

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Biochemijos studijų programos magistrantė

Akvilė Milašiutė

Magistrinis darbas

*Hsp70 sąveikos su lipidų membranų modelinėmis sistemomis tyrimas*

**Darbo vadovė:**

Dr. Rima Budvytytė

**Vilnius 2021**

***Hsp70 sąveikos su lipidų membranų modelinėmis sistemomis tyrimas***

Darbas atliktas Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje

Akvilė Milašiūtė

/parašas/

Darbo vadovė:

Leisti / neleisti gintis:

Dr. Rima Budvytytė

/parašas/

*Įrašo data*

# TURINYS

<b>SANTRUMPOS</b>	<b>5</b>
<b>ĮVADAS</b>	<b>6</b>
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA</b>	<b>8</b>
1.1. Šilumos šoko baltymų šeima	8
1.2. Hsp70 superšeima	9
1.2.1. Hsp70 baltymo struktūra	10
1.2.3. Oligomerizacija	11
1.2.4. Hsp70 sąveika su membrana	13
1.2.5. Hsp70 eksportas	15
1.2.6. Hsp70 funkcijos	15
1.3. Ligos	17
1.3.1. Vėžys	17
1.3.2. Ūminis pankreatitas	18
1.4. Biologinės membranos	19
1.5. Membranų modeliai	22
1.5.1. Liposomos	22
1.5.2. Modelinės sistemos ant kieto paviršiaus	24
<b>2. MEDŽIAGOS IR METODAI</b>	<b>27</b>
2.1. Medžiagos, prietaisai ir tirpalai	27
2.1.1. Medžiagos	27
2.1.2. Prietaisai ir priemonės	28
2.1.3. Tirpalai	28
2.2. Metodai	29
2.2.1. Stiklo plokštelės padengimas auksu	29
2.2.2. Daugiasluosknių liposomų paruošimas	29
2.2.3. Prie paviršiaus prikabintų membranų formavimas	29
2.2.4. Fluorescencinė mikroskopija	30
2.2.4.1. Fluorescencinės mikroskopijos teorija	30
2.2.5. Elektrocheminio impedanso spektroskopija	32
2.2.5.1. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodo teorija	32
2.2.6. Dinaminė šviesos sklaida	37
2.2.6.1. Dinaminės šviesos sklaidos metodo teorija	37
2.2.7. Kalceinu užkrautų liposomų gamyba ir lizavimas	39
<b>3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS</b>	<b>42</b>
3.1. Rezultatų įvadas	42
3.2. Prie paviršiaus prikabintos fosfolipidinės membranos charakterizavimas	42
3.2.1. Prie paviršiaus prikabintos membranos formavimosi tyrimas elektrocheminio impedanso metodu	42
3.2.2. Prie paviršiaus prikabintų membranų morfologijos tyrimas	44

3.3. Hsp70 ir prie paviršiaus prikabintų lipidinių membranų sąveikos tyrimas nuo laiko ir skirtingų baltymo koncentracijų	46
3.4 Hsp70 sąveika su vienasluoksnėmis liposomomis	49
3.4.1. Liposomų charakterizavimas dinaminės šviesos sklaidos metodu	49
3.4.2. Kalceinu užkrautų liposomų sąveika su Hsp70	50
3.5. Tolimesni planai	53
<b>IŠVADOS</b>	<b>54</b>
<b>SANTRAUKA</b>	<b>55</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>56</b>
<b>LITERATŪRA</b>	<b>57</b>
<b>PADĖKA</b>	<b>66</b>
<b>MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS</b>	<b>67</b>

## SANTRUMPOS

Hsp – šilumos šoko baltymas;  
Hsp70 – 70 kDa dydžio šilumos šoko baltymas;  
tBLM – prie paviršiaus prikabinta lipidinė membrana;  
EIS – elektrocheminio impedanso spektroskopija;  
HSF – šilumos šoko faktorius;  
HSF1 – šilumos šoko faktorius 1;  
PS – fosfatidilserinas;  
IL – interliukinas;  
NK – natūralios ląstelės žudikės;  
NF- $\kappa$ B – branduolio faktorius- $\kappa$ B;  
NTF – naviko nekrozės faktorius;  
SUV – mažos vienasluoksnės liposomos;  
LUV – didelės vienasluoksnės liposomos;  
GUV – labai didelės vienasluoksnės liposomos;  
SAM – savitvarkis monosluoksnis;  
 $\beta$ ME –  $\beta$ -merkaptioetanolis;  
DOPC – 1,2-dioleoil-sn-glicerolio-3-fosfocholinai;  
Chol – cholesterolis;  
DOPE – 1,2-dioleoil-sn-glicerolio-3-fosfoetanolaminai;  
DOPS – 1,2-dioleoil-sn-glicerolio-3-fosfo-L-serinai;  
DPPC – 1,2-dipalmitoil-sn-glicerolio-3-fosfocholinai;  
LRPE – 1,2-dipalmitoil-sn-glicerolio-3-fosfoetanolaminai su fluorescuojančia žyme lizamino rodamino B;  
WC14 – 20-tetradeksiloksio-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontano-1-tiolis;  
PBS – natrio fosfato buferinis tirpalas;  
f – dažnis (Hz);  
I – srovės stipris;  
Y – laidumas;  
U – įtampa;  
Z – impedansas;  
 $\phi$  – fazės poslinkio kampas;  
 $C'$  ( $C_{re}$ ) – reali talpos komponentė;  
 $C''$  ( $C_{im}$ ) – menama talpos komponentė;  
 $Z'$  – reali impedanso komponentė;  
 $Z''$  – menama impedanso komponentė;  
 $\Delta Y$  – laidumo pokytis;  
DLS – dinaminė šviesos skvarba;  
s. f. v – santykiniai fluorescencijos vienetai.

## ĮVADAS

70 kDa šilumos šoko baltymas (Hsp70) yra pagrindinis streso ir įvairių ligų metu indukuojamas šilumos šoko baltymas. Šis baltymas palaiko ląstelės homeostazę – dalyvauja naujai susintetintų, agreguotų, bei neteisingą konformaciją turinčių baltymų lankstyme ir transportavime. Hsp70 dažniausiai randamas ląstelės viduje: endoplazminiame tinkle, citozolyje, mitochondrijose (De Maio, 1999). Tačiau, taip pat Hsp70 yra randamas prisijungęs prie plazminės membranos ir užląstelinėje erdvėje, kur atlieka ne molekulinio šaperono, o signalo perdavimo funkciją (De Maio, 2011). Hsp70 neturi sekos reikalingos transportavimui klasikiniu endoplazminio tinklo – Goldžio komplekso keliu (Hunter-Lavin et al., 2004). Manoma, kad baltymas yra pernešamas alternatyviu keliu, kurio mechanizmas nėra žinomas. Spėjama, kad šio mechanizmo pirmasis žingsnis gali būti Hsp70 prisijungimas prie membranos.

Ląstelės membrana yra sudėtinga sistema sudaryta iš daugybės komponentų, kurie sąveikauja ne tik tarpusavyje, bet ir su juos supančia aplinka. Tokias sistemas yra sudėtinga tirti, todėl yra kuriami jas imituojantys modeliai. Naudojant modelines sistemas galima keisti jų sudėtį ir tirti tik dominančius membranos komponentus. Įvairiems tyrimams naudojamos įvairios modelinės sistemos, tokios kaip prie paviršiaus prikabintos lipidinės membranos (tBLM) ar liposomos.

Hsp70 sąveikos su membranomis tyrimuose gali būti naudojamas elektrocheminio impedanso metodas, registruojant elektrinius tBLM parametrus prieš ir po sąveikos su Hsp70. Taip pat fluorescencijos metodais galime stebėti kalceino išlaisvinimą iš liposomų, nes Hsp70 baltymas prisijungdamas prie membranos suformuoja jonams laidžius kanalus (Arispe et al., 2004; Vega et al., 2008).

**Šio darbo tikslas:** suformuoti įvairios sudėties prie paviršiaus prikabintas lipidines membranas (tBLM), fluorescencinės mikroskopijos metodu įvertinti jų morfologiją ir ištirti Hsp70 sąveiką su jomis, be to ištirti šio baltymo sąveiką su vienasluoksnėmis liposomomis, kurios yra užkrautos kalceinu.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Suformuoti įvairios lipidinės sudėties prie paviršiaus prikabintas lipidines membranas ir ištirti jų morfologiją.

2. Panaudoti elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodą tBLM ir Hsp70 sąveikos tyrimuose.
3. Nustatyti kalceinu užkrautų vienasluoksnių liposomų dydį prieš ir po dydžio išskyrimo chromatografijos.
4. Tirti Hsp70 sąveiką su skirtingos kompozicijos vienasluoksniomis liposomomis.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Šilumos šoko baltymų šeima

1962 m. mokslininkas Ferruccio Ritossa atrado, kad aukšta temperatūra indukuoja specifinį genų rinkinį *Drosophila melanogaster* lervų seilių liaukų audiniuose (Ritossa, 1962). Vėliau šių genų produktai pavadinti šilumos šoko baltymais (Hsp, angl. heat shock proteins) (Tissières et al., 1974). Hsp baltymų molekulinė masė yra nuo 10 kDa iki 110 kDa ir pagal tai jie yra skirstomi į 7 šeimas: Hsp10, Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 ir Hsp110 (De Maio, 1999). Šie baltymai randami nuo archejų iki žmogaus ir pasižymi konservatyvumu (Gupta ir Singh, 1994). Žmogaus Hsp70 genas yra 50% homologiškas *E. coli* (Craig ir Gross, 1991) ir 85% *Drosophila* genams (Feder ir Hofmann, 1999).

Hsp šeimos baltymai ląstelėje atlieka įvairias funkcijas (1.1 lentelė). Dažniausiai jie veikia kaip molekuliniai šaperonai – lanksto baltymus ir juos transportuoja. Kai ląstelė patiria stresą, jų koncentracija padidėja. Stresą gali sukelti įvairūs veiksniai: šiluma, virusinės infekcijos, citokinai, oksidacinis stresas, jonizuojanti ir ultravioletinė spinduliuotė, gliukozės trūkumas ir t.t. (Ashburner, 1970). Hsp baltymai yra svarbūs ląstelei atsistatant po jau patirto streso ir apsisaugant nuo tolimesnio galimo streso poveikio (De Maio, 1999). Konstutyviai ekspresuojami Hsp baltymai sudaro 5-10% visų ląstelėje esančių baltymų, o sąlygoms pasikeitus į stresines, šių baltymų koncentracija gali padidėti iki 15% (Welch, 1993).

1.1 lentelė. Šilumos šoko baltymų klasifikacija ir funkcijos (sudaryta remiantis (Feng ir Li, 2010)).

<b>HSP šeima</b>	<b>Vidutinė molekulinė masė (kDa)</b>	<b>Vieta ląstelėje</b>	<b>Funkcija</b>
Hsp10	10	Citozolyje, branduolyje, mitochondrijose	Trukdo kaspazių aktyvacija; oksidacinio streso toleravimas; Hsp60 kofaktorius
Hsp27	20 - 30		
Hsp40	40 - 47	Branduolyje, endoplazminiame tinkle	Baltymų lankstymas; Hsp70 kofaktorius
Hsp60	60	Mitochondrijose	Baltymų lankstymas, kai jie patenka į mitochondrijas
Hsp70	66 - 78	Citozolyje, branduolyje, mitochondrijose, endoplazminiame tinkle	Baltymų lankstymas ir jų transportavimas; šilumos streso toleravimas; ląstelių apsauga
Hsp90	83 - 100	Citoplazmoje	Vienas iš dažniausiai randamų baltymų citoplazmoje; palaiko steroidų receptorių aktyvijoje būsenoje
Hsp110	100 - 110	Citozolyje, branduolyje	Baltymų lankstymas; šilumos streso toleravimas

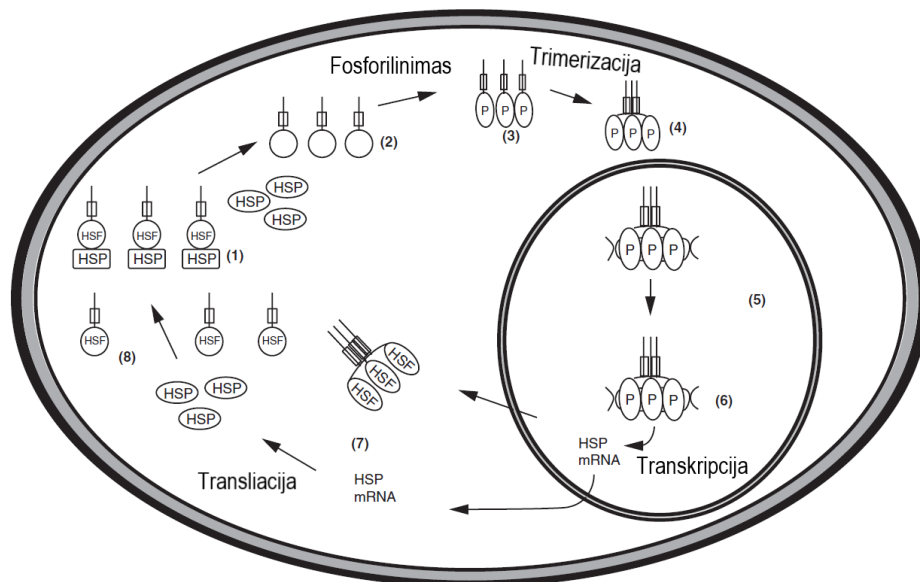


## 1.2. Hsp70 superšeima

Hsp70 superšeima viena iš konservatyviausių ir geriausiai ištytintų Hsp šeimų. Šios šeimos baltymai yra nuo ATP priklausomi šaperonai, kurių dydis yra nuo 66 iki 78 kDa (Giri et al., 2017). Pagrindiniai Hsp70 superšeimos nariai yra 72 kDa, 73 kDa, 75 kDa ir 78 kDa baltymai. 75 kDa ir 78 kDa baltymai, dar vadinami GRP75 ir GRP78, yra indukuojami ne šilumos šoko, o gliukozės trūkumo, kalcio koncentracijos padidėjimo (angl. calcium influx) ar agentų, kurie trikdo glikolizimą (Locke ir Noble, 1995). GRP75 yra randamas mitochondrijoje, o GRP78 endoplazminiame tinkle. 73 kDa baltymas (Hsc73) sintetinamas daugelyje ląstelių ir ekspresuojamas visą laiką. Kai sąlygos pasikeičia į stresines, Hsc70 koncentracija nepakinta, o tik pernešamas iš citozolio į branduolį (Welch ir Feramisco, 1984). 72 kDa dydžio baltymai dažniausiai vadinami Hsp70, tačiau pagal naują nomenklatūrą, kurią pateikė žmogaus genomo organizacija (HUGO, angl. Human Genome Organisation), jis vadinamas HSPA1A (Kampinga et al., 2009). Ląstelei patiriant stresą, šių baltymų sintezė indukuojama ir jų koncentracija smarkiai išauga (Donati et al., 1990).

Hsp70 šeimos baltymus koduoja 17 genų ir 30 psiaudogenų (Brocchieri et al., 2008). Baltymo koncentraciją ląstelėje reguliuoja keturi šilumos šoko faktoriai (HSF): HSF1, HSF2, HSF3 ir HSF4. Šilumos šoko faktoriai turi tiek vienodų, tiek ir unikalių funkcijų, bei audiniams specifinę ekspresiją. HSF1 yra pagrindinis transkripcijos reguliatorius, kuris reikalingas HSP genų aktyvacijai ir termotolerancijos užtikrinimui (Akerfelt et al., 2010).

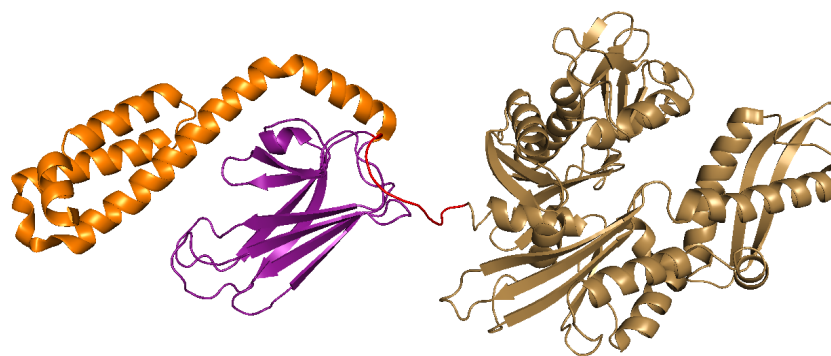
Stresinių sąlygų metu HSF1 jungiasi prie Hsp70 promotorio ir greitina transkripciją (1.1 pav.). Esant įprastoms fiziologinėms sąlygoms, HSF1 yra monomeras prisijungęs prie Hsp70. Kai sąlygos tampa stresinėms, padaugėja neteisingai sulankstytų baltymų. Šie neteisingai sulankstyti baltymai turi didesnę giminingumą Hsp70, nei HSF1, taigi HSF1 tampa laisvas. Tada jis yra fosforilinamas mitogenais aktyvinamų baltymų kinazų (MAPK/ERK) arba streso aktyvuojamų baltymų kinazių (SAPK) ir formuoja trimerus (Kim et al., 1997). HSF1 trimeras pernešamas į branduolį, prisijungia prie Hsp70 geno promotoriaus ir prasideda Hsp70 mRNR transkripcija (Pockley ir Graham, 2003).



1.1 pav. Hsp70 koncentracijos reguliavimas. (1) šilumos šoko transkripcijos faktorius (HSF) susijungęs su Hsp70 yra neaktyvus. (2) ląstelei patyrus stresą padaugėja neteisingai sulankstytų baltymų, kurie jungiasi prie Hsp70, HSF lieka laisvas. (3) HSF yra fosforilinamas ir (4) įvyksta jo trimerizacija. (5) Trimeras pernešamas į branduolį, (6) jungiasi prie DNR ir pradeda Hsp70 mRNR transkripcija. HSP - Hsp70 (Tytell ir Hooper, 2001).

### 1.2.1. Hsp70 baltymo struktūra

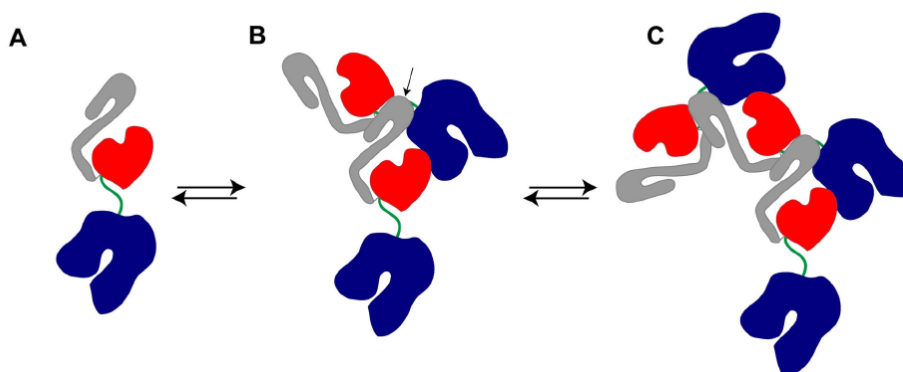
Hsp70 sudarytas iš dviejų domenų (1.2 pav.). Baltymo N galiniame regione yra konservatyvus 44 kDa dydžio adenino nukleotidus rišantis domenas. Šis domenas turi silpną ATPazinį aktyvumą. Baltymo C galiniame regione randamas mažiau konservatyvus 28 kDa substratą rišantis domenas. Substratą rišantis domenas yra skirstomas į du subdomenus: substrato rišimo ir spiralinio dangtelio. Substrato rišimo subdomenas yra sudarytas iš  $\beta$  “sumuštinio” regiono, kuris turi substrato rišimo kišenę. Spiralinio dangtelio subdomeno dydis yra 10 kDa. Jį sudaro penkios  $\alpha$  spirilės ir gale esančios netvarkingos 26 aminorūgštys. Šis subdomenas yra mobilus ir reguliuoja substrato rišimo kinetiką (Mayer et al., 2000). Nukleotidus rišantį ir substratą rišantį domenų jungia hidrofobinis jungtukas, kuris sudarytas iš 13 amino rūgščių, bei turi konservatyvų leucinu turtingą motyvą. Jungtukas dalyvauja alosteriniame bendravime tarp domenų ir košaperono Hsp40 prijungime (Kumar et al., 2011).



1.2 pav. Pilno ilgio prokariotinio Hsp70 kristalinė struktūra ir domenai esantys molekulėje. Hsp70 turi N gale esantį nukleotidus rišantį domeną (pažymėtas ruda spalva), trumpą jungtuką (raudona) ir substratą rišantį domeną, kuris sudarytas iš dviejų subdomenų: substratą rišančio subdomeno (violetinis) ir spiralinio dangtelio (oranžinė). Nėra nustytos žmogaus Hsp70 baltymo struktūros, todėl domenai pažymėti naudojant DnaK komplekso struktūrą (pdb: 2KHO).

### 1.2.3. Oligomerizacija

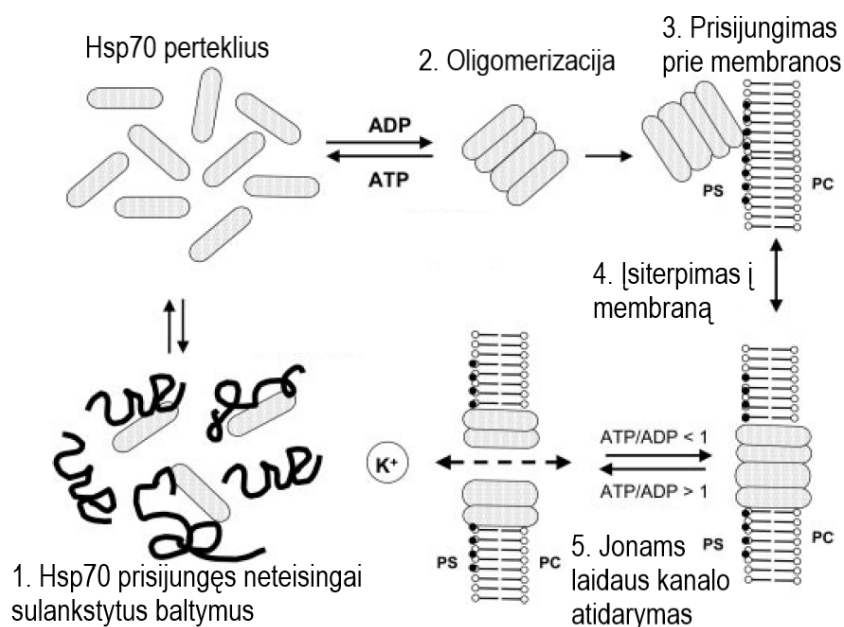
Hsp70 gali formuoti dimerus ir aukštesnės eilės oligomerus. Šis procesas yra priklausomas nuo baltymo koncentracijos ir temperatūros, bei yra grįžtamas procesas. Oligomerizacijoje dalyvauja substratą rišantis domenas ir jungtukas iš kitos baltymo molekulės (1.3 pav). Literatūroje yra minimi įvairūs substratą rišančio domeno regionai, kurie dalyvauja oligomerizacijoje (Fouchaq et al., 1999; Nemoto et al., 2006; Chou et al., 2003). Aprile *et al.* parodė, kad žmogaus Hsp70 baltyme yra svarbus spiralinis dangtelio subdomenas, ir kad sąveika vyksta būtent tarp spiralinio dangtelio subdomeno ir jungtuko. Tačiau, specifinės sąveikos atsirandančios oligomerizacijos metu nėra žinomos (Aprile et al., 2013). Žmogaus Hsp70 spiraliniame dangtelio subdomene yra septynios leucino amino rūgštys, kurios gali sąveikauti su jungtuke esančiu konservatyviu, bei leucinu turtingu regionu (Aprile et al., 2013; Nimmervoll et al., 2015).



1.3 pav. Hsp70 oligomerizacija. A - monomeras; B - dimeras; C- oligomeras. Monomerinėje būsenoje Hsp70 domenai yra alosteriškai nepriklausomi vienas nuo kito, o spiralinis dangtelio subdomenas gali laisvai judėti. Hsp70 oligomerizacija vyksta dėl vienos baltymo molekulės spiralinio dangtelio subdomeno sąveikos su kitos molekulės jungtuku (B). Tokia sąveika leidžia formuotis oligomerams (Aprile et al., 2013).

Hsp70 dimerizacijos metu išsidėsto antiparaleliai. Sąveika vyksta dėl per visą molekulę išsidėsčiusių lizinų turtingų regionų, kurių daugiausia substratą rišančiame domene. Vykdamas aminorūgščių fosforilinimą ir acetilinimą yra stabilizuojama baltymas-baltymas sąveika ir dimerai išsilaiko ilgesnį laiką (Morgner et al., 2015).

Kada vyksta Hsp70 oligomerizacija nėra žinoma. Vieni autoriai teigia, kad tai vyksta prieš prisijungimą prie membranos, o kiti mano, kad Hsp70 oligomerizuojasi įsiterpęs į membraną. Arispe *et al.* pasiūlė, kad baltymo oligomerizacija vyksta tirpale. Esant stresinėms sąlygoms Hsp70 negali įsiterpti į plazminę membraną, nes jis yra prisijungęs prie naujai sintetinamų ar prie neteisingai sulankstytų baltymų. Sąlygoms vėl tapus normalioms, neteisingai sulankstytų baltymų skaičius greitai mažėja, o Hsp70 koncentracija išlieka pastovi, todėl lieka laisvų Hsp70 molekulių, kurios gali oligomerizuotis, įsiterpti į membraną, bei sukurti jonams laidžius kanalus (1.4 pav) (Arispe et al., 2004).



