

VILNIAUS UNIVERSITETAS

RIMA BUDVYTYTĖ

**DIRBTINĖS FOSFOLIPIDINĖS SISTEMOS BALTYMŲ BEI PEPTIDŲ
SĄVEIKOS SU BIOLOGINĖMIS MEMBRANOMIS TYRIMAMS**

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2012 metai

Disertacija rengta 2008 – 2012 metais Vilniaus universiteto Biochemijos insitute.

Mokslinis vadovas:

doc. dr. Gintaras Valincius (Vilniaus universiteto Biochemijos institutas, gamtos mokslai, biochemija – 04 P).

Konsultantas:

habil. dr. Gediminas Niaura (Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, chemija – 03 P).

*Pagrindinė proto teigiamybė – ne gyvumas, o tikslumas, kaip ir švytuoklės
pivalumas – ne sparta, o eigos tikslumas.*

// L. DE. VOVENARGAS //

TURINYS

PADĖKA	7
SANTRUMPOS	8
IVADAS.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	16
1.1 Biologinės membranos ir jų sudėtis	16
1.1.1 Fosfolipidų cheminės savybės	18
1.1.2 Fosfolipidų fizikinės savybės	20
1.2 Lipidų – baltymų sąveikos	24
1.2.1 Išoriniai (periferiniai) membranos baltymai.....	24
1.2.2 Vidiniai (integralieji) membranos baltymai	25
1.2.3 Lipidų įtaka membraninių baltymų aktyvumui	25
1.3 Ląstelių membranos modeliai.....	27
1.3.1 Dvisluoksnės lipidinės membranos suformuotos ant kietų paviršių.....	28
1.3.2 Prijungtos prie paviršiaus dvisluoksnės fosfolipidinės membranos.....	30
1.3.3 Baltymų įterpimas (atkūrimas) į fosfolipidinę membraną.....	33
1.4 Poras formuojantys toksinai (PFTs).....	34
1.4.1 β -PTF – α -hemolizinas (α -hemolysin).....	36
1.4.1.1 α – hemolizino struktūra	36
1.4.1.2 α – hemolizino įsiterpimas į membraną	38
1.4.1.3 α – hemolizino patogenezė.....	40
1.4.2 β -PTF – juodligės toksinas (<i>Anthrax toxin</i>)	41
1.4.2.1 Juodligės toksino struktūra.....	42
1.4.2.2 Juodligės toksino įsiterpimas į membraną ir patogenezė.....	44
1.4.3 CDC – <i>vaginolizinas</i>	46
1.4.3.1 Nuo cholesterolio priklausomi citolizinais	46
1.4.3.2 CDC struktūra	47
1.4.3.3 CDC – Vaginolizino (VLY) veikimas	49
1.4.4 <i>Apibendrinimas ir PTF perspektyvos</i>	51
1.5 Biologinių nanoporų panaudojimas.....	52
1.6 Beta amiloidų vaidmuo Alzheimerio ligoje.....	54
1.6.1 <i>Netvarkių agreguotų baltymų įtaka neurodegeneracijai</i>	54
1.6.2 <i>Alzheimerio ligos sukėlėjai – β amiloidų sankaupos</i>	56
1.6.2.1 Alzheimerio liga.....	56
1.6.2.2 Amiloido pirmtako baltymas ir β -amiloido peptidas	57
1.6.2.3 Alzheimerio ligos neuropatologija.....	59
1.6.3 <i>β-amiloidų oligomerų struktūra ir toksiškumas</i>	60
1.6.3.1 β -amiloidų oligomerų morfologija.....	60
1.6.3.2 Užląstelinių β -amiloidų oligomerų formavimasis ir jų toksiškumas	63
2. TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGOS	66
2.1 <i>Elektrocheminio impedanso spektroskopija: dvisluoksnio kokybės charakterizavimas</i>	66
2.1.1 Elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodo teorija	66
2.1.2 Elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodo taikymas	68
2.1.3 Eksperimentinė įranga.....	70
2.1.4 Imobilizuotos dvisluoksnės lipidinės membranos formavimas	71

2.1.5. Duomenų analizė.....	72
2.2 Fluorescentinė koreliacinė spektroskopija: peptidų sąveikos su dvisluoksniu ir fosfolipidų dinamikos membranoje tyrimas	74
2.2.1 Fluorescentinės koreliacinės spektroskopijos metodo teorija	75
2.2.2 Fluorescentinės koreliacinės spektroskopijos taikymas.....	77
2.2.3 Eksperimentinė įranga ir duomenų analizė	78
2.3 Atominės jėgos mikroskopija.....	80
2.3.1 AJM darbo režimai.....	81
2.3.3 Eksperimentinė įranga.....	83
2.4 Suminio dažnio generacijos spektroskopija.....	83
2.4.1 Suminio dažnio generacijos spektroskopijos teorija	84
2.4.2 Eksperimentinė įranga ir duomenų analizė	85
2.5 Kiti papildomi metodai.....	87
2.6 Medžiagos ir paruošimo protokolai	88
3. DARBO REZULTATAI	92
I SKYRIUS. Dirbtinės prijungtos fosfolipidinės membranos: vystymas ir charakterizavimas	92
<i>Įvadas</i>	<i>92</i>
1. tBLM savybių charakterizavimas.....	93
1.1 EIS spektriniai pokyčiai, formuojantis membranai	93
1.2 Elektriniai tBLM parametrai	94
1.3 tBLM stabilumo tyrimas	96
2. Inkarnių junginių įtaka tBLM savybėms	97
2.1 SAM talpų pokyčiai, priklausomai nuo inkaro prigimties ir jo koncentracijos	97
2.2 Mišrių SAM charakterizavimas atominės jėgos mikroskopu	100
2.3 Fosfolipidų dinamikos tyrimai dvisluoksnyje.....	102
3. tBLM modifikavimas vezikulių liejimosi metodu	106
3.1 Cholesterolio įtaka tBLM elektrinėms savybėms	106
3.2 Lipidų ir cholesterolio pernešimo tyrimai fluorescentiniu mikroskopu.....	109
3.3 tBLM elektrinės talpos kitimas – modifikavimo metu	112
3.4 Vezikulių dydžio įvertinimas po sąveikos su tBLM	115
4. Daugiakomponentės lipidinės membranos.....	116
4.1 Neuronų membraną imituojanti tBLM.....	117
4.2 Neuronų membranos lipidinio ekstrakto vezikulių liejimas	119
5. Apibendrinimas.....	121
II SKYRIUS. Poras formuojančių toksinų ir fosfolipidinės membranos sąveikos eksperimentinis tyrimas.....	123
<i>Įvadas</i>	<i>123</i>
<i>Rezultatai ir jų aptarimas</i>	<i>124</i>
1. α-hemolizino ir PA₆₃ įsiterpimas į fosfolipidinę membraną	124
1.1 EIS spektrų ir elektrinių parametrų pokyčiai įsiterpant α -hemolizinui	124
1.2. tBLM sąveikos su α -HL priklausomybė nuo baltymo koncentracijos ir temperatūros	126
1.3. α -hemolizino kanalo funkcionalumo tyrimas	131
1.4 PA ₆₃ ir tBLM sąveikos tyrimas nuo toksino koncentracijos ir temperatūros.....	133
1.5. PA ₆₃ kanalo funkcionalumo tyrimas	135
2. Vaginolizino (VLY) sąveika su pavuršiuje imobilizuotomis fosfolipidų membranomis	136
2.1 VLY įsiterpimas į tBLM	137
2.2 VLY veikimas priklausomas nuo membranos fosfolipidinės sudėties	139

3. Apibendrinimas.....	141
------------------------	-----

III SKYRIUS. A β ₁₋₄₂ oligomerų ir tBLM sąveikos bei neurotoksiškumo tyrimas..... 143

<i>Ivadas</i>	143
<i>Rezultatai ir jų aptarimas</i>	144
1. Aβ₁₋₄₂ agregatų morfologijos ir struktūros tyrimas	144
1.1 Patogeninių β – amiloido oligomerų (agregatų) formavimas in vitro	144
1.2 A β ₁₋₄₂ oligomerų ir fibrilių charakterizavimas atominės jėgos mikroskopu	145
1.3 A β ₁₋₄₂ oligomerų formų morfologiniai tyrimai koreliacinės fluorescentinės spektroskopijos ir dinaminės sklaidos metodais	149
1.4 A β ₁₋₄₂ oligomerų neurotoksiškumo ir struktūros ryšio nustatymas	151
1.5. A β ₁₋₄₂ oligomerų antrinės struktūros elementų nustatymas.....	152
1.6 A β ₁₋₄₂ darinių detekcija suminio dažnio generacijos spektroskopijos metodu	156
2. Tirpių Aβ₁₋₄₂ oligomerų ir fosfolipidinės membranos sąveikos bei galimo toksiškumo tyrimas	159
2.1 Tirpių A β oligomerų sukkelto tBLM dielektrinio pažeidimo tyrimas.....	160
2.2 Jonų, judančių per A β ₁₋₄₂ oligomerų paveiktą membraną, aktyvacijos barjero nustatymas.....	164
2.3 Toksiškųjų ir netoksiškųjų A β ₁₋₄₂ oligomerų formų sąveika su fosfolipidinėmis vezikulėmis	166
2.4 A β ₁₋₄₂ oligomerų sąveikos ir afiniškumo fosfolipidiniams komponentams tyrimas.....	169
3. Apibendrinimas	174

IŠVADOS 176

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA..... 178

Publikacijos:..... 178

Tezės: 179

LITERATŪROS SARAŠAS 180

PADĖKA

Esu dėkinga daugeliui žmonių, kurie vienaip ar kitaip yra prisidėję prie šios disertacijos atsiradimo. Pirmiausia aš nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui **dr. Gintarui Valinčiui**, kuris visos doktorantūros metu palaikė mane savo kantrybe, entuziazmu, patarimais ir žiniomis. Esu dėkinga Jam, jog atvėrė man langą į membranų pasaulį. Dėka jo intelektualaus vadovavimo, aš susidomėjau akademinio mokslu ir išsiugdžiau kantrybę, nepaisydama pasitaikančių sėkmių ir neskėmių darbe. Taip pat didelis Ačiū Jam už kiekvieną diskusiją, kurios visada buvo naudingos ir laukiamos.

Reiškiu padėką savo konsultantui **habil.dr. Gediminui Niaurai** už tai, jog supažindino mane su SDG ir padėjo suprasti šio metodo principus. Taip pat dėkoju už žinių perdavimą spektroskopijos srityje ir naudingus patarimus visos mano doktorantūros metu.

Disertacijos darbas yra susijęs su daug didesniais projektais, taigi norėčiau padėkoti visiems prisidėjusiems prie jų įgyvendinimo. Dėkoju: **dr. Vilmantei Borutaitei**, **dr. Ramunei Morkūnienei** and **Pauliui Čižui** iš Sveikatos mokslų universiteto už sėkmingą bendradarbiavimą ir stimulating diskusijas; **dr. Aurelijai Žvirblienei** iš Biotechnologijos instituto už vaginolizino ir A β ₁₋₄₂ antikūnų tiekimą ir gamybą; **dr. Justui Barauskui** už pagalbą supažindinant mane su AFM matavimais; firmai “**Ekspla**” už suteiktą galimybę pasinaudoti SDG instrumentu ir atlikti matavimus.

Dėkoju **dr. David Vanderah** (NIST, JAV) už susintetintus prikabinčius junginius ir jų tiekimą mums. Be jo pagalbos šis darbas nebūtų užbaigtas; Ačiū, **dr. John J. Kasianowicz** (NIST, USA) už juodligės toksiną.

Ypatingai dėkoju **prof. Mathias Losche** (CMU ir NIST, JAV) už suteiktą galimybę nuvykti į Carnegie Mellon Universitetą įsijungti į jo grupę, atlikti matavimus ir už pasitikėjimą. Esu dėkinga: **Sidd Shenoy** už pagalbą įsisavinant FCS metodą ir draugiškas diskusijas; **Dr. Radu Moldovan** už tai, jog supažindino mane su Pitsburgu ir už gerą laiką po darbo; **Agnieszka Kalinowski** už draugiškumą ir svetingumą, kur aš jaučiausi taip, lyg būdama namie.

Esu dėkinga **Mindaugui Mickevičiui**, **Marijai Jankunec**, **Tadui Ragaliauskui** and **dr. Daivai Tauraitėi** už malonias kavos pertraukėles ir dalinimąsi pykčiu, laime ar nepasitenkinimu, dėka kurių gyvenimas darėsi tik įdomesnis; Ačiū visiems buvusiems ir esamiems Bioelektrochemijos ir Biospektroskopijos skyriaus darbuotojams už pagalbą ir malonią darbinę aplinką.

Pabaigai, aš norėčiau padėkoti šeimai už palaikymą ir **Donatui (Džiugui)** už meilę, pagalbą ir niekadą nesibaigiančią kantrybę.

SANTRUMPOS

BLM – dvisluoksnė lipidinė membrana;
SAM – savitvarkis monosluoksnis;
sBLM – plokštuminė dvisluoksnė lipidinė membrana;
tBLM – imobilizuota dvisluoksnė lipidinė membrana;
PTFs – poras formuojantys toksinai;
 α -HL – α -hemolizinas iš *Staphylococcus aureus*;
PA – juodligės toksino komponentas – apsauginis antigenas;
EF – juodligės toksino komponentas – edemos faktorius;
LF – juodligės toksino komponentas – letalinis faktorius;
AL – Alzheimerio liga;
APP – amiloido pirmtako baltymas;
BACE – β -sekretazė;
A β – amiloidas β ;
HFIP – heksafluorizopropanolis;
DOPC – 1,2-dioleilo-*sn*-glicerolio-3-fosfotidicholinas;
DPhPC – 1,2-difitanoilo-*sn*-glicerolio-3-fosfotidilcholinas;
POPC – 2-oleoilo-1-palmitoilo-*sn*-glicerolio-3-fosfotidicholinas;
DOPE – 1,2-dioleilo-*sn*-glicerolio-3-fosfotidiletanolaminas;
OPPC – 1-oleoil-2-palmitoilo-*sn*-glicerolio-3-fostidilfocholinas;
DecoPC – 1,2-Dieikozonoilo-*sn*-glicerolio-3-fosfotidilcholinas;
DOPE-LR – 1,2-dioleilo-*sn*-glicerolio-3-fosfotidiletanolamino-N-(lizamino rodamino B sulfonilas) (amonio druska);
DOPE-NDB – 1,2-dioleilo-*sn*-glicerolio-3-fosfotidietanolamino-N-(7-nitro-2-1,3-benzoksadiazolio-4-ilas) (amonio druska);
CHO-NBD – 25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoksadiazoli-4-yl)metil]amino]-27-norcholesterolis;
PS – fosfotidilserinas;
PC – fosfotidicholinas;
PE – fosfotidietanolaminas;
PI – fosfotidilinozitolis;
CHO – cholesterolis;
Cer – cerebrozidas;
SM – sfingomielinas;
L_c – lipidų kristalinė fazė;
L _{β} – lipidų gelinė fazė;
L _{α} – lipidų skysta kristalinė fazė;
CDC – nuo cholesterolio priklausomi citoliziniai;
PFO – perfingolizinas;
VLY – vaginolizinas;
ADDL – tirpūs A β ₁₋₄₂ difuziniai ligandai;
WC14 – 20-tetradeciloksio-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontano-1-tiolas;

HC18 – Z 20-(Z-oktadeko-9-eniloksi)-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksatetrakont-31-eno-1-tiolis;
 FC16 – 29-heksadecyloksio-3,6,9,12,15,18,21,24,27,31-dekaoksaheptatetrakontano-1-tiolis;
 β ME – β -merkaptotanolis;
 PEG – polietilenglikolis;
 EIS- elektrocheminio impedanso spektroskopija;
 U – įtampa, V;
 I – stipris, A;
 R – varža, Ω ;
 C – elektrinė talpa, F;
 AC – kintama srovė;
 Z – impedansas, Ω arba $\Omega \cdot \text{cm}^2$;
 φ – postūmio kampas;
 ω – dažnis, išreikštas rad/s;
 ϵ – dielektrinė skvarba;
 ϵ_0 – santykinė dielektrinė skvarba;
 CPE – pastovios fazės elementas, F arba F/cm^2 ;
 α – pastovios fazės elemento laipsnio rodiklis;
 Z' – impedanso reali komponentė;
 Z'' – impedanso menama komponentė;
 j – menamasis vienetas.
 Y – admitansas arba laidumas, S arba $\text{S} \cdot \text{cm}^{-2}$;
 Y' – admitanso reali komponentė;
 Y'' – admitanso menama komponentė;
 E_a – aktyvacijos energija, kJ/mol;
 FCS – fluorescencijos koreliacijos spektroskopija;
 τ_D – lateralinis difuzijos laikas, ms;
 D – difuzijos koeficientas, $\mu\text{m}^2/\text{s}$;
 $G(\tau)$ – savaiminės koreliacijos funkcija;
 DLS – dinaminė šviesos sklaida;
 CD – apskritiminis (žiedinis) dichroizmas;
 AJM – atominės jėgos mikroskopija;
 SDG – suminio dažnio generacija;
 ω_{SD} – Generuojamas suminio dažnio signalas
 ω_{VIS} – matomos srities kaupinimo spindulys;
 ω_{IR} – infraraudonosios srities kaupinimo spindulys;

ĮVADAS

Ląstelės plazminės membranos yra sudėtingos sistemos, o jų tyrimai yra svarbūs tiek medicinoje, tiek molekuliniėje biologijoje, tiek fiziologijoje, taip pat ir ląstelės biologijoje bei biochemijoje. Dėl sudėtingos biologinių membranų struktūros, tiriant jas ir jose vykstančius reiškinius, buvo sukurti įvairūs ląstelių membraną modeliuojantys dariniai: liposomos (vezikulės), juodosios lipidinės membranos ir dvisluoksnės lipidinės membranos, suformuotos ant kietų paviršių. Dirbtinės, paviršiuje imobilizuotos dvisluoksnės fosfolipidinės membranos (angl.: Tethered bilayer lipid membrane, tBLM) pastaruoju metu itin aktyviai tyrinėjamos daugelyje pasaulio laboratorijų. Jos naudojamos kaip stabilūs fosfolipidinės membranos modeliai įvairiems biologiškai svarbiems procesams tirti, bei potencialios matricos naujos kartos biosensoriams, veikiantiems poras formuojančių polipeptidų pagrindu (Bayley ir Cremer, 2001). Šio darbo tyrimams pasirinktas būtent tBLM modelis, turintis joninį rezervuarą tarp paviršiaus ir fosfolipidinio dvisluoksnio, bei pasižymintis lateraliu fosfolipidų mobilumu. Be to, tBLM pasižymi dideliu stabilumu ir yra patogi eksperimentinė platforma įvairiems ląstelinių procesų tyrimams: receptorių funkcionalumo, fermentų aktyvumo, transmembraninių baltymų įterpimo. Disertacijos darbe bus aptartos tBLM sukūrimo ir išvystymo galimybės, bei šių modelių pritaikymas baltymų (peptidų) įterpimui, jų detekcijai ir funkcijos tyrimuose. tBLM bus analizuojamos ir charakterizuojamos elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS), fluorescentine koreliacine spektroskopija (FCS) bei fluorescentine mikroskopija.

Bakteriniai poras formuojantys toksinai (PFTs) – tai galingas gamtos biologinis ginklas. Infekcijos metu jie formuoja poras membranoje ir taip sutrikdo natūralią ląstelės homeostazę, suardo pralaidumo barjerą, inhibuoja specifinius procesus ir galų gale sukelia ląstelių žūtį. Šiame darbe tyrinėjami trys toksinai – tai α -hemolizinas (α -HL), kuris yra vienas geriausiai ištirtų, stipriai pažeidžiančių fosfolipidinės membranos integralumą, poras

formuojantis toksinas sekretuojamas *Staphylococcus aureus*. Kraujotakoje α -hemolizinas atakuoja eritrocitų membranas ir sukelia jų lizę, inicijuodamas uždegiminių procesų kaskadas; Juodligės toksinas (PA₆₃) – tai taip pat poras formuojantis toksinas, sekretuojamas *Bacillus anthracis*, sukeliantis bendrą organizmo intoksikaciją; Vaginolizinas (VLY) – nuo cholesterolio priklausomas citolizinas sekretuojamas *Gardnerella vaginalis*, kurio pasekoje pasireiškia bakterinė vaginozė. PTFs poveikis yra tiesiogiai susijęs su fosfolipidinės membranos ir toksino sąveika. Darbe bus parodytos galimybės detektuoti toksinus, naudojant fosfolipidų dvisluoksnius, bei tirti membranų ir toksinų sąveiką, pasitelkiant EIS metodą.

Alzheimerio liga (AL) yra dažniausia progresuojanti neurodegeneracinė vyresnio amžiaus asmenų liga, kuri pasireiškia mąstymo (suvokimo) ir atminties sutrikimais, ryškiais asmenybiniais bei psichinės būsenos pokyčiais. Ligos metu yra pažeidžiamos ir, progresuojant ligai, miršta smegenų dalies, susijusios su mąstymu bei atmintimi, ląstelės. Alzheimerio ligos patogenezė siejama su baltymo β -amiloido (A β ₁₋₄₂) savaiminio susiorganizavimo į skirtingas viršmolekulines struktūras: netirpias fibriles, protofibriles ir tirpius oligomeras ir jų kaupimusi smegenų audiniuose, bei vienas iš neurotoksiškumą, paveikiančių veiksnių – tiesioginė sąveika su neuronų membrana. Šiame darbe buvo tiriama galimi veiksniai, kurie molekuliniam lygyje gali būti susiję su biocheminiais ir biofizikiniais reiškiniais, iššaukiančiais ar skatinančiais Alzheimerio ligą. Tam buvo pasitelkiami įvairūs struktūriniai bei spektroskopiniai metodai (FCS, atominės jėgos mikroskopija (AJM), EIS, suminio dažnio generacija (SDG) ir kiti).

Darbo tikslas ir uždaviniai:

Šio darbo pagrindinis darbo tikslas - sukurti ir charakterizuoti paviršiuje įmobilizuotus fosfolipidinius dvisluoksnius (tBLM), imituojančius ląstelių membranas bei panaudoti juos baltymų veikimo tyrimuose. Darbe yra sprendžiama eilė biocheminių, biofizikinių bei spektroskopinių tyrimų

uždavinių, kurie skirti pagrindinio disertacijos darbo tikslo įgyvendinimui. Pagrindiniai uždaviniai yra šie:

- Sukurti biologiškai tikroviškas tBLM baltymų (peptidų) poveikio membranoms tyrimams.
- Įterpti poras formuojančių toksinus – α -hemolizino, juodligės toksino, bei vaginolizino savaiminį į tBLM ir nustatyti elektrocheminius dirbtinių fosfolipidų membranų pažaidos požymius.
- Ištirti amiloidinių ($A\beta_{1-42}$) darinių funkcijos ir struktūros ypatybes, leidžiančias identifikuoti ir charakterizuoti toksiškuosius oligomerų variantus.
- Ištirti tirpių $A\beta_{1-42}$ oligomerų sąveiką su tBLM ir fosfolipidinės membranos pažaidos mechanizmą.

Sprendžiamos mokslo problemos aktualumas ir naujumas

Paviršiuje imobilizuotosios membranos yra sudėtingos molekulinės architektūros sistemos, atveriančios galimybes sukurti naujos kartos biosensorius bei ląstelės membranos modelius. Idealūs ląstelės membranos modeliai, tam kad jie būtų tinkami baltymų įterpimui ir jų tyrimams, turi pasižymėti savaiminiu ilgalaikiškumu, fosfolipidų judrumu ir tam tikra architektūra, pritaikoma paviršinei analizei. Todėl vienas pagrindinių šio darbo tikslų – tai eukariotinių ląstelių ar organelių membraną imituojančios naujos tBLM sukūrimas ir jos išvystymas, bei charakterizavimas. Šiame darbe, tBLM konstravimui, panaudojome unikalius, mūsų užsienio partnerio dr. D.Vanderah (NIST, Gaithersburg) susintetintus, bioimituojančius tiolipidinius junginius ir jų kiekius, kurie šiose sistemose atlieka membranos fiksavimo paviršiuje funkciją. Nuo jų, kaip matysite, priklauso suformuotų membranų elektrinės savybės ir fosfolipidų judrumas. Tikroviškos aplinkos sukūrimui yra būtinas fiziologiškai artimos tBLM suformavimas, todėl išvystėme metodą, kuriuo yra modifikuojamos membranos, įterpiant svarbius, etanolyje netirpius, lipidinius

komponentus. Modifikavimas remiasi tiesiogine sąveika tarp vezikulių ir imobilizuotųjų membranų.

Poras formuojančių bakterinių toksinų poveikis yra tiesiogiai susijęs su ląstelių membranos ir baltymo (polipeptido) molekulės sąveika. Sąveikos pobūdis gali būti įvairus, specifinis arba nespecifinis. Taigi, fosfolipidų ir poras formuojančių toksinų sąveikos molekulinio lygio mechanizmo supratimas yra būtinas, norint detektuoti toksinus bei sukurti efektyvius antitoksinio veikimo preparatus. Šiame darbe panaudodami EIS metodą, detektavome ir analizavome tBLM sąveiką su poras formuojančiais toksinais: α -HL, juodligės toksinu ir mažai tirinētu, nuo cholesterolio priklausomu citolizinu – VLY. Nuo cholesterolio priklausomo vaginolizino atveju, membranos pažeida buvo stebima, varijuojant cholesterolio kiekiu membranoje ir gauta apatinė toksino detekcijos riba 5,8 nM, kuri yra palyginama su hemolitiniais testais gautąja.

Daugelis neurodegeneracinių ligų tokių kaip Alzheimerio, Parkinsono, Hangtintono, prioninė ir šoninė amiotrofinė sklerozė pasižymi bendru ląstelinio ir molekulinio patogenezės mechanizmu, kuris siejamas su abnormalių baltymų agregacija ir struktūros praradimu, netobula degradacija ir keletu biocheminių virsmų ir procesų: oksidaciniu stresu ir laisvų radikalų formavimu; mitochondrijos disfunkcija ir DNR pažeida; ir kt. (Jellinger, 2009). Nors ši tyrimų sritis yra labai aktuali dėl pasaulinio vidutinio gyventojų amžiaus ilgėjimo ir joje dirbama labai aktyviai, vis dar Alzheimerio ligos ankyvasis patogenezės mechanizmas, kuris siejamas su $A\beta_{1-42}$ agregacija, nėra suprastas ir daugelis klausimų yra dar neatsakyti: kokios struktūros ir konformacijos agregatai yra patys neurotoksiškiausi? Kodėl vienos formos amiloidiniai dariniai sąveikauja su fosfolipidine membrana, kitos ne? Kokie baltymų ar fosfolipidinių membranų komponentų struktūriniai skirtumai įtakoja sukliamas neuronų pažeidas? Koku mechnizmu vyksta fosfolipidinės membranos pažeidimas (dielektrinis, joninis, elektrinis ar ligandų-receptorių valdomas)?

Atsižvelgiant į tai, pirmiausia darbe buvo tiriami įvairūs molekulinio lygio veiksniai, veikiantys $A\beta_{1-42}$ peptidų oligomerizaciją, susidarant

patogeniškiems $A\beta_{1-42}$ agregatams. Darbe pasiūlyti paviršiniai (AJM, IR) ir tūriniai (FCS, DLS, CD) metodai, pilnai įvertino nežymius struktūrinius ir morfologinius $A\beta_{1-42}$ agregatų pokyčius, priklausomus nuo paruošimo protokolų. Tokiu būdu nustatėme reikšmingą ryšį tarp $A\beta_{1-42}$ oligomerinių dalelių dydžio ir jų neurotoksiškumo. Suminio dažnio generacijos spektroskopijos pagalba parodėme, jog $A\beta_{1-42}$ oligomerai ir fibrilės adsorbuojasi oro/vandens fazių riboje orientuotoje formoje, taigi, generuoja stiprius vibracinius signalus, spektrinius žymenis, kurie gali būti panaudojami toksiškųjų oligomerų detekcijai. Antra, detektavome sąveiką tarp toksiškų, gerai charakterizuotos sudėties ir morfologijos, $A\beta_{1-42}$ oligomerų ir tBLM, varijuodami fosfolipidine sudėtimi. EIS pagalba, darbe parodyta, jog $A\beta_{1-42}$ oligomerai pažeidžia dielektrinį fosfolipidinių membranų integralumą, bet veikimo mechanizmas, lyginant su poras formuojančiais toksiniais, skiriasi. Nustatėme, jog $A\beta_{1-42}$ oligomerai pasižymi afiniškumu fosfolipidinėms membranoms, turinčioms sfingomielino. Sujungę visus biocheminius, biofizikinius ir spektroskopinius metodus, radome svarbią sąsają tarp agregatų dydžio, neurotoksiškumo, membranos lipidinės sudėties ir surišimo jėgos.

Iš esmės, disertacijos darbas apima platų spektrą taikomų tarpdisciplininių metodų, kurių panaudojimas užtikrino pagrindinių darbo tikslų įgyvendinimą.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. tBLM geometrija, elektrinės savybės, defektiškumas, lateralinis fosfolipidų judrumas, bei funkcinio baltymų įterpimo galimybės priklauso nuo molekulinio inkaro, naudojamo dirbtinės membranos imobilizavimui, prigimties.
2. tBLM defektiškumas priklauso ne tik nuo inkaro, bet ir nuo imobilizuojamo fosfolipido prigimties.
3. Vezikulių liejimo metodu ląstelių lipidų ekstraktai gali būti imobilizuoti paviršiuje, suformuojant funkcionalius tBLM.

4. tBLM, gaunamų tirpiklio pakeitimo metodu, sudėtis gali būti modifikuojama sąveikos su vezikulėmis būdu.
5. Cholesterolio įterpimas į tBLM stipriai sumažina membranos talpą, aktyvuoja nuo cholesterolio priklausomus citolizinus bei sukuria fluorescenciškai stebimus domenų dirbtinių membranų paviršiuje.
6. Poras formuojantys toksinai įsiterpia į tBLM nuo koncentracijos priklausomu būdu, formuodami jose elektrolito pripildytas poras, kuriose jonų judrio aktyvacijos barjeras artimas jonų judrio aktyvacijos barjerui elektrolito tūryje.
7. Vaginolizino funkciniam įsiterpimui į tBLM būtinas cholesterolis, bet tirtose dirbtinėse sistemose, toksino įsiterpimui ir membranos pažaidai nereikalingas CD59 receptorius.
8. $A\beta_{1-42}$ peptidai *in vitro* formuoja įvairios morfologijos agregatus, iš kurių didžiausiu neurotoksiškumu bei stipria sąveika su tBLM pasižymi mažos molekulinės masės oligomerai.
9. Toksiški $A\beta_{1-42}$ oligomerai pasižymi didesniu afiniškumu fosfolipidų biluoksniams, negu netoksiški, nors cirkuliarinio dichroizmo ir IR spektroskopijos tyrimas nerodo šių darinių antrinės struktūros skirtumų.
10. Toksinių $A\beta_{1-42}$ oligomerų sąveikos su tBLM metu membranos dielektrinė konstanta padidėja, todėl sumažėja joninio judrio per membrana barjeras ir išauga membranos laidumas.
11. Sfingomielinas sustiprina $A\beta_{1-42}$ oligomerų pažaidos efektą tBLM, taip pat sumažina amiloidų sukkelto laidžio aktyvacijos barjerą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Biologinės membranos ir jų sudėtis

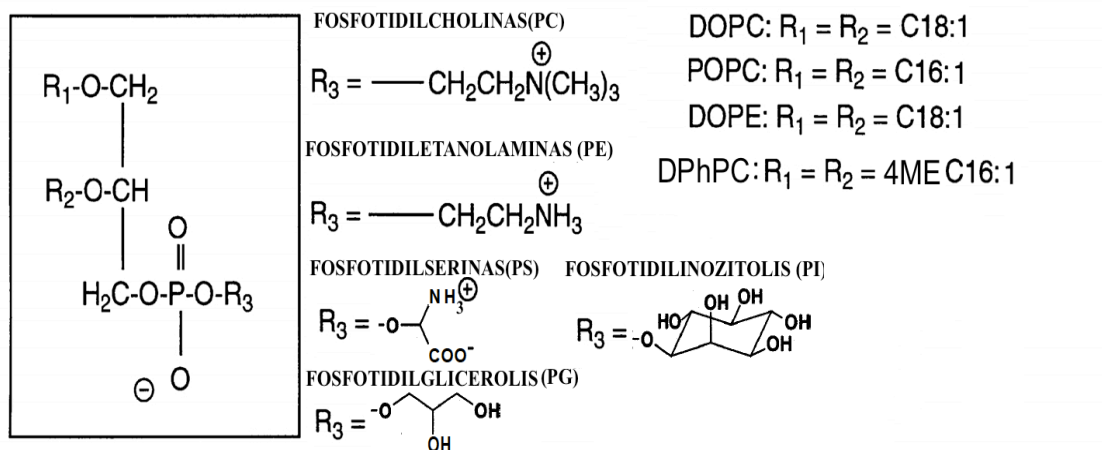
Membranos yra būtinosios gyvosios ląstelės dalys. Plazminė membrana gaubia ląstelę ir atskiria ląstelės ar jos organelių išorę nuo vidaus, dalyvauja selektyvioje pernašoje, nes turi specifines pernašos sistemas, nešiklius bei kanalus, taip pat dalyvauja signalo, ateinančio iš aplinkos perdavime, nes juose yra lokalizuotų specifinių receptorių ir indukuoja viduląstelines reakcijas ir kontroliuoja kai kurių reakcijų eigą. Jos būtinos kaupiant ląstelės energiją, pvz.: mitochondrijų vidinėje membranoje vyksta oksidacinio fosforilavimo procesai, kurie eukariotinėms ląstelėms teikia didžiausią ATP dalį. Plazminėje membranoje yra lokalizuotų fermentų ar jų kompleksų, išrikiuotų tam tikra seka. (Praškevičius ir kt., 2003). Jau 1925 m. Horteris ir Grendelis parodė, kad membrana sudaryta iš dviejų sluoksnių lipidų molekulių, o membraninių baltymų išsidėstymas ir jų tarpusavio sąveika buvo įvertinta tik 1972 m. Singerio ir Nikolsono pasiūlytame tokios – mozaikinės membranos modelyje (angl.: Fluid – mosaic model). Modelis teigia, kad membranos pagrindas yra lipidų dvisluoksnis su išsidėsčiusiais baltymais – vieni jų yra įsiterpę į membraną (integralieji), kiti – išsidėstę membranos paviršiuje (paviršiniai). Lipidinis dvisluoksnis yra skystas, todėl lipidai ir baltymai lengvai difunduoja ir atsitiktinai išsidėsto membranoje, sudarydami mozaiką, o angliavandeniai, prisijungę prie lipidų arba baltymų, išsidėsto išorinėje membranos pusėje. Steroliai taip pat yra vieni pagrindinių komponentų membranoje. Cholesterolis sutinkamas žinduolių ląstelėse, ir tai yra pagrindinis sterolinis eukariotų komponentas ląstelių plazminėje ir organelių membranose, išskyrus mitochondrijų membranose. Cholesterolio kiekis membranoje varijuoja tarp organelių (Lange ir kt., 2004). Cholesterolis gali savaime judėti (angl.: Flip – flop) tarp abiejų plazminės membranos sluoksnių. Tyrimai parodė, jog cholesterolio pasikeitimo puslaidis yra < 1 sekundės (Steck ir kt., 2002, Bennett ir kt., 2009). Kiek anksčiau buvo aptiktas ilgesnis cholesterolio perkėlimo tarp membranos sluoksnių laiko periodas (Leventis ir Silvius, 2001,

Backer ir Dawidowicz, 1979). Cholesterolis taip pat gali būti pakeistas tarp organelių vezikuliniu arba nevezikuliniu pernešimo mechanizmu. Vezikulinis pernešimas vykdomas per membranos pernešimo vezikules, turinčias baltymus, o nevezikulinis vyksta arba per tiesioginį cholesterolio judėjimą, arba tarpininkaujant baltymams – sterolio nešiklių baltymams (Maxfield ir Mondal, 2006). Cholesterolis dalyvauja daugelyje svarbių biologinių procesų: ląstelių membranose formuoja lipidinius plaustus, dalyvauja steroidinių hormonų sintezėje ir tulžies rūgščių sintezėje (Gimpl, 2010, Chiang, 1998). Pasikeitęs cholesterolio kiekis stipriai veikia signalų perdavimą ir membranos transportą.

1997 metais skystamozaikinį modelį patobulino Simons ir Ikonen, pasiūlydami lipidų plaustų modelį (angl.: lipid rafts model) (Simons ir Ikonen, 1997). Gyvūnų ląstelių plazminėje membranoje yra daug lipidinių plaustų (~ 70 nm skersmens), kuriuose gausu sfingolipidų ir cholesterolio, kurie sąveikaudami stipriau tarpusavyje sudaro nedidelius (70 nm), dinaminis ir heterogeniškus mikrodomenus, vadinamus lipidiniais plaustais. Kadangi plaustus sudarančių lipidų riebalų rūgštys yra ilgesnės, ir juose randami dideli kiekiai cholesterolio, lipidų plaustai yra storesni, nei kitos membranos vietos. Lipidiniai plaustai membranoje pasižymi gelio struktūra, dėl to lateralinis judėjimas jų viduje yra lėtesnis (Pike, 2004). Lipidų plaustuose gali koncentruotis atitinkami membranų baltymai ar net organizuoti funkcionuojantys fermentiniai kompleksai. Plaustai, kuriuose susikaupę glikozilsosfatidilinozitolio (GPI) – inkarinio baltymo, dalyvauja signalo perdavime ir vidinėje pūslelių pernašoje. Neuronų membranų lipidiniai plaustai yra svarbūs neuronų ląstelių adhezijoje, aksonų valdyme ir sinapsių pernešime (Tsui-Pierchala ir kt., 2002).

1.1.1 Fosfolipidų cheminės savybės

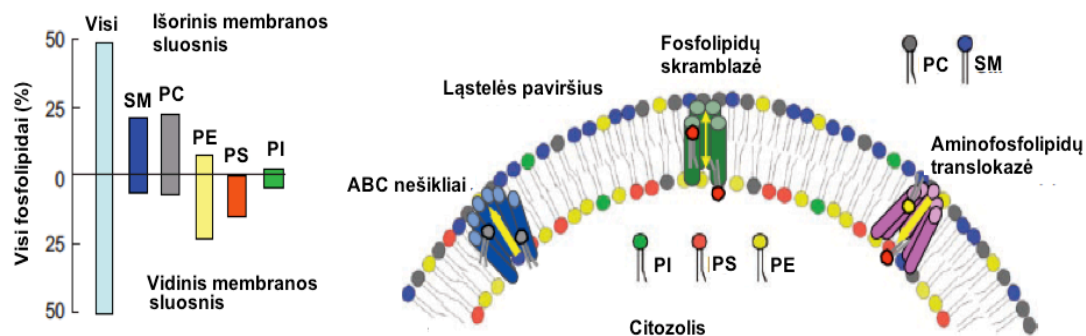
Lipidai yra pagrindiniai ląstelių membranų struktūriniai elementai (Petty, 1993). Tai – amfifilinės medžiagos, kurių molekulių viena dalis yra hidrofobinė, o kita hidrofilinė. Membranos sudarytos iš lipidų ir baltymų. Lipidų ir baltymų santykis paprastai svyruoja nuo 1:4 iki 4:1. Membranos, kuriose vyksta intensyvi medžiagų apykaita, turi daugiau baltymų, pvz., mitochondrijų vidinė membrana. Tokiose membranose, kurių pagrindinė funkcija yra tik izoliuoti ląstelės turinį nuo aplinkos, lipidai sudaro iki 80 %. Lipidai atlieka energetinę, struktūrinę, apsauginę funkcijas, yra fermentų kofaktoriai, elektronų nešėjai. Viena svarbiausių lipidų grupė yra fosfolipidai. Fosfolipidai sudaryti iš dviejų riebiųjų rūgščių grandinių, prijungtų per esterines jungtis prie glicerolio grandinės pirmojo ir antrojo anglies atomų (1.1 pav). Fosfolipidų skirtingas elgesys priklauso nuo jų hidrofilinės dalies struktūros ir taip pat priklauso nuo esančių riebiųjų rūgščių (hidrofobinės dalies) struktūros. Labiausiai biologinėse membranose paplitę glicerolio pagrindu grįsti fosfolipidai, kurių molekulinė struktūra schematiškai pavaizduoda 1.1 paveiksle. Paveiksle išskiriamos fosfolipidų klasės pagal hidrofilinės dalies funkcinę grupę: fosfotidilcholoinai (PC), fosfotidiletanolaminai (PE), fosfotidilserinai (PS), fosfotidilinozitoliai (PI).



