bus aptariami du membranos modeliai: liposomos ir prie paviršiaus prikabintos fosfolipidinės membranos (tBLM, angl. tethered bilayer lipid membranes).

1.8.1. Liposomos

Liposoma – sferinis fosfolipidų dvisluoksnis, kurio viduje yra vandeninė aplinka. Dėl gebėjimo atskirti vidinę aplinką nuo išorinės, liposomos gali būti naudojamos atliekant vaistų

pernešimo ir membranos integralumo tyrimus (Hern, 2011). Liposomų lipidų sudėtis priklauso nuo pageidaujamo modelio. Norint atkartoti eukariotinių ląstelių membranas naudojami tokie lipidai kaip PC, PE, PS, rečiau fosfatidilinozitolis (PI) bei fosfatidilglicerolis (PG). 3PE:1PG molinis santykis atitinka vidinės bakterijų membranos modelį (Pasenkiewicz-Gierula, 2005). Paprastai liposomų modeliuose abu lipidų sluoksniai yra vienodi, tačiau naudojant tam tikrus paruošimo protokolus galima gauti asimetrinį fosfolipidų dvisluoksnį. Tokios sistemos gaunamos tarp skirtingų kompozicijų liposomų vykstant lipidų molekulių mainams. Tai gali būti pasiektas 3 pagrindiniais būdais: 1) keičiant tirpalo, kuriame yra neigiamai įkrautos vezikulės, pH; 2) pridėdant išorinių fermentų, kurie selektyviai modifikuoja dvisluoksnio išorinių lipidų grupes; 3) pridėdant lipidus pernešančių molekulių, kurios katalizuoja lipidų mainus tarp vezikulių išorinių sluoksnių (Doktorova et al., 2018).

Liposomų gamybos procedūra yra gana paprasta ir remiasi hidrofobine lipidų ir vandens molekulių sąveika (Zakharian, 2013). Lipidų molekulės vandeniniame tirpale formuoja įvairaus dydžio daugiasluoksnes liposomas, kurių skersmuo gali svyruoti nuo nanometrų iki kelių mikrometrų. Vienasluoksnės liposomos pagal dydį yra skirstomos į dvi rūšis. Turinčios didesnę nei 100 nm skersmenį vadinamos didžiosiomis vienasluoksnėmis liposomomis (LUV, angl. large unilamellar vesicles), o 20–100 nm vadinamos mažosiomis vienasluoksnėmis liposomomis (SUV, angl. small unilamellar vesicles). Vienasluoksnės liposomos yra formuojamos naudojant ultragarsą arba mechaninę jėgą (ekstruzija). Ekstruzijos proceso metu liposomų suspensija yra praleidžiama per polikarbonato filtrą su reikalingo dydžio poromis (Routledge et al., 2019). Liposomos dydis turi įtakos fosfolipidų dvisluoksnio kreivumui. Kreivumas gali būti svarbu kai kurių baltymų gebėjimui prisijungti prie membranos (Middleton ir Rhoades, 2010) ir paveikti jos integralumą, todėl būtina atsižvelgti į liposomos dydį, tinkamiausią tyrimui. Daugiasluoksnių pūslelių užšaldymas-atšildymas dažnai naudojamas siekiant sumažinti pūslelių sluoksnių skaičių ir pagerinti jų inkapsuliavimo efektyvumą (Costa et al., 2014).

Liposomų tyrimuose gali būti naudojami įvairūs metodai. Liposomų viduje inkapsuluoto dažo (pvz.: kalceino) fluorescencijos intensyvumo registravimas gali suteikti informacijos apie liposomų integralumo sutrikdymą (Routledge et al., 2019). Plazmoninių nanodalelių jutikliai leidžia nustatyti liposomų konformaciją, kreivumą ir storį realiuoju laiku (Soler et al., 2016). Dydžio pokyčius galima registruoti dinaminės šviesos sklaidos metodu (DLS) (Hupfeld et al., 2006). Kartu šie metodai yra labai svarbūs tiriant potencialiai toksiškų junginių poveikį ląstelių membranai ir leidžia geriau suprasti, kaip įvairių sutrikimų metu kinta membranos savybės.

1.8.2. Prie paviršiaus prikabintos lipidinės membranos

tBLM yra gaminamos panardinant metalinį elektrodą (pvz.: auksą) į inkarinių molekulių ir β -merkaptoetanolio tirpalą. Po kelių valandų inkubacijos ant paviršiaus susiformuoja savitvarkis monosluoksnis (SAM) (angl. self-assembled monolayer). Sekančiame etape ant savitvarkio monosluoksnio liejamos lipidų suspensijos vezikulės ir gaunamos funkcionalios membranos (McGillivray et al., 2007). Inkarinių molekulių hidrofobiniai segmentai įsiterpia į lipidinį dvisluoksnį, o hidrofilinės sritys palaiko jį 1–2 nm atstumu kieto paviršiaus. β -merkaptoetanolis išsidėsto tarp inkarinių molekulių ir neleidžia joms suartėti, kad membrana netaptų per daug kieta bei palaikytų tinkamą takumą. Struktūrinės ir funkcinės tBLM savybės priklauso nuo daugelio veiksnių, įskaitant lipidus, naudojamus jų susidarymui, paviršių ir pomembraninę erdvę. Inkarinių junginių pobūdis turi reikšmingos įtakos prikabinto dvisluoksnio savybėms. Didėjant inkarinių molekulių ilgiui, tBLM kokybė blogėja. Membranos struktūra tampa mažiau tvarkinga, joje atsiranda pažeidimai ir ji gali atsiskirti nuo kieto pagrindo (Liu ir Faller, 2012). Taip pat svarbi ir inkarinių molekulių cheminė struktūra. Nustatyta, kad inkariniai lipidai, su dvigubais ryšiais anglies atomų grandinėse, lemia mažiau tvarkingą savitvarkio monosluoksnio molekulių išsidėstymą, o tai padidina tBLM dvisluoksnio takumą (Budvytyte et al., 2013).

Idealus modelis turėtų pasižymėti pagrindinėmis savybėmis, imituojančiomis natūralias membranas. tBLM sugeba palaikyti optimalų dvisluoksnio takumą, be to, užtikrina hidratuotą pomembraninį rezervuarą, kuris suteikia į membraną įsiterpusiems baltymams natūralias biologines sąlygas. Šio tipo modeliuose kietu pagrindu dažniausiai pasirenkamas stiklas, padengtas plonu aukso sluoksniu (apie 100 nm). Auksas naudojamas dėl savo stabilumo ir universalumo analitiniais metodams. Membranos parametrai gali būti registruojami pasitelkiant neutronų sklaidą, atominės jėgos mikroskopiją, infraraudonųjų spindulių atspindžio-sugerties spektroskopiją (IRRAS), paviršiaus plazmonų rezonansą (SPR), elektrocheminio impedanso spektroskopiją (EIS) (Andersson et al., 2018).

tBLM modeliai naudojami tiriant ligas bei procesus, sukeliančius pažeidimus membranoje, taip pat norint geriau suprasti membraninių baltymų savybes, juos įterpiant į lipidų dvisluoksnį. Ši sistema gali būti naudojama kaip stabili platforma biojutiklių kūrimo (Jackman et al., 2012). Prie kieto paviršiaus prikabinti lipidų dvisluoksniai dažnai taikomi sąveikos su peptidais ir baltymais tyrimuose bei poras formuojančių toksinų aktyvumo nustatyme. McGillivray et al. (2009) pademonstravo α -hemolizino formuojamų porų aptikimo tBLM sistemoje galimybes.

2. METODIKA

2.1 Prietaisai ir medžiagos

2.1.1. Reagentai

- Agaras (Carl Roth);
- Akrilamidas:bisakrilamidas 37,5:1 (Fisher Scientific);
- Amonio chloridas NH_4Cl (Acros Organics);
- Amonio persulfatas APS (Acros Organics);
- Ampicilinas (Carl Roth);
- $\text{A}\beta_{1-42}$ (gautas iš dr. V. Smirnovo Amiloidų tyrimų grupės, Biotechnologijos instituto, GMC, VU);
- Baltymų molekulinės masės žymuo „Ez-Run Rec ladder” (Fisher Scientific);
- Chloroformas (Sigma-Aldrich);
- Dinatrio hidrofosfatas Na_2HPO_4 (Carl Roth);
- Ditiotreitolis DTT (Fisher Scientific);
- Elektroforezės gelių dažas (Fisher Scientific);
- Etanolis (Sigma-Aldrich);
- Etilendiamintetraacto rūgštis EDTA (Fisher Scientific);
- Glicerolis (Acros Organics);
- Gliukozė (Fisher Scientific);
- Kalio chloridas KCl (Sigma-Aldrich);
- Kalio dihidrofosfatas KH_2PO_4 (Carl Roth);
- Karbamidas (Fisher Scientific);
- Laktozė (Fisher Scientific);
- LB mitybinė terpė (Carl Roth);
- Magnio sulfatas MgSO_4 (Fisher Scientific);
- Mielių ekstraktas (Thermo Fisher);
- Natrio chloridas NaCl (Carl Roth);
- Natrio dodecilsulfatas NDS (Fisher Scientific);
- Natrio hidroksidas NaOH (Sigma-Aldrich);
- Natrio sulfatas Na_2SO_4 (Acros Organics);
- Pentanas (Reachem);
- TEMED (Fisher Scientific);
- Tris(hidroksimetil)aminometanas TRIS (Carl Roth);
- Tritonas X-100 (Sigma-Aldrich);
- Plazmidė su atsparumo ampicilinui genu ir įklonuotu S100A9 baltymą koduojančiu genu (gauta iš dr. V. Smirnovo amiloidų tyrimų grupės, Biotechnologijos instituto, GMC, VU);
- Lipidai (Avanti polar lipids):
1,2-dioleoil-*sn*-glicerolio-3-fosfocholino (DOPC), sfingomielinas (SM), smegenų lipidų ekstraktas (SLE) (sudėtis: 12,6 % PC, 33,1 % PE, 4,1 % PI, 18,5 % PS, 0,8 % PA, 30,9 % nežinoma), cholesterolis, LRPE, Cy5-chol;

- SAM komponentai (junginius susintetino David J. Vanderah, NIST Chemical Sciences and Technology Laboratory, Marilandas, JAV):
20-Z-oktadecil-9-eniloksi-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksatetra-31-konteno-1-olis (HC18),
20-tetradeksiloksio-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontano-1-tiolis (WC14).

2.1.2. Tirpalai

- Tirpalai, naudojami S100A9 baltymo gryninime:
 - A buferinis tirpalas** (naudojamas chromatografijoje): 20 mM Tris bazinis komponentas, 0,50 mM DTT, pH 8;
 - B buferinis tirpalas** (naudojamas chromatografijoje): 20 mM Tris bazinis komponentas, 1M NaCl, 0,50 mM DTT, pH 8;
 - C1 buferinis tirpalas** (biomasės homogenizavimui, dializei): 20 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT, pH 8;
 - C2 buferinis tirpalas** (biomasės plovimui): 20 mM Tris, 1M karbamido 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT, pH 8;
 - C3 buferinis tirpalas** (baltymo tirpinimui): 20 mM Tris, 8M karbamido 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT, pH 8;
- Natrio fosfatinis buferinis tirpalas: 0,1 NaCl, 0,01 NaH₂PO₄, pH 4,5;
- PBS buferinis tirpalas: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4;
- SAM tirpalai:
 - HC18 ir βME tirpalas etanolyje: HC18:βME moliniu santykiu 45:55. Bendra tiolių koncentracija 0,1 mM;
 - WC14 ir βME tirpalas etanolyje: WC14:βME moliniu santykiu 35:65. Bendra tiolių koncentracija 0,1 mM;
- 10 mM cholesterolio tirpalas chloroforme
- 10 mM DOPC tirpalas chloroforme
- 12 mg/ml smegenų lipidų tirpalas chloroforme
- 60 mM kalceino tirpalas PBS buferyje, pH 7,4.

2.1.3. Sorbentai

- DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare);
- Superdex 75 prep grade (GE Healthcare);
- Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich).

2.1.4. Kompetentinės ląstelės

Baltymų raiškai naudojamas kamienas *E. coli* BL21 (DE3).

2.1.5. Mitybinės terpės

- **Agarizuota LB (Luria Broth) terpė:** 0,625 g LB mitybinės terpės ir 0,375 g agaro ištirpinama 25 ml dH₂O, autoklavuojama 121 °C 20 min. Atvėsinama iki ~50 °C, įdedama ampilino, kad jo galutinė koncentracija būtų 100 µg/ml ir supilama į Petri lėkštelę sustingti.
- **Skysta LB (Luria Broth) terpė:** 0,5 g LB mitybinės terpės ištirpinama 20 ml dH₂O, autoklavuojama 20 min., 121 °C.
- **Autoinduktyvi terpė ZYM-5052:** 90 g triptono, 45 g mielių ekstrakto, 31,95 g Na₂HPO₄, 30,6 g KH₂PO₄, 24,075 g NH₄Cl, 6,3 g Na₂SO₄, 4,41 g MgSO₄ ištirpinama 2,7 l dH₂O. Atskirai pasveriam 45 g glicerolio, 4,5 g gliukozės, 18 g laktozės ir ištirpinama 300 ml dH₂O. Abu tirpalai autoklavuojami atskirai 20 min. 121 °C. Po to šie tirpalai sumaišomi laminariniame bokse ir pridedama ampilino (100 µg/ml).

2.1.6. Laboratorinė įranga ir priedai

- AJM adata FESP-V2 (Bruker);
- Analitinės svarstyklės (Kern);
- Atominės jėgos mikroskopas (Dimension Icon Bruker);
- Autoklavas (AHS-75N);
- Centrifuga (Herolab HiCen SR);
- Chromatografinės kolonėlės (Sigma-Aldrich): „XK26“, „Tricorn 10/300“;
- Chromatografinė sistema (Äkta explorer);
- Dializės žarna (Fisher Scientific);
- Elektrocheminių celių blokas (Pagamintas Biochemijos institute, GMC, VU);
- Elektrocheminė darbo stotis (Zennium);
- Elektroforezės aparatas (Biometra Minigel-Twin);
- Filtrai, 0,22 µm porų dydžio (Fisher Scientific)
- Fluorescencinis mikroskopas „BX61WI“ (Olympus);
- Homogenizatorius „Potter-Elvehjem“ (Sigma-Aldrich);
- Koncentratoriai (Amicon);
- Krosnelė (Gallencam);
- Laminarinis boksas (Telstar Bio II Advance);
- Magnetinė maišyklė (Cole-Parmer);
- Mėgintuvėlių kratyklė (VWR);
- Membranos (Avanti Polar Lipids);
- Mikroplokštelių sandarinimo plėvelė (Fisher Scientific);
- Mikroplokštelių skaitytuvas (Clario star plus);

- pH-metras (Mettler Toledo);
- Prastūmimo sistema Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids);
- Purtyklė (IKA KS);
- Spektrofotometras „NanoDrop 2000“ (Fisher Scientific);
- Spektrofotometras „Zetasizer μV“ (Malvern);
- Stiklo plokštelės (Fisher Scientific)
- Termostatas „IB-15G“ (Fisher Scientific);
- Ultragaršinis homogenizatorius (Bandelin Sonopuls);
- Ultragarso vonelė (MRC);
- Vandens valymo sistema (Milli-Q plus)
- Žėrutis (SPI Supplies);
- 96 šulinėlių mikroplokštelės (Corning).

2.2. Metodai

2.2.1. S100A9 baltymo gryninimas

2.2.1.1. Transformuotų ląstelių auginimas ir tikslinio baltymo raiška

Į 200 μl *E. coli* BL21 (DE3) kompetentinių ląstelių dedama 2 μl plazmidės tirpalo. Transformantai užsėjami ant Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe, kurioje yra 100 μg/ml ampicilino. Ląstelės apie 16 val. inkubuojamos 37 °C. Atsitiktinė kolonija iš Petri lėkštelės perkeliama į 10 ml autoklavuotos LB terpės su ampicilinu (100 μg/ml). Ląstelės apie 7 val. auginamos purtyklėje (220 aps/min, 37 °C). Optiniui tankiui pasiekus 0,7 vienetus, ląstelės persėjamos į 4 kolbas, kuriose yra po 300 ml autoinduktyvios terpės su ampicilinu (100 μg/ml). Tokioje terpėje baltymo raiškos indukcija prasideda, kai baigiasi gliukozė ir kaip energijos šaltinį ląstelės pradeda naudoti laktozę. Kolbos vėl dedamos į purtyklę ir ląstelės paliekamos augti per naktį. Kitą dieną iš kolbų surenkama biomasė. Tam užauginta kultūra centrifuguojama 5000 × g, 15 min, 4 °C temperatūroje.

2.2.1.2. S100A9 baltymo renatūracija ir dializė

Bakterijoms ekspresuojant didelį baltymo kiekį gali susidaryti inkluziniai kūneliai (agregata). Jie tirpinami buferyje, turinčiame didelę koncentraciją denatūranto. Visos tolimesnės procedūros atliekamos baltymo tirpalą laikant ledo vonelėje. Surinkta biomasė homogenizuojama C1 buferyje ir ląstelės ardamos ultragarso homogenizatoriuje (sąlygos: 50 % amplitudė, 10 min trukmė, 30 s veikimo režimas, po kurio seka 30 s pertrauka). Po veikimo ultragarsu biomasė centrifuguojama 20000 × g, 30 min, 4 °C temperatūroje. Supernatantas nupilamas, paliekamos nuosėdos. S100A9 baltymas yra randamas tiek tirpioje, tiek netirpioje frakcijose, tačiau didžioji jo dalis yra netirpi, todėl gryninimas atliekamas iš šios

frakcijos. Nuosėdos dar kartą homogenizuojamos C1 buferyje ir tirpalas centrifuguojamas ($20000 \times g$, 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatantas nupilamas, nuosėdos praplaunamos C2 buferiu, kuriame yra 1M karbamido. Vėl centrifuguojama $20000 \times g$, 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Nupylus supernatantą nuosėdos ištirpinamos buferyje, kuriame karbamido koncentracija 8M (C3 buferinis tirpalas). Karbamidas suardo antrinę baltymo struktūrą. Renatūracija atliekama denatūrantą pašalinant dializės būdu. Tirpalas supilamas į dializės žarną. Dializė vyksta C1 buferiniame tirpale (4 l), po 4 val. pakeičiant buferinį tirpalą. Po dializės baltymo tirpalas centrifuguojamas $25000 \times g$, 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Tuomet filtruojamas naudojant $0,22\text{ }\mu\text{m}$ dydžio porų filtrą.