1.4 pav. Hsp70 kanalų formavimas. Kai Hsp70 yra daugiau nei baltymo - taikinio, tai laisvas Hsp70 oligomerizuojasi (2). Oligomeras sąveikauja su fosfatidilserinu esančiu membranoje (3) ir įsiterpia į membraną (4) suformuodamas jonams laidžius kanalus (5) (Arispe et al., 2004).

Kitas oligomerizacijos mechanizmas yra susijęs su oligomerizacija po baltymo įsiterpimo į membraną. Tirpale yra randamas monomerinis Hsp70 baltymas, o oligomerinės Hsp70 formos - plazminėje membranoje. Citozolyje esantis monomerinis Hsp70 atpažįsta PS esantį vidinėje plazminės membranos pusėje. Tada vyksta baltymo konformacijos pokytis ir įsiterpimas į lipidų dvisluoksnį. Po įsiterpimo, Hsp70 oligomerizuojasi ir jungiasi su lipidiniais plaustais (Armijo et al., 2014).

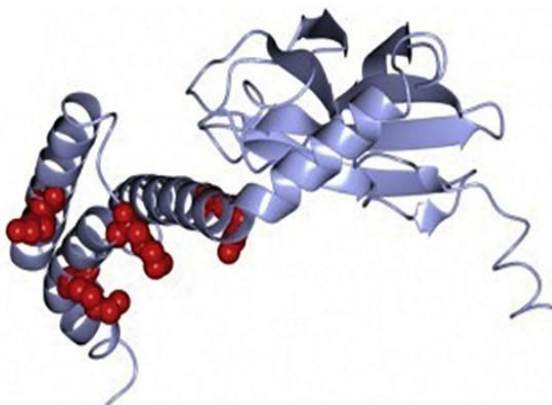
#### 1.2.4. Hsp70 sąveika su membrana

Hsp70 yra citozolinis baltymas, tačiau jis randamas prisijungęs prie membranos. Pasitelkus tėkmės citometriją (angl. flow cytometry of viable tumor cells) ir selektyvų ląstelių paviršiaus jodavimą (angl. selective cell surface iodination), baltymas buvo rastas naviką sudarančių ląstelių plazminėje membranoje (Multhoff, 2007). Šį pastebėjimą patvirtino ir visuotinis prie membranos prisijungusių baltymų profiliavimas (angl. global profiling of membrane-bound proteins). Tyrimo metu nustatyta, kad įvairūs molekuliniai šaperonai, įskaitant Hsp70, randami prisijungę prie membranos įvairiuose navikų ląstelių linijose (Shin et al., 2003).

Hsp70 yra įsiterpęs į membraną, o ne prisijungęs prie membranoje esančių baltymų. Panaudojus antikūnus prieš skirtingus Hsp70 epitopus, rasta, kad Hsp70 polipeptido C galas įsiterpia į membraną, o likusi baltymo dalis yra nukreipta į užląstelinę erdvę (Botzler et al., 1998). Taip pat, Hsp70 nepavyko pašalinti nuo membranos paviršiaus, nei veikiant rūgštiniais ir baziniais tirpalais, nei daug druskų turinčiais tirpalais (Gehrmann et al., 2008; Vega et al., 2008). Yra duomenų, jog Hsp70 plazminėje membranoje išsidėsto tankiais klasteriais (Lamprecht et al., 2018), o ne kaip anksčiau manyta, kad sudaro poras (Arispe ir De Maio, 2000; Armijo et al., 2014).

Mechanizmas, kurio Hsp70 prisijungia prie plazminės membranos, vis dar neišaiškintas. Hsp70 neturi signalinės sekos, kuri reikalinga baltymo transportavimui klasikiniu endoplazminio tinklo – Goldžio aparato keliu (Multhoff, 2007). Baltymo paviršiuje yra daug krūvį turinčių amino rūgščių, todėl transportavimo procesas yra energetiškai nepalankus (Wimley et al., 1998).

Hsp70 įsiterpimas į plazminę membraną gali vykti dėl lipidų dvisluoksnio heterogeniškumo. Plazminė membrana sudaryta iš fosfolipidų, kurių uodegėlės sąveikauja viena su kita, o galvutės su supančia aplinka. Toks lipidų išsidėstymas suteikia membranai heterogeniškumo (Wimley et al., 1998). Hsp70 įsiterpimo į membraną mechanizmas gali prasidėti nuo žingsnio, kai baltymas dėl elektrostatinės sąveikos prisijungia prie lipidų galvučių. Šį prisijungimą sustiprina membranoje esantis neigiamai įkrautas fosfatidilserinas (PS). Hsp70 baltymo paviršiuje yra teigiamai įkrautų lizino ir arginino amino rūgščių (R533 ir K601/K597), kurios sąveikauja su PS (Morozova et al., 2016) (1.5 pav). Prisijungus prie membranos paviršiaus, baltymo įsiterpimas į dvisluoksnį gali vykti dėl PS transmembraninės difuzijos, kurios metu baltymas perveria membraną (De Maio, 2011).



1.5 pav. Lizino ir arginino amino rūgštys, kurios sąveikauja su fosfatidilserinu (PDB: 4PO2, Žmogaus Hsp70 jungtuko ir substratą jungiantis domenas). Teigiamai įkrautos R533, R535, K569, K573, K589 ir K597 amino rūgštys vaizduojamos raudonai. Spėjama, kad jos jungiasi prie PS, kuris randama į citoplazmą nukreiptame endosomų sluoksnyje. Šios amino rūgštys leidžia Hsp70 patekti į endosomų vidų autofagijos būdu (Morozova et al., 2016).

Hightowe ir Guidon nustatė, kad Hsp70 rišasi prie sočių, ilgų riebalų rūgščių (Guidon ir Hightower, 1986). Dažniausiai pasitaiko palmitino ir stearino riebalų rūgštys, rečiau miristo rūgštis. Stresą patiriančiose ląstelėse, Hsp70 yra randamas detergentams atspariuose domenuose. Šie domenai yra sudaryti iš cholesterolio ir sočias riebalų rūgštis turinčių lipidų, tokių kaip sfingolipidai (Vega et al., 2008). Detergentams atsparūs domenai yra mažiau takūs, todėl manoma, kad baltymas yra stabilus mažiau tokioje aplinkoje (Horváth et al., 2008).

Hsp70 sąveikos su lipidiniais modeliais parodė selektyvų jungimąsi prie dirbtinių membranų, kurių sudėtyje yra neigiamą krūvį turinčių lipidų. Ypač didelį giminingumą baltymas turi PS, tačiau Hsp70 sąveika su teigiamą krūvį turinčiais ir neutraliais lipidais, tokiais kaip fosfatidilcholinai, yra silpna ir nespecifinė. (Arispe et al., 2004; Armijo et al., 2014; Schilling et al., 2009). Liposomų agregaciją sustiprina, kai membranos sudėtyje kartu su PS yra monosialotetraheksozilganglioizidų ir cholesterolio (De Maio, 2011). Kiti sfingolipidai, tokie kaip globotriaozilceramidas, taip pat palengvina Hsp70 įsiterpimą į membraną (Sugawara et al., 2009).

Esant fiziologinėms sąlygoms, lipidai plazminėje membranoje yra išsidėstę asimetriškai. Daugiausia PS yra randama į ląstelės vidų nukreiptame plazminės membranos sluoksnyje. Preapoptozinio etapo metu PS keičia savo lokaciją ir yra randamas išoriniame sluoksnyje. Daugiau prisikabinusio Hsp70 buvo rasta prie išorinio membranos sluoksnio apoptozę patiriančiose ląstelėse, nei sveikose. Hsp70 koncentracija ant plazminės membranos išorinio sluoksnio padidėja tiek ankstyvojoje, tiek ir vėlyvojoje apoptozėje, bet didžiausias padidėjimas nustatytas etape, kai keičiasi ląstelės membranos asimetriškumas (Sapozhnikov et al., 1999).

### 1.2.5. Hsp70 eksportas

Hsp transportas yra sudėtingas procesas apimantis skirtingus pernašos būdus. Iki šiol vyksta diskusijos, ar šis baltymas į užląstelinę erdvę patenka po ląstelės žūties, ar yra eksportuojamas aktyviu, nuo ląstelės lizės nepriklausomu mechanizmu. Pirmieji tyrimai atlikti Basu et al. parodė, kad Hsp70 užląstelinėje ervėje atsiranda po ląstelės nekrozės (Basu et al., 2000). Tačiau kita mokslininkų grupė nustatė, kad Hsp70 išnešimas yra nepriklausomas nuo ląstelės žūties (Hunter-Lavin et al., 2004).

Hsp70 gebėjimas prisijungti prie plazminės membranos gali būti susijęs su vienu iš būdų, kaip baltymas patenka į užląstelinę erdvę. Hsp70 yra sintetinamas citozolyje ir eksportuojamas į užląstelinę erdvę alternatyviu mechanizmu - neklasikiniu sekrecijos keliu, kurio neblokuoja endoplazminio tinklo – Goldžio kelio slopikliai (Hightower ir Guidon, 1989). Šiuo neklasikiniu keliu yra eksportuojamos signalinės molekulės, pavyzdžiui, interliaukinas 1 (Nickel ir Seedorf, 2008). Kadangi Hsp70 rastas ant transformuotų, bei stresą patiriančių ląstelių paviršiaus, manoma, kad vienas iš Hsp70 transportavimo etapų yra prisijungimas prie plazminės membranos (De Maio, 2011). Kai baltymas prisijungia prie membranos, iš ląstelės jis pašalinamas suformuojant ekstraląstelines pūsles (De Maio ir Vazquez, 2013; Vega et al., 2008). Hsp70 į užląstelinę erdvę gali patekti keliais alternatyviais būdais. Vienas iš jų yra lizosomų – endosomų kelias. Hsp70 patenka į lizosomas. Ten baltymas yra apsaugomas nuo degradacijos ir pernešamas endocitozės būdu į ląstelės išorę. Į lizosomas baltymas patenka per ATP surišimo kasetės transportavimo sistemą (Mambula ir Calderwood, 2006). Hsp70 į užląstelinę erdvę gali patekti naudojant sekrecines granules (Evdonin et al., 2006).

### 1.2.6. Hsp70 funkcijos

Svarbiausias ląstelių tikslas yra išgyventi. Jos yra išvysčiusios keletą mechanizmų, kurie esant stresinėms sąlygoms padeda išlikti gyvybingomis. Vienas iš konservatyviausių apsaugos mechanizmų yra šilumos šoko baltymų ekspresija. Todėl ląstelės patiriančios silpną stresą ir ekspresuojančios Hsp baltymus yra atsparesnės stipriam stresui. Šis gebėjimas apsisaugoti nuo tolesnio stipraus streso yra vadinamas streso toleravimu (angl. stress tolerance). Tikslus streso toleravimo mechanizmas nėra aiškus. Streso metu pažeistų baltymų konformacijos atstatymas yra vienas iš pagrindinių streso toleravimo žingsnių (De Maio, 1999).

Hsp70 veikia kaip molekulinis šaperonas. Kai ląstelė patiria ūminį ar lėtinį stresą, daugelis signalinių kelių yra sutrikdomi, todėl padaugėja neteisingai sulankstytų ir agreguotų

baltymų, sutrinka baltymų kompleksų funkcijos. Tai kelia pavojų ląstelės išlikimui. Esant tokiai situacijai, ląstelės aktyvuoja šilumos šoko atsaką, kurio metu padidėja Hsp70 baltymų ekspresija. Šie šilumos šoko baltymai padeda atstatyti tinkamą baltymų konformaciją ir homeostazę (Hartl ir Martin, 1995).

Hsp70 veikia ne tik kaip molekuliniai šaperonai, bet jie turi ir kitokių funkcijų, pavyzdžiui, signalo perdavimo. Esant normalioms fiziologinėms sąlygoms, ląstelės viena su kita bendrauja ir sinchronizuoja metabolinį aktyvumą, genų ekspresiją ir kitus ląstelinius procesus. Ląstelės bendrauja tarpusavyje, kad palaikytų homeostazę. Kai aplinkos sąlygos pasikeičia, pavyzdžiui pakinta maisto medžiagų prieinamumas, ląstelės bendrauja tarpusavyje ir pritaiko savo metabolizmą prie pakitusių sąlygų. Stresą patiriančios ir jo nepatiriančios ląstelės taip pat bendrauja tarpusavyje. Jos perduoda signalą ir įspėja likusias ląsteles, kurias gali paveikti stresinės sąlygos. Mechanizmas atsakingas už stresinių sąlygų pajutimą ekstraląstelinėje erdvėje yra vadinamas streso stebėjimo sistema (angl. stress observation system). Vienas iš streso signalų, kurios skleidžia ląstelės yra šilumos šoko baltymai (De Maio ir Vazquez, 2013).

Hsp70 atsiradęs užląstelinėje erdvėje nuo receptorių priklausomu signaliniu keliu aktyvuoja monocitus, kurie sekretuoja uždegimą skatinančius citokinus (Asea et al., 2002). Kai imunogeniniai peptidai nėra prisijungę, Hsp70 veikia, kaip nespecifinis pavojaus signalas imuninei sistemai (Wang et al., 2006). Prie membranos prisijungęs Hsp70 veikia kaip atpažinimo struktūra natūralioms ląstelėms žudikėms (NK, ang. natural killer cells). Buvo atlikti tyrimai su naviko ląstelių sublinijomis, kurios ekspresuoja skirtingas Hsp70 koncentracijas ant ląstelės paviršiaus. Ląstelės, prie kurių plazminės membranos yra prisijungę daugiau Hsp70, sunaikinamos NK ląstelių greičiau, nei ląstelės turinčios mažiau šio baltymo (Multhoff et al., 1997). Be to, inkubuojant NK ląsteles su tirpiu Hsp70 ir nedidele interleukinų (IL) koncentracija, yra dar labiau sustiprinamas NK ląstelių citolitinis aktyvumas (Multhoff et al., 1999).

Hsp70 randamas vėžinių ląstelių endosomų ir lizosomų membranose ir manoma, kad šis baltymas slopina jų membranų pralaidumą, kurį sukelia citokinai, priešvėžiniai vaistai, radiacija, oksidacinis stresas ir fotolizė. Be to, Hsp70 pašalinimas iš vėžinių ląstelių sukelia lizosomų membranų pralaidumo padidėjimą, bei jų turinio patekimą į citozolį ir nuo katapsinų priklausomą programuotą ląstelių mirtį. Taigi, Hsp70 apsaugo vėžines ląsteles mažindamas jų lizosomų ir kitų katapsinų turinčių pūslelių membranų pralaidumą (Leist ir Jäättelä, 2001).



### 1.3. Ligos

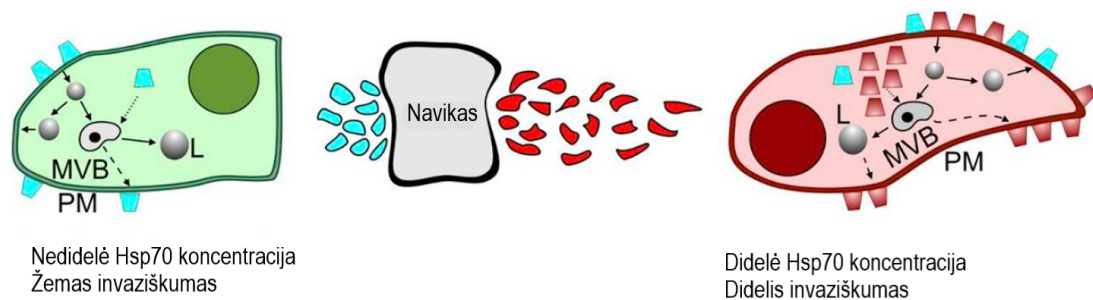
Hsp70 yra randamas prisikabinęs prie membranos ir kraujotakos sistemoje esant skirtingoms pataloginėms ir fiziologinėms sąlygoms (1.2 lentelė). Baltymo pernešimas iš citozolio yra siejamas su kritinių pacientų išgyvenamumu (Ziegler et al., 2005).

1.2 lentelė. Ligos, kurių metu yra randamas užląstelinis Hsp70.

<b>Liga</b>	<b>Šaltinis</b>
Ūminis plaučių pažeidimas	(Ganter et al., 2006)
Vėžys	(Faure et al., 2004)
Lėtinis uždegimas senėjimo metu	(Njemini et al., 2004)
Koronarinė širdies liga	(Zhang et al., 2010)
Diabetas	(Oglesbee et al., 2005)
Hipertenzija/nėštumas	(Molvarec et al., 2006)
Infekcija	(Njemini et al., 2004)
Išemija/reperfuzija	(Hecker ir McGarvey, 2011)
Miokardo infekcija	(Dybdahl et al., 2005)
Traumos	(Ziegler et al., 2005)

#### 1.3.1. Vėžys

Daugelyje navikų Hsp70 ekspresija vyksta nuolat ir yra intensyvesnė palyginus su sveikomis ląstelėmis. Didesnis šio baltymo kiekis padeda navikui išgyventi, skatina jų augimą, slopina senėjimą, bei suteikia atsparumą apoptozei (Juhász et al., 2013; Lamprecht et al., 2018). Neįprasta Hsp70 lokalizacija yra susijusi su navikams būdingomis funkcijomis: sumažėjusiu lizosomų membranų pralaidumu (Kirkegaard et al., 2010) ir vėlesne nuo lizosomų priklausoma ląstelių mirtimi (Gehrmann et al., 2005). Didėjant naviko ląstelių skaičiui, daugiau Hsp70 randama ant ląstelės išorės. Hsp70 išsidėstymas / radimas yra susijęs su navikų atsparumu radioterapijoje, padidėjusiu invaziškumu, nutolusių metastazių atsiradimu ir blogomis prognozėmis pacientui (1.6 pav.) (Lamprecht et al., 2018).



1.6 pav. Nuo Hsp70 priklausomas naviko invaziškumo modelis. Navikai, kurie ekspresuoja nedidelį kiekį Hsp70, pasižymi žemu invaziškumu ar neinvaziniu fenotipu (kairėje). Pirešingai, didelį invaziškumą turintys navikai ekspresuoja daug Hsp70 (dešinėje). Mėlynos spalvos kvadratai vaizduoja bazinę Hsp70 ekspresiją, o raudonos padidėjusią. MVB - vėlyvos endosomos; L - lizosomos; PM - plazminė membrana (Balogi et al., 2019).

Nustatant Hsp baltymų koncentraciją cirkuliacijoje, galima atskirti uždegiminius procesus nuo specifinių ligų būsenų. Multhoff grupė nustatė, kad sergant vėžiu padidėja Hsp70 koncentracija cirkuliacijoje. Taip pat, jie parodė, kad esant chroniniam hepatitui Hsp70 koncentracija yra mažesnė, nei esant vėžiui (Gehrmann et al., 2014). Kraujo serume esančio Hsp70 koncentracija yra didesnė sergant kepenų vėžiu, nei chroniniu pankreatitu (Dutta et al., 2012). Šie duomenys rodo, kad uždegiminius procesus / ligas galima atskirti nuo vėžinių susirgimų matuojant Hsp70 koncentraciją serume, todėl Hsp70 galima panaudoti, kaip vėžio žymenį.

### 1.3.2. Ūminis pankreatitas

Ūminis pankreatitas yra uždegiminė kasos liga, kuri pažeidžia akinarines ląsteles ir sukelia mirtį. Esant fiziologinėms sąlygoms, kasos akinarinėse ląstelėse yra sintetami, saugomi ir iš jų sekretuojami fermentai. Fermentų aktyvaciją šiose ląstelėse saugo įvairūs mechanizmai (Pandol et al., 2007). Tačiau, prasidėjus pankreatitui, zimogenai virsta aktyviais fermentais, kurie aktyvuoja ląstelių žūtį ir uždegiminius kelius (Saluja et al., 2007). Mokslininkai mano, kad ankstyvoje ūminio pankreatito fazėje, virškinimo fermentų zimogenai patenka į liposomas, kur tripsinogenas yra aktyvuojamas ir tampa tripsinu (Saluja et al., 1997). Taip pat, yra aktyvinamas nuo branduolio faktorius-kB (NF-kB) priklausomas priešūždegiminis kelias, kurio metu iš akinarinių ląstelių išleidžiami uždegiminiai citokinai, todėl padidėja lokalus ir sisteminis pažeidimas (Dawra et al., 2011).

Šilumos šoko baltymai yra svarbūs sergant ūminiu pankreatitu. Hsp70 koncentracija smarkiai padidėja, kai akinarinės ląstelės, iš pelių kepenų, yra veikiamos šiluma (Wagner et al., 1996). Taigi, Hsp70 apsaugo akinarines ląsteles pankreatito metu. Baltymas neleidžia tripsinogenui patenkti į lizosomas (Bhagat et al., 2008).

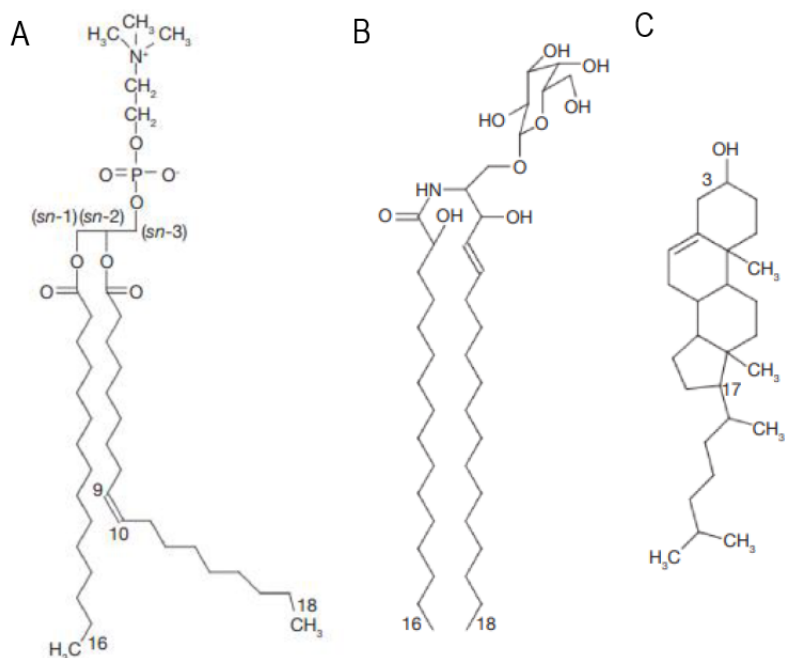
NF-kB reguliuoja uždegiminį atsaką keisdamas citokinų (naviko nekrozės faktoriaus (NTF), IL - 1, IL - 6, ir IL - 8) koncentraciją (Altavilla et al., 2003). Ankstyvos stadijos pankreatito metu išsiskiria šie uždegiminiai mediatoriai - citokinai, kurie pažeidžia kasą ir sukelia vietinį ir sisteminį atsaką (Makhija ir Kingsnorth, 2002). Kasos išskiriami citokinai (TNF, IL-1, IL-6, IL-8 ir kt.) sukelia daugybę kaskadinių reakcijų, bei sunkiais atvejais gali sukelti sisteminio uždegiminio atsako sindromą ir daugybinių organų disfunkcijos sindromą (Wilson et al., 1998). Kasoje esantis Hsp70 sumažina TNF ir IL-8 molekulių koncentraciją kraujyje. Taip pat, hipertermiją patiriančiuose kasos ląstelių modeliuose, Hsp70 ekspresija yra aktyvi, bet NF-kB aktyvacija yra atidėta (Frossard et al., 2001). Todėl yra manoma, kad Hsp70 apriboja TNF gamybą sumažindamas NF-kB aktyvumą.

#### 1.4. Biologinės membranos

Biologinės membranos ir su jomis susiję procesai yra labai svarbūs gyviesiems organizmams. Kelių nanometrų storio membranoje yra randami trys pagrindiniai komponentai: lipidai, baltymai ir angliavandeniai. Lipidai sudaro dvisluksnį, kuris formuoja išorinį ląstelių, bei atskirų organelių išorinį sluoksnį, taip pat jame išsidėsto įvairias funkcijas atliekantys baltymai. Be to, ląstelės membrana ne tik palaiko ląstelės homeostazę, bet ir atlieka barjero funkciją ir saugo nuo patogenų. Patogenai ir toksinai turi sąveikauti ar pereiti membraną, kad sutrikdytų ląstelės veiklą (Knobloch et al., 2015). Biologinėje membranoje randami baltymai dalyvauja ląstelė - ląstelė sąveikoje, signalo perdavime ir jonų, bei maisto medžiagų pernašoje (Rebaud et al., 2014). Įprastai, baltymai užima apie 50% plazminės membranos paviršiaus (Alberts et al., 2014). Membraniniai baltymai gali būti trijų tipų: integraliniai, paviršiniai ir inkariniai. Angliavandeniai kovalentiškai prisikabina prie lipidų ir baltymų išorinėje membranos pusėje. Jie pasižymi didele struktūros įvairove, todėl veikia, kaip molekuliniai žymenys, pavyzdžiui, vėžinės ląstelės turi specifinius angliavandenių žymenis (Watson, 2015).