1.1 pav. Bendra fosfolipidų struktūra. Prie pirmo ir antro glicerolio anglies atomo yra prijungtos riebiosios rūgštys, tuo tarpu prie trečio anglies atomo yra prijungiamas fosfatas, o prie jo gali būti jungiami: alkoholis, serinas, etanolaminas, cholinas ir kt. Disertacijoje labiausiai naudojamų fosfolipidų sudėtys pavaizduotos dešninėje.

Sfingozino pagrindu grįsti lipidai, tokie kaip sfingomielinai ir glikosfingolipidai, taip pat sintinkami eukariotų membranose (Pieter ir kt., 1996). Riebiosios rūgštys – tai linijinės angliavandenilių grandinės su karboksi- grupe grandinės gale. Jos gali būti sočiosios ir nesočiosios. Jei fosfolipido molekulės karboninių rūgščių grandinėje yra keletas dvigubųjų jungčių, tai jos visada izoliuotos viena nuo kitos metilo grupėmis. Riebiųjų rūgščių angliavandenilių grandinė varijuoja nuo 12 iki 26 anglies atomų. Priklausomai nuo membranos sudėties, skiriasi ir membranos takumas, klampumas, fazinio virsmo temperatūra (T_m), membranos asimetriškumas (Kusumi ir kt., 1986, Devaux, 1991). Lipidinė plėvelė lemia membranų lankstumą, plonumą, tvirtumą (Mildažienė ir kt., 2004).

Biologinės membranos pasižymi asimetriškumu (1.2 pav). Membranos asimetriškumą lemia keletas transmembraninių baltymų: ABC nešikliai, fosfolipidų skramblazė ir aminofosfolipidinė translokazė (Fadeel ir Xue, 2009) (1.2 pav.) Vienas svarbiausių skirtumų tarp išorinio ir vidinio dvisluoksnių yra neigiamai įkrauti fosfolipidai, išsidėstę dvisluoksnių citozolinėje pusėje (Janmey ir Kinnunen, 2006). Tyrimai su trombinu (Beveris ir kt., 1982) ir fluorescencijai žymėtu aneksinu (Kuypers ir kt., 1996) parodė, kad normaliose kraujo ląstelių membranose visas fosfatidilserinas, randamas vidiniame monosluoksnyje, tuo tarpu apie 20 % PE detektuojama išoriniame sluoksnyje, nors 80 % randama vidiniame monosluoksnyje. Išoriniame sluoksnyje dominuoja fosfatidilcholinai, sfingomielinai ir glikolipidai (Devaux, 1992, Williamson ir Schlegel, 1994). Membranos asimetriškumą lemia ir skeleto baltymų, pvz.:, spektrino – aktino komplekso sąveika su vidiniu lipidinio dvisluoksnių monosluoksniu, dėl kurios paveikiamas membranos mechaninis stabilumas (Manno ir kt., 2002).



1.2 pav. Fosfolipdų asimetriškumas membranoje ir su lipidų translokacija susiję fermentai. (Kairėje) Fosfolipidų pasiskirstymas žmogaus eritrocitų membranoje. Normalių eukariotinių ląstelių PC ir SM dominuoja išoriniame membranos sluoksnyje. PE ir PI didesnis kiekis sutinkamas vidiniame membranos sluoksnyje, tuo tarpu PS išimtinai randama tik vidiniame membranos sluoksnyje. (Dešinėje) Fosfolipidų asimetrija palaikoma arba veikiama šių baltymų: fosfolipidinės skramblazės, ATP-surišimo (ABC) nešiklių ir aminofosfolipidinės translokazės (Fadeel ir Xue, 2009).

Membranos asimetriškumo praradimas siejamas su senėjimo procesu (Tanaka ir Schroit, 1983). Anijoninių fosfotidilserinų atsiradimas ant ląstelės paviršiaus yra universalus, daugeliu atvejų, ląstelės mirties indikatorius, įskaitant ir apoptozę (Verhoven ir kt., 1995, Fadeel ir Xue, 2009, Janmey ir Kinnunen, 2006).

1.1.2 Fosfolipidų fizikinės savybės

Dėl amfifilinių savybių fosfolipidai vandenyje susijungia ir savaimingai sudaro uždaras struktūras, sudarytas iš dviejų lipidų molekulių sluoksnio. Kai vanduo iš visų pusių supa šias molekules, jos jungiasi taip, kad polinės galvutės būtų atsuktos į vandens pusę, o hidrofobinės uodegėlės paslėptos bisluoksnio viduje (1.2 pav.). Sudėtingos amfifilinės molekulės (pvz., fosfolipidai), kintant aplinkos savybėms (terpės pH, temperatūrai), formuoja žymiai įvairesnių geometrinių formų struktūras – pūsleles, orientuotus cilindrus, trimates periodines struktūras, dvisluoksnius ar heksagonalines struktūras (Schwarz, 1998). Papildomais, struktūros formą apibūdinančiais, dydžiais paprastai naudojami: amfifilinės molekulės tarpfazinėje riboje užimamo optimalaus ploto parametro a_0 ir molekulės hidrofobinės dalies (pvz.,

alifatinės grandinės) tūris v , bei jos maksimalus ilgis. Pastarojo parametras dažniausiai vadinamas *kriziniu grandinės ilgiu* (angl.: critical chain length) ir žymimas l_C . Jeigu kalbama apie alifatines hidrofobines grandines, tai parametras l_C artimas ar kiek mažesnis, nei maksimalus ištemptos šios funkcinės grupės ilgis ir aprašomas 1.1 lygtyje:



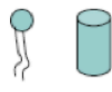
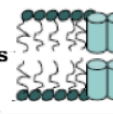




$$l_{\text{maks.}} \cdot l_C \leq l_{\text{maks}} \approx (0,154 + 0,1265 \times n) \text{ nm} \quad (1.1)$$

o grandinės užimamas tūris aprašomas 1.2 lygtyje:

$$v \approx (27,4 + 26,9 \times n) \times 10^{-3} \text{ nm}^3 \quad (1.2)$$

Israelachvili ir kt. dar 1976 metais parodė, kad amfifilinei molekulei būdingas bedimensinis *molekulinis formos faktorius* (angl.: molecular shape factor) – $v/(a_0 l_C)$, kur v – amfifilo hidrofobinės dalies tūris, l_C – maksimalus hidrofobinės funkcinės grupės ilgis, o a_0 – vienos molekulės užimamas plotas. Molekulės formos faktorius parodo kokios formos bus molekulinis agregatas, pvz.: rutulio formos micelė – $v/(a_0 l_C) < 1/3$; pūslelė – $v/(a_0 l_C) < 1$; dvisluoksnis – $v/(a_0 l_C) = 1$; atvirkštinė micelė – $v/(a_0 l_C) > 1$ (Israelachvili ir kt., 1976). Lipidai vandenyje spontaniškai formuoja mices. Micelių dydis labiausiai priklauso nuo tirpiklio ir nuo lipidinės sudėties. Micelių kreivumo diametras gali būti keičiamas varijuojant lipidine sudėtimi ir jų kiekiu, pvz.: maišant invertuotos konuso geometrinės formos lipidus su konusiais lipidais (Stokes ir Evans, 1997). Pagrindinės, vidinės agregatinės sąveikos, darančios įtaką amfifilinių molekulių savaiminei organizacijai į vandenyje skirtingos formos agregatus, yra šios: *hidrofobinė jėga*, veikianti tarp amfifilo hidrofobinių funkcinų grupių ir *hidrofilinė jėga*, veikianti tarp amfifilo hidrofilinių funkcinų grupių, užtikrinančių hidrofilinės molekulės dalies maksimalų kontaktą su terpe. Abiejų jėgų kombinacija apsprendžia agregato formą. Pirmoji jėga skatina vienos molekulės užimamo tarpfazinio ploto sumažėjimą, o antroji – padidėjimą (Israelachvili ir Wennerstrom, 1992). Amfifilinių molekulių suformuotos pirminės struktūros, dėl šių molekulių sąveikos, tarp molekulių agregatų toliau gali transformuotis į kitas geometrines stabilesnes

formas: kubines (Q), lamelines (L), heksagonalines struktūras (H_I, H_{II}) (Seddon ir Templer, 1995) (1.3 pav.).

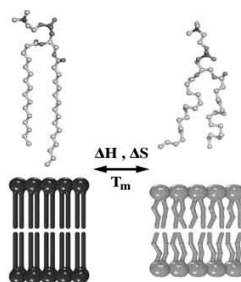
LIPIDAI	LIPIDŲ FORMA	ORGANIZACIJA	FAZĖ
Muilai Detergentai	Atvirkštinis kūgis $P < 1/3 - 2/3$ 	Micelės 	Heksagonalinė I
Sfingomielinas Fosfatidilserinas Fosfatidilcholinai Fosfatidilinozitolis Kardiolipinas	Cilindras $P \sim 1$ 	Bisluoksnis 	Plokštuminė (kubinė)
Fosfatidiletanolaminas Kardiolipinas - Ca ²⁺ Fosfatidilserinas (pH < 4) Monogalactozidilgliceridas	Kūgis $P > 1$ 	Atvirkštinė micelė 	Atvirkštinė micelė, heksagonalinė II
Mišiniai	$P \sim 1$ 	Bisluoksnis 	Plokštuminė

1.3 pav. Lipidų forma ir molekulinė jų organizacija (polimorfizmas). Pagal molekulinį formos faktorių, kuris priklauso nuo hidrofiliinės dalies tūrio ir riebiųjų rugščių grandinės ilgio, lipidai skirstomi į: cilindrinis (PC), kūginis (PE), apverstus kūginis (detergentai). Molekulinė organizacija ar susipakavimas priklauso nuo lipidų formos, išskiriamos fazės: dvisluoksniu (Lamelinė, L), dvisluoksniu (Lamelinė kubinė, Q) micelės (Heksagonalinė, H_I), atvirkštinės micelės (heksagonalinė, H_{II}) (Simons ir Sampaio, 2011).

Heksagonalinė fazė yra dažniausiai žymima H ir egzistuoja dvi jos formos: H_I ir H_{II}, besiskiriančios kreivumu. H_{II} fazės metu hidrofobinės dalys yra nukreiptos į vandenį, dėl to vadinama atvirkštine heksagonaline faze (angl.: Reverse Hexagonal II). Kubinės fazės (Q), kaip tarpinė būseną, gali būti sutinkamos įvairiose, lipidų organizacijos į fazes, sekos vietose. Svarbu pabrėžti, kad kubinės fazės matomos, kaip susilieję dvisluoksniai, kurių bendras paviršiaus kreivumas artimas nuliui (Fontell, 1990, Lindblom ir kt., 1989).

Pastaruoju metu kubinės fazės yra intensyviai tyrinėjamos, buvo aptikta, jog kubinės membranos fazės egzistuoja, ir biologinėse sistemose atlieka specifinį vaidmenį (Larsson, 2000, Frolov ir kt., 2011). Kubinės fazės dėl savo didelio paviršiaus ploto yra tinkamos membraninių baltymų įterpimui (angl.: reconstitution) (Ai ir Caffrey, 2000), taip pat kaip netirpių ar amfifilinių vaistų pernešimui (Gustafsson ir kt., 1997, Larsson, 2000).

Fosfolipidų lamelinės fazės gali egzistuoti keletose skirtingose būsenose. Žemoje temperatūroje egzistuoja kristalinė (L_c) būsena, kai hidrofobinės grandinės išsidėsto tvarkingai. Kylant temperatūrai, suaktyvėja fosfolipidinių grandinelių judrumas, todėl pereinama iš kristalinės būsenos į energetiškai palankesnę plokštuminę gelio fazę (L_β) (1.4 pav. kairėje). Aukštesnėje temperatūroje pereinama į skystą kristalinę fazę (L) (1.4 pav. dešinėje), kurios metu hidrofobinės grandinės yra netvarkingos.



1.4 pav. Pasiėkus lipidų lydimosi temperatūrą, lipidų hidrofobinės grandinės pereina į netvarkingą struktūrą. Membrana iš tvarkingos L_β fazės pereina į netvarkingą L_α fazę (Thomas, 2009).

Tvarkingas membranos fazių ar būsenų, besiskiriančių fizikinėmis savybėmis, perėjimas iš vienos į kitą, vadinamas lydimosi procesu. Žemoje temperatūroje lipidų grandinės yra tvarkingai išsidėsčiusios *trans* konfigūracijoje (1.4 pav. viršuje, kairėje). Aukštesnėje temperatūroje, dėl vidinės C-C jungties sukimosi, išsikraipo lipidų tvarkingas išsidėstymas (1.4 pav. viršuje, dešinėje). Tokiu būdu, kylant temperatūrai, membranos iš tvarkingos L_β fazės pereina į netvarkingą L_α fazę (1.4 pav. apačioje) (Thomas, 2009, Frolov, 2011). Šioje disertacijoje svarbiausiu tiriamuoju objektu ir įrankiu tiriant sąveikas su baltymais ir peptidais yra dvisluoksnės lipidinės struktūros – tai ir gamtoje labiausiai paplitusi lipidų organizacija.

1.2 Lipidų – baltymų sąveikos

Daugelis baltymų sąveikauja su fosfolipidine membrana, o tokių sąveikų analizė yra būtina pilnam biologinių membranų sistemų supratimui. Išskiriami trys lipidų – baltymų sąveikose dalyvaujančių baltymų tipai. Pirmasis – tai baltymai, vadinami vidiniais ar integraliaisiais, turintys hidrofobinius segmentus, kurie įsiskverbia į lipidinį dvisluoksnį arba perveria jį. Tuo tarpu antrasis apima tirpius baltymus, kurie vadinami išoriniais ar periferiniais, ir kurie, sąlytyje lipidai – vanduo, elektrostatiškai sąveikauja su neigiamai įkrautomis grupėmis (Cullis ir kt., 1996). Trečiasis – tai poras membranoje formuojantys baltymai (apie juos plačiau bus aptariama 1.4 skyriuje). Nors lipidų svarba įvairioms ląstelių funkcijoms yra žinoma jau seniai, bet tik dabar pradama suprasti, kaip lipidai ir jų sudėtis reguliuoja baltymų susilankstymą, organizaciją, baltymų eismą ir funkciją (Andersen ir Koeppe, 2007).

1.2.1 Išoriniai (periferiniai) membranos baltymai

Sąveikos tarp išorinių baltymų ir lipidų principai buvo pavaizduoti analizuojant keletą baltymų: poliliziną, citochromą C, bendrąjį mielino baltymą ir spektriną iš raudonųjų kraujo ląstelių. Įprastai, šie baltymai (teigiamai įkrauti) stipriai sąveikauja su lipidais, o jų rūgštinės (neigiamai įkrautos) grupės yra reikalingos baltymo su membrana elektrostatinei asociacijai. Pirmiausia, tokios paviršinės sąveikos inicijuoja neigiamai įkrautų lipidų klasterius ar kristalinius domenų, kurie lokaliai sumažina membranos takumą. Antra, divalenčiai katijonai konkuruoja tarpusavyje su periferiniais baltymais dėl prikabinimo prie lipidų. Taip, spektrinas apsaugo membranoje esančių neigiamai įkrautų lipidų regionus, kurie sąveikaudami su Ca^{2+} pereina į gelio – skysčio fazę (Lee, 1995). Tiriant periferinių baltymų įtaką lipidų polimorfizmui, taip pat buvo nustatytas konkurencingumas tarp baltymų ir divalenčių katijonų (Epan, 1998, Marsh, 2008). Baltymai, sąlytyje lipidai –

vanduo, sąveikauja su fosfolipidine membrana veikiami hidrofobinės, elektrostatinės, dipolinės sąveikos, ir dėl vandenilinių ryšių (Killian ir Heijne, 2000).

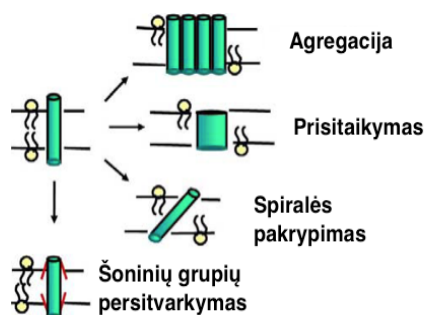
1.2.2 Vidiniai (integralieji) membranos baltymai

Vidiniai (integralieji baltymai) yra netirpūs ir turi vieną ar kelias hidrofobines sekas, kuriomis vieną ar kelis kartus perveria lipidinį dvisluoksnį. Lipidų fizinė būseną, tokios sąveikos pasekoje, keičiasi. Buvo parodyta, kad lipidus, sąveikaujančius su integraliais baltymais sąlytyje lipidai – vanduo, supa skirtinga aplinka, nei laisvai tirpale randamų dvisluoksnio lipidų aplinka (Lee, 2004). Sąveikaudami lipidai su integraliais baltymais, praranda įprastą lipido judrį. Taip pat nustatyta, kad baltymų aktyvumą, gali lemti kelios, sinergetiškai veikiančios molekulės. Tokiu principu veikia endoplazinio tinklo ATPazė, kurios aktyvumas pasireiškia kartu įterpus fosfolipidus arba detergentus. BMR ir kalorimetrijos tyrimai parodė, jog sąveikaudami integraliniai baltymai gali sutrikdyti lipidų struktūrą. Sąveikos metu, sąlytyje esantys lipidai esti ne gelinėje fazėje ir pasižymi staigiu lipidų keitimusi (pasikeitimo greitis = 10^{-7}).

1.2.3 Lipidų įtaka membraninių baltymų aktyvumui

Membraninių baltymų atyvumas priklauso nuo lipidinės apsupties ir specifinių lipidų. Bendram supratimui, kaip lipidai reguliuoja baltymų aktyvumą, reikia pirmiausia susipžinti su lipidų poveikiu membraninių baltymų struktūrai (Lee, 2003). Membraninių baltymų funkcija yra regliuojama per dvisluoksnio tankumą, dvisluoksnio suspaudimą ar dvisluosnio baltymų hidrofobinį atitikimą (Bechinger, 2000), integraliųjų baltymų kreivumą ar kreivumo sutrikdymą (Lee, 2004), dvisluoksnio deformacijos energiją (Fattal ir Ben-Shaul, 1993), acilo grandinių susipakavimą, dvisluoksnio laisvąjį tūrį, dvisluoksnio pakavimosi įtempimą ar dvisluoksnio stangrumą (Bezrukov, 2000). Visi šie reiškiniai atspindi

sudėtingus, vykstančius tiek dvisluoksniu, tiek baltymų pokyčius. Šie įvairūs ir sudėtingi procesai yra tiek specifinės lipidų – baltymo sąveikos, tiek bendros dvisluoksniu – baltymo sąveikos pasekmė. Atskirti specifinę (cheminę) nuo bendrosios (fizikinės) sąveikos yra sudėtinga, bet genetiniai tyrimai aiškiai parodė šių sąveikų priklausomybę nuo membranos lipidinės sudėties (Andersen ir Koeppe, 2007). Kad ir kokia sąveika vyktų, lipidai reguliuoja membraninių baltymų funkcijas, keisdami baltymo konformacijos pokyčio energetiką ir kinetiką, kuri užtikrina normalią jo funkciją. Sąveikos metu, skystakristalinė lipidų būseną užtikrina transmembraninio baltymo konformacijos virsmus (White, 2006). Baltymo įsiterpimo metu pasireiškia neatitikimas (angl.: mismatch) tarp baltymo hidrofobinių segmentų, įsiterpiančių į membraną, ir hidrofobinio dvisluoksniu storio. Kuomet transmembraniniai segmentai yra ilgesni (teigiamas nukrypimas) už dvisluoksniu storį, baltymo hidrofobinės grupės gali būti nukreiptos į polinę aplinką, kas energetiškai yra nepalanku. Tam, kad sumažinti sąveikos metu atsirandančius neatitikimus, sistema gali persitvarkyti keliais būdais, pavaizduotais 1.5 paveiksle.



1.5 pav. Baltymo – dvisluoksniu sąveikos metu, atsiradusio teigiamo neatitikimo, įvairūs sprendimo būdai (Killian, 2003).

Baltymai gali persitvarkyti: (i) formuodami oligomerus (agreguodami), tokiu būdu apsisaugodami nuo polinės aplinkos; (ii) keisdami savo karkaso konformaciją, prisitaikydami prie dvisluoksniu; (iii) pasikreipdami, sumažindami savo efektyvinį ilgį; (iv) keisdami šoninių grupių orientaciją sąlytyje vanduo/lipidas. Panašūs persitvarkymai, išskyrus pakrypimą

sutinkami, kai vyksta neigiamas neatitikimas, kuomet transmembraninis segmentas yra per trumpas. Taip pat baltymai gali rinktis “geriausiai jiems tinkančią” lipidinę aplinką, kuomet turime lipidų mišinį. Tokiu būdu atsiranda biologiškai svarbūs atrankos, specifiškumo procesai (Killian, 2003, White ir Wimley, 1999).

Biologinėse membranose sąveikaujant lipidams su baltymais vyksta sudėtingi procesai. Sąveikos metu dažniausiai lipidų frakcijos duoda tik tinkamą aplinką integralinių baltymų funkcionavimui. Tuo tarpu yra žinoma, kad tam tikros lipidų funkcijos, gali būti daug svarbesnės membranos sąvybėms, pavyzdžiui pralaidumui, nei tam tikra baltymų funkcija. Visgi, daugelis fundamentalių klausimų nėra atsakyti, kaip lipidai veikia įvairių baltymų sandeliavimą dvisluoksnyje ir sukuria paviršių, tinkamą baltymų – substratų sąveikoms.

1.3 Ląstelių membranos modeliai

Ląstelių membranų modeliai yra naudingi ir patogūs, tiriant biologines membranas. Biologinės membranos yra sudėtingos struktūros, o ląstelių membranų modeliai suteikia galimybę tirti jas žymiai paprastesniame lygyje. Jau 1962 metais mokslininkai Mueller and Rudin pasiūlė juodųjų lipidinių membranų (angl.: black lipid membrane – BLM) modelį (Mueller ir Kt., 1962). Juodosios lipidinės membranos yra formuojamos mažoje kiaurymėje, kuri padaroma hidrofobinės medžiagos plėvelėje (~ 10 – 50 μm), skiriančioje du vandeninius tirpalus. Lipidų dvisluoksnis gali būti formuojamas, oro – vandens fazių sąlytyje, iš dviejų lipido monosluoksnių (Montal ir Mueller, 1972). Yra keletas kitų lipidinių modelių sistemų – tai: lipidų vezikulės ar liposomos (Banerjee, 2001, Lasic, 1998, Walde ir kt., 2010), plokštuminės ant paviršiaus (angl.: sBLM, supported bilayer membranes) (Tamm ir McConnel, 1985, Groves ir kt., 1997) hibridinės (angl.: hybrid sBLM) (Plant, 1993) ir prijungtos (Ragure ir kt., 1998, Naumann ir kt., 2003, Valincius G. ir kt., 2006) lipidinės

membranos ant kietų paviršių (angl.: tBLM, tethered bilayer membranes), kurios naudojamos tyrimams įvairiose biofizikos ir biochemijos srityse.

Šiame poskyryje bus plačiau kalbama apie dvisluoksnių lipidinių membranų, suformuotų ant kietų paviršių, modelius, kurie yra tinkami ląstelių membranų modeliavimui, studijuojant transporto reiškinius ir signalų perdavimą ir tiriant baltymų sąveikas su fosfolipidais. Daugeliu atveju, suformuotų fosfolipidinių membranų savybės ant kietų paviršių identišškai atkartoja liposomas, juodąsias lipidines membranas, bet jos lengviau paruošiamos, paprasčiau atkuriamos, pasižymi stabilumu ir palankios paviršiaus analizei (Tanaka ir Sackmann, 2005).

1.3.1 Dvisluoksnės lipidinės membranos suformuotos ant kietų paviršių

Dvisluoksnės lipidinės membranos (sBLM), suformuotos ant kietų paviršių yra vienos svarbiausių ląstelių modelių (Tamm ir McConnel, 1985) (1.6 pav. A). Šios membranos suformuotos ant kieto pagrindo yra mechaniškai atsparios ir pasižymi ilgalaikiškumu. Fosfolipidinės membranos gali būti formuojamos ant stiklo (Groves ir kt., 2003), kvarco (Kalb ir kt., 1992), žėručio (Leonenko ir kt., 2000), silicio (Tamm ir McConnel, 1985) ir ant įvairių tauriųjų metalų paviršių (Tanaka ir kt., 2005). Idealioms ląstelės membranos modeliui reikalingas savaiminis susitvarkymas, sluoksnių tvirtumas, ilgalaikiškumas ir atitinkamai lanksti ir dinamiška analizavimo technika. Taip pat pageidautina įkomponuotų (įterptų) molekulių lateralinė difuzija ir galimybė analitiškai tyrinėti membranas. Tam tikslui buvo formuojamos hibridinės BLM ant metalų paviršių (Plant, 1993, Glazier ir kt., 2000). Jos sudarytos iš savitvarkio monosluoksniu ir fosfolipidų monosluoksniu. Savitvarkis monosluoksnis (angl.: self – assembled monolayers, SAM) – tai paprastas molekulių sluoksnis, kuris savaiminio proceso metu simetriškai susiformuoja ant pagrindo. Alkantolių monosluoksniai dažniausiai formuojami ant aukso, sidabro, vario, platinos, o silanų monosluoksniai ant silicio oksido (SiO_2), aliuminio oksido (Al_2O_3) ir

žėručio (Love ir kt., 2005). Šie savitvarkiai monosluoksniai yra labai hidrofobiški, homogeniški ir stabilūs. Juos ant paviršiaus orientuoja lateralinės traukos jėgos (van der Waals jėgos), pasireiškiančios tarp alkanų grandinių, o tarp pagrindo ir savitvarkių molekulių susidaro stiprus kovalentinis ryšys (Rao ir kt., 1997). Metalo paviršiuje kompaktiškas monosluoksnis susidaro sekundžių arba kelių minučių bėgyje. (Plant ir kt., 1994). Bet matavimai parodė, kad į hibridines BLM įkomponuotų baltymų lateralinė difuzija nevyksta. Taip pat sąveika, panaši į fiziologinę, tarp baltymų ir paviršiaus taip pat nevyksta dėl fosfolipidinio monosluoksnio ir mažo fosfolipidų mobilumo (Castellana ir Cremer, 2006).

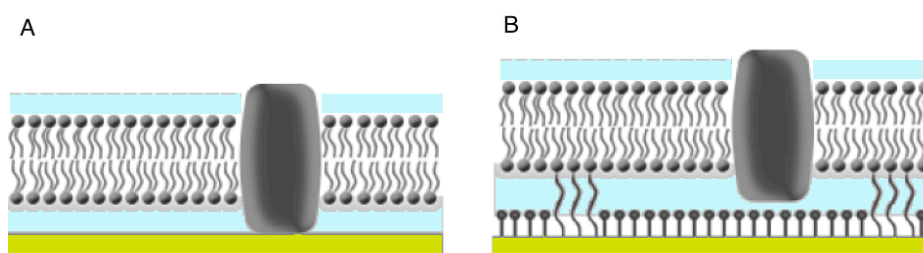
Nors ši sBLM formavimo technika buvo išvysta daugelyje pasaulio laboratorijų (Rossi ir kt., 2003, Kiessling ir kt., 2006, Tanaka, 2006, Renner L., 2008) ir šie modeliai yra panaudojami pritaikyme (Sackmann, 1996, Albertorio F., 2005), bet susiduriama su šiais trūkumais:

- Turi labai ploną vandens sluoksnį (dažniausiai $< 10 \text{ \AA}$), kuris skiria dvisluoksnį nuo kieto paviršiaus ir yra tik pakankamas lipidų lateraliniam judėjimui (Tamm ir McConnel, 1985) (1.6 pav. A).
- Plonas vandens rezervuaras tarp paviršiaus ir dvisluoksnio nėra palankus funkcionuojančių membraninių baltymų įterpimui (Sackmann ir Tanaka, 2005.)
- Arti esantis kietas paviršius gali sukelti ekstramembraninių baltymų domenų denatūraciją (Castellana ir Cremer, 2006) (1.5 pav. A).
- Dvisluoksnis gali atitrūkti nuo paviršiaus tam tikromis sąlygomis, pvz., veikiant elektriniam laukui (Burgess ir kt., 2004).

Šie sBLM modelių trūkumai, studijuojant joninį judėjimą per membraną, judėjimą per membranoje esančius baltymų kanalus ir sąveiką tarp fosfolipidų ir integralinių baltymų, limituoja rezultatų kokybę.

1.3.2 Prijungtos prie paviršiaus dvisluoksnės fosfolipidinės membranos

Tobulėjant ir plečiantis chemijos ir biofizikos moksliniams darbams buvo išvystytos prikabintos lipidinės dvisluoksnės fosfolipidinės membranos (tBLM) su gerai charakterizuotu joniniu rezervuaru (1.6 **B** pav.) (Lang ir kt., 1994, 1998, Valincius G. ir kiti: 2006, McGillivray ir kt., 2007, Naumann ir kt., 2003). Jose dvisluoksnis yra atitolinamas naudojant prikabinimo molekules ar sluoksnius, kurie išsidėsto tarp dvisluoksnio ir paviršiaus. Tokie membraniniai modeliai išsprendė dvisluoksnio artumo su kietu paviršiumi problemą ir užtikrino baltymų įterpimą, ir jų tyrimus nedenaatūruojančiomis sąlygomis. tBLM sėkmingai panaudojami kaip stochastinės jautrios platformos tiriant: biomembranų struktūrą ir funkciją, lipidų – baltymų sąveikas, signalų perdavimus (Bayley ir Cremer, 2001, Frasconi ir kt., 2010, Robertson ir kt., 2007).



1.6 pav. Dvisluoksnių lipidinių membranų, suformuotų ant kieto paviršiaus modeliai su įterptais transmembraniniais baltymais. **A.** sBLM modeliuose transmembraninio baltymo periferiniai domenai denatūruoja. **B.** Prijungtos dvisluoksnės lipidinės membranos modelis su gerai charakterizuotu vandens rezervuaru abiejose membranos pusėse yra palankus funkcionuojančių membraninių baltymų įterpimui.

Neseniai buvo pademonstruota modelinių kanalų ar porų tokių kaip: gramicidinas (Cornell ir kt., 1997), alamicinas (Yin ir kt., 2003), α -hemolizinas (McGillivray ir kt., 2009, Tun ir Jenkins, 2010), juodligės toksinas (Zhang ir kt., 2004, Nablo ir kt., 2008), įterpimas į tBLM. Dirbtinės tBLM sistemos panaudojamos ir biomediciniuose tyrimuose: neurodegeneracinių ligų (Valincius, 2008), imuninio atsako (Terrettaz ir kt., 2009), receptorių įterpimo (Danelon, 2008, Sinner ir kt., 2010).

Molekulinė savitvarka, tokiose sistemose, labiausiai priklauso nuo skiriančių molekulių ir inkarinio junginio tipo (Junghans ir Koper, 2010, Sinner ir kt., 2010). Kuriant tBLM membraninius modelius, pasitelkiama tokiomis konstrukcijomis: **(i) Dvisluoksnis ant polimerinio sluoksnio.** Tokiu metodu formuojant tBLM, ant substrato paviršiaus imobilizuojamas švelnus polimeras (ar polielektrolitinė plėvelė). Minkšto pagrindo formavimui naudojami: dekstranas (Knoll ir kt., 2000), poli(etilenglikolis) (PEG) (Munro ir Frank, 2004, Zhao ir Tamm, 2003, Hamai ir kt., 2010). Polimero sluoksnelis pasižymi judrumu ir hidrofiliškumu ir toks paviršius jau yra tinkamas formuoti skystą dvisluoksnį. Ant polimerinio sluoksnio prikabinamas dvisluoksnis lipidines membranas, galima suformuoti pasitelkiant Langmuir – Blodgett metodą, vezikulių liejimą ar tarpusavyje kombinuojant abu metodus (Vockenroth ir kt., 2008, Knoll ir kt., 2000). Panaudojant vezikulių lydimosi metodą, dvisluoksnis formuojasi keliais etapais (Lipowsky ir Seifert, 1990). Pirmame etape vyksta vezikulių nusėdimas ant paviršiaus ir formuojasi paprasto dvisluoksnio pėdsakai. Antrame, daugėjant nusėdusių vezikulių, vyksta tolimesnis dvisluoksnio formavimasis, kai fosfolipidai pasiekia reikiamą mobilumą, susiformuoja galutinis pilnas dvisluoksnis (Kalb ir kt., 1992, Leonenko ir kt., 2000). **(ii) Kovalentiškai prie aukso prijungtas dvisluoksnis.** Vogelis su kolegomis buvo pirmieji pademonstravę tokiu principu suformuotas tBLM. Pirmojo monosluoksnio formavimui jie naudojo susintetintas lipidines disulfidines molekules (Lang ir kt., 1992), o antrojo monosluoksnio formavimui – fosfotidilcholinus, pritaikydami detergentų skiedimo techniką, nusodindami juos su n-oktil- β -glikopiranozinu. Cornell su kolegomis naudojo sintetinius prikabinimo lipidus su benzilodisulfidine grupe, taip pat sintetinius archėjos lipidus, stabilizuotus fitanoilo grandinėmis, o kaip hidrofilinis skiediklį naudojo polietilenglikolį (Cornell ir kt., 2001, Woodhouse ir kt., 1999, Krishna, 2003). Tuo tarpu Knoll ir kiti, išvystė visą seriją inkarinių lipidų su skirtingo ilgio alifatinėmis grandinėmis. Tokių junginių, hidrofobinę inkaro dalį sudaro difitanoilo grandinė, o hidrofilinę dalį sudaro etilenoglikolio grandinės, nuo kurių ilgio keičiasi pomembraninio sluoksnio storis, ir tiolinė grupė, per kurią

molekulė prikabinama prie paviršiaus (Knoll ir kt., 2000, Duschl ir kt., 1996, Vockenroth ir kt., 2008). Buvo parodyta, kad susintetinti skirtingi inkariniai lipidai su įvairiomis grupėmis stipriai veikia suformuotų membranų elektrines savybes (Junghans ir Koper, 2010, Atanasov ir kt., 2006, McGillivray ir kt., 2007). O inkarinių junginių kiekis ant paviršiaus stipriai paveikia fosfolipidų judrumą (Shenoy ir kt., 2010). **(iii) Kovalentiškai prie aukso prijungtas lipidinis dvisluosnis per specialias molekules.** Dvisluoksnių prikabinimui taip pat panaudojami specialūs cheminiai inkarai, pvz. turintys cholesterolį (Sheikh ir kt., 2007, Erbe ir kt., 2007). Tokios konstrukcijos tBLM, turinčios cholesterolį, yra suderinamos su biologine aplinka ir tinkamos studijuojant baltymų – membranos sąveikas (Tun ir Jenkins, 2010) ir charakterizuojant redokso aktyvius membranos baltymus (Jauken, 2006). Neseniai buvo pademonstruotas naujas tBLM formavimo būdas, pagrįstas DNR hibridizacija, kuriame, kaip prikabinantys junginiai, yra DNR molekulės, atskiriančios dvisluoksnį nuo paviršiaus (Tabaei ir kt., 2009, Chung ir kt., 2009).

Imobilizuotos lipidinės membranos ant kietų paviršių yra labai patogios analizuojant jas, paviršiniaus analizavimo metodais. dvisluoksnių lipidinių membranų tyrinėjimui taikomi elektrocheminiai metodai: ciklinė voltamperometrija (CV) (Rao ir kt., 1997), tiek ir impedanso spektroskopijos metodas (EIS) (Terrettaz ir Vogel, 2005, Gervasi ir Vallejo, 2002, Cornell ir kt., 2001, Valincius ir kt., 2006, Haas ir kt., 2001; Wiegand ir kt., 2002). Elektrocheminiais metodais išmatuojama tBLM talpa ir varža, taip gaunama informacija apie krūvio pernašos kinetiką, kuri gali būti susieta su membranoje esančiais defektais, ir membranos vientisumą. Fluorescencinė mikroskopija suteikia informacija apie lipidų pasiskirstymą ir difuziją dvisluoksnyje (Wagner ir Tamm, 2000, Groves ir kt., 1997, Starr, 2000; Sonnleitner ir kt., 1999). tBLM topografija ir stabilumas tiriama atominės jėgos mikroskopija (AJM) (Benz ir kt., 2004). Paviršiaus plazmonų rezonanso (Rao ir kt., 1997) ir kvarco kristalų mikrobilanso (QCM) (Giess ir kt., 2004, Rossetti ir kt., 2005) metodai yra naudojami tyrinėjant vezikulių liejimosi kinetiką, (Reimhult ir kt., 2003) optinį storį ir dvisluoksnių formavimosi procesą realiame laike, fiksuojant lūžio

rodiklio parodymus ir masės pokytį. Neutronų reflektometrija yra ideali priemonė tiriant tBLM asimetriškumą (Wacklin, 2011) ir molekulinę struktūrą (McGillivray ir kt., 2007, Heinrich ir kt., 2009, Vockenroth ir kt., 2009, Wacklin, 2010, Vial ir kt., 2009).

1.3.3 Baltymų įterpimas (atkūrimas) į fosfolipidinę membraną

Šiuo atveju baltymų įterpimas (atkūrimas) atitinka plačiai, baltymų analizėje, naudojamą anglišką terminą – reconstitution. Įterpimas, įkomponavimas (atkūrimas) (angl: reconstitution) – tai komplekso struktūros išardymas, kai iš struktūros izuoliuojamas vienas ar keli komponentai ir jie atkuriami į aiškesnes, labiau suprantamas ir išmatuojamas sistemas. Viduląsteliniai endoplazminio ir sarkoplazminio tinklo, mitochondrijos membranos joniniai kanalai nėra lengvai prieinami išoriniais elektrodais, ar kita standartine paviršine analizavimo technika, taip pat neįmanoma atlikti „patch-clamp“ technologijos, todėl labai sunku išaiškinti skirtingų tipų kanalų savybes. Tokiu atveju, perkeltant baltymus į dirbtines membranų sistemas, juos jau galima tyrinėti pasitelkus daugelį paviršiaus technikų ir elektrochemiją. Taip, baltymas lengviau analizuojamas ir nustatomos jo biofizikinės savybės, laidumas ir selektyvumas. Išskirti citoplazminiai tirpūs fermentai yra funkciškai aktyvūs ir tiksliai nustatomi tirpale įvairiais metodais. O išskirtų transmembraninių baltymų – joninių kanalų funkcinis aktyvumas jau visiškai priklauso nuo baltymo įkomponavimo į membraną, nes baltymui reikalinga tinkama hidrofobinė aplinka ir barjeras, per kurį kanalas gali katalizuoti jonų judėjimą (Williams, 1994, Rémigy ir kt., 2003).