2.2.1.3. Jonų mainų chromatografija

Chromatografijai naudojamas DEAE sefarozės sorbentas. Supylus sorbentą į kolonėlę, ji prijungiama prie chromatografijos sistemos ir praplaunama A ir B buferiais. Ant kolonėlės baltymas užnešamas naudojant peristaltinę pompą. Baltymo eliucija vykdoma didinant B buferio gradientą nuo 5 % iki 20 %. Viso atplovimo metu tirpalai leidžiami 3 ml/min greičiu. B buferinio tirpalo 5 % gradientas pasiekiamas per 5 min, 15 % – per 10 min, 20 % – per 30 min. Didėjant pastarajam gradientui yra renkamos frakcijos, kuriose detektuojamas baltymas pagal UV sugertį.

2.2.1.4. Gelfiltracija

Prieš gelfiltraciją baltymo tirpalas koncentruojamas iki 10 mg/ml. Baltymo koncentracija tirpale nustatoma naudojant „NanoDrop 2000“ spektrofotometrą ($\lambda = 280\text{ nm}$). Koncentracija apskaičiuojama pagal baltymo masę (13242 Da) ir ekstincijos koeficientą ($7090\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Baltymo tirpalas filtruojamas per $0,22\text{ }\mu\text{m}$ porų dydžio filtrą ir užnešamas ant kolonėlės, pakrautos „Superdex 75“ sorbentu, naudojant užnešimo kilpą. Nuo kilpos ant kolonėlės baltymas užnešamas 1 ml/min greičiu. Eliucija vykdoma leidžiant PBS buferį 1,5 ml/min greičiu. Gelfiltracija naudojama surinkti tas baltymo frakcijas, kuriose yra mažiausias priemaišų kiekis bei pakeisti buferinį tirpalą į reikiamą (tolimesniems eksperimentams bus reikalingas PBS fosfatinis buferis).

2.2.1.5. Baltymų elektroforezė

Paruošiami skiriamasis ir koncentruojamasis elektroforezės (NDS-PAAG) geliai. Pirmiausia ruošiamas skiriamasis gelis (12 %), kurio komponentai nurodyti 2.1 lentelėje. Tirpalas pilamas tarp dviejų surinktų elektroforezės stiklo plokštelių ir ant viršaus užpilama distiliuoto vandens. Palaukiama apie 40 min., kol gelis polimerizuojasi. Ruošiamas 4 %

koncentruojamasis gelis (2.1 lentelė). Nuo skiriamąo gėlio nupilamas vanduo, uępilamas koncentruojamojo gėlio tirpalas ir tarp stiklinių plokštėlių įstatomos űukos. Sustingus ir antrajam geliui (apie 30 min.), plokštėlės yra įstatomos į elektroforezės aparatą ir jo ertmės uępildomos elektroforezės buferiu. Elektroforezės parametrai: 200 V įtampa, 30 mA stiprio srovė. Kai daęas pasiekia gėlio apačią, procesas yra stabdomas ir gelis išimamas iš plokštėlių. Keletą kartų praplaunamas distiliuotu vandeniu ir apie 15 min. daęomas „Ez-run“ daęu, skirtu baltymams. Nupylus daęą gelis dar kartą praplaunamas distiliuotu vandeniu ir paliekamas jame išryškėti.

2.1 lentelė. Elektroforezės gelių komponentai.

12 % skiriamasis gelis		4 % koncentruojamasis gelis	
H ₂ O dist.	2,55 ml	H ₂ O dist.	1,27 ml
1,5M Tris-HCl pH 8,8	1,53 ml	1,5M Tris-HCl pH 6,8	500 μl
40% AA/BAA	1,83 ml	40 % AA/BAA	201 μl
10% NDS	61 μl	10% NDS	20 μl
10% APS	30,5 μl	10% APS	10 μl
TEMED	3,65 μl	TEMED	2 μl

2.2.2. S100A9 baltymo oligomerizacija skirtingomis sąlygomis

Išgrynintas S100A9 baltymas yra PBS buferiniame tirpale. Norint gauti įvairaus dydžio agregacijos formas, baltymo oligomerizacija atliekama skirtingomis sąlygomis. Baltymo tirpalas (2 mg/ml) 2 val. inkubuojamas skirtingose temperatūrose (22 °C, 37 °C, 60 °C). Tuomet paliekamas toliau oligomerizuotis parą laiko 22 °C temperatūroje.

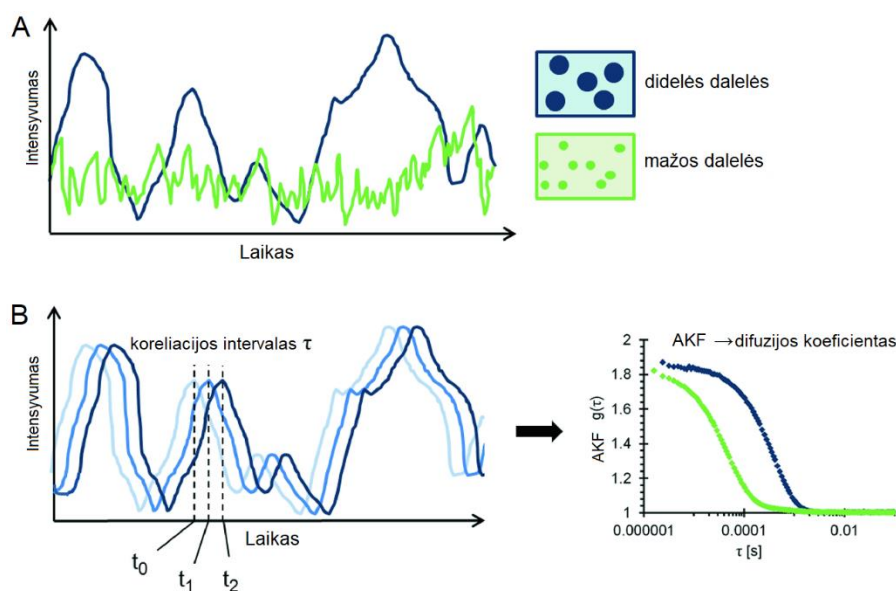
2.2.3. Dinaminė űviesos sklaida

Dinaminės űviesos sklaidos (DLS) metode matuojami nuo laiko priklausantys išsklaidytos űviesos intensyvumo svyravimai, atsirandantys dėl dalelių Brauno judėjimo. Matavimo metu lazerio űviesa nukreipiama į mėginį kiuvetėje. Jei mėginyje yra dalelių, krintanti lazerio űviesa išsklaidoma į visas puses. űviesos sklaida detektuojama tam tikru fiksuotu kampu, paprastai 90°. Intensyvumo svyravimai analizuojami naudojant autokoreliatorių, kuris nustato signalo autokoreliacijos funkciją. Signalo koreliacijos koeficientas slopsta eksponentiškai ir priklauso nuo tirpale esančių dalelių difuzijos. Brauno judėjimo greitį apibrėžia difuzijos koeficientas (D). Stokso-Einšteino lygtis sieja difuzijos koeficientą su dalelių hidrodinaminiu skersmeniu (R_h):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}, \quad (2.1)$$

kur k_B – Bolcmano konstanta, T – absoliuti temperatūra, o η – terpės klampumas (Stetefeld et al., 2016).

Skirtingo dydžio dalelės sukelia skirtingas išsklaidytos šviesos fluktuacijas. Priklausomai nuo dalelių dydžio, skiriasi difuzijos greitis ir koreliacijos koeficiento slopimo trukmė (2.1 pav.). Koreliacijos koeficiento slopimo pradžios taškas suteikia informacijos apie dalelių hidrodinaminį spindulį. Kai tirpale vyrauja mažos dalelės, koreliacijos koeficientas slopsta greičiau nei vyraujant didelėms (Falke ir Betzel, 2019, p. 174–176).



2.1 pav. DLS nustatomas dalelių dydis. A – dalelių išsklaidytos šviesos intensyvumo priklausomybė nuo laiko; B – schematinė autokoreliacijos iliustracija. Priklausomai nuo dalelių dydžio, difuzijos greitis ir koreliacijos koeficiento slopimo laikas skiriasi. Dešinėje pusėje pateiktos mažų (žalia kreivė) ir didelių (mėlyna kreivė) dalelių autokoreliacijos funkcijos (AKF) (Pritaikyta pagal Falke ir Betzel, 2019).

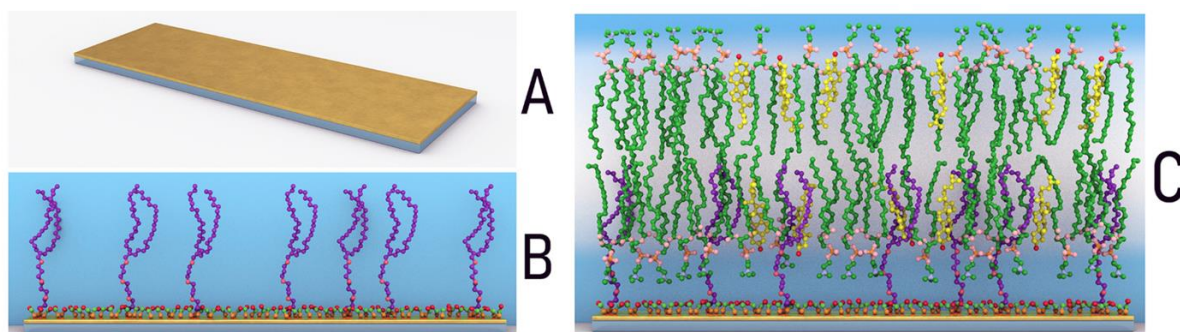
2.2.3.1. Dinaminės šviesos sklaidos matavimai

Dinaminės šviesos sklaidos (DLS) eksperimentai baltymo struktūrų dydžio nustatymui buvo atliekami naudojant nanodalelių dydžio analizatorių Zetasizer μV , 24 °C temperatūroje. Lazerio bangos ilgis – 632,8 nm, išsklaidyta šviesa detektuojama 90° kampu į lazerio šviesos srautą. Baltymo tirpale (2 mg/ml) esančių dalelių dydis matuojamas 100 μl tūrio kiuvetėje.

2.2.4. Prie paviršiaus prikabintos dvisluoksnės lipidinės membranos formavimas

Membranos formavimo procedūrą galima suskirstyti į du etapus. Pirmojo etapo metu stiklo plokštelė, padengta plonu aukso sluoksniu (100–200 nm) (2.2 pav. A), pamerkiama į

inkarinių molekulių (HC18 arba WC14) ir skiediklio (β -merkptoetanolio) molekulių tirpalą, kur bendra tiolių koncentracija lygi 0,1 mM. Pamerkta plokštelė inkubuojama 2–3 val. laikotarpiui, per kurį molekulės ant paviršiaus susiorganizuoja į savitvarkį monosluoksnį (2.2 pav. B). Tuomet paviršius nuplaunamas etanolio ir nusausinamas azoto dujų srove. Antrajame etape formuojamas lipidų dvisluoksnis daugiasluoksnių vezikulių liejimosi metodu. Pirmiausia reikiamų lipidų (darbe naudoti DOPC, smegenų lipidų ekstraktas (SLE), cholesterolis (chol)) tirpalas chloroforme 30 min pučiamas azoto srove, kol išgarinamas tirpiklis ir lieka lipidinė plėvelė. Ji resuspenduojama fosfatiniame buferyje, kurio pH 4,5 (galutinė lipidų koncentracija 1 mM). Tirpale susidaro įvairaus dydžio daugiasluoksnės liposomos. Stiklo plokštelė, modifikuota pirmojo etapo metu, patalpinama į elektrocheminių celių bloką. Į kiekvieną bloko šulinėlį (plotas 0,16 cm²) įpilama po 100 μ l paruošto liposomų tirpalo. Inkubuojama 40–60 min, per kurias liposomos suyra ir liejasi ant modifikuoto aukso paviršiaus lipidams savaimė susiorganizuojant į dvisluoksnį. Hidrofobinės inkarinių molekulių sritys įsiterpia į lipidų dvisluoksnį ir neleidžiant jam tiesiogiai kontaktuoti su paviršiumi (2.2 pav. C). Po inkubacijos pakeičiamas buferinis tirpalas. Kiekviena celė išplaunama PBS fosfatinio buferiu ir etanolio tokia tvarka: 1) fosfatinis buferis (pH 7,4); 2) 10% etanolio tirpalas; 3) fosfatinis buferis (pH 7,4). Membranos formavimo procedūros atliekamos kambario temperatūroje.



2.2 pav. Prie paviršiaus prikabinta dvisluoksnė lipidinė membrana (tBLM). A – stiklo plokštelė, padengta aukso sluoksniu; B – ant plokštelės susiformavęs savitvarkis monosluoksnis, sudarytas iš inkarinių molekulių (pvz.: WC14) ir skiediklio molekulių (β -merkptoetanolio); C – susiformavusi tBLM (Pritaikyta pagal Penkauskas ir Preta, 2019).

2.2.5. Elektrocheminio impedanso spektroskopija

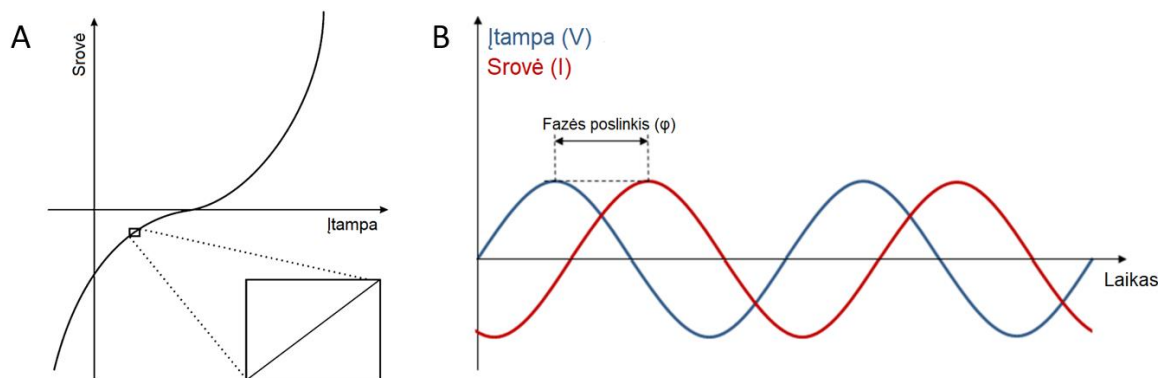
Elektrocheminio impedanso spektroskopija naudojama tiriant elektrines medžiagų savybes (pvz.: kompleksinė varža/impedansas, laidumas, talpa). Metode atliekamas dažnių srities matavimas sistemai taikant sinusoidinį trukdį, dažnai įtampą. Paprastai kintamos srovės

grandinėse atsakas į suteiktą įtampą nėra linijinis. Elektrocheminio impedanso matavimo reikalavimas yra, kad sistema būtų linijinė, t.y. galiojūt Omo dėsnis:

$$R = \frac{U}{I}, \quad (2.2)$$

kur R yra laidininko varža (Ω), U – įtampa (V), I – srovės stipris (A).

Norint išlaikyti tiesinę sistemą EIS yra taikoma pakankamai maža įtampa (1–10 mV) ir nagrinėjama siaura srovės priklausomybės nuo įtampos kreivės sritis (2.3 pav. A) (Kampouris et al., 2015).



2.3 pav. A – srovės priklausomybės nuo įtampos tiesinis intervalas; B – srovės stiprio ir įtampos sinusoidės, pasislinkusios viena nuo kitos per fazės kampą (φ) (Pritaikyta pagal Kampouris et al., 2015; Dickinson, 2017).

Tiesinei sistemai galima pritaikyti lygtį, analogišką Omo dėsniai:

$$Z = \frac{U}{I}, \quad (2.3)$$

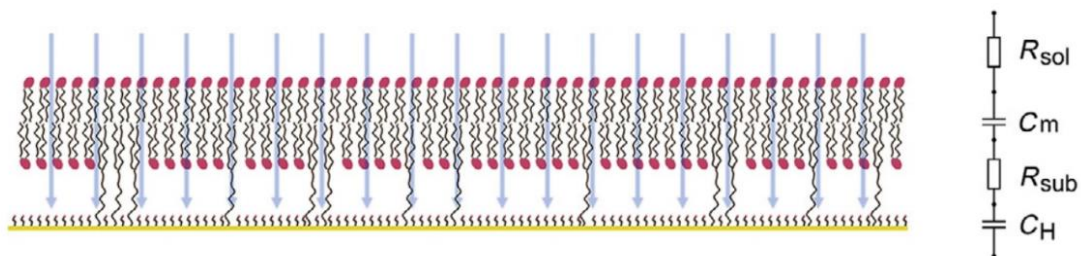
kur Z yra impedansas (Ω arba $\Omega \cdot m^2$), U – įtampa (V), I – srovės stipris (A). Impedansui atvirkštinis dydis yra elektrocheminis admitansas arba tiesiog laidumas, kuris matuojamas simensais (S):

$$Y = Z^{-1}. \quad (2.4)$$

EIS įtampa ir srovės stipris yra nuo laiko priklausančios sinusoidinės funkcijos. Šios dvi periodinės bangos turi tą patį dažnį, nes viena banga sukelia kitą, tačiau tarp jų atsiranda pastovus laiko poslinkis, kuris vadinamas fazės kampo poslinkiu (φ) ir išreiškiamas laipsniais ($^\circ$) (2.3 pav. B) (Kampouris et al., 2015).

Elektrocheminė impedanso spektroskopija naudojama įvertinti tBLM laidumą ir dielektrines savybes. Membranos dielektrinių ir izoliacinių savybių pokyčiai atspindi baltymo, peptido, toksino ar kitų molekulių aktyvumą, todėl šiuo metodu gauti spektrai gali suteikti naudingos informacijos. Tiesiogiai iš elektrocheminio impedanso spektrų galima gauti tokius fizikinius sistemos parametrus, kaip talpa ar varža. Norint interpretuoti elektrocheminėje sistemoje vykstančius procesus, jai galima priskirti ekvivalentinės grandinės elementus.

2.4 pav. pateikta schema, atitinkanti tBLM, kurioje nėra defektų. Dvigubas lipidų sluoksnis atitinka kondensatorių, kurio talpa C_m . R_{sol} ir R_{sub} yra virš membranos esančio tirpalo ir pomembraninio rezervuaro varža. C_H – sąlyčio vietos tarp metalinio paviršiaus ir vandens rezervuaro talpa. Lipidų dvisluoksnyje atsiradus defektams prisideda dar vienas elementas – defektų varža (R_{def}) (Valincius, Mickevicius, 2015, p. 29–32).



2.4 pav. tBLM elektrinės grandinės modelis, kai membranoje nėra defektų (Pritaikyta pagal Valincius ir Mickevicius, 2015).