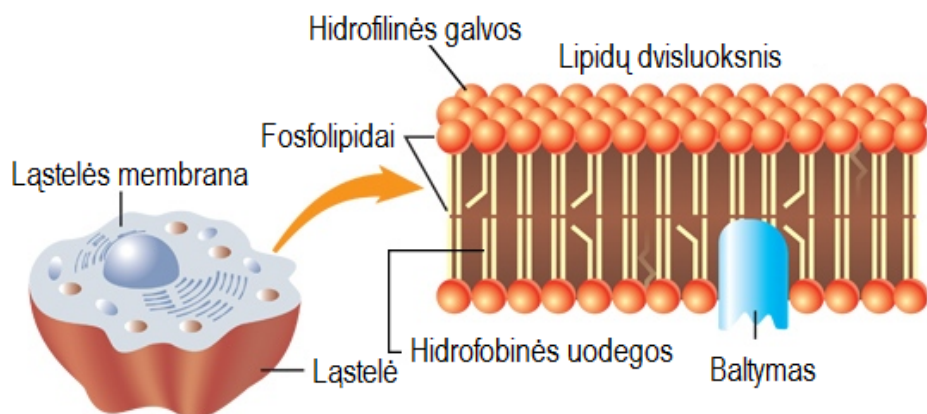
Biologinėse membranose randamos trys pagrindinės lipidų grupės: fosfolipidai, glikolipidai ir steroliai (1.7 pav.). Fosfolipidai gali būti dviejų tipų: glicerofosfolipidai ir sfingofosfolipidai. Glicerofosfolipidai yra sudaryti iš glicerolio molekulės, prie kurios yra prijungtos dvi riebalų rūgštys ir fosfato grupė. Riebalų rūgštys būna sudarytos iš 14-24 anglies atomų. Viena iš dviejų riebalų rūgščių gali būti nesoti. Nesočiosios riebalų rūgštys turi nuo 1 iki 4 dvigubų ryšių, kuomet yra cis konformacijos. Prie fosfato grupės gali būti prijungiamas cholinas, serinas ar etanolaminas (1.7 pav. A). Kai vietoje glicerolio yra sfingozinas, pavyzdžiui, sfingomielinas, gaunama kita fosfolipidų grupė - sfingofosfolipidai. Glikolipidai yra sudaryti panašiai, kaip fosfolipidai, tik vietoj fosfato grupės prie glicerolio yra prijungtas

cukrus, pavyzdžiui, gliukozė (1.7 pav. B). Sterolių nėra daugelyje bakterijų membranų, bet jie yra svarbus gyvūnų ir augalų membranų komponentas. Žinduoliuose dažniausiai sutinkamas cholesterolis, o augaluose stigmasterolis. Cholesterolis yra sudarytas iš keturių konjugotų žiedų prie kurių prijungta hidroksilo grupė ir trumpa alifatinė anglies grandinė (1.7 pav. C) (Watson, 2015).



1.7 pav. Membraną sudarantys lipidai. A – fosfatidilcholinas – glicerofosfolipidas; B – glikosfingolipidas – glikolipidas; C – cholesterolis – sterolis.

Lipidų dvisluoksnį sudarantys fosfolipidai ir glikolipidai yra amfifilinės molekulės. Jos turi hidrofilinę galvutę ir dvi hidrofobines uodegėles (1.8 pav.). Hidrofilinės galvutės yra stabilios vandeninėje aplinkoje, o hidrofobinės uodegėlės – lipidinėje. Vandeninėje terpėje šios molekulės spontaniškai, dėl hidrofobinės traukos ir hidrofilinės stūmos jėgos, išsidėsto viena šalia kitos ir suformuoja dvisluoksnį, kuriame hidrofobinės uodegėlės nukreiptos viena į kitą, o galvutės į išorę. Lipidų dvisluoksniai formuoja uždaras struktūras – liposomas. Jos atrodo kaip mažos ląstelės, kurių išorėje ir viduje yra vanduo. Tai yra palankiausia konformacija, nes galvutės turi kontaktą su vandeniu, o visos hidrofobinės uodegėlės yra lipidinėje aplinkoje (Watson, 2015).



1.8 pav. Ląstelės membrana (“Difference Between Peripheral and Integral Membrane Proteins” 2014).

Biologines membranas apibūdina skystamozaiškės membranos modelis (angl. fluid mosaic model), kurį 1972 m. pasiūlė J. Singer ir G. Nicolson. Membraną sudaro lipidai, prie kurių prisijungia baltymai, sudarydami mozaiką (Singer ir Nicolson, 1972). Svarbiausia savybė yra mozaikos takumas. Lipidai ir baltymai laisvai difunduoja membranos sluoksnyje, kuriame jie yra. Fosfolipidų difuzija yra gana greita. Per 1 sekundę jie įveikia atstumą lygų bakterijos ląstelės ilgiui. Fosfolipidams būdingas aksialinis judėjimas, kai jie sukasi apie savo ašį. Membranų komponentų įvairus judėjimas sukuria dinamišką ir taktišką membraną. Baltymams, kaip ir lipidams būdingas šoninis judėjimas, bet jų judėjimo greitis daug mažesnis. Lipidų judėjimas iš vieno sluoksnio į kitą yra vadinamas transmembranine difuzija arba „flip-flop” judėjimas. Šis judėjimas vyksta daug rečiau, nei molekulių šoninis judėjimas. Vykstant šiam judėjimui, polinės galvutės turi pereiti energetinį barjerą, kurį suformuoja nepolinis, hidrofobinis anglies grandinių sluoksnis. Kadangi, transmembraninė difuzija vyksta retai, membranos vidinis ir išorinis sluoksniai skiriasi lipidine sudėtimi (Watson, 2015). Simons ir Ikonen papildė skystamozaiškės membranos modelį lipidinius plaustus. Membranoje sotūs lipidai ir cholesterolis formuoja domenų, kurie apsupti nesočių lipidų. Lipidiniuose plaustuose gausu baltymų, kurie sąveikauja su kitais baltymais ir angliavandeniais. Šių plaustų dydis ir struktūra priklauso nuo tam tikrų signalų ir dirgiklių (Simons ir Ikonen, 1997).

Fosfolipidinės membranos yra asimetriškos. Žinduolių ląstelių išoriniame plazminės membranos sluoksnyje dominuoja fosfatidilcholinai ir sfingomielinai, o PS ir fosfatidiletanolaminai randami daugiausia vidiniame sluoksnyje. Vykstant programuotai ląstelės žūčiai (apoptozei), PS yra perkeltas į išorinį plazminės membranos sluoksnį. Perkėlime dalyvauja skramblazė. PS turi neigiamą krūvį ir jo perkėlimas į kitą sluoksnį

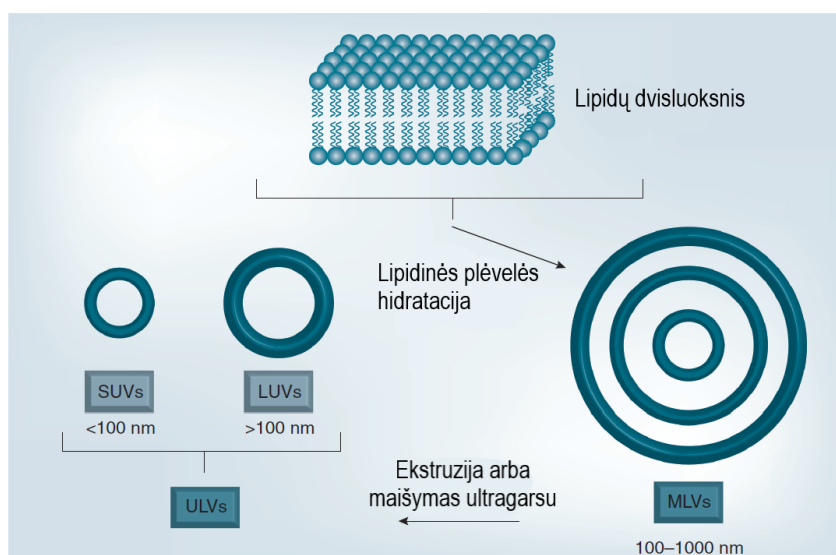
pakeičia plazminės membranos krūvį. Membranos krūvio pasikeitimas yra ženklas fagocitams pradėti vykdyti fagocitozę (Watson, 2015).

## 1.5. Membranų modeliai

Biologinė membrana yra kompleksinė sistema sudaryta iš daugybės skirtingų komponentų. Membranos architektūros sudėtingumas trukdo tirti procesus vykstančius joje, todėl kuriamos įvairios supaprastintos modelinės sistemos, kurios atspindi fundamentalią membranos architektūrą – lipidų dvisluoksnį. Modeliai sumažina membranos kompleksumą ir suteikia galimybę lengviau tirti jos funkcijas. Modelinės sistemos atspindi svarbiausias struktūrinės ir cheminės lipidų dvisluoksnio savybes, bei leidžia apibrėžti ir kontroliuoti eksperimentines sąlygas (Andersson ir Köper, 2016). Yra sukurta daug įvairių lipidinių modelinių sistemų. Paprasčiausios modelinės sistemos yra liposomos ir juodosios membranos, o pačios naujausios modelinės sistemos yra kuriamos ant kieto paviršiaus (Chan ir Boxer, 2007). Visos šios sistemos turi savo privalumų ir trūkumų. Nei viena modelinė sistema neatspindi visų biologinės membranos savybių, bet jos yra puikus įrankis tirti specifines membranos charakteristikas ir baltymų – lipidų sąveikas.

### 1.5.1. Liposomos

Liposomos yra vienos iš paprasčiausių biologinės membranos modelių. Jos yra sferinės pūslelės sudarytos iš lipidų dvisluoksnio, kuris atskiria dvi vandenines terpes. Liposomos yra skirstomos į dvi grupes: vienasluoksnes ir daugiasluoksnes liposomas (1.9 pav.). Vienasluoksnės liposomos yra sudarytos iš vieno lipidų dvisluoksnio, o daugiasluoksnėse liposomose keletas lipidų dvisluoksnų gaubia vienas kitą. Pagal dydį vienasluoksnės liposomos yra skirstomos į mažas (20 nm - 50 nm) (SUV, angl. small unilamellar vesicles), dideles (50 nm - 100 nm) (LUV, angl. large unilamellar vesicles) ir labai dideles (10 μm - 100 μm) (GUV, angl. giant unilamellar vesicles) (1.9 pav.) (Pinheiro et al., 2011).



1.9 pav. Liposomų skirstymas ir paruošimo schema. SUV – mažos vienasluoksnės liposomos, LUV – didelės vienasluoksnės liposomos, MLV – daugiasluoksnės liposomos, ULV – vienasluoksnės liposomos (Pinheiro et al., 2011).

Hidratuojant lipidines plėveles vandeniniu tirpalu spontaniškai susidaro daugiasluoksnės liposomos (1.9 pav.). Panaudojant ekstruzijos ar maišymo ultragarsu metodus formuojamos SUV ar LUV (Szoka ir Papahadjopoulos, 1980). LUV dažniausiai gaminamos naudojant ekstruzijos metodą (Mui et al., 2003), kai lipidų suspensija yra stumiama per polikarbonatinį filtrą, kuris turi žinomo dydžio poras. Šio proceso metu iš daugiasluoksnių liposomų susiformuoja vienasluoksnės liposomos, kurių dydis yra artimas polikarbonatinio filtro poros dydžiui. Prieš ekstruziją, daugiasluoksnių liposomų suspensija gali būti keletą kartų užšaldoma / atšildoma ar atliekama ekstruzija per didesnio dydžio poras turintį filtrą, kad galutinis liposomų dydžio pasiskirstymas būtų homogeniškesnis. Liposomų dydžio sumažinimas vyksta temperatūroje, kuri yra aukštesnė nei lipidų fazės virsmo temperatūra. Ekstruzijos negalima atlikti žemesnėje temperatūroje nei lipidų fazinio virsmo temperatūra, nes tuomet liposomas sudarančių membranų klampumas yra didelis ir tai neleidžia joms pereiti per filtro poras (Mui et al., 2003; Zhao ir Lappalainen, 2012).

Nors liposomos yra lengvai paruošiamos, ribotas panaudojimas yra susijęs su jų tyrimo metodais. Liposomų dydžio ir formos pasikeitimus, dėl išorinių stimulų, galima stebėti naudojant išsklaidymo technikas, pavyzdžiui, išsklaidytos šviesos, mažo kampo rentgeno spindulių ar neutronų išsklaidymą. Funkcines savybes, tokias kaip molekulių pernešimą per membraną, bei baltymų funkciją, galima stebėti naudojant fluorescencinius metodus (Domenech et al., 2009). Eksperimentų metu į liposomų vidinę erdvę yra įterpiamas fluorescuojantis dažas. Paveikus liposomas baltymais, kurie sutrikdo membranos integralumą, stebimas dažo tekėjimas iš jų. Tyrimo metu yra stebimas fluorescencijos pokytis.

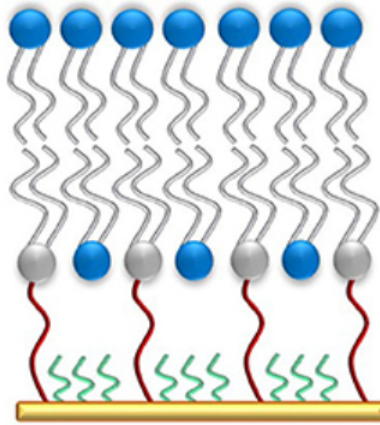
Liposomos yra tinkama platforma tirti transmembraninius baltymus, nes jos laisvai plaukioja tirpale ir nesukelia baltymų denatūracijos, be to vandeninė terpė yra abiejose liposomą sudarančio fosfolipidų dvisluoksnio pusėse, kas imituoja biologinės membranos aplinką. Tačiau, ši sistema pasižymi prastu stabilumu, sunku atlikti chemines manipuliacijas, bei dirbant su liposomomis negalima naudoti paviršiumi jautrių metodų (Castellana ir Cremer, 2006).

### 1.5.2. Modelinės sistemos ant kieto paviršiaus

Tam ir McConnell pirmieji pristatė metodą, leidžiantį sukurti stabilius dvisluoksnius ant kieto paviršiaus. Jie pastebėjo, kad tokioje sistemoje membrana yra labai arti pagrindo ir egzistuoja tik plonas vandens sluoksnis tarp jų (Tamm ir McConnell, 1985). Toks nedidelis atstumas trukdo baltymams įsiterpti į membraną (Kühner et al., 1994), o įsiterpę baltymai praranda savo funkciją (dėl sąlyčio su kietu paviršiumi jie denatūruojasi (Thompson et al., 1993), bei integraliniai baltymai negali laisvai difunduoti lipidų dvisluoksnyje (M. L. Wagner ir Tamm, 2000). Ne tik integralinių baltymų įsiterpimas yra kompliktuotas, bet ir membranos elektrinių savybių tyrimas yra sudėtingas, nes vandens rezervuaras tarp membranos ir kieto paviršiaus yra mažas (Raguse et al., 1998). Todėl buvo sukurtos sistemos su didesniu vandens rezervuaru – prie paviršiaus prikabintos lipidinės membranos (tBLM).

Prie paviršiaus prikabinta lipidinė membrana yra modelinė sistema ant kieto paviršiaus. Lipidų dvisluoksnis nuo paviršiaus atskirtas naudojant inkarinius junginius, kurie kovalentiškai prisijungia prie pagrindo (Köper, 2007) (1.10 pav). Inkarai yra sudaryti iš hidrofobinės, jungiamosios dalių ir dalies reikalingos molekulei prisijungti prie kieto paviršiaus. Inkariais gali būti įvairūs junginiai, pavyzdžiui, polimerai (Ye et al., 2009), DNR (Hughes ir Boxer, 2013) ar į lipidus panašios molekulės (Rebaud et al., 2014). tBLM yra formuojamos ant įvairių paviršių, pavyzdžiui, silicio dioksido (Atanasov et al. 2005), aukso (Junghans ir Köper, 2010), gyvsidabrio (Becucci et al., 2015), o inkarinė molekulė yra prikabinama naudojant paviršiaus chemiją (silanų, tiolių) ir susidaro savitvarkis monosluksnis (SAM) (Becucci ir Guidelli, 2014). Naudojant metalus kaip kietą paviršių, jie veikia kaip elektrodai, todėl galima atlikti elektrinius matavimus, kuriais nustatomas į membraną įsiterpusių jonų kanalų aktyvumas (Vockenroth et al., 2007).





1.10 pav. Prie paviršiaus prikabinta lipidinė membrana (tBLM). Lipidų dvisluoksnis nuo paviršiaus atskirtas naudojant mišrų savitvarkį monosluoksnį (SAM). SAM sudaro inkariniai junginiai ir mažos molekulės ( $\beta$ -merkaptetoetanolis) (Andersson et al., 2018).

Svarbiausiais tBLM komponentas yra inkarinis junginys, nuo kurio tipo, ilgo ir prisikabinimo būdo prie kieto paviršiaus priklauso membranos savybės (Budvytyte et al., 2013). Tankiai išsidėstę ir trumpi inkarai lemia didelę membranos varžą, tai gali sumažinti baltymų įsiterpimo tikimybę. Elektrines membranos savybes galima reguliuoti naudojant ilgus polimerinius inkarus (Tamm ir McConnell, 1985) arba inkarines molekules skiedžiant su mažomis molekulėmis. Praskiedus inkarines molekules, mažosios molekulės varžosi su inkarais dėl prisikabinimo prie kieto paviršiaus ir sukuriama mažiau inkarų turintis SAM. Dažniausiai naudojama molekulė yra  $\beta$ -merkaptetoetanolis ( $\beta$ ME). Skiedimas ne tik keičia elektrines membranos savybes, bet ir padidina membranos judrumą ir sukuria didesnę vandens rezervuarą po membrana (McGillivray et al., 2007).

tBLM formavimas yra sudarytas iš dviejų žingsnių (Vockenroth et al., 2009). Pirmiausia, savaime susirenkančios inkarinės molekulės sudaro monosluoksnį ant kieto paviršiaus, tada liposomų liejimo būdu yra suformuojamas membranos dvisluoksnis. Kitas būdas, kurio suformuojamas membranos dvisluoksnis yra tirpiklio pakeitimo metodas. Jo metu, monosluoksnis inkubuojamas su etanolio - lipidų tirpalu, kuris vėliau pakeičiamas į buferį. Tirpiklio pakeitimas lemia spontanišką dvisluoksnio susiformavimą (McGillivray et al., 2007).

Pagrindinis tBLM privalumas yra stabilumas. Pagamintas tBLM galima naudoti kelias dienas, savaites ar net mėnesius (Jackman et al., 2012). tBLM atkartoja pagrindines biologinės membranos savybes: takumą skystakristalinėje fazėje, bei membraną iš abiejų pusių supančią vandeninę aplinką (Lahiri et al., 2000).

Įvairūs metodai yra naudojami tirti tBLM savybes. Dažniausiai yra naudojama neutronų sklaida, kuri suteikia informacijos apie membranos struktūrą vandeninėje terpėje,

pavyzdžiui, membranos storį, sudėtį, hidrataciją (Junghans ir Köper, 2010). Pasitelkus paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopiją galima išmatuoti membranos storį, o kvarco kristalo mikrosvarstyklės leidžia stebėti SAM susirinkimą. Atominės jėgos mikroskopu galima nustatyti membranos morfologiją. Fluorescencija yra naudojama tirti membranos homogeniškumui. Šoninių lipidų judėjimą galima stebėti naudojant fluorescencijos atkūrimo po fotoblukinimo metodą. EIS yra tinkama charakterizuoti membranų elektrines savybes, pavyzdžiui varžą ir talpą. Naudojant EIS galima tirti membranos ir baltymų sąveiką. Sąveikos metu keičiasi tiriamos sistemos elektrinės savybės. Išanalizavus duomenis (atlikus modelio fitinimą) gaunama joninio rezervuaro ir membranos talpa ir varža (Köper, 2007; Jackman et al., 2012).

tBLM panaudojimas yra įvairus. Ši sistema yra naudojama tirti poras formuojančius peptidus, jonų kanalus. Buvo atlikti tyrimai, kurių metu stebėta ligandais valdomų jonų kanalų (Vockenroth et al., 2007), alfa-hemolizino (McGillivray et al., 2009), valinomicino (Roskamp et al., 2008), gramicidino (Jadhav et al., 2008), vaginolizino (Budvytyte et al., 2013; Ragaliauskas et al., 2019) įsiterpimas į membraną. Naudojant tBLM buvo tirama HIV-1 Gag baltymo struktūra ir jo sąveika su membrana (Datta et al., 2011). Šis modelis buvo naudojamas nustatyti amiloidinių beta-oligomerų ir kitų neteisingai sulankstytų oligomerų ir baltymų poveikį membranai (Valincius et al., 2008). tBLM yra tinkamas membraninis modelis funkcinių baltymų, tokių kaip ubikvitino oksidazė, įsiterpimui (Jeuken et al., 2006). Ši membranos modelį galima panaudoti biosensorių kūrime funkcionalizuojant įterptus jonų kanalus (Cornell et al., 1997), bei tirti naujų medžiagų, pavyzdžiui, nanodalelių poveikį ląstelių membranai (Goreham et al., 2015).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos, prietaisai ir tirpalai

#### 2.1.1. Medžiagos

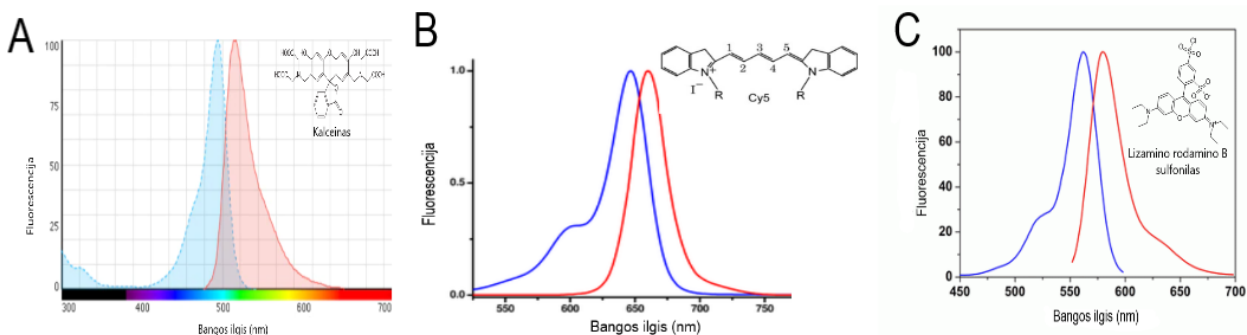
- Dejonizuotas vanduo (dist. H<sub>2</sub>O) (Milli-Q plius, JAV);
- NaCl (Carl Roth, Danija);
- K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Carl Roth, Danija);
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (Carl Roth, Danija);
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Carl Roth, Danija);
- Žmogaus rekombinantinis Hsp70 baltymas, grynumas ≥70 % (Sigma - Aldrich, Kanada);
- EtOH (98%) (UAB „Vilniaus degtinė“, Lietuva);
- 1,2-dioleoil-sn-glicerolio-3-fosfocholinas (DOPC) (Avanti Polar Lipids, JAV);
- Cholesterolis (Chol) (Avanti Polar Lipids, JAV);
- 1,2-dioleoil-sn-glicerolio-3-fosfoetanolaminas (DOPE) (Avanti Polar Lipids, JAV);
- 1,2-dioleoil-sn-glicerolio-3-fosfo-L-serinas (DOPS) (Avanti Polar Lipids, JAV);
- 1,2-dipalmitoil-sn-glicerolio-3-fosfocholinas (DPPC) (Avanti Polar Lipids, JAV);
- Cholesterolis su fluorescuojančia žyme Cy5 (Susintetino Olegas Eicher Lorka, Chemijos institutas);
- 1,2-dipalmitoil-sn-glicerolio-3-fosfoetanolaminas su fluorescuojančia žyme lizamino rodamino B (LRPE) (Avanti Polar lipids, JAV);
- β-merkaptoetanolis (βME) (Sigma-Aldrich, JAV);
- 20-tetradeksiloksio-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontano-1-tiolis (WC14) susintetintas dr. D. J. Vanderah grupėje (NIST, Marylandas, JAV);
- Chloroformas (Sigma-Aldrich, JAV);
- Natrio hidroksidas (NaOH) (Sigma-Aldrich, Vokietija);
- Sieros rūgštis (Reachem, Slovakija);
- 2-propanolis (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH) (Sigma-Aldrich, Vokietija);
- Kalceinas (Sigma-Aldrich, JAV);
- Triton X-100 paviršiaus aktyvi medžiaga (Sigma-Aldrich, JAV);
- Sephadex G-50 Fine (Sigma-Aldrich, JAV).