Dvisluoksnės lipidinės membranos, suformuotos ant kietų paviršių su įterptais joniniais kanalais, panaudojamos: imunologijoje, tiriant ląstelės – ląstelės reakciją į imuninį sužadimą (Groves ir Dustin, 2003), biomedicinoje, kuriant biosuderinamus paviršius su receptoriais, reikalingais ląstelės prikabinimui ir augimui, taip pat kuriant vaistus (Rossetti ir kt., 2004). sBLM ir tBLM naudojamos tiriant: fosfolipidų difuziją (Tamm ir McConnell, 1985,

Shenoy ir kt., 2009), mediatorių gamyboje (Jeuken ir kt., 2005), fermentų aktyvumo nustatymui (Valincius, 2008), lipidų – baltymų sąveikas, kurios tiesiogiai panaudojamos biomediciniuose toksikologijos, Alzheimerio ligos (Valincius ir kt., 2008), ląstelių signaluose dalyvaujančių lipidų (Wymann ir Schreiner, 2008) tyrimuose.

Šio darbo tyrimams pasirinktas tBLM modelis. Disertacijos darbe aptartos tBLM sukūrimo ir išvystymo galimybės, bei šių modelių pritaikymas poras formuojančių toksinų bei peptidų įterpimui, jų detekcijai ir funkcijos tyrimuose.

1.4 Poras formuojantys toksinai (PFTs)

Toksinai yra stiprūs nuodai, inicijuojantys patologinius pokyčius gyvuose organizmuose, tame tarpe ir žmoguje. Citolizinius toksinus gamina įvairūs gyvi organizmai, ypač bakterijos, tam tikri vabzdžiai, nuodingi ropliai ir geliantys jūriniai bestuburiai. Toksinai, infekcijos metu, formuojantys poras membranoje ir taip sutrikdantys natūralią ląstelės homeostazę, suardantys pralaidumo barjerą ir inhibuojantys specifinius procesus ir galų gale sukeltantys ląstelių žūtį, vadinami poras formuojančiais toksinais (angl.: Pore – forming protein toxins, PFTs). Toksinai sekretuojami vandenyje tirpių monomerų pavidalu, bet atakuodami ląstelę taikinę patiria daug įvairių konformacinių pasikeitimų ir transformuojasi į ląstelei toksišką integraliąją membranos porą (Parker ir Feil, 2005, Tilley ir Saibil, 2006).

PFTs klasifikuojami, pagal tai, kokio tipo membranoje formuoja poras, į dvi šeimas: α -PFTs ir β -PFTs (Gouaux, 1997). α -PFTs klasės toksinai transmembraninę porą formuoja iš polipeptidinių α -spiralių grandinių. Šios klasės toksinai savo struktūroje turi poras formuojantį domeną, sudarytą iš didelio kiekio α -spiralių, išsidėsčiusių trimis sluoksniais. Struktūros viduryje esti hidrofobinis spiralinis plaukų smeigtukas (angl.: hairpin), kuris dalyvauja pradiniam įsiterpimui į membraną žingsnyje. α -PFTs klasei priklausantys toksinai: *kolicinai (colicin)* – tai charakteringa antibiotikų klasė, gaminami

įvairios padermės *E. Coli* bakterijų, toksiški kitoms padermėms ar kitoms giminingoms bakterijoms; *egzotoksinas A (exotoxin A)* – tai kritinis virulentinis faktorius, produkuojamas *Pseudomonas aeruginosa* bakterijų, inhibuoja baltymų sintezę; *δ-endotoksinas (δ-endotoxin)* – tai insekticidas naudojamas biotechnologijos pramonėje; *Difterijos toksinas (Diphtheria toxin)* – žudo žinduolių ląsteles, inaktyvuodamas pagrindinį translokacijos mechanizmo baltymą elongacijos faktorių 2 (EF-2); *Bcl-2* – tai šeima apoptozinių baltymų, kurie reguliuoja apoptozės reiškinius ląstelėje (Parker ir Feil, 2005, Tilley ir Saibil, 2006).

Kita svarbi poras formuojančių toksinų klasė yra β -PFTs. Jų struktūra turtinga β -klosčių, kurios membranoje formuoja β -statinės (angl.: β -barrel) struktūrą. Porą formuoja ištemptos polipeptidinės grandinės antilygiagretės β juostos. Jos tarpusavyje susijungia vandeniliniais ryšiais ir sudaro užpildytą vandeniu β statinę, sudarytą iš 8 – 22 β -klosčių, pasvirusių 45° kampu statinės ašiai. β -PFTs klasei priklausantys toksinai: *aerolizinas (aerolysin)* – tai pagrindinis *Aeromonas* šeimos bakterijų virulentinis faktorius, patogeniškas kai kuriems gyvūnams, žmogui sukeliantis skrandžio ir plonųjų žarnų ligas; *α-hemolizinas (α-hemolysin)* – tai *Staphylococcus aureus* gamintas toksinas, sukelią ląstelių žūtį, kraujo užkrėtimą (apie šį toksiną plačiau bus kalbama **4.1 skyriuje**); *juodligės toksinas (anthrax toxin)* – sekretuojamas iš *Bacillus anthracis* (**4.2 skyrius**); *Vibrio choleros citolizinas* – žmogaus virulentinis faktorius, sukeliantis žarnų pralaidumą ir cholera (De ir Olson, 2011); *Lizeninas* – nuo sfingomielinio priklausantis toksinas (Shogomori ir Kobayashi, 2008). Kita svarbi β -PFTs klasė – *nuo cholesterolio priklausomi citoliziniai (cholesterol-dependent cytolysins, CDCs)* (Apie juos plačiau bus kalbama **4.3 skyriuje**) – tai plačiai paplitę toksinai, kurių didžiausias aktyvumas pasireiškia cholesterolio turtingose membranose, kuriose toksinas formuoja labai dideles, daugiau nei 150 Å skersmens, transmembranines poras (Gilbert, 2002, Nguyen ir Kamio, 2004). β -PFTs jungiasi prie ląstelės paviršiuje esančių receptorių, oligomerizuojasi ir formuoja β -statinės struktūrą, kuri įsiskverbia į lipidinį dvisluoksnį ir sudaro joje kanalą. PTF veikimą

palengvina lipidų receptoriai, lokalizuoti skirtinguose domenuose, kurie koncentruoja juos ant ląstelės membranos. β -PFTs receptoriais gali būti ant ląstelės paviršiaus lokalizuoti patys lipidai (cholesterolis), lipidų dariniai (gangliozidai) ar GPI (glikofosfotidilinozitolio) – inkariniai baltymai (Geny ir Popoff, 2006).

1.4.1 β -PTF – α -hemolizinas (α -hemolysin)

α -hemolizinas (α -HL) yra vienas geriausiai ištirtų, stipriai pažeidžiančių fosfolipidinės membranos integralumą, poras formuojantis toksinas, sekretuojamas *Staphylococcus aureus*. Tai yra vienas iš nedaugelio transmembraninių baltymų, kurio integraliają struktūrą yra pavykę identifikuoti rentgenostruktūrinės analizės metodais. Kraujotakoje α -hemolizinas atakuoja eritrocitų membranas ir sukelia jų lizę, taip inicijuodamas sepsį – visuminį organizmo uždegiminį procesą – kraujo užkrėtimą.

1.4.1.1 α – hemolizino struktūra

Normaliomis sąlygomis *Staphylococcus aureus* nesukelia jokio pavojaus šeiminiui, tačiau kai kuriais atvejais *S. aureus* sukelia įvairias tiek paviršines, tiek gyvybei pavojingas ligas. *Staphylococcus aureus* išskiria endotoksinus (surišti su bakterijos ląstelės sienele) ir egzotoksinus (išskiriami į aplinką, jų veikimas tampa nuo bakterijos nepriklausomas) ir gamina ekstraląstelinius baltymus. α – hemolizinas yra pagrindinis *Staphylococcus aureus* bakterijų virulentinis faktorius. Baltymas yra citotoksiškas, pažeidžiantis membraną, ir neurotoksiškas (Freer ir Arbuthnott, 1983).

Pirminė ir antrinė struktūra

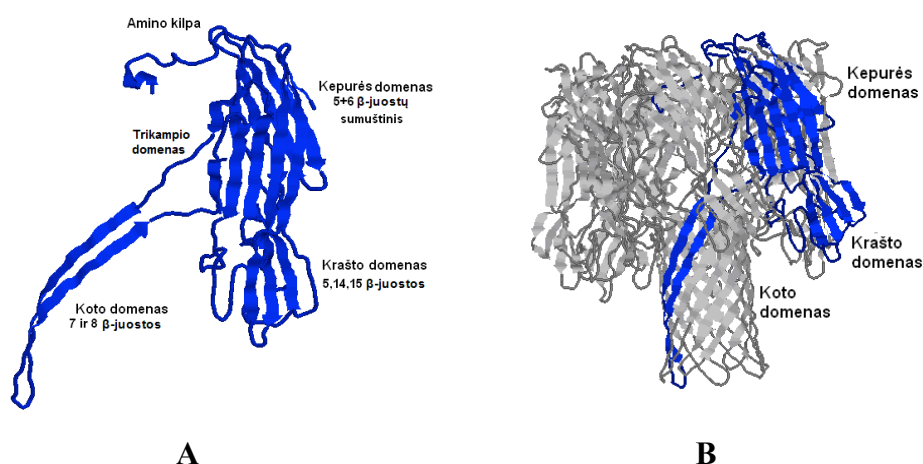
1996 m. biologiškai aktyvaus α -HL struktūra buvo nustatyta rentgenostruktūriniais metodais su rezoliucija 1,86 Å (Song, 1996). α -HL yra sekretuojamas į vandenįje tirpius 33,2 kDa monomerus, sudarytus iš 293 aminorūgščių, cisteinas – vienintelė aminorūgštis, kurios nėra sudėtyje. Struktūroje dominuoja β juostos – 52,9 %, taip pat randama: 4,3 % alfa ar 3_{10}

spiralių, 7,9 % atsitiktinių spiralių ir 34,9 % nei alfa, nei beta struktūrų (Song, 1996).

Tretinė ir ketvirtinė struktūra

Kiekvienas monomeras sudarytas iš trijų domenu: kepurės (angl.: cap), koto (angl.: stem), krašto (angl.: rim) (1.7 pav A). Kepurės domenas – hidrofilinis, sudarytas iš dviejų (5-tos ir 6-tos) β -juostų. Amino kilpa yra svarbi baltymo ketvirtinės struktūros (heptamero) formavime. Koto domenas sudarytas iš 7-os ir 8-os β -juostų charakteringo smeigtuko, kuris įsiterpia į membraną. Trikampio domenas jungia koto domeną su kepurės domenu per aminorūgštis: Pro103 su Thr109, Val149 su Asp152, atsakingas už svarbią monomero – monomero sąveiką heptameriniame baltyme ir gali veikti konformacinius pasikeitimus baltymo oligomerizacijos metu. Krašto domenas yra žemiau kepurės domeno ir sąveikauja su membranos fosfolipidiniu dvisluoksniu. Sudarytas iš didelio kiekio nei alfa nei beta struktūrų, bei gerai apibrėžtų trijų β -juostų (5, 14, 15) (Song ir kt., 1996, Gouaux, 1998). Sąveikaudami su fosfolipidinėmis membranomis monomerai, savaime oligomerizuojasi į vandenyje toksišką, grybo formos heptamerinį, tirpų joninį kanalą, kurio molekulinė masė 232,4 kDa (1.7 B pav). Suformuotą porą sudaro septyni identiški subvienetai, kurie sudaro heptamerinį žiedą su centrine angele (Song ir kt., 1996, Gouaux E., 1998). Heptamero koto domenas yra sudarytas iš 7 persipynusių monomerų β -smeigtukų, tarpusavyje susijungusių vandenilniais ryšiais, sudarančių β -statinės struktūrą (bendrai 14 β -juostų), kuri įsiskverbia į membraną ir suformuoja vandens pripildytą maždaug 1 – 2 nm diametro kanalą. Koto domenas yra turtingas neutralių glicino aminorūgščių ir kitų hidrofobinių ir hidrofilinių aminorūgščių, todėl vykstant baltymo oligomerizacijai, hidrofilinės amino rūgštys suformuoja kanalo vidų, o hidrofobinės aminorūgštys išsidėsto išorėje ir sąveikauja su membranos fosfolipidiniu dvisluoksniu (Song ir kt., 1996, Parker ir Feil, 2005). Kepurės domenas yra 46 Å aukščio ir 100 Å pločio, jį sudaro 80 % viso baltymo aminorūgščių. Šio domeno amino kilpa yra atsakinga už daugelį sąveikų tarp

monomerų, taip pat už daugelį hidrofobinių ir hidrofilinių sąveikų, kurios stabilizuoja kepurės domeną ir visą baltymą (Song ir kt., 1996). Kepurės domeno histidinas 35 (His35) ir histidinas 48 (His48) yra labai svarbios aminorūgštys, kurių svarba buvo parodyta su jų mutacijomis (Menzies ir Kernodle, 1994). Jeigu His48 pakeistas į leuciną, baltymas nesioligomerizuoja ir nesukelia ląstelių lizės. Abi aminorūgštys yra svarbios monomero – monomero sąveikai.



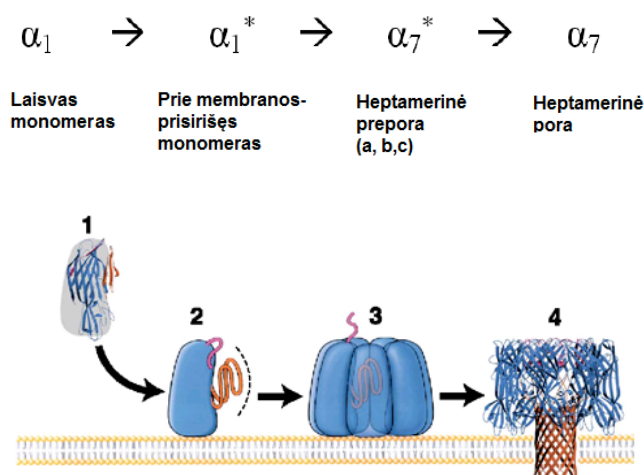
1.7 pav. A. Tretinė α -hemolizino struktūra. Pavaizduota monomero kepurės, krašto, koto, trikampio domenai ir amino kilpa, kuri svarbi baltymo heptamero formavime. **B** Ketvirtinė α -hemolizino struktūra. Heptamerą sudaro septyni identiški monomerai. Monomeras paveiksle pavaizduotas mėlynai. Paveikslai padaryti su RasMol programa, PDB failas 7AHL.

Heptamero krašto domenas yra žemiau kepurės domeno ir sąveikauja su membrana. Turi bazinių ir aromatinių aminorūgščių su kuriomis jungiasi fosfolipidų hidrofobinės galvutės (Galdiero ir Gouaux, 2004). Taip pat krašto domenas dalyvauja α -hemolizino monomero – monomero sąveikoje, ir krašto/koto domenu sąveikoje. Fosfolipidinio dvisluoksnio sąveika su krašto domenu sukelia konformacinius pasikeitimus ir sukelia baltymo oligomerizaciją (Song ir kt., 1996, Geny ir Popoff, 2006).

1.4.1.2 α – hemolizino įsiterpimas į membraną

Savaiminis α -HL oligomerizacijos procesas į vandenyje toksišką heptamerinį joninį kanalą vyksta keliais etapais (1.8 pav.). Pirmiausia (1) toksinas sekretuojamas iš bakterijos, tirpau monomero pavidalu. Tirpūs

baltymo monomerai, tiesiogiai arba per įvairius receptorius, jungiasi prie ląstelės taikinės membranos ir difunduoja joje. Receptoriai koncentruoja toksiną ant membranos paviršiaus (Geny ir Popoff, 2006); (2) monomerai patiria daug susidūrimų, iššaukiančių trumpalaikių dimerų formavimą. Šių dimerų gyvavimo laikas ~ 50 ms, po kurio jie disocijuoja į monomerus; (3) Monomerų susidūrimai su laikiniu kompleksu, perveda juos į negrįžtamą palaispni augimą; (4) Oligomerizacijos pasekmė – stabilūs, disocijuoti jau negalintys, heptamerai (Thompson ir kt., 2011). Heptamerai iš pradžių suformuoja preporą, kuri dėl įvairių konformacinių pasikeitimų (a, b, c etapai) persitvarko į toksišką porą (1.8 pav.), kuri membranoje sudaro kanalą, pažeidžia jos integralumą ir sutrikdo natūralią ląstelės homeostazę (Montoya ir Gouaux, 2003, Parker ir Feil, 2005).



1.8 pav. α -HL kanalo susidarymas: vandenyje tirpus monomeras (1) jungiasi su membrana (2) oligomerizuojasi, sudaro preporą (3) ir galiausiai įsiterpia į membraną (4) (Adaptuota iš Montoya M and Gouaux E, 2003, Galdiero S and Gouaux E, 2004).

Savaiminis α -HL oligomerizacijos procesas į vandenyje toksišką heptamerinį, buvo tiriamas panaudojant vienatinės molekulės fluorescencijos vaizdinimą (Thompson ir kt., 2011). Stebėtina, savaiminis susirinkimas nuo monomero iki galutinio heptamero, yra nepaprastai greitas, siekiantis < 5 ms. Proceso metu nebuvo detektuota jokių kitokų oligomerinių tarpinių būsenų. Lipidų judėjimo koreliacijos laikas dvisluoksnyje yra 10 ms (Shenoy ir kt., 2010, Sharovov ir kt., 2008), tuo tarpu integralinių baltymų judėjimo

koreliacijos laikas yra nuo 1 ms iki 10 ms. α -hemolizino monomero, kai jis difunduoja ant membranos paviršiaus, judėjimo koreliacijos laikas yra artimesnis 10 ms. Todėl Thompson ir kitų, apskaičiuotas tarpinių būsenų gyvavimo laikas (~ 50 ms), rodo, kad α -HL monomeras, prieš susidurdamas su kitu monomeru, membranoje gali patirti keletą apsisukimų, sukurdamas efektyvesnią susirišimo padėtį (Thompson ir kt., 2011).

1.4.1.3 α – hemolizino patogenezė

α -hemolizinas pasižymi hemolizinėmis, citotoksinėmis, odos nekrozinėmis savybėmis ir gali būti letaliniu faktoriumi įvairiems organizmams. Tyrėjai ir mokslininkai šio toksino sukeltos ligos, bendru pavadinimu, vadinamos *S. aureus* infekcija. α -hemolizinas yra toksiškas monocitams, fagocitams, eritrocitams, makrofagams ir edotelinėms ląstelėms (Bhakdi ir Tranum-Jensen, 1991). *S. aureus* infekcija prasideda, kai α -HL heptamerai formuoja poras membranoje ir sutrikdo natūralią homeostazę. Membraninis kanalas membranoje praleidžia visus jonus ir mažos molekulinės masės junginius (iki 2000 Da), ir sukelia ląstelių lizę. α -hemolizinas taip pat sukelia daugelį ligų nuo odos infekcijos (skauduliai, furunkulai) iki gyvybei pavojingų ligų – kraujo užkrėtimas, endokarditas, kvėpavimo sutrikimai ar pneumonija (Dinges ir kt., 2000). Kiti toksino sukeliamai pažeidimai organizme pateikti 1.1 lentelėje. Transmembraninės poros atsiradimas membranoje sukelia taip pat ir patofiziologiškai svarbias antrines ląstelines reakcijas (Bhakdi ir Tranum-Jensen, 1991). Pirmiausia, poros yra per mažos, kad pro jas galėtų ištekėti ar keliauti citoplazminiai baltymai, taigi įvairių ląstelinių procesų molekuliniai mechanizmai, išlieka nepakitę.

1.1 lentelė. α – HL sukeliama patogeniniai fiziologiniai efektai.

Toksinas	Sukeliamas efektas	Literatūros šaltinis
α -hemolizinas	T limfocitų apoptozė	Jonas ir kt., 1994
<i>Staphylococcus aureus</i>	Padidina plaučių arterinį slėgį	Walmrath ir kt., 1993
	Sukelia IL-6 sekreciją pelėse	Onogawa, 2005
	Sukelia IL-8 sekreciją	Rose ir kt., 2002
	alveolinėse epitelinėse ląstelėse	

Nors mažų molekulių, tokių kaip ATP, nuotėkis ir yra pakankamai greitas, vistiek procesas užtrunka keletą minučių, todėl per šį laiką, kol ląstelė žūna, gali būti sukeliama serija giminingų patofiziologinių reakcijų. Antra, staigi kalcio jonų difuzija sutrikdo išorinį – viduląstelinį koncentracijos gradientą. Sutrikdytas kalcio jonų gradientas yra svarbiausias sukėlėjas antrinių reakcijų, tokių kaip: *Eikozanoidų produkcijos stimuliavimas* – kalcio jonai, aktyvuodami prie membranos prisirišusių fosfolipazę, sukelia arachidoninės rūgšties metabolizmą. To pasekoje aktyvuojamas metabolinis prostaciklino ir tromboksano kelias. Tromboksanas yra žinomas kaip plaučių kraujagysles siaurinantis veiksnys (vazokonstriktorius). Galų gale išsivysto plaučių edema ar kvėpavimo sutrikimo sindromas. Šiuo metu žinoma, kad ir kiti poras formuojantys toksinai sukelia prostaglandinų ar leukotrienų produkciją (Dinges ir kt., 2000, Bhakdi ir Trantum-Jensen, 1991); *Sukelia ląstelinę susitraukimo disfunkciją* – kalcio jonai sukelia aktino – miozino siūlų susitraukimą, o jų atsipalaidavimui yra reikalingas ATP. Kadangi toksino pažeistos membranos patiria ATP nuotėkį ir ląstelės yra užliejamos kalciu, ląstelė patiria susitraukimo disfunkciją (Bhakdi ir Trantum-Jensen, 1991); *Sukelia endonukleazių aktyvaciją* – plačiai manoma, kad užprogramuota ląstelės žūtis yra sukeliama vidinių endonukleazių aktyvacijos, todėl kalcio jonai yra pagrindinis šio proceso sukėlėjas; *Sukelia membranos pakitimą* – toksino įsiterpimas į dvisluoksnį perorientuoja neigiamai įkrautą fosfotidilseriną, jo “flip – flop” vyksta iš vidinio dvisluoksnio į išorinį (Bhakdi ir Trantum-Jensen, 1991).

Pastaruoju metu α – hemoliziną bandoma panaudoti kaip stochastinį biojutiklį įvairių mažų baltymų, vienetinių molekulių (Robertson ir kt., 2007) ir DNR (Bayley ir Cremer, 2001) molekulės nustatymuose (plačiau apie α -HL panaudojimą jutikliuose, bus rašoma 1.5 skyriuje).

1.4.2 β -PTF – juodligės toksinas (*Anthrax toxin*)

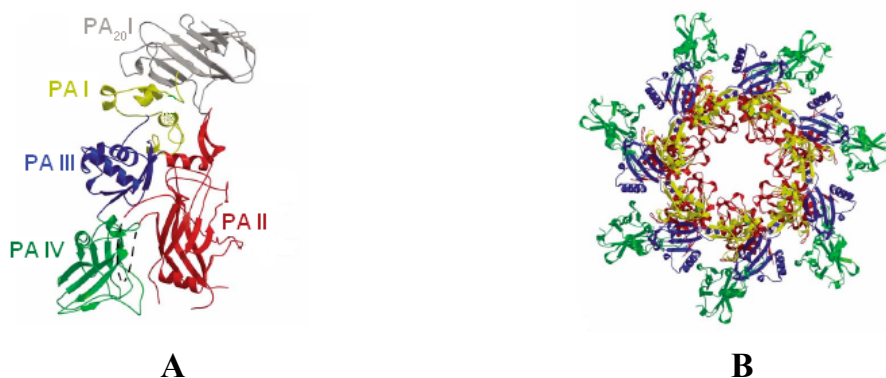
Juodligė – tai ūminė infekcinė liga, kuria serga gyvūnai ir žmonės. Juodligę sukelia *Bacillus anthracis* bakterijos sekretuojami toksinai.

Pavojingiausia yra inhaliuojamoji juodligės forma. Daugindamasi bakterija išskiria PFTs toksinus, dėl kurių išsivysto lokals audinių hemoragijos, edema ir nekrozė. Galutinė juodligės toksino integralioji struktūra dar nėra pilnai nustatyta. Pastaruoju metu juodligės toksinas (angl.: anthrax toxin) yra minimas kaip galimas preparatas biologinio ginklo ruošimui. Pasaulyje yra siekiama sukurti vaistinius preparatus ir vakcinas, apsaugojančias nuo galimo bioterorizmo pavojaus.

1.4.2.1 Juodligės toksino struktūra

Bacillus anthracis sekretuoja tris monomerinius baltymus, kurie bendrai kartu, vadinami juodligės toksinu. Kiekvienas atskiras komponentas pasižymi skirtingomis antigeninėmis savybėmis. Du iš jų yra fermentai: pirmas – tai 90 kDa letalinis faktorius (LF) (angl.: Lethal factor) – Zn^{2+} proteazė, kuri specifiskai kerpa ir inaktyvuoja MAP – kinazės kinazės (MAPKK) ir inicijuoja letalinius juodligės toksino efektus; Antras – tai 89 kDa edemos faktorius (EF) (angl.: Edema factor) – tai nuo Ca^{2+} ir kalmodulino priklausanti adeninilciklazė. Trečiasis komponentas – tai 83 kDa apsauginis antigenas (PA) (angl.: Protective antigen) – tai efektyviai indukuojantis apsauginį imunitetą prieš juodligę, turintis dvi aktyvias zonas prie kurių jungiasi LF ir ED ir taip patenka į citozolį (Young ir Collier, 2007).

Juodligės toksino integralioji membranos struktūra tiksliai nėra nustatyta, bet 1997 metais kristalografijais metodais su rezoliucija 2,1 Å nustatyta monomerinio natyvaus PA₈₃ struktūra (PDB kodas, 1ACC) (Petosa ir kt., 1997), o 2004 metais jau nustatyta monomerinio PA₈₃ komplekso su ANTXR2 receptoriumi struktūra su rezoliucija 2,50 Å (PDB kodas, 1T6B) (Santelli ir kt., 2004). Tirpus 83 kDa monomeras, sudarytas iš 735 aminorūgščių. Struktūroje yra 31 %, β-juostų, taip pat randama 13 % α-spiralių ir 56 % nei-alfa, nei-beta struktūrų. PA₈₃ sudarytas iš keturių skirtingų domenu (1.9 pav A, PDB kodas 1TZO).



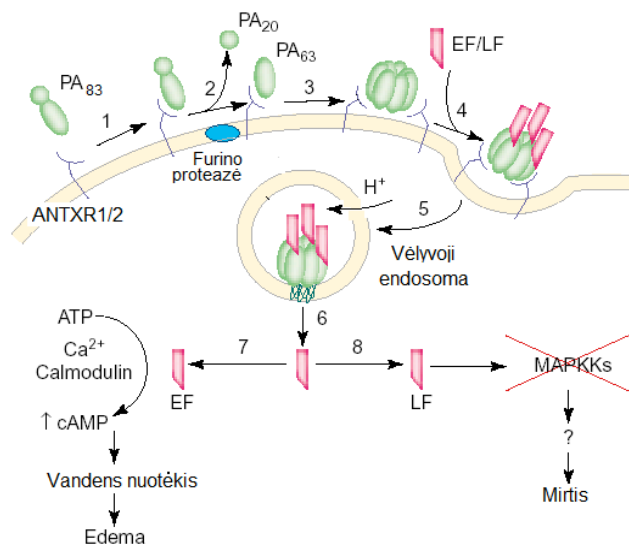
1.9 pav. A – Tretinė monomerinio PA₈₃ struktūra yra sudaryta iš keturių domenų: PAI, PAII, PAIII, PAIV. Furino proteazė nukerpa PA₂₀ ir lieka PA₆₃ domenas, kuris oligomerizuoja ant membranos paviršiaus. **B** Ketvirtinė PA₆₃ struktūra, pavaizduota iš viršaus. Struktūra sudaryta iš septynių identiškų (PA₆₃)₇ monomerų. Abiejuose paveiksluose spalvos atitinka atskirą domeną (Paveikslai adaptuoti iš Lacy ir kt., 2004, PDB, ID kodas 1TZO).

Domenas 1 (PAI) (1 – 258 aminorūgštys) sudarytas iš β -klosčių, keturių mažų spiralių ir dviejų kalcio jonų. PAI turi seką RKKR, kurią atpažįsta furino proteazė ir inicijuoja PA₈₃ kirpimą iki preporos pirmtako, PA₆₃, t.y. atskeliamas PA₂₀ nuo domeno PAI (Gao ir Schulten, 2006, Young ir Collier, 2007). Domeno 2 (PAII) (259 – 487 aminorūgštys) pagrindinė funkcija yra transmembraninės poros formavimas, per kurią EF ir LF patenka į citozolį. Neseniai parodyta, kad PAII taip pat dalyvauja PA₈₃ surišime su ląstelinio receptoriu. Įsiterpę į fosfolipidinę membraną, PA₆₃ monomerai savaime oligomerizuoja į heptamerinę preporą (1.9 B pav. PDB, ID kodas 1ZO) ir dėl konformacinių pasikeitimų, priklausančių nuo pH, suformuoja 14 β -juostų transmembraninę statinę, kurios ilgis ~ 35 Å, o plotis ~ 20 Å.

Vandenyje tirpios heptamerinės poros diametras yra 160 Å, o aukštis – 85 Å. Domenas 3 (PAIII) (488 – 595 aminorūgštys) dalyvauja PA₆₃ savaiminiame oligomerizacijos procese. Šio domeno mutacijos stipriai inhibuoja oligomerizacijos procesą. Domenas 4 (PAIV) (596 – 735 aminorūgštys) sudarytas iš β tipo struktūrų, dalyvauja ląstelių receptorių atpažinime ir surišime (Chauhan ir Bhatnagar, 2002).

1.4.2.2 Juodligės toksino įsiterpimas į membraną ir patogenezė

Savaiminis PA oligomerizacijos procesas į toksišką heptamerinį joninį kanalą vyksta keliais etapais (1.10 pav.). I etapas – *Bacillus anthracis* sekretuojamo monomero, PA₈₃ komponento, PAIV domenai ant ląstelės membranos paviršiaus atpažįsta ir sąveikauja su dviejų tipų receptoriais – ANTXR1 (angl.: tumor endothelial marker-8) ir ANTXR2 (capillary morphogenesis protein 2). II etapas – aktyvuota ląstelinė furino proteazė, nukerpa ir pašalina nuo PA₈₃ 20 kDa dydžio fragmentą (PA₂₀), o prie receptoriaus lieka prisijungęs 63 kDa fragmentas (PA₆₃) (Young ir Collier, 2007, Mourez ir kt., 2002). III etapas – Receptoriai koncentruoja PA₆₃ ant membranos paviršiaus ir PA₆₃ oligomerizuojasi į heptamerą, (PA₆₃)₇, susiformuoja prepora. IV etapas – oligomerizacijos proceso metu susiformuoja trys surišimo sritys, jungiančios kitus *Bacillus anthracis* sekretuojamus komponentus, ligandus: EF ir/ ar LF (Lacy ir kt., 2005). V etapas – susidaręs prepūros kompleksas yra apgaubiamas plazmine membrana, iš vidaus padengta baltymo klatrino molekulėmis (paveiksle neparodyta). Susidariusios pūslelės, endocitozės būdu, patenka į ląstelės vidų ir pereina į vėlyvosios endosomos stadiją, kurioje rūgštinis pH 5,0 – 6,0. VI etapas – dėl pH pokyčio, prepora, per eilę konformacinių pasikeitimų, formuoja endosomos membranoje integraliąją struktūrą ir inicijuoja toksiškų fermentų, LF ir EF, pernešimą į citozolį. VII etapas – tai edemos faktoriaus citotoksiškasis kelias. Dėl edemos faktoriaus, nuo Ca²⁺ ir kalmodulino priklausančios adeninilciklazės, veikimo kaupiasi vanduo – išsivysto edema (vandenligė). VIII etapas – tai letalinio faktoriaus citotoksiškasis kelias. Letalinis faktorius – Zn²⁺ proteazė specifiskai kerpa ir inaktyvuoja MAP – kinazės kinazes (MAPKK) ir inicijuoja letalinius efektus (Nassi ir kt., 2002, Zhang ir kt., 2004, Mourez ir kt., 2002).



1.10 pav. Juodligės toksino patekimo į ląstelę ir citotoksiškumo kelias. Toksino baltyminis kompleksas endocitozės būdu patenka į ląstelę, heptameras (PA_{63})⁷ endosomose formuoja joninį kanalą (porą) ir išleidžia į ląstelinę terpę toksiškus fermentus: EF ir LF (Adaptuota iš Mourez ir kt., 2002).

Ligandų LF ir EF pernešimą per PA_{63} porą galima išmatuoti kontroliuojant lipidinės membranos joninį laidumą. LF, ties teigiama įtampa, patenka į PA_{63} porą ir, todėl blokuoja joninį laidumą (Zhang ir kt., 2004). Ypatingai ties didelėmis įtampomis, LF pernešamas priešinga membranos kryptimi ir tokiu būdu atblokuojamas kanalas. Šioje sistemoje visas pernešimo mechanizmas yra kontroliuojamas tik PA_{63} poroje ir jo vyksmui nereikalingi kiti ląsteliniai baltymai ar ATP. LF ir EF pernešimas per PA_{63} porą, aprašomas įkrautu Brauniniu reketo mechanizmu (angl.: Brownian ratchet mechanism). Pernešimo per porą mechanizmas yra pagrįstas difuzija, kadangi poros segmentai įkrauti neigiamai, rūgštinės aminorūgštys gali patekti į porą, tik po protonizacijos endosomoje (dėl žemo pH). Kai segmentai pasiekia citozolį, jie akimirksniu deprotonuojami ir nebegali difunduoti atgal į porą (Young ir Collier, 2007). LF ir EF pernešimo per porą tyrimams, buvo pritaikomas vieno kanalo matavimais (angl.: Patch – clamp) grįstas metodas, leidžiantis atlikti matavimus ląstelės membranoje, realiame laike (Wolfe ir kt., 2005).

Dirbtinėse lipidinėse sistemose buvo užfiksuota funkcionuojanti sąveika tarp PA_{63} kanalo ir jo ligandų. Sąveika buvo detektuota pritakius elektrofiziologinius matavimus (Halverson ir kt., 2005, Nablo ir kt., 2008).

Buvo pademonstruota, kad prie pH 6,6 ligandai stipriausiai sąveikauja su pora ir ją reguliuoja. Toks metodas pasižymi trimis pagrindiniais privalumais: pirmiausia pilno ilgio EF ir LF gali būti kvantifikuojami mažose koncentracijose; Antra, terapinės medžiagos gali būti greitai aptiktos ir išaiškinamos. Ir trečia, iš infekuotų gyvūnų kraujo išskirtas visas letalinis toksinas, tokiose sistemose detektuojamas prie itin mažų koncentracijų (30 pM) (Halverson ir kt., 2005, Sun ir kt., 2007). Šio metodo privalumai verčia matyti, kad ateityje jie bus panaudojami juodligės diagnostikoje, biojutiklių kūrime.

1.4.3 CDC – vaginolizinas

1.4.3.1 Nuo cholesterolio priklausomi citolizinais

Nuo cholesterolio priklausomi citolizinais (angl.: Cholesterol – dependent cytolysins, CDCs) – tai β -PFTs klasės, plačiai paplitę toksinai, identifikuojami daugelyje gram-teigiamų bakterijų šeimų: pvz., perfringolizinas iš *Clostridium perfringens*, pneumolizinas iš *Streptococcus pneumoniae*, streptolizinas from *S. pyogenes*, listeriolizinas iš *Listeria monocytogenes*, vaginolizinas iš *Gardnerella vaginalis* (Hotze ir Tweten, 2012). CDCs veikimas ir aktyvumas, lyginant su kitais PTF, pasižymi keletu išskirtinių bruožų: jie visiškai priklausomi nuo membranoje esančio cholesterolio ir formuoja membranoje labai dideles oligomerines transmembranines poras, kurių diametras didesnis nei 150 Å ir gali siekti iki 450 Å. CDC monomerinės formos yra tirpios vandenyje, bet prisikabinusios prie cholesterolio turinčios membranos, spontaniškai savaime asocijuojasi, formuodamos dvisluoksnyje vandeningą porą, kurią sudaro iki 50 monomerų (Tweten ir Johnson, 2003). Pastaraisiais metais, stengiamasi atsakyti į klausimą, kaip tirpūs monomeriniai baltymai susirenka į didelį kompleksinę porą, kuri perveria membraną. Papildomais tyrimais nustatyta, kad cholesterolio praradimas, blokuoja CDC preporos vartimą į toksiškąją porą (Tweten, 2005). Vis dar nėra žinoma, kodėl cholesterolio praradimas apsaugo membranas nuo kanalo įsiterpimo, bet akivaizdu, kad tai susiję su membranos

struktūros pokyčiais (lipidinių klasterių formavimu). Tokie tyrimai parodė, kad CDC poras formuojančių mechanizmo vyksmui limituojanti yra preporos persiorientavimosi į porą stadija, kuri yra jautri cholesterolio kiekiui membranoje, o ne susirišimo su membrana stadija, kaip buvo manoma anksčiau. (Giddings ir kt., 2003, Hotze ir Tweten, 2012).

1.4.3.2 CDC struktūra

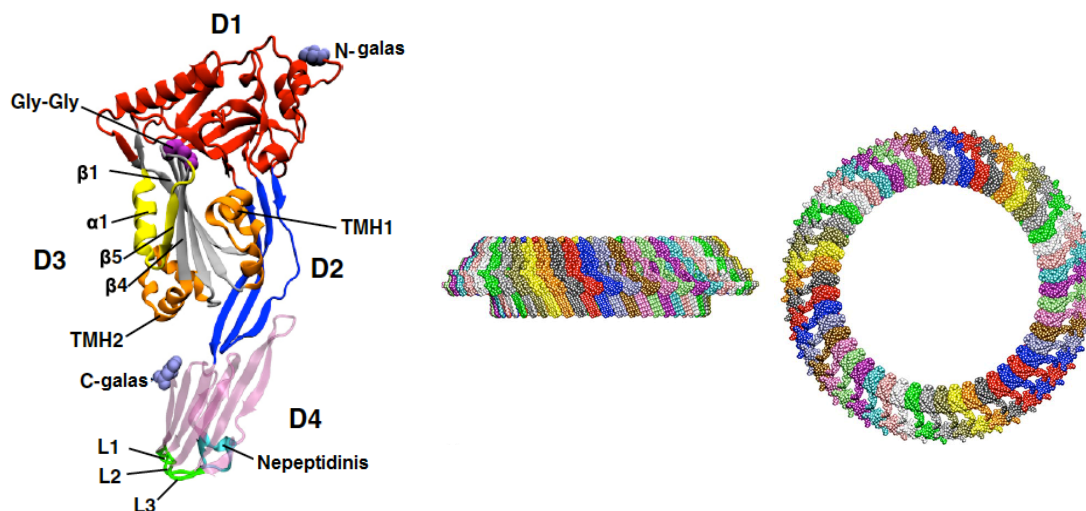
CDC pirminė struktūra

Pirmą kartą pirminė CDC – pneumolizino (PLY) struktūra buvo aprašyta Walker ir kitų 1987 metais (Walker ir kt., 1987). Nuo to laiko baltymų duomenų bazėje, GenBank, yra paskelbta virš 25 skirtingų CDCs. Sekretuojamų CDCs monomerų molekulinė masė yra nuo 50 iki 72 kDa. Už kamieno susiformavimą atsakinga seka sudaro apie 50 kDa, nors keli, nuo cholesterolio priklausomų citolizinais, turi papildomų 150 aminorūgščių seką, sąveikaujančią su lecitinu (Farrand ir kt., 2008). CDC šeimos baltymų pirminės sekos tarpusavyje turi daug konservatyvių regionų, kurių identifiškumas siekia nuo 40 % iki 80 %. Labiausiai konservatyvus – tai C gale sutinkamas, 11 amino rūgščių (ECTGLAWEWWR), unikalus CDC struktūrinis motyvas. Šis motyvas pavadintas nepeptidiniu (angl.: undcapeptide) ar triptofano (Trp) turtinga kilpa (angl., Trp – rich loop). Sekretuojamų CDC monomerų pirminė struktūra yra stebėtinai hidrofilinė, be jokių akivaizdžių hidrofobinių regionų, galinčių įsiterpti į dvisluoksnį. (Parker ir Feil, 2005, Hotze ir Tweten, 2012).