EIS rezultatams gali būti pritaikomi įvairūs atvaizdavimo būdai, pavyzdžiui, Bode ir Cole-Cole grafikai. Bode grafike vaizduojama impedanso ir/arba fazės kampo priklausomybė nuo dažnio. x ir y ašyse nurodomos logaritminės parametrų vertės. Cole-Cole grafike x ir y ašyse atidedamos menama ir reali membranos elektrinė talpa. Šios koordinatės gali suteikti informacijos apie tiriamojo lipidinio dvisluoksniu storį. Elektrinė talpa yra atvirkščiai proporcinga nelaidaus sluoksnio storiui. Kondensatoriaus talpa gali būti įvertinta formule:

$$C_{Real} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon A}{d}, \quad (2.5)$$

kur ε_0 yra vakuomo dielektrinė konstanta ($8,85 \cdot 10^{-14}$ F/cm), ε – elektrai nelaidaus sluoksnio santykinė dielektrinė skvarba, A – paviršiaus plotas (cm^2), d – sluoksnio storis (cm).

2.2.5.1. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos matavimai

EIS matavimai atliekami naudojant Zennium darbo stotį, valdomą Thales programiniu paketu. EIS spektrai buvo registruojami dažnių srityje nuo 0,5 Hz iki 100 kHz, suteikiant 10 mV potencialą. Naudota trijų elektrodų sistema: darbinis elektrodas (auksu padengta stiklo plokštelė), palyginamasis elektrodas (Ag/AgCl/NaCl_{sat}), pagalbinis elektrodas (aplink palyginamąjį elektrodą apvyniota 250 μm skersmens platinos viela).

2.2.6. tBLM vizualizavimas fluorescencinės mikroskopijos metodu

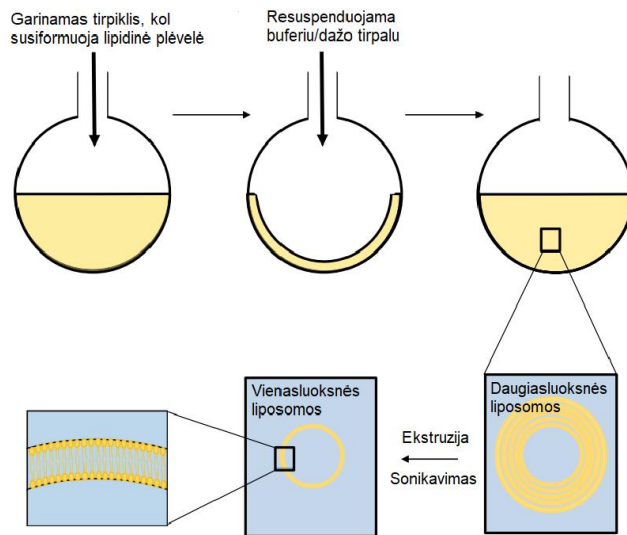
Prie paviršiaus prikabintų membranų vizualizavimui pasitelkta fluorescencinė mikroskopija. Po tBLM savybių matavimų EIS metodu, celių blokas yra išrenkamas ir stiklo plokštelė su pavyzdžiais perkeliama į Petri lėkštelę. Procedūra atliekama vandeninėje terpėje (inde su dejonizuotu vandeniu), vengiant kontakto su oro deguonimi. Ruošiant tBLM

vaizdinimui, į daugiasluoksnes vezikules įterpiami fluorescuojantys lipidai Cy5-chol ir LRPE (3 % visų lipidų). Formuojamos vienasluoksnės (sudarytos iš vieno lipidų dvisluoksnio) vezikulės, kaip bus pateikta 2.2.7. skyriuje, 2.5 pav. schemeje.

tBLM vizualizavimas atliekamas vandeninėje terpėje, imersiniu objektyvu, naudojant fluorescencinį Olympus mikroskopą BX61WI. Mikroskopo gyvsidabrio lempos šviesos kelyje esantis filtras praleidžia žadinimo bangos ilgio šviesą. Ši šviesa krenta į dichroinį veidrodį ir nuo jo atsispindi, o fluorescencijos bangos ilgio šviesa per jį pereina. Fluorescuojančių lipidų žadinimo bangos ilgiai – 560 nm (LRPE) ir 646 nm (Cy5-chol), emisijos – 583 nm (LRPE) ir 663 nm (Cy5-chol).

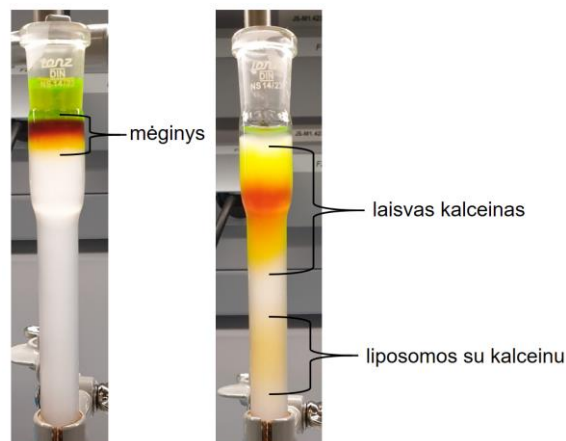
2.2.7. Liposomų su inkapsuliuotu kalceinu paruošimas

Liposomų ruošimui naudojami fosfolipidų ir cholesterolio tirpalai chloroforme. Šių vienasluoksnių (sudarytų iš vieno lipidų dvisluoksnio) vezikulių gaminimo schema pavaizduota 2.5 pav. Komponentai sumaišomi reikiamu santykiu ir azoto dujų srove išgarinamas tirpiklis. Susidariusi lipidų plėvelė tirpinama pentane, kuris vėl išgarinamas. Likusi plėvelė suspenduojama fosfatiniame buferyje (pH 7,4) su 60 mM fluorescuojančio dažo kalceino (esant didesnei, nei 50 mM koncentracijai dažo molekulės pačios save gesina). Buferinio tirpalo pilamas toks tūris, kuriame lipidų koncentracija yra 2 mM. Vandeniniame tirpale lipidai savaime suformuoja sferines pūsleles, į kurių vidų patenka kalceino molekulės. Gaunamas heterogeninis tirpalas, kuriame yra įvairaus dydžio daugiasluoksnės liposomos. Siekiant sumažinti pūslelių sluoksnių skaičių ir pagerinti jų inkapsuliovimo efektyvumą tirpalas 5 kartus užšaldomas/atšildomas ir 60 min veikiamas ultragarsu. Vienodo dydžio vienasluoksnės liposomos formuojamos naudojant mechaninę jėgą (ekstruziją). Tam tirpalas 21 kartą prastumiamas per prastūmimo sistemą (ekstruderį) su 100 nm porų dydžio polikarbonato membrana.



2.5 pav. Vienodo dydžio vienasluoksnių liposomų paruošimas. Liposomos yra ruošiamos išgarinant organinį tirpiklį ir ant lipidų užpilant reikiamą buferinį tirpalą. Susidariusių liposomų tirpalas tuomet veikiamas ultragarsu ir prastumiamas per prastūmimo sistemą su norimo dydžio porų membrana (Pritaikyta pagal Routledge et al., 2019).

Į liposomų vidų nepatekęs kalceinas iš išorinės terpės pašalinamas gelfiltracijos metodu (2.6 pav.). Visą suspensija leidžiama per chromatografinę kolonėlę, užpildytą Sephadex G-50, plaunant PBS buferiu. Mažesnės kalceino molekulės difunduoja į poras ir jo ištekėjimo iš kolonėlės kelias pailgėja. Liposomos yra didesnės už kalceino molekules, todėl jos neprasiskverbia į poras ir išteka pirmos.



2.6 pav. Laisvo ir liposomose inkapsuliuoto kalceino atskirimas gelfiltracijos metodu.

2.2.8. Kalceino išlaisvinimo iš liposomų stebėjimas

Fluorescencijos intensyvumo pokytis dėl kalceino išsiskyrimo iš liposomų buvo stebimas mikroplokštelių skaitytuvu, naudojant 96 šulinėlių plokštelę. Į šulinėlius supilstomi liposomų tirpalai, kad galutinė liposomų koncentracija kiekviename iš jų būtų $60 \mu\text{M}$. Mėginiai apšviečiami kalceino žadinimo bangos ilgio šviesa ($\lambda = 470 \text{ nm}$) ir matuojama emisija ($\lambda = 510 \text{ nm}$). Atsiradus pažaidoms liposomose, kalceinas išlaisvinamas iš jų vidaus. Išorinėje

terpėje kalceino koncentracija tampa mažesnė už 50 mM, todėl jis savęs nebegesina ir galima registruoti fluorescenciją. Eksperimento pabaigoje liposomos visiškai suardomos detergento tirpalu, kad būtų žinoma maksimali fluorescencija. Tam į šulinėlius įpilama 1% Triton X-100 medžiagos. Po laiko t išsiskyrusio kalceino kiekis apskaičiuojamas pagal lygtį:

$$IKD(\%) = 100(I_t - I_0)/(I_{max} - I_0), \quad (2.6)$$

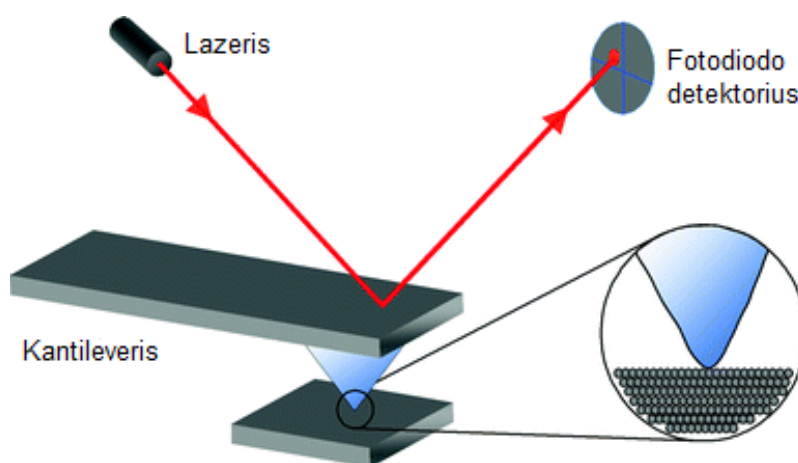
kur IKD yra ištekėjusi kalceino dalis, I_0 , I_t ir I_{max} yra fluorescencijos intensyvumas, išmatuotas eksperimento pradžioje, laiku t ir pridėjus 1% triton X-100, atitinkamai (Maherani et al., 2013).

2.2.9. Amiloido β peptido paruošimas eksperimentams

Eksperimentuose buvo naudojamos skirtingos $A\beta_{1-42}$ peptido agregacijos formos: iškart išgrynintas (monomerinė ir oligomerinė frakcija) bei fibrilizuotas. $A\beta_{1-42}$ fibrilės paruošiamos inkubuojant 5 μ M tirpalą PBS buferyje (pH 7,4). Inkubacija vykdoma 24 valandas 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos, iki eksperimento pradžios, tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje.

2.2.10. Atominės jėgos mikroskopija

Atominės jėgos mikroskopija (AJM) yra skenuojančio zondo mikroskopijos rūšis, pasižyminti nanometrų eilės skiriamąja geba (Mahmoudi ir Bahrami, 2020). Principinė metodo schema pavaizduota 2.7 pav. Duomenys gaunami mechaniniam zondui judant mėginio paviršiumi (Rourk, 2019). AJM matuoja jėgą tarp zondo ir mėginio atomų (Plaut et al., 2019). Šiame metode naudojamas lankstus laikiklis su pritvirtinta adata (zondų) skenuoti paviršiui. Jėga, kuria adatos galo atomai sąveikauja su paviršiumi lemia laikiklio išsilenkimą, registruojamą lazerio spinduliui atsispindint nuo laikiklio ir patenkant į fotodetektorių (Ordu et al., 2016).



2.7 pav. AJM principo schema (Pritaikyta pagal Grobelny et al., 2010).

AJM gali būti naudojama keliais režimais, atsižvelgiant į tiriamą objektą. Paprastai vaizdinimo režimai skirstomi į statinius (kontaktinius) ir dinامينius (nekontaktinius ar tapšnojimo) (Plaut et al., 2019). Atliekant matavimus svarbu atkreipti dėmesį į atstumą tarp mėginio ir adatos galiuko. Statiniame režime mėginys gali būti pažeistas dėl sąveikos tarp zondo ir mėginio, nes adata pastoviai jėga spaudžia paviršių ir nuolatos su juo kontaktuoja. Tapšnojimo ir nekontaktinis režimai gali skenuoti mėginius švelniau nei kontaktinis režimas, todėl jie tinka biologinių objektų vaizdinimui. Dinaminiam režimui laikiklis svyruoja arba vibruoja tam tikru dažniu, todėl išvengiama nuolatinio mėginio veikimo spaudžiančia jėga. Bekontaktis režimas pasižymi lėtesniu matavimu ir mažesne gaunamų vaizdų raiška, nes šiuo atveju adata palaikoma toliau nuo paviršiaus ir kontaktas su paviršiumi gali būti lengvai prarastas (Zhao et al., 2019).

2.2.10.1. Amiloido β mėginių paruošimas AJM vaizdinimui

Mėginiai AJM vaizdinimui yra ruošiami ant atomiškai lygaus žėručio paviršiaus. Kadangi amiloidas β ir žėrutis pasižymi neigiamu krūviu, žėručio paviršių pirmiausia reikia modifikuoti. Sustiprinti traukos jėgoms tarp A β ir žėručio paviršiaus buvo naudojamas APS. 20 μ l APS (0,16 mM) tirpalo užlašinama ant žėručio paviršiaus ir paliekama inkubuotis 30 min. Tuomet žėrutis nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir džiovinamas azoto dujų srove. Ant modifikuoto žėručio paviršiaus užnešama 20 μ l A β tirpalo (5 μ M ir 10 μ M) ir 5–10 min. inkubuojama. Žėrutis vėl nuplaunamas vandeniu ir džiovinamas azoto dujų srove. A β vizualizavimui buvo naudojama Dimension Icon atominės jėgos mikroskopijos sistema. Naudotos FESP-V2 modelio adatos, kurių virpėjimo dažnis 75 kHz. Mėginio skenavimas atliekamas paviršiaus tapšnojimo režimu, 0,5–0,7 Hz greičiu. Skenavimo kokybė 1024 \times 1024 taškų.

2.2.11. Duomenų pateikimas ir analizė

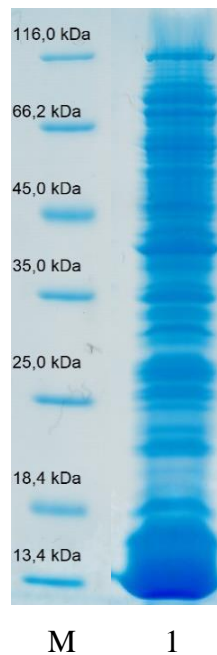
Atliekant EIS matavimus buvo panaudotas „Thales 2.0“ programinis paketas, o gauti rezultatai analizuojami „Zview“ bei „Zahner Analysis“ paketais. Naudojant „Qcapture“ programinį paketą gautos fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos, kurios apdorotos „ImageJ 1.53“ programine įranga. Atominės jėgos mikroskopijos vaizdai gauti „NanoScope 1.4“ programiniu paketu, o apdorojami „NanoScope Analysis 1.9“ ir „WSxM 4.0“.

Skaičiavimams ir rezultatų pateikimui naudoti „MS Excel“, „GraphPad Prism 9“ ir „Origin 9.0“ programinės įrangos paketai. AJM matavimų metu gautos aukščio vertės analizuotos duomenų masyvui pritaikant netiesinę regresiją (Gauso pasiskirstymo aproksimacija). Kiti eksperimentiniai duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis.

3. REZULTATAI

3.1. Baltymo S100A9 gryninimas

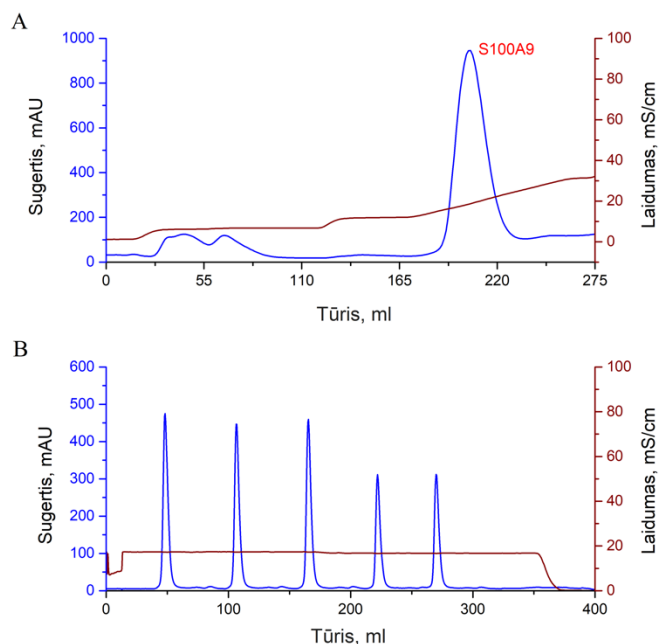
Po plazmidės, turinčios S100A9 baltymą koduojantį geną, transformacijos į kompetentines ląsteles, įsitikinama, kad procedūra pavyko sėkmingai. Norint patikrinti ar vyksta S100A9 baltymo raiška, augintos *E. coli* ląstelių kultūros mėginys buvo analizuojamas elektroforezės metodu. 3.1 pav. pateiktoje elektroforezės gelio nuotraukoje galima matyti daug įvairios molekulinės masės baltymų. Ryškiausia juostelė, esanti ties 13,4 kDa, atitinka S100A9 molekulinę masę.



3.1 pav. Baltymų raiška transformuotose *E. coli* ląstelėse. M – molekulinės masės žymuo; 1 – ultragarsu ardytos biomasės mėginys, kur juostelė ties 13,4 kDa atitinka S100A9 baltymo molekulinę masę.