### 2.1.2. Prietaisai ir priemonės

- Stiklo plokštelės (Thermo Fisher, Lietuva);
- Magnetrono kamera PVD75 (Lesker, JK);
- Analitinės svarstyklės (Kern, Vokietija);
- Magnetinė maišyklė (Cole-Parmer, Indija);
- Vandens valymo sistema Mill-Q plus (JAV);
- PH-metras (Mettler Toledo, JAV);
- Ultragarso vonelė (MRC, Izraelis);
- Elektrocheminė celė (GMC VU Biochemijos institutas);
- Elektrocheminė darbo stotis (Zennium, Vokietija);
- Spektrofotometras „Zetasizer  $\mu$ V“ (Malvern, Didžioji Britanija);
- Automatinės pipetės (Eppendorf AG, Vokietija);
- Purtyklė (VWR, JAV);
- Kiuvetės (4,5 mL) (Kartell, Italija);
- Ekstruderis su 100 nm polikarbonato membranomis (Avanti Polar Lipids, JAV);
- Spektrofotometras „Varian Cary Eclipse“ (Agilent, JAV);
- Fluorescencinis mikroskopas BX61WI (Olympus, JAV);

### 2.1.3. Tirpalai

- Natrio fosfato buferinis tirpalas (PBS), kurio pH 7,5. 0,137 M NaCl, 0,0027M KCl, 0,01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ir 0,0018 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tirpinama dejonizuotame vandenyje;
- Natrio fosfato buferinis tirpalas, kurio pH 4,5. 0,1 M NaCl ir 0,01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tirpinama dejonizuotame vandenyje, o pH koreguojamas NaOH tirpalu;
- Savitvarkio monosluoksniu tirpalas: 10 mM WC14 ir  $\beta$ ME tirpalai etanolyje maišomi santykiu 35:65. Bendra tiolių koncentracija 0,1 mM;
- 10 mM DOPC, DOPE, Chol ir DPPC tirpalai chloroforme;
- 10 mM DOPS tirpalas chloroformo ir metanolio (9:1) mišinyje;
- 60 mM kalceino PBS buferyje (2.1 pav. A);
- 10% Tirtan X-100 tirpalas dejonizuotame vandenyje;
- 0,5 mM cholesterolio su prijungta Cy5 molekule tirpalas chloroforme (2.1 pav. B);
- 0,5 mM LRPE tirpalas chloroforme (2.1 pav. C).



2.1 pav. Fluorescuojančių junginių sužadavimo (mėlyna spalva) ir spinduliavimo (raudona spalva) spektrai. A - kalceino; B - Cy5; C - lizamino rodamino B sulfonilo spektrai.

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Stiklo plokštelės padengimas auksu

Stiklo plokštelės valomos mechaniškai, sonikuojamos 20 minučių propanolyje ir nusausinamos azoto srove. Po to 1 valandą inkubuojamos sieros rūgštyje. Sekantis žingsnis yra jų nuplovimas dejonizuotu vandeniu, nusausinimas azoto srove ir patalpinimas į magnetrono PVD75 garinimo sistemos kamerą. Garinimas pradedamas esant  $7 \cdot 10^{-8}$  Torr vakuumi. Pirmiausia plokštelės padengiamos 2 nm storio chromo pasluoksniu, po to 100 nm aukso sluoksniu.

### 2.2.2. Daugiasluosknių liposomų paruošimas

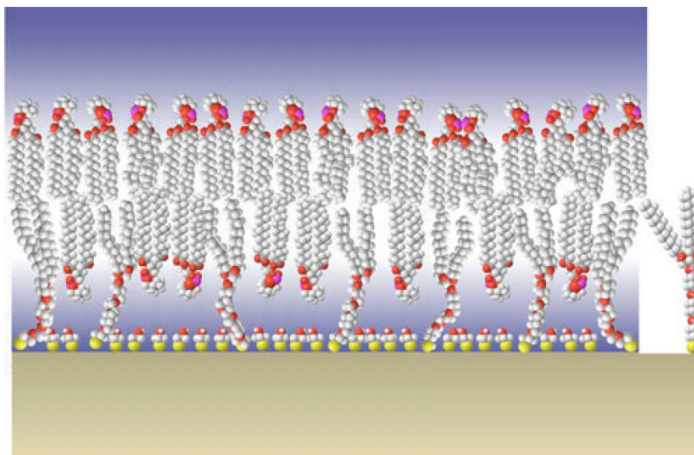
Lipidų tirpalai, kurie paruošti chloroforme yra sumaišomi norimu moliniu santykiu, kad bendra jų koncentracija būtų 1 mM. Tada tirpiklis yra išgarinamas silpna azoto srove. Garinimas vyksta apie 1 valandą ir po jo susidaro lipidinė plėvelė, kuri hidratuojama 4,5 pH fosfatinio buferiniu tirpalu. Susidaro homogeniškas balkšvas tirpalas.

Atliekant fluorescencinės mikroskopijos eksperimentus, buteliuke yra maišomi ne tik lipidai, bet ir 3% LRPE arba 3% cholesterolio su prijungta Cy5 žyme.

### 2.2.3. Prie paviršiaus prikabintų membranų formavimas

Prie paviršiaus prikabintų membranų (tBLM) formavimas yra sudarytas iš dviejų etapų. Pirmojo etapo metu ant auksu padengtos stiklinės plokštelės yra suformuojamas savitvarkis monosluoksnis. Plokštelė yra pamerkiama į 0,1 mM WC14 ir  $\beta$ ME (santykis 35:65) etanolio tirpalą ir inkubuojama 3 valandas. Po inkubacijos, plokštelė nuplaunama etanoliu, kad būtų pašalintas tiolių perteklius, ir nusausinama azoto srove. Surenkama elektrocheminė celė su 14 šulinėlių, kiekviename iš jų yra formuojama atskira tBLM.

Lipidų dvisluoksnis formuojamas liposomų liejimo metodu. Į kiekvieną šulinėlį yra įpilama 100  $\mu\text{L}$  daugiasluoksnių liposomų tirpalo. Liposomų liejimas vyksta apie 30 min ir susiformuoja prikabinta lipidinė membrana (2.2 pav.). Liposomų perteklius pašalinamas kiekvieną šulinėlį plaunant su 15 ml PBS buferio.



2.2 pav. Prie paviršiaus prikabintos lipidinės membranos modelis (McGillivray et al., 2007).

#### 2.2.4. Fluorescencinė mikroskopija

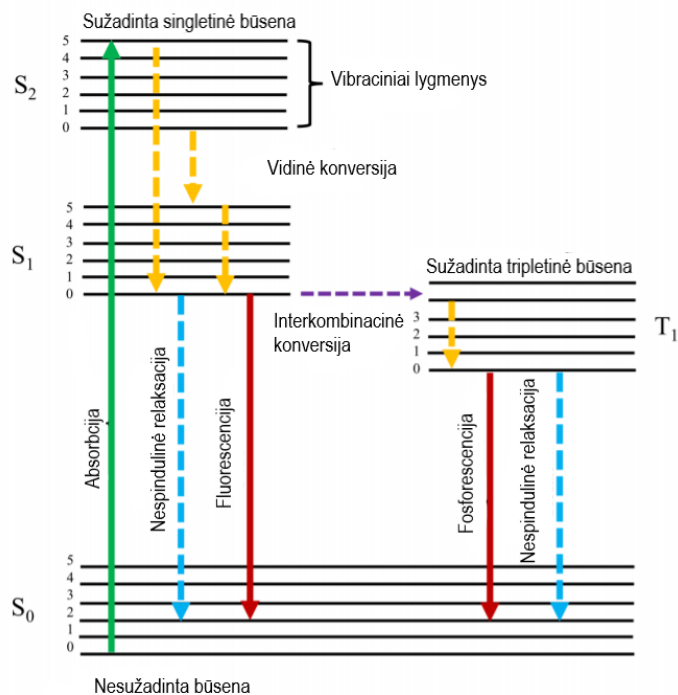
tBLM vizualizacija buvo atlikta fluorescenciniu mikroskopu. Pirmiausia suformuojamos membranos elektrocheminėje celėje ir pamatuojamos elektrinės savybės. Tada, elektrocheminė celė išrenkama po vandeniu, kad tBLM išliktų stabilios ir nesuirytų. Aukso padengta plokštelė su suformuotomis tBLM yra perkeliama į Petri lėkštelę, kurioje nuplaunami likę nešvarumai ir atliekamas membranų vizualizavimas.

Fluorescencinės mikroskopijos matavimai atliekami naudojant vandens 10x imersinį objektyvą (UMPlanFN-W (10x/0,30 N.A. (Olympus, JAV))). Žadinimo šviesos šaltinis - gyvsidabrio lempa. Šviesa nukreipiama per žalios spalvos filtrą, kad mėginys būtų apšviečiamas  $\sim 570$  nm ilgio bangomis ir vyktų Cy5, bei LRPE fluoroforų sužadinimas. Fluorescencija stebima realiu laiku naudojant Exi Aqua (Qimaging, Canada) kamerą ir Qcapture (Silicon Graphics, JAV) programinę įrangą. Vaizdai fiksuojami nuotraukose, kurios apdorojamos ImageJ programa (atviro kodo programa).

##### 2.2.4.1. Fluorescencinės mikroskopijos teorija

Fluorescencija yra liuminiscijos rūšis. Tai procesas, kurio metu yra išspinduliuojamas šviesos kvantas praėjus kelioms nanosekundėms po šviesos sugerties. Fluorescenciją patogu aiškinti naudojant Jablonskio diagramą (2.3 pav.). Kairėje diagramos pusėje yra singletinės būsenos. Jose elektronų pora turi priešingus sukinius ( $+\frac{1}{2}$  ir  $-\frac{1}{2}$ ). S0 yra

pagrindinė būseną. Molekulė yra šioje būsenoje prieš sužadimą šviesa. S<sub>1</sub> ir S<sub>2</sub> yra sužadinti energijos lygmenys, kuriuose elektronas atsiduria fluoroforui sugėrus šviesos kvantą. S<sub>2</sub> būseną turi daugiau energijos nei S<sub>1</sub>, o S<sub>1</sub> daugiau, nei S<sub>0</sub>. Kiekviename elektronų energijos lygmenyje yra keletas vibracinių energijos lygmenų (Lichtman ir Conchello, 2005).



2.3 pav. Jablonskio diagrama. S raide yra žymimi singletiniai elektronų lygmenys, o T - tripletiniai. Brūkšninės linijos žymi procesus kurių metu nėra sugeriami ar išspinduliuojami šviesos kvantai (Gomes et al., 2019)

Visa fotono energija yra perduodama fluoroforui, kai jis sugeria šviesą. Fotono energija priklauso nuo jo bangos ilgio. Jei absorbuoto fotono energija yra didesnė, nei jos reikia elektronui pereiti iš S<sub>0</sub> į S<sub>1</sub> elektronų lygmenį, tai elektronas pateks į aukštesnę S<sub>1</sub> būsenos vibracinį lygmenį arba pereis į dar aukštesnę sužadintą būseną (S<sub>2</sub>). Molekulė dalies energijos netenka, kai pradeda vibruoti t.y. vyksta vidinė konversija, kurios metu elektronas pereina į žemiausia S<sub>1</sub> būsenos vibracinį lygmenį. Toliau vyksta elektrono grįžimas į nesužadintą lygmenį, kurio metu yra išspinduliuojamas šviesos kvantas, kuris turi mažiau energijos, nei tas kuris buvo sugertas. Skirtumas tarp sugerto ir išspinduliuoto kvanto bangos yra Stokso poslinkis. Fluorescencijos emisijos greitis yra  $10^8 \text{ s}^{-1}$ , todėl fluorescencijos gyvavimo laikas yra apie 10 ns (Gomes et al., 2019).

Fluorescencinė mikroskopija yra vaizdinimo būdas, kurio metu mėginys yra nudažomas fluorescuojančiais dažais ir stebimas pro mikroskopą. Atliekant eksperimentus bandinys yra apšviečiamas šviesa, kurios bangos ilgis yra santykinai trumpas. Sužadintas

dažas emituoja ilgesnio bangos ilgio šviesą – vyksta fluorescencija. Dažniausiai šviesos šaltinis būna ksenono arba gyvsidabrio lempa arba lazeris, be to yra naudojami specifiniai filtrai, praleidžiantys skirtingo ilgio bangas, todėl matavimo metu stebime švytėjimą tamsiame fone (Fleming, 2017).

### 2.2.5. Elektrocheminio impedanso spektroskopija

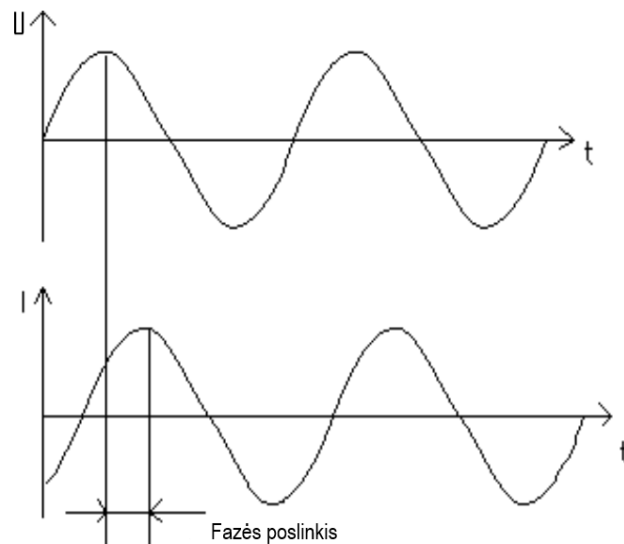
Elektrocheminio impedanso spektroskopijos matavimai atliekami naudojant Zahner Zennium (Vokietija) firmos elektrocheminę darbo stotį ir Thales programinę įrangą. Naudojama trijų elektrodų sistema. Ją sudaro darbinis elektrodas (stiklo plokštelė padengta aukso sluoksniu), palyginamasis elektrodas, kuris yra Ag/AgCl/NaCl sotusis mikroelektrodas ir pagalbinis elektrodas (0,25 mm diametro platinos viela apsukta apie palyginamąjį elektrodą). Matavimai atliekami nuo 0,5 Hz iki 100 kHz diapazone, o duomenys apdorojami naudojant Zview (Scribner Associates, JAV) programinę įrangą.

#### 2.2.5.1. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodo teorija

Elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS, angl. electrochemical impedance spectroscopy) yra analizinis metodas naudojamas tirti elektrochemines sistemas. Metodas yra jautrus paviršiaus pokyčiams, pavyzdžiui, polimerinių sluoksnių kitimui ar paviršiaus pasikeitimui dėl baltymo adsorbcijos. Atlikus EIS matavimus galima gauti įvairius tiriamos sistemos elektrinius parametrus, pavyzdžiui, talpą, tirpalo varžą (Orazem ir Tribollet, 2008; Valincius et al., 2012).

Eksperimento metu sistemai užduodama kintama įtampa ir matuojamas srovės atsakas. Spektras gaunamas atliekant matavimus skirtinguose dažniuose, dažniausiai nuo 0,1 Hz iki 100 kHz diapazone. Naudojamas signalas būna mažas (iki 10mV), todėl sistemos atsakas yra linijinis. Linijinėje sistemoje sužadinimas yra vykdomas naudojant sinusoidiškai kintančią įtampą, o atsakas į žadinimą yra sinusoidiškai kintantis srovės stipris, kuris yra tokio pat dažnio, bet pasislinkęs per fazę ir turi kitokią amplitudę (2.4 pav.) (Alahi ir Mukhopadhyay, 2019).





2.4 pav. Sinusoidinis kintamos srovės atsakas į suteiktą kintamą įtampą. Įtampa ir srovė skiriasi per fazę, bei jų amplitudės yra nevienodos, tačiau abu dydžiai kinta tuo pačiu dažniu.

Elektros grandinėje sudarytoje iš vieno elemento (idealaus rezistoriaus) varža yra apibrėžiama Omo dėsnio:

$$R = \frac{U}{I}, \quad (2.1)$$

kur  $R$  yra varža ( $\Omega$ ),  $U$  - įtampa (V),  $I$  - srovės stipris (A). Šis dėsnis tinka dviem atvejais. Pirmasis yra, kai naudojama nuolatinė elektros srovė. Antruoju atveju sistemai užduodama kintama srovė, bet dažnis visada turi būti lygus 0 Hz. Kai varža priklauso nuo dažnio, yra naudojama analogiška Omo dėsnui – Impedanso lygtis:

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

kur  $Z$  yra impedansas ( $\Omega$  arba  $\Omega \cdot m^2$ ),  $U$  - įtampa (V),  $I$  - srovės stipris (A). Impedansas apibrėžiamas panašiai, kaip varža – medžiagos savybė pasipriešinti elektronų judėjimui, tačiau jis yra bendras sistemos pasipriešinimas elektros srovės tekėjimui. Tai kompleksinis dydis sudarytas iš realaus (varžos) ir menamo (reaktanso/talpos) komponento.

Žadinimo signalas yra išreiškiamas kaip laiko funkcija:

$$U_t = U_0 \sin(\omega t), \quad (2.3)$$

kur  $U_t$  yra įtampa  $t$  laiko momentu,  $U_0$  - signalo amplitudė, o  $\omega$  - kampinis dažnis (rad/s). Ryšys tarp kampinio dažnio  $\omega$  ir dažnio (Hz) yra:

$$\omega = 2\pi f. \quad (2.4)$$

Kai sistema yra linijinė, atsako signalas  $I_t$  yra sinusoidinis, bet pasislinkęs per fazę ( $\phi$ ) ir turi kitokią amplitudę  $I_0$ :

$$I_t = I_0 \sin(\omega t - \phi). \quad (2.5)$$

Naudojama lygtis analogiška Omo lygčiai ir suskaičiuojamas impedansas:

$$Z = \frac{U_t}{I_t} = \frac{U_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t - \phi)}. \quad (2.6)$$

Impedansas yra apibūdinamas dviem dydžiais: amplitudė  $Z_0$  ir fazės poslinkiu  $\phi$ . Pritaikius Eulerio pakeitimą:

$$\exp(j\phi) = \cos\phi + j\sin\phi, \quad (2.7)$$

kur  $j$  yra menamas skaičius, kuris yra lygus  $\sqrt{-1}$ . Impedansa galima išreikšti kaip kompleksinę funkciją. Įtampa apibūdinama taip:

$$U_t = U_0 \exp(j\omega t), \quad (2.8)$$

srovės atsakas:

$$I_t = I_0 \exp(j\omega t - \phi). \quad (2.9)$$

Impedansas apibūdinamas kaip kompleksinis skaičius:

$$Z(\omega) = \frac{U}{I} = Z_0 \exp(j\phi) = Z_0 (\cos\phi + j\sin\phi) = Z' + jZ'' . \quad (2.10)$$

Impedansas yra sudarytas iš realios komponentės ( $Z'$ ) ir menamos komponentės ( $Z''$ ). Absoliuti impedanso  $|Z|$  vertė apskaičiuojama:

$$|Z| = (Z'^2 + Z''^2)^{1/2}. \quad (2.11)$$

Impedansui atvirkščias dydis yra elektrocheminis laidumas:

$$Y = Z^{-1} = \frac{I}{U}, \quad (2.12)$$

kur  $Y$  - kompleksinis laidumas (S arba S/m<sup>2</sup>) (<https://www.gamry.com>).

### *EIS spektroskopijoje naudojami ekvivalentinės grandinės modeliai*

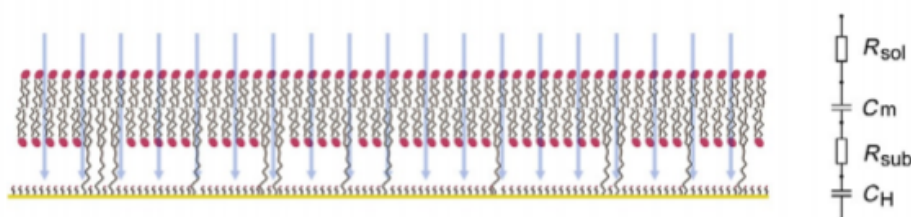
EIS duomenys yra analizuojami naudojant ekvivalentinės grandinės modelius. Dažniausiai ekvivalentinę grandinę sudaro rezistoriai, kondensatoriai, induktoriai (2.1 lentelė). Grandinė yra suprojektuojama taip, kad tikros elektrocheminės sistemos atsakas atitiktų modelio spektrines savybes (Valincius et al., 2012).

2.1 lentelė. Ekvivalentinės grandinės elementai.

Komponentas	Srovė ir įtampa	Impedansas
Rezistorius	$E = IR$	$Z = R$
Induktorius	$E = L di/dt$	$Z = j\omega L$
Kondensatorius	$I = C dU/dt$	$Z = 1/j\omega C$

Rezistorius apibūdina Faradėjaus krūvio perkėlimą reakcijos metu, pavyzdžiui, elektrono perėjimą iš elektrodo paviršiaus į elektrolito tirpalą ir atvirkščiai. Rezistoriaus impedansas yra lygus jo varžai (Bredar et al. 2020). Jis nepriklauso nuo dažnio ir neturi menamos komponentės. Todėl, srovė tekanti per rezistorių ir įtampa išlaiko vienodą fazę. Didėjant dažniui induktoriaus impedansas didėja. Jis, priešingai nei rezistorius, turi tik menamą impedanso komponentę. Srovė tekanti per induktorių skiriasi nuo įtampos per  $-90^\circ$ . Kondensatoriaus impedansas mažėja, kai didėja dažnis. Jis, kaip ir induktoriaus impedansas, turi tik menamą komponentę, todėl srovė tekanti per kondensatorių nuo įtampos pastumta per  $90^\circ$  (<https://www.gamry.com>).

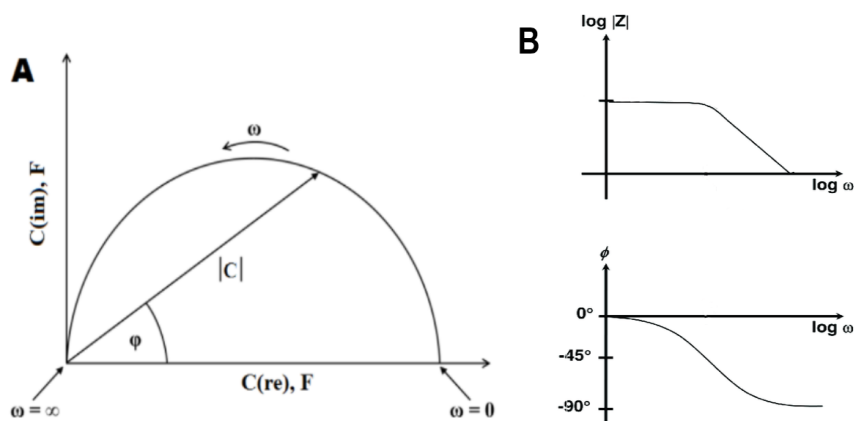
Defektų neturinčiai tBLM esančiai tirpale, kuriame yra jonų ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , fosfato) tinka paprasta ekvivalentinė grandinė sudaryta iš kelių nuosekliai sujungtų rezistorių ir kondensatorių -  $R_{\text{sol}}$ ,  $C_m$ ,  $R_{\text{sub}}$  ir  $C_H$ , kurie vaizduoja laidžiuosius ir dielektrinius sluoksnius (2.5 pav.).  $R_{\text{sol}}$  yra buferio varža,  $R_{\text{sub}}$  vaizduoja plono sluoksnio tarp fosfolipidų dvisluoksnio ir kieto paviršiaus varžą,  $C_H$  yra talpa tarp metalo ir vandens rezervuaro, o  $C_m$  yra fosfolipidų dvisluoksnio talpa (Valincius et al., 2012).



2.5 pav. Defektų neturinčios tBLM sistemos ekvivalentinė grandinė (Valincius ir Mickevicius, 2015).

#### Duomenų vaizdavimo būdai

Vienas iš būdų atvaizduoti EIS duomenis yra Bode spektras (2.6 pav. B). Bode spektrą sudaro du spektrai: viename yra absoliutaus impedanso ( $|Z| = Z_0$ ), o kitame fazės poslinkio priklausomybė nuo dažnio.



2.6 pav. EIS atvaizdavimo būdai. A - Cole-Cole diagrama; B - Bode spektras (Nonnenmann et al., 2013).

Kitas duomenų vaizdavimo būdas yra Cole-Cole diagramos (2.6. pav. A). Norint gauti tokio tipo grafikus, impedanso realios ir menamos komponentės yra perskaičiuojamos į realias ir menamas elektrines talpas:

$$C' = \frac{Z'}{\omega|Z|^2}, \quad (2.13)$$

$$C'' = \frac{Z''}{\omega|Z|^2}. \quad (2.14)$$

Menamos elektrinės talpos vertė atidedamos Y ašyje, o realios - X ašyje. Membranų neturinčių defektų (2.5 pav.) Cole-Cole diagrama yra idealus pusapskritimis.

#### *Elektrocheminio impedanso spektroskopijos taikymas tBLM tyrimuose*

tBLM ant kieto paviršius turi panašias savybes, kaip plokščiasis kondensatorius. Kadangi tBLM dažniausiai nebūna ideali (turi pažeidų), tai šios membranos nesielia idealiai, o veikia kaip pastovios fazės elementas (CPE, angl. constant phase element). Pastovios fazės elemento impedansas išreiškiamas lygtimi:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{(j\omega)^\alpha CPE}, \quad (2.15)$$

kur  $Z_{CPE}$  yra impedansas,  $CPE$  yra pastovios fazės elementas, o  $\alpha$  kondensatoriaus rodiklis, kuris gali būti lygus nuo 0 iki 1 (jei  $\alpha = 1$ , tai kondensatorius yra idealus). Pastovios fazės elemento  $\alpha$  yra mažesnė, nei 1. Kuo  $\alpha$  yra mažesnis, tuo heterogeniškesnė yra tBLM.