CDC kristalinė struktūra

Pirmoji, tirpaus sekretuojamo CDC monomero – perfringolizino (PFO), kristalinė struktūra buvo išspręsta Rossjohn ir kitų 1997 metais (Rossjohn ir kt., 1997). Kitų CDC: SLO, Listeriolizino O ir PLY, struktūros buvo nustatytos tik po 14 metų. Neseniai buvo taip pat išspręsta intermedilizino (ILY) iš *Streptococcus Intermedius* (Polekhina ir kt., 2005) ir antrolizino O (ALO) iš *Bacillus anthracis* (Bourdeau ir kt., 2009), ir visai neseniai suilzino (SLY) iš *Streptococcus suis* (Xu ir kt., 2010) struktūros. PFO monomeras sudarytas iš keturių domenu, D1 – D4 (1.11 pav. A). Molekulė yra turtinga β -klostėmis ir hidrofilinė, be jokių reikšmingų hidrofobinių liekanų ant paviršiaus. Kitų CDC,

kaip minėta anksčiau, struktūros stipriai panašios į PFO, tik skiriasi jų galutinė forma. Pirmiausia buvo nustatyta, jog D4 domeno Trp turtingas motyvas, elgiasi kaip hidrofobinis kryželis, kuriuo PFO įsiskverbia į membraną ir suformuoja porą membranoje (1.11 pav. B) (Hotze ir Tweten, 2012, Rossjohn ir kt., 1997). Jau seniau buvo parodyta, kad būtent šiame motyve randami triptofanai, įeina į membraną (Nakamura ir kt., 1995).



1.11 pav. A. Perfringolizino O iš *Clostridium perfringens* molekulinė struktūra (PDB ID: 1PFO), sudaryta iš keturių, D1–D4, domenui; transmembraninių smeigtukų, TMH1 and TMH2 (oranžinė); β-klosčių, β1, β4 and β5; α-spiralės, α1; kilpų, L1–L3; Dvigubo glicino motyvo (Alyvinė spalva) ir Trp turtingos kilpos (žalia). B. CDC poros modelis. Pora sudaryta iš 50 monomerų. (i) Poros vaizdas iš šono. (ii) Poros vaizdas iš viršaus (Paveikslas adaptuotas iš Parker ir Feil, 2005).

Domenas 1 (D1) sudarytas iš septynių antiparalelinių β-klosčių. D2 yra tarpinis domenas, jungiantis molekulės vieną galą su kitu. D3 domeno kamieną sudaro β-klostės, apsuptos iš abiejų pusių α-spiralėmis. D4 domene randama, baltymams būdinga, β-klosčių topologija (Rossjohn ir kt., 1997, Geny ir Popoff, 2006.). Kontaktuojant monomerui su kitu monomeru, pagrindė vyksta β5 ir α1 kilpos sukimasis nuo β4 (1.11 pav. A). Toks judesys atlaisvina kito monomero β4 motyvą. Monomerai jungiasi į oligomerinę formą tol, kol pasiekiami žiedo formos struktūra, vadinama preporos kompleksu, kuris dar neįsiterpia į dvisluoksnį. Preporos stadija, taip pat turi keletą tarpinių būsenų (Hotze ir Tweten, 2012). Preporos komplekso stadijoje, kiekvieno monomero du transmembraniniai β-smeigtukai (TMH1 ir TMH2), turintys tris 3 α-spirales,

dalyvauja savaiminiame didelios β -statinės struktūros susiformavime membranoje (Soltani ir kt., 2007).

Susiformavusi milžiniška PFO β -statinės struktūra, kurios diametras 250 – 300 Å, apytiksliai turi 144 β -klostes ar 72 β -smeigtukus, perveriančius membraną. CDC poros yra didžiausios iki šiol žinomos toksino poros.

1.4.3.3 CDC – *Vaginolizino (VLY) veikimas*

Bakterinė vaginozė (BV) yra labiausiai pasaulyje paplitusi vaginalinė infekcija, susijusi su natūraliai makštyje esančių bakterijų pagausėjimu. Šios ligos priežastis nėra visiškai aiški, tačiau manoma, kad ja sergama dėl bakterijų pusiausvyros sutrikimo makštyje, sumažėjus *Lactobacillus* kiekiui. BV sergančios moters makštyje anaerobinių bakterijų, tokių kaip *Gardnerella vaginalis*, yra nuo šimto iki tūkstančio kartų daugiau nei paprastai. BV yra labai paplitusi, ja serga viena iš trijų moterų (Gelber ir kt., 2008, Randis ir kt., 2009). Sutrikusi makšties mikroflora, padidina prieššlaikinio gimdymo ir persileidimo riziką, taip pat padidėja prieššlaikinio vaisiaus vandenių nutekėjimo, pogimdyminių ir pooperacinių infekcijų rizika ir kitų lytiškai plintančių infekcijų įgyjimas. Gydytas antibiotikais yra problematiškas dėl savo pašalinių efektų, ypač nėščioms moterims, ir dėl ligos dažno atsinaujinimo (Livengood, 2009). Buvo pademonstruota, kad *G. vaginalis* gali vyrams sukelti šlapimo takų uždegimą, artritą (Yoon ir kt., 2010). Šie duomenys rodo, kad *G. Vaginalis* gali būti daug labiau virulentiškas, nei manyta anksčiau.

G. vaginalis yra išrankus organizmas, reikalaujantis pilnos kompleksinės terpės augimui. *Gardnerella vaginalis* yra anaerobinė bakterija, fermentacijos metu, skaidanti angliavandenius dekstriną, fruktozę, gliukozę, maltosę, ribosę, krakmolą ir cukrozę. Kai kurie kamieniai fermentuoja manozę, galaktozę, ir ksilozę, bet neskaido manitolio, rafinozės ir sorbitolio (Harwich ir kt., 2010). *G. vaginalis* išskiria baltymą – toksiną, kuris elgiasi kaip hemolizinas, priklausantį nuo cholesterolio priklausomų citolizinių šeimai. Šis toksinas buvo pavadintas vaginolizinu (VLY). VLY, kaip ir intermedilizinas

(ILY) (Nagamune ir kt., 1996) ar *Streptococcus mitis* lectinolysin (LLY) (Wickham ir kt., 2011), yra selektyvus žmogaus ląstelėms, jis specifiskai atpažįsta ir rišasi su žmogaus ląstelėje esančiu receptoriumi, CD59 molekule, bet jo aktyvumas taip pat yra priklausomas ir nuo cholesterolio, esančio membranoje (Gelber ir kt., 2008). Priešingai kitiems CDC, VLY turi D4 domene skirtingą nepeptidinį motyvą (EKTGLVWEPWR), vietoj pastovaus. Dėl konseratyvaus cisteino praradimo, VLY yra oksidacijai atsparus baltymas. Buvo taip pat parodyta, kad prolinas, esantis D4 domeno nepeptidiniame motyve, yra reikalingas citolitiniam aktyvumui. Įdomu, kad CD59 yra gliukozilfosfotidilinozitolio – inkarinis baltymas, kuris slopina membraną atakuojantį kompleksą (MAC). Bakterinės infekcijos metu, kai MAC yra aktyvuotas, CD59 apsaugo šeimininkę ląstelę nuo komplekso sukeltos lizės (Rollins ir kt., 1990). CD59 veikia labai specifiskai ir ribotai, slopinantis tik šeimininkės ląstelės MAC, bet ne kitos rūšies veikėjus. Faktas, kad VLY tik kabinasi ir lizuoja žmogaus ląsteles, rodo VLY susirišimą su žmogaus CD59 molekulės vieta, kuri taip pat svarbi sąveikai, susilpninančiai MAC kompleksą (Hotze ir Tweten, 2012).

BV gydymas antibiotikais nėra labai sėkmingas, dėl dažno ligos atsinaujinimo ir atsparumo jiems. Tai paskatino ligos gydymui sukurti rekombinantinius antikūnus ir panaudoti juos terapiniais veiksniais (Marrazzo, 2008). Monokloninių antikūnų, prieš bakterinius citolizinus, sukūrimas, palengvintų ryšio, tarp jų struktūros ir veikimo, supratimą. Sukurti triušio polikloniniai antikūnai prieš VLY, buvo naudojami VLY imunodetekcijai, panaudojant tiek ELISA, tiek Westerno dėmės metodus (Randis, 2009). Žvirblinė ir kiti išvystė monokloninių antikūnų, prieš VLY, gamybos technologiją ir pademonstravo, *in vitro* žmogaus eritrocitų hemolitiniame tyrime, jų neutralizavimo veikimą (Zvirbliene ir kt., 2010). Monokloniniai antikūnai panaudojami VLY imunodetekcijoje ir ateityje, gali būti naudingi struktūriniuose ir funkcijos tyrimuose. Neseniai buvo sukurti rekombinantiniai monokloniniai antikūnai, kuriuose viena imunoglobulinų grandinė yra pakitusi. Tyrimai *in vitro* parodė, kad tokie monokloniniai antikūnai pilnai slopina

citolitinį VLY aktyvumą (Pleckaityte ir kt., 2011).

1.4.4 Apibendrinimas ir PTF perspektyvos

Poras formuojantys toksinai, egzistuoja dvejose nesuderinamose stadijose: tirpioje vandens stadijoje, kurioje toksinas yra transportuojamas iš šeimininkės ląstelės į ląstelę taikinę ir membranos stadijoje, kurioje toksinas įjungia žudymo mechanizmą. Tirpioje vandens stadijoje, α -PFTs paprastai savo trasmembraninius regionus slepia viduje, spiralinėje konformacijoje. Priešingai, β -PFT transmembraniniai regionai skirtingai susilanksto tirpioje vandens stadijoje, o membraninėje terpėje, veikiant tinkamiems aktyviems komponentams, kurie konvertuoja šiuos regionus, ir įsiterpimo į membraną metu, paverčiami į β -smeigtukus. Kiekvieno monomero β -smeigtukų pora, oligomerizacijos metu, sąveikaudama su kitais smeigtukais, sukuria didelę hidrofobinę β -statinę, kuri perveria membraną. Nėra tiksliai suprasta toksinų bendroji struktūra pradiniu, įsiskverpimo į membraną, etapu kuomet svarbūs pokyčiai atsiranda β -smeigtukų motyve.

Abi PTF šeimos turi požymių, sustiprinančių toksino sąveiką su membrana. Pavyzdžiui, žemas pH daro įtaką, kai kurių toksinų (kolicinas A, PA63) hidrofobiškumui, dėl kurio pasikeičia toksino susilankstymas, konformacija ir veikimas. Atsiradusios ertmės ar įdubos struktūros viduje, gali taip pat paveikti toksino konformaciją (kolicinas, PFO). O aromatinės grupės, esančios molekulės paviršiuje, gali veikti ir prisikabinimą prie membranos (α -hemolizinas, PFO) (Parker ir Feil, 2005).

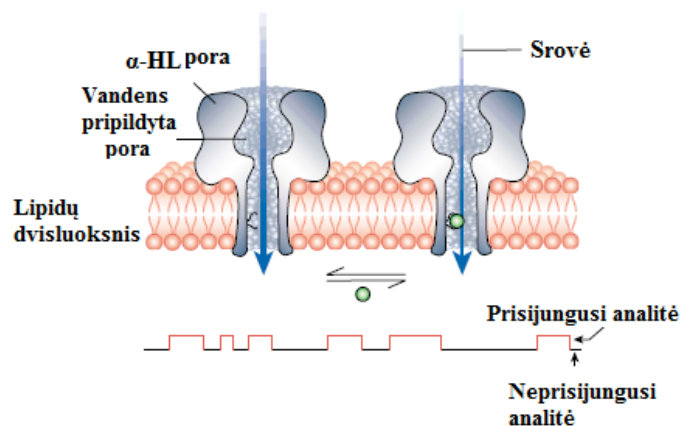
Daugelyje atvejų, dirbtinėse membranų sistemose parodyta, kad toksinų, išskyrus CDC, įsiterpimui ir veikimui nebūtinai joks receptorių. PTF veikimo mechanizmas ir jų struktūros, yra vis dar neaiškios. Ar tikrai toksino veikime nedalyvauja jokie receptoriai? Ar receptoriai, toksino susirišimo su membrana metu, vykdo ryšio perdavimus? Taip pat vis dar nėra pilnai aišku, kaip kinta toksinų konformacija įsiterpimo į membranas metu. (Pastan ir Kreitman, 2002).

CDC poros formavimo mechanizmas yra taip pat silpnai suprantamas. Pavyzdžiui, vis dar nėra suprata, kaip CDC apskaičiuoja ir reguliuoja, didelės β – statinės įsiterpimą. Požymiai rodo, kad tai atsitinka susiformavus žiedo formos kompleksui, bet mechanizmo reguliacija, nėra žinoma. Nėra visiškai aišku, koku principu CDC jungiasi su cholesteroliu, ir ar tikrai cholesterolis elgiasi kaip receptorių? (Gilbert, 2002, Tweten, 2005). Kad atsakyti į šiuos klausimus, vis dar, pasitelkus tyrimus, reikalinga išgauti daugiau informacijos apie toksino struktūrą, įvairiose veikimo stadijose, taip pat nustatyti toksino su membrana sąveikos ypatumus ir galimus pašalinius veiksnius, darančius įtaką sąveikai. *Šiame darbe bus stengiamasi detektuoti vaginolizino sąveiką su tBLM ir jos ypatumus ir sukeltas membranos pažeidimus, o taip pat tirti cholesterolio įtaką toksino veikimui.*

1.5 Biologinių nanoporų panaudojimas

Molekulių transportas per biologinę membraną yra griežtai reguliuojamas ir gyvybiškai reikalingas kiekvienam gyvam organizmui. Medžiagų pernešimui per lipidinę membraną, ląstelės naudoja mažas skylutes, dažniausiai tai baltyminiai selektyvūs kanalai, kuriais keliaudami jonai, keisdami transmembraninį elektrostatinį potencialą, pakeičia ir jų pralaidumą. Kanalai reguliuoja daugelį biologinių procesų: neuroninių impulsų perdavimą, raumenų aktyvumą ir pačių baltymų pernešimą per membraną. Jeigu tokie kanalai yra visada atviri ir nepasižymi jokia selektyvumu, jie vadinami nanoporomis. Nanopora – tai mažo diametro ertmė membranoje, taip apibūdinamos visos toksinų formuojamos poros, aprašytos 1.4 skyriuje. Gamtoje naudojamų 1 – 2 nm nanoporų efektyvumas, paskatino vystyti molekulinis jutiklius. Dirbtinės lipidinės membranos yra racionali priemonė stochastinių biojutiklių kūrimui, (Bayley ir Cremer, 2001, Römer ir Steine, 2004). Jutiklis paremtas joninės srovės, keliaujančios per nanoporą, pasikeitimu, kuri yra veikiamas dalyvaujančių molekulių (1.12 pav.) Ši srovės

pasikeitimas duoda informaciją apie molekulės dinaminis ir struktūrinius pokyčius (Venkatesan ir Bashir, 2011).



1.12 pav. Įterpta biologinė pora lipidiniame dvisluoksnyje. Kai užduodamas potencialas, srovė teka per porą, nešdama jonus, druskų tirpale, kuris supa dvisluoksnį iš abiejų pusių. Srovės pokytis, pavaizduotas linija, fiksuojamas kiekvieną kartą, analitei prisikabinus prie poros. Tokia technologija gali detektuoti kiekvieną individualų prisikabinimą (Paveikslas adaptuotas iš Bayley ir Cremer, 2001).

Nanoporos gali būti dviejų tipų: biologinės kilmės ir kietos būsenos. tBLM yra puiki platforma konstruojant biojutiklius, nes pasižymi dideliu stabilumu, į jas galima lengvai įkomponuoti receptorių, antikūnus, ir baltymų joninius kanalus ar poras – biologinės kilmės nanoporas (1.12 pav.). Analitė gali būti transportuojama per baltymo nanoporą, gali jungtis prie baltymo ir uždaryti ar atidaryti kanalą kitoms molekulėms arba pradėti kokią nors fermentinių reakcijų kaskadą (Kasianowicz ir kt., 2008). Biologinės kilmės nanoporos, gali būti išskiriamos iš bakterijų, pavyzdžiui, išorinis membranos baltymas F iš *Escherichia coli*, toksinas α -hemolizinas iš *Staphylococcus aureus* (plačiau aprašytas 4.1 skyriuje ir pavaizduotas 1.12 pav.), Juodligės toksinas iš *Bacillus anthracis* (aprašytas 4.2 skyriuje) ar K^+ selektyvus joninis kanalas (Kasianowicz ir kt., 2008, Keyser, 2011). Taip pat neseniai buvo pavaizduota porino A iš *Mycobacterium smegmatis* ir membraninio baltymo phi29, nanoporų panaudojimas vienos molekulės sekos nustatyme (Shen ir Shi, 2012). Kietos būsenos nanoporos, kuriamos iš silicio nitrido, formuojamos ant graviruotų poliimidų, polikarbonato ar poli(etileno) tereftalato membranų (Kasianowicz ir kt., 2008). Pastaruoju metu intensyviai kuriami nauji

nestandartiniai DNR sekvenavimo metodai, ateityje pakeisiantys Sengerio metodą. Elektrinis įtampos gradientas gali traukti RNR ar DNR molekules per nanoporą, tuo būdu sukuriama unikalūs signalai, leidžiantys identifikuoti ir charakterizuoti polinukleotidų molekules. Tokiu būdu detektuojant molekules, nebūtinai molekuliu pagausinimas, žymėjimas ir modifikavimas (Rhee ir Burns, 2006). Toksino α -hemolizino poros diametras membranoje įgalina detektuoti tik viengrandes nukleorūgštis DNR ir RNR bei linijinius polimerus, bet ne dvigrandžius. Kuomet per porą keliauja viengrandė DNR, gaunama skirtingus kvantuotus elektros srovės pikus, kurių kiekvieno piko aukštis yra skirtingas ir atitinka tam tikrą nukleotidinę bazę (Osaki ir kt., 2009, Kasianowicz ir kt., 2001, Kasianowicz ir kt., 2008). Modifikuoti baltymo kanalai membranoje naudojami detektuoti: metalo jonus (Zn^{+2} , Co^{2+}) (Braha ir kt., 2000), mažas organines molekules (β -ciklodekstriną) (Gu ir kt., 1999), specifines cukrų molekules (Kullman ir kt., 2002) ir kitus baltymus nanomoliarinėse koncentracijose (Bayley ir Cremer, 2001). Paskutiniaisiais metais vystantis technologijoms α -hemolizino poros naudojamos ir vienos molekulės (poli(etilenglikolio)) detekcijai (Robertson ir kt., 2007). Nanoporų technologija vis dar yra vystymosi stadijoje. Tam, kad analizė būtų detektuojama greitai, jautriai, selektyviai ir grįžtamai, turi būti išspręstos įsiterpimo stabilumo, savaiminio įsiterpimo ir signalo silpnumo problemos (Ke-Jian ir kt., 2011).

1.6 Beta amiloidų vaidmuo Alzheimerio ligoje

1.6.1 Netvarkių agreguotų baltymų įtaka neurodegeneracijai

Neurodegeneracinės ligos pasižymi progresyvia smegenų disfunkcija ir ląstelių žūtimi specifinėse smegenų vietose. Pagrindinė neurodegeneracinių ligų problema, sunkinanti ligonių gydymą, yra vėlyva klinikinė diagnozė. Neuronų praradimas yra siejamas su tam tikrų baltymų konformacijos pasikeitimu ir šių netvarkingų baltymų agregacija ir kaupimusi tiek ekstraląstelinėje, tiek viduląstelinėje erdvėje (Ross ir Poirer, 2004). Buvo

parodyta, kad daugelis neurodegeneracinių ligų, tokių kaip Alzheimerio, Parkinsono, Hangtintono, prioninė ir šoninė amiotrofinė sklerozė pasižymi bendru ląsteliniu ir molekulinu patogenezės mechanizmu, kuris siejamas su abnormalių baltymų dinamika ir struktūros praradimu, netobula degradacija ir netvarkingų baltymų agregacija. Patogenezė taip pat siejama su ikliuzinių kūnelių formavimu, taip pat dar su keletu biocheminių virsmų ir procesų: oksidaciniu stresu ir laisvų radikalų formavimu; Susilpninta bioenergetika, mitochondrijos disfunkcija ir DNR pažeidimai; neuronų Goldžio komplekso fragmentacija; Ląstelinio transporto ardymas; Molekulinių šaperonų mutacija ir veiksmas; Neurotrofinė disfunkcija; Neuroūdegiminiu/neuroimuniniu procesu (Jellinger, 2009). Netvarkūs agreguoti baltymai indukuoja visus čia išvardintus procesus, todėl yra esminis sukeltos patogenezės šaltinis ir daugelio pasaulio laboratorijų tyrimo objektas. Abnormalūs baltymai yra linę agreguoti į skirtingo dydžio, konformacijos, ir/ar morfologijos daleles su skirtingu jų poveikiu ir sąveika fosfolipidinėms membranoms. Baltymų agregacijos metu vyksta viduląsteliniai antrinės ir/ar tretinės baltymo struktūros pasikeitimai, kurie lydi įvairių supramolekulinių struktūrų susidarymą. Neurodegeneracinių ligų eigoje dauguma susidariusių agregatų yra nepriklausomi nuo jų tirpaus baltymo pirmtako konformacijos. Tačiau neurotoksiškųjų agregatų identifikavimo mechanizmas, kuriuo yra pažeidžiami ir ilgainiai nužudomi neuronai, nėra pilnai išaiškintas.

Ankstesnieji agregacijos *in vitro* ir gyvūnų modeliuose tyrimai išaiškino, jog baltymų oligomerinės ar protofibrilinės formos atsakingos už neuronų žūtį, o fibrilinės formos, kurios tipiška aptinkamos autopsijos metu, gali iš tikrųjų būti neuroapsauginės (Caughey ir Lansbury, 2003). Dėl savo molekulinės struktūros, peptidai gali jungtis ir sąveikauti su įvairiomis biomolekulėmis: lipidais, baltymais, proteoglikanais. Sąveika su membranos lipidais, sukelia katastrofišką įvykių kaskadą: abnormalių peptidų – lipidų sąveika – padidina patogeninių baltymų išmetimą/fibriliaciją/agregaciją ir paeiliui pakeičia dvisluoksnio savybes, suardo membranos takumą ir funkcijas (Vestergaard ir kt., 2008). Yra parodyta, kad kai kuriais atvejais oligomerai gali būti žiediniai,

formuojantys poras membranoje, ir taip sutrikdantys membranos integralumą, kuris sukelia ląstelinį stresą ir opoptozę (Bischofberger ir kt., 2009). Svarbiausias dabartinis iššūkis, būtų iššifruoti, kuris netvarkių baltymų agregatų tipas labiausiai veikia patogenezę ir koku mechanizmu ar principu vyksta fosfolipidinės membranos pažeidimas.

1.6.2 Alzheimerio ligos sukėlėjai – β amiloidų sankaupos

Alzheimerio liga (angl: Alzheimer disease, AL) – tai viena dažniausių demencijos formų, progresuojantis neurodegeneracinis susirgimas, kliniškai pasireiškiantis nuolatiniu atminties blogėjimu, pažintinių funkcijų blogėjimu, kasdienės veiklos pasyvėjimu, elgsenos pokyčiais, neuropsichiatriniais simptomais. Progresuojant ligai, palaipsniui išnyksta nervinės galūnėlės (aksonų, dendritų), sinapsės ir patys neuronai. Šiuo metu liga nepagydoma, bet vystantis biologinėms ir molekulinėms žinioms apie ligos priežastis, tikimasi, kad prieš AL bus sukurtos vakcinos ar terapijos metodai.

1.6.2.1 Alzheimerio liga

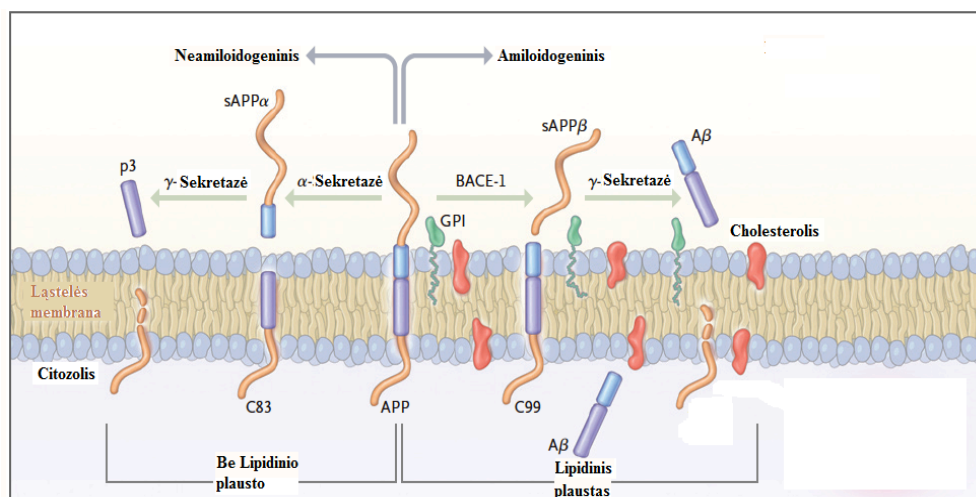
Alzheimerio liga Jungtinėse Amerikos Valstijose ir Europje yra dažniausiai pasitaikanti demencija, ji sudaro 60 – 75 proc. visų senatvinių demencijų. Alzheimerio liga dažniau serga senyvi žmonės, todėl, senstant populiacijai, šia liga sergančiųjų sparčiai daugėja. Sergamumas labai priklauso nuo amžiaus: jeigu tarp 65 metų asmenų kiekvienais metais ši liga nustatoma apie 1,5 %, tai tarp 80 metų asmenų – apie 30 %. Nuo 65 metų amžiaus kiekvienas amžiaus penkmetis Alzheimerio ligos riziką didina du kartus (Gorelick, 2004). Pirmąjį, 1907 metais, AL atvejį diagnozavo vokiečių neuropatologas ir psichiatras Alois Alzheimer savo pacientei, 51 metų moteriai, kuri buvo praradusi atmintį, orientaciją, ir kuriai pasireiškėdavo haliucinacijos.

Pagrindinis AL rizikos veiksnys yra amžius. Bet ankstyvos pradžios AL, prasidedanti jaunesniame nei 60 – 65 m. amžiuje, dažniausiai yra paveldima. Ankstyvąją Alzheimerio ligą sukelia mutacijos trijuose genuose: *Amiloido pirmtako baltymo* (APP) gene, esančiame 21-oje chromosomoje, ; *Presenilino-*

1 (PS-1) gene, esančiame 14-oje chromosomoje ir *Presenilino-2* (PS-2) gene, esančiame 1-oje chromosomoje. Šitos mutacijos padidina $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ santykį ir sąlygoja labai ankstyvą ir agresyvią AL formą (Tilley ir kt., 1998, Findeis, 2007); *apolipoproteino E gene* (ApoE4), esančiame 19 chromosomoje. ApoE4 gali stimuliuoti β -amiloido agregaciją (Corder ir kt., 1993, Hardy ir Selkoe, 2007). Paveldimos ankstyvos AL formos yra retos ir sudaro vos 1 – 2 proc. visų ligos atvejų, todėl bendru atveju AL yra sporadinė. Negenetiniams rizikos veiksniams priskiriama: amžius; bloga socialinė ir ekonominė padėtis; menkas išsilavinimas; moteriškoji lytis (galbūt dėl sumažėjusio estrogenų kiekio po menopauzės); intoksikacija aliuminiu; galvos smegenų trauma; taip pat tokios ligos kaip diabetas, hipertenzija, aukštas cholesterolis, insultas (Findeis, 2007).

1.6.2.2 Amiloido pirmtako baltymas ir β -amiloido peptidas

Amiloidas beta – tai 4,5 kDa peptidas, susidedantis iš 38 – 43 aminorūgščių. $A\beta$ peptidas, randamas sveikų žmonių galvos smegenų ir nugaros smegenų skystyje (Walsh ir Selkoe, 2007). Amiloido pirmtako baltymas (Amyloid precursor protein, APP) yra transmembraninis baltymas (100 – 130 kDa), reiškiamas ant ląstelių paviršiaus daugelyje audinių ir koncentruojamas neuronų sinapsėse. Šis baltymas atsakingas už nervinio audinio augimą, atsinaujinimą ir plastiškumą, taip pat už sinapsių formavimą. Yra žinomi du APP baltymo apdorojimo keliai – tai amiloidogeninis kelias ir neamiloidogeninis kelias (1.13 pav.) (Querfurth ir LaFerla, 2010, Selkoe, 2004, Gandy, 2005). APP baltymas yra proteolitiškai karpomas α , β ir γ sekretazių. Pagrindinis (iki 95%), neamiloidogeninis APP skaidymo procesas neuronuose prasideda nuo skaidymo α -sekretaze, kuri kerpa ties ekstraląstelinio $A\beta$ galo ir generuoja: sekretuojamą sAPP α fragmentą, kurį toliau kerpa γ -sekretazė ir gaminasi maži hidrofobiniai fragmentai – P₃ baltymai, kurių funkcija amiloidogenezeje yra nežinoma (Vestergaard ir kt., 2008, Gandy, 2005). Išlaisvinti sAPP α fragmentai pasižymi neuroapsauginiu ir atminties stiprinimo aktyvumu, (Meziane ir kt., 1998), taip pat jie yra žinomi kaip serino proteazių inhibitoriai, ir ląstelės – substrato adhezijos molekulės (Selkoe, 2004).



1.13 pav. Alzheimerio neamiloidogeninis ir amiloidogeninis keliai ir su jais asocijuotų baltymų metaboliniai keliai. Kai APP yra karpomas fermento BACE ir po to γ -sekretazės, gaminasi $A\beta$ peptidai. Tačiau, kai APP yra kerpamas α -sekretazės ir po to γ -sekretazės, $A\beta$ peptidai nesigamina. (Querfurth ir LaFerla, 2010).

Amiloidogeninis kelias prasideda, kai APP baltymas apdorojamas β -sekretazės (BACE) ir generuojamas $sAPP_{\beta}$ fragmentas. Dėl tolimesnio γ -sekretazės kirpimo, priklausomai nuo kirpimo vietos, gaminasi 39 – 43 aminorūgščių, 4,5 kDa, $A\beta$ peptidai. Vyraujančios formos yra $A\beta_{1-40}$ (90 %) ir $A\beta_{1-42}$ (10 %) (Vestergaard ir kt., 2008). Suaktyvėjusi $A\beta$ peptidų gamyba yra kritinis Alzheimerio ligos vystymosi veiksnys. $A\beta$ peptidų sankaupos sukelia tiek išorinius, tiek viduląstelinius neuronų pažeidimus. APP baltymas ir jo apdorojimo fermentai yra lokalizuoti membranoje, bet skirtinguose domenuose. Tiek fermentas BACE, tiek γ -sekretazė yra lokalizuoti ant membranos, cholesterolio turtinguose lipidų domenuose t.y. lipidiniuose plaustuose, tuo tarpu α -sekretazė lokalizuota ant membranos, fosfolipidų turtinguose domenuose (Ehehalt ir kt., 2003). Neurodegeneracija labiausiai priklauso nuo šių proteazinių fermentų reguliacijos ir disreguliacijos.

Įdomu pažymėti, kad keičiant ląstelės membranos kompoziciją, reguliuojami ne tik BACE ir α -sekretazės aktyvumai, bet $A\beta$ peptidų agregacija, membranos pažeidimo ir toksiškumo lygis. Keičiant ląstelės membranos kompoziciją, reguliuojami BACE ir α -sekretazės aktyvumai. Buvo nustatyta, kad anijoniniai glicerofosfolipidai (fosfatidilserinas) ir fosfatidiletanolaminas gali stimuliuoti BACE aktyvumą. Anijoniniai

glicerofosfolipidai stimuliuoja BACE aktyvumą, dėl elektrostatinės sąveikos ant membranos paviršiaus ir dėl jų tiesioginės sąveikos su neigiamai įkrautais lipidais (Vestergaard ir kt., 2008). Amiloidogeninio kelio APP metabolizmui taip pat įtakos turi cholesterolis, kurio dideli kiekiai ląstelėje sumažina ląstelės takumą, ir taip sutrukdo α -sekretazei priartėti ir sąveikuoti su APP. (Ehehalt ir kt., 2003). Taigi, Alzheimerio ligos metu membranos lipidiniai plauštai, kuriuose gausu cholesterolio (CHO), sfingolipidų (SM), gangliozidų (GM), turi įtakos BACE fermento aktyvumui ir A β kaupimuisi. Vienas reikšmingiausių GM rolės aspektų yra jų sugebėjimas sąveikauti ir kabintis su A β . Amiloidų kabinimasis prie membranos, turinčios pakankamą kiekį GM, sukelia konformacinius A β α -spiralinės struktūros pasikeitimus į tvarkingą β -klostinę struktūrą (Posse de Chaves ir Sipione, 2010).

1.6.2.3 Alzheimerio ligos neuropatologija

Alzheimerio ligos skiriamasis histopatologinis požymis yra apibrėžtas dviejų tipų pažeidimais, randamais smegenų, atsakingų už atmintį ir pažinimą, srityse – tai užląstelinės amiloidinės sankaupos (amyloid plaques) ir viduląsteliniai neurofibriliniai raizginiai (neurofibrillary tangles) (Selkoe, 2004, Findeis, 2006). Neurofibriliniai raizginiai yra randami neuronų ląstelės citoplazmoje ir vystosi jie dėl patologinio baltymo Tau fibrilizacijos į polimerinius, tiesius ir sraiginius kuokštus. Ši neurofibrilinė viduląstelinė nervinių ląstelių degeneracija ir aksonų suirimas yra susijęs su per dideliu baltymo Tau, susijungusio su mikrovamzdeliais, fosforiliniu. Tau baltymas, sergant AL, tampa nenormalus ir suardo mikrovamzdelių struktūrą. Dėl to, pamažu, nervinės ląstelės tampa izoliuotos ir pradeda nykti (degeneracija) (Gamblin ir kt., 2003). Ekstraląsteliniai pakitimai yra susiję su amiloidinėmis sankaupomis, kurias formuoja β -amiloidai, kurie spontaniškai savaime linę agreguotis į koegzistuojančias daugialypes fizikines formas: netirpias fibriles, tirpias protofibriles (tarpinė būseną tarp fibrilių ir oligomerų) ir tirpius oligomeras (Querfurth ir LaFerla, 2010). Visos šios A β formuojamos struktūros yra matomos ir užfiksuojamos atominės jėgos mikroskopu (Klein ir

kt., 2001). Toksiškiausios $A\beta$ formos yra $A\beta_{1-40}$ ir $A\beta_{1-42}$. „Ilgasis“ $A\beta_{1-42}$ yra labiau linkęs agreguotis negu $A\beta_{1-40}$, taigi, $A\beta_{1-42}$ yra svarbiausia forma inicijuojanti oligomerų, fibrilių ir sankaupų formavimąsi, kurie desponuojami smegenų ekstraląstelinėje terpėje (Gandy, 2005). Neseniai buvo nustatyta, kad abu šie patologiniai AL požymiai yra funkciškai susiję, nors mechanizmai, kaip β -amiloidų sankaupos skatina patologinę Tau baltymo fibrilizaciją, nėra dar visiškai aiškūs (Selkoe, 2004, Gamblin ir kt., 2003).

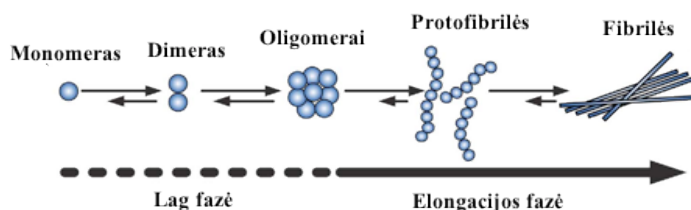
1.6.3 β -amiloidų oligomerų struktūra ir toksiškumas

Sintetiniai $A\beta$ peptidai akimirksniu, savaime agreguojasi į β -klosčių turtingas struktūras. Ilgą laiką buvo manoma, kad fibrilinės $A\beta_{1-40}$ ir $A\beta_{1-42}$ sankaupos yra pagrindinė AL priežastis. Bet šiuolaikiniai biofizikiniai tyrimai rodo, kad pirminiai, toksiški, su AL susiję dariniai yra tirpūs $A\beta$ oligomerai (Kayed ir kt., 2004), kurie gali pažeisti atminties mechanizmus, sukelti sinapsių pažeidimą ar praradimą ir net būti, kaip tiesioginis veiksnys, neuronų žūtyje (Klein ir kt., 2001). Naujausi tyrimai pademonstravo, kad $A\beta_{1-42}$ peptidai, gali kauptis ir ląstelėse viduje, taip pat sėkmingai, kaip ir užląstelinėje terpėje. Šiame poskyryje bus aprašoma įvairių $A\beta_{1-42}$ oligomerų morfologija ir jų toksiškumas. Taip pat, bus aptarti galimi toksiškumo mechanizmai, kuriuos sukelia užląsteliniai $A\beta$ oligomerai.

1.6.3.1 β -amiloidų oligomerų morfologija

β -Amiloido įvairių oligomerų ir fibrilių susidarymas vyksta pagal bendrą, nuo nukleacijos priklausomą, polimerizacijos mechanizmą (1.14 pav.) (Roychaudhuri ir kt., 2009). Toks procesas charakterizuojamas: kritine koncentracija, žemiau kurios negali vykti agregacija, lėta lag faze, elongacijos faze ir pusiausvyros nusistovėjimo faze. Monomerai labai nestabilūs, todėl iš karto jungiasi į dimerus, kurie yra pagrindinis oligomerizacijos „statybinis blokas“. Lag fazėje jie oligomerizuojasi į tetramerus, heksameras, oktameras ir t.t., sudarydami tirpius oligomeras, kurių molekulinė masė siekia nuo 10 kDa iki 100 kDa, kurių dydis iki 20 nm (Haass ir Selkoe, 2007). Elongacijos metu

vyksta intensyvus protofibrilių ir fibrilių formavimasis (1.14 pav.). Protofibrilės yra didesnės negu oligomerai, tačiau vis dar lanksčios, lazdelės formos molekulės, maždaug iki 200 nm ilgio ir 2 – 5 nm skersmens (Chiti ir Dobson, 2006).



1.14 pav. $A\beta_{1-42}$ agregacijos formavimosi eiga. Agregacijos procesas susideda iš dviejų kinetinių fazių. Lag fazėje vyksta lėtas oligomerų formavimasis (punktyrinė linija). Elongacijos fazėje vyksta spartus fibrilių augimas (vientisa linija) (Adaptuota iš Kumar ir kt., 2011).

Dalinis susilankstymas, nestabilūs tarpiniai produktai (Fezoui ir kt., 2002) bei fosforilinimas skatina konformacines transformacijas į beta klostėmis turtingas struktūras, ir savarankišką jų susirinkimą (Kumar ir kt., 2011). Mokslinėje literatūroje paskelbta daug duomenų apie sintetinius ir natūralius $A\beta_{1-42}$ oligomerus, besiskiriančius dydžiu, forma, struktūra ir jų vaidmeniu AL patologijoje. Aprašytos $A\beta_{1-42}$ formos: tirpios protofibrilės, žiedinės struktūros, tirpūs oligomerai, pavadinti $A\beta_{1-42}$ difuziniai ligandai (ADDL, angl. *amyloid β – derived diffusible ligands*), globuliniai įvairūs oligomerai ir amiloidinės fibrilės. Visi randami $A\beta_{1-42}$ oligomerų tipai apibendrinti 1.2 lentelėje. $A\beta_{1-42}$ konformacijos yra priklausomos nuo aplinkos veiksnių, tokių kaip temperatūra, pH, druskų koncentracijos (Stine ir kt., 2003). Atsparūs SDS, $A\beta_{1-42}$ dimerai ir trimerai buvo rasti žmogaus smegenų tirpioje frakcijoje, kas rodo, kad šie, mažos molekulinės masės, $A\beta_{1-42}$ oligomerai, gali inicijuoti didesniųjų oligomerų ir fibrilių formavimąsi. Neseniai, Lesne ir kiti pademonstravo, kad nonamerai ir dodekamerai ($A\beta^{*56}$) susiję su atminties praradimu ir pažinimo sutrikimu, transgeniniuose Tg2576 pelių modeliuose (Lesne ir kt., 2006).