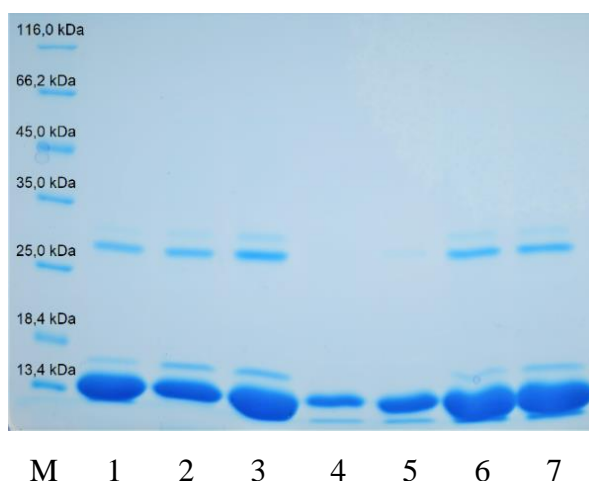
S100A9 baltymo gryninimas atliekamas jonų mainų chromatografijos metodu. 3.2 pav. A dalyje pavaizduota šio proceso chromatograma. Tirpalo laidumo vertės kyla didinant joninę jėgą, t.y. per kolonėlę tekančio B buferio gradientą. Pasiekus 20 % gradientą (esant 0,2 M NaCl koncentracijai tirpale) vyksta tikslinio baltymo eliucija. Renkamos tos frakcijos, kuriose yra didžiausia baltymo koncentracija (3.2 pav. A, smailė su S100A9 žyma). Didėjanti baltymo koncentracija lemia sugerties ($\lambda = 280$ nm) intensyvumo padidėjimą. Po jonų mainų chromatografijos atliekama gelfiltracija (dydžio išskyrimo chromatografija). Gelfiltracijos metu galima atskirti baltymą nuo priemaišų ir susidariusių agregatų bei pakeisti tirpalo buferį. Tolimesniuose eksperimentuose S100A9 bus naudojamas PBS fosfatiniame buferyje (pH 7,4).

3.2 pav. B dalyje matyti, kad S100A9 baltymo sugerties smailės aiškiai atsiskiria nuo mažo intensyvumo priemaišų sugerties smailių. Išgryninto S100A9 baltymo kiekis – 173 mg.



3.2 pav. S100A9 baltymo jonų mainų (A) ir gelfiltracijos (B) chromatogramos. Gelfiltracijos metu ant kolonos užnešamas baltymo tirpalo tūris padalintas į 5 mažesnio tūrio mėginius (B grafike matomos 5 smailės).

Atlikus jonų mainų chromatografiją ir gelfiltraciją, buvo imami baltymo tirpalo mėginiai ir tikrinami elektroforezės metodu. 3.3 pav. pateiktame elektroforezės gelyje matyti, kad S100A9 baltymas randamas visuose mėginiuose. Ryškios juostelės, kiekviename iš takelių, pagal molekulinę masę atitinka baltymo monomerus, o blankesnės juostelės – dimerus.

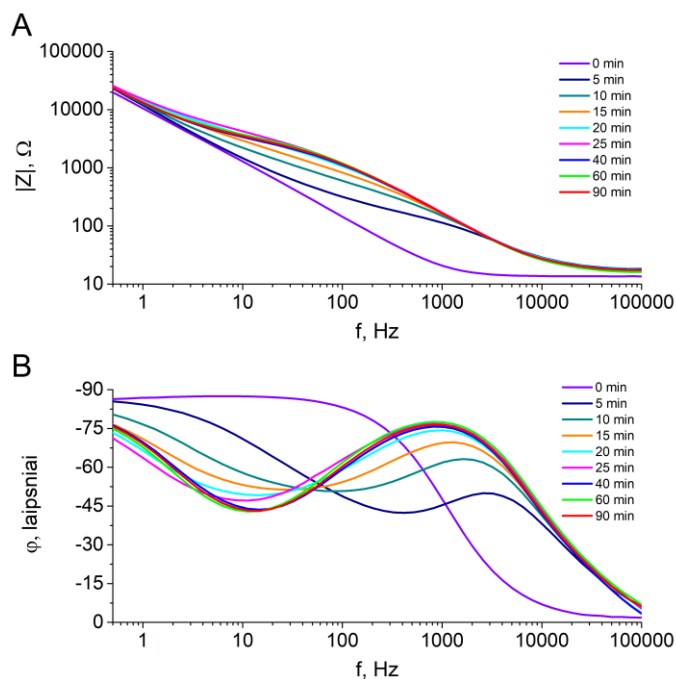


3.3 pav. Elektroforezės gelis. M – molekulinės masės žymuo. 1 – apjungtos baltymo frakcijos po gelfiltracijos; 2–5 – gelfiltracijos metu surinktos atskiros baltymo frakcijos; 6 – jonų mainų chromatografijos metu gauta viena iš baltymo frakcijų; 7 – baltymo frakcijos, apjungtos po jonų mainų chromatografijos.

3.2. Prie paviršiaus prikabintų membranų ir baltymo S100A9 sąveikos tyrimas

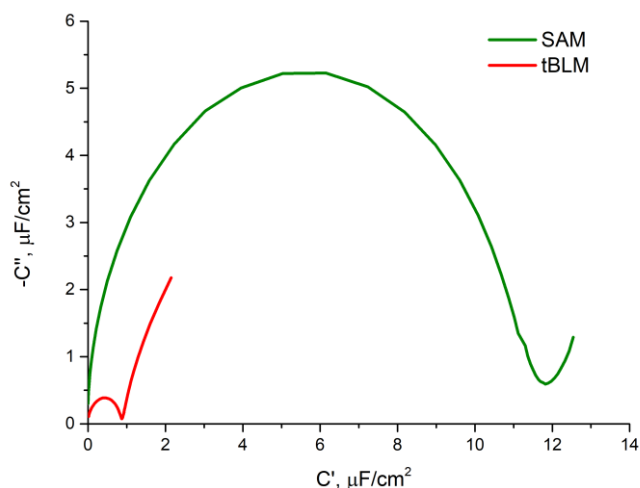
3.2.1. tBLM charakterizavimas EIS metodu

tBLM formavimo metu savitvarkiu monosluoksniu (SAM) modifikuotas aukso paviršius yra inkubuojamas su daugiasluoksnių liposomų tirpalu. Inkubacijos metu vezikulės liejasi ant paviršiaus. Tokiu būdu susidaro lipidų dvisluoksnis, kuris prie kieto pagrindo prikabintas per SAM esančias inkarines molekules. Vezikulių liejimosi proceso pokyčius galima registruoti elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu. 3.4 pav. yra pateikiamos Bode koordinatės, kuriose vaizduojami tBLM spektrai, jos formavimosi metu. Impedanso modulio ir fazės kampo priklausomybė nuo dažnio suteikia informacijos apie suformuotos tBLM integralumo pokyčius. Pirmasis užregistruotas spektras (3.4 pav.) atitinka paviršių su savitvarkiu monosluoksniu. Po 5 min. EIS spektro forma jau yra pakitusi ir tai indikuoja apie lipidų dvisluoksniu formavimosi pradžią. Po 5 min. atsiranda fazės minimumo taškas (3.4 pav. B), kuris laike slenkasi į žemų dažnių sritį. Pagal šio minimumo padėtį galima spręsti apie susiformavusios membranos laidumą – kuo kairiau jis yra, tuo mažesnis dvisluoksniu laidumas. Taip pat liejantis vezikulėms laike, didėja impedanso modulis (3.4 pav. A), kas rodo tBLM izoliuojančių savybių augimą. Kai EIS kreivės nusistovi ir jų forma nebekinta, susiformuoja stabili ir izoliuojanti tBLM. Pagal gautus rezultatus matome, jog po 40 min. nuo vezikulių liejimosi pradžios, elektriniai tBLM parametrai nebekinta.



3.4 pav. EIS spektriniai pokyčiai tBLM formavimosi metu. A – impedanso grafikas, B – fazės kampo grafikas. Skirtingų spalvų kreivės atitinka tBLM, sudarytos iš DOPC ir cholesterolio (santykiu 60:40), elektrines savybes praėjus skirtingam laikui nuo vezikulių liejimosi pradžios. Aukso paviršius, ant kurio formuojama tBLM, padengtas WC14/ β ME (santykiu 35:65) savitvarkiu monosluoksniu.

Elektrocheminio impedanso spektroskopija taip pat gali suteikti informacijos apie susiformavusios tBLM talpą. Kompleksinės talpos koordinatės EIS metode yra vadinamos Cole-Cole grafiku. 3.5 pav. pavaizduotas SAM ir tBLM talpos reikšmių grafikas. EIS spektruose stebimas pusapskritimių diametras yra proporcingas elektrodo elektrinei talpai. Ant elektrodo paviršiaus susiformavus tBLM, susidaro papildomas 3–4 nm storio dielektriko sluoksnis, todėl sumažėja talpa. tBLM talpa yra maždaug 12 kartų mažesnė už savitvarkio monosluoksnio talpą.

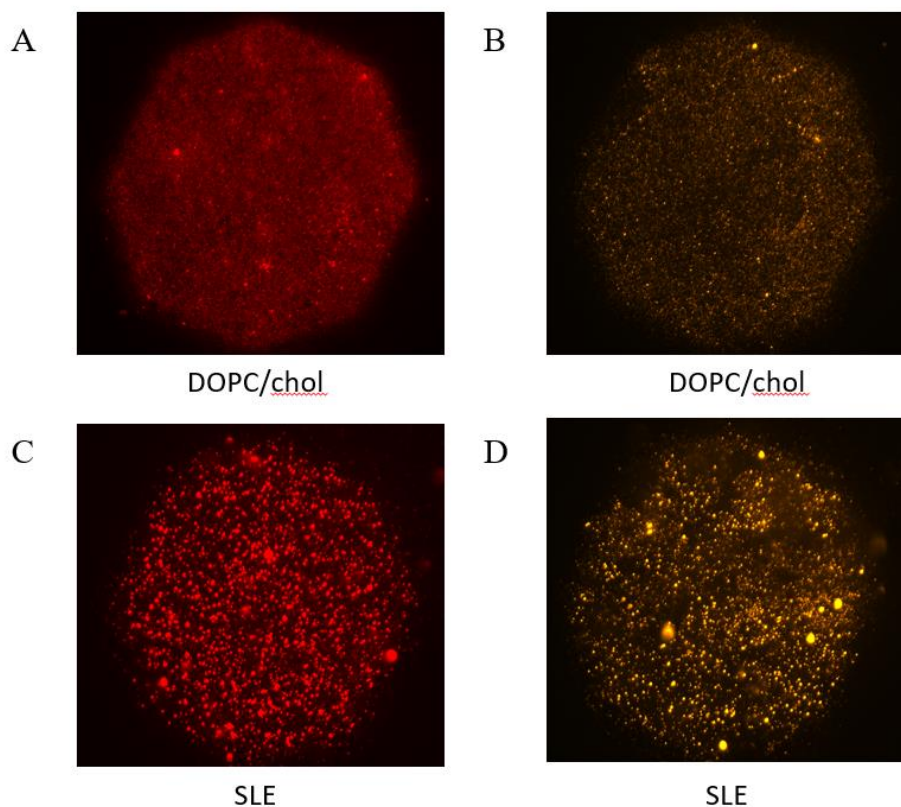


3.5 pav. EIS Cole-Cole koordinatės. Pusapskritimių diametras atitinka tBLM (raudona spalva) ir SAM (žalia spalva) elektrinę talpą. tBLM sudaryta iš DOPC ir cholesterolio (santykiu 60:40), SAM – WC14/ β ME (santykiu 35:65).

3.2.2. tBLM vizualizavimas fluorescencinės mikroskopijos metodu

Norėdami įvertinti skirtingos kompozicijos susiformavusių tBLM morfologiją, atlikome fluorescencinės mikroskopijos vaizdinimo eksperimentus. Į vezikules įterpus fluorescuojančius lipidus galima gauti informacijos apie lipidų išsidėstymą dvisluoksnyje. Darbe buvo naudojami fluorescuojančia žyme žymėti fosfatidiletanolaminas (LRPE) ir cholesterolis (Cy5-chol). 3.6 pav. pavaizduotos tBLM, sudarytos iš DOPC/chol ir smegenų lipidų ekstrakto (SLE). Skirtingų kompozicijų dvisluoksniuose matomi specifiniai skirtumai tarp Cy5-chol (3.6 pav. A, C) ir LRPE (3.6 pav. B, D) išsidėstymo. tBLM, sudarytoje iš DOPC ir cholesterolio stebimas homogeniškas lipidų išsidėstymas (3.6 pav. A, B), o SLE membranoje lipidai pasiskirsto netolygiai, formuodami Cy5-chol ir LRPE lipidines sanaukas (3.6 pav. C, D). Toks lipidų heterogeniškas gali būti paaiškinamas lipidinių plaustų formavimusi. Kadangi smegenų lipidų ekstraktas sudarytas iš įvairių lipidų, tokių kaip sfingomielinas, cerebrizidas, gangliozidai ir kt., atsiranda galimybė formuotis plaustams – membranos domenams, kuriuose

susidaro įvairių lipidų sankaupos. Taigi pasitelkus fluorescencijos mikroskopiją patvirtinome lipidinių plaustų formavimąsi tBLM, sudarytose iš SLE.

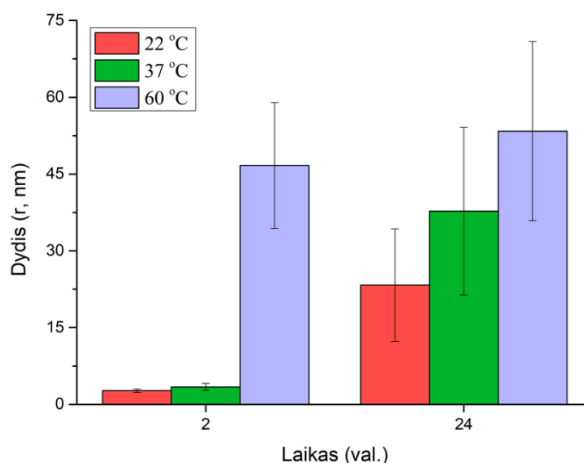


3.6 pav. LRPE ir Cy5-chol pasiskirstymas lipidų dvisluoksnyje. A – DOPC/chol (60:40) tBLM su įterptu Cy5-chol; B – DOPC/chol (60:40) tBLM su įterptu LRPE; C – tBLM, suformuota iš smegenų lipidų ekstrakto (SLE) su įterptu Cy5-chol; D – tBLM, suformuota iš SLE su įterptu LRPE. Visais atvejais fluorescuojantys lipidai sudarė 3 % visų lipidų.

3.2.3. Baltymo S100A9 charakterizavimas DLS metodu

Dinaminės šviesos sklaidos metodas buvo taikomas norint įvertinti S100A9 agregatų dydį, priklausomą nuo baltymo oligomerizacijos sąlygų. Pirmiausia baltymo tirpalas 2 val. inkubuojamas skirtingose temperatūrose (22 °C, 37 °C, 60 °C). Tirpale susiformavusių dalelių dydis pateikiamas 3.7 pav. Po inkubacijos 22 °C temperatūroje vidutinis S100A9 agregatų spindulys yra $2,66 \pm 0,33$ nm. S100A9 monomero dydis yra apie 0,8 nm. Šiuos rezultatus palyginus su pateikiamais literatūroje galima spręsti, kad tirpale yra susiformavę oligomerai ir trumpi protofilamentai (Pansieri et al., 2019; Wang et al., 2014). 37 °C temperatūroje inkubuotame tirpale susiformavo panašaus dydžio struktūros (spindulys $3,41 \pm 0,69$ nm). Labiausiai išsiskyrė rezultatai, gauti išmatavus dalelių dydį 60 °C temperatūroje inkubuotame tirpale. Šiuo atveju vidutinis spindulys yra $46,68 \pm 12,29$ nm. Dydžio išaugimas rodo, kad 60 °C temperatūroje pagreitėja agregacijos procesas ir jau po 2 val. tirpale formuojasi dideli

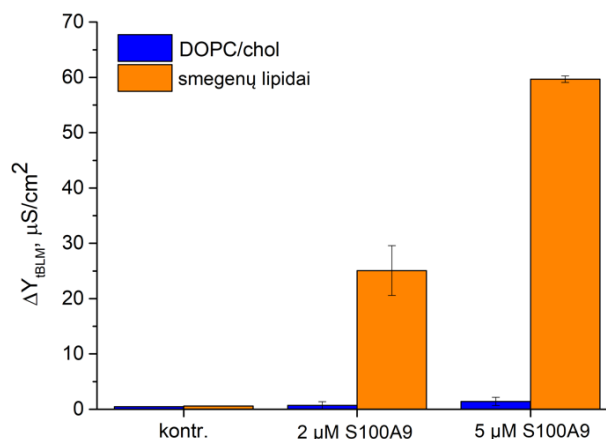
agregatai. Visų 3 preparacijų S100A9 tirpalai toliau buvo paliekami inkubuotis 24 val. kambario temperatūroje. Pagal gautus dalelių spindulio rezultatus po 24 val., matyti, kad baltymo tirpale, kurio pradinė oligomerizacija vyko 60 °C temperatūroje, dydis beveik nebekinta. Ryškus S100A9 struktūrų dydžio išaugimas stebimas 22 °C ir 37 °C temperatūrose pradžioje inkubuotuose tirpaluose.



3.7 pav. Skirtingomis sąlygomis inkubuoto S100A9 (2 mg/ml) dydis. Baltymo tirpalas pirmas dvi oligomerizacijos valandas laikomas 22 °C, 37 °C ir 60 °C, likusį laiką 22 °C temperatūroje.

3.2.4. tBLM laidumo pokyčiai po sąveikos su S100A9 monomerais

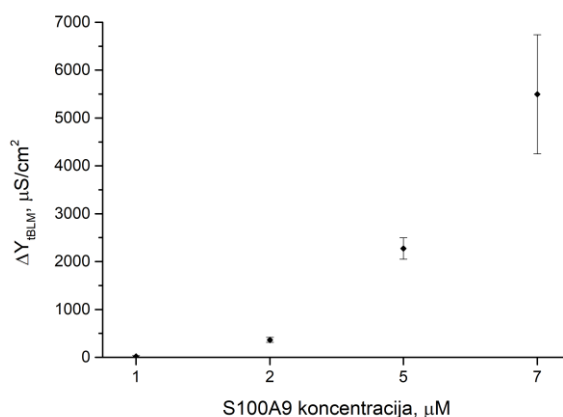
Pirmiausia buvo bandoma išsiaiškinti ar egzistuoja sąveika tarp tBLM ir S100A9 monomerų panaudojant 2 kompozicijų membranas. tBLM buvo formuotos iš DOPC ir cholesterolio (santykiu 60:40) bei smegenų lipidų ekstrakto, o elektriniai tBLM pokyčiai buvo fiksuojami EIS metodu. 3.8 pav. matyti, kad S100A9 baltymas pasižymi labai skirtingu poveikiu šių sudėčių membranoms. Sąveikos metu S100A9 pažeidžia tBLM integralumą, todėl stebime išaugusį membranos laidumą. tBLM, sudarytoje iš smegenų lipidų, po sąveikos su S100A9 monomerais, stebimas žymiai didesnis laidumo padidėjimas nei sudarytoje iš DOPC/chol (3.8 pav). Gauti rezultatai tarsi parodo S100A9 specifiškumą tam tikriems lipidiniams komponentams, esantiems smegenų ekstrakto.