Dielektrinio sluoksnio, kurį sudaro susiformavusi membrana, elektrinė talpa priklauso nuo membranos storio, dielektrinių savybių ir elektrodo matmenų:

$$C = \frac{\epsilon\epsilon_0 A}{d}, \quad (2.16)$$

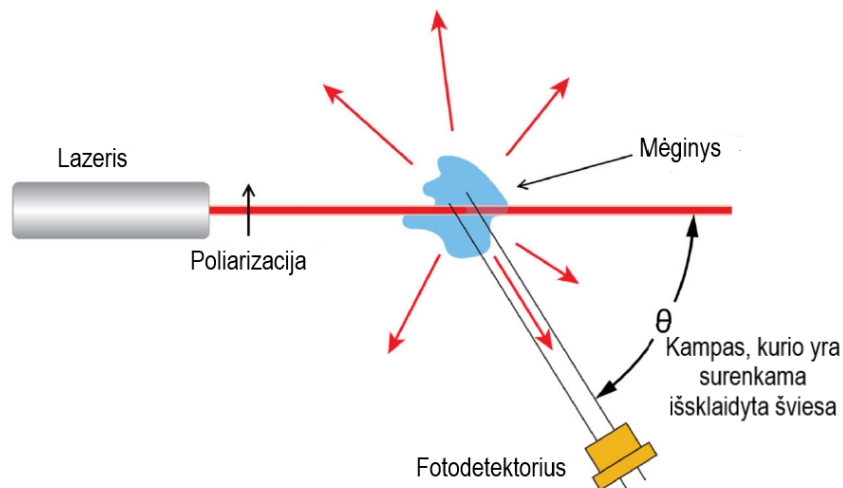
kur  $\epsilon_0$  yra dielektrinė konstanta ( $8,85 \cdot 10^{-14}$  F/cm),  $\epsilon$  – membranos santykinė dielektrinė skvarba,  $A$  – membranos paviršiaus plotas ( $cm^2$ ),  $d$  – membranos storis ( $cm$ ) (Valincius ir Mickevicius, 2015).

### 2.2.6. Dinaminė šviesos sklaida

Dinaminės šviesos sklaidos (DLS, angl. dynamic light scattering) matavimams naudojamas „Zetasizer  $\mu V$ “ spektrofotometras, o duomenys analizuojami su Zetasizer Software (Malvern Instruments, Jungtinė Karalystė) programine įranga. Detektorius išsklaidytą šviesą matuoja  $90^\circ$  kampu. Matavimai atliekami naudojant 4.5 ml tūrio kiuvetes  $25^\circ C$  temperatūroje.

#### 2.2.6.1. Dinaminės šviesos sklaidos metodo teorija

Dinaminė šviesos sklaida (DLS) dar žinoma, kaip fotonų koreliacijos spektroskopija, yra metodas skirtas nustatyti dalelių dydį tirpale. Atliekant DLS eksperimentus monochromatinės šviesos spindulys yra nukreipiamas į mėginį, mėginyje esančios dalelės išsklaido šviesą visomis kryptimis, o detektorius tam tikru kampu fiksuoja išsklaidytos šviesos intensyvumą (2.7 pav.) (Lim et al., 2013).



2.7 pav. DLS matavimo schema (Minton, 2016).

Matavimo metu yra stebimas išsklaidytos šviesos intensyvumo kitimas nuo laiko, kuris vyksta dėl dalelių Brauno judėjimo. Tai leidžia nustatyti difuzijos koeficientą ( $D$ ) ir pritaikius Stokso – Einstein lygtį rasti hidrodinaminį dalelės spindulį (Cummins, 1974):

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta R_h}, \quad (2.17)$$

kur  $k_b$  yra Bolcmano konstanta ( $1,380 \cdot 10^{-23} \text{kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $T$  – absoliuti temperatūra,  $\eta$  yra terpės klampumas,  $R_h$  – hidrodinaminis dalelės spindulys. Iš (2.17) lygties galima pastebėti, kad dalelės difuzija priklauso nuo temperatūros, terpės klampumo ir dalelės dydžio.

Matavimo pradžioje, įvairaus dydžio dalelių koreliacijos funkcija yra linijinė ir pastovi. Tai reiškia, kad tirpale esančios dalelės nejuda. Vėliau matomas koreliacijos funkcijos mažėjimas, dėl dalelių judėjimo. Mažos dalelės tirpale difunduoja daug greičiau, nei didesnės, todėl intensyvumo svyravimai kinta daug sparčiau laike ir koreliacijos funkcija mažėja greičiau (2.8 pav. A,B). Didelės dalelės juda lėtai ir jų išsklaidytos šviesos kitimas yra lėtesnis, bei koreliacijos funkcija išlieka pastovi ilgesnį laiką (2.8 pav. C,D). Koreliacijos funkcija yra naudojama apibūdinti išsklaidytos šviesos svyravimus. Ji gaunama matuojant intensyvumo svyravimus ir jų koreliaciją tam tikrais laiko tarpais (nanosekundėmis arba mikrosekundėmis). Išmatuotas intensyvumas yra normalizuojamas integruojant pradiniam laiko taške  $t$  ir po tam tikro laiko  $\tau$ :

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t)^2 \rangle}. \quad (2.18)$$

Išmatuoti kiekvienos dalelės judėjimą tirpale yra neįmanoma, todėl matuojamas normalizuotas elektrinis laukas  $E$ :

$$g_1(\tau) = \frac{\langle E(t)E(t+\tau) \rangle}{\langle E(t)^2 \rangle}. \quad (2.19)$$

Normalizuota intensyvumo koreliacijos funkciją ir normalizuota elektrinio lauko funkciją galima susieti panaudojus Siegerto sąryšį:

$$g_2(\tau) = B + \beta |g_1(\tau)|^2, \quad (2.20)$$

kur  $B$  yra bazinė linija (apytiksliai lygi 1),  $\beta$ - koherencijos faktorius, kuris priklauso nuo detektoriaus paviršiaus ploto, optinio lyginimo ir dalelių gebėjimo išsklaidyti šviesą. Esant monodispersiniam mėginiui, normalizuoto intensyvumo koreliacijos funkcija ( $g_1(\tau)$ ) kinta eksponentiškai ir priklauso nuo slopinimo konstantos  $\Gamma$ :

$$g_2(\tau) = 1 + \beta e^{-2\Gamma\tau}, \quad (2.21)$$

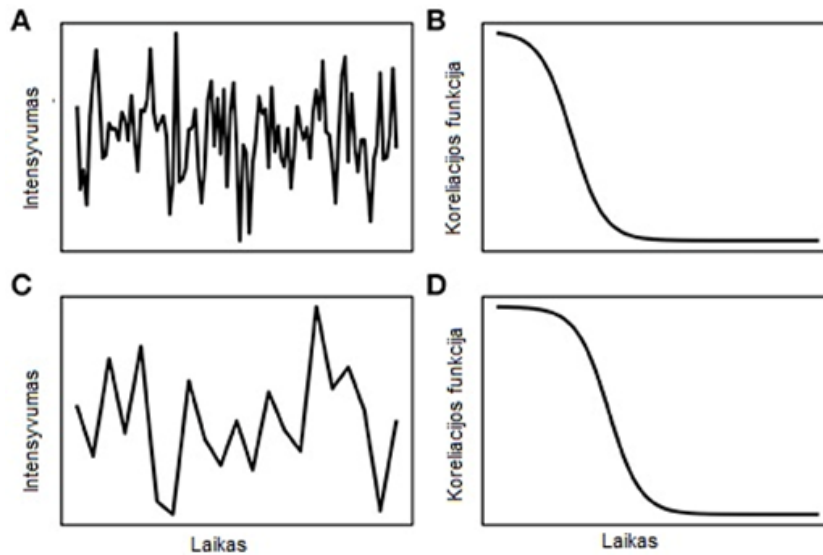
o  $\Gamma$  yra susijusi su dalelių difuzijos koeficientu  $D$ :

$$\Gamma = Dq^2, \quad (2.22)$$

kur  $q$  yra išsklaidymo vektorius, kuris tiesiogiai proporcingas lūžio rodikliui ( $n_0$ ) ir atvirkščiai proporcingas bangos ilgiui ( $\lambda$ )

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin(\theta/2), \quad (2.23)$$

kur  $\theta$  yra kampas, kurio detektorius surenka išsklaidytą šviesą.

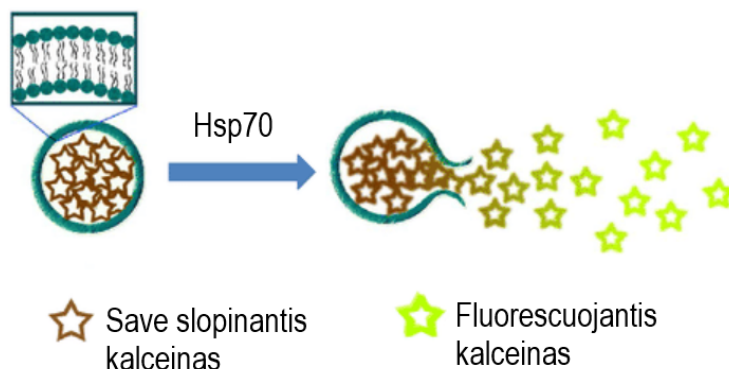


2.8 pav. Mažų (A, B) ir didelių (C,D) dalelių išsklaidytos šviesos intensyvumų ir koreliacijos funkcijų kitimai. Mažos dalelės juda greičiau, nei didelės, todėl jų išsklaidomos šviesos intensyvumas kinta greičiau, bei koreliacijos funkcija pradeda slopti praėjus mažiau laiko (Carvalho et al., 2018).

### 2.2.7. Kalceinu užkrautų liposomų gamyba ir lizavimas

Kalceinu užkrautos vienasluoksnės liposomos yra tinkamos stebėti baltymo - membranos sąveikai. Kalceinas yra vandenyje tirpus, žaliai fluorescuojantis dažas, kuris save slopina, kai koncentracijos yra didelės (Allen ir Cleland, 1980). Kalceinas naudojamas ląstelių gyvybingumo ir lipidinių liposomų membranos laidumo tyrimuose. Eksperimento metu, kalceino koncentracija liposomų viduje yra didelė (2.9 pav). Vadinasi, kalceinas save slopina. Be to, kalceinas turi mažą pralaidumo koeficientą per lipidinę membraną. Todėl, kol liposomos nesąveikauja su taikiniu, stebimas fluorescencijos intensyvumas tik dėl nedidelio

kalceino nuotekio. Pridėjus baltymo, kuris ardo membranas, jis jungiasi su liposomomis, sutrikdo membranos integralumą ir kalceinas patenka į tirpalą (savęs slopinimas nebevysta), o fluorescencija smarkiai padidėja (Shimanouchi et al., 2009).



2.9 pav. Kalceinu užkrautų liposomų lizavimas Hsp70. Kalceino koncentracija liposomų viduje yra didelė, todėl jis pats save slopina. Kai baltymas prisijungia prie membranos, sutrinka jos integralumas ir kalceinas patenka į tirpalą. Ten jo koncentracija yra nedidelė, todėl kalceinas pradeda fluorescuoti (Sun et al., 2014).

Šiame tyrime yra naudojamos kalceinu užpildytos vienasluoksnės liposomos. Jų gamyba susideda iš keletos žingsnių. Pirmajame pagaminamos daugiasluoksnės liposomos kaip aprašyta 2.2.2. skyriuje, tik lipidų koncentracija yra 2 nM ir lipidinė plėvelė yra užpilama ne fosfatiniu buferiu, kurio pH 4,5, o 60 mM kalceino turinčiu fosfatiniu buferiu (pH 7,5). Tada atliekami 5 šildymo – šaldymo ciklai, bei liposomos 30 min sonikuojamos. Šildymas – šaldymas ir sonikavimas padeda kalceinui patekti į liposomų vidų. Po to, iš daugiasluoksninių liposomų formuojamos vienasluoksnės liposomos ekstruzijos metodu. Lipidinės struktūros praleidžiamos pro 100 nm dydžio poras turinčią polikarbonato membraną. Tirpalas prastumiamas per membraną 21 kartą. Dydžio sumažinimas vykdomas aukštesnėje temperatūroje, nei yra lipidų fazinio virsmo temperatūra. DPPC fazinio virsmo temperatūra yra 41 °C, todėl formuojant DPPC/DOPS (80:20) liposomas, šis žingsnis vykdomas aukštesnėje už 41 °C temperatūroje. Visi kiti naudojami lipidai kambario temperatūroje yra skysti, todėl eksperimentai vykdomi 21 °C temperatūroje. Paskutinis liposomų paruošimo žingsnis yra neinkapsuliuoto kalceino pašalinimas iš vienasluoksninių liposomų tirpalo. Šiame etape vykdoma dydžio išskyrimo chromatografija naudojant sefadekso G-50 kolonėlę (2.10 pav.).





2.10 pav. sefdekso G-50 kolonėlė. Viršutinė raudona juosta yra neinkapsuliuotas kalceinas, o kolonėlės apačioje esanti geltona juosta yra liposomos su inkapsuliuotu kalceinu.

Fluorescencijos matavimai atliekami “Varian Cary Eclipse“ (Agilent, JAV) spektrofotometru. Matavimo metu kiuvetėje vienasluoksnių liposomų tirpalas praskiedžiamas 400 kartų. Užrašoma bazinė linija naudojant 490 nm ilgio žadinimo bangą ir stebima emisija esant 520 nm ilgio bangai. Į kiuvetę įinjektuojamas Hsp70. Hsp70 jungiasi prie membranos ir kalceinas yra išlaisvinamas į tirpalą, kur pradeda fluorescuoti. Užrašoma jo fluorescencija. Tada į kiuvetę yra įpilamas Triton X-100 perteklius, kuris visiškai suardo liposomas ir stebimas 100% kalceino išleidimas. Baltymo poveikis liposomoms (t.y. išleisto kalceino koncentracija  $F\%$ ) yra normalizuojamas naudojant šią formulę:

$$F\% = \frac{F_t - F_i}{F_f - F_i} \cdot 100\%, \quad (2.24)$$

kur  $F_t$  yra 100% išleisto kalceino fluorescencija (A.U.),  $F_i$  bazinės linijos fluorescencija (A.U.), o  $F_f$  baltymu paveiktų liposomų fluorescencija (A.U.).

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

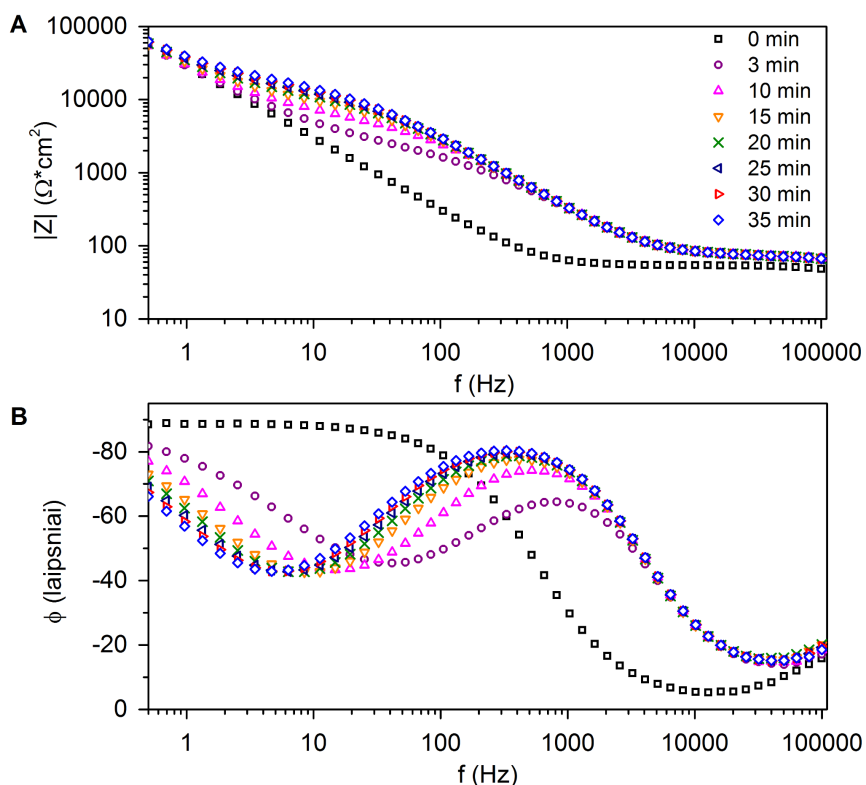
#### 3.1. Rezultatų įvadas

Hsp70 yra svarbus įvairiuose patologiniuose procesuose. Padidėjusi baltymo koncentracija yra randama infekcijų, vėžio, ūminio pankreatito metu ir t.t. Hsp70 veikimo mechanizmas nėra iki galo iširtas ūminio pankreatito atveju. Arispe et al. parodė, kad baltymas geba membranoje formuoti poras (Arispe et al., 2004). Todėl, šiame darbe yra tirama Hsp70 sąveika su dviejų tipų modelinėmis sistemomis: tBLM ir liposomomis.

#### 3.2. Prie paviršiaus prikabintos fosfolipidinės membranos charakterizavimas

##### 3.2.1. Prie paviršiaus prikabintos membranos formavimosi tyrimas elektrocheminio impedanso metodu

Prie paviršiaus prikabintos membranos (tBLM) formavimasis buvo stebėtas realiu laiku EIS metodu, o duomenys analizuojami naudojant Bode diagramą. EIS Bode diagramos yra tinkamos stebėti lipidinio dvisluoksnio formavimąsi ant savitvarkio monosluoksnio (SAM) ir šio proceso metu vykstančių elektrinių parametrų pokyčius (Valincius et al., 2012). Eksperimento metu ant mišraus savitvarkio monosluoksnio ( $\beta$ ME:WC14 (65:35)), liposomų liejimosi metodu, buvo formuojama tBLM membrana sudaryta iš DOPC/Chol (60:40). Aukštų dažnių srityje ( $>10^4$  Hz) impedanso modulio  $|Z|$  vertės yra pastovios (3.1 pav. A), kurios atspindi tirpalo varžos savybes. Vidutinių dažnių srityje šio elektrinio parametro vertės didėja tiesiškai, kai dažnis mažėja. Ties fazės minimumu, šis tiesiškas didėjimas nutrūksta (Rakovska et al., 2015). Formuojantis tBLM, impedanso modulio  $|Z|$  vertės dažnių srityje nuo 100 Hz iki 5 Hz didėja, priklausomai nuo laiko (3.1 pav. A). Proceso metu fazės minimumas slenkasi į mažesnių dažnių sritį (3.1 pav. B). Liposomų liejimosi pradžioje susiformuoja keletas membranos „sėklų“, o toliau vyksta lipidų dvisluoksniu nepadengtų plotų mažėjimas, todėl fazės minimumas iš pradžių yra ties  $\sim 90^\circ$  (nulinę minutę) ir staigiai nusileidžia formuojantis membranai (Ragaliauskas et al., 2017). Praėjus 35 min nuo tBLM formavimosi pradžios, EIS spektrai nebekinta (fazės minimumo ir laidumo vertės tampa stabilios) (3.1 pav. A ir B). Vadinasi, iš DOPC ir Chol sudaryta membrana pilnai susiformuoja per 35 min.



3.1 pav. tBLM formavimosi laike EIS Bode diagramos. Matavimai atlikti 35 minučių intervale nuo liposomų injektavimo į šulinėlį ir liejimosi pradžios. tBLM formuota iš  $\beta$ ME:WC14 (65:35) ir DOPC/Chol (60:40). A – impedanso grafikas; B – fazės grafikas.

tBLM formavimosi metu nustatytos talpos vertės yra pateiktos 3.1 lentelėje. Savitvarkio monosluoksnio, ant kurio yra formuojamas lipidinis dvisluoksnis, elektrinė talpa yra  $5,3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Prasidėjus liposomų liejimuisi šis dydis pradeda kisti iš karto, o po 15 minučių elektrinė talpa tampa pastovi ir lygi  $0,48 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . tBLM talpa pasikeičia apie 11 kartų, nuo vezikulių liejimosi pradžios. Šio elektrinio parametro sumažėjimas rodo, kad dielektriko sluoksnis ant Au elektrodo pastorėja – susiformuoja lipidų dvisluoksnis (McGillivray et al., 2007).

3.1 lentelė. tBLM talpos ir laidumo priklausomybė nuo laiko vezikulių liejimosi metu. tBLM formuojama iš DOPC:Chol (60:40). Parametrų vertės normalizuotos į geometrinį aukso elektrodo plotą.

Laikas (min)	tBLM laidumas, Y ( $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ )	tBLM talpa, C ( $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ )
0	-	5,3
3	402	0,43
10	157	0,46
15	95	0,48
20	75	0,48
25	68	0,48
30	56	0,48
35	53	0,48

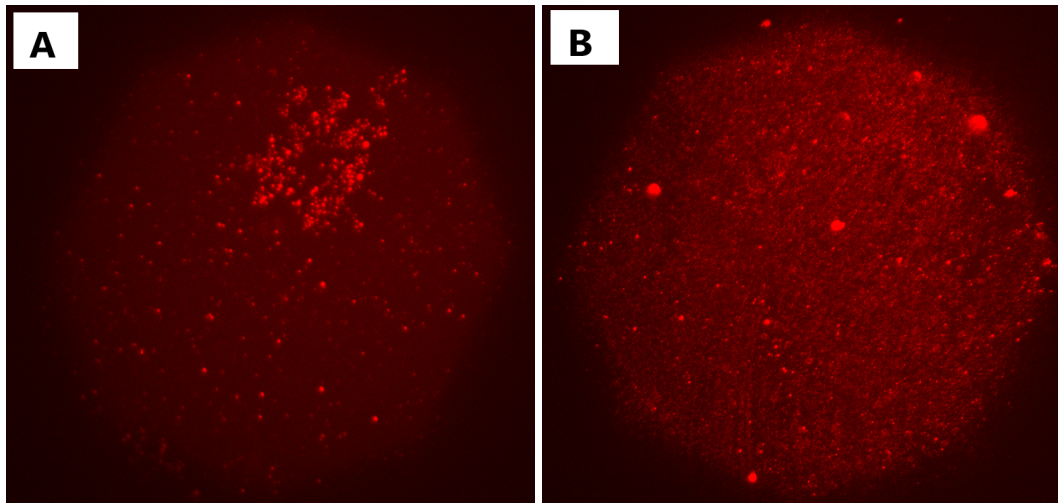
tBLM laidumas atitinka fazės minimumo reikšmę pagal formulę (2.12). tBLM laidumo parametras leidžia įvertinti susiformavusios membranos izoliacines savybes. SAM nesudaro izoliuojančio sluoksnio, todėl jo laidumo reikšmė lentelėje nepateikta (3.1 lentelė). Pirmasis matavimas po liposomų liejimo pradžios buvo atliktas praėjus 3 minutėms, tuo metu nustatytas tBLM laidumas yra  $402 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ . Tolimesni matavimai buvo atliekami kas 5 minutes. Rezultatai rodo, jog tBLM laidumas mažėja laikui bėgant, tai rodo, jog formuojasi izoliuojantis bisluoksnis. Laikui bėgant laidumo reikšmės įsisotina ir toliau laikui bėgant nebekinta. Kas rodo, jog susiformavo stabili ir izoliuojanti tBLM.

Norint suformuoti skirtingų sudėčių tBLM, reikalingas skirtingas liposomų liejimosi laikas. Šis procesas gali užtrukti iki 1 valandos ir daugiau, priklausomai nuo liposomų lipidinės sudėties (Ragaliauskas et al., 2017). Magistriniame darbe buvo naudojamos dvi skirtingos tBLM kompozicijos. Izoliuojančių tBLM, kurios sudarytos iš DOPC/Chol (60:40) ir DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30), suformavimo laikas buvo 30-35 minučių.

### 3.2.2. Prie paviršiaus prikabintų membranų morfologijos tyrimas

Susiformavusių tBLM morfologija buvo tirta fluorescencinės mikroskopijos metodu. Pirmiausia, tBLM sudarytos iš DOPC/Chol (60:40) ir DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30) buvo suformuotos vezikulių liejimo būdu. Fluorescencijos matavimuose buvo naudotos dvi fluorescencinės žymės: Cy5 ir lizaminas rodaminas. Žymė Cy5 pradeda fluorescuoti, kai apšviečiama 650 nm bangos ilgiu, o lizaminas rodaminas - 560 nm. Suformuotose tBLM vienu atveju buvo 5 % cholesterolio, žymėto Cy5 fluorescuojančia žyme, arba 5 % DOPE su lizamino rodamino žyme (LRPE).