1.2 lentelė. Įvairios tirpių $A\beta_{1-42}$ oligomerų struktūros (Haass ir Selkoe, 2007, Benilova ir kt., 2012).

$A\beta_{1-42}$ Oligomerės dalelės	Charakteristikos ir struktūra	Literatūros šaltinis
Protofibrilės	Tarpinės struktūros $A\beta$ fibrilizacijos metu, kurių ilgis apie 150 nm, o plotis ~5; β -klostinė struktūra: kabinasi su Congo raudonuoju ir Tioflavinu T.	Walsh ir kt., 1997
Žiedinės protofibrilės	Riestainio tipo $A\beta_{1-42}$ struktūros (155 kDa) iš 6 heksamerų (36 – merų); kurių išorinis diametras ~ 8–12 nm; vidinis diametras ~ 2,0 – 2.5 nm. Sukelia Ca^{2+} perteklių ląstelėje ir citotoksiškumą (mikromoliarinėse koncentracijose).	Lashuel ir kt., 2002 Lasagna-Reeves ir kt., 2011
$A\beta$ – difuziniai ligandai (ADDL)	Sintetiniai $A\beta$ oligomerai, mažesni nei žiediniai; 3 – 24merai; pagrindinis komponentas 17 kDa (tetrameras). Globulės struktūros, 2 – 5nm dydžio. Gali veikti neuronų signalo perdavimo kelius.	Gong ir kt., 2003
$A\beta^{*56}$	Globulomerai iš 12 monomerų, kurių molekulinė masė 56 kDa; Aptikti transgeninių APP pelių smegenyse ir susiję su atminties praradimu.	Lesne ir kt., 2006
SDS stabilūs tirpūs $A\beta$ dimerai ir trimerai	Išskirti 6-, 8- ir 12- kDa $A\beta$ iš kultivuojamų ląstelių; atsparūs SDS; veikia sinapsių struktūrą ir funkciją.	Walsh ir kt., 2002 Shipton ir kt., 2011.
$A\beta_{1-42}$ sintetiniai oligomerai	β -klostines struktūras turintys oligomerai, randami nuo 1 – 20 nm. Citotoksiški pirminiams neuronams (mikromoliarinėse koncentracijose).	Cizas, Budvytyte ir kt., 2010 Kayed ir kt., 2003
SDS-stabilūs amilosferoidai (ASPD; sintetiniai ar išskirti iš smegenų)	10 – 15 nm sferinės $A\beta$ struktūros iš 32 – 150 -merų. Didžiausias toksiškumas priskiriamas 32-merui (7.2 nm) arba ASPD >10 nm.	Hoshi ir kt., 2003

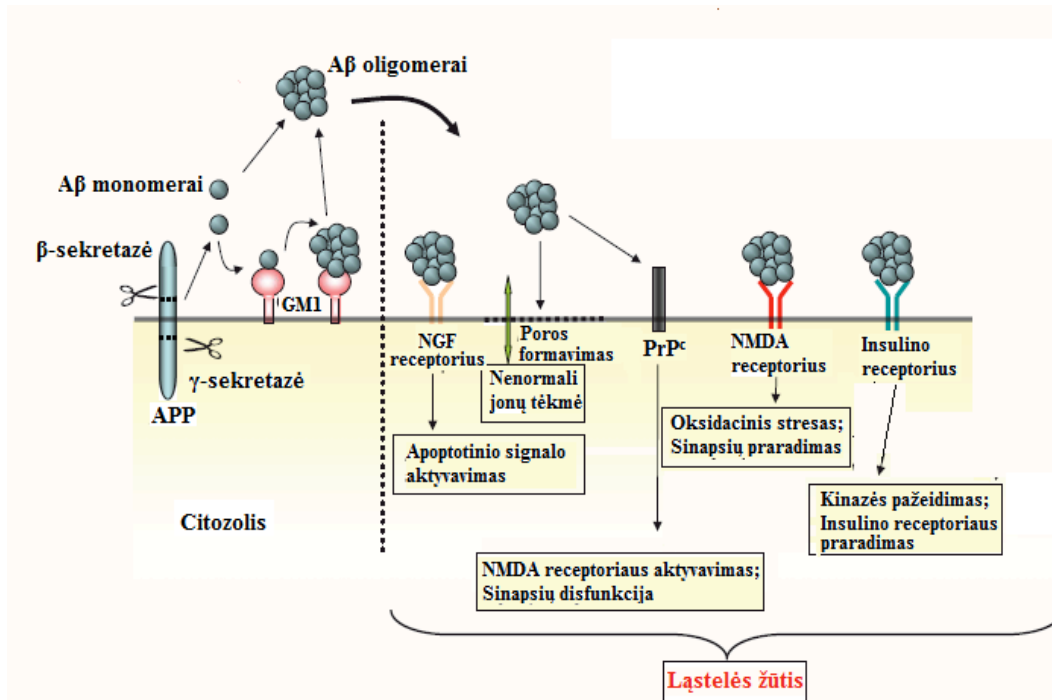
In vitro suformuoti ADDL stipriai kabinasi, neuronų kultūroje, prie dendritų, sukeldami neuronų žūtį. Tirpiuose žmogaus smegenų ekstraktuose, panaudojus ADDL specifinius antikūnus, buvo aptikti ADDL, ko pasekoje, iškelta idėja, jog būtent tokios $A\beta_{1-42}$ dalelės yra patologiškos (Lambert ir kt.,

2001). Tyrimai *in vitro*, panaudojant sintetinius $A\beta_{1-42}$, yra labai naudingi analizuojant Alzheimerio ligos mechanizmą ir $A\beta_{1-42}$ monomerų agregaciją į sudėtingesnes oligomerines formas ir jų molekulinę struktūrą (Sakono ir Zako, 2010). AL sergančio ligonio galvos smegenyse buvo aptiktos visos tirpių $A\beta$ formos, tarp kurių, daugiausia buvo mažos molekulinės masės $A\beta$, diapazone nuo dimerų iki oktamerų (nuo < 10 kDa iki > 100 kDa) (Walsh ir Selkoe, 2007). *Šiame darbe taip pat pavaizduoti in vitro sintetinių $A\beta_{1-42}$ peptidų oligomerizacijos būdai ir įvertinama, gautų darinių, morfologija, bei antrinė struktūra.*

1.6.3.2 Užląstelinių β -amiloidų oligomerų formavimasis ir jų toksiškumas

Tirpių $A\beta$ oligomerų formavimosi mechanizmas *in vivo* yra neaiškus. Galbe ir kiti parodė, kad skirtingų oligomerų struktūrų formavimasis vyksta skirtingais keliais ir priklauso nuo jų lokalizacijos ląstelėje (Glabe, 2008). Šiame skyriuje bus aprašomi galimi užląstelinių $A\beta$ oligomerų formavimosi mechnizmai ir jų įtaka AL patologijoje (1.15 pav.). Užląsteliniai $A\beta$ monomerai gali oligomerizuotis terpėje arba jungiantis prie gangliozido GM1 (Sakono ir Zako, 2010). Susiformavę $A\beta$ oligomerai, skirtingai veikdami ląstelėje, sukelia neuronų žūtį (1.15 pav.).

$A\beta$ oligomerai gali tiesiogiai jungtis prie nervų augimo faktorio (angl. Nerve growth factor, NGF) receptoriaus, lokalizuoto membranoje ir susijusio su toksiškumo mechnizmu (Yamamoto ir kt., 2007). Kitas galimas toksiškumo mechanizmas pasireiškia, kai $A\beta$ oligomerai jungiasi su N-metil-d-aspartato tipo gliutamato receptoriaus (NMDA) ir sutrikdo kalcio homeostazę, lydinčią padidėjusio oksidacinio streso ir sinapsių praradimu. Taip pat parodyta, kad $A\beta$ oligomerai paskatina insulino receptoriaus praradimą nuo neuronų paviršiaus ir pažeidžia ilgo veikimo asocijuotos kinazės aktyvumą (Sakono ir Zako, 2010, Zhao, 2008).



1.15 pav. Galimi AL neurotoksiškumo mechanizmai, sukelti tirpių užląstelinių A β oligomerų. A β oligomerai gali formuotis terpėje arba ant ląstelės membranos, tarpininkaujant ganglioziui GM1. A β oligomerai: (I) rišasi su membranoje esančiu NGF receptoriu ir tokiu būdu indukuoja neuronų žūtį. Pakeičia signalo transdukcijos sistemas; (II) Sąveikauja su ląsteliniu prionų baltymu (PrP^c) ir sutrikdo sinapsių veikimą; (III) pažeidžia ląstelės membraną, suformuodami porą ar kanalą joje, ar dielektriškai pažeisdami ją, sukeldami jos pralaidumą ir pakeisdami jonų tėkmę; (IV) Kabinasi prie NMDA receptoriaus, padidindami oksidacinį stresą; (V) Sukelia insulino receptoriaus praradimą neuronų paviršiuje ir sumažina kinazės aktyvumą (Adaptuota iš Sakono ir Zako, 2010).

Kitu būdu A β oligomerai gali sąveikauti su membrana, padidindami dielektrinę membranos konstantą ir taip sukeldami jos pralaidumą, ir ląstelinių pažeidimą, arba įsiterpti į membraną ir joje suformuoti porą ar kanalą (Arispe ir kt., 1994). Paskutiniaisiais metais iškelta dar viena AL patogenezės hipotezė – A β peptidai membranoje formuoja selektyvų joninį kanalą. Joniniai kanalai praleidžia Ca²⁺ jonus į ląstelę ir tuo būdu, destabilizuoja ląstelių joninę homeostazę, kuri paveikia termodinaminius ir kinetinius biocheminių virsmų parametrus, sukelia ląstelių neuritinę degeneraciją (Arispe ir kt., 2007). Neseniai, Lauren ir kitų, aptikta, kad ląstelinis prionų baltymas (PrP^c) pasižymi stipriu afiniškumu A β oligomerams ir gali tarnauti, kaip jų receptorių, sukeldamas sinapsių disfunkciją ir signalų perdavimą. Šis atradimas, paskatino

nuomonę, kad Alzheimerio liga ir susijusi su kitomis neurodegeneracinėmis ligomis.

Galiausiai, vienareikšmio atsakymo, kaip tirpūs $A\beta$ oligomerai pažeidžia neuronų membraną ir sukelia AL ligą, vis dar nėra. Tikriausiai, AL atsiradimą sąlygoja visi aprašyti mechanizmai ir jų tarpusavio sąsajos. *Mes savo ruožtu taip pat tyrėme vieną iš galimų aspektų – tai $A\beta$ oligomerų tiesioginę pažeidimą membranoms ir bandėme spręsti šio mechanizmo principus .*

2. TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGOS

Suformuota tBLM yra lokalizuota paviršiuje, todėl gali būti analizuojama panaudojant daugelį fizikinių metodų, suteikiančių informaciją apie dvisluoksnių savybes ir molekulinę struktūrą. Šiame darbe, tBLM savybių ir sąveikos su baltymais tyrimams buvo naudojami keli, papildantys vienas kitą, metodai. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) metodas buvo taikomas charakterizuoti imobilizuotų lipidinių membranų elektrines savybes ir tirti baltymų pažaidas joje. EIS teorijos ir taikymo pagrindai bus aprašomi 2.1 skyriuje. Fluorescencijos koreliacijos spektroskopijos (FCS) (2.2 skyrius) metodas, panaudotas baltymų ir peptidų sąveikos su dvisluoksniu analizei, ir tūriniam β -amiloidų oligomerų charakterizavimui. Atominės jėgos mikroskopija (AJM) (2.3 skyrius) buvo taikoma $A\beta_{1-42}$ oligomerų morfologijos charakterizavimui. $A\beta_{1-42}$ oligomerų struktūriniai tyrimai atlikti sąlytyje vanduo – oras, pritakius suminio dažnio (Sum frequency generation, SDG) generacijos spektroskopijos metodą (2.4 skyrius). Darbe papildomai buvo panaudoti ir kiti metodai – tai žiedinis dichroizmas, dinaminė šviesos sklaida, fluorescentinė mikroskopija – jie bus trumpai aprašomi rezultatų aptarimo dalyje.

2.1 Elektrocheminio impedanso spektroskopija: dvisluoksnių kokybės charakterizavimas

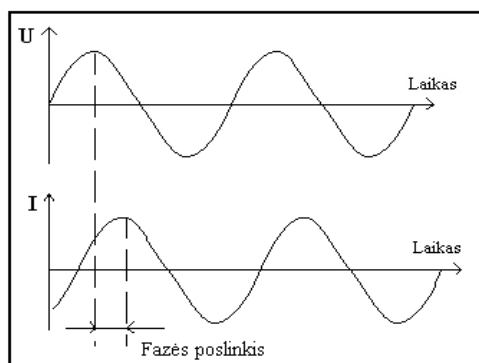
2.1.1 Elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodo teorija

Elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS) yra šiuolaikinis metodas tirti medžiagų elektrines savybes (dielektrine konstantą, laidumą, elektrinę talpą) (Barsoukov ir Macdonald, 2005). EIS yra kompleksinis kintančios įtampos ir srovės santykis.

$$Z = U/I, \quad (2.1)$$

kur U ir I – atitinkamai įtampa ir srovės stipris, Z – impedansas, arba kompleksinė varža (Ω arba $\Omega \cdot m^2$).

Nors tiriama sistema, atliekant EIS matavimus, gali būti sužadinama įvairio sformos signalais, mūsų darbe naudojome klasikinį EIS metodą, kuriame sužadinimas vykdomas sinusoidiškai kintama srove (įtampa), 2.1. pav. Elektrocheminėje celėje impedansą lemia tokie veiksniai, kaip elektrodų kinetika, cheminės reakcijos ir difuzija.



2.1 pav. Sinusoidinis kintamos srovės grandinės atsakas.

Taigi, kai sužadinti įtampa yra : $U(t) = U_0 \cos \omega t$, srovė atsilieka (aplenkia) nuo sužadinančio signalo tikru fazės kampu φ : (Bard ir Faulkner, 2001).

$$I(t) = I_0 \cos(\omega t - \varphi), \quad (2.2)$$

kur $I(t)$ yra momentinė srovė, I_0 – amplitudės signalas, ω – dažnis (rad / s) t.y. $\omega = 2\pi f$ kur f – dažnis (Hz)), t – laikas, φ – fazės poslinkio kampas (rad).

Harmoninės funkcijos yra aprašomos dviem dydžiais – amplitude ir faze. Kompleksinis skaičius taip pat aprašomas dviem dydžiais ir gali būti atvaizduotas vektoriumi. Taigi, grafinius veiksmus su harmoniniais virpesiais galime pakeisti analiziniais, jų vektorius užrašę kompleksiniais skaičiais, Impedansas, kuris yra apibrėžiamas 2.1 lygtimi, yra, bendru atveju, kompleksinis dydis, charakterizuojamas amplitudžių santykiu, U_0/I_0 , ir faziniu postūmiu, φ . Jį galime užrašyti menamos ir realios komponentių suma:

$$Z_{\text{bendra}} = \frac{U(t)}{I(t)} = |Z| \frac{\cos(\omega t)}{\cos(\omega t - \varphi)} = |Z| e^{j\varphi} = |Z|(\cos \varphi + j \sin \varphi) = Z' + jZ'' \quad (2.3)$$

kur, Z' – reali komponentė, Z'' – menama komponentė, j – menamas vienetas. Išraiška lygtyje (2.4) yra adekvati kompleksinio skaičiaus algebrinei

formai: $a + bj$, kur $j = \sqrt{-1}$ - menamas vienetas. a – vadinama realiaja, b – menamąja kompleksinio skaičiaus dalimis, o $|Z|$ – kompleksinio skaičiaus moduliui. Iš (2.3) lygties seka, kad absoliuti impedanso vertė ir fazės kampas apskaičiuojami:

$$|Z| = (Z'^2 + Z''^2)^{1/2}, \text{ ir tuomet: } \operatorname{tg}(\varphi) = Z''/Z', \quad (2.4)$$

Nagrinėjant kintamosios srovės grandines, taip pat naudojamas kompleksinis dydis – admitansas, kuris vaizduoja laidumą ir yra priešingas impedansui. Bendru atveju, jis taip pat užrašomas menamos ir realios komponentių suma:

$$Y_{\text{bendra}} = \frac{I(t)}{U(t)} = \frac{1}{|Z|} e^{-j\varphi} = Y' + jY'' = Z^{-1}, \quad (2.5)$$

kur Y – admitansas arba kompleksinis laidumas (S ar $S \cdot m^{-2}$), Y' – reali komponentė, Y'' – menama komponentė (Bard ir Faulkner, 2001, Sluyters-Rehbach, 1994). Laidumo sąvoka ypatingai naudojama elektrofiziologijoje, matuojant srovių, tekančių per membraną, pasiskirstymą ar joninių kanalų pralaidumą (Bretschneider ir Weille, 2006). Padalinus lygtį 2.5 iš $j\omega$, gaunama kompleksinė talpa C :

$$C = Y/j\omega = Y''/\omega - jY'/\omega = C' - jC'' \quad , \quad (2.6)$$

kuri patogi duomenų, gaunamų dielektrikų sistemose atvaizdavimui. Kompleksinės talpos komponentų tarpusavio priklausomybės plačiai naudotos šiame darbe.

2.1.2 Elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodo taikymas

Fosfolipidinio dvisluoksnio bei alkantiolių sluoksnio elektrinės ir struktūrinės savybės, suteikia puikias galimybes panaudoti elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodą. EIS charakterizuoja, dirbtinėse membranose vykstančius savitvarkius procesus ir jų struktūros ypatumus. Kai kuriais atvejais, panaudojant šį metodą, galima tikrinti įterptų į membraną: peptidų, baltymų ir kitų biomolekulių aktyvumą. Kai elektrodas yra

padengiamas plonu organiniu sluoksniu (SAM ir BLM) ir sumaišytas su elektrolito tirpalu, jis panašus į plokščiąjį kondensatorių (Elliott ir kt., 2003, Steinem, 1996). Kondensatorius – tai prietaisas, sudarytas iš dviejų laidininkų (elektrodų), tarp kurių yra plonas dielektriko sluoksnis. Šiuo atveju, organinis sluoksnis elgiasi, kaip dielektriko sluoksnis, ir šios sistemos kompleksinis impedanso atsakas:

$$Z = 1 / j\omega C, \quad (2.7)$$

kur i – menamasis vienetas, ω – dažnis (rad), C – talpa (F) (Bard ir Faulkner, 2001). Tuo tarpu, dielektrinio sluoksnio elektrinė talpa (plokščiojo kondensatoriaus atveju) priklauso nuo dielektriko sluoksnio storio, jo dielektrinių savybių ir elektrodų matmenų:

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon A}{d}, \quad (2.8)$$

kur ϵ_0 yra vakuumo dielektrinė konstanta $8,85 \cdot 10^{-14}$ F/cm, ϵ – dvisluoksnės membranos santykinė dielektrinė skvarba, A – membranos (elektrodo) paviršiaus plotas (cm^2), d – dvisluoksnės membranos storis (cm) (Sluyters-Rehbach, 1994). Tuo tarpu, realių lipidinių membranų talpa dažnai nėra ideali. Vietoje to, ji elgiasi kaip pastovios fazės elementas (angl.: Constant Phase Element, CPE), kurio impedansas apibūdinamas lygtimi:

$$Z = 1 / CPE(j\omega)^\alpha, \quad (2.9)$$

kur Z yra impedansas (Ω), ω – dažnis (Hz), CPE – pastovios fazės elementas, α – pastovios fazės elemento laipsnio rodiklis – skaičius, kurio kitimo sritis gali būti nuo 0 iki 1 (Barsoukov ir Macdonald, 2005). Jei $\alpha = 1$, CPE tampa paprasta elektrine talpa. Tokiomis elektrinėmis savybėmis pasižymi idealūs homogeniški paviršiai. Tačiau realių paviršių, kurie yra tiek geometriškai, tiek energetiškai heterogeniški α yra < 1 . Kuo labiau α nutolsta nuo vieneto, tuo heterogeniškesnė, netvarkingesnė yra paviršinė struktūra. Taigi, šis parametras atspindi savitvarkės struktūros, tokios kaip lipidinis dvisluoksnis, tvarkingumo (defektiškumo) laipsnį (McGillivray ir kt., 2007, Valincius ir kt., 2012). Šiuo atveju, pastoviosios fazės elemento kompleksinis laidumas yra apibūdinamas lygtimi:

$$Y = \text{CPE} (j\omega)^\alpha, \quad (2.10)$$

kur Y yra admitansas (laidumas) (S arba $S \cdot m^{-2}$). Laidumas yra atvirkščiai proporcingas impedansui dydis, taigi jis tiesiogiai proporcingas CPE ir dažniui ir pastovios fazės laipsnio rodikliui (Krishna ir kt., 2003). Bendra BLM talpa skaičiuojama:

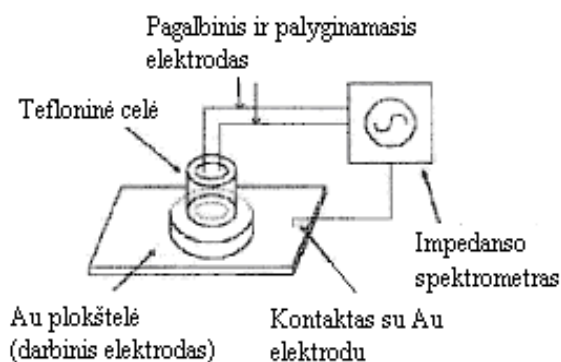
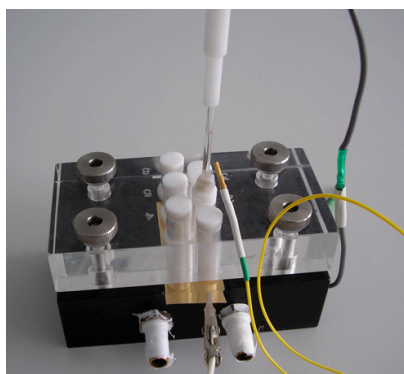
$$1 / C_{\text{bendra}} = 1 / C_{\text{SAM}} + 1 / C_{\text{BLM}}, \quad (2.11)$$

kur C_{bendra} – bendra dvisluoksnės lipidinės membranos talpa, C_{SAM} – savitvarkio monosluoksnio (alkantiolių) talpa, C_{BLM} – lipidinio dvisluoksnio talpa. Infraraudonosios ir Ramano spektroskopijos tyrimai įrodė, kad membranos struktūra keičiasi varijuojant pridedamų alkantiolių kiekį, tuo tarpu nuo fosfolipidų sluoksnio priklausomybė maža. C_{BLM} nustatymas įvertina fosfolipidų sluoksnio storį ir dielektrinę konstantą (Plant, 1993).

2.1.3 Eksperimentinė įranga

Elektrocheminio impedanso spektroskopijos (toliau – EIS) tyrimai buvo atlikti naudojant firmos Princeton Applied Research (JAV) kompiuterizuotą darbo stotį, potenciostatą, Parstat 2273, valdomą Power Suite programiniu paketu ir Solartron (Farnborough, UK) potenciostatą, modelis 1287 su dažnio atasako analizatoriumi (FRA, modelis 1252). Elektrocheminių duomenų analizei naudotas EIS spektrų optimizavimo programų paketas Zview (Scribner Associates, JAV). EIS spektrai buvo rašomi dažnių diapozone nuo 0,5 Hz iki 100 kHz. Buvo naudojama trijų elektrodų elektrocheminė matavimo schema. Palyginamuoju naudotas Microelectrodes, Inc firmos Ag/AgCl/NaCl sotus elektrodas, pagalbinis elektrodas yra spirale susukta 0,25 mm diametro Pt viela (99.99% grynumas Sigma Aldrich, Vokietija). Darbiniu elektrodu buvo naudojama Si plokštelė (150 – 250 μm storio 100 kristalografinės orientacijos Si monokristalas), magnetroniškai padengta 100 – 200 nm storio Au sluoksnėliu. Tyrimams buvo sukonstruotas specialus šešių elektrocheminių celių blokas, leidžiantis atlikti elektrocheminius tyrimus termostatuojamomis sąlygomis. (žr. 2.3 pav). Vienos elektrocheminės celės plotą (0,32 cm^2) apriboja Vitono O - žiedai. Elektrocheminiai matavimai buvo atliekami

reikiamose temperatūrose, termostatuojamoje elektrocheminėje celėje aeruotuose elektrolitų tirpaluose. Elektrinių savybių tyrimams buvo naudota fosfatinė 0,01 M buferinė sistema, pH 7,4; foniniu elektrolitu naudotas 0,1 M NaCl, jeigu tekste nenurodyta kitaip.

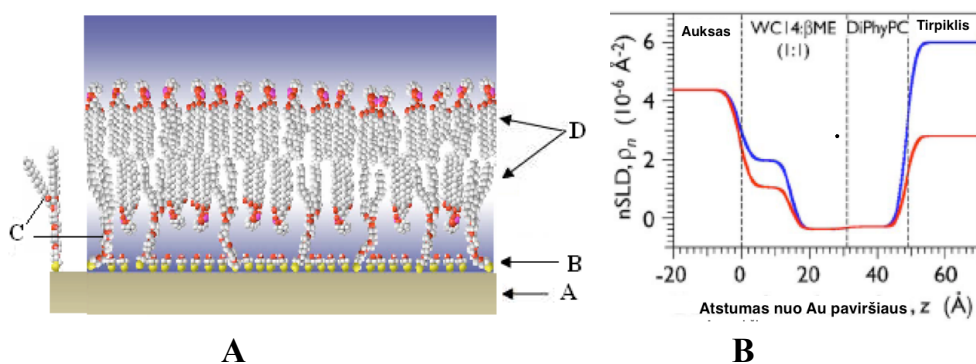


2.3 pav. Termostatuojama elektrocheminė celė paruošta matavimui. Vertikalusis stiklinis – palyginamasis elektrodas, spirale susukta viela (nesimato) – pagalbinis elektrodas ir Au plokštelė – darbinis elektrodas. Detalesį aprašymą žiūrėkite tekste. (Matavimo schema adaptuota iš Raguse ir kt., 1998, Nuotrauka iš asmeninio archyvo).

2.1.4 Imobilizuotos dvisluoksnės lipidinės membranos formavimas

Paviršiuje imobilizuotų fosfolipidinių membranų, su kuriomis buvo dirbama šiame darbe, molekulinė architektūra pavaizduota 2.4 paveiksle A, kuri neseniai buvo įrodyta neutronų reflektometrijos metodu (2.4 pav. B) (McGillivray ir kt., 2007). Tokia nanosistema formuojama dvejomis pakopomis. Pirmoji – *savitvarkio monosluoksnio (SAM) formavimas*, kuris vykdomas 100 – 200 nm storio aukso sluoksniu, padengtą Si plokštelę (2.4 pav, A) įmerkiant į inkarinių junginių (šiam darbe buvo naudojami trijų tipų junginiai: WC14, FC16 ir HC18) ir β -merkaptioetanolio tirpalus (įvairiais moliniais tiolų santykiais), kuriame bendroji tiolų koncentracija buvo 0,2 mM. Plokštelės inkubuojamos 12 – 36 valandų. Po inkubacijos, pavydžiai nuplaunami su absoliučiu etanoliumi ir nusausinami, nupučiant sausa azoto srove. Susidaręs savitvarkis mišrus (junginiai B ir C, 2.4 pav.) monosluoksnis buvo naudojamas fosfolipidinio dvisluoksnio prikabinimui. Antroji pakopa – dvisluoksnės lipidinės membranos formavimas, naudojant tirpiklio pakeitimo

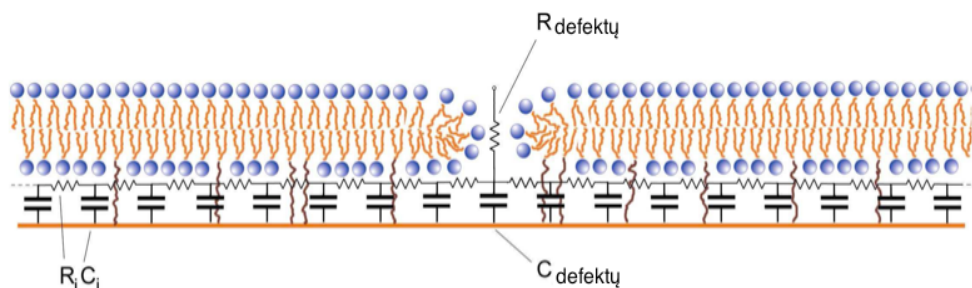
metodą. Į specialiai sukonstruotą elektrocheminę celę (2.3 pav.) patalpinama auksu padengta ir pirmojoje stadijoje modifikuota Si plokštelė su SAM ir ant jos paviršiaus užnešamas 50 μ l 10 mM atitinkamo fosfolipido tirpalas (DPhPC, DOPC, POPC ar jų mišinių su cholesteroliu, cerebrozidu, sfingomielinu, ar realaus lipidinio ekstrakto). Palaikius šį tirpalą maždaug 10 min kontakte su Au paviršiumi, jis išplaunamas stipria 15 – 20 ml atitinkamo buferio srove. Naudojant tirpiklio pakeitimo technologiją (Cornell ir kt., 1997) ant funkcionalizuoto Au paviršiaus fosfolipidas saviorganizuojasi į dvisluoksnį (2.4 pav). Visi pakeitimai buvo atliekami kambario temperatūroje (20 ± 2 °C).



2.4 pav. A. Dirbtinės prijungtos dvisluoksnės membranos modelis, tirtas šiame darbe. A – silicio plokštelė padengta plonu aukso sluoksniu; B – β -merkptoetanolis; C – WC14 (membranoje pavaizduotas junginys, 20-tetradekiloksio-3,6,9,12,15,18,22 heptaoksaheksatrikontano-1- tiolis, WC14, kurio etileno oksido fragmentai susisukę į spiralę, o šalia – molekulė *trans* konformacijoje); D – fosfolipidinis dvisluoksnis. B. tBLM profilis, išmatuotas neutronų reflektometrija (Adaptuota iš McGillivray ir kt., 2007).

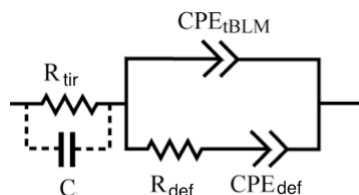
2.1.5. Duomenų analizė

Jeigu suformuotume idealią, homogenišką fosfolipidinę membraną, kuri elektriniu požiūriu sudaro tolygų izoliacinį sluoksnį, taikytume nuosekliai sujungtų elektrinių elementų modelį, sudarytą iš elektrolito varžos R_{tir} dvisluoksnio elektrinės talpos C_{BLM} , elektrolito rezervuaro tarp membranos ir elektrodo paviršiaus varžos R_{res} ir Helmholtco talpos C_H , atspindinčios fazių sąlyčio ribos tarp metalo ir elektrolito paviršiaus elektrinę talpą. Tačiau formavimo metu, natūralus, ar po sąveikos su toksiniais, formuojančiais jonams pralaidžius kanalus, membranoje atsiranda defektai ar skylutės. Toks dvisluoksnio skerspjūvio variantas pavaizduotas 2.5 paveiksle.



2.5 pav. Defektuota tBLM ir ją modeliuojanti elektrinė ekvivalentinė grandinė (Adaptuota iš Valincius ir kt., 2012).

Dėl membranoje atsiradusių defektų, pasikeičia elektrinio lauko tėkmė, todėl tarp elektrodo paviršiaus ir fosfolipidinio dvisluoksnio greta atsiranda dar vienas “laidumo kanalas”, kurį sudaro R_{def} – defektų varža ir CPE_{def} – defektų talpa. Todėl, viso fosfolipidinio paviršiaus su defektais, impedansas atvaizduojamas ekvivalentiniu modeliu 2.6 pav., kurio taikymą tBLM analizei, matematiškai aprašė Valincius ir kiti (Valincius ir kt., 2012).



2.6 pav. Ekvivalentinis fosfolipidinės membranos modelis. CPE_{tBLM} – fosfolipidinio dvisluoksnio talpa (pastovios fazės elementas), R_{def} – defekto varža, CPE_{def} – pastoviosios fazės elementas, kurio, esant nedideliame defektų kiekiui, elemento laipsnis turi būti 0,5. Kiti elementai nėra tiesiogiai susiję su paviršiaus savybėmis, tai R_{tir} – tirpalo varža, C – matavimo grandinės parazitinės talpas elementas, pasireiškiantis didelių dažnių srityje (> 1000 Hz) (Valincius ir kt., 2012, McGillivray ir kt., 2007).

2.5 paveiksle pavaizduota modelinės dirbtinės prijungtos dvisluoksnės membranos struktūra su defektais, sąlygojančiais liekamąjį laidumą, ribojantį tokių modeliųjų sistemų panaudojimą baltymų/membranų sąveikos analitiniame detektavime. Šiame darbe, panaudodami mūsų laboratorijoje pagamintą celių bloką bei optimizuotą dvisluoksnio paruošimo protokolą mums pavyko gauti membranas, kurių specifinis laidis buvo $0,5 - 3,0 \mu S/cm^2$. Šis laidis yra daug didesnis, nei galėtume tikėtis idealios membranos atėju, tačiau, kaip matysite disertacijos rezultatų aptarimo dalyje ir išspausdintuose darbuose (Valincius et

al., 2008), tokie dirbtiniai dvisluoksniai modeliai buvo sėkmingai panaudoti $A\beta_{1-42}$ oligomerų detekcijai nuo maždaug 100 – 150 nM koncentracijos (skaičiuojant pagal $A\beta_{1-42}$ monomerą) ir poras formuojančių toksinų sukeltų membranų pažaidų tyrimams.

Šiame darbe EIS metodas taikomas tiriant ir analizuojant tBLM sąveikas su poras formuojančių toksiniais ir $A\beta_{1-42}$ oligomerais ir jų afiniškumo lipidiniams komponentams tyrimuose.

2.2 Fluorescentinė koreliacinė spektroskopija: peptidų sąveikos su dvisluoksniu ir fosfolipidų dinamikos membranoje tyrimas

Fluorescencijos koreliacijos spektroskopija (FCS) – tai aukštos rezoliucijos, optinės mikroskopijos metodas, kuris leidžia atlikti ypatingai mažos koncentracijos biomolekulių erdvinę ir laikinę analizę. Šiuo instrumentu naudojami Amerikos Carnegie Mellon Universitete Pitsburge, Pensilvanijos valstijoje. Bendradarbiavimas vyko su Fizikos skyriaus, Biologinės fizikos grupės, Aukštamolekulinių struktūrų laboratorijos mokslininkais. FCS yra vienas pagrindinių biofizikinių metodų pritaikomas molekulių sąveikų tyrimams *in vitro* ir *in vivo* ir suteikiantis galimybę tirti dinامينius procesus biologiniuose pavyzdžiuose, minimaliai juos pažeidžiant. FCS duoda informaciją apie molekulės mobilumą ir fotochemines ir fotofizikines reakcijas (Haustein ir Schwille, 2007). Priešingai kitiems fluorescenciniams metodams, pirminis signalas gaunamas ne emisijos, o savaiminės fliuktuacijos, sukurtas minutinio nukrypimo nuo termės, pusiausvyros metu. Bendrai, visi fizikiniai parametrai, sužadinantys fluorescencinio signalo fliuktuacijas, yra FCS prieinami. Pavyzdžiui, gana paprasta, detektuoti nanomoliarinėse koncentracijose fluorescenciškai žymėtų biomolekulių lokalią koncentraciją, mobilumo koeficientus, konformacijos pasikeitimus ar charakterizuoti vidinių ar išorinių molekulių reakcijų pasiskirstymą.

Šioje disertacijoje bus pristatoma FCS metodo platus biologinis taikymas ir panaudojimas, šio tiriamojo darbo trijų uždavinių sprendimui: pirma, $A\beta_{1-42}$ oligomerinių darinių charakterizavimui bei oligomerizacijos

proceso valdymui; antra, β -amiloidų oligomerų sąveikos su fosfolipidine membrana tyrimui; ir trečia, fosfolipidų dinamikos tyrimui dvisluoksnyje, priklausomai nuo tBLM sudėties ir architektūros.

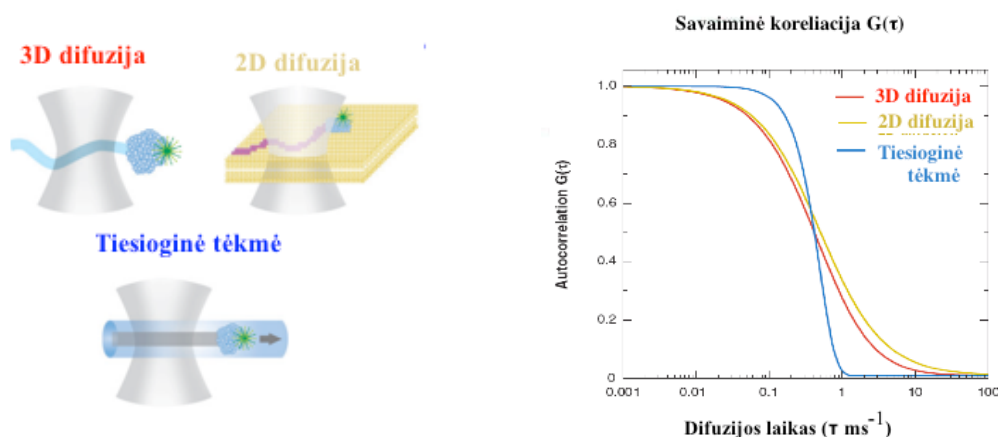
2.2.1 Fluorescentinės koreliacinės spektroskopijos metodo teorija

Autokoreliacija

Siauras lazerio spindulys yra fokusuojamas į pavyzdį ir matuojama dalelių fluorescencijos intensyvumo fliktuacija (autokoreliacija) mikroskopiniame detekcijos tūryje (židinio tūris). Svarbu minimizuoti molekulių skaičių detekcijos tūryje, nes didėjant dalelių skaičiui, fliktuacijos intensyvumas mažėja. Optimalus kiekis molekulių detekcijos tūryje, turi būti nuo 0,1 iki 1000, o koncentracijų diapozonas nuo subnanomoliarinės ($\sim 10^{-10}$ M) iki mikromoliarinės ($\sim 10^{-6}$ M) koncentracijos.

Mobilumas

Visų pirma atskirti ir suprasti tiesioginį molekulės judėjimą nuo atsitiktinio gali būti labai sudėtingas uždavinys. Keletos nepriklausomų difunduojančių dalelių savaiminės koreliacijos modelinės sistemos ir autokoreliacijos kreivės pateiktos 2.7 paveiksle.



2.7 pav. Skirtingai judančių dalelių modelinės savaiminės koreliacijos kreivės: savaiminė FCS laisva difuzija 3D (*raudona*), savaiminė FCS difuzija membranoje 2D (*geltona*) ir FCS tiesiakryptė tėkmė (*mėlyna*) (Adaptuota iš Hausteina ir Schwille, 2007). Kur k_B yra Boltzmano konstanta, T yra temperatūra, η yra dinaminis terpės klampumas, r yra dalelės diametras. Elipsės formos dalelės atveju, lygtis 2.16 yra modifikuojama (žr. Čižas, Budvytyte ir kt., 2010).

Galutinė laisvai difunduojančių molekulių savaiminės koreliacijos funkcija (3D modelis):

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}} \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad , \quad (2.11)$$

kur pirmas faktorius – tai atvirkščias, molekulių skaičiui detekcijos tūryje, dydis. V_{eff} – tai efektyvus detekcijos tūris.