3.8 pav. EIS metodu gauti skirtingų sudėčių tBLM laidumo poslinkiai po 24 val. inkubacijos su baltymo S100A9 monomerais.

3.2.5. tBLM laidumo poslinkio priklausomybė nuo S100A9 oligomerų koncentracijos

Kadangi ląstelėje S100A9 linkęs agreguoti (Horvath et al., 2018), savo tyrimuose norėjome įvertinti tBLM sąveiką su S100A9 agregatais panaudojant elektrocheminio impedanso spektroskopiją. Prieš membranos sąveiką su skirtingo dydžio S100A9 struktūromis, buvo norima išsiaiškinti, kokia S100A9 koncentracija yra pakankama pamatyti jo sukeltus pokyčius membranoje. Tam buvo panaudoti tBLM modeliai, kuriuose savitvarkis monoslouksnis sudarytas iš HC18 ir βME (santykiu 45:55), o lipidų dvislouksnis iš DOPC ir cholesterolio (santykiu 60:40). EIS metodu išmatavus tBLM laidumo poslinkio vertes po inkubacijos su skirtinga S100A9 oligomerų (2 val. inkubuotų 37 °C temperatūroje) koncentracija, pastebėta, kad didinant baltymo koncentraciją, membranos laidumo poslinkis eksponentiškai didėja (3.9 pav.). Sąveikos tyrimams buvo pasirinkta 2 μM S100A9 koncentracija, kuriai esant galime stebėti ryškius tBLM pokyčius EIS spektruose.

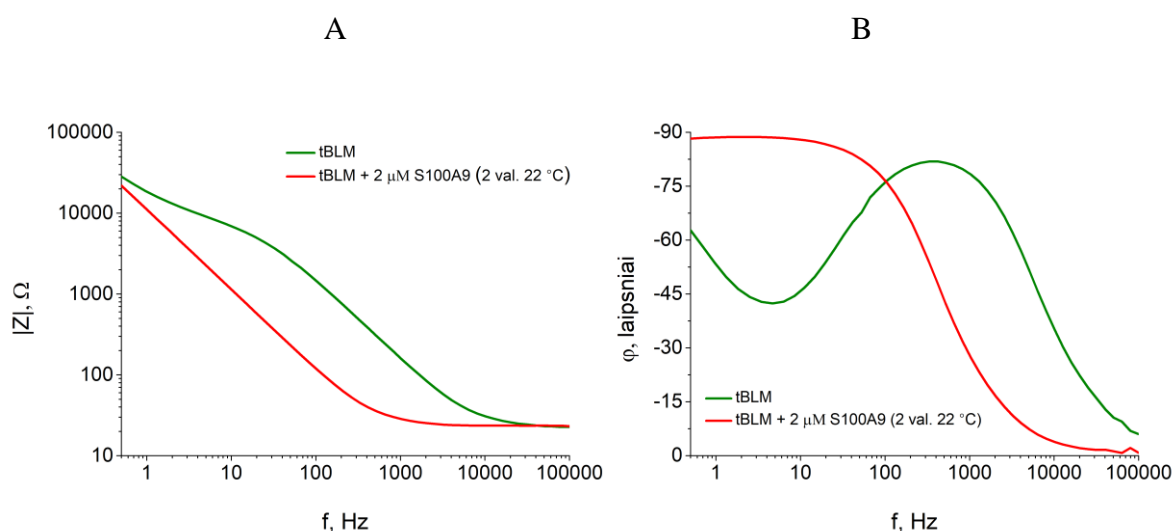


3.9 pav. EIS metodu gauta tBLM laidumo poslinkio priklausomybė nuo S100A9 (2 val. inkubuoto 37 °C) koncentracijos.

3.2.6. tBLM pokyčiai po sąveikos su skirtingais S100A9 agregatais

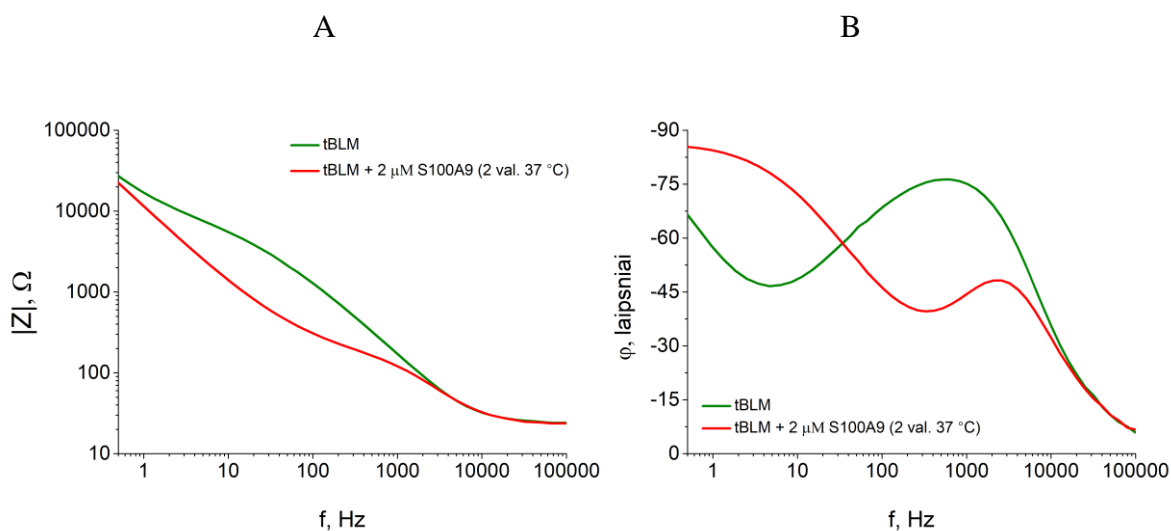
Norint įvertinti kaip skirtingos morfologijos S100A9 agregatai pakeičia membranos savybes, buvo registruojami EIS spektrai prieš tBLM sąveiką su skirtingomis sąlygomis inkubuotu baltymu ir po sąveikos. Pirmiausia, eksperimentuose buvo naudojami DOPC/chol (60:40) membranos modeliai. 2 val. skirtingose temperatūrose (22 °C, 37 °C, 60 °C) inkubuotas S100A9 įleidžiamas į matavimo šulinėlius, kuriuose yra suformuotos prie paviršiaus prikabintos membranos. Galutinė baltymo koncentracija tirpale – 2 μM. Spektriniai pokyčiai registruojami po 24 val.

Didžiausius EIS spektrinius pokyčius sukėlė tBLM sąveika su S100A9, 2 val. inkubuotu 22 °C temperatūroje (3.10 pav.). Tokiomis sąlygomis susidariusių S100A9 agregatų spindulys, nustatytas DLS metodu, yra 2–3 nm (3.7 pav.). Iš tBLM spektro matyti, kad po sąveikos su S100A9, EIS kreivė pakeičia savo formą ir nebelieka minimumo taško (3.10 pav. B). Taip pat ženkliai sumažėja tBLM impedanso modulis (3.10 pav. A). Tokie spektro pokyčiai rodo, kad tBLM visiškai prarado izoliacines savybes ir lipidų dvisluoksnis yra suardytas.



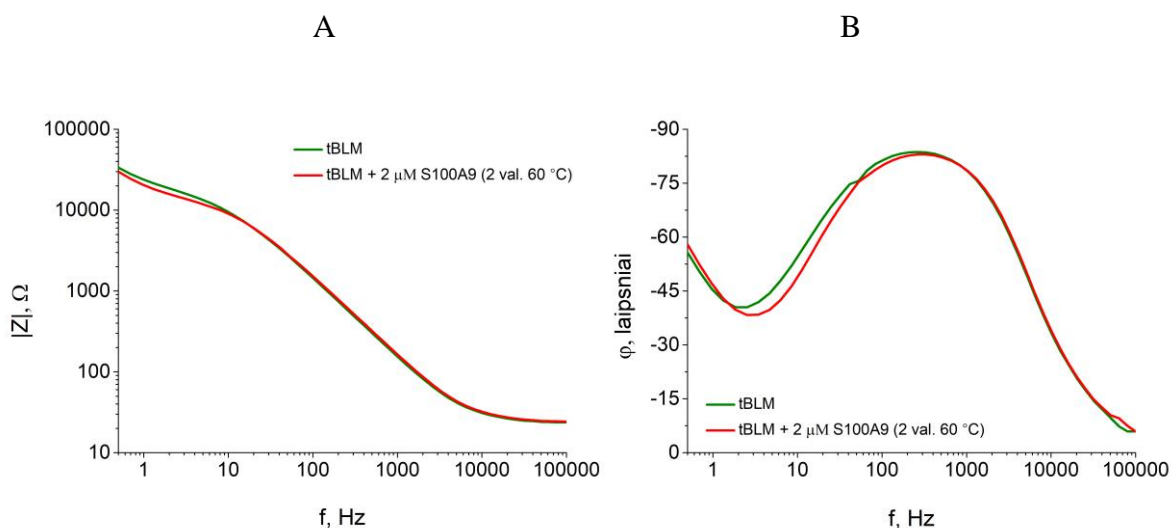
3.10 pav. EIS spektriniai pokyčiai prieš (žalia spalva) ir po tBLM (DOPC/chol) sąveikos su S100A9 (2 μM) 2 val. inkubuotu 22 °C (raudona spalva). A – impedanso grafikas; B – fazės kampo grafikas.

Toliau buvo tiriamas 2 val. 37 °C temperatūroje inkubuoto S100A9 poveikis lipidų dvisluoksniui (3.11 pav.). Po tBLM sąveikos su šiais S100A9 agregatais, kurių spindulys 3–4 nm (3.7 pav.), taip pat stebimi ryškūs EIS spektriniai pokyčiai, tačiau šiuo atveju tBLM nėra suardoma, kaip po sąveikos su mažesnio dydžio S100A9 (3.10 pav.). EIS fazės minimumo poslinkis į didelių dažnių sritį indikuoja apie stiprų membranos laidumo padidėjimą dėl S100A9 sukeltų pažaidų.



3.11 pav. EIS spektriniai pokyčiai prieš (žalia spalva) ir po tBLM (DOPC/chol) sąveikos su S100A9 (2 μM) 2 val. inkubuotu 37 °C (raudona spalva). A – impedanso grafikas; B – fazės kampo grafikas.

Po tBLM sąveikos su S100A9 baltymu, 2 val. inkubuotu 60 °C temperatūroje, žymių EIS spektrinių pokyčių nėra matoma (3.12 pav.). Tokiomis sąlygomis inkubuotame S100A9 tirpale susidaro didžiausi agregatai, kurių spindulys, išmatuotas DLS metodu, gali siekti iki 50 nm (3.7 pav.). Taigi po tBLM ir S100A9 sąveikos EIS fazės kampo bei impedanso grafike neatsiranda ryškių skirtumų. Remiantis rezultatais galime teigti, jog po tBLM sąveikos su didžiausiais S100A9 agregatais, tBLM elektrinės savybės nesikeičia ir specifinės sąveikos neužfiksuota.



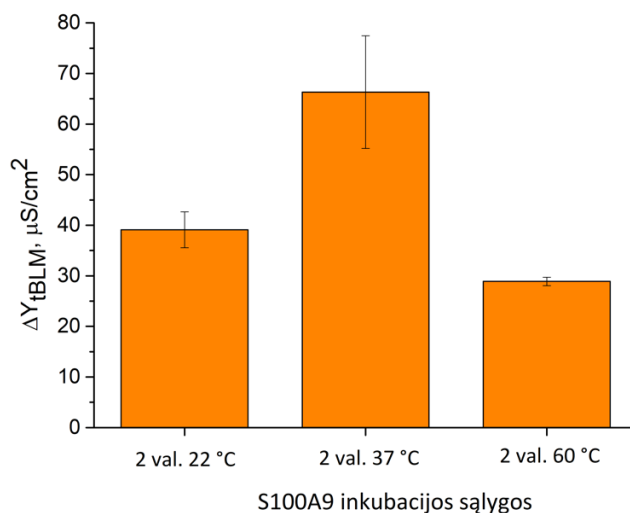
3.12 pav. EIS spektriniai pokyčiai prieš (žalia spalva) ir po tBLM (DOPC/chol) sąveikos su S100A9 (2 μM) 2 val. inkubuotu 60 °C (raudona spalva). A – impedanso grafikas; B – fazės kampo grafikas.

Vidutinės tBLM (DOPC/chol) laidumo poslinkių vertės (ΔY_{tBLM}), apskaičiuotos iš EIS spektrų, po sąveikos su skirtingomis sąlygomis inkubuotu S100A9, pateikiamos 3.1. lentelėje. Pastebėta, kad maži S100A9 oligomerai, inkubuoti 2 val. 22 °C temperatūroje, po sąveikos su tBLM, sukelia didesnę membranų laidumo poslinkį, lyginant su 24 val. inkubuotu baltymu. Tuo tarpu didesnių S100A9 agregatų, inkubuotų 2 val. 37 °C ir 60 °C temperatūroje, poveikis tBLM po 24 val. beveik nesiskyrė (3.1 lentelė).

3.1. lentelė. Skirtingomis pradinėmis (2 val.) sąlygomis inkubuoto S100A9 baltymo sukeltų tBLM (DOPC/chol) laidumo poslinkių vertės (ΔY_{tBLM}).

2 val. 22 °C	2 val 37 °C	2 val. 60 °C
$\Delta Y_{tBLM}, \mu S/cm^2$		
6546,75 ± 517,55	389,33 ± 14,14	2,66 ± 0,25
$\Delta Y_{tBLM}, \mu S/cm^2$		
24 val. 22 °C (prad. 22 °C)	24 val. 22 °C (prad. 37 °C)	24 val. 22 °C (prad. 60 °C)
$\Delta Y_{tBLM}, \mu S/cm^2$		
653,93 ± 81,94	326,65 ± 11,76	1,62 ± 0,12

Taip pat buvo stebima skirtingose temperatūrose 2 val. inkubuoto S100A9 sąveika su tBLM, sudarytomis iš smegenų lipidų ekstrakto. Šiuo atveju nebuvo pastebėta tokių ryškių skirtumų tarp tBLM laidumo padidėjimo po sąveikos su skirtingo dydžio S100A9 agregatais, lyginant su DOPC/chol membrana. Kaip anksčiau nustatyta (3.8 pav.), monomerinė S100A9 forma sukelia 25,07 ± 4,51 $\mu S/cm^2$ tBLM, sudarytos iš smegenų ekstrakto lipidų, laidumo poslinkį. Labai panašų tBLM laidumo poslinkį sukelia ir 60 °C temperatūroje inkubuotas baltymas. Tai mažiausia ir didžiausia S100A9 agregatų formos. Paveikus SLE membranas tarpinio dydžio S100A9 oligomerais (2 val. inkubacija 22 °C ir 37 °C) gautos didesnės tBLM laidumo poslinkio vertės (3.13 pav.).



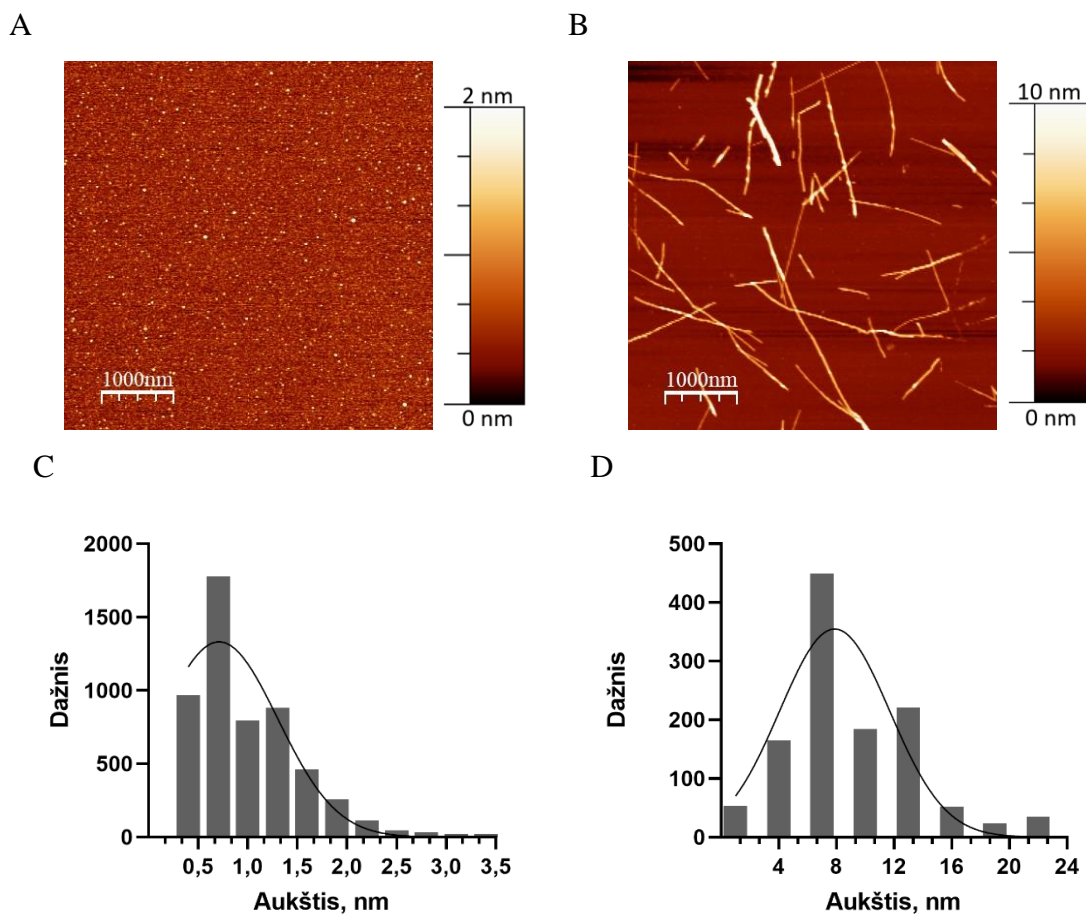
3.13 pav. EIS metodu gauti smegenų lipidų ekstrakto tBLM laidumo poslinkiai po 24 val. inkubacijos su skirtingomis sąlygomis inkubuotu S100A9.

Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad S100A9 gebėjimas pažeisti tBLM priklauso nuo jo dydžio. Vidutinio dydžio S100A9 struktūros (maži oligomerai ir trumpi protofilamentai) yra toksiškesnės membranai S100A9 formos lyginant su monomere S100A9 forma ir dideliais agregatais.