3.2 paveikso A fluorescencijos nuotraukoje matome tBLM, suformuotą iš DOPC/DOPE/Chol/DOPS. Šiuo atveju fluorescuojančią Cy5 žymę turintis cholesterolis pasiskirstęs netolygiai ir formuoja klasterių regioną, kuriame šio dažo yra daugiau, nei likusioje membranos dalyje. Visame mikroskopo regos lauke, taip pat, matosi daug nedidelių fluorescuojančio cholesterolio sankaupų. Tačiau, tBLM, sudarytoje iš DOPC ir Chol, šis dažas pasiskirsto tolygiai, yra tik keletas truputį didesnių dažo sankaupų išsidėsčiusių visoje membranoje (3.2 pav. B). Nors lipidų, turinčių fluorescencinę žymę, išsidėstymas šiose membranose skiriasi, bet vidutinis fluorescencijos intensyvumas yra beveik vienodas. tBLM, sudarytų iš DOPC/DOPE/Chol/DOPS fluorescencijos intensyvumas buvo  $10498 \text{ s. f. v.} \pm 837 \text{ s. f. v.}$  ( $n = 3$ ) (santykiniai fluorescencijos vienetai), o sudarytų iš DOPC/Chol -  $11556 \text{ s. f. v.} \pm 897 \text{ s. f. v.}$  ( $n = 4$ ).

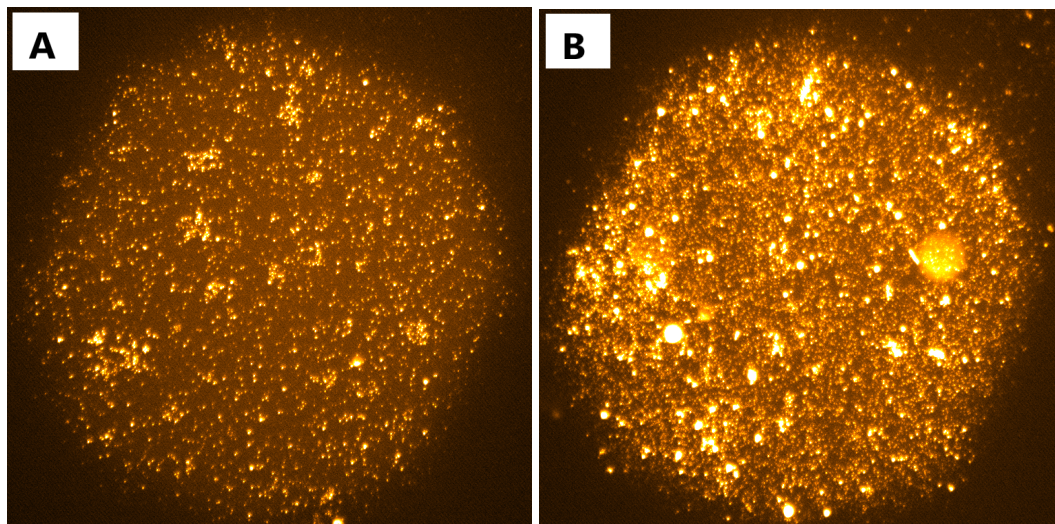


3.2 pav. tBLM suformuotos iš liposomų, kurių sudėtyje yra 5 % Cy5 žymę turinčio cholesterolio. Membranos formuotos ant  $\beta$ ME:WC14 (65:35) SAM. A - tBLM suformuota po liejimosi su DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30) liposomomis; B - tBLM suformuota po liejimosi su DOPC/Chol (60:40) liposomomis. Objektyvas - 10X, matymo laukas - 90  $\mu$ m.

Norėdami tiksliau įvertinti tBLM morfologiją, papildomai buvo atliekami eksperimentai su kita fluorescuojančia žyme – LRPE. Šiuo atveju, DOPE buvo žymėtas su LRPE žyme, o ne cholesterolis. tBLM, suformuotos iš DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30) yra heterogeniškos, jose yra daug fluorescuojančiu dažu žymėtų lipidų klasterių (3.3 pav A). Galime pastebėti, jog įvairaus dydžio lipidinės sankaupos išsidėsčiusios gan tolygiai fluorescenciniame lauke. Tuo tarpu, tBLM, sudarytos iš DOPC ir Chol, matomi beveik vienodo dydžio klasteriai, kurie tolygiai pasiskirstę visoje membranoje (3.3 pav. B). Be to, šioje nuotraukoje matomi trys didesni ir ryškesni taškai siejami su aukso paviršiuje ar stikle esančiais defektais arba kitais nešvarumais. tBLM, sudarytos iš DOPC ir Chol, vidutinis fluorescencijos intensyvumas yra 18291 s. f. v.  $\pm$  3307 s. f. v. (n = 4), o DOPC/DOPE/Chol/DOPS membranos 45% mažesnis (10085 s. f. v.  $\pm$  2168 s. f. v. (n = 4)). Fluorescencijos intensyvumui, DOPC/Chol atveju, turi įtakos matomi stiklo defektų artefaktai.

tBLM, suformuota liejant DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30), pasižymi lipidų klasterių formavimu. Naudojant Cy5 žymę žymėtą cholesterolį, matome, kad cholesterolis formuoja nevienodo dydžio, heterogeniškas sankaupas (3.2 pav A). Tačiau, stebint LRPE žymę žymėtą DOPE, tokioje membranoje yra daug didesnių ir mažesnių klasterių, kurie išsidėstę homogeniškai visame fluorescencijos lauke (3.3 pav. A). Vadinasi DOPE sankaupos tolygiai pasiskirsčiusios visoje tBLM, o cholesterolis linkęs formuoti žymiai didesnius klasterius. Tokie morfologiniai skirtumai šiose membranose, patvirtina lipidinių plaustų egzistavimą, membranose, turinčiose fosfatidilserino, fosfatidiletanolamino, ir cholesterolio (Pike, 2003).

Naudojant Cy5 žyme žymėtą cholesterolį, tBLM sudarytose iš DOPC ir Chol, dominuoja nedideli klasteriai, kurie tolygiai pasiskirstę visoje membranoje (3.2 pav. B). Tuo tarpu, LRPE dažų žymėtoje tBLM yra matomi tamsesni plotai tarp ryškiai šviečiančių taškų (3.3 pav. B). Gal būt, šiuos plotus užpildo cholesterolis, kuris stebėtas naudojant Cy5 žymę.



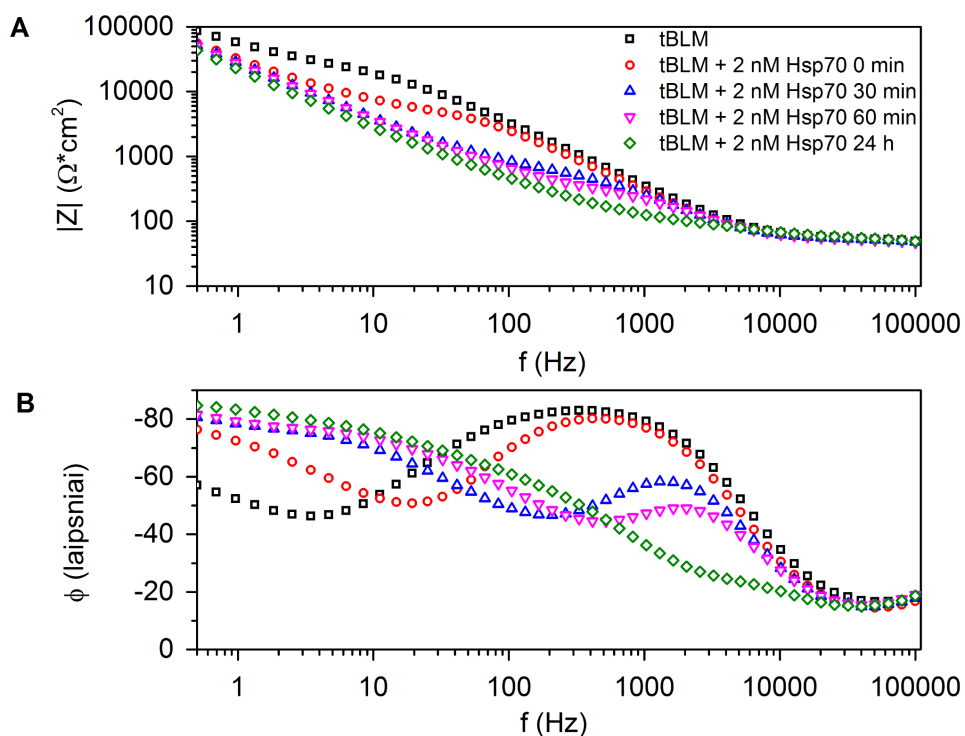
3.3 pav. tBLM suformuotos iš liposomų, kurių sudėtyje yra 5 % lizamino rodamino žymę turinčio DOPE. Membranos formuotos ant  $\beta$ ME:WC14 (65:35) SAM. A - tBLM suformuota po liejimosi su DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30) liposomomis; B - tBLM suformuota po liejimosi su DOPC/Chol (60:40) liposomomis. Objektyvas - 10x, matymo laukas - 90  $\mu$ m.

### 3.3. Hsp70 ir prie paviršiaus prikabintų lipidinių membranų sąveikos tyrimas nuo laiko ir skirtingų baltymo koncentracijų

Hsp70 sąveikos su tBLM tyrimas yra atliekamas elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) metodu. Membranos pažeidimą, kurią sukelia baltymo prisijungimas prie membranos stebime realiu laiku fiksuodami tBLM spektrų pokyčius. Literatūroje yra aprašoma, kad šis baltymas nespecifiškai jungiasi prie membranų, savo sudėtyje turinčių PC (McCallister et al., 2016). Tačiau, Hsp70 specifiškai sąveikauja su anijoniniais lipidais (Armijo et al., 2014; McCallister et al., 2015). Todėl, šio darbo metu buvo pasirinktos dvi skirtingos sudėties tBLM, kurių charakterizavimas aprašytas 3.2.2 skyriuje. Jos pasižymi tuo, kad vienoje yra DOPC, o kitoje neigiamą krūvį turintis DOPS.

Šios dalies tikslas buvo nustatyti Hsp70 ir tBLM sąveikos priklausomybę nuo laiko. 2 nM Hsp70 paveikus DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30) membraną, Bode diagramoje yra stebimas impedanso modulio  $|Z|$  vertės mažėjimas žemų dažnių srityje (3.4 pav. A). Didėjant inkubacijos laikui, fazės minimumas slenkasi į didesnių dažnių sritį (3.4 pav. B). Kuo daugiau laiko praeina nuo baltymo injektavimo į šulinėlį su tBLM, tuo labiau fazės minimumas pasislenka į dešinę. Šie EIS spektro pokyčiai rodo, kad Hsp70 didina membranos

laidumą, inicijuodamas jonų judėjimą per ją. Panašūs tBLM laidumo pokyčiai yra stebimi membranas paveikus poras formuojančiais toksiniais, kurie pažeidžia membranas jose formuodami poras (McGillivray et al., 2009; Ragaliauskas et al., 2019).



3.4 pav. EIS Bode diagrama vaizduojanti tBLM spektrinius pokyčius laike, kai membrana yra paveikiama 2 nM Hsp70. Skirtingos spalvos kreivės vaizduoja skirtingu laiku užrašytus tBLM spektrus. tBLM suformuota iš  $\beta$ ME:WC14 (65:35) ir DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30). A - impedanso grafikas; B - fazės grafikas.

Hsp70 jungiantis prie DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30) tBLM, jos laidumo pokytis priklauso nuo inkubacijos laiko. tBLM laidumo reikšmės buvo išskaičiuotos iš EIS spektro fazės minimumo (3.2 lentelė). Laikui bėgant, tBLM laidumo pokytis didėja, kas rodo didėjančią membranos pažeidimą. Esant mažoms koncentracijoms (nuo 0,5 nM iki 1,5 nM) tBLM nėra suardoma net praėjus 24 h (3.2 lentelė). Tuo tarpu po 24h tBLM inkubacijos su 2 nM Hsp70, dvisluoksnis yra suardomas. tBLM sąveikos metu su didesnėmis nei 2nM koncentracijos Hsp70, lipidų membrana yra suardoma per 60 minučių. Ryškiausias Hsp70 poveikis tBLM yra stebimas po 30 minučių, kai visame Hsp70 koncentracijų intervale stebime tBLM laidumo pokyčius, bet membranos nėra pilnai suardomas. Toks Hsp70 su liposomomis inkubacijos laikas buvo pasirinktas stebint baltymo sąveiką su lipidais.

3.2 lentelė. tBLM, sudarytos iš DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30), laidumo reikšmių pokyčio priklausomybė nuo laiko esant skirtingoms Hsp70 koncentracijoms.  $n \geq 3$ .

Laikas	Laidumo pokytis, $\Delta Y$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ )					
	0,5 nM	1 nM	1,5 nM	2 nM	2,5 nM	5 nM
0 min	2 ± 1	28 ± 14	94 ± 36	184 ± 63	4319 ± 1510	4047 ± 1954
30 min	5 ± 1	31 ± 1	379 ± 234	3312 ± 2420	5670 ± 1822	7195 ± 3201
60 min	6 ± 1	2187 ± 1342	496 ± 245	4188 ± 1235	suardė	suardė
24 h	28 ± 8	2614 ± 825	8600 ± 1788	suardė		

tBLM elektrinės talpos pokytis sąveikos su Hsp70 metu beveik nekinta. Suformuotos tBLM elektrinė talpa yra  $0,43 \mu\text{F}/\text{cm}^2 \pm 0,02 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ( $n = 18$ ). Tuo tarpu po sąveikos su Hsp70 tBLM, talpa yra  $0,46 \mu\text{F}/\text{cm}^2 \pm 0,03 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ( $n = 18$ ) ir išlieka nepakitusi. tBLM talpa žymiai kinta tik tada, kai membrana pilnai suardoma. Lipidų dvisluoksnio elektrinė talpa priklauso nuo dvisluoksnio dielektrinių savybių ir yra atvirkščiai proporcinga jo storiui (McGillivray et al., 2007). Taigi, šie rezultatai leidžia teigti, kad baltymo prisijungimo metu nepakito nei membranos storis, nei dielektrinės savybės.

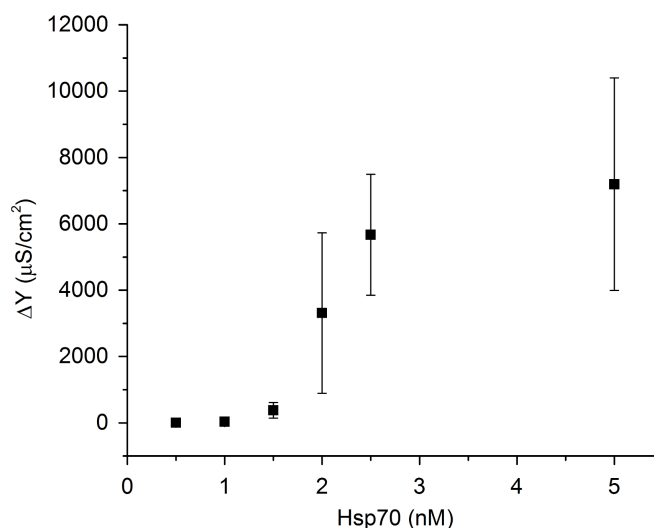
Atliekant eksperimentus su tBLM, suformuotomis iš DOPC/Chol (60:40), buvo gauti panašūs rezultatai (3.3 lentelė). Esant mažoms HSP70 koncentracijoms (0,5 nM ir 1 nM), tBLM po sąveikos su baltymu nėra suardoma per 24 h. Tuo tarpu, po sąveikos su 2,5 nM ir 5 nM Hsp70, tBLM buvo suardyta po 60 minučių, kaip ir neigiamai įkrautų tBLM atveju. Remiantis gautais duomenimis galima teigti, kad sąveikos su Hsp70 metu, tBLM elektrinės talpos ir laidumo pokyčiai kintant laikui nepriklauso nuo membranos sudėties.

3.3 lentelė. tBLM, suformuotų iš DOPC/Chol (60:40), laidumo reikšmių pokyčio priklausomybė nuo laiko esant skirtingoms Hsp70 koncentracijoms.  $n \geq 3$ .

Laikas	Laidumas, $Y$ ( $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ )			
	0,5 nM	1 nM	2,5 nM	5 nM
0 min	4 ± 1	16 ± 8	1878 ± 765	1526 ± 261
30 min	21 ± 6	31 ± 14	1121 ± 5545	3538 ± 1449
60 min	23 ± 1	49 ± 30	suardė	suardė
24 h	4501 ± 2796	5241 ± 3723		



3.5 paveiksle vaizduojama neigiamai įkrautos tBLM, suformuotos iš DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30), laidumo pokyčio priklausomybė nuo Hsp70 koncentracijos, esant fiksuotam inkubacijos, su baltymu, laikui – 30 minučių. Matavimai atlikti naudojant skirtingas Hsp70 koncentracijas (0,5 nM, 1 nM, 1,5 nM, 2 nM, 2,5 nM ir 5 nM). Gauta, kad tBLM laidumo priklausomybė nuo Hsp70 koncentracijos yra panaši į eksponentę (3.5 pav). Kuo didesnė baltymo koncentracija yra naudojama sąveikai su tBLM, tuo didesnis tBLM laidumas pasiekiamas. Mažiausia Hsp70 koncentracija, kuri pažeidžia membraną ir galime stebėti tBLM laidumo pokyčius yra 0,5 nM. Atliekant tokius pat matavimus su neutralia tBLM, sudaryta iš DOPC ir Chol, pastebėjome, kad tBLM laidumo priklausomybė nėra nei tiesiška, nei eksponentinė. Gauti rezultatai išsibarstę, net ir inkubuojant tBLM su didesnėmis Hsp70 koncentracijomis. Pasitelkus EIS metodą buvo patvirtina, kad Hsp70 sąveika su PC yra nespecifinė, o su PS - specifinė.



3.5 pav. tBLM laidumo pokyčio priklausomybė nuo Hsp70 koncentracijos. Inkubacijos laikas 30 min. Membranos sudarytos iš βME:WC14 (65:35) ir DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30).

### 3.4 Hsp70 sąveika su vienasluoksnėmis liposomomis

#### 3.4.1. Liposomų charakterizavimas dinaminės šviesos sklaidos metodu

Tyrimo metu buvo pagamintos keturių skirtingų sudėčių vienasluoksnės liposomos su įsiterpusiu kalceinu viduje. Dalis kalceino liko laisvas, todėl jis iš liposomų tirpalo buvo pašalintas dydžio išskyrimo chromatografijos metodu. Dinaminės šviesos sklaidos matavimai buvo atlikti prieš ir po chromatografijos, norint patikrinti, kaip keičiasi liposomų dydis chromatografijos metu. 3.4 lentelėje pateikti liposomų spindulio ilgio matavimo rezultatai. Visų sudėčių liposomų dydis, po chromatografijos, nežymiai padidėja. Mažiausiai pakinta

liposomų, sudarytų iš DPPC/DOPS (80:20), dydis – nuo 70 iki 73 nm. 5 nm padidėjo dviejų sudėčių liposomos (DOPC ir DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30)). Didžiausias dydžio pokytis po chromatografijos buvo stebimas liposomų, sudarytų iš DOPC/Chol. Jų spindulys padidėjo 12 nm. Taigi, dydžio išskyrimo chromatografijos metu, liposomų dydis pakinta nežymiai, bet skirtingų kompozicijų liposomų dydis kinta skirtingai. Liposomų tirpalui tekant chromatografinė kolona, liposomos sąveikauja su koloną užpildančiu geliu. Kadangi liposomos skiriasi kompozicija, skiriasi ir jas sudarančio dvisluoksnio sąvybės (kietumas ir lankstumas). Vadinasi, jos skirtingai sąveikauja su polimeru esančiu kolonėlėje, todėl ir jų dydis pakinta skirtingai (Grabielle-Madelmont et al., 2003).

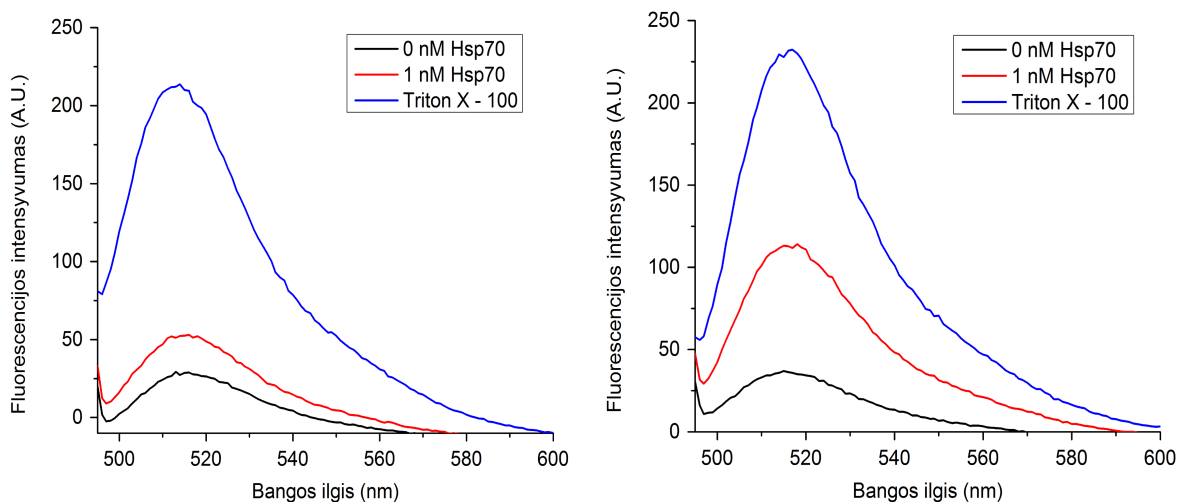
3.4 lentelė. Įvairios sudėties liposomų spindulio ilgis prieš ir po dydžio išskyrimo chromatografijos.

<b>Liposomos</b>	<b>Liposomų spindulys prieš dydžio išskyrimo chromatografiją, r (nm)</b>	<b>Liposomų spindulys po dydžio išskyrimo chromatografijos, r (nm)</b>
DOPC	74 ± 2 (n = 15)	79 ± 6 (n = 15)
DOPC/Chol (60:40)	82 ± 5 (n = 21)	94 ± 10 (n = 21)
DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30)	78 ± 4 (n = 15)	83 ± 5 (n = 15)
DPPC/DOPS (80:20)	70 ± 5 (n = 15)	73 ± 7 (n = 15)

#### 3.4.2. Kalceinu užkrautų liposomų sąveika su Hsp70

Vienas iš būdų stebėti baltymų sąveiką su membranomis yra naudoti kalceinu užkrautas liposomas ir detektuoti sąveikos metu išlaisvinto kalceino fluorescenciją. Pagal duomenis pateiktus 3.3. skyriuje, gauta, jog, Hsp70 skirtingu specifiškumu jungiasi prie skirtingos sudėties membranų.

Eksperimento eigoje buvo stebima Hsp70 sąveika su skirtingos sudėties liposomomis ir stebima išlaisvinto kalceino fluorescencija (3.6 pav.). Neutralių liposomų, sudarytų iš DOPC, sąveikos metu su 1 nM Hsp70, fluorescencijos intensyvumas išauga nuo 29 A.U. iki 52 A.U., paveikus DOPC liposomas TritonX - 100 pertekliumi, fluorescencija yra 213 A.U (3.6 pav. A). Hsp70 sąveikaujant su neigiamai įkrautomis liposomomis, sudarytomis iš DPPC/DOPS (80:20), išlaisvinamo kalceino kiekis yra didesnis (3.6 pav. B). Bazinės linijos fluorescencija yra 37 A.U., po sąveikos su Hsp70 - 114 A.U., o injektavus tritoną - 232 A.U. Šie rezultatai rodo, kad Hsp70 specifiškai sąveikauja su neigiamą krūvį turinčiomis liposomomis, nes sąveikos metu yra išlaisvinama didesnė kalceino koncentracija.



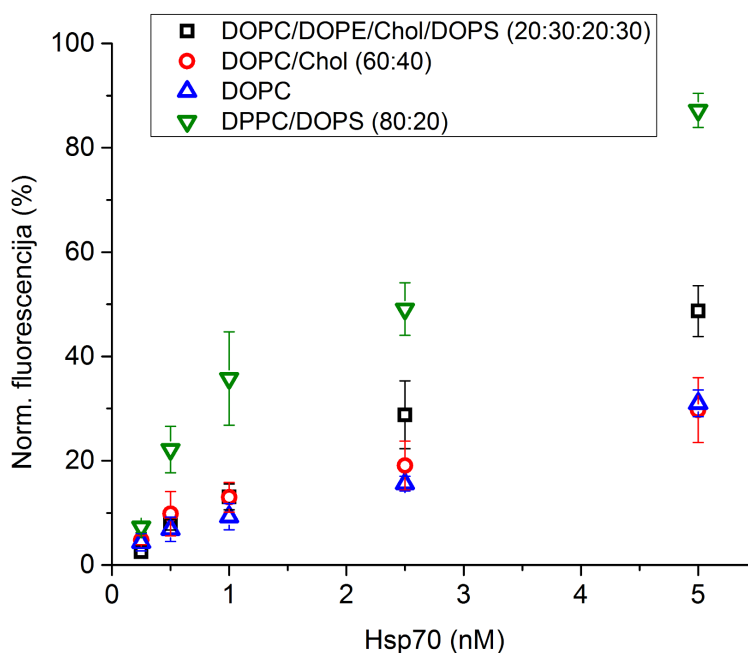
3.6 pav. Kalceino išlaisvinimo fluorescencijos spektrai. Juodos spalvos kreivė vaizduoja bazinę liposomų fluorescenciją. Raudonos spalvos kreivė - po sąveikos su 1 nM koncentracijos Hsp70 baltymu, inkubuotu 10 min, o mėlyna kreivė yra fluorescencija po visiško liposomų suardymo naudojant TritonX - 100 perteklių. A - DOPC vienasluoksnės liposomos; B - DPPC/DOPS vienasluoksnės liposomos.