Atsižvelgiant į detekcijos plokštumą, detekcijos tūris išplečiamas į spindulinį, r_0 ir ašinį, z_0 parametrus. Dėl to, fluorescuojančių molekulių koncentracija gali būti nustatyta tiksliai, žinant r_0 ir z_0 matmenis iš kalibracijos matavimų, iš savaiminės koreliacijos kreivės amplitudės $G(0)$:

$$G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{V_{\text{eff}} \cdot \langle C \rangle} \quad \Leftrightarrow \quad \langle C \rangle = \frac{1}{V_{\text{eff}} \cdot G(0)} \quad , \quad (2.12)$$

Savaiminė dvidimensinės difuzijos koreliacijos funkcija membranoje :

$$G_{2D}(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \quad , \quad (2.13)$$

Kur, τ yra lateralinis fluorescuojančių difuzijos laikas. Tačiau 2.13 lygties galiojimas priklauso nuo pavyzdžio tikslios lokalizacijos detekcijos plokštumoje: jei tik pavyzdys lokalizuotas $z = z_0$, tuomet lateralinis difuzijos laikas τ_D , tai toks laikas, kuriame molekulė užsibūna židinio tūryje ir yra paprastai išreiškiamas per difuzijos koeficientą D :

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{\alpha \cdot D} \quad , \quad (2.14)$$

Bet jeigu matavimai atliekami, kai pavyzdys esti ties $z = z_0 + \Delta z$, tuomet konfokalinėje geometrijoje spindulio padidėjimas aprašomas lygtimi (Shenoy ir kt., 2009):

$$r^2 = r_0^2 \left(1 + \frac{\lambda^2 \Delta z^2}{\pi^2 n^2 r_0^2} \right) \quad , \quad (2.15)$$

kur n yra terpės lūžio rodiklis, λ yra lazerio bangos ilgis vakuume.

2.2.2 Fluorescentinės koreliacinės spektroskopijos taikymas

Kaip pavaizduota 2.7 paveiksle, stebėdami charakteringas savaiminės koreliacijos funkcijas, besiskiriančias savo forma, galime atskirti vykstančius molekulinis procesus. Kaip taisyklė, anomalios subdifuzijos kreivė, lyginant su laisva difuzija, palaipsniui slenkasi į apačią, lėtėja, tuo tarpu aktyvaus transporto metu koreliacijos kreivė statesnė, stumiasi į viršų, greitėja (2.7 pav). FCS priklauso vienietinės molekulės detekcijos metodų klasei, kuris neseniai pradėtas taikyti viduląstelinėje aplinkoje. FCS yra itin jautrus laiko atžvilgiu, nepažeidžiantis pavyzdžio metodus, leidžiantis atlikti matavimus realiaame laike. Tai idealus metodas tiriant baltymų difuziją ir dinamiką gyvose ląstelėse, nanomoliarinėse koncentracijose (Kim ir Schwille, 2003).

Fluorescencijos koreliacijos metodas lyginant su kitais šiuolaikiniais metodais pasižymi unikaliomis savybėmis. FCS gali būti taikomas vietoje tokio klasikinio metodo, kaip imunoprecipitacija, tiriant ląstelės sąveikas ir molekulių mobilumus skirtingose vietose (Bacia ir Schwille, 2003). FCS duomenys yra kiekybinės prigimties (koncentracija, difuzijos koeficientai, disociacijos konstantas) ir nepriklauso nuo erdvinio fluoroforo išsidėstymo (priešingai FRET metodui). FCS tyrimams reikalingas tiriamųjų pavyzdžių koncentracijos diapozonas, gerai atitinka fiziologines baltymų koncentracijas (Kim ir Schwille, 2003). Buvo parodyta, jog FCS metodas yra itin tinkamas, tiriant silpnai ekspresuojamus baltymus (kurių konc. mažiau nei 10 – 20 nM), tuo tarpu tai padaryti kitais metodais yra labai sudėtinga (Mutze ir kt., 2011). Taigi, paskutiniaisiais metais, biologijos moksluose, FCS intensyviai panaudojama fluorescuojančių baltymų struktūrinės dinamikos *in vitro* ir molekulinės dinamikos *in vivo* tyrimams (Schwille ir kt., 1999, Medina ir Schwille, 2002). Taip pat intensyviai pritaikoma tiriant baltymų transportą ir baltymų/baltymų, nukleorūgščių/baltymų, makromolekulių/mažų molekulių sąveikas (Van Craenenbroeck ir Engelborghs, 1998, Politz ir kt., 1998, Sevenich, 1998, Schwille, 1999).

2.2.3 Eksperimentinė įranga ir duomenų analizė

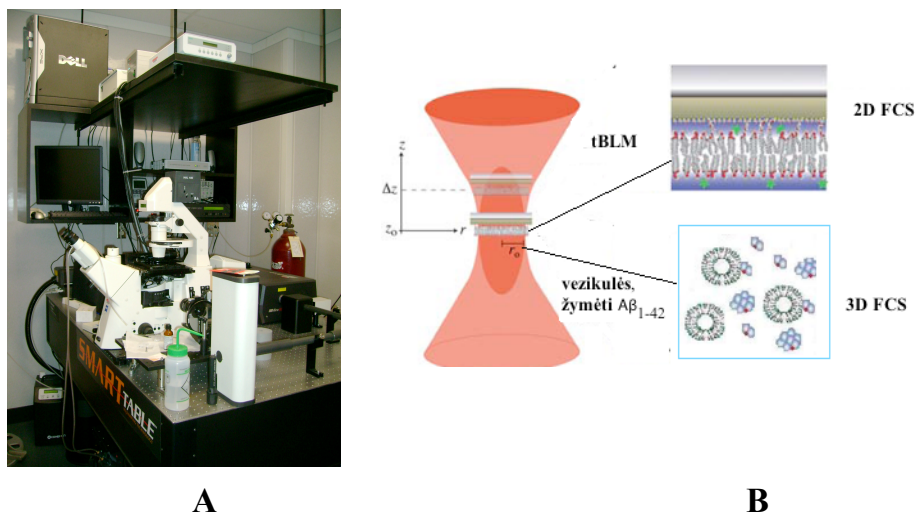
Visi fluorescenciniai koreliaciniai spektroskopiniai matavimai atlikti JAV Carnegie Mellon universitete (Pittsburgh, Pennsylvania), stažuočių metu, su Zeiss LSM 510 Meta ir joje įdiegta Confocor 3 detekcijos sistema (2.8 pav. **A**). Sužadavimo šviesa $\lambda = 561$ nm gauta iš diodo kieto būvio (DPSS) buvo derinama su 40×1.1 NA LD – C-Apochromat vandens imersiniu objektyvu ir fluorescentinė emisija yra renkama su tuo pačiu objektyvu ir detektuojama su srautiniu fotodiodu ir įtaisytu 575 – 615 nm filtru.

Šiame darbe vykdomų eksperimentų iliustracijos pavaizduotos 2.8 paveiksle (**B**). Buvo keliami du tikslai: pirma, įvertinti susiformavusių $A\beta_{1-42}$ oligomerų difuzijos koeficientus ir jų dydį, bei tirti jų sąveiką su fosfolipidiniu dvisluoksniu visame tūryje, t.y. 3D, panaudojant vezikulių modelines sistemas (2.8 pav. **B**); Antra, nustatyti paviršiuje prijungtų dirbtinių fosfolipidinių membranų dinamines savybes (2D matavimai, 2.8 pav **B**).

FCS duomenys buvo analizuojami pritaikant 3D (2.11 lygtis) ir 2D (2.13 lygtis) difuzijos modelius (Haustein ir kt., 2007), iš kurių išskaičiuojamas difuzijos koeficientas, kuris apsprendžiamas laisvai tūryje ar membranoje judančios dalelės dydžiu. Sąryšį tarp difuzijos konstantos ir sferinės dalelės dydžio, nusako Stokes – Einstein dėsnis:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}, \quad (2.16)$$

Kur k_B yra Boltzmano konstanta, T yra temperatūra, η yra dinaminis terpės klampumas, r yra dalelės diametras. Elipsės formos dalelės atveju, lygtis 2.16 yra modifikuojama (žr. Čižas, Budvytyte ir kt., 2010).



2.8 pav. FCS instrumentinė bazė ir vykdomų eksperimentų iliustracija. **A.** JAV Carnegie Mellon universiteto, Fizikos skyriuje, Biologinės Fizikos grupėje disponuojama kompiuterizuota fluorescencijos koreliacijos spektroskopijos darbo stotis. **B.** FCS eksperimento vaizdavimas. Vykdomi tyrimai naudojant 2D FCS (viršuje), kuomet difuzinė analizė atliekama siaurame apribotame tūrio diapozone, tokiu principu matuojama fluorescenciškai žymėta tBLM. 3D FCS tyrimai atliekami visame tūryje (apačioje), tokiu principu buvo analizuojama sąveika tarp žymėtų $A\beta_{1-42}$ oligomerų ir fosfolipidinių vezikulių (Nuotrauka ir paveiklas adaptuota iš asmeninio archyvo).

Tuomet, kai tiriama $A\beta_{1-42}$ oligomerų sąveika su vezikulėmis visame tūryje, naudojamas dviejų komponentų, pasižyminčių skirtingomis dinaminėmis savybėmis, 3D difuzijos modelis. Analizės metu gauname tiek laisvų $A\beta_{1-42}$ oligomerų difuzijos koeficientą, tiek $A\beta_{1-42}$ oligomerų susiriusių su vezikulėmis difuzijos koeficientą ir molinę surištų $A\beta_{1-42}$ oligomerų frakcija.

2D FCS duomenys gaunami skenuojant pavyzdį per detekcijos plokštumą (z – skenavimas). Įprastai lipidinio sluoksnio storis 5 nm, tuomet FCS užrašomas kas 0,2 nm ir gaunama Gausinio tipo autokoreliacijos priklausomybė nuo skenavimo padėties (Benda ir kt., 2003)

Paviršiuje prijungtų dirbtinių fosfolipidinių membranų dinaminės savybės, priklausomai nuo inkarinio junginio tankio ant paviršiaus, buvo tiriamos FCS metodu, pritaikius 2D modelį (Rezultatų aptarimo dalis, I skyrius, 1.2 poskyris) $A\beta_{1-42}$ oligomerų sąveika su fosfolipidine membrana ir afiniškumas lipidiniams komponentams buvo stebimas panaudojant skirtingos sudėties fosfolipidines vezikules ir pritaikius 3D FCS modelį (III skyrius).

2.3 Atominės jėgos mikroskopija

Skenuojančio zondo mikroskopai yra instrumentų klasė, naudojama tiriant medžiagų paviršių savybes. Visų skenuojančių mikroskopų veikimo principas – paviršiaus skenavimas plonu zonu, kuris tam tikru būdu (priklausomai nuo mikroskopo tipo) sąveikauja su paviršiumi. Yra trys pagrindinės skenuojančių mikroskopų rūšys: tuneliniai, optiniai artimojo lauko ir atominės jėgos mikroskopai (AJM).

Vieni universaliausių iš skenuojančiųjų mikroskopų yra jėgos mikroskopai – AJM. Geriausių atominės jėgos mikroskopų horizontali skiriamoji geba siekia 0,1 Å, vertikali – 0,01 Å (vakuume), tuo tarpu ore ant bandinio susidaro plonas adsorbuoto vandens ar dujų sluoksnis, kuris žymiai sumažina mikroskopo skiriamąją gebą, todėl ore mikroskopo horizontali skiriamoji geba neviršija 10 – 20 Å, o vertikali – apie 1 Å. Neseniai pasiekta 1 nm skyra, modifikavus AJM adatą metaliniu plaukeliu (Hong ir kt., 2011). AJM zondas yra adata, kurios ilgis paprastai neviršija 5 μm, o smaigalio skersmuo mažesnis už 10 nm. Adata tvirtinama prie laisvojo liežuvėlio (angl.: cantilever) galo. Liežuvėlio ilgis paprastai yra 100 – 500 μm (Binnig ir kt., 1986). Dabartiniai AJM zondai gaminami litografijos metodais dažniausiai iš silicio arba silicio nitrido. Liežuvėlio gale esantis zondas kontaktuoja su paviršiumi (arba yra Van der Waalso jėgų veikimo atstume), o grįžtamojo ryšio mechanizmas palaiko vienodą sąveikos jėgą tarp zondo ir paviršiaus skenavimo metu. Adatėlės vertikalus prisitaikymas ir pirminis priartėjimas prie pavyzdžio yra valdomas elektromechaniškai. Adatėlė priartinama prie sąveikos srities su pavyzdžio paviršiumi per atstumą d , kuris yra proporcingas tam tikros adatos jėgai, $F = k * d$, kur k yra liežuvėlio elastingumo – jėgos konstanta (0,01– 0,1 N/m biologiniams objektams) (Sader ir kt., 1999; Sader, 2002). Jėga, kuria adatos galo atomai sąveikauja su bandiniu, išlenkia liežuvėlį. Liežuvėlio atsilenkimas ir yra AJM detektoriaus signalas, registruojamas optiškai, panaudojant lazerio spindulį. Atsispindėjęs spindulys patenka į dvi arba į keturias dalis padalintą šviesos fotodetektorių, kur yra registruojamas

skirtuminis signalas tarp fotodetektoriaus dalių. Signalą sukelti gali kelios jėgos, o kuri iš jų dominuoja, paprastai priklauso nuo atstumo tarp zondo ir bandinio, todėl AJM skirstoma į įvairus AJM darbo režimus: kontaktinis, nekontaktinis ir dinaminio kontaktavimo (Ash ir Nicholls, 1972, Geisse, 2009).

2.3.1 AJM darbo režimai

Kontaktinis režimas

Bendriausias AJM režimas yra vadinamas kontaktiniu, kurio metu adatelė kontaktuoja su bandiniu. Mikroskopui veikiant kontaktiniu režimu zondas skenuoja paviršių priartintas mažesniu, nei 1 Å atstumu, todėl vyrauja stipri (apie 1 – 2 N) stūmos jėga. Šiuo režimu gaunama didžiausia skiriamoji geba lyginant su kitais AJM režimais, tačiau jo taikymą riboja keletas trūkumų. Kontaktiniame režime lateralinė rezoliucija (ir daugelyje kitų AJM režimų), sąveikos su bandiniu metu, yra limituojama dėl adatos geometrijos, pavyzdžio šiurkštumo, atsiradusių nelygumų (vingių) (Hubner ir kt., 2003). Sąveikos jėgos tarp zondo ir bandinio vertikaliaja kryptimi yra gana didelės, be to, zondui slenkant paviršiumi, dėl adhezijos, atsiranda didelės ir horizontaliosios jėgos, todėl dažnai bandiniai pažeidžiami. Dėl šių priežasčių šis metodas retai taikomas biologinės kilmės bandiniams tirti (Hoh ir Hansma, 1992, Giessibl, 2003).

Nekontaktinis režimas

Mikroskopui veikiant nekontaktiniu režimu, zondas yra gana toli nuo bandinio paviršiaus (10 – 25 nm atstumu). Tokiu atstumu esantis zondas, su bandiniu sąveikauja tik Van der Waalso jėgomis, taigi šiuo atveju vyrauja silpna (apie 100 – 200 pN) traukos jėga. Šiuo režimu tikimybė pažeisti bandinį yra minimali, todėl toks režimas visgi taikomas biologiniams, jautriems pavyzdžiams tirti (Heinz ir kt., 1999, Giessibl, 2003).

Dinaminis virpančiojo zondo režimas

Virpančiojo zondo režimas (angl., tapping mode) buvo išvystytas tam, kad sumažinti žalingas laterales jėgas, kurios atsiranda kontaktiniame ar nekontaktiniame režime (Hansma ir kt., 1994) ir vėliau sėkmingai pritaikytas gyvų ląstelių vaizdinimui (Nagao ir Dvorak, 1999). Virpančiojo zondo režimas yra universaliausias, nes apima kontaktinio ir nekontaktinio režimų privalumus. Mikroskopui veikiant šiuo režimu, liežuvėlis su zonu virpinamas pjezoelektriniu būdu. Kintant bandinio paviršiaus topografijai, keičiasi adatos judėjimo amplitudė. Tokiu būdu, „tapšnojant“ bandinį, beveik visiškai eliminuojamos horizontaliosios adhezijos jėgos. Kitas svarbus šio virpančiojo režimo privalumas – tai sugebėjimas išvengti bandinį dengiančio skysčio ar dujų sluoksnio, kuris visuomet atsiranda, dirbant įprastinės atmosferos sąlygomis. Dirbant šiuo būdu yra pasiekama artima kontaktiniam režimui skiriamoji geba (Vengris, 2008, Giessibl, 2003). Šiuo metodu papildomai galima fiksuoti ir fazinius virpėjimo skirtumus (Chen ir kt., 1998; Garcia ir San Paulo, 1999). Fazių skirtumą lemia ne tik paviršiaus morfologija, bet ir mechaninės paviršiaus savybės, taip pat adhezijos jėgos tarp zondo ir bandinio. Matavimo metu registruojama zondo virpėjimo amplitudė ir fazių skirtumas tarp zondą virpančiojo signalo ir realaus zondo virpėjimo signalo.

Šiame darbe kontaktinis režimas buvo panaudojamas silicio plokštelių, magnetroniškai padengtų auksu, topografijos ir šurkštumo nustatymui. O virpančiojo zondo režimas buvo naudojamas įvertinti suformuotų mišrių savitvarkių monosluoksnių, kurie mūsų sistemose yra pagrindas, prikabinantis fosfolipidinį dvisluoksnį, morfologiją (plačiau žiūrėkite rezultatų aptarimo dalyje, I skyriuje, 2.2 poskyryje). Šie pagrindai yra kritiniai, norint suformuoti funkcionalią, izoliuojančią ir tinkančią baltymų detekcijai, tBLM. Taip pat AJM virpančiojo zondo režimas buvo sėkmingai panaudotas tiriant suformuotų $A\beta_{1-42}$ oligomerų ir fibrilių morfologiją ir jų dydį, priklausomai nuo paruošimo sąlygų (plačiau žiūrėkite rezultatų aptarimo dalyje, III skyriuje).

2.3.3 Eksperimentinė įranga

Tyrimams buvo naudojama Atominės Jėgos Mikroskopijos sistema Agilent 5500 (Santa Clara, CA), įgalinančia atlikti visus reikiamus šiuolaikinius didelės skiriamosios gebos mikroskopavimo metodus. Pirmiausia magnetroniškai garintos plokštelės buvo modifikuojamos skirtingais mišriais SAM tirpalais iš WC14, FC16, HC18 junginių, skiedžiant juos β -merkaptetanoliu, atitinkamai santykiu 3:7. Pavyzdžiai buvo, praplaunami etanoliu ir nudžiovinanti prieš mikroskopavimą. Biologinio objekto vizualizavimui, 20 μ l 10 μ M A β ₁₋₄₂ tirpalai buvo užnešami ant atomiškai lygaus V-4 kokybės žėručio (SPI Supplies, West Chester, PA) ir inkubuojama 5 – 10 min kambario temperatūroje, po to praplaunami vandeniu ir džiovinami su N₂ srove. Mikroskopavimas buvo atliekamas oro atmosferos sąlygomis virpesiniu, taip pat ir kontaktiniu režimais. Skenavimui buvo naudojami TESP modelio ($f = 257 - 301$ kHz, $k = 20 - 80$ N/m) ir FESP ($f = 60 - 90$ kHz, $k = 1,2 - 5,5$ N/m) modelio (Veeco, Plainview, NY) arba PPP-CON modelio ($f = 6 - 21$ kHz, $k = 0,02 - 0,77$ N/m) (Nanosensors, Neuchatel, Switzerland) siličio zondai. Tipiškas skenavimo greitis buvo 0,5 – 1 Hz, skenavimo kokybė 512 x 512 taškų. Dalelių dydžiai buvo nustatomi iš jų profilio, pagal aukštį (z koordinatė) x – y plokštumoje. Vidutinė z – aukščio vertė buvo apskaičiuojama naudojant SPIP programinio paketo plokštumos korekcijos modulį (angl.: Plane Correction (Flattening) module).

2.4 Suminio dažnio generacijos spektroskopija

Suminio dažnio generacijos eksperimentai buvo atlikti bendradarbiaujant su dr. Zenonu Kuprioniu (UAB „EKSPLA“).

Suminio dažnio generacijos (SDG) spektroskopija – tai netiesinės optikos metodas, kuomet medžiagos paviršius apšviečiamas intensyviu spinduliavumu. SDG metodas – tai pakankamai naujas metodas, kurio pritaikymo galimybes 1987 metais pavaizdavo prof. Sheno grupė iš JAV (Guyot-Sionnest ir kt., 1987). Tai unikalus metodas, įgalinantis nustatyti fazių riboje orientuotas

molekules, turinčias dipolius. Šiuo metodu galima gauti molekulinę informaciją apie sąveikaujančių molekulių orientaciją ir struktūrą. SDG spektroskopijos unikalumą apsprendžia jos paviršinis specifiškumas. Todėl SDG metodas leidžia tirti molekulių adsorbciją skystų/kietų, skystų/skystų, skystų/dujinių, kietų/dujinių medžiagų ribose, paviršines skysčių mišinių kompozicijas, paviršiaus fazės transformacijas (Richmond, 2002, Watry ir kt., 2001). Paskutiniu metu vis plačiau SDG metodas taikomas biologijoje ar net biomedicinoje, tiriant biomolekulių, tokių lipidų, struktūrą ir orientaciją sąveikoje su baltymais (Anglin ir Conboy, 2008, Ye ir kt., 2009, Doyle ir kt., 2004), taip pat peptidų/baltymų (įskaitant ir membraninių baltymų) sąveikas (Chen ir Chen, 2006, Chen ir kt., 2005, Wang ir kt., 2005). Taip pat mūsų laboratorijoje, SDG metodas buvo pritaikytas lipazės aktyvumo nustatymui sąlytyje vanduo/oras (Niaura ir kt., 2008).

2.4.1 Suminio dažnio generacijos spektroskopijos teorija

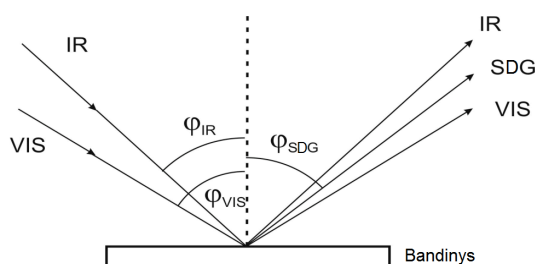
SFG spektroskopijoje naudojami du kaupinimo spinduliai: vienas – fiksuoto bangos ilgio matomos srities (ω_{VIS}), kitas – derinamo bangos ilgio infraraudonosios srities (ω_{IR}). Tuo metu, kai infraraudonos srities bangos ilgis sutampa su molekulių virpesiniu dažniu, tuomet SDG signalas stiprinamas ir generuojamas molekulių, esančių fazių riboje, virpesių spektras (2.9 pav.). SDG dalyvauja tik orientuotos molekulės, esančios fazių riboje ir nepasižyminčios centrine simetrija. Sąveikos metu generuojamas suminis dažnis:

$$\omega_{SD} = \omega_{IR} + \omega_{VIS} \quad (2.17)$$

Generuojamas suminio dažnio signalas ω_{SD} atsispindi nuo paviršiaus, pagal fazinio sinchronizmo sąlygą:

$$k_{SD} \sin \varphi_{SD} = k_{VIS} \sin \varphi_{VIS} + k_{IR} \sin \varphi_{IR}, \quad (2.18)$$

sudarydamas φ_{SD} kampą su pavyzdėlio paviršiaus plokštuma (Vidal F. and Tadjeddine A., 2005) (2.9 pav.).

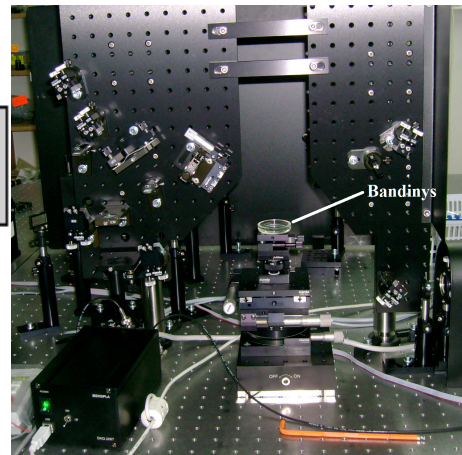
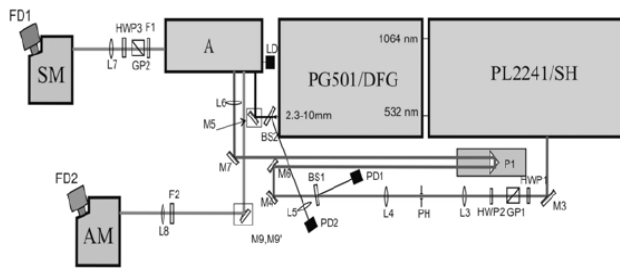


2.9 pav. Tipinė suminio dažnio generacijos geometrija (Adaptuota iš Niaura ir Kurionis, 2009).

SDG matavimuose dažnai naudojamos įvairios suminio dažnio spindulių poliarizacijų kombinacijos, norint nustatyti paviršiaus simetriją ar paviršinę molekulių orientaciją. Poliarizacija žymima iš trijų raidžių, kur pirmoji raidė reiškia suminio dažnio poliarizaciją, antroji – VIS spindulio poliarizaciją, trečioji – IR spindulio poliarizaciją. Pavyzdžiui ssp spektras reiškia, kad suminio dažnio poliarizacija yra statmena spindulių kritimo plokštumai, VIS spindulio poliarizacija taip pat statmena, o IR spindulio poliarizacija yra plokštumoje.

2.4.2 Eksperimentinė įranga ir duomenų analizė

Suminio dažnio generacijos spektrai gauti pasinaudojus „EKSPLA“ (Vilnius, Lietuva) pagamintu pikosekundiniu SDG spektroskopometru. 2.10 paveiksle pateiko UAB „Ekspla“ komercinio SDG spektrometro schemoje naudojamas pikosekundinis lazeris PL2241, mūsų matavimuose buvo naudojamas EKSPLA PL2143A/50 Nd:YAG lazeris, generuojantis 28 ps, pasikartojančius 20 ar 50 Hz impulsus prie 1064 nm. Šio lazerio antros harmonikos spinduliavimas (bangos ilgis 532 nm, impulso energija 300 – 400 μ J) naudojamas kaip matomos šviesos spindulys (ω_{VIS}). Suderinti infraraudonosios spinduliuotės (355 nm, 40 – 200 μ J) impulsai (ω_{IR}), gaminami parametriniame EKSPLA PG401VIR/DFG generatoriuje. Suminio dažnio (ω_{SD}) spinduliavimas filtruojamas išpjautu filtru ir monochromatoriumi sugaudomas fotodaugikliu uždaroje registravimo sistemoje.



2.10 pav. UAB „Ekspla“ suminio dažnio generacijos spektrometro schema (kairėje) ir spektro .patalpintas bandinys, paruoštas matavimui (Schema adaptuota iš Niaura ir Kurionis, 2009 nuotrauka iš asmeninio archyvo).

Spektrometre bandinys talpinamas horizontalioje padėtyje (2.10 pav.). Tokia geometrija yra patogi tiek kietų, tiek skystų paviršių tyrimams. VIS spindulys nukreipiamas į pavyzdėlį veidrodžiais M12, M13 ir fokusuojamas lęšiu L6 (Vaičiškuskas ir kt., 2008, Niaura ir Kurionis, 2009).

SDG virpesinių rezonansų parametų nustatymui (intensyvumui, puspločiui, dažniui) eksperimentiškai registruojami spektrai buvo aproksimuojami (2.19) lygtimi:

$$I(\omega_{SDG}) \approx \left| \chi_{NR}^{(2)} + \sum_n \frac{A_n e^{i\psi_n}}{\omega_{IR} - \omega_n + i\gamma_n} \right|^2 I(\omega_{VIS}) I(\omega_{IR}), \quad (2.19)$$

kur $I(\omega_{SDG})$ yra suminio dažnio generacijos intensyvumas, $(2) NR \chi$ – nerezonantinė netiesinio jautrio dalis, A_n yra n -tojo rezonanso intensyvumas, ir., ψ_n – santykinė faze, ω_n – rezonansinis dažnis ir γ_n – juostos plotis.

Matavimai atliekami stiklinėje celėje, kurios diametras 38 nm. Matavimo celė buvo amonio persulfato tirpalas konc. sieros rūgštyje. Po šios procedūros celė gausiai plaunama distiliuotu vandeniu. Prieš kiekvieną eksperimentų seriją išvalyta celė būdavo testuojama su švariu vandeniu ir užrašomas jo suminis dažnio generacijos spektras. Pikų nebūvimas C – H srityje yra geras indikatorius, kad sistema švari, neužteršta jokiais organiniais

junginiais. Šiame darbe SDG metodas buvo pritaikytas skirtingo oligomerizacijos laipsnio $A\beta_{1-42}$ darinių analizei, sąlytyje vanduo/oras (plačiau žr. Rezultatų aptarimo dalyje, III skyriuje) (Niaura, Budvytyte R. ir kt., 2010).

2.5 Kiti papildomi metodai

Fluorescentinė mikroskopija

tBLM modifikavimo galimybė ir tiesioginis lipido apsikeitimo egzistavimas buvo analizuojamas fluorescentiniu mikroskopu, pažymint vezikules fluorescuojančiais fosfolipidais. Fluorescentinė mikroskopija atlikta su Carl Zeiss mikroskopu: AxioTech epifluorescentinio mikroskopo kombinacija su EM – CCD mod. C9100 video kamera (Hamamatsu Photonics, Herrsching, Vokietija). Vaizdinimui buvo naudojamas Zeiss vandens Achroplan (20 0.5 NA) objektyvas.

Dinaminės šviesos išbarstymas (DLS)

Suformuoti Dinaminės šviesos išbarstymo eksperimentai buvo atliekami su Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK) instrumentu, naudojant lazerio šaltinį su bangos ilgiu $\lambda = 633$ nm ir detektoriumi, kurio išbarstymo kampas yra $q = 173$ laipsniai. Dinaminės šviesos išbarstymo metodas matuoja dalelių išbarstytos šviesos fliuktacijos intensyvumą nuo laiko, pagal Brownio judėjimą. Ištikrųjų yra matuojamas ne dalelių dydis, o faktiškai yra matuojama difuzijos konstanta. Taigi yra sąryšis tarp difuzijos konstantos ir dalelės dydžio pagal Stokes-Einstein dėsnį (2.18 lygtis, 2.2 skyriuje).

Apskritiminis Dichroizmas

Apskritiminio dichroizmo (CD) spektrai buvo surinkti su Jasco J-810 spektropoliarimetru. Spektrai buvo užrašomi bangų diapozone nuo 185 iki 270 nm su rezoliucija 0,2 nm. Matavimams buvo naudojama 1cm kvarcinė kiuvetė su tefloniniu dangteliu. Skenavimo metu nustatytas greitis – 50 nm/s ir 4 s atsako laikas. Spektrų vertės buvo konvertuojamos į aminorūgščių elipsinius

vienetus ir duomenys buvo analizuojami naudojant CDPro programą, kuri naudoja trijų programų algoritmus CONTIN, CDSSTR ir SELCON3.

Infraraudonoji spektroskopija

Infraraudonuosius spektrus (IR) registravome FTIR spektrometru (Perkin-Elmer Spectrum GX) su DTGS detektoriumi. Spektrometro skiriamąją gebą parinkome – 4 cm^{-1} . Siekiant padidinti signalo/triukšmo santykį, buvo sudedama 50 interferogramų. Pralaidumo spektrus gavome naudodami CaF_2 langelį. Ant jo užlašindavome 60 μL tūrio tiriamos medžiagos lašą ir jį išdžiovindavome. Peptidų koncentracija buvo 10 arba 70 μM . Oligomerų vandeninių tirpalų pralaidumo spektrus registravome tarp dvejų CaF_2 langelių.

2.6 Medžiagos ir paruošimo protokolai

Prijuntų prie paviršiaus membranų formavimo medžiagos

Distiliuotas vanduo (vandens valymo sistema Milli-Q plus, JAV); **NaCl** – (FLUKA, Šveicarija); **$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$** , grynumas > 99% (FLUKA, Šveicarija); **Etanolis** – grynumas > 99,2%, grynintas Biochemijos instituto Bioelektrochemijos ir Biospektroskopijos skyriuje; **β – merkaptoetanolis (ME)** (Sigma Aldrich, Vokietija);

Inkariniai junginiai: 20-tetradeksiloksio-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontano-1-tiolas (sintetinis fosfocholino analogas (1,2-dimiristilo-3- $[\omega]$ -merkaptohexa (etileno oksido)] glicerolis), **WC14**); 29-heksadeksiloksio-3,6,9,12,15,18,21,24,27,31 dekaoksaheptatetrakontano-1 tiolis (sintetinis fosfocholino analogas, {1,2-dipalmitilo-3- $[\omega]$ -merkaptono (etileno oksido)] glicerolis, **FC16**); Z 20-(Z-oktadeko-9-eniloksio)- 3,6,9,12,15,18,22-heptaoksatetrakonto-31-eno-1-tiolis (**HC18**) – junginiai susintetinti dr. D. J. Vanderah grupėje (NIST, Marylandas, JAV).

Lipidai: 1,2-difitanoilo-*sn*-glicerolio-3-fosfocholinas (**DPhPC**); 1,2-dioleoil-*sn*-glicerolio-3-fosfocholino (**DOPC**) 2-oleoil-1-palmitoil-*sn*-glicerolio-3-fosfocholino (**POPC**); 1-oleoil-2-palmitoil-*sn*-glicerolio-3-fosfocholino (**OPPC**); 1,2-Dieikozonoil-*sn*-glicerolio-3-fosfocholinas (**DEcoPC**); 1,2-dioleoil-*sn*-glicerolio-3-fosfoetanolaminas (**DOPE**); Cholesterolis (**CHO**), Sfingomielinas (**SM**); Cerebrozidas (**CER**) (Avanti Polar Lipids, JAV); Neuronų membranos lipidinis ekstraktas – išskirtas iš žiurkių smegenėlių, kolegų iš LSMU, Biomedicininių tyrimų instituto.

Fluorescuojantys lipidai: 1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino-N-(lizamino rodamino B sulfonilas) (amonio druska) (**DOPE-LR**) – Sugertis/Emisija = 560/583 nm; 1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino-N-(7-nitro-2-1,3-benzoksadiazolio-4-ilas) (amonio druska). (**DOPE-NDB**) – Sugertis/Emisija 460/535 nm; 25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoksadiazoli-4-yl)metil]amino]-27-norcholesterolis (**CHO-NBD**) – Sugertis/Emisija 483/523 nm

Polietilenglikoliai (PEG) (Sigma Aldrich, Vokietija) – naudojami skirtingos molekulinės masės PEG: 100, 200, 400, 1000, 1500, 2000, 3400, 4000, 6000, 8000 ir 10000 buferiniai tirpalai, kuriuose PEG yra 15 %.

SAM tirpalai: ruošiami iš β ME ir inkarinių junginių (WC14, FC16, HC18), kuriuose moliniai tiolų santykiai tirpale: 3:7, 2:8, 8:2, o bendroji tiolų koncentracija yra 0,2 mM.

Silicio plokštelės, magnetroniškai dengtos 100 – 200 nm aukso sluosniu-garintinos Nacionaliniame Standartų ir Technologijos Institute, Gaitesburgas, MD, JAV arba Carnegie Mellon Universitete, Pitsburgas, PA, JAV).

Poras formuojantys toksinai

α -hemolizinas (α -HL) – išskirtas iš bakterijos *Staphylococcus aureus* (Sigma Aldrich, Vokietija). **Juodligės toksinas (PA_{63})** – gautas iš Dr. John J. Kasianowicz (Nacionalinis Standartų ir Technologijos institutas, NIST, Marilendas, JAV). **Vaginolizinas (VLY)** – gautas iš Dr. Aurelijos Žvirblienės, Vilniaus Universiteto Biotechnologijos instituto.

β -amiloido oligomerų ir fibrilių paruošimas

Toksinų amiloido oligomerų formavimui *in vitro* buvo naudojamas sintetinis $A\beta_{1-42}$ peptidas (American Peptide, Kalifornija JAV). Fluorescencijos koreliacijos spektroskopijos (FCS) eksperimentams, $A\beta_{1-42}$ oligomerų paruošimui buvo naudojama maža frakcija 0,2 mol % žymėtų $A\beta_{1-42}$ peptidų su HiLyte Fluor™ 555 (Anaspec, Kalifornija, USA). Oligomerai ir fibrilės buvo gaminami pagal aprašytą protokolą (Kayed ir kt., 2003). Šis protokolas buvo tikslinamas ir parenkamos tolimesniems tyrimams reikalingos sąlygos. Oligomerai ir fibrilės buvo ruošiami pagal protokolus, kurie smulkiai aprašomi mūsų paruoštame straipsnyje Cizas, Budvytyte ir kt., 2010. Pirmiausia 1 mg $A\beta_{1-42}$ tirpinamas 400 μ L HFIP (FLUKA, Vokietija) 30 – 60 min kambario temperatūroje, panaudojant sonikavimą. Vėliau 100 μ l drumsto tirpalas silikonizuotame mėgintuvėlyje, praskiedžiamas 900 μ L H_2O ir tirpalas maišomas sukuriniu judesiu (vorteksu) ir inkubuojamas 20 min kambario temperatūroje. Po inkubacijos pavyzdžiai centrifuguojami 15 min prie 12.000

rpm ir temperatūros 22 °C. Gautas supernatantas perkeliamas į naują silikonizuotą mėgintuvėlį ir išgarinamas HFIP. Tam, pavyzdys 1h laikomas traukos spintoje, atvirame mėgintuvėlyje. Likutinė HFIP koncentracija, budavo kontroliuojama FTIR spektruose pagal CH₃ juostos, ties 1192 cm, sumažėjimu (žr. Rezultatų aptarime). Tuomet pavyzdžiai inkubuojami termostatuojamoje vandens vonelėje 24 h prie 20 °C. Toks pagaminimo būdas, vadinamas *protokolu I*, tokiu būdu gaunami maži oligomerai. Didelių oligomerų, tipiška 4 – 10 nm dydžio, gamybai po centrifugacijos, supernatantas perkeliamas į nesilikonizuotą mėgintuvėlį ir siekiant pašalinti tam tikrą dalį HFIP prapučiamas 7 min silpna N₂ srove. Po prapūtimo, pavyzdys maišomas ant 500 rpm su teflonu dengta magnetine maišykle 24 h kambario temperatūroje. Šis būdas buvo pavadintas *protokolu II*. Fibrilės formuojamos pagal *protokolą III*, kurio metu vandeninis tirpalas po visiško HFIP pašalinimo (30 min N₂ srove) buvo inkubuojamas 7 dienas, kambario temperatūroje. Paruošti peptidų tirpalai buvo laikomi -20 °C temperatūroje.

Taip pat Aβ₁₋₄₂ oligomerai buvo gaminami pagal *NaOH protokolą*, aprašytą 2012 metais Lioudyn ir kitų, kurių gamyboje nenaudojamas HFIP, o kaip tirpiklis pasirinktas NaOH. 0,25 mg Aβ₁₋₄₂ peptidų ištirpinami 33 μL 100 mM NaOH tirpiklyje (taip, kad visas peptido kiekis būtų apsemtas), kurio pH 12 ir inkubuojamas 25 min kambario temperatūroje. Vėliau Aβ₁₋₄₂ tirpalas skiedžiamas su 800 μl su buferiu (100 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄), kurio pH 7,4 – 7,5 ir netrikdomai paliekamas kambario temperatūroje 48 valandas. Po oligomerizacijos laikomas 4 °C temperatūroje. Tokiu būdu suformuoti Aβ₁₋₄₂ oligomerai buvo panaudoti kai kuriems sąveikos su membranomis tyrimams.