3.3. Amiloido beta sąveikos su liposomomis tyrimas

3.3.1. Amiloido beta morfologijos nustatymas AJM metodu

Amiloido beta ($A\beta_{1-42}$) peptidas pasižymi gebėjimu sąveikauti su ląstelės plazminė membrana ir joje sukelti pažaidas (Picone et al., 2020). Amiloidų agregacijos metu susidaro nevienalytės, įvairių dydžių ir formų struktūros. Jų skirtumai gali lemti toksiškumo laipsnį ir mechanizmą, dėl to svarbu charakterizuoti skirtingas agregacijos proceso formas. Liposomų integralumo pokyčių tyrime buvo naudojamas iškart prieš eksperimentą išgrynintas $A\beta_{1-42}$ ir fibrilizuotas $A\beta_{1-42}$. Norint nustatyti specifinius struktūrinius skirtumus tarp šių mėginių buvo pasitelktas atominės jėgos mikroskopijos metodas. Iškart prieš eksperimentą išgryninto $A\beta_{1-42}$ mėginyje vidutinis sferinių struktūrų aukštis yra $0,71 \text{ nm} \pm 0,59 \text{ nm}$ (3.14 pav. A, C). Tokie rezultatai sutampa su literatūroje pateikiamu $A\beta_{1-42}$ mažų oligomerų diametru (Walsh et al., 1999). Pagal struktūrų morfologiją ir aukštį matyti, kad mėginys yra heterogeniškas, sudarytas iš monomerų bei oligomerų (dimerų, trimerų). Kitame, jau inkubuotame $A\beta_{1-42}$ peptido tirpale, stebimos susiformavusios fibrilės, kurių vidutinis aukštis $7,88 \text{ nm} \pm 3,82 \text{ nm}$ (3.14 pav. B, D).

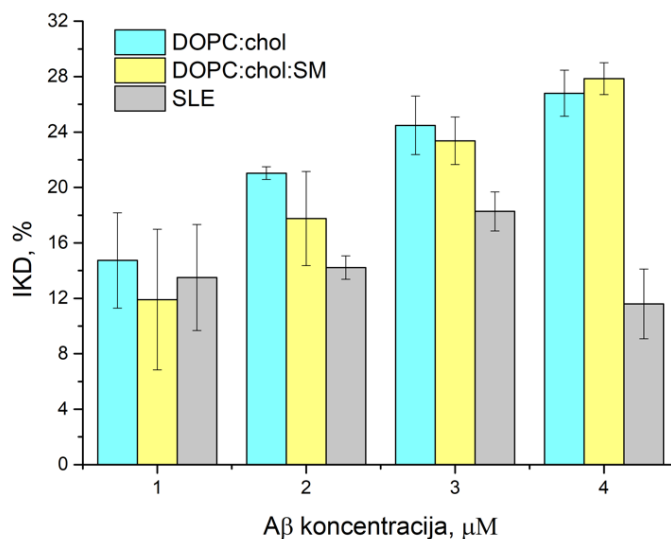


3.14 pav. AJM gauti topografiniai $A\beta_{1-42}$ peptido vaizdai, kai skenavimo laukas $5 \times 5 \mu\text{m}$ (A, B). A – maži oligomerai ($10 \mu\text{M}$), B – fibrilės ($5 \mu\text{M}$). $A\beta_{1-42}$ Oligomerų ir fibrilių aukščio pasiskirstymas mėginiuose pateikiamas C ir D histogramose, atitinkamai. Juodos linijos – Gauso pasiskirstymo aproksimacija.

3.3.2. $A\beta_{1-42}$ sukeltų liposomų integralumo pokyčių tyrimas

100 nm dydžio liposomos buvo naudojamos kaip modelinė membranos sistema, leidžianti tirti $A\beta_{1-42}$ ir lipidų dvisluoksnio sąveiką. Į vezikulių vidų įterpus kalceino molekules galima lengvai stebėti dvisluoksnio integralumo pokyčius. Kadangi liposomų viduje yra didelė kalceino koncentracija, jis save gesina ir fluorescencija nėra registruojama. Jam patekus į išorinę terpę, kalceino molekulės prasiskiedžia – stebimas fluorescencijos intensyvumo padidėjimas. Matuojant fluorescencijos intensyvumą galima kiekybiškai įvertinti liposomų pralaidumo lygį, kurį sukelia skirtingos $A\beta_{1-42}$ formos. Darbe buvo stebima $A\beta_{1-42}$ sąveika su liposomomis, sudarytomis iš 1) DOPC ir cholesterolio (santykiu 60:40); 2) DOPC, cholesterolio ir sfingomielinio (SM) (santykiu 63:30:7); 3) smegenų lipidų ekstrakto (SLE). Fluorescencijos intensyvumo kitimo stebėjimas buvo atliekamas 2 valandas, 37°C temperatūroje. 3.15 pav. yra pateikiama iš skirtingos sudėties liposomų ištekėjusi kalceino dalis (IKD), esant skirtingai $A\beta_{1-42}$ mažų oligomerų koncentracijai. Kadangi pačios liposomos pasižymi skirtingu savaiminiu pralaidumu priklausomai nuo jų sudėties, rezultatuose yra

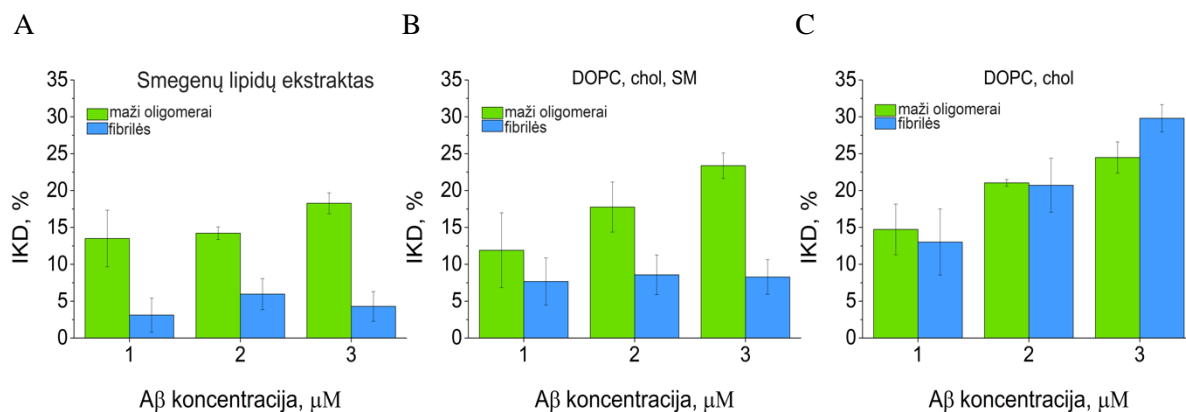
pateikiamas skirtumas tarp sąveikos su peptidu nulemtos ištekiančio kalceino dalies ir spontaninio kalceino molekulių ištekėjimo. Didėjant $A\beta_{1-42}$ koncentracijai stebimas DOPC/chol bei DOPC/chol/SM liposomų laidumo kalceinui didėjimas. Smegenų lipidų ekstrakto liposomose ši priklausomybė neatsikartoja. Taip pat nepastebėta ryškaus mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų ardymo specifiskumo kažkuriai iš kompozicijų.



3.15 pav. Iš skirtingos sudėties liposomų ištekiančio kalceino dalis dėl padidėjusio lipidų dvisluoksnio laidumo. Eksperimente naudotos skirtingos mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų koncentracijos (1–4 μM). Pateikiamos vertės – skirtumas tarp po sąveikos su peptidu ištekiančio kalceino dalies ir spontaninio kalceino molekulių ištekėjimo. Rezultatai gauti po 2 val. liposomų inkubacijos su $A\beta_{1-42}$ 37 °C temperatūroje.

Toliau buvo lyginami mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų ir $A\beta_{1-42}$ fibrilių sukelti liposomų integralumo pokyčiai. Po skirtingo oligomerizacijos laipsnio $A\beta_{1-42}$ formų inkubacijos su liposomomis (2 val., 37 °C), suformuotomis iš smegenų lipidų, buvo stebimas skirtingas liposomų laidumo padidėjimas. $A\beta_{1-42}$ oligomerų sukeltos pažaidos lipidų dvisluoksnyje lėmė didesnę ištekiančio kalceino srautą, lyginant su $A\beta_{1-42}$ fibrilių sukeltomis pažaidomis (3.16 pav. A). Tendencija atsikartoja ir po DOPC/chol/SM liposomų sąveikos su $A\beta_{1-42}$ skirtingomis formomis (3.16 pav. B). Priešingai, žymaus skirtumo tarp mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų ir $A\beta_{1-42}$ fibrilių nulemtu pralaidumo padidėjimo DOPC/chol liposomose nepastebėta (3.6 pav. C). Lyginant DOPC/chol ir DOPC/chol/SM liposomų pralaidumo pokyčius, matoma, kad esant sfingomielinui, $A\beta_{1-42}$ fibrilių poveikis liposomoms sumažėja, tuo tarpu $A\beta_{1-42}$ oligomerų atveju stebimas panašus pralaidumo mastas. Remiantis rezultatais, tarsi stebime, mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų afiniškumą sfingomielinui (3.16 pav. A, B). Smegenų lipidinis ekstraktas yra mišinys įvairių lipidinių komponentų, įskaitant ir sfingomieliną. Abiem atvejais stebimas

liposomų pralaidumo padidėjimas, kas gali būti siejama su $A\beta_{1-42}$ oligomerų specifiskumu sfingomielinui.



3.16 pav. Mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų ir $A\beta_{1-42}$ fibrilių sukeltas lipidų dvisluoksniu laidumo kalceinui padidėjimas. A, B, C – pokyčiai SLE, DOPC/chol/SM ir DOPC/chol liposomose, atitinkamai. Pateikiamos vertės – skirtumas tarp po sąveikos su peptidu ištekiančio kalceino dalies ir spontaninio kalceino molekulių ištekėjimo. Rezultatai gauti po 2 valandų liposomų inkubacijos su $A\beta_{1-42}$, 37 °C temperatūroje.

REZULTATŲ APITARIMAS

Atliktą darbą galima suskirstyti į tris pagrindines dalis. Pirmoje reikėjo išgryninti S100A9 baltymą. Parinkti tinkamas sąlygas nebuvo sudėtinga, nes šio baltymo grynino metodika jau buvo aprašyta literatūroje. S100A9 buvo ekspresuojamas *E. coli* BL21 kamienne. *Escherichia coli* organizmas pasirinktas dėl kelių pagrindinių privalumų: 1) Labai greita augimo kinetika, optimalioms aplinkos sąlygoms ląstelių dvigubėjimo laikas yra apie 20 min. (Sezonov et al., 2007); 2) Lengva pasiekti didelį ląstelių kultūros tankį (Shiloach ir Fass, 2005); 3) Greitas ir lengvas egzogeninės DNR įterpimas (Pope ir Kent, 1996). Biomassę pasirinkta auginti autoinduktyvioje mitybinėje terpėje, nes joje nereikia nuolatos sekti ląstelių optinio tankio, kad tinkamu metu įdėti induktorių. Išsekus gliukozei ir likus vieninteliam anglies šaltiniui laktozei, indukuojama rekombinantinio baltymo geno raiška (Krause et al., 2016). Kadangi S100A9 pasižymi amiloidogeninėmis savybėmis, ekspresuojant didelius jo kiekius, gali susidaryti inkliuziniai kūneliai. Norint to išvengti buvo įtraukta baltymo denatūracija-renatūracija pagal Sambrook et al. (2012) aprašytą metodiką. S100A9 gryninimas buvo atliktas jonų mainų chromatografijos metodu, remiantis Kozlyuk et al. (2019).

Antroje dalyje reikėjo iširti, kaip skirtingo dydžio S100A9 agregatai sąveikauja su fosfolipidų dvisluoksniu. Norint gauti įvairaus S100A9 dydžio agregacijos proceso formas, baltymas (2 mg/ml) buvo inkubuojamas 2 val. ir 24 val., esant skirtingai pradinėi temperatūrai. Po 2 val. 22 °C ir 37 °C temperatūrose susidariusių S100A9 agregatų dydis siekė 4–8 nm (3.7 pav.). Literatūroje teigiama, kad tokio dydžio yra maži S100A9 oligomerai ir trumpi protofilamentai (Pansieri et al., 2019; Wang et al., 2014). Darbe buvo atsižvelgta į tai, kad S100A9 agregacija vyksta pakankamai lėtai. Esant 42 °C temperatūrai ir tokiai koncentracijai, kuri naudojama šiame darbe, baltymas suagreguoja per 40 val. (Iashchishyn, 2019). Norint pagreitinti šį procesą baltymo tirpalas buvo inkubuojamas 60 °C temperatūroje. Šiomis sąlygomis po 2 val. susidarė 90–100 nm dydžio S100A9 agregatai (3.7 pav.). Lyginant su kitų tyrėjų gautais duomenimis, tokie rezultatai atitinka S100A9 fibrilių ir žiedinių agregatų dydį (Pansieri et al., 2020; Wang et al., 2014). Po paros laiko S100A9 tirpale esančių dalelių dydis auga, kas rodo, kad vyksta agregacija. Skirtinga pradinė inkubacijos temperatūra lėmė skirtingo dydžio S100A9 agregatų susidarymą po 24 val.

Apie tBLM ir S100A9 sąveikos tyrimus iki šiol dar nėra niekur skelbta. Viena iš darbe naudotų tBLM imitavo supaprastintą eukariotinės ląstelės plazminę membraną, sudarytą iš DOPC ir cholesterolio, kita – neuronų membraną. Pastarosios tBLM formavimui buvo panaudotas smegenų lipidų ekstraktas, kuriame randama įvairių komponentų (pvz.: fosfatidilcholino, fosfatidiletanolamino, fosfatidilinozitolio, fosfatidilserino). Remiantis

fluorescencijos mikroskopijos duomenimis, buvo patvirtinta, jog iš smegenų lipidinio ekstrakto suformuota tBLM, pasižymi heterogeniška struktūra, kurioje dominuoja lipidinės sankaupos-domenai (3.6 pav.). Darbe pademonstruota, kad monomerinė S100A9 forma bei struktūros, kurios pagal dydį atitinka fibriles ir didelius agregatus, yra mažiausiai toksiškos membranai (3.8 pav., 3.12 pav., 3.13 pav.). Daugiausia pažaidų lipidų dvisluoksnyje sukelia S100A9 maži oligomerai ir galimai trumpos protofibriles (3.10 pav., 3.11 pav., 3.13 pav.). Lyginant abiejų kompozicijų tBLM laidumo pokyčius, pastebėta, kad maži S100A9 oligomerai sukelia didesnes pažaidas DOPC/chol dvisluoksnyje, kur yra daugiau cholesterolio nei smegenų lipidų ekstrakto. Yra žinoma, kad kiti amiloidiniai baltymai, pvz., α -sinukleinas pasižymi afiniškumu cholesteroliui (Fantini et al., 2011). S100A9 maži oligomerai ir trumpi protofilamentai taip pat galėtų pasižymėti šiuo specifišku efektu.

Vykdamas SMART projektą „Alzheimerio ligos gydymui skirtų vaistinių kandidatinių junginių, slopinančių BACE1 fermentinį aktyvumą ir A β peptido agregaciją, kūrimas“ Nr. 01.2.2-LMT-K-718-03-0003, kurio vadovas dr. D. Matulis, paskutinėje dalyje buvo tiriama A β ₁₋₄₂ peptido ir liposomų sąveika. Atliekant šios dalies eksperimentus buvo lyginamas A β ₁₋₄₂ mažų oligomerų, kurių vidutinis aukštis, pagal AJM duomenis, buvo $0,71 \pm 0,59$ nm (3.14 pav. A, C) ir A β ₁₋₄₂ fibrilių, kurių nustatytas aukštis $7,88 \pm 3,82$ nm (3.14 pav. B, D), poveikis lipidų dvisluoksniui. Liposomose, kurios savo sudėtyje turi sfingomielino arba suformuotose iš smegenų lipidų, A β ₁₋₄₂ mažų oligomerų sukeltos pažaidos liposomoms yra žymiai didesnės nei fibrilių (3.16 pav.). Tokie rezultatai rodo, kad A β ₁₋₄₂ maži oligomerai gali pasižymėti specifiskumu sfingomielinui. Taip pat ir literatūroje pateikiama informacija, kad amiloidogeniniai baltymai dažnai turi sfingolipidus surišantį domeną, orientuotą į tirpiklį (Fantini ir Yahi, 2010). Susiformavus A β ₁₋₄₂ fibrilėms šie regionai gali būti nukreipiami į vidų ir nebesąveikauti su išorine terpe. Dėl to A β ₁₋₄₂ oligomerai, kuriuose yra daugiau tokių atvirų sričių, pasižymi didesniu afiniškumu sfingomielinui. Liposomose, sudarytose iš smegenų lipidų, yra ne vienas komponentas, su kuriuo potencialiai galėtų sąveikauti A β ₁₋₄₂ oligomerai. Vienas jų – fosfatidiletanolaminas. Jo maža galvos grupė suteikia molekulei kūgio formą, o dvisluoksnyje anglies grandinės sukelia šoninį slėgį, kas lemia membranos neigiamą kreivumą (Laan et al., 2004). Tokiomis sąlygomis įmanoma, kad maži A β ₁₋₄₂ oligomerai lengviau nei fibrilės įsiterps tarp fosfatidiletanolamino galvučių ir padidins dvisluoksniu laidumą. Taip pat smegenų lipidų ekstrakto yra neigiamai įkrauto fosfatidilserino. Literatūroje pateikiami duomenys, kad A β ₁₋₄₂ prisijungimo efektyvumas koreliuoja su fosfatidilserino kiekiu ląstelės paviršiuje (Simakova ir Arispe, 2007). Tikslus amiloidinių baltymų sąveikos su plazmine membrana mechanizmas nėra žinomas, dažnai pateikiami skirtingi A β ₁₋₄₂ oligomerų sukeltų pažaidų tipai. Bode et al. (2019) teigia, kad A β ₁₋₄₂ gali atplėšti iš membranos lipidų fragmentus.

Toki efektą galima prilyginti detergentų veikimui. Kandel et al., (2018) nustatė, kad cholesteroliui sudarant 10 % visų liposomų lipidų, A β ₁₋₄₂ skatina porų susidarymą dvisluoksnyje.

Darbe buvo nustatyta, kad maži A β ₁₋₄₂ oligomerai bei S100A9 oligomerai ir trumpos protofibrilės pasižymi didžiausiu toksiškumu naudotiems membranos modeliams. Šie rezultatai sutampa su tyrimais, kuriuose pateikiami įrodymai, kad amiloidinių baltymų ir peptidų oligomerinės rūšys lemia ląstelių žūtį per padidėjusį membranos pralaidumą (Wong et al., 2009, Cizas, Budvytyte et.al., 2010, Horvath et al., 2018).