Kalceino išlaisvinimo fluorescencijos matavimai buvo atlikti naudojant įvairias Hsp70 koncentracijas ir 4 skirtingų sudėčių liposomas. Neutralios liposomos buvo sudarytos tik iš nesotaus fosfolipido DOPC, bei liposomos, turinčios cholesterolio, santykiu 60:40 (DOPC : Chol). Neigiamą krūvį turinčios liposomos buvo sudarytos iš keturių lipidinių komponentų (DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30) ir liposomos, sudarytos iš sotaus fosfolipido DPPC ir DOPS santykiu 80:20 (DPPC/DOPS). Gauti spektrai normalizuoti pagal 2.24 formulę, parodo kiek procentų kalceino išteka iš liposomų kiekvienu sąveikos su Hsp70 atveju.

Nustatyta, jog Hsp70 skirtingu specifiskumu sąveikauja su įvairios sudėties liposomomis. Tyrimuose stebėjome skirtingų Hsp70 koncentracijų: 0,25 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2,5 nM, 5 nM, sąveikos su liposomomis mastą. Daugiausia kalceino išlaisvinama, po Hsp70 sąveikos su liposomas sudarytomis iš sotaus fosfolipido DPPC ir neigiamą krūvį turinčio DOPS santykiu 80:20, atitinkamai (3.7 pav). Sekantis kalceino fluorescencijos išlaisvinimo mastas, stebimas po sąveikos su kitomis neigiamą krūvį turinčiomis liposomomis (DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20 : 30 : 20 :30)). Naudojant neutralias liposomas pastebėta, kad esant mažoms Hsp70 koncentracijoms (iki 1 nM), po sąveikos stebimas fluorescencijos intensyvumas abiejose liposomų kompozicijose yra panašus. Skirtumai atsiranda didėjant Hsp70 koncentracijai. Nustatyta, kad išlaisvinto kalceino koncentracija yra apie 3 kartus didesnė po Hsp70 sąveikos su sočiomis ir neigiamą krūvį turinčiomis liposomomis, sudarytomis iš DPPC/DOPS ir 1,6 karto didesnė po sąveikos su neigiamą krūvį turinčiomis daugiakomponentinėmis liposomos (DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20 : 30 : 20 :30)), lyginant

kalceino išlaisvinimą po Hsp70 sąveikos su neutraliomis ir nesočiomis liposomomis (DOPC/Chol (60 : 40) ir DOPC).

Remiantis rezultatais, galima teigti, kad kalceino išlaisvinimas iš liposomų po sąveikos tiesiogiai priklauso nuo Hsp70 koncentracijos. Priešingai nei EIS matavimų metu, sąveikos su liposomomis metu, gauta tiesinė priklausomybė nuo Hsp70 koncentracijos, be to toks kalceino fluorescencijos kitimas yra stebimas visose naudotose kompozicijose.



3.7 pav. Iš liposomų išėjusio kalceino kiekio priklausomybė nuo Hsp70 koncentracijos sąveikaujant su skirtingos sudėties liposomomis. Hsp70 koncentracijos: 0,25 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2,5 nM, 5 nM. Juodi kvadratai žymi kiek procentų kalceino ištekėjo, Hsp70 prisijungus prie liposomų, sudarytų iš DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30), raudoni apskritimai - DOPC/Chol (60:40), mėlyni trikampiai - DOPC, o žali trikampiai - DPPC/DOPS (80:20).

Tyrimo metu naudojome įvairias Hsp70 koncentracijas ir nustatėme, kad mažiausia Hsp70 koncentracija, kuri pažeidžia liposomų membranos integralumą, ir galima detektuoti kalceino fluorescencijos intensyvumo augimą yra 0,25 nM. Skirtingų kompozicijų liposomų atveju, ši koncentracija yra tokia pati, tik skiriasi išlaisvinto kalceino kiekis. Rezultatai rodo, kad vienasluoksnių liposomų sudėtis, neturi įtakos mažiausiai nustatamai koncentracijai, bet liposomų pažeidimo dydis stipriai koreliuoja su liposomų kompozicija. Didžiausias kalceino fluorescencijos išleidimas detektuotas po Hsp70 sąveikos su sočiomis ir neigiamą krūvį turinčiomis liposomomis (DPPC/DOPS). Šie rezultatai patvirtina literatūroje aprašytus tyrimus (Lamprecht et al., 2018).

### 3.5. Tolimesni planai

EIS metodas ir prikabintos lipidinės membranos gali būti panaudojamos biosensorių, kurie detektuoja Hsp70, kūrime. Šiame darbe parodyta, kad šio sensoriaus jautrumas yra 0,5 nM ( $\approx 35$  ng/ml). Toks jautrumas gerokai lenkia optinį biosensorių, kuriuo galima detektuoti 1290 ng/ml Hsp70 (Maniya ir Srivastava, 2020). Tačiau, negalima detektuoti tokios mažos Hsp70 koncentracijos, kaip naudojant elektrocheminį imunosensorių ( $\approx 0,02$  ng/ml) (Sun et al., 2018). Tokį jautrumą galbūt būtų galima pasiekti naudojant tBLM, suformuotas iš DPPC/DOPS (80:20), nes tyrimuose su liposomomis, Hsp70 labiausiai paveikia šios sudėties liposomas. Ruošiant tokios sudėties tBLM susidūrėme su sunkumais, nes suformuotos daugiasluoksnės liposomos nesiliejo ir izoliuojanti tBLM nesusiformavo. Kiti darbe naudoti nesotūs lipidai, kambario temperatūroje yra skysti, o sotaus fosfolipido DPPC lipido fazinio virsmo temperatūra yra 41°C. Šis skirtumas galėjo turėti įtakos, membranos formavimuisi. Ateityje, tobulinsime liposomų liejimosi protokolus ir bandysime suformuoti tBLM iš sočių fosfolipidų. Alternatyviai ieškosime lipidinės membranos sudėties, kuri būtų jautriausia sąveikai su Hsp70. Galimybė tBLM panaudoti kaip jautrią bioanalitę platformą, skirtą ūminio pankreatito diagnozavimui, jau yra aprašyta paruoštoje mokslinėje publikacijoje, kuri yra priduta leidyklai (Rima Budvytyte, Akvile Milasiute, Dalius Vitkus, Kestutis Strupas, Aiste Gulla, Ieva Sakinyte, Julija Razumiene. Tethered lipid membranes as a nanoscale arrangement towards non-invasive electrochemical analysis of Acute Pancreatitis. 2021, *Submitted*).

## IŠVADOS

1. Sėkmingai suformuotos prie paviršiaus prikabintos lipidinės membranos (tBLM) sudarytos iš DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30) ir DOPC/Chol (60:40). Neigiamai įkrautoje tBLM, DOPE klasteriai pasiskirstę tolygiai visoje tBLM, o Chol formuoja didesnius sankauptų regionus. Neutralioje tBLM, šių lipidų klasteriai pasiskirsto visame plote tolygiai.
2. Naudojant elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodą, pastebėta, kad tBLM sąveikos metu su Hsp70, membranos elektrinių savybių kitimas laike nepriklauso nuo tBLM sudėties, o optimaliausia Hsp70 poveikį tBLM stebėti po 30 minučių.
3. Ištirta tBLM laidumo priklausomybė nuo Hsp70 koncentracijos. Gauta, kad DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30) tBLM laidumo kitimas didėjant Hsp70 koncentracijai yra panašus į eksponentę, o tuo tarpu tBLM sudarytų iš DOPC ir Chol gauta išsibarsčiusi laidumo priklausomybė.
4. Dydžio išskyrimo chromatografijos metu skirtingos kompozicijos liposomų dydis kito skirtingai, bet bendras visų liposomų dydžio kitimas buvo nežymus. Daugiausia pakito liposomos sudarytos iš DOPC/Chol (60:40) (spindulys pailgėjo 12 nm).
5. Ištyrus Hsp70 sąveiką su skirtingos kompozicijos vienasluoksnėmis liposomomis nustatyta, kad Hsp70 labiausiai pažeidžia liposomas sudarytas iš sotaus ir neigiamą krūvį turinčių lipidų (DPPC/DOPS (80:20)), o liposomų pažaidos mastas didėja didėjant Hsp70 koncentracijai.

## **Hsp70 sąveikos su lipidų membranų modelinėmis sistemomis tyrimas**

### **SANTRAUKA**

70 kDa šilumos šoko baltymas (Hsp70) yra citozolinis baltymas, kuris atlieka molekulinio šaperono funkciją. Esant pataloginėms sąlygoms Hsp70 yra randamas prisikabinęs prie membranos arba užląstelinėje erdvėje. Šis baltymas neturi sekos reikalingos transportavimui endoplazminio tinklo - Goldžio aparato keliu, todėl manoma, kad Hsp70 pernešamas alternatyviu keliu, kurio pirmas žingsnis galbūt yra prisijungimas prie membranos.

Šio darbo tikslas buvo suformuoti įvairios sudėties prie paviršiaus prikabinatas lipidines membranas (tBLM), fluorescencinės mikroskopijos metodu įvertinti jų morfologiją ir iširti Hsp70 sąveiką su tBLM elektrocheminio impedanso metodu, be to iširti šio baltymo sąveiką su įvairios sudėties vienasluoksnėmis liposomomis, kurios yra užkrautos kalceinu.

Darbo metu pavyko suformuoti dvi skirtingos sudėties tBLM (DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30) ir DOPC/Chol (60:40)), kurios skiriasi viena nuo kitos formuojamais lipidų klasteriais. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos rezultatai parodė, kad didėjant Hsp70 koncentracijai, DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30) tBLM laidumo priklausomybė yra panaši į eksponentę. Atliekant eksperimentus su liposomomis, pastebėta, kad Hsp70 didžiausiu giminingumu jungiasi prie sočių ir neigiamą krūvį turinčių liposomų (DPPC/DOPS (80:20)).

## **Study of the Interaction of Hsp70 with Membrane Model Systems**

### **SUMMARY**

70-kDa heat shock protein (Hsp70) is a cytosolic protein which acts as a molecular chaperone. Under pathological conditions Hsp70 translocates into the plasma membrane. Moreover, the protein is detected in the extracellular milieu. Hsp70 does not have a consensus signal for their translocation via the classical Endoplasmic Reticulum - Golgi compartment. It is possible that the protein is transported by an alternative mechanism and its first step could be an interaction with the plasma membrane.

The aim of this work was to form tethered lipid membranes (tBLM) of various compositions, to investigate their morphology using fluorescence microscopy and to use them in the study of the interaction of Hsp70 with tBLM by the electrochemical impedance spectroscopy. Furthermore, calcein leakage assay was used to investigate Hsp70 interaction with unilamellar vesicles.

Two compositions of tBLM were successfully formed. They were composed of DOPC/DOPE/Chol/DOPS (20:30:20:30) and DOPC/Chol (60:40). In these, tBLM lipids formed clusters which are different in size and position. Electrochemical impedance spectroscopy data has showed, that Hsp70 interaction with tBLM has increased the conductance of tBLM and showed an exponential dependence on conductance of tBLM depending on Hsp70 concentration. Calcein leakage assay experiments revealed that Hsp70 had high affinity for vesicles composed of saturated DPPC lipids and negatively charged phosphatidylserine (in ratio % 80:20).



## LITERATŪRA

1. Akerfelt, M., Morimoto, R.I., Sistonen, L. 2010. "Heat Shock Factors: Integrators of Cell Stress, Development and Lifespan." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (8): 545–55.
2. Alahi, E., Mukhopadhyay, S. 2019. "Smart Nitrate Sensor, Internet of Things Enabled Real-Time Water Quality Monitoring," January.
3. Alberts, B., Johnson, A.D., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter P.,. 2014. *Molecular Biology of the Cell*. Sixth edition. New York, NY: W. W. Norton & Company.
4. Allen, T. M., Cleland, A. 1980. "Serum-Induced Leakage of Liposome Contents." *Biochimica Et Biophysica Acta* 597 (2): 418–26.
5. Altavilla, D., Famulari, C., Passaniti, M., Galeano, M., Macri, A., Seminara, P., Minutoli, L. 2003. "Attenuated Cerulein-Induced Pancreatitis in Nuclear Factor- $\kappa$ B-Deficient Mice." *Laboratory Investigation* 83 (12):
6. Andersson, J., Köper, I. 2016. "Tethered and Polymer Supported Bilayer Lipid Membranes: Structure and Function." *Membranes* 6 (2).
7. Andersson, J., Köper, I., Knoll, W. 2018. "Tethered Membrane Architectures—Design and Applications." *Frontiers in Materials* 5.
8. Aprile, F.A., Dhulesia, A., Stengel, F., Roodveldt, C., Benesch, J., Tortora, P., Robinson, C.R., Salvatella, X., Dobson, C., Cremades, N. 2013. "Hsp70 Oligomerization Is Mediated by an Interaction between the Interdomain Linker and the Substrate-Binding Domain." *PloS One* 8 (6): e67961.
9. Arispe, N., Doh, M., Simakova, O., Kurganov, B., De Maio, A. 2004. "Hsc70 and Hsp70 Interact with Phosphatidylserine on the Surface of PC12 Cells Resulting in a Decrease of Viability." *The FASEB Journal* 18 (14): 1636–45.
10. Armijo, G., Okerblom, J., Cauvi, D.M., Lopez, V., Schlamadinger, D.E., Kim, J., Arispe, N., De Maio, A. 2014. "Interaction of Heat Shock Protein 70 with Membranes Depends on the Lipid Environment." *Cell Stress & Chaperones* 19 (6): 877–86.
11. Asea, A., Rehli, M., Kabling, E., Boch, J., Bare, O., Auron, P., Stevenson, M.A., Calderwood, S.K. 2002. "Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70: Role of Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (17): 15028–34.
12. Ashburner, M. 1970. "Patterns of Puffing Activity in the Salivary Gland Chromosomes of Drosophila." *Chromosoma* 31 (3): 356–76.
13. Atanasov, V., Atanasova, P., Vockenroth, I., Knorr, N., Köper, I. 2006. "A Molecular Toolkit for Highly Insulating Tethered Bilayer Lipid Membranes on Various Substrates." *Bioconjugate Chemistry* 17 (3): 631–37.
14. Atanasov, V., Knorr, N., Duran, R., Ingebrandt, S., Offenhäusser, A., Knoll, W., Köper, I. 2005. "Membrane on a Chip: A Functional Tethered Lipid Bilayer Membrane on Silicon Oxide Surfaces." *Biophysical Journal* 89 (3): 1780–88.
15. Balogi, Z., Multhoff, G., Jensen, T., Lloyd-Evans, E., Yamashima, T., Jäättelä, Harwood, J.L., Vigh, L. 2019. "Hsp70 Interactions with Membrane Lipids Regulate Cellular Functions in Health and Disease." *Progress in Lipid Research* 74: 18–30.
16. grammy.com [internetinė svetainė] "Basics of EIS: Electrochemical Research-Impedance." [cituota 2021 04 06]. Adresas: <https://www.gamry.com/application-notes/EIS/basics-of-electrochemical-impedance-spectroscopy/>.
17. Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., Srivastava, P. K.. 2000. "Necrotic but Not Apoptotic Cell Death Releases Heat Shock Proteins, Which Deliver a Partial Maturation Signal to Dendritic Cells and Activate the NF- $\kappa$ B Pathway." *International Immunology* 12 (11): 1539–46.

18. Becucci, L., Faragher, R. J., Schwan, A. 2015. "The Effect of the Hydrophilic Spacer Length on the Functionality of a Mercury-Supported Tethered Bilayer Lipid Membrane." *Bioelectrochemistry* 101 (February): 92–96.
19. Becucci, L., Guidelli, R. 2014. "Mercury-Supported Biomimetic Membranes for the Investigation of Antimicrobial Peptides." *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 7 (2): 136–68.
20. Bhagat, L., Singh, V., Dawra, R. K., Saluja, A. 2008. "Sodium Arsenite Induces Heat Shock Protein 70 Expression and Protects against Secretagogue-Induced Trypsinogen and NF-KappaB Activation." *Journal of Cellular Physiology* 215 (1): 37–46.
21. Botzler, C., Li, G., Issels, R. D., Multhoff, G. 1998. "Definition of Extracellular Localized Epitopes of Hsp70 Involved in an NK Immune Response." *Cell Stress & Chaperones* 3 (1): 6–11.
22. Bredar, A., Amanda, L. R., Chown, C., Burton, A. R., Farnum, B. 2020. "Electrochemical Impedance Spectroscopy of Metal Oxide Electrodes for Energy Applications." *ACS Applied Energy Materials* 3 (1): 66–98.
23. Brocchieri, L., Conway de Macario, E., Macario, A. J. 2008. "Hsp70 Genes in the Human Genome: Conservation and Differentiation Patterns Predict a Wide Array of Overlapping and Specialized Functions." *BMC Evolutionary Biology* 8 (January): 19.
24. Buboltz, J. T., Feigenson, G. T. 1999. "A Novel Strategy for the Preparation of Liposomes: Rapid Solvent Exchange." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1417 (2): 232–45.
25. Budvytyte, R., Pleckaityte, M., Zvirbliene, A., Vanderah, D., Valincius, G. 2013. "Reconstitution of Cholesterol-Dependent Vaginolysin into Tethered Phospholipid Bilayers: Implications for Bioanalysis." *PLOS ONE* 8 (12): e82536.
26. Budvytyte, R., Valincius, G., Niaura, G., Voiciuk, V., Mickevicius, M., Chapman, H., Goh, H. 2013. "Structure and Properties of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Unsaturated Anchor Molecules." Research-article. American Chemical Society. World. June 26, 2013.
27. Castellana, E. T., Cremer, P. 2006. "Solid Supported Lipid Bilayers: From Biophysical Studies to Sensor Design." *Surface Science Reports* 61 (10): 429–44.
28. Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Remy-Martin, J., Boireau, W. et al. 2010. "Membrane-Associated Hsp72 from Tumor-Derived Exosomes Mediates STAT3-Dependent Immunosuppressive Function of Mouse and Human Myeloid-Derived Suppressor Cells." *The Journal of Clinical Investigation* 120 (2): 457–71.
29. Chan, Y. M., Boxer, S. G. 2007. "Model Membrane Systems and Their Applications." *Current Opinion in Chemical Biology* 11 (6): 581–87.
30. Chou, C., Forouhar, F., Yeh, Y., Shr, H., Wang, C., Hsiao, C. 2003. "Crystal Structure of the C-Terminal 10-KDa Subdomain of Hsc70." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (32): 30311–16.
31. Cornell, B. A., Braach-Maksvytis, V. L. B., King, L. G., Osman, P. D. J., Raguse, B., Wieczorek, L., Pace, R. J. 1997. "A Biosensor That Uses Ion-Channel Switches." *Nature* 387 (6633): 580–83.
32. Craig, Elizabeth A., and Carol A. Gross. 1991. "Is Hsp70 the Cellular Thermometer?" *Trends in Biochemical Sciences* 16 (January): 135–40.
33. Cummins, H., ed. 1974. *Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy*. Nato Science Series B: Springer US.
34. Datta, S., A. K., Heinrich, F., Raghunandan, S., Krueger, S., Curtis, J. E., Rein, A., Nanda, H. 2011. "HIV-1 Gag Extension: Conformational Changes Require Simultaneous Interaction with Membrane and Nucleic Acid." *Journal of Molecular Biology* 406 (2): 205–14.
35. Dawra, R., Sah, R. P., Dudeja, V., Rishi, L., Talukdar, R., Garg, P., Saluja, A. K..

2011. "Intra-Acinar Trypsinogen Activation Mediates Early Stages of Pancreatic Injury but Not Inflammation in Mice with Acute Pancreatitis." *Gastroenterology* 141 (6): 2210-2217.e2.
36. De Maio, A. 1999. "Heat Shock Proteins: Facts, Thoughts, and Dreams." *Shock (Augusta, Ga.)* 11 (1): 1–12.
  37. De Maio, A. 2011. "Extracellular Heat Shock Proteins, Cellular Export Vesicles, and the Stress Observation System: A Form of Communication during Injury, Infection, and Cell Damage. It Is Never Known How Far a Controversial Finding Will Go! Dedicated to Ferruccio Ritossa." *Cell Stress & Chaperones* 16 (3): 235–49.
  38. De Maio, A., Vazquez, D. 2013. "EXTRACELLULAR HEAT SHOCK PROTEINS: A NEW LOCATION, A NEW FUNCTION." *Shock (Augusta, Ga.)* 40 (4): 239–46.
  39. *Biology Wise [internetinè svetainè]* "Difference Between Peripheral and Integral Membrane Proteins."; sukurta 2014 07 15. Adresas: <https://biologywise.com/difference-between-peripheral-integral-membrane-proteins>.
  40. Donati, Y. R., Slosman, D. O., Polla, B. S.. 1990. "Oxidative Injury and the Heat Shock Response." *Biochemical Pharmacology* 40 (12): 2571–77.
  41. Dutta, S.K., Girotra, M., Singla, M., Dutta, A., Stephen, O., Nair, P. P., Merchant, N. B. 2012. "Serum HSP70: A Novel Biomarker for Early Detection of Pancreatic Cancer." *Pancreas* 41 (4): 530–34.
  42. Dybdahl, B., Slørdahl, S. A., Waage, A., Kierulf, P., Espevik, T., Sundan, A. 2005. "Myocardial Ischaemia and the Inflammatory Response: Release of Heat Shock Protein 70 after Myocardial Infarction." *Heart* 91 (3): 299–304.
  43. Evdonin, A. L., Martynova, M. G., Bystrova, O., Guzhova, I., Margulis, B., Medvedeva, N. 2006. "The Release of Hsp70 from A431 Carcinoma Cells Is Mediated by Secretory-like Granules." *European Journal of Cell Biology* 85 (6): 443–55.
  44. Faure, O., Graff-Dubois, S., Bretaudeau, L., Derré, L., Gross, D., Alves, P. M. S., Cornet, S., et al. 2004. "Inducible Hsp70 as Target of Anticancer Immunotherapy: Identification of HLA-A\*0201-Restricted Epitopes." *International Journal of Cancer* 108 (6): 863–70.
  45. Feder, M. E., Hofmann, G. E. 1999. "Heat-Shock Proteins, Molecular Chaperones, and the Stress Response: Evolutionary and Ecological Physiology." *Annual Review of Physiology* 61: 243–82.
  46. Feng, J. Y., Li, Y. Y. 2010. "Alteration and Role of Heat Shock Proteins in Acute Pancreatitis." *Journal of Digestive Diseases* 11 (5): 277–83.
  47. Fleming, K. G. 2017. "Fluorescence Theory." In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*, edited by John C. Lindon, George E. Tranter, and David W. Koppenaal, 647–53. Oxford: Academic Press.
  48. Fouchaq, B., Benaroudj, N., Ebel, C., Ladjimi, M. M. 1999. "Oligomerization of the 17-KDa Peptide-Binding Domain of the Molecular Chaperone HSC70." *European Journal of Biochemistry* 259 (1–2): 379–84.
  49. Frossard, J. L., Pastor, C. M., Hadengue, A. 2001. "Effect of Hyperthermia on NF-KB Binding Activity in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 280 (6): G1157–62.
  50. Gabai, V. L., Yaglom, J., Waldman, T., Sherman, M. Y. 2009. "Heat Shock Protein Hsp72 Controls Oncogene-Induced Senescence Pathways in Cancer Cells." *Molecular and Cellular Biology* 29 (2): 559–69.
  51. Ganter, M. T., Ware, L. B., Howard, M., Roux, J., Gartland, B., Matthay, M. A., Fleshner, M., Pittet, J. 2006. "Extracellular Heat Shock Protein 72 Is a Marker of the Stress Protein Response in Acute Lung Injury." *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 291 (3): L354-361..
  52. Gehrman, M., Marienhagen, J., Eichholtz-Wirth, H., Fritz, E., Ellwart, J., Jäättelä,