Fluorescuojančių β-amiloido oligomerų paruošimas

Fluorescuojantys amiloidų dariniai, būtini fluorescencijos koreliacinės spektroskopijos (FCS) tyrimams buvo gauti panaudojant amiloido peptidų formavimo *in vitro* protokolus, panaudojant sintetinį Aβ₁₋₄₂ peptidą (American Peptide, JAV). FCS eksperimentams, Aβ₁₋₄₂ oligomerų paruošimui buvo naudojama maža frakcija 0,2 mol % žymėtų Aβ₁₋₄₂ peptidų su HiLyte Fluor™ 555 (Anaspec, Kalifornija, USA).

Lipidinių vezikulių paruošimas

Vezikulės buvo formuojamos naudojant įvairias fosfolipidų (DOPC, DOPS, DOPE) ir kitų lipidinių komponentų (cholesterolis, sfingomielinas, cerebrozidas) kompozicijas. Pirmiausia lipidai ištirpinami chloroforme (bendra koncentracija 10 mM). Chloroformas išgarinamas (vakuume ar N₂ srove) ir gautos lipidinės plėvelės ištirpinamos 1ml pentane, ir paliekamos per naktį iki pilno pentano išgaravimo. Gautos lipidinės plėvelės suspenduojamos 1ml NaCl, NaH₂PO₄, pH 7,5 buferyje ir inkubuojama 25 min kambario temperatūroje. Po inkubacijos tirpalas sonikuojamas 1 val. Po sonikavimo, norint gauti homogenišką vezikulių tirpalą, buvo naudojamas dalelių dydžio reguliuotojas (angl.: extruder, Avanti Polar Lipids, JAV). Buvo naudojamos membranos,

kurių porų dydis 100 nm. Tirpalas prastumiamas per membraną 21 kartą. Gautų vezikulių dydis ir homogeniškumas įvertinamas ir kontroliuojamas dinaminės šviesos sklaidos metodu.

3. DARBO REZULTATAI

I SKYRIUS. Dirbtinės prijungtos fosfolipidinės membranos: vystymas ir charakterizavimas

Įvadas

Paviršiuje imobilizuotos fosfolipidinės dvisluoksnės membranos (tBLM) yra plačiai tyrinėjamos, kaip stabilūs fosfolipidinės membranos modeliai įvairiems biologiškai svarbiems procesams tirti bei biosensorių kūrimui. Pagrindis šio darbo etapo tikslas – sukurti tBLM, kurių sudėtis ir biofizikinės, bei biocheminės savybės būtų artimos eukariotinių ląstelių, membranų savybėms. Pirmiausia, šiame skyriuje bus kalbama, apie tBLM susiformavimą ir charakterizavimą, pasitelkiant elektrinius parametrus, išskaičiuotus iš EIS spektrinių pokyčių, remiantis ekvivalentine elektrine grandine. Bus aptartos tBLM sukūrimo ir tobulinimo galimybės, panaudojant skirtingomis savybėmis pasižyminčius prikabinimo junginius (WC14, FC16, HC18), ir taip pat varijuojant tBLM fosfolipidų cheminę sudėtį. HC18 junginys, skirtingai nei kiti du, turi vieną po vieną dvigubą jungtį kiekvienoje grandinėje ir kaip matysime, pasižymi kitokiomis fizikinėmis savybėmis, nei sotieji junginiai.

tBLM modeliai yra kritiškai svarbūs struktūriniuose baltymų tyrimuose, bei jų sąveikos su membranomis tirti. Ne visi, dirbtinių membranų konstravimui, naudojami lipidai yra tirpūs etanolyje, todėl vienas centrinių šio darbo etapų būtų išvystyti technologijas, leidžiančias įterpti tokius lipidinius komponentus į membranas. Papildomai, fosfolipidinės membranos bus modifikuojamos, panaudojant tiesioginę sąveiką tarp vezikulių ir imobilizuotųjų membranų, tokiu būdu įterpiami žinomi kiekiai fosfolipdų. Lipidų apsiskeitimo galimybės, analizuojamos, pasitelkiant fluorescencijos spektroskopiją, elektrocheminio impedanso spektroskopiją ir dinaminės šviesos sklaidos metodą. Taip pat pavaizduotos galimybės, neuronų membraną imituojančios tBLM sukūrimui, panaudoti realius žiurkių smegenėlių neuronų lipidinius membranos ekstraktus.

Rezultatai ir jų aptarimas

1. tBLM savybių charakterizavimas

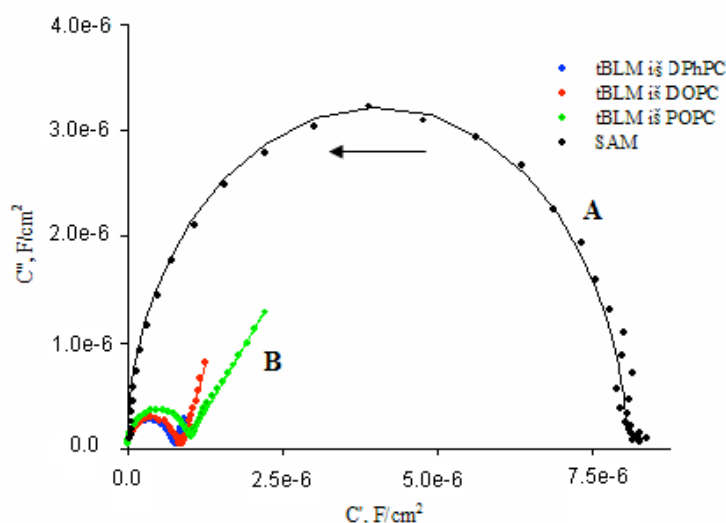
1.1 EIS spektriniai pokyčiai, formuojantis membranai

Tipiški EIS spektrai, atspindintys dvisluoksnės fosfolipidinės membranos formavimosi procesą ir atitinkamų elektrinių parametrų pokyčius, pavaizduoti I.1 paveiksle. Kreivės pateiktos Cole Cole, kompleksinės talpos koordinatėse, kurios patogios tiriant dielektrikų sistemų EIS spektrus (I.1 pav.). Pusapskritimių, kuriuos matome paveiksle, diametras yra proporcingas tiramojo elektrodo elektrinei talpai. Matome, kad ant savitvarkio mišraus monosluoksnio susiformavus dvisluoksnei membranai, pusapskritimio diametras sumažėja beveik 10 kartų nuo ~ 7 iki $\sim 0,7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Dielektrinio sluoksnio elektrinė talpa priklauso nuo dielektriko paviršiaus ploto, storio ir jo dielektrinės konstantos (2.9 lygtis). Susiformavus membranai, elektrodo paviršius, yra padengiamas papildomu maždaug 3 – 4 nm dielektriko sluoksniu, tai įrodo mūsų partnerio prof. M. Loesche (Carnegie Mellon University, JAV) ir mūsų grupės bendradarbių gauti reflektometriniai duomenys (McGillivray ir kt., 2007). Laikydami, jog fosfolipidinio sluoksnio alkanų (šiuo atveju DPhPC) dalies storis yra 3 nm, o santykinė dielektrinė skvarba atitinka sočiųjų angliavandenilių konstantą ($\epsilon = 2,1$), galime iš 2.9 lygties įvertinti, elektrinę talpą, kai elektrodo plotas $A = 0,32 \text{ cm}^2$. I.1 paveiksle gauta abscisės reikšmė yra $0,76 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, kurią vaizduoja DPhPC membranos EIS spektras, atitinkamai kitų fosfolipidų talpos vertės truputį didesnės (žr. Toliau).

Analizuojant stebėtus EIS spektrus nustatyta, jog elektrodo, padengto tik savitvarkiu WC14 ir β -merkaptioetanolio (santykiu 3:7) monosluoksniu, spektras gali būti modeliuojamas paprasta CPE – R nuoseklia elektrine ekvivalentine grandine. Tuo tarpu, dvisluoksnių membranų spektras, kaip matyti iš I.1 paveikslo B kreivių, pakinta ne tik kiekybiškai, bet ir kokybiškai, Cole – Cole spektruose žemų dažnių srityje atsiranda „uodegėlės“. Tokio spektro modeliavimui taikomas elektrinis ekvivalentinis modelis (EEM),

aprašytas plačiau 2.1.5 poskyryje (2.6 pav.). Paraleliniai šio modelio elementai atspindi natūralius tBLM defektus (skylutes). Kai defektų koncentracija membranoje maža, o patys defektai dideli, pvz. > 1000 nm, (Valincius ir kt., 2012), uodegėlių nuolinkio kampas Cole-Cole diagramoje artėja į 45° , o modeliuojant gaunamas CPE_{def} elemento laipsnio rodiklis $\alpha \rightarrow 0.5$. Nedidelio tankio maži defektai, pvz., < 100 nm, lemia statesnių ir trumpesnių „uodegėlių“ atsiradimą. Taikant EEK modelį tokiems spektrams, dažnai stebimos $\alpha < 0.5$ vertės. Didėjant defektų tankiui, Cole-Cole spektrų „uodegėlės“ pradeda augti, o EEK modelio CPE_{def} elemento $\alpha \rightarrow 1$. Taigi, iš pateiktų I.1 pav, kreivių, galim daryti prielaidą, jog naudojant WC14 molekulinį inkarą, defektiškiausios tBLM yra stebimos POPC fosfolipido atveju (žalia kreivė), o DPhPC fosfolipidas leidžia gauti mažiausiai defektų turinčias tBLM (mėlyna kreivė).



I.1 pav Savitvarkio monosluoksnio ir prijungtų lipidinių membranų talpos pokyčiai. **A** – EIS Cole Cole koordinatėse SAM (β -ME : WC14 = 7:3), talpos kreivė; **B** – tBLM (β -ME:WC14 = 7:3 + fosfolipidas) talpos kreivės. Mėlyna spalva pavaizduota tBLM suformuota iš fosfolipido – DPhPC, raudona – iš DOPC, žalia – iš POPC. Rodyklė rodo dažnio augimo kryptį. EIS spektro dažnių sritis nuo 0.5 iki 10^5 Hz.

1.2 Elektriniai tBLM parametrai

Detalesnė informacija apie įvairių fosfolipidų formuojamas tBLM savybes gauta, įvertinus elektrinius membranų parametrus. Parametrai skaičiuoti, panaudojant EEM (2.1 skyrius, 2.6 pav.). I.1 lentelėje yra pateikta šių parametrų suvestinė. Išskirtume keletą akivaizdžių tendencijų: membranų

talpos (CPE_{tBLM}) sekoje, $DPhPC < DOPC < DEcoPC < POPC < OPPC$ auga. Kadangi POPC (16:0-18:1 PC), OPPC (18:1-16:0 PC) ir ypač DEcoPC (20:1) alkanų (žemos dielektrinės skvarbos) dalies storis yra didesnis, negu DPhPC (4 metil- 10:0 PC), todėl CPE_{tBLM} kitimo negalime paaiškinti vien tik dielektriko storio kitimu šioje lipidų sekoje. Greičiausiai, šis talpos (CPE_{tBLM}) kitimas atspindi augančią santykinę dielektrinės konstantos vertę, kuria gali lemti membranų defektiškumas. Pavyzdžiui, tiek vandens molekulių įsiterpimas į defektų vietas, tiek skylutės, kuriose gali judėti jonai, turėtų didinti efektyvinę dielektriko santykinę skvarbą.

I.1 lentelė. tBLM, suformuotų iš skirtingų fosfolipidų ant SAM (β -ME : WC14 = 7:3), EIS spektrų elektriniai parametrai, gauti EIS spektrus pagal EEM (2.1 skyriaus, 2.6 pav). Fosfatinis buferinis tirpalas (pH 7,2), turintis 0,1 M NaCl.

Parametrai	Fosfolipidai				
	DPhPC	DOPC	EcoPC	POPC	OPPC
$CPE_{tBLM}, \mu F/cm^2$	0,79	0,85	0,93	1,10	1,18
α_{BLM}	0,982	0,979	0,975	0,951	0,906
$CPE_{def}, \mu F/cm^2$	4,72	5,78	6,25	8,81	8,84
α_{def}	0,549	0,649	0,662	0,928	0,947
$R_{def}, k\Omega \cdot cm^2$	1180	620	136	6,17	0,72
Modelio atitikimo kokybė, $\chi^2 \cdot 10^4$	2,41	4,67	2,56	1,43	4,78

Ši spėjimą patvirtina ir α_{tBLM} parametro reikšmių kitimas. Kuo labiau α_{tBLM} tolsta nuo vieneto tuo netvarkingesnė darosi struktūra. Šis parametras, kaip jau buvo minėta, atspindi savitvarkės struktūros tvarkingumo (defektiškumo) laipsnį. Kaip tik mažėjančios α_{tBLM} reikšmės rodo, jog lipidų sekoje: $DPhPC < DOPC < DEcoPC < POPC < OPPC$, dvisluoksnio defektiškumas žymiai išauga. Įdomiai kinta ir paralelinės grandinės parametrai, kuriems suprasti atlikta matematinė analizė (Valincius ir kt., 2012) parodė, kad didėjančios α_{def} parametro reikšmės, artėjančios į vienetą, kurias lydi ir CPE_{def} augimas gali būti paaiškinamas didėjančia elektrinio lauko skverbtimi po dielektriko sluoksniu ir tBLM struktūros netvarkingumu, defektų paviršinio tankio augimu. Mažėjančios defektų varžos (R_{def}) reikšmės atspindi didėjančių jonų srautą per dirbtinę membraną, taigi, patvirtina išvadą, jog sekoje $DPhPC <$

DOPC < DEcoPC < POPC < OPPC defektų tankis auga. Iš čia seka išvada, jog tomis pačiomis sąlygomis ne visi fosfolipidai yra tinkami gauti izoliuojančias, mažai defektų turinčias tBLM. DPhPC ir DOPC membranos pasižymi labai geromis elektrinėmis izoliacinėmis, tuo tarpu POPC ir ypač OPPC gaunamos su žymiai didesniu defektų tankiu.

1.3 tBLM stabilumo tyrimas

tBLM stabilumo tyrimui buvo pasirinktas fosfolipidas DOPC – tai simetrinis ir turintis po 1 nesočią jungtį abiejose alkanų grandinėse (18 : 1) ir pasižymintis žema fazinio virsmo temperatūra. Šio lipido pasirinkimą sąlygojo ir tai, jog su juo šiame darbe buvo atliekami dauguma β -amiloidų oligomerų sąveikos su fosfolipidinėmis membranomis tyrimai. Taigi, suformavus dvisluoksnes lipidines membranas ant aukso paviršiaus, naudojant DOPC fosfolipidą, buvo stebimas jų stabilumas, laike. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu, didelių (> 5 %) tBLM talpos (CPE_{tBLM}) pokyčių nebuvo detektuota net po 20 dienų (I.2 lentelė).

I.2 lentelė. Suformuotos imobilizuotos membranos (DOPC) ant SAM (β -ME : WC14 = 7:3), elektriniai parametrai, geriausiai modeliuojantys EIS spektrus, gauti atlikus matavimus pirmąją dieną, po 3 dienų, po 10 dienų ir po 20 dienų. Fosfatinis buferinis tirpalas (pH 7,2), turintis 0,1 M NaCl. Parametrų vertės normalizuotos į geometrinį Au elektrodo plotą.

Dienos	CPE_{tBLM} , $\mu F/cm^2$	α_{tBLM}	CPE_{def} , $\mu F/cm^2$	α_{def}	R_{def} , $k\Omega \cdot cm^2$
1 diena	0,84	0,9952	4,3	0,4633	32,96
Po 3 dienų	0,86	0,9857	5,49	0,4582	20,54
Po 10 dienų	0,87	0,9830	6,2	0,5878	18,05
Po 20 dienų	0,88	0,9829	7,53	0,6634	14,46

Vadinasi, dielektrinė membranos konstanta ir efektyvinis membranos storis laike, išlaikant pastovias aplinkos sąlygas, mažai kinta. Žymesnis pokytis atsiranda tik žemų dažnių srityje („uodegėlių“ nuoseklus didėjimas, duomenys neparodyti), susijusioje su membranoje esančiais (ir matyt su laiku daugėjančiais) natūraliais defektais. Tą patvirtina ir α_{def} parametro nuoseklus didėjimas (I.2 lentelė), bei mažėjanti likutinė membranos defektų varža (R_{def}). Tačiau reikia pastebėti, jog net ir mažiausios vertės stebėtos po 20 dienų yra

pakankamai aukštos ir netrukdo baltymų (peptidų) sąveikai su membranomis detektuoti. Tyrimas įrodo mūsų suformuotų membranų stabilumą ir ilgalaikiškumą.

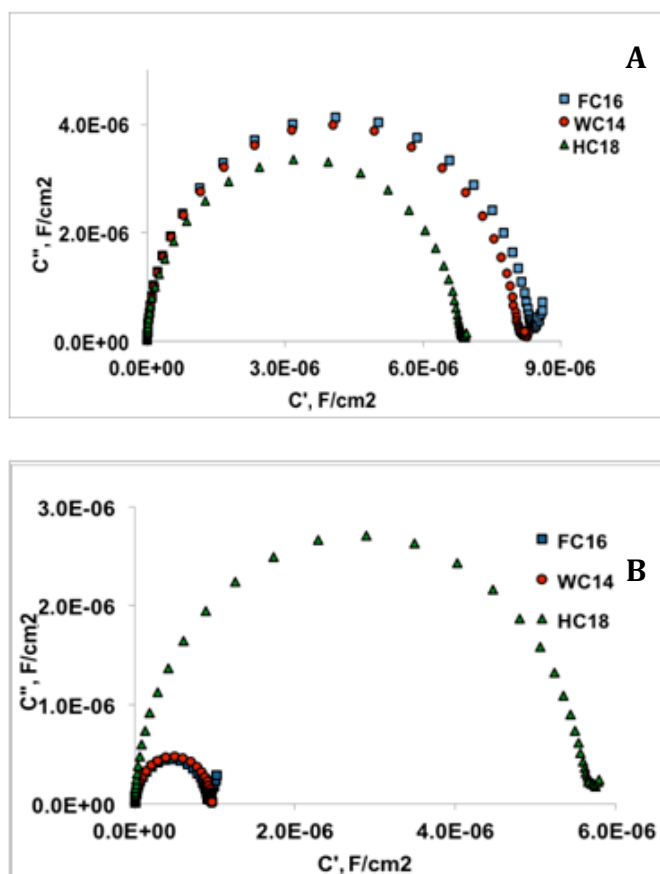
2. Inkarinių junginių įtaka tBLM savybėms

2.1 SAM talpų pokyčiai, priklausomai nuo inkaro prigimties ir jo koncentracijos

Savitvarkio monosluoksnio kokybė ir architektūra yra lemiamas faktorius funkcionalios ir kokybiškos tBLM suformavimui. Todėl SAM buvo formuojami, panaudojant skirtingas prikabinimo molekules: WC14, FC16 ir HC18, o kaip skiediklis naudojamas β -merkaptoetanolis. WC14 ir FC16 yra fosfocholino analogai, kurių abi hidrofobinės grandinės yra sočios, tuo tarpu HC18 junginyje, abiejose hidrofobinėse grandinėse yra po vieną nesočią jungtį.

Tyrimo metu buvo lyginami tos pačios paviršinės koncentracijos mišrūs monosluoksniai. Paprastai, ant kompaktiškų SAM, kuriuose praskiedimo ME molekulių kiekis yra mažas, galima suformuoti fosfolipidų viršsluoksnius, pasižyminčius labai didele varža. Tačiau tokios (dažnai vadinamos hibridinių membranų) sistemos kelia problemų įterpiant funkcionalius baltymus (Glazier ir kt., 2000). Tai, pirmiausia susiję su tuo, jog tarp fosfolipido sluoksnio ir kieto paviršiaus tokiose sistemose nėra vandens. Mūsų darbe, siekdami įsitikinti formuojamų membranų funkcionalumu, pasireiškiančių, pirmiausia, lengva baltymų rekonstitucija, inkarinių junginių koncentraciją inkubavimo tirpaluose keitėme plačiame intervale. Tokiu būdu, SAM formuojami iš mišrių, WC14 (HC18 ar FC16) ir ME, etanolinių tirpalų, varijuojant molinių jų santykiu nuo 0 iki 100%.

I.2 paveiksle pateikti skirtingų inkarinių junginių suformuotų monosluoksnių EIS spektrai, esant nedideliame, 30 %, (I.2 pav. **A**) ir dideliame, 70 %, atitinkamo inkarinio junginio kiekiui inkubavimo tirpaluose, (I.2 pav. **B**). Kaip matome I.2 A paveiksle, visų SAM, kai inkarinio junginio yra 30%, EI spektrų pusapskritimiai yra beveik tobuli.



I.2 pav. A – Skirtingų savitvarkių monosluoksnių talpos pokyčiai – Cole Cole koordinatėse. **A** – Mažo tankio savitvarkiai monosluoksniai, kuriuose inkarinių junginių koncentracija – 30 %. Trikampiais pavaizduota SAM, suformuoto iš HC18 : ME (30:70) talpos kreivė; Aspkritymais – SAM iš WC14 : ME (30:70) talpos kreivė; kvadratais – SAM iš FC16 : ME (30:70) talpos kreivė.

B – Didelio tankio savitvarkiai monosluoksniai, kuriuose inkarinių junginių koncentracija – 70 %. Trikampiais pavaizduota SAM, suformuoto iš HC18 : ME (70:30) talpos kreivė; Aspkritymais – SAM iš WC14 : ME (70:30) talpos kreivė; kvadratais – SAM iš FC16 : ME (70:30) talpos kreivė.

Įprastai nesočiojo HC18 junginio mišriųjų 30 % SAM atveju EI spektro pusapskritimis yra mažesnis, taigi galima manyti, jog šio junginio formuojamų SAM elektrinė talpa mažesnė, negu sočiųjų analogų. Tą patvirtina ir modeliavimo rezultatai, gauti pritaikius anksčiau minėtą ekvivalentinį SAM modelį (I.3 lentelė). Kaip matome, apskaičiuota talpos vertė, HC18 atveju, ($6,92 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) yra mažesnė lyginant su kitų SAM talpomis (FC16 = $8,93 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, WC14 = $8,57 \mu\text{F}/\text{cm}^2$), o paviršiaus heterogeniškumą atspindinčio α_{tBLM} parametro reikšmės kinta nedaug, ir yra panašios visiems inkariniams

junginiams. nors ir čia stebime, šiek tiek didesnes HC18 SAM vertes $\alpha_{tBLM} = 0,992$. tBLM, suformuotų ant 30 % tirpalų SAM, naudojant fosfolipidą DOPC, talpos (CPE_{tBLM}) yra artimos ir siekia apie $0,86 \mu F/cm^2$ (I.3 lentelė). Tai rodo, kad imobilizuotos tBLM ant mažo paviršinio tankio inkarų yra panašių dielektrinių savybių, kurias, pirmiausia, lemia pats fosfolipidas.

Kaip matėme, nedidelės koncentracijos (30 %) HC18 ir ME junginiai formuoja mišrius SAM, kurių talpos yra šiek tiek mažesnės, nei sočiųjų analogų, tačiau esant dideliems HC18: bME santykiams, situacija pasikeičia. Pavyzdžiui, kai inkarinio junginio yra 70 % (I.2 pav., B), EIS spektruose stebimi žymiai ryškesni skirtumai. Sočiųjų analogų, WC14 ir FC16 SAM impedanso spektrai, susitraukia į mažus, maždaug $1 \mu F/cm^2$ pusapskritimus, tuo tarpu SAM, suformuoto iš HC18, EIS spektras išlieka didelis, ir dydžiu viršija analogų spektrus bent 6 kartus. (I.2 pav. B).

Sočiųjų inkarinių junginių WC14 ir FC16 atvejais talpos, išskaičiuotos modeliavimo keliu (I.3 lentelė), rodo, kad ant paviršiaus, esant 70 % inkaro, formuojasi “kieti”, kompaktiški dielektriko sluoksniai, savo savybėmis panašūs į savitvarkius monosluoksnius, kuriuos formuoja sotieji ilgesnės grandinės ($n > 12$) alkanų tioliai (nuoroda). Tuo tarpu didelio tankio, 70 %, SAM iš HC18 talpa išlieka beveik šešis kartus didesnė ($\sim 5,9 \mu F/cm^2$) (I.2 pav. B ir I.3 lentelė). Tai rodo, jog struktūriškai didelio tankio HC18 SAM yra kitokie, nei sotieji analogai, ir matyt, pasižymi gerokai didesniu hidratacijos laipsniu.

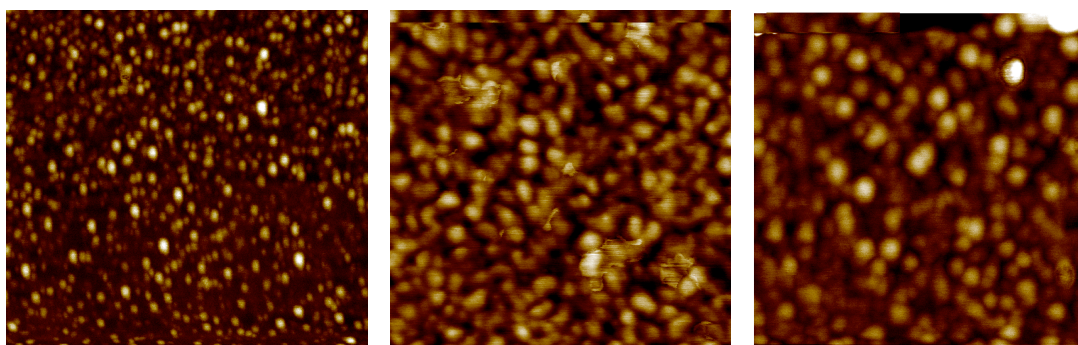
I.3 lentelė. Įvairių SAM ir ant jų suformuotų tBLM iš DOPC, EIS spektrų elektriniai talpų parametrai, varijuojant inkarinio junginio kompozicijos su ME molinį santykį. Fosfatinis buferinis tirpalas (pH 7,2), turintis 0,1 M NaCl. Parametrų vertės normalizuotos į geometrinį Au elektrodo plotą.

<i>Inkarinis junginys</i>	$CPE_{SAM}, \mu F/cm^2$	α_{SAM}	$CPE_{tBLM}, \mu F/cm^2$	α_{tBLM}
	<i>SAM</i>		<i>tBLM, DOPC</i>	
<i>WC14 30 %</i>	$8,61 \pm 0,544$	$0,9864 \pm 0,009$	$0,89 \pm 0,075$	$0,9867 \pm 0,003$
<i>FC16 30 %</i>	$8,90 \pm 0,290$	$0,9882 \pm 0,003$	$0,87 \pm 0,045$	$0,9818 \pm 0,002$
<i>HC18 30 %</i>	$6,92 \pm 0,047$	$0,992 \pm 0,002$	$0,84 \pm 0,016$	$0,9909 \pm 0,002$
<i>WC14 70 %</i>	$1,00 \pm 0,032$	$0,9958 \pm 0,002$	$0,65 \pm 0,007$	$0,9984 \pm 0,001$
<i>FC16 70 %</i>	$0,93 \pm 0,014$	$0,9931 \pm 0,005$	$0,62 \pm 0,024$	$0,9970 \pm 0,001$
<i>HC18 70 %</i>	$5,89 \pm 0,164$	$0,9934 \pm 0,002$	$0,80 \pm 0,047$	$0,9952 \pm 0,002$

Suformavus membraną ant tankių SAM iš WC14 ar FC16, matome (I.3 lentelė), kad membranos talpa (CPE_{tBLM}) sumažėja iki $\sim 0,6 \mu F/cm^2$. tBLM, kurių talpa yra tokia maža, paprastai pasižymi itin didelia varža, tačiau fosfolipidų judrumas joje yra labai mažas (žiūrėti toliau šiame poskyryje). Savo savybėmis šie dvisluoksniai, panašūs į hibridines fosfolipidų membranas [Glazier ir kt., 2000] todėl nėra tinkami baltymų įterpimui į dvisluoksnį (žr.toliau). Tuo tarpu, HC18 inkarinis junginys, esant didelėms junginio santykinėms koncentracijoms ($> 70 \%$) formuoja $\sim 0,8 \mu F/cm^2$ talpos tBLM ($\alpha_{tBLM} > 0.99$), tačiau, priešingai nei sočiųjų analogų atveju, fosfolipidų molekulės bilsuoksnyje išleika judrios (žiūrėti toliau šiame poskyryje) ir tinkamos baltymų funkcionaliam įterpimui.

2.2 Mišrių SAM charakterizavimas atominės jėgos mikroskopu

Pavyzdžio pagrindas – magnetronu užgarintos aukso plėvelės (storis 50 – 100 nm) ant Si plokštelės (Silicon, Inc, JAV) su chromo pasluoksniu (storis 1 – 2 nm). Pirmiausia toks pagrindas buvo charakterizuojamas AJM, tam kad įvertinti Au plėvelės morfologiją ir šiurkštumo faktorių. AJM pagalba gautas topografinis Au plėvelės paviršiaus AJM vaizdas (I.3 pav. A). AJM vaizdas pavaizduotas $1 \times 1 \mu m$ skenavimo lauke, pagal x, y. Gauta Au plėvelės morfologija, pasižymi homogeniškumu (I.3 pav., A), kurios vidutinė nuokrypio, z ašies kryptimi, nuo paviršiaus (toliau naudosime trumpinį – RMS) vertė yra $1,1 \pm 0,5 \text{ nm}$. Ši vertė iš esmės sutampa su rentgeno spindulių reflektometru nustatytu, analogiškai gautos Au plėvelės RMS paviršiaus šiurkštumu – 5 \AA (McGillivray ir kt., 2007). Tuo tarpu matomų kristalitų lateralinis dydis yra apie $40 \pm 5 \text{ nm}$. Žinoma, turime atsižvelgti į tai, jog lateralinis dalelių dydis, nėra tikslus, jis yra veikiamas adatėlės diametro, skenavimo metu (Ramirez-Aguilar ir Rowlen, 1998). Charakterizuotas Au pagrindas toliau buvo modifikuojamas mišriais savitvarkiais monosluoksniais iš β -merkaptioetanolio ir WC14, HC18 moliniu santykiu 3:7,. Suformuoti SAM buvo vaizdinami AJM (I.3 pav., B, C),

**A****B****C**

I.3 pav. Topografiniai Au ir SAM AJM vaizdai. **A.** Au topografinis vaizdas, kurio nelygumai pagal z koordinatę ~ 1nm. **B.** SAM (HC18: ME, 3:7) topografinis vaizdas, kurio nelygumai ~1.3 nm pagal z. **C** – SAM (WC14 : ME, 3:7) topografinis vaizdas kuriame paviršiaus nelygumai ~ 1.8 nm. AJM pavaizduotų topografinių vaizdų skenavimo laukas: A – 1.0x1.0 μm, B ir C – 500 nm x 500 nm, x – y. SAM koncentracija buvo 0,2 nM.

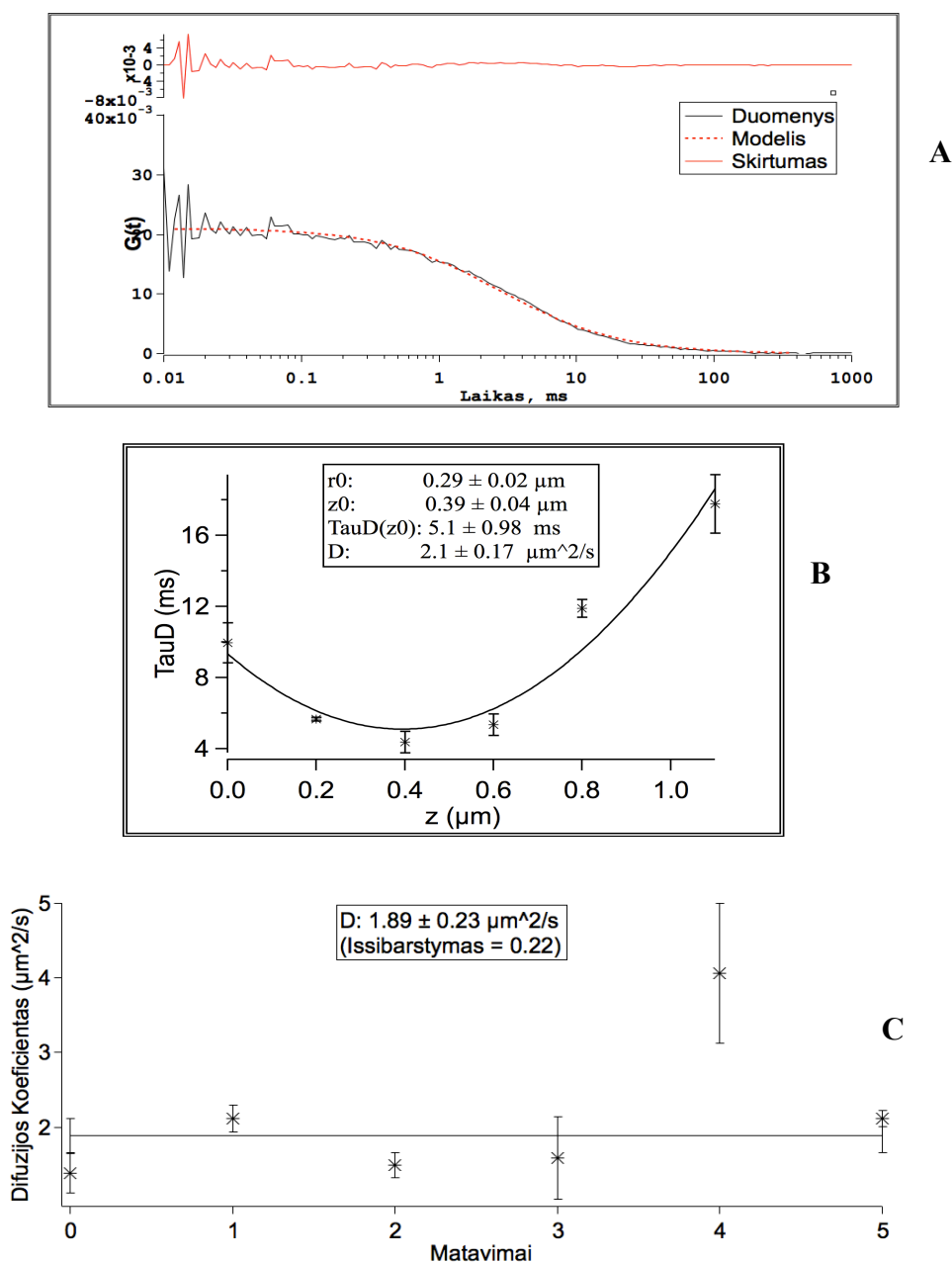
Gauti vaizdai beveik nesiskiria savo morfologija. Savitvarkių HC18 monosluoksnių nelygumų vidutinė vertė yra $1,36 \pm 0,3$ nm, o šių nelygumų vidutinis lateralinis skersmuo 37 ± 6 nm. Tuo tarpu WC14 monosluoksnių, nelygumų vidutinė vertė yra $1,76 \pm 25$ nm, o lateralinis skersmuo 42 ± 3 nm.

Matomas paviršiaus nelygumų išaugimas sekoje: Au < HC18 < WC14. Stebimo nelygumų dydžio kitimo negalime paaiškinti ir su alkanų (dielektrinės) dalies storio kitimu, nes HC18 molekulės hidrofobinė grandinė yra ilgesnė, nei WC14 molekulės. Greičiausiai, šis kitimas rodo kitokią, molekulinę HC18 savitvarkio monosluoksniu architektūrą, kurioje, pagal paskutinius, RAIRS (atspindžio – sugerties IR spektroskopijos), duomenis HC18 molekulės guli išilgai Au paviršiaus, tuo tarpu WC14 pradeda anksti formuoti stačias struktūras. Tuo tarpu nelygumų plotis, įvertinus paklaidas, išlieka pastovus ir nepriklauso nuo junginio prigimties. Tai parodo, kad laterališkai, drastiškų pakitimų neaptinkama, arba jie yra per maži, ir neįmanoma jų detektuoti AJM metodu su naudotomis standartinėmis adatėlėmis.

2.3 Fosfolipidų dinamikos tyrimai dvisluksnyje

Baltymų ir lipidų judrumas priklauso nuo membranos takumo. Nuo membranos takumo priklauso cheminių reakcijų (elektronų pernašos ir kt.) greičiai, baltyminių struktūrų susirinkimas. Membranos takumui sumažėjus, slopinama medžiagų pernaša ir membraninių baltymų funkcijos ir fermentų aktyvumas. Membranos takumas priklauso nuo lipidų išsidėstymo membranoje, cheminės membranos sudėties ir temperatūros (Mildažienė ir kt., 2004). Kaip matome, norint, kad vyktų funkcionali membraninių baltymų – lipidų sąveika dirbtinėmis sąlygomis, reikia turėti tinkamą pagrindą šios sąveikos detekcijai. Mūsų atveju – tai imobilizuota fosfolipidinė membrana pasižyminti reikiama architektūra ir takumu. Skirtingi inkariniai junginiai, kurie prijungia dvisluksnį prie paviršiaus, turi įtakos tBLM struktūrai ir fizikinėms jų savybėms, ko pasekoje gali keistis ir lipidų – baltymų sąveikos ypatumai. Tuo tikslu, buvo suformuotos didelio ir mažo tankio tBLM, panaudojus mišrius monosluoksnius iš β -merkaptoetanolio ir WC14, FC16 ir HC18, skirtingais moliniais santykiais inkubaciniame tirpale (3:7, 7:3), buvo analizuojamos FCS metodu. Šis metodas remiasi koreliacijos laiku matavimais kurie, pritaikius FCS 2D modelį (2.3 skyrius, 2.15 lygtis), leidžia įvertinti fosfolipidų judrumą membranoje ir membranos fosfolipidų, esančių vidiniame ir išoriniuose membranų sluoksniuose ir žymėtų fluorescencine žyme, vidutinį difuzijos koeficientą.

Reprezentatyvūs FCS spektras, vaizduojantis savaiminės autokoreliacijos funkciją ir z skenevimą ir difuzijos koeficiento vertes, gautas atžvelgiant į kiekvieno matavimo paklaidą, pavaizduoti I.4 paveiksle. Išskaičiuoti ir apibendrinti difuzijos koeficientai pateikti I.4 lentelėje. Šiuose matavimuose fluorescentinės žymės yra abiejuose membranų sluoksniuose, bet galimas daiktas, kad išoriniame sluoksnyje dažo koncentracija bus didesnė, nei vidiniame membranų sluoksnyje. Šiame darbe pateiktos bendros (svertinis vidurkis), abiejų membranų monosluoksnių, difuzijos koeficiento vertės.