IŠVADOS

1. Darbo metu išgryninta 173 mg S100A9 rekombinantinio baltymo.
2. Pastebėta, kad skirtingomis sąlygomis inkubuojamas S100A9 formuoja skirtingo dydžio agregatus. Agregaciją skatina aukšta temperatūra. Atitinkamai 22 °C ir 37 °C temperatūroje gauti 2–3 nm ir 3–4 nm spindulio oligomerai, o 60 °C temperatūroje 30–60 nm spindulio dideli agregatai.
3. Nustatyta, kad tBLM pažeidimo lygis priklauso nuo S100A9 agregatų dydžio. Didžiausią membranų, suformuotų iš DOPC/cholesterolio ir smegenų lipidų, laidumo poslinkį sukelia maži S100A9 baltymo oligomerai.
4. Vizualizavus A β ₁₋₄₂ oligomerų ir paruoštų fibrilių mėginius, nustatyti morfologijos skirtumai tarp jų. Gautas oligomerų aukštis yra 0,5–1,5 nm, fibrilių – 5–10 nm.
5. Liposomose, sudarytose iš smegenų lipidų ekstrakto ir DOPC/cholesterolio/sfingomielino, A β ₁₋₄₂ oligomerai sukelia didesnes pažaidas, lyginant su fibrilėmis, tačiau ardymo specifiškumo tarp oligomerų ir fibrilių nepastebėta liposomose, sudarytose iš DOPC/cholesterolio.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Evelina Jankaitytė

Magistro baigiamasis darbas

**S100A9 BALTYMO IR AMILOIDO BETA PEPTIDO SĄVEIKOS SU DIRBTINIAIS
PLAZMINĖS MEMBRANOS MODELIAIS TYRIMAS**

SANTRAUKA

Alzheimerio liga yra labiausiai paplitusi senatvinės demencijos forma. Jai būdingi molekuliniai žymenys – įvairaus oligomerizacijos laipsnio A β peptido bei S100A9 baltymo dariniai, kurie kaupiasi ligos pažeistose smegenyse. Minėti ligos veiksniai linkę spontaniškai agreguoti į daugialypes fizikines formas: oligomeras, fibriles, amorfinius agregatus. A β ir S100A9 gali sąveikauti su membrana ir ją pažeisti. Pagrindinis šio darbo tikslas buvo ištirti skirtingos morfologijos S100A9 baltymo ir A β peptido formų sąveiką su modelinėmis plazminės membranos sistemomis.

Darbo metu buvo išgrynintas tyrimams tinkantis rekombinantinis S100A9 baltymas. Dinaminės šviesos sklaidos metodu (DLS) įvertintas skirtingomis sąlygomis susiformavusių S100A9 agregatų dydis. Nustatyta, kad inkubavus baltymą skirtingose, 22 °C, 37 °C ir 60 °C temperatūrose, susiformuoja oligomerai, trumpi protofilamentai bei fibrilės, atitinkamai. Tirti šių struktūrų pažaidas membranoje buvo naudojamos prie paviršiaus prikabintos fosfolipidinės membranos (tBLM), o jų elektrinės savybės registruojamos elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu (EIS). Norint išsiaiškinti kokias struktūras formuoja A β ₁₋₄₂ peptidas, buvo naudojama atominės jėgos mikroskopija (AJM). Susiformavusių oligomerų ir fibrilių gebėjimas ardyti lipidų dvisluoksnį buvo stebėtas pagal į liposomų vidų įterpto kalceino fluorescencijos intensyvumo pokyčius.

Atlikus tyrimus paaiškėjo, kad S100A9 baltymo ir A β ₁₋₄₂ peptido membranos pažeidimo lygis priklauso nuo jų agregatų dydžio. Toksiškiausi membranai yra 4–8 nm dydžio S100A9 ir 0,5–1,5 nm A β oligomerai.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Evelina Jankaitytė

Master thesis

**STUDY OF THE INTERACTION OF S100A9 PROTEIN AND AMYLOID BETA
PEPTIDE WITH ARTIFICIAL PLASMA MEMBRANE MODELS**

SUMMARY

Alzheimer's disease is the most common form of dementia. The hallmarks of Alzheimer disease (AD) include aggregation and accumulation of A β peptide and S100A9 protein in the brain. Different types of aggregates (oligomers, amyloid fibrils and amorphous aggregates) can interact with plasma membrane and cause it damage. The main objective of this work was to investigate the effect of S100A9 protein and A β peptide on model plasma membrane systems.

During this work recombinant S100A9 protein was purified. The size of S100A9 aggregates formed under different conditions was estimated by using dynamic light scattering (DLS). It was found that after incubation of proteins at different temperatures of 22 °C, 37 °C and 60 °C, oligomers, short protofilaments, and fibrils were formed, respectively. To investigate the damage caused by these structures to the membrane, tethered bilayer lipid membranes (tBLM) were used. By employing electrochemical impedance spectroscopy, changes in the electrical properties of the membrane were observed. Atomic force microscopy (AFM) was used to determine the morphology of structures formed by the A β ₁₋₄₂ peptide. The ability of A β ₁₋₄₂ oligomers and fibrils to disrupt the lipid bilayer integrity was observed by changes in the fluorescence intensity of the calcein incorporated into the liposomes.

Results have shown that the level of membrane damage caused by S100A9 protein and A β ₁₋₄₂ peptide depends on the size of their aggregates. Oligomeric species are more toxic to the membrane compared to fibrils and monomers.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Afanador, L., Roltsch, E. A., Holcomb, L., Campbell, K. S., Keeling, D. A., Zhang, Y., Zimmer, D. B. (2014). The Ca²⁺ sensor S100A1 modulates neuroinflammation, histopathology and Akt activity in the PSAPP Alzheimer's disease mouse model. *Cell Calcium*, 56, 68–80. DOI: 10.1016/j.ceca.2014.05.002.
- Alfaro, I. E., Albornoz, A., Molina, A., Moreno, J., Cordero, K., Criollo, A., Budini, M. (2019). Chaperone mediated autophagy in the crosstalk of neurodegenerative diseases and metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 778. DOI: 10.3389/fendo.2018.00778.
- Andersson, J., Fuller, M. A., Wood, K., Holt, S. A., Köper, I. (2018). A tethered bilayer lipid membrane that mimics microbial membranes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20, 12958–12969. DOI: 10.1039/c8cp01346b.
- Arosio, P., Vendruscolo, M., Dobson, C. M., Knowles, T. P. J. (2014). Chemical kinetics for drug discovery to combat protein aggregation diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35, 127–135. DOI: 10.1016/j.tips.2013.12.005.
- Bate, C., Williams, A. (2010). Amyloid-β1-40 inhibits amyloid-β1-42 induced activation of cytoplasmic phospholipase A2 and synapse degeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, 21, 985–993. DOI: 10.3233/JAD-2010-100528.
- Blanco, L. P., Evans, M. L., Smith, D. R., Badtke, M. P., Chapman, M. R. (2012). Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends in Microbiology*, 20, 66–73. DOI: 10.1016/j.tim.2011.11.005.
- Bode, D. C., Freeley, M., Nield, J., Palma, M., Viles, J. H. (2019). Amyloid-β oligomers have a profound detergent-like effect on lipid membrane bilayers, imaged by atomic force and electron microscopy, 294, 7566-7572. DOI: 10.1074/jbc.AC118.007195
- Brothers, H. M., Gosztyla, M. L., Robinson, S. R. (2018). The physiological roles of amyloid-β peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 35, 1–16. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00118.
- Bucciantini, M., Nosi, D., Forzan, M., Russo, E., Calamai, M., Pieri, L., Formigli, L., Quercioli, F., Soria, S., Pavone, F., Savistchenko, J., Melki, R., Stefani, M. (2012). Toxic effects of amyloid fibrils on cell membranes: the importance of ganglioside GM1. *The FASEB Journal*, 26, 818–831. DOI: 10.1096/fj.11-189381.
- Budvytyte, R., Valincius, G., Niaura, G., Voiciuk, V., Mickevicius, M., Chapman, H., Goh, H. Z., Shekhar, P., Heinrich, F., Shenoy, S., Lösche, M., Vanderah, D. J. (2013). Structure and properties of tethered bilayer lipid membranes with unsaturated anchor molecules. *Langmuir*, 29, 8645–8656. DOI: 10.1021/la401132c.
- Butterfield, S. M., Lashuel, H. A. (2010). Amyloidogenic protein-membrane interactions: Mechanistic insight from model systems. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49, 5628–5654. DOI: 10.1002/anie.200906670.

- C. Crdenas-Aguayo, M. del, C. Silva-Lucero, M. del, Cortes-Ortiz, M., Jimnez-Ramos, B., Gmez-Virgilio, L., Ramrez-Rodrguez, G., Vera-Arroyo, E., Fiorentino-Prez, R., Garca, U., Luna-Muoz, J., A. Meraz Ros, M. (2014). Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. T. Heinbockel *Neurochemistry*. DOI: 10.5772/57398.
- Campioni, S., Mannini, B., Zampagni, M., Pensalfini, A., Parrini, C., Evangelisti, E., Relini, A., Stefani, M., Dobson, C. M., Cecchi, C., Chiti, F. (2010). A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nature Chemical Biology*, 6, 140–147. DOI: 10.1038/nchembio.283.
- Casares, D., Escribá, P. V., Rosselló, C. A. (2019). Membrane lipid composition: Effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 2167. DOI: 10.3390/ijms20092167.
- Chang, K. A., Kim, H. J., Suh, Y. H. (2012). The role of S100a9 in the pathogenesis of Alzheimer's disease: The therapeutic effects of S100a9 knockdown or knockout. *Neurodegenerative Diseases*, 10, 27–29. DOI: 10.1159/000333781.
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38, 1205–1235. DOI: 10.1038/aps.2017.28.
- Ciechanover, A. (2006). Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology*, 1, 1–12. DOI: 10.1182/asheducation-2006.1.1.
- Ciechanover, A., Kwon, Y. T. (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Experimental & Molecular Medicine*, 47, 147. DOI: 10.1038/emm.2014.117.
- Comsol.com [internetinè svetainè]. Dickinson, E. Electrochemical Impedance Spectroscopy: Experiment, Model, and App. 2017 [žiūrèta 2021-05-28]. Adresas: <https://www.comsol.com/blogs/electrochemical-impedance-spectroscopy-experiment-model-and-app/>.
- Costa, A. P., Xu, X., Burgess, D. J. (2014). Freeze-anneal-thaw cycling of unilamellar liposomes: Effect on encapsulation efficiency. *Pharmaceutical Research*, 31, 97–103. DOI: 10.1007/s11095-013-1135-z.
- Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., DiFiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. A., Scherzinger, E., Wanker, E. E., Mangiarini, L., Bates, G. P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, 90, 537–548. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80513-9.
- De Silva, H. A. R., Jen, A., Wickenden, C., Jen, L. S., Wilkinson, S. L., Patel, A. J. (1997). Cell-specific expression of β -amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Molecular Brain Research*, 47, 147–156. DOI: 10.1016/S0169-328X(97)00045-4.

- Doktorova, M., Heberle, F. A., Eicher, B., Standaert, R. F., Katsaras, J., London, E., Pabst, G., Marquardt, D. (2018). Preparation of asymmetric phospholipid vesicles for use as cell membrane models. *Nature Protocols*, 13, 2086–2101. DOI: 10.1038/s41596-018-0033-6.
- Duce, J. A., Tsatsanis, A., Cater, M. A., James, S. A., Robb, E., Wikhe, K., Leong, S. L., Perez, K., Johanssen, T., Mark, A., Cho, H., Galatis, D., Moir, R. D., Masters, C. L., Mclean, C., Tanzi, R. E., Cappai, R., Barnham, K. J., Ciccotosto, D., Bush, A. I. (2011). An iron-export ferroxidase activity of APP is inhibited by zinc in Alzheimer ' s Disease. *Cell*, 142, 857–867. DOI: 10.1016/j.cell.2010.08.014.
- Falke, S., Betzel, C. (2019). Dynamic Light Scattering (DLS). Pereira, A., S., Tavares P., Limao-Vieira, P. Radiation in Bioanalysis Spectroscopic Techniques and Theoretical Methods. JAV: Springer Nature Switzerland AG. 174–176 p.
- Fantini, J., Carlus, D., Yahi, N. (2011). Biochimica et Biophysica Acta The fusogenic tilted peptide (67–78) of α -synuclein is a cholesterol binding domain. *BBA - Biomembranes*, 1808, 2343–2351. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.06.017.
- Fantini, J., Yahi, N. (2010). Molecular insights into amyloid regulation by membrane cholesterol and sphingolipids : common mechanisms in neurodegenerative diseases. *Expert Rev. Mol. Med.* 12, 1–22. DOI: 10.1017/S1462399410001602.
- Ferreira, D., Perestelo-Pérez, L., Westman, E., Wahlund, L. O., Sarrisa, A., Serrano-Aguilar, P. (2014). Meta-review of CSF core biomarkers in Alzheimer's disease: The state of the art after the new revised diagnostic criteria. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 47. DOI: 10.3389/fnagi.2014.00047.
- Ferreira, S. T., Clarke, J. R., Bomfim, T. R., De Felice, F. G. (2014). Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 10, 76–83. DOI: 10.1016/j.jalz.2013.12.010.
- Gandhi, J., Antonelli, A. C., Afridi, A., Vatsia, S., Joshi, G., Romanov, V., Murray, I. V. J., Khan, S. A. (2018). Protein misfolding and aggregation in neurodegenerative diseases : a review of pathogenesis, novel detection strategies, and potential therapeutics. *Reviews in the Neurosciences*, 30, 339-358. DOI: 10.1515/revneuro-2016-0035.
- Ghosh, R., & Pattison, J. S. (2018). Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy in Heart Failure: The Known and the Unknown. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. DOI: 10.1155/2018/8602041.
- Grobelny, J., DelRio, F. W., Pradeep, N., Kim, D., Hackley, V. A., Cook, R. F. (2011). Size Measurement of Nanoparticles Using Atomic Force Microscopy. McNeil, S., E. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. JAV: Humana Press. 71–82 p.
- Gruden, M. A., Davidova, T. B., Mališauskas, M., Sewell, R. D. E., Voskresenskaya, N. I., Wilhelm, K., Elistratova, E. I., Sherstnev, V. V., Morozova-Roche, L. A. (2007). Differential neuroimmune markers to the onset of Alzheimer's disease neurodegeneration and dementia: Autoantibodies to A β (25-35) oligomers, S100b and neurotransmitters. *Journal of Neuroimmunology*, 186, 181–192. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2007.03.023.

- Guerreiro, R. J., Gustafson, D. R., Hardy, J. (2012). The genetic architecture of Alzheimer's disease: Beyond APP, PSEN2 and APOE. *Neurobiology of Aging*, 33, 437–456. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.025.
- Gupta, S., Banerjee, P., Laferla, F. M., Selkoe, D. J. (2010). *Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy*. 81, 741–766. DOI: 10.1152/physrev.2001.81.2.741.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14, 388–405. DOI: 10.1016/S1474-4422(15)70016-5.
- Hern, V. A. (2011). Intrinsic Heterogeneity in Liposome Suspensions Caused by the Dynamic Spontaneous Formation of Hydrophobic Active Sites in Lipid Membranes. *Langmuir*, 27, 4873–4883. DOI: 10.1021/la1049919.
- Hoozemans, J. J. M., Veerhuis, R., Rozemuller, J. M., Eikelenboom, P. (2006). Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 24, 157–165. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2005.11.001.
- Horvath, I., Iashchishyn, I. A., Moskalenko, R. A., Wang, C., Wärmländer, S. K. T. S., Wallin, C., Gräslund, A., Kovacs, G. G., Morozova-Roche, L. A. (2018). Co-aggregation of pro-inflammatory S100A9 with α -synuclein in Parkinson's disease: Ex vivo and in vitro studies. *Journal of Neuroinflammation*, 15, 1–16. DOI: 10.1186/s12974-018-1210-9.
- Horwich, A. L. (2014). Molecular chaperones in cellular protein folding: The birth of a field. *Cell*, 157, 285–288. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.029.
- Hupfeld, S., Holsaeter, A. M., Skar, M., Frantzen, C. B., Brandl, M. (2006). Liposome size analysis by dynamic/static light scattering upon size exclusion-/field flow-fractionation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 3025–3031. DOI: 10.1166/jnn.2006.454.
- Iashchishyn, I. A., Gruden, M. A., Moskalenko, R. A., Davydova, T. V., Wang, C., Sewell, R. D. E., Morozova-Roche, L. A. (2018). Intranasally Administered S100A9 Amyloids Induced Cellular Stress, Amyloid Seeding, and Behavioral Impairment in Aged Mice. *ACS Chemical Neuroscience*, 9, 1338–1348. DOI: 10.1021/acscemneuro.7b00512.
- Iwatsubo, T. (2004). The γ -secretase complex: Machinery for intramembrane proteolysis. *Current Opinion in Neurobiology*, 14, 379–383. DOI: 10.1016/j.conb.2004.05.010.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., Ihara, Y. (1994). Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron*, 13, 45–53. DOI: 10.1016/0896-6273(94)90458-8.
- Jackman, J. A., Knoll, W., Cho, N. J. (2012). Biotechnology applications of tethered lipid bilayer membranes. *Materials*, 5, 2637–2657. DOI: 10.3390/ma5122637.