- M., Zilch, T., Multhoff, G. 2005. "Dual Function of Membrane-Bound Heat Shock Protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: Protection against Radiation-Induced Effects and Target Structure for Natural Killer Cells." *Cell Death and Differentiation* 12 (1): 38–51.
53. Gehrman, M., Liebisch, G., Schmitz, G., Anderson, R., Steinem, C., De Maio, A., Pockley, G., Multhoff, G. 2008. "Tumor-Specific Hsp70 Plasma Membrane Localization Is Enabled by the Glycosphingolipid Gb3." *PloS One* 3 (4): e1925.
  54. Gehrman, M., Specht, H. M., Bayer, C., Brandstetter, M., Chizzali, B., Duma, M., Breuninger, S., et al. 2014. "Hsp70 - a Biomarker for Tumor Detection and Monitoring of Outcome of Radiation Therapy in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck." *Radiation Oncology (London, England)* 9 (June): 131.
  55. Giri, B., Sethi, V., Modi, S., Garg, B., Banerjee, S., Saluja, A., Dudeja, V. 2017. "Heat Shock Protein 70 in Pancreatic Diseases: Friend or Foe." *Journal of Surgical Oncology* 116 (1): 114–22.
  56. Gomes, A. J., Lunardi, C. N., Rocha, F. S., Patience, G. S. 2019. "Experimental Methods in Chemical Engineering: Fluorescence Emission Spectroscopy." *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 97 (8): 2168–75.
  57. Goreham, R. V., Thompson, C., Samura, Y., Gibson, C., Shapter, G. J., Köper, I. 2015. "Interaction of Silver Nanoparticles with Tethered Bilayer Lipid Membranes." *Langmuir* 31 (21): 5868–74.
  58. Grabielle-Madelmont, C., Lesieur, S., Ollivon, M. 2003. "Characterization of Loaded Liposomes by Size Exclusion Chromatography." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods, Size-Exclusion Chromatography*, 56 (1): 189–217.
  59. Guidon, P. T., Hightower, L. E. . 1986. "The 73 Kilodalton Heat Shock Cognate Protein Purified from Rat Brain Contains Nonesterified Palmitic and Stearic Acids." *Journal of Cellular Physiology* 128 (2): 239–45.
  60. Gupta, R. S., Singh, B. 1994. "Phylogenetic Analysis of 70 KD Heat Shock Protein Sequences Suggests a Chimeric Origin for the Eukaryotic Cell Nucleus." *Current Biology: CB* 4 (12): 1104–14.
  61. Hartl, F. U., Martin, J. 1995. "Molecular Chaperones in Cellular Protein Folding." *Current Opinion in Structural Biology* 5 (1): 92–102.
  62. Hecker, J. G., McGarvey, M. 2011. "Heat Shock Proteins as Biomarkers for the Rapid Detection of Brain and Spinal Cord Ischemia: A Review and Comparison to Other Methods of Detection in Thoracic Aneurysm Repair." *Cell Stress & Chaperones* 16 (2): 119–31.
  63. Hightower, L. E., Guidon, P. T. . 1989. "Selective Release from Cultured Mammalian Cells of Heat-Shock (Stress) Proteins That Resemble Glia-Axon Transfer Proteins." *Journal of Cellular Physiology* 138 (2): 257–66.
  64. Horváth, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., Vígh, L. 2008. "Membrane-Associated Stress Proteins: More than Simply Chaperones." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1778 (7–8): 1653–64.
  65. Hughes, L. D., Boxer, S. G. 2013. "DNA-Based Patterning of Tethered Membrane Patches." *Langmuir* 29 (39): 12220–27.
  66. Hunter-Lavin, C., Davies, E., Bacelar, M., Marshall, M. J., Andrew, S., Williams, J. 2004. "Hsp70 Release from Peripheral Blood Mononuclear Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324 (2):
  67. Jackman, J., Knoll, W., Cho, N. 2012. "Biotechnology Applications of Tethered Lipid Bilayer Membranes." *Materials* 5 (December): 2637–57.
  68. Jadhav, S. R., Sui, D., Garavito, R., Worden, R. 2008. "Fabrication of Highly Insulating Tethered Bilayer Lipid Membrane Using Yeast Cell Membrane Fractions for Measuring Ion Channel Activity." *Journal of Colloid and Interface Science* 322

- (2): 465–72.
69. Jeuken, L. J. C., Connell, S. D., Henderson, P., Gennis, R. B., Evans, S. D., Bushby, R. 2006. “Redox Enzymes in Tethered Membranes.” *Journal of the American Chemical Society* 128 (5): 1711–16.
  70. Juhász, K., Thuenauer, R., Spachinger, A., Duda, E., Horváth, I., Vígh, L., Sonnleitner, A., Balogi, Z. 2013. “Lysosomal Rerouting of Hsp70 Trafficking as a Potential Immune Activating Tool for Targeting Melanoma.” *Current Pharmaceutical Design* 19 (3): 430–40.
  71. Junghans, A., Köper, I. 2010. “Structural Analysis of Tethered Bilayer Lipid Membranes.” *Langmuir* 26 (13): 11035–40.
  72. Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M., Kubota, H., Tanguay, R., Bruford, E., Cheetham, M., Chen, B., Hightower, L. 2009. “Guidelines for the Nomenclature of the Human Heat Shock Proteins.” *Cell Stress & Chaperones* 14 (1): 105–11.
  73. Kim, J., Nueda, A., Meng, Y. H., Dynan, W. S., Mivechi, N. F. . 1997. “Analysis of the Phosphorylation of Human Heat Shock Transcription Factor-1 by MAP Kinase Family Members.” *Journal of Cellular Biochemistry* 67 (1): 43–54.
  74. Kirkegaard, T., Roth, A., Petersen, N., Mahalka, A. K., Olsen, O., Moilanen, I., Zylicz, A., et al. 2010. “Hsp70 Stabilizes Lysosomes and Reverts Niemann-Pick Disease-Associated Lysosomal Pathology.” *Nature* 463 (7280): 549–53.
  75. Knobloch, J., Suhendro, D., Zieleniecki, J., Shapter, J., Köper, I. 2015. “Membrane–Drug Interactions Studied Using Model Membrane Systems.” *Saudi Journal of Biological Sciences*, Special issue on Molecular Biology and Biophysics of Eukaryotic Cells and Special issue on Biological Aspects of Global Health Issues, 22 (6): 714–18.
  76. Köper, I. 2007. “Insulating Tethered Bilayer Lipid Membranes to Study Membrane Proteins.” *Molecular BioSystems* 3 (10): 651–57.
  77. Kühner, M., Tampé, R., Sackmann, E. 1994. “Lipid Mono- and Bilayer Supported on Polymer Films: Composite Polymer-Lipid Films on Solid Substrates.” *Biophysical Journal* 67 (1): 217–26.
  78. Kumar, D. P., Vorvis, C., Sarbeng, E., Ledesma, V., Willis, J. E., Liu, Q. 2011. “The Four Hydrophobic Residues on the Hsp70 Inter-Domain Linker Have Two Distinct Roles.” *Journal of Molecular Biology* 411 (5): 1099–1113.
  79. Lahiri, J., Kalal, P., Frutos, A., Jonas, S., Schaeffler, R. 2000. “Method for Fabricating Supported Bilayer Lipid Membranes on Gold.” *Langmuir* 16 (20): 7805–10.
  80. Lamprecht, C., Gehrmann, M., Madl, J., Römer, W., Multhoff, G., Ebner, A. 2018. “Molecular AFM Imaging of Hsp70-1A Association with Dipalmitoyl Phosphatidylserine Reveals Membrane Blebbing in the Presence of Cholesterol.” *Cell Stress & Chaperones* 23 (4): 673–83.
  81. Leist, M., Jäätelä, M. 2001. “Triggering of Apoptosis by Cathepsins.” *Cell Death & Differentiation* 8 (4): 324–26.
  82. Lichtman, J. W., Conchello, J. 2005. “Fluorescence Microscopy.” *Nature Methods* 2 (12): 910–19.
  83. Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X., Low, S. C. 2013. “Characterization of Magnetic Nanoparticle by Dynamic Light Scattering.” *Nanoscale Research Letters* 8 (1): 381.
  84. Locke, M., Noble, E. G. 1995. “Stress Proteins: The Exercise Response.” *Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne De Physiologie Appliquee* 20 (2): 155–67.
  85. Makhija, R., Kingsnorth, A. 2002. “Cytokine Storm in Acute Pancreatitis.” *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* 9 (4): 401–10.
  86. Mambula, S. S., Calderwood, S. K. 2006. “Heat Shock Protein 70 Is Secreted from Tumor Cells by a Nonclassical Pathway Involving Lysosomal Endosomes.” *The Journal of Immunology* 177 (11): 7849–57.

87. Maniya, N. H., Srivastava, D. N. 2020. "Fabrication of Porous Silicon Based Label-Free Optical Biosensor for Heat Shock Protein 70 Detection." *Materials Science in Semiconductor Processing* 115 (August): 105126.
88. Mayer, M. P., Schröder, H., Rüdiger, S., Paal, K., Laufen, T., Bukau, B. 2000. "Multistep Mechanism of Substrate Binding Determines Chaperone Activity of Hsp70." *Nature Structural Biology* 7 (7): 586–93.
89. McCallister, C., Kdeiss, B., Nikolaidis, N. 2016. "Biochemical Characterization of the Interaction between HspA1A and Phospholipids." *Cell Stress & Chaperones* 21 (1): 41–53.
90. McCallister, C., Siracusa, M., Shirazi, F., Chalkia, D., Nikolaidis, N. 2015. "Functional Diversification and Specialization of Cytosolic 70-KDa Heat Shock Proteins." *Scientific Reports* 5 (March).
91. McGillivray, D. J., Valincius, G., Heinrich, F., Robertson, J., Vanderah, D., Febo-Ayala, W., Ignatjev, I., Lösche, M., Kasianowicz, M. 2009. "Structure of Functional Staphylococcus Aureus  $\alpha$ -Hemolysin Channels in Tethered Bilayer Lipid Membranes." *Biophysical Journal* 96 (4): 1547–53.
92. McGillivray, D. J., Valincius, G., Vanderah, D., Febo-Ayala, W., Woodward, J., Heinrich, F., Kasianowicz, J., Lösche, M. 2007. "Molecular-Scale Structural and Functional Characterization of Sparsely Tethered Bilayer Lipid Membranes." *Biointerphases* 2 (1): 21–33.
93. Minton, A. P. 2016. "Recent Applications of Light Scattering Measurement in the Biological and Biopharmaceutical Sciences." *Analytical Biochemistry* 501 (May): 4–22.
94. Molvarec, A., Prohászka, Z., Nagy, B., Szalay, J., Füst, G., Karádi, I., Rigó, J. 2006. "Association of Elevated Serum Heat-Shock Protein 70 Concentration with Transient Hypertension of Pregnancy, Preeclampsia and Superimposed Preeclampsia: A Case-Control Study." *Journal of Human Hypertension* 20 (10): 780–86.
95. Morgner, N., Schmidt, C., Beilsten-Edmands, V., Ebong, I., Patel, N., Clerico, E., Kirschke, E., et al. 2015. "Hsp70 Forms Antiparallel Dimers Stabilized by Post-Translational Modifications to Position Clients for Transfer to Hsp90." *Cell Reports* 11 (5): 759–69.
96. Morozova, K., Clement, C., Kaushik, S., Stiller, B., Arias, E., Ahmad, A., Rauch, J., et al. 2016. "Structural and Biological Interaction of Hsc-70 Protein with Phosphatidylserine in Endosomal Microautophagy." *The Journal of Biological Chemistry* 291 (35): 18096–106.
97. Mui, B., Chow, L., Hope, M. 2003. "Extrusion Technique to Generate Liposomes of Defined Size." *Methods in Enzymology* 367: 3–14.
98. Multhoff, G., Botzler, C., Jennen, L., Schmidt, J., Ellwart, J., Issels, R. 1997. "Heat Shock Protein 72 on Tumor Cells: A Recognition Structure for Natural Killer Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 158 (9): 4341–50.
99. Multhoff, G., Mizzen, L., Winchester, C. C., Milner, C. M., Wenk, S., Eissner, G., Kampinga, H. H., Laumbacher, B., Johnson J. 1999. "Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Stimulates Proliferation and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells." *Experimental Hematology* 27 (11): 1627–36.
100. Multhoff, G. 2007. "Heat Shock Protein 70 (Hsp70): Membrane Location, Export and Immunological Relevance." *Methods, Heat Shock Proteins In Extracellular Signaling*, 43 (3): 229–37.
101. Nemoto, T. K., Fukuma, Y., Itoh, H., Takagi, T., Ono, T. 2006. "A Disulfide Bridge Mediated by Cysteine 574 Is Formed in the Dimer of the 70-KDa Heat Shock Protein." *Journal of Biochemistry* 139 (4): 677–87.
102. Nickel, W., Seedorf, M. 2008. "Unconventional Mechanisms of Protein Transport to the Cell Surface of Eukaryotic Cells." *Annual Review of Cell and Developmental*

- Biology* 24 (1): 287–308.
103. Nimmervoll, B., Chtcheglova, L., Juhasz, K., Cremades, N., Aprile, F., Sonnleitner, A., Hinterdorfer, P., Vigh, L., Preiner, J., Balogi, Z. 2015. “Cell Surface Localised Hsp70 Is a Cancer Specific Regulator of Clathrin-Independent Endocytosis.” *FEBS Letters* 589 (19 Pt B): 2747–53.
  104. Njemini, R., Demanet, C., Mets, T. . 2004. “Inflammatory Status as an Important Determinant of Heat Shock Protein 70 Serum Concentrations during Aging.” *Biogerontology* 5 (1): 31–38.
  105. Nonnenmann, S., Chen, X., Bonnell, D. 2013. “HIGH SENSITIVITY SCANNING IMPEDANCE MICROSCOPY AND SPECTROSCOPY.” In , 457–79.
  106. Oglesbee, M. J., Herdman, A., Passmore, G., Hoffman, W. 2005. “Diabetic Ketoacidosis Increases Extracellular Levels of the Major Inducible 70-KDa Heat Shock Protein.” *Clinical Biochemistry* 38 (10): 900–904.
  107. Orazem, M., Tribollet, B. 2008. “An Integrated Approach to Electrochemical Impedance Spectroscopy.” *Electrochimica Acta* 53 (October): 7360–66.
  108. Pandol, S. J., Saluja, A., Imrie, C., Banks, P. A. 2007. “Acute Pancreatitis: Bench to the Bedside.” *Gastroenterology* 132 (3): 1127–51.
  109. Pike, L. J. 2003. “Lipid Rafts: Bringing Order to Chaos.” *Journal of Lipid Research* 44 (4): 655–67.
  110. Pinheiro, M., Lúcio, M., Lima, J., Reis, S. 2011. “Liposomes as Drug Delivery Systems for the Treatment of TB.” *Nanomedicine (London, England)* 6 (October): 1413–28.
  111. Pockley, Graham, A. 2003. “Heat Shock Proteins as Regulators of the Immune Response.” *Lancet (London, England)* 362 (9382): 469–76.
  112. Ragaliauskas, T., Mickevicius, M., Rakovska, B., Penkauskas, T., Vanderah, D. J., Heinrich, F., Valincius, G. 2017. “Fast Formation of Low-Defect-Density Tethered Bilayers by Fusion of Multilamellar Vesicles.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859 (5): 669–78.
  113. Ragaliauskas, T., Plečkaitytė, M., Jankunec, M., Labanauskas, L., Baranauskiene, L., Valincius, G. 2019. “Inerolysin and Vaginolysin, the Cytolysins Implicated in Vaginal Dysbiosis, Differently Impair Molecular Integrity of Phospholipid Membranes.” *Scientific Reports* 9 (1): 10606.
  114. Raguse, B., Braach-Maksvytis, V., Cornell, B., King, L., Osman, P., Pace, R. J., Wiczorek, L. 1998. “Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation and Ionic Reservoir Characterization.” *Langmuir* 14 (3):
  115. Rakovska, B., Ragaliauskas, T., Mickevicius, M., Jankunec, M., Niaura, G., Vanderah, D. J., Valincius, G. 2015. “Structure and Function of the Membrane Anchoring Self-Assembled Monolayers.” *Langmuir* 31 (2):
  116. Rebaud, S., Maniti, O., Girard-Egrot, A. P. 2014. “Tethered Bilayer Lipid Membranes (TBLMs): Interest and Applications for Biological Membrane Investigations.” *Biochimie, From Membranes to Pathologies*, 107 (December): 135–42.
  117. Ritossa, F. 1962. “A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in Drosophila.” *Experientia* 18 (12): 571–73.
  118. Roskamp, R. F., Vockenroth, I., Eisenmenger, N., Braunagel, J., Köper, I. 2008. “Functional Tethered Bilayer Lipid Membranes on Aluminum Oxide.” *Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* 9 (13): 1920–24.
  119. Saluja, A. K., Donovan, E. A., Yamanaka, K., Yamaguchi, Y., Hofbauer, B., Steer, M. L. 1997. “Cerulein-Induced in Vitro Activation of Trypsinogen in Rat Pancreatic Acini Is Mediated by Cathepsin B.” *Gastroenterology* 113 (1): 304–10.
  120. Saluja, A. K., Lerch, M. M., Phillips, P., Dudeja, V. 2007. “Why Does Pancreatic

- Overstimulation Cause Pancreatitis?" *Annual Review of Physiology* 69: 249–69.
121. Sapozhnikov, A. M., Ponomarev, E. D., Tarasenko, T. N., Telford, W. G. . 1999. "Spontaneous Apoptosis and Expression of Cell Surface Heat-Shock Proteins in Cultured EL-4 Lymphoma Cells." *Cell Proliferation* 32 (6): 363–78.
  122. Schilling, D., Gehrman, M., Steinem, C., De Maio, A., Pockley, A., Abend, M., Molls, M., Multhoff, G. 2009. "Binding of Heat Shock Protein 70 to Extracellular Phosphatidylserine Promotes Killing of Normoxic and Hypoxic Tumor Cells." *The FASEB Journal* 23 (8): 2467–77.
  123. Shimanouchi, T., Ishii, H., Yoshimoto, N., Umakoshi, H., Kuboi, R. 2009. "Calcein Permeation across Phosphatidylcholine Bilayer Membrane: Effects of Membrane Fluidity, Liposome Size, and Immobilization." *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 73 (1): 156–60.
  124. Shin, B. K., Wang, H., Yim, A., Naour, F., Brichory, F., Jang, J., Zhao, R., et al. 2003. "Global Profiling of the Cell Surface Proteome of Cancer Cells Uncovers an Abundance of Proteins with Chaperone Function." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (9): 7607–16.
  125. Simons, K., Ikonen, E. 1997. "Functional Rafts in Cell Membranes." *Nature* 387 (6633): 569–72.
  126. Singer, S. J., Nicolson, G. L. 1972. "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes." *Science (New York, N.Y.)* 175 (4023): 720–31.
  127. Sugawara, S., Kawano, T., Omoto, T., Hosono, M., Tatsuta, T., Nitta, K. 2009. "Binding of Silurus Asotus Lectin to Gb3 on Raji Cells Causes Disappearance of Membrane-Bound Form of HSP70." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790 (2): 101–9.
  128. Sun, B., Cai, J., Li, W., Gou, Gou, Y., Li, D., Hu, F. 2018. "A Novel Electrochemical Immunosensor Based on PG for Early Screening of Depression Markers-Heat Shock Protein 70." *Biosensors & Bioelectronics* 111 (July): 34–40.
  129. Sun, C., Wang, C., Chen, B., He, R., Liu, G., Wang, C., Chen, W., Chern, Y., Huang, J. 2014. "The Influence of Pathological Mutations and Proline Substitutions in TDP-43 Glycine-Rich Peptides on Its Amyloid Properties and Cellular Toxicity." *PloS One* 9 (August): e103644.
  130. Szoka, F., Papahadjopoulos, D. 1980. "Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)." *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 9: 467–508.
  131. Tamm, L. K., McConnell, H. M. 1985. "Supported Phospholipid Bilayers." *Biophysical Journal* 47 (1): 105–13.
  132. Thompson, N. L., Poglitsch, C., Timbs, M., Pisarchick, M. 1993. "Dynamics of Antibodies on Planar Model Membranes." *Accounts of Chemical Research* 26 (11): 567–73.
  133. Tissières, A., Mitchell, H. K., Tracy, U. 1974. "Protein Synthesis in Salivary Glands of *Drosophila Melanogaster*: Relation to Chromosome Puffs." *Journal of Molecular Biology* 84 (3): 389–98.
  134. Tytell, M., Hooper, P. 2001. "Heat Shock Proteins: New Keys to the Development of Cytoprotective Therapies." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 5 (May): 267–87.
  135. Valincius, G., Heinrich, F., Budvytyte, R., Vanderah, D. J., McGillivray, D., Sokolov, Y., Hall, J., Lösche, M. 2008. "Soluble Amyloid Beta-Oligomers Affect Dielectric Membrane Properties by Bilayer Insertion and Domain Formation: Implications for Cell Toxicity." *Biophysical Journal* 95 (10): 4845–61.
  136. Valincius, G., Meškauskas, T., Ivanauskas, F. 2012. "Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes." *Langmuir* 28 (1): 977–90.
  137. Valincius, G., Mickevicius, M. 2015. "Tethered Phospholipid Bilayer Membranes.



- An Interpretation of the Electrochemical Impedance Response.” *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* 21 (December): 27–61.
138. Vega, V. L., Rodríguez-Silva, M., Frey, T., Gehrmann, M., Diaz, J., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., De Maio, A. 2008. “Hsp70 Translocates into the Plasma Membrane after Stress and Is Released into the Extracellular Environment in a Membrane-Associated Form That Activates Macrophages.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (6): 4299–4307.
  139. Vockenroth, I. K., Atanasova, P., Long, J., Jenkins, A., Knoll, W., Köper, I. 2007. “Functional Incorporation of the Pore Forming Segment of AChR M2 into Tethered Bilayer Lipid Membranes.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768 (5): 1114–20.
  140. Vockenroth, Inga K., Claire Rossi, Muhammad Raza Shah, and Ingo Köper. 2009. “Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes Probed by Various Surface Sensitive Techniques.” *Biointerphases* 4 (2): 19–26.
  141. Wagner, A. C., H. Weber, L. Jonas, H. Nizze, M. Strowski, F. Fiedler, H. Printz, H. Steffen, and B. Göke. 1996. “Hyperthermia Induces Heat Shock Protein Expression and Protection against Cerulein-Induced Pancreatitis in Rats.” *Gastroenterology* 111 (5): 1333–42.
  142. Wagner, M. L., Tamm, L. K. . 2000. “Tethered Polymer-Supported Planar Lipid Bilayers for Reconstitution of Integral Membrane Proteins: Silane-Polyethyleneglycol-Lipid as a Cushion and Covalent Linker.” *Biophysical Journal* 79 (3): 1400–1414.
  143. Wang, R., Kovalchin, J., Muhlenkamp, P., Chandawarkar, R. 2006. “Exogenous Heat Shock Protein 70 Binds Macrophage Lipid Raft Microdomain and Stimulates Phagocytosis, Processing, and MHC-II Presentation of Antigens.” *Blood* 107 (4): 1636–42.
  144. Watson, H. 2015. “Biological Membranes.” *Essays in Biochemistry* 59 (November): 43–69.
  145. Welch, W. J. 1993. “How Cells Respond to Stress.” *Scientific American* 268 (5): 56–64.
  146. Welch, W. J., Feramisco, J. R. . 1984. “Nuclear and Nucleolar Localization of the 72,000-Dalton Heat Shock Protein in Heat-Shocked Mammalian Cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 259 (7): 4501–13.
  147. Wilson, P. G., Manji, M., Neoptolemos, J. P. 1998. “Acute Pancreatitis as a Model of Sepsis.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41 (suppl 1): 51–63.
  148. Wimley, W. C., Hristova, K., Ladokhin, A., Silvestro, L., Axelsen, P., White, S. 1998. “Folding of  $\beta$ -Sheet Membrane Proteins: A Hydrophobic Hexapeptide Model” Edited by D. C. Rees.” *Journal of Molecular Biology* 277 (5): 1091–1110.
  149. Ye, Q., Konradi, R., Textor, M., Reimhult, E. 2009. “Liposomes Tethered to Omega-Functional PEG Brushes and Induced Formation of PEG Brush Supported Planar Lipid Bilayers.” *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 25 (23): 13534–39.
  150. Zhang, X., Xu, Z., Zhou, Li., Chen, Y., He, M., Cheng, L., Hu, F., Tanguay, R., Wu, T. 2010. “Plasma Levels of Hsp70 and Anti-Hsp70 Antibody Predict Risk of Acute Coronary Syndrome.” *Cell Stress & Chaperones* 15 (5): 675–86.
  151. Zhao, H., Lappalainen, P. 2012. “A Simple Guide to Biochemical Approaches for Analyzing Protein-Lipid Interactions.” *Molecular Biology of the Cell* 23 (August): 2823–30.
  152. Ziegler, T. R., Ogden, L., Singleton, K., Luo, M., Fernandez-Estivariz, C., Griffith, D., Galloway, J.R., Wischmeyer, P. 2005. “Parenteral Glutamine Increases Serum Heat Shock Protein 70 in Critically Ill Patients.” *Intensive Care Medicine* 31 (8): 1079–86.

## **PADĖKA**

Esu dėkinga baigiamojo darbo vadovei dr. Rimai Budvytytei už galimybę atlikti magistro darbą Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje bei už patarimus, kantrybę ir suteiktas žinias. Nuoširdžiai dėkoju visam skyriaus kolektyvui už drauge praleistą laiką ir naudingus patarimus.

Reiškiu didelę padėką dr. Vytautui Smirnovui iš iš Biotechnologijų instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimų skyriaus, kuris suteikė galimybę naudotis spektrofotometru.

## MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

### Studentų konferencijos:

1. 2021 03 30 International Conference of Life Sciences The(Extra)ordinary COINS, Vilnius, Lietuva.

Study of the Interaction of Hsp70 with Unilamellar Vesicles. **Akvilė Milašiutė**, Rima Budvytytė, Gintaras Valinčius

2. 2021 03 16-19 Open Readings 2021, Vilnius, Lietuva.

Study of the Interaction of Hsp70 with Unilamellar Vesicles. **Akvilė Milašiutė**, Rima Budvytytė, Gintaras Valinčius