- Kadziauskas, J. (2012). Biochemijos pagrindai. 2-asis leidimas. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla. 48, 245 p.
- Kakkar, V., Månsson, C., de Mattos, E. P., Bergink, S., van der Zwaag, M., van Waarde, M. A. W. H., Kloosterhuis, N. J., Melki, R., van Cruchten, R. T. P., Al-Karadaghi, S., Arosio, P., Dobson, C. M., Knowles, T. P. J., Bates, G. P., van Deursen, J. M., Linse, S., van de Sluis, B., Emanuelsson, C., Kampinga, H. H. (2016). The S/T-Rich Motif in the DNAJB6 Chaperone Delays Polyglutamine Aggregation and the Onset of Disease in a Mouse Model. *Molecular Cell*, 62, 272–283. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.03.017.
- Kampouris, D. K., Ji, X., Randviir, E. P., Banks, C. E. (2015). A new approach for the improved interpretation of capacitance measurements for materials utilised in energy storage. *RSC Advances*, 5, 12782–12791. DOI: 10.1039/c4ra17132b.
- Kandel, N., Matos, J. O., Tatulian, S. A. (2018). Effect of Cholesterol on Membrane Pore Formation by Amyloid β 25-35. *Biophysical Journal*, 114, 616. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.11.3769.
- Katte, R., Yu, C. (2018). Blocking the interaction between S100A9 protein and RAGE V domain using S100A12 protein. *PLoS ONE*, 13, 1–10. DOI: 10.1371/journal.pone.0198767.
- Kim, M., Lee, H. S., LaForet, G., McIntyre, C., Martin, E. J., Chang, P., Kim, T. W., Williams, M., Reddy, P. H., Tagle, D., Boyce, F. M., Won, L., Heller, A., Aronin, N., DiFiglia, M. (1999). Mutant Huntingtin expression in clonal striatal cells: Dissociation of inclusion formation and neuronal survival by caspase inhibition. *Journal of Neuroscience*, 19, 964–973. DOI: 10.1523/jneurosci.19-03-00964.
- Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M., Dobson, C. M. (2014). The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 384–396. DOI: 10.1038/nrm3810.
- Koga, H., Kaushik, S., Cuervo, A. M. (2011). Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Research Reviews*, 10, 205–215. DOI: 10.1016/j.arr.2010.02.001.
- Kotler, S. A., Walsh, P., Brender, J. R., Ramamoorthy, A. (2014). Differences between amyloid- β aggregation in solution and on the membrane: Insights into elucidation of the mechanistic details of Alzheimer's disease. *Chemical Society Reviews*, 43, 6692–6700. DOI: 10.1039/c3cs60431d.
- Kozlyuk, N., Monteith, A. J., Garcia, V., Damo, S. M., Skaar, E. P., Chazin, W. J. (2019). S100 Proteins in the Innate Immune Response to Pathogens. *Methods Mol Biol*, 1929, 275–290. DOI: 10.1007/978-1-4939-9030-6_18.
- Krause, M., Neubauer, A., Neubauer, P. (2016). The fed - batch principle for the molecular biology lab: controlled nutrient diets in ready - made media improve production of recombinant proteins in Escherichia coli. *Microbial Cell Factories*, 15, 110. DOI: 10.1186/s12934-016-0513-8.

- Laan, E. V. D. B. Der, Killian, J. A., Kruijff, B. De. (2004). Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1666, 275–288. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.06.010.
- Liu, C., Faller, R. (2012). Conformational, dynamical, and tensional study of tethered bilayer lipid membranes in coarse-grained molecular simulations. *Langmuir*, 28, 15907–15915. DOI: 10.1021/la303511p.
- Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Kheirilomoom, A., Geny, D., Linder, M. (2013). Calcein release behavior from liposomal bilayer; Influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. *Biochimie*, 95, 2018–2033. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.07.006.
- Mahmoudi, M. S., Bahrami, A. (2020). A novel excitation scheme to enhance image resolution in dynamic atomic force microscopy. *Physics Letters, Section A: General, Atomic and Solid State Physics*, 384, 126099. DOI: 10.1016/j.physleta.2019.126099.
- Marenholz, I., Heizmann, C. W., Fritz, G. (2004). S100 proteins in mouse and man: From evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322, 1111–1122. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.07.096.
- Markowitz, J., Carson, W. E. (2013). Review of S100A9 biology and its role in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1835, 100–109. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.10.003.
- Marquardt, D., Geier, B., Pabst, G. (2015). Asymmetric lipid membranes: Towards more realistic model systems. *Membranes*, 5, 180–196. DOI: 10.3390/membranes5020180.
- Masters, C. L., Selkoe, D. J. (2012). Biochemistry of amyloid β -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, 6262. DOI: 10.1101/cshperspect.a006262.
- McGillivray, D. J., Valincius, G., Heinrich, F., Robertson, J. W. F., Vanderah, D. J., Febo-Ayala, W., Ignatjev, I., Lösche, M., Kasianowicz, J. J. (2009). Structure of functional *Staphylococcus aureus* α -hemolysin channels in tethered bilayer lipid membranes. *Biophysical Journal*, 96, 1547–1553. DOI: 10.1016/j.bpj.2008.11.020.
- Middleton, E. R., Rhoades, E. (2010). Effects of curvature and composition on α -synuclein binding to lipid vesicles. *Biophysical Journal*, 99, 2279–2288. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.07.056.
- Moir, R. D., Lathe, R., Tanzi, R. E. (2018). The antimicrobial protection hypothesis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 14, 1602–1614. DOI: 10.1016/j.jalz.2018.06.3040.
- Morales, R., Moreno-Gonzalez, I., Soto, C. (2013). Cross-Seeding of Misfolded Proteins: Implications for Etiology and Pathogenesis of Protein Misfolding Diseases. *PLoS Pathogens*, 9, e1003537. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003537.

- Mori, T., Koyama, N., Arendash, G. W., Horikoshi-Sakuraba, Y., Tan, J., Town, T. (2010). Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Glia*, 58, 300–314. DOI: 10.1002/glia.20924.
- Niu, Z., Zhang, Z., Zhao, W., Yang, J. (2018). Interactions between amyloid β peptide and lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1860, 1663–1669. DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.04.004.
- Nunan, J., Small, D. H. (2000). Regulation of APP cleavage by a-, b- and g-secretases. *FEBS Lett*, 483, 6–10. DOI: 10.1016/s0014-5793(00)02076-7.
- Ordu, O., Lusser, A., Dekker, N. H. (2016). Recent insights from in vitro single-molecule studies into nucleosome structure and dynamics. *Biophysical Reviews*, 8, 33–49. DOI: 10.1007/s12551-016-0212-z.
- Pansieri, J., Iashchishyn, I. A., Fakhouri, H., Ostojić, L., Malisauskas, M., Musteikyte, G., Smirnovas, V., Matthias, M. (2020). Templating S100A9 amyloids on A β fibrillar surfaces revealed by charge detection mass spectrometry, microscopy, kinetic and microfluidic analyses. *Chemical Science*, 11, 7031–7039, DOI: 10.1039/C9SC05905A.
- Pansieri, J., Ostoji, L., Iashchishyn, I. A., Magzoub, M., Wärmländer, S. K. T. S., Gräslund, A., Ngoc, M. N., Smirnovas, V., Svedruzic, Z., Morozova-roche, L. A. (2019). Pro-inflammatory S100A9 protein aggregation promoted by NCAM1 peptide constructs. *ACS Chemical Biology*, 14, 1410–1417, DOI: 10.1021/acscchembio.9b00394.
- Pasenkiewicz-gierula, M. (2005). Phosphatidylethanolamine-Phosphatidylglycerol Bilayer as a Model of the Inner Bacterial Membrane. *Biophysical Journal*, 88, 1091-1103. DOI: 10.1529/biophysj.104.048835.
- Pedersen, J. S., Christensen, G., Otzen, D. E. (2004). Modulation of S6 fibrillation by unfolding rates and gatekeeper residues. *Journal of Molecular Biology*, 341, 575–588. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.06.020.
- Penkauskas, T., Preta, G. (2019). Biological applications of tethered bilayer lipid membranes. *Biochimie*, 157, 131–141. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.11.011.
- Picone, P., Nuzzo, D., Giacomazza, D., Di Carlo, M. (2020). β -Amyloid Peptide: the Cell Compartment Multi-faceted Interaction in Alzheimer's Disease. *Neurotoxicity Research*, 37, 250–263. DOI: 10.1007/s12640-019-00116-9.
- Plaut, J. S., Strzelecka-Kiliszek, A., Bozycki, L., Pikula, S., Buchet, R., Mebarek, S., Chadli, M., Bolean, M., Simao, A. M. S., Ciancaglini, P., Magrini, A., Rosato, N., Magne, D., Girard-Egrot, A., Farquharson, C., Esener, S. C., Millan, J. L., Bottini, M. (2019). Quantitative atomic force microscopy provides new insight into matrix vesicle mineralization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 667, 14–21. DOI: 10.1016/j.abb.2019.04.003.
- Pope, B., Kent, H. M. (1996). High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli. *Nucleic Acids Research*, 24, 536–537. DOI: 10.1093/nar/24.3.536.

- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H. A., Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26, 7212–7221. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1450-06.2006.
- Qiu, T., Liu, Q., Chen, Y. X., Zhao, Y. F., Li, Y. M. (2015). A β 42 and A β 40: similarities and differences. *Journal of Peptide Science*, 21, 522–529. DOI: 10.1002/psc.2789.
- Quist, A., Doudevski, I., Lin, H., Azimova, R., Ng, D., Frangione, B., Kagan, B., Ghiso, J., Lal, R. (2005). Amyloid ion channels: A common structural link for protein-misfolding disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 10427–10432. DOI: 10.1073/pnas.0502066102.
- Rebaud, S., Maniti, O., Girard-Egrot, A. P. (2014). Tethered bilayer lipid membranes (tBLMs): Interest and applications for biological membrane investigations. *Biochimie*, 107, 135–142. DOI: 10.1016/j.biochi.2014.06.021.
- Riva, M., He, Z., Källberg, E., Ivars, F., & Leanderson, T. (2013). Human S100A9 Protein Is Stabilized by Inflammatory Stimuli via the Formation of Proteolytically-Resistant Homodimers. *PLoS ONE*, 8, e61832. DOI: 10.1371/journal.pone.0061832.
- Rourk, C. J. (2019). Conductive atomic force microscopy data from substantia nigra tissue. *Data in Brief*, 27, e103986. DOI: 10.1016/j.dib.2019.103986.
- Routledge, S. J., Linney, J. A., Goddard, A. D. (2019). Liposomes as models for membrane integrity. *Biochemical Society Transactions*, 47, 919–932. DOI: 10.1042/BST20190123.
- Sasahara, K., Morigaki, K., Okazaki, T., Hamada, D. (2012). Binding of islet amyloid polypeptide to supported lipid bilayers and amyloid aggregation at the membranes. *Biochemistry*, 51, 6908–6919. DOI: 10.1021/bi300542g.
- Sciacca, M. F. M., Brender, J. R., Lee, D. K., Ramamoorthy, A. (2012). Phosphatidylethanolamine enhances amyloid fiber-dependent membrane fragmentation. *Biochemistry*, 51, 7676–7684. DOI: 10.1021/bi3009888.
- Serio, T. R., Cashikar, A. G., Kowal, A. S., Sawicki, G. J., Moslehi, J. J., Serpell, L., Arnsdorf, M. F., Lindquist, S. L. (2000). Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science*, 289, 1317–1321. DOI: 10.1126/science.289.5483.1317.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., D'Ari, R. (2007). Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189, 8746–8749. DOI: 10.1128/JB.01368-07.
- Sharma, N., Singh, A. N. (2016). Exploring biomarkers for Alzheimer's disease. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10, KE01–KE06. DOI: 10.7860/JCDR/2016/18828.8166.
- Shepherd, C. E., Goyette, J., Utter, V., Rahimi, F., Yang, Z., Geczy, C. L., Halliday, G. M. (2006). Inflammatory S100A9 and S100A12 proteins in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 27, 1554–1563. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.033.

- Shiloach, J., Fass, R. (2005). Growing E. coli to high cell density – A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, 23, 345–357. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.04.004.
- Simakova, O., Arispe, N. J. (2007). The Cell-Selective Neurotoxicity of the Alzheimer's Abeta Peptide Is Determined by Surface Phosphatidylserine and Cytosolic ATP Levels . Membrane Binding Is Required for Abeta Toxicity. *Journal of Neuroscience*, 27, 13719–13729. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3006-07.2007.
- Socher, E., Sticht, H., Horn, A. H. C. (2014). The conformational stability of nonfibrillar amyloid- β peptide oligomers critically depends on the C-terminal peptide length. *ACS Chemical Neuroscience*, 5, 161–167. DOI: 10.1021/cn400208r.
- Soler, M., Estevez, M. C., Villar-Vazquez, R., Casal, J. I., Lechuga, L. M. (2016). Label-free nanoplasmonic sensing of tumor-associated autoantibodies for early diagnosis of colorectal cancer. *Analytica Chimica Acta*, 930, 31–38. DOI: 10.1016/j.aca.2016.04.059.
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8, 409–427. DOI: 10.1007/s12551-016-0218-6.
- Stroo, E., Koopman, M., Nollen, E. A. A., Mata-Cabana, A. (2017). Cellular regulation of amyloid formation in aging and disease. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 64. DOI: 10.3389/fnins.2017.00064.
- Sweeney, P., Park, H., Baumann, M., Dunlop, J., Frydman, J., Kopito, R., McCampbell, A., Leblanc, G., Venkateswaran, A., Nurmi, A., Hodgson, R. (2017). Protein misfolding in neurodegenerative diseases: Implications and strategies. *Translational Neurodegeneration*, 6, 6. DOI: 10.1186/s40035-017-0077-5.
- Swindell, W. R., Johnston, A., Xing, X., Little, A., Robichaud, P., Voorhees, J. J., Fisher, G., Gudjonsson, J. E. (2013). Robust shifts in S100a9 expression with aging: A novel mechanism for chronic inflammation. *Scientific Reports*, 3, 1215. DOI: 10.1038/srep01215.
- Tartaglia, G. G., Pawar, A. P., Campioni, S., Dobson, C. M., Chiti, F., Vendruscolo, M. (2008). Prediction of Aggregation-Prone Regions in Structured Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 380, 425–436. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.05.013.
- Teplow, D. B. (1998). Structural and kinetic features of amyloid β -protein fibrillogenesis. *Amyloid*, 5, 121–142. DOI: 10.3109/13506129808995290.
- Tharp, W. G., Sarkar, I. N. (2013). Origins of amyloid- β . *BMC Genomics*, 14, 290. DOI: 10.1186/1471-2164-14-290.
- Valincius, G., Mickevicius, M. (2015). Tethered phospholipid bilayer membranes: an interpretation of the electrochemical impedance response. Iglič, A., Kulkarni, C. V., Rappolt, M. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Academic Press, 29–32 p.
- Vinicius, M., De Mello, C., Vieira, L., Cruz de Souza, L., Gomes, K., Carvalho, M. (2019). Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *Journal of Biomedical Science*, 26, 33. DOI: 10.1186/s12929-019-0524-y.

- Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Selkoe, D. J., Teplow, D. B. (1999). Amyloid β -protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 25945–25952. DOI: 10.1074/jbc.274.36.25945.
- Wang, C., Iashchishyn, I. A., Pansieri, J., Nyström, S., Klementieva, O., Kara, J., Horvath, I., Moskalenko, R., Rofougaran, R., Gouras, G., Kovacs, G. G., Shankar, S. K., Morozova-Roche, L. A. (2018). S100A9-Driven Amyloid-Neuroinflammatory Cascade in Traumatic Brain Injury as a Precursor State for Alzheimer’s Disease. *Scientific Reports*, 8, 1–16. DOI: 10.1038/s41598-018-31141-x.
- Wang, C., Klechikov, A. G., Gharibyan, A. L., Wärmländer, S. K. T. S., Jarvet, J., Zhao, L., Jia, X., Shankar, S. K., Olofsson, A., Brännström, T., Mu, Y., Gräslund, A., Morozova-Roche, L. A. (2014). The role of pro-inflammatory S100A9 in Alzheimer’s disease amyloid-neuroinflammatory cascade. *Acta Neuropathologica*, 127, 507–522. DOI: 10.1007/s00401-013-1208-4.
- Watson, H. (2015). Biological membranes. *Essays in Biochemistry*, 59, 43–70. DOI: 10.1042/BSE0590043.
- Wong, P. T., Schauerte, J. A., Wisser, K. C., Ding, H., Lee, E. L., Steel, D. G., Gafni, A. (2009). Amyloid- β Membrane Binding and Permeabilization are Distinct Processes Influenced Separately by Membrane Charge and Fluidity. *Journal of Molecular Biology*, 386, 81–96. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.11.060.
- Yoon, S. S., Jo, S. A. (2012). Mechanisms of amyloid- β peptide clearance: Potential therapeutic targets for Alzheimer’s disease. *Biomolecules and Therapeutics*, 20, 245–255. DOI: 10.4062/biomolther.2012.20.3.245.
- Zakharian, E. (2013). Recording of ion channel activity in planar lipid bilayer experiments. *Methods in Molecular Biology*, 998, 109–118. DOI: 10.1007/978-1-62703-351-0_8.
- Zeineddine, R., Yerbury, J. J. (2015). The role of macropinocytosis in the propagation of protein aggregation associated with neurodegenerative diseases. *Frontiers in Physiology*, 6, 277. DOI: 10.3389/fphys.2015.00277.
- Zhang, M., Zhao, J., Zheng, J. (2014). Molecular understanding of a potential functional link between antimicrobial and amyloid peptides. *Soft Matter*, 10, 7425–7451. DOI: 10.1039/c4sm00907j.
- Zhao, L. N., Chiu, S. W., Benoit, J., Chew, L. Y., Mu, Y. (2011). Amyloid β peptides aggregation in a mixed membrane bilayer: A molecular dynamics study. *Journal of Physical Chemistry B*, 115, 12247–12256. DOI: 10.1021/jp2065985.
- Zhao, W., Song, W., Cheong, L. Z., Wang, D., Li, H., Besenbacher, F., Huang, F., Shen, C. (2019). Beyond imaging: Applications of atomic force microscopy for the study of Lithium ion batteries. *Ultramicroscopy*, 204, 34–48. DOI: 10.1016/j.ultramic.2019.05.004.

Padėka

Esu labai dėkinga darbo vadovei dr. Rimai Budvytytei už palaikymą, nuolatinį skatinimą, konsultacijas ir begalę profesionalių įžvalgų rašant baigiamąjį magistro darbą. Taip pat noriu padėkoti Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriaus vadovui dr. Gintarui Valinčiui ir visam kolektyvui už malonią darbo aplinką, pagalbą, patarimus ir įgytas žinias.

Ačiū Biotechnologijos instituto Amiloidų tyrimų grupės vadovui dr. Vytautui Smirnovui ir visai grupei už suteiktą galimybę dalį darbų atlikti jų laboratorijoje. Dėkoju dr. Zigmantui Toleikiui už pagalbą gryninant S100A9 baltymą bei Andriui Sakalauskui, kuris pasidalino išgrynintu $A\beta_{1-42}$ peptidu.

Reiškiu padėką Lietuvos mokslo tarybai už finansavimą ir galimybę dalyvauti Europos Sąjungos remiamuose projektuose: „Studentų gebėjimų ugdymas vykdant mokslo tyrimus semestrų metu (studentų tyrimai)“, projekto Nr. 09.3.3-LMT-K-712-22-219 ir „Tiksliniai moksliniai tyrimai sumanios specializacijos srityje“, projekto Nr. 01.2.2-LMT-K-718-03-0003.

Taip pat dėkoju tarptautinių konferencijų „Coins 2020“, „Open Readings 2021“, „EJTEMM 2021“ organizatoriams už suteiktą galimybę pristatyti šiame darbe gautus rezultatus.