I.4 pav. Tankios prijungtos dvisluoksnės membranos (β -ME:WC14 = 3:7 ir DOPC) 2D FCS matavimais z skenavimas. Abu fosfolipidiniai sluoksniai membranoje žymėti su LR-DOPE 0,003 mol %. **A.** FCS matavimo individuali tBLM autokoreliacijos kreivė, sumodeliuota pritaikius 2D modelį (2.15 lygtis). **B.** 6 FCS matavimų serija, Gausinis matavimų pasiskirstymas, kurių metu, lazerio spindulys fokusuojamas kas 300 nm statmenčiai į membraną, išilgai z ašiai. Kiekvienas matavimas buvo apskaičiuotas naudojant tą pačią, A paveiksle, pavaizduotą procedūrą. Paklaidos buvo nustatytos pritaikant Levenberg–Marquardt lygtį (Shenoy ir kt., 2010). **C.** Šešių nepriklausomų (vienas iš jų pavaizduotas **B** paveiksle), z skenavimo matavimų rezultatai, pavaizduoti, įvertinus kiekvieno matavimo duotas paklaidas. Gautas bendras tBLM, kurioje inkarinio WC14 junginio yra 70 %, žymėto fosfolipido difuzijos koeficientas: $D = 1,89 \pm 0,23 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Didelio tankio tBLM buvo ruošiamos ant SAM iš WC14, FC16 ir HC18, kuriose inkarinio junginio buvo 70 %, ir kiekvienu atveju elektrocheminio impedanso metodu buvo nustatomos elektrinės membranų savybės, kurios aprašytos anksčiau (I.3 lentelė). I.4 paveikslas vaizduoja tankios, prijungtos prie paviršiaus, dvisluoksnės membranos (β -ME:WC14 = 3:7 ir DOPC) 2D FCS eksperimentinė krevė pavaizduota ištisine juoda linija. I.4 paveiksle modelinė autokoreliacijos kreivė, gauta pritaikius 2D modelį (2.15 lygtis), yra pavaizduota raudona punktyrine linija. Kaip matome, modelis gerai atitinka eksperimentiškai stebėtą kreivę, o skirtumas tarp jų, neviršija 10% (raudona ištisinė kreivė). Vieno eksperimento metu išmatuotas difuzijos laikas τ_D , negali būti panaudotas tiksliai difuzijos konstantos nustatymui, nes dvisluoksnis nebūtinai patenka tiksliai į detekcijos plokštumą, todėl eksperimentinė lazerio ir dvisluoksnės membranos susikirtimo sritis: $A_{\text{spind}} = \pi \cdot r^2$ tiksliai nėra žinoma. Dėl šios priežasties buvo atliekama serija r_0 ir τ_D matavimų, skenuojant pavyzdį pagal z ašį (Bend ir kt., 2003, Shenoy ir kt., 2010). I.4 B paveiksle pavaizduotos sumodeliuotos τ_D reikšmės, gautos iš 7 matavimų, matuojant kas 300 nm išilgai z ašiai. Z skenavimo vertės išsidėsto Gausiška funkcija, kurią aproksimavus antro laipsnio polinomie lygtimi, gauta $r_0 = 0,29 \mu\text{m}$, o $\tau_D = 5.1 \text{ ms}$, o apskaičiuotas difuzijos koeficientas $D = 2,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Duomenų atsikartojimui ir statistiniam patikimumui buvo atlikti šešių, nepriklausomai paruoštų, tBLM matavimai (I.4 pav. C).

Įvertinus kiekvieno matavimo paklaidas, apskaičiuotas bendrasis žymėtų fosfolipidų difuzijos koeficientas tBLM (β -ME:WC14 = 3:7 ir DOPC): $D = 1,89 \pm 0,23 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Tokiu pačiu principu buvo išmatuotos ir kitos tBLM, suformuotos iš 70 % FC16 ir HC18 (Duomenys apibendrinti I.4 lentelėje). Didelio tankio tBLM, suformuotų iš HC18 (70 %), fosfolipidų paviršinės difuzijos koeficientų vertės yra $> 4 \mu\text{m}^2/\text{s}$, o difuzijos koeficientai, tBLM, suformuotuose ant sočiųjų inkarinių junginių, WC14 ir FC16 yra $< 2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (I.4 lentelė). Tai rodo, jog fosfolipidų paviršinis mobilumas, ir matyt viso dvisluoksnio judrumas stipriai priklauso nuo inkarinių junginių prigimties. Sotieji WC14 ir FC16 formuoja

žymiai kietesnes tBLM, kurios paviršinis fosfolipidų mobilumas žymiai mažesnis, nei HC18 pagrindu gautuose tBLM.

I.4 lentelė. Fosfolipidų judrumas didelio tankio (70 % inkarinio junginio) ir mažo tankio (30 % inkarinio junginio) fosfolipidinėse membranose.

<i>Inkaras</i>	<i>2D Difuzijos koeficientas, D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)</i>
HC18 70 %	$4,03 \pm 0,21$ ($n = 6$)
FC16 70 %	$1,6 \pm 0,16$ ($n = 5$)
WC14 70 %	$1,9 \pm 0,18$ ($n = 6$)
HC18 30 %	$6,2 \pm 0,46$ ($n=7$)
FC16 30 %*	$4,1 \pm 0,1$
WC14 30 %*	$3,6 \pm 0,2$

* Siddharth Shenoy, et. al., 2010.

Mažo tankio tBLM, suformuotą iš HC18 (30 %), difuzijos koeficientas siekia $6,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ir yra didesnis nei WC14 ir FC16, kurių pagrindu suformuotą tBLM, difuzijos koeficientus nustatė mūsų kolegės iš JAV (Shenoy ir kt., 2010) (I.4 lentelė). Nustatytas fosfolipidų tBLM judris yra palyginamas su laisvai judančių lipidų judriu vezikulėse $7,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Przybylo ir kt., 2006), kas rodo, kad HC18 pagrindas yra labai takus ir tinkamas membranų modelių gavimui. Netgi tankios tBLM atveju, kai HC18 koncentracija 70 %, viršutiniojo ir vidinio sluoksnio lipidai pasižymi aukštu judriu, ir matyt, yra tinkami funkciniam baltymų įterpimui ir jų savybių tyrimui.

Apibendrinant galime teigti, jog inkarinių molekulių savybės turi įtakos membranos dinaminėms ir izoliacinėms (elektrinėms) savybėms. Nustatėme, jog dvisluoksnių, suformuotų ant mažo (30 %) ir didelio tankio (70 %) HC18 SAM, fosfolipidų judrumas yra daugiau nei du kartus didesnis, nei tBLM, suformuotose ant WC14 ir FC16 SAM, be to HC18 pagalba prijungtų fosfolipidų dvisluoksnių elektrinės savybės, nenusileidžia analogiškiems dvisluoksniams, gautiems ant WC14 ir FC16. Priešingai nei WC14 ir FC16, 70 % HC18 SAM gali būti panaudoti paviršiuje prijungtų dvisluoksnių formavimui, kurie savo fizikomechaninėmis ir elektrinėmis savybėmis yra panašūs į ant mažo tankio suformuotus dvisluoksnius. Todėl nesočiausias alkenų grandinės, turinčio HC18 junginio panaudojimas, turi pastebimų privalumų, lyginant su panašios sudėties sočiaisiais analogais.

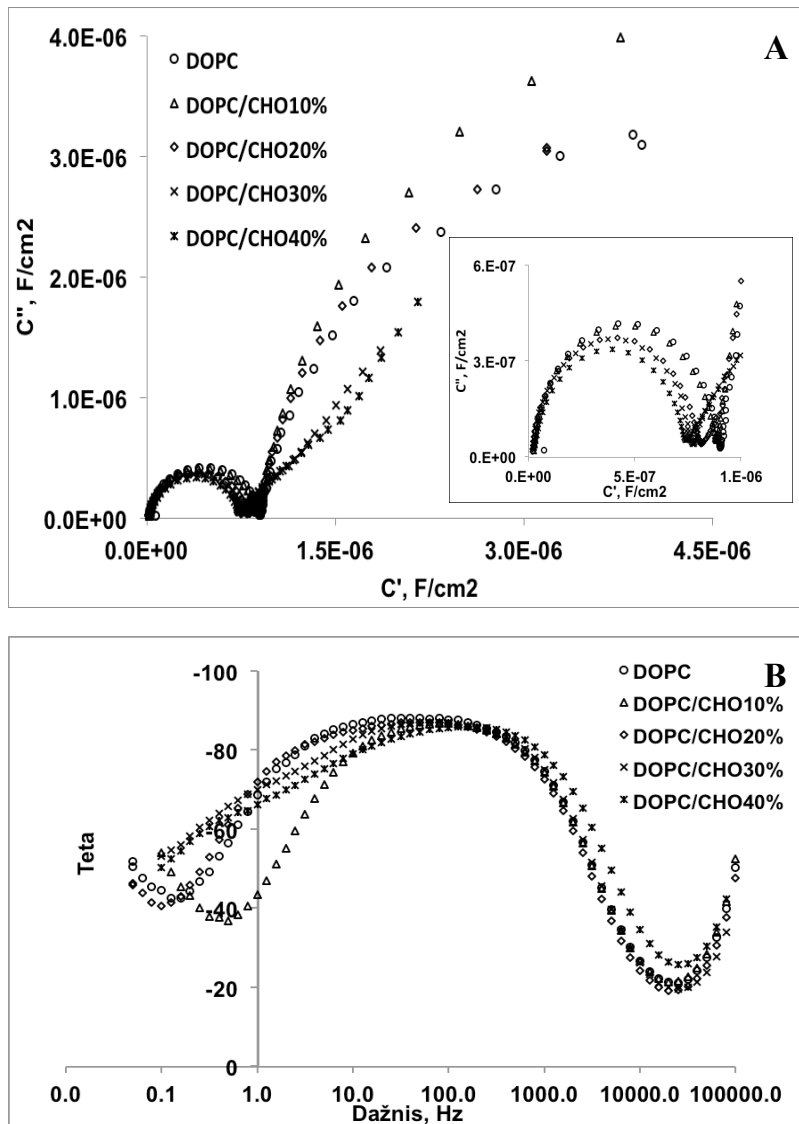
3. tBLM modifikavimas vezikulių liejimosi metodu

Tikroviškos aplinkos sukūrimui yra būtinas fiziologiškai artimos tBLM išvystymas. Daugiakomponenčiai membraniniai modeliai, turintys lipidinių plaustų domenų, turėtų pagilinti supratimą kaip baltymai ar peptidai sąveikauja su membrana ir kaip sąveikauja su kitomis lipidinių plaustų biomolekulėmis. Daugelis fiziologinių lipidų, tokių kaip: sfingomielinas, fosfotidiletanolaminas, cerebrozidas ir kt., yra menkai tirpūs etanolyje, todėl jų įvedimui į membraną, reikalingi alternatyvūs metodai. Vienu atveju buvo ieškoma tinkamų tirpiklių lipidiniams komponentams ir tokiu būdu, tirpiklio pakeitimo metodu, optimizuojant tBLM kompoziciją, panaudojami įvairūs fosfolipidiniai komponentai (5 ar net 7 lipidiniai komponentai (šie duomenys bus pristatyti 4 skyriuje). Šiame skyriuje aprašytas metodas, leidžiantis suformuoti tBLM modifikuoti vezikulių liejimosi metodu. Metodas remiasi tiesioginiu lipido apsikeitimu tarp vezikulės ir membranos (Basañe, 2002, Kuntze ir kt., 2009, Jahn and Südhof, 1999).

3.1 Cholesterolio įtaka tBLM elektrinėms savybėms

Iš pradžių panagrinėsime cholesterolio turinčias tBLM sistemas, sukonstruotas tirpiklio pakeitimo metodu. Elektrinės tokių membranų savybės buvo tirtos EIS metodu. I.5 A paveiksle atidėtos fosfolipidinės membranos Cole Cole koordinatės, vaizduojančios talpos priklausomybę nuo cholesterolio koncentracijos membranoje. Kompleksinės talpos koordinatėse (I.5 pav. A), po cholesterolio (30 %, 40 %) įsiterpimo matomas ryškus kompleksinės talpos sumažėjimas žemų dažnių srityje, pasireiškiantis spektrų žemo dažnio „uodegėlių“ mažėjimu. Jis signalizuoja apie žymų membranos laidumo sumažėjimą, kurį sietume su cholesterolio įsiterpimu į membraną. Po cholesterolio įvedimo, taip pat matomas ryškus talpos pusapskritimio skersmens sumažėjimas aukštų dažnių srityje (I.5 pav. A), taigi stebimas cholesterolio įsiterpimas į membraną, padidina fosfolipidinio sluoksnio dielektrinę konstantą arba efektyvųjį dvisluoksnio storį ir sumažina membranos

laidį. Įdomu yra tai, kad mažėja ne tik pusapskritimo diametras, bet ir keičiasi pačio spektro, dažnių diapozone nuo 100 Hz iki 0.1 Hz, nuolinio kampo (I.5 pav. A ir Įklija).



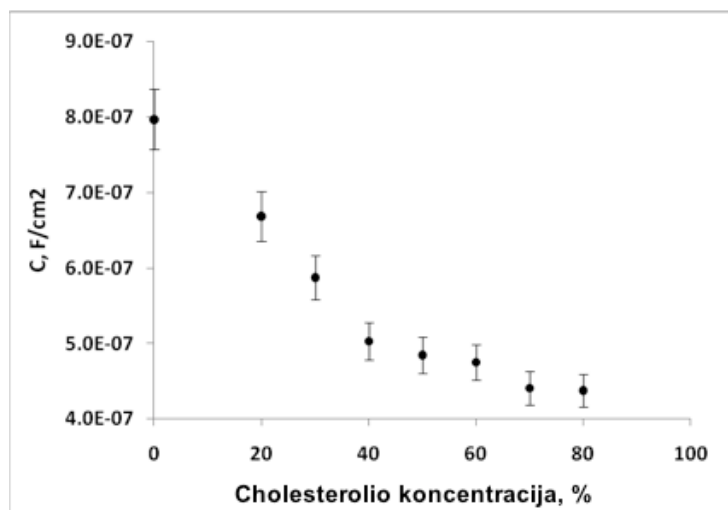
I.5 pav. A. tBLM suformuotos iš FC16:bME (3:7 mol:mol) EIS spektrų Cole Cole koordinatės, talpos priklausomybė nuo cholesterolio koncentracijos, kur: be cholesterolio (apskritimai); 10 % cholesterolio (trikampiai); 20 % cholesterolio (rombai); 30 % cholesterolio (žvaigždutės); 40 % cholesterolio (kryžiukai). (Įklija) Padidintas, talpos srities, vaizdas.

B. tBLM suformuotos iš FC16:bME (3:7 mol:mol) EIS spektrų Bode koordinatės, talpos priklausomybė nuo cholesterolio koncentracijos, kur: be cholesterolio (apskritimai); 10 % cholesterolio (trikampiai); 20 % cholesterolio (rombai); 30 % cholesterolio (žvaigždutės); 40 % cholesterolio (kryžiukai).

EIS spektrų matematinė analizė, parodė, jog tokie spektriniai pokyčiai gali būti siejami su skirtingo dydžio klasterių buvimu membranoje (Valincius ir kt., 2011). Didelio tankio, tačiau mažo dydžio (pvz. 5 – 100 nm) defektų, EIS spektras pasižymi dideliu nuolinkio kampu, tuo tarpu dominuojant paviršiuje dideliems (>1000 nm) defektams, kurių tankis nedidelis, nuolinkio kampo tangentas spektro žemų dažnių intervale mažėja ir artėja į 1 (Valincius ir kt., 2012). Eksperimentiniai duomenys (I.5 pav. **A**), rodo, kad tokia kitimo tendencija gaunama didėjant cholesterolio kiekiui membranose, todėl galime hipotetiškai tvirtinti, jog stebimi kokybiniai spektrų pokyčiai signalizuoja apie defektų sričių, kuriuose dominuoja cholesterolis, lateralinio dydžio augimu, gal būt ir cholesterolio klasterių (lipidinių plaustų) formavimąsi.

Šie pokyčiai dera ir su pokyčiais stebimais Bode koordinatėse, vaizduojančiose fazės priklausomybę nuo dažnio (I.5 pav. **B**). Žemų dažnių srityje tBLM, be cholesterolio, spektras fazinėje diagramoje turi išreikštą fazės ekstremumą ties 0,5 Hz, atitinkantį tBLM laidumo reikšmę $7 \cdot 10^{-6} \text{ S/cm}^2$, kuri parodo foninį dirbtinės membranos laidumą. Fazės minimumo padėtis, kaip matome iš I.5 B paveikslo, kinta priklausomai nuo cholesterolio koncentracijos ir stumiasi į žemesnių dažnių pusę, o prie didesnių cholesterolio koncentracijų (30 % ir 40 %) visai išnyksta (I.5 pav. B). Tokie EIS spektrų pokyčiai rodo, kad įvedant į membraną didesnius cholesterolio kiekius, didėja membranos izoliacinės savybės. Šios dalies pokyčiai (kaip jau buvo rašyta anksčiau), susiję su stipriai išaugusia R_{def} varža, kuri atspindi membranos elektrinio laidumo sumažėjimą, o tai sietina su cholesterolio atėjimu ir įsiterpimu į membraną.

Iš tBLM talpos priklausomybės nuo cholesterolio koncentracijos (I.6 pav.), matome, kad, iki cholesterolio koncentracija membranoje pasiekia 30 %, ji staigiai krenta. Toliau didinat cholesterolio koncentraciją, talpos mažėjimas pastebimai sulėtėja. Literatūroje yra fluorescentinės mikroskopijos duomenų, kad liposomos, paruoštos iš lipidų kompozicijos: DOPC/DOPE/cholesterolio (35/35/30), yra heterogeniškos ir sudarytos iš skystos netvarkingos fazės (L_{α} fazė) ir skystos tvarkingos fazės (L_{β} , lipidiniai domenai) (Vestergaard ir kt., 2008).



I.6 pav. Fosfolipidinės membranos talpos priklausomybė nuo cholesterolio koncentracijos membranoje.

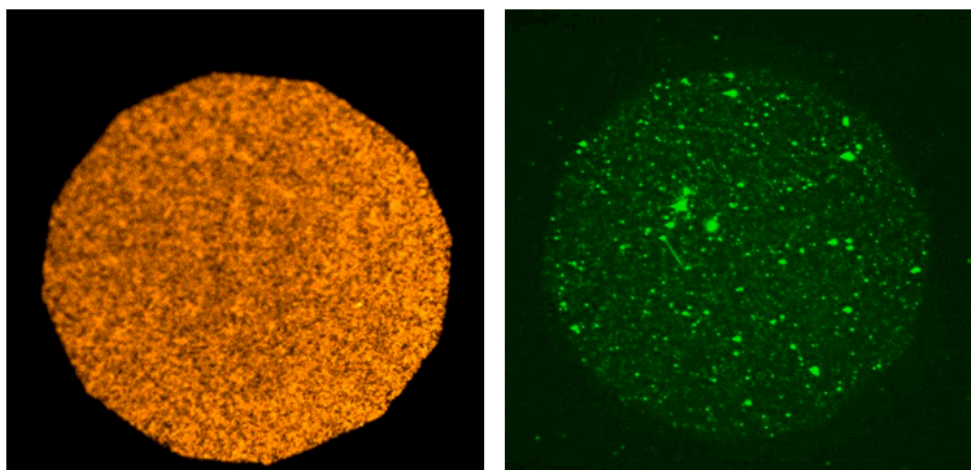
Cholesterolio koncentracijos diapozone nuo 0 % iki 80 %, detektuojamas bendras talpos pokyčio sumažėjimas net ~ 44 %. (I.6 pav A). Yra žinoma, kad plazminėje membranoje, ar jų modeliuose, formuojantis lipidiniams plaustams, stebimas membranos sustorėjimas (Vestergaard ir kt., 2008) CPE_{tBLM} pokytis, kuris bendru atveju gali būti indukuotas tiek membranos sustorėjimu, tiek dielektrinės skvarbos sumžėjimu, šiuo atveju siejamas su fosfolipidinio dvisluoksni storio pokyčiu, kas rodo lipidinių plaustų formavimąsi.

3.2 Lipidų ir cholesterolio pernešimo tyrimai fluorescentiniu mikroskopu

Nors staigaus tirpiklio pakeitimo metodas leidžia formuoti , tBLM, tačiau, šiuo metodu yra sudėtinga reguliuoti membranos lipidinę sudėtį, ypač, kai naudojame kelių rūšių lipidų mišinius, ypač tuo atveju, kai mišinyje yra etanolyje ribotai tirpstantis fosfolipidas. Todėl pasirinkta alternatyva, bei pabandyta etanolyje netirpius lipidus ir kitus membraninius komponentus kontroliuojamai įvesti į fosfolipidines membranas, panaudojant tiesioginę sąveiką tarp vezikulių ir imobilizuotųjų membranų.

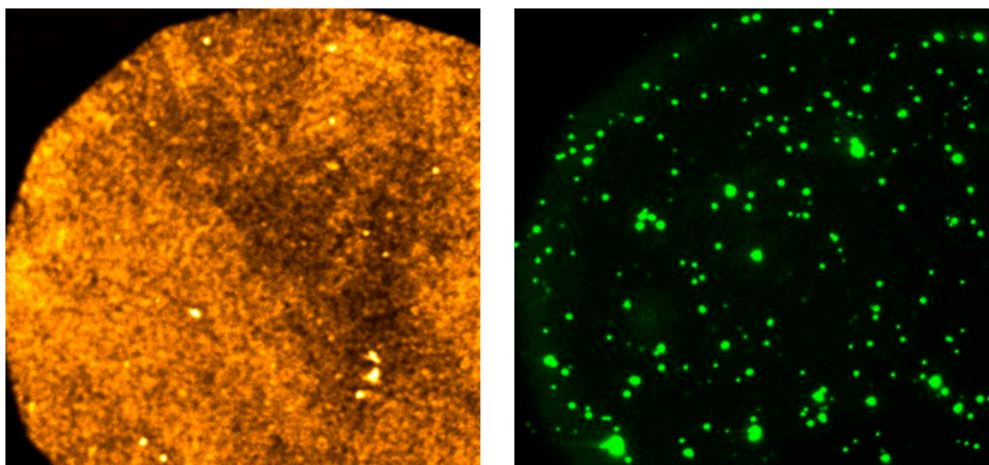
Pirmiausia, monokomponentė tBLM suformuota įprastu tirpiklio pakeitimo būdu iš etanolyje gerai tirpaus fosfolipido DOPC. Tokia tBLM buvo veikiamą DOPC/CHO30% vezikulėmis, žymėtomis LR-DOPE ir tokios pat sudėties

vezikulėms, bet fluoresceniškai žymėtomis CHO-NDB. Pirmuoju atveju, vezikulės turėjo fluoresceniškai pažymėtą fosfolipidą, antruoju – cholesterolį. Šie eksperimentai turi dvejopą tikslą. Pirmą, patikrinti, ar iš vezikulės į plokščią paviršių gali būti pernešamas fosfolipidas, antra, ar galima, sterolių, mūsų atveju, cholesterolio pernaša. Abiejų eksperimentų rezultatai pavaizduoti I.7 paveiksle. Kaip jau buvo aprašyta 1 skyriuje, tBLM paruoštos tirpiklio pakeitimo metodu, pasižymi tolygiu dvisluoksio formavimusi (Shenoy ir kt., 2010) ir geromis izoliacinėmis savybėmis. Po tBLM sąveikos su vezikulėmis, turinčiomis žymėtą fosfolipidą, akivaizdi ne tik LR-DOPE pernaša į membraną, bet ir stebimas homogeniškas, tolygiai šviečiantis mikroskopo regos laukas (I.7 pav. kairėje). Iš čia seka išvada, jog tos pačios hidrofobinės dalies (šiuo atveju dioleilo) fosfolipidas ne tik pernešamas iš vezikulės į plokščią dvisluoksnį, bet ir tolygiai pasiskirsto jame. Kitu atveju, po modifikavimo, stebime gana heterogenišką švytinčių dalių pasiskirstymą (I.7 pav. Dešinėje). Taigi, cholesterolio pernašos metu, gauname heterogenišką cholesterolio pasiskirstymą. Matomos cholesterolio sankaupos (didesni fluorescuojantys taškai) gali būti požymis, jog cholesterolis dvisluoksnyje agreguoja į submikroninio arba mikroninio dydžio agregatus.



I.7 pav. Modifikuotos tBLM po liejimosi su žymėtomis vezikulėmis (DOPC/CHO 30 %). **(Kairėje)** tBLM suformuota iš HC18/bME (30 : 70) ir DOPC po liejimosi su DOPC/CHO30% vezikulėmis, žymėtomis LR-DOPE. Bendroji dažo koncentracija 0.5 mol % . **(Dešinėje)** tBLM suformuota iš HC18/bME (30 : 70) ir DOPC po liejimosi su DOPC/CHOL30% vezikulėmis, žymėtomis CHOL-NDB. Objektyvas: 20X, matymo lauko diametras 250 μm.

Siekiant patikrinti, ar skirtingi lipidiniai komponentai, vezikulių liejimosi metu, gali būti pernešami į membraną vienu metu, buvo vykdomas tBLM modifikavimas DOPC/CHO30% vezikulėmis, žymėtomis, dviem skirtingais fluorescuojančiais lipidais, tiek LR-DOPE, tiek CHO-NDB. I.8 paveiksle pavaizduotas vienalaikis lipidų pernešimas iš donoro, vezikulės, į akceptorius, prie paviršiaus prijungtą fosfolipidinę membraną, stebimas matavimo laukas 2x didesnis, nei prieš tai aprašytame eksperimente (I.8 pav.). Matavimo metu, fluorescuojantys vaizdai gauti, keičiant registruojančius šviesos filtrus. Vienu atveju galėjome stebėti lizamino rodamino emisiją (ties 583 nm), atsirandančią dėl LR-DOPE pernešimo į membraną (I.8 pav. Kairėje). Kitu atveju filtras buvo suderintas stebėti NDB emisiją (523 nm), atsirandančią dėl cholesterolio pernešimo į membraną (I.8 pav. Dešinėje).



I.8 pav. Vienalaikis lipidų pernešimas iš donoro, DOPC/CHO30% vezikulių, žymėto fluorescuojančiais lipidais: LR-DOPE ir CHO-NDB į prie paviršiaus prijungtas fosfolipidines membranas. Pavaizduoti tBLM fluorescuojantys vaizdai po modifikavimo vezikulėmis. **(Kairėje)** – DOPC pernešimas. **(Dešinėje)** – cholesterolio pernešimas. Objektyvas 50X, matymo lauko diametras: 120 μm .

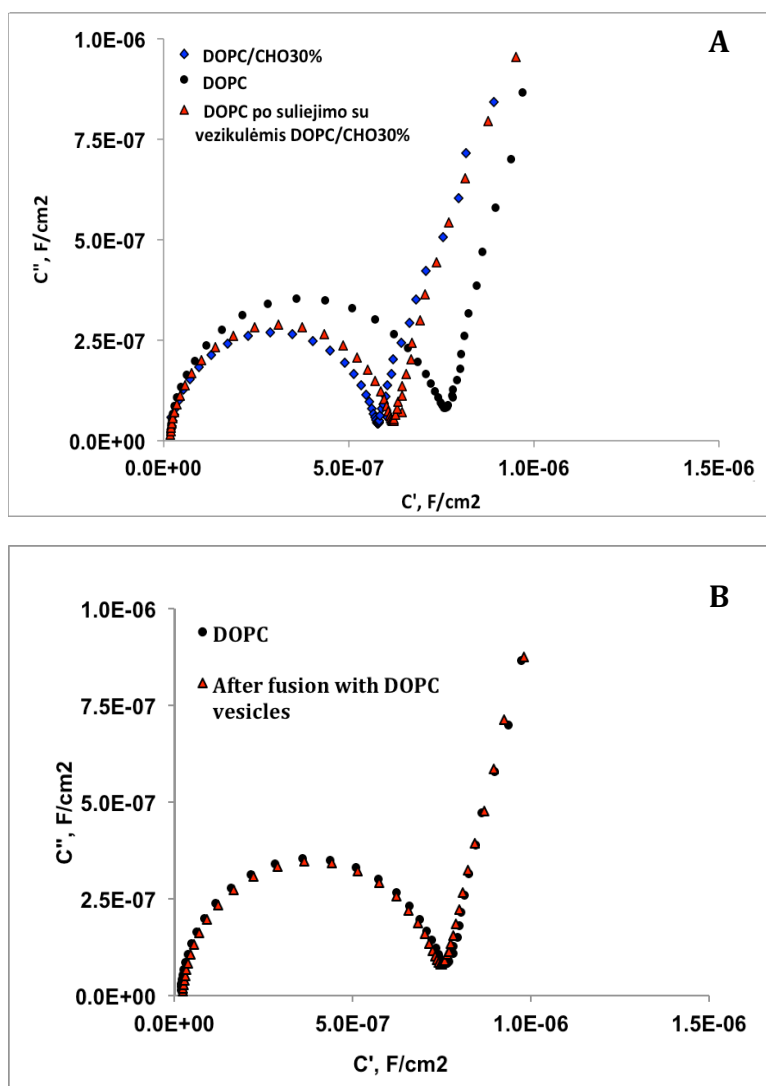
Iš I.8 pav. pateiktų duomenų akivaizdu, jog abu fluorofuorais žymėti komponentai vienu metu pernešami į tBLM. Tačiau LR-DOPE atveju (8A pav) matome, kad membrana modifikuojama homogeniškai ir LR-DOPE pasiskirsto skystoje, L_{α} membranos, fazėje. Tuo tarpu cholesterolis pernešamas sankaupomis, kurios spėjame sudaro L_{β} fazę (stebimas heterogeniškai švytintis laukas, I.8 pav. Dešinėje) arba sankaupos susiformuoja jau patekus

cholesteroliui į lipidinę aplinką. Gautas rezultatas parodė, kad tiek fosfolipidai, tiek cholesterolis, liejimosi metu, vienu metu yra pernešami į tBLM.

3.3 tBLM elektrinės talpos kitimas – modifikavimo metu

Tiesioginio lipido apsikeitimo tarp vezikulės ir membranos egzistavimas ir galimybės taip pat buvo analizuojamos EIS metodu, tiriant suformuotos tBLM talpą, laidumą, defektiškumo laipsnį. Buvo ieškoma koreliacijos tarp gauto tBLM optinio homogeniškumo, ar heterogeniškumo ir EIS spektrų, elektrinių parametrų.

I.9 paveiksle patekti skirtingais metodais suformuotų ir modifikuotų tBLM EIS spektrai, Cole Cole koordinatėse, kuriose atvaizduojamos talpinės membranos savybės. Analizuojant stebėtus EIS spektrus (I.9 pav. A) nustatyta, jog membranos, suformuotos iš DOPC/CHO (7:3) lipidų mišinio panaudojant tirpiklio pakeitimo metodą, talpa paprastai yra 10 – 25 % mažesnė lyginant su membranos talpa, kuri tuo pačiu būdu suformuota, tik naudojant fosfolipidą DOPC. Spektuose matomas, susiformavusios tBLM, kurios sudėtyje yra 30 % cholesterolio, mažesnis pusapskritimo diametras. Po vezikulių DOPC/CHO (7:3) sąveikos su membrana (modifikavimo metodas) (I.9 A, spektras – raudoni simboliai), tBLM talpa sumažėja iki 20 %, kas patvirtina, kad vezikulėse esantis cholesterolis keliauja į tBLM t.y. vyksta lipido pernešimas iš vezikulės į membraną. Šis rezultatas gerai koreliuoja su fluorescentiniais matavimais (3.2 skyrius), kuriuose po modifikacijos vezikulėmis, turinčiomis cholesterolio, stebimas cholesterolio pernešimas sankaupomis. Tuo tarpu elektrocheminis matavimas parodė, kad cholesterolio atėjimas į membraną, sumažina tBLM talpą (I.9 pav., I.5 lentelė).



I.9 pav. Prijungtų dvisluoksnių lipidinių membranų suformuotų ant SAMs: HC18:ME (3:7 mol:mol) tirpiklio pakeitimo ir vezikulių suliejimo metodais, EIS spektrai, talpos koordinatėse. **A.** Mėlyna pavaizduota tBLM, suformuota tirpiklio pakeitimo metodu naudojant fosfolipidų mišinį DOPC/CHO 30 %, Juoda – tBLM suformuota tirpiklio pakeitimo metodu iš DOPC. Raudona – tBLM iš DOPC, modifikuota vezikulių liejimosi – apsikeitimo metodu naudojant DOPC/CHO (70:30) vezikules. **B.** Juoda – tirpiklio pakeitimu suformuota DOPC tBLM. Raudona – Modifikuota DOPC membrana, po modifikacijos DOPC vezikulėmis.

Norint nustatyti, ar po modifikavimo, su tos pačios prigimties fosfolipidu, iš kurio ir suformuota membrana, fosfolipidinės membranos elektrinės savybės kinta ar išlieka nepakitusios, tam buvo atliekamas DOPC vezikulių liejimas su tBLM (I.9 pav **B**). Šiuo atveju membranos elektrinės savybės po modifikacijos beveik nepasikeitė (I.5 lentelė). Elektriniai talpos

parametrai, modeliuojantys EIS spektrus (I.9 pav. **A ir B**) pateikti I.5 lentelėje. Parametras CPE_{tBLM} , modeliuojantis talpines membranos savybes, leidžia įvertinti, tiek pirminės membranos, tiek ir membranos po modifikacijos dielektrines savybes. Matome, kad tirpiklio pakeitimu suformuotos tBLM iš DOPC, talpa yra $0,84 \mu F/cm^2$, o po vezikulių, turinčių 30 % cholesterolio, sąveikos su membrana talpa sumažėjo iki $0,69 \mu F/cm^2$, taigi, talpos pokytis, beveik sutampa su tirpiklio pakeitimu būdu suformuotos membranos talpa, kurios sudėtyje taip pat yra 30 % cholesterolio, CPE_{tBLM} parametru.

Tuo tarpu po modifikacijos DOPC vezikulėmis, tBLM talap beveik nekinta ir siekia $0,81 \mu F/cm^2$. Suformavus tBLM tirpiklio pakeitimu metodu, bet naudojant lipidų mišinį, kuriame taip pat 30 % sudaro cholesterolis, gauname tBLM talpos reikšmę – $0,61 \mu F/cm^2$, jau palyginamą su po modifikavimo gauta membranos talpa. Tokie rezultatai patvirtino cholesterolio pernešimą į prijungtą dvisluoksnę membraną. Pernešimo metu arba formuojamos cholesterolio sankaupos (lipidiniai plauštai), arba cholesterolis pakeičia dielektrinę tBLM konstantą, todėl keičiasi talpa.

Eksperimentas demonstruoja, jog parametras CPE_{tBLM} ir jo eksponentė gali būti panaudota membranų sąveikos su vezikulėmis, charakterizavimui, bei tBLM modifikavimo analizei.

I.5 Lentelė. tBLMs iš DOPC elektriniai parametrai, geriausiai modeliuojantys EIS spektrus pavaizduotus I.6 paveiksle, prieš ir po modifikavimo vezikulių liejimosi metodu. Parametrų vertės gerai palyginamos su tBLM, suformuotos iš DOPC/CHO30 tirpiklio pakeitimo metodu, vertėmis. Parametrų vertės normalizuotos į geometrinį Au elektrodo plotą.

<i>EIS parametrai</i>	<i>tBLM</i>	<i>Po modifikacijos vezikulių liejimosi metodu</i>	<i>Tirpiklio pakeitimo metodu</i>
	DOPC	DOPC	
$CPE, \mu F/cm^2$	$0,84 \pm 0,02$	$0,81 \pm 0,03$	
α_{tBLM}	0,9762	0,9751	
	DOPC	DOPC/CHOL30	DOPC/CHOL30
$CPE, \mu F/cm^2$	$0,84 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,02$
α_{tBLM}	0,9762	0,9897	0,9904

3.4 Vezikulių dydžio įvertinimas po sąveikos su tBLM

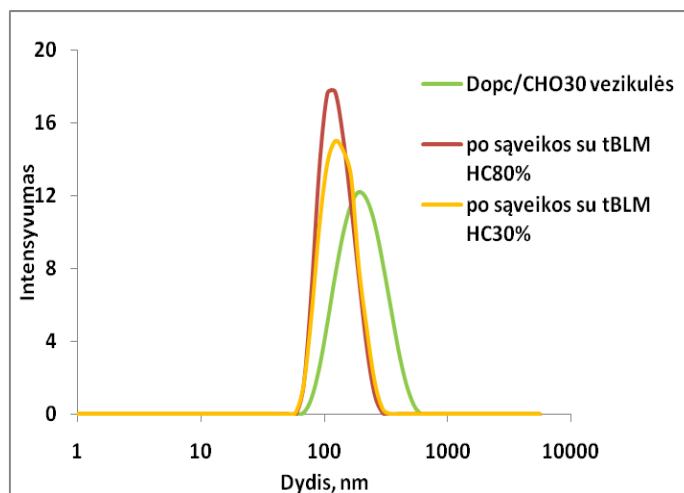
Įprastai vezikulių dydžio analizė ir polidispersiškumas įvertinamas dinaminės šviesos sklaidos (DLS) metodu. Gauta vidutinė dydžio reikšmė yra interpretuojama priimant, kad vezikulės yra sferinės dalelės. Įvairių kompozicijų vezikulių dydžiai tirpale buvo nustatyti DLS metodu, o difuzijos koeficientai FCS metodu, pritaikius savaiminės koreliacijos 3D modelį tūryje (2.13 lygtis). Gauti duomenys pateikti I.6 lentelėje. Lentelės, antrame stulpelyje, vezikulių dydis yra tiesiogiai išmatuotas dinaminės šviesos sklaidos metodu, o trečiame stulpelyje, vezikulių dydis yra paskaičiuotas iš Stokes–Einstein lygties, panaudojus FCS metodu, išmatuotą difuzijos koeficientą. Gautas įdomus rezultatas, įrodantis ekperimento tikslumą, nes panaudojus du atskirus metodus, gauname sutampančius vezikulių dydžio rezultatus. Šis rezultatas parodo, kad nors vezikulių populiacija ir yra polidispersiška, bet FCS matavimo metu gautas difuzijos laikas atspindi tikrąją populiaciją (Middleton ir Rhoades, 2010). Taigi, matavimuose naudojamų vezikulių, suformuotų iš fosfolipido DOPC, dydis ~120 nm, o vezikulių, kurių sudėtyje buvo 30 % cholesterolio, išmatuotas dydis ~ 130 nm. Vezikulės, turinčios cholesterolio, yra didesnio diametro ir pasižymi lėtesne difuzija, dėl didelio savo kreivumo spindulio, kuris priklauso nuo esančio cholesterolio. Neuronų membranos lipidinio ekstrakto vezikulių difuzijos koeficientas jau didesnis, atitinkamai ir dydis – mažesnis, lyginant su kitomis sintetinėmis vezikulėmis, paruoštomis tomis pačiomis sąlygomis (I.6 lentelė).

I.6 lentelė. Įvairių vezikulių dydis nustatytas DLS metodu, o difuzijos koeficientas gautas FCS metodu pritaikius 3D modelį.

<i>Vezikulės</i>	<i>Difuzijos koeficientas, $\mu\text{m}^2/\text{s}$</i>	<i>Dydis iš DLS, nm</i>	<i>Dydis iš FCS, nm</i>
<i>DOPC</i>	20,27 ± 2,42	119	118
<i>DOPC/CHO30%</i>	17,64 ± 2,13	136	130
<i>Neuronų lipidinio Ektrakto*</i>	24,74 ± 2,02	89	86,7

* Žiurkių smegenėlių neuronų ekstraktai buvo išskirti LSMU, Biomedicinių tyrimų institute. Šios vezikulės, buvo panaudotos fiziologinės membranos modelių kūrimui (bus aprašyta 4.3 poskyryje).

DLS metodas buvo panaudotas tam, kad įvertinti vezikulių morfologines savybes po sąveikos su tBLM. I.10 paveiksle matome, kad po sąveikos su tBLM stebimas vezikulių dydžio pasikeitimas – mažėjimas.



I.10 pav. Vezikulių, suformuotų iš DOPC/CHO 30 %, pasiskirstymas pagal dydį prieš ir po sąveikos, DLS metodu. Žalia kreivė – DOPC/CHO30% vezikulių dydis prieš sąveiką su tBLM; Orandžinė – po sąveikos su mažo tankio tBLM iš DOPC (kurioje SAM: HC18:ME, 2:8); Raudona – po sąveikos su didelio tankio tBLM iš DOPC (kurioje SAM: HC18:ME, 8:2).

Vezikulėms sąveikaujant su didelio tankio tBLM (HC18 80 %), dydis sumažėjo nuo 213 nm iki 139 nm, o sąveikaujant su mažo tankio tBLM (HC18 30 %) dydis sumažėjo iki 158 nm. Dydžio pasikeitimo, kol kas negalime logiškai paaiškinti, spėjame, kad tai galėtų atsitikti, dėl vezikulės kreivumo spindulio pasikeitimo, kai cholesterolis iš jų išeina. Tokios teorijos prieštarauja logikai, kadangi vezikulių liejimo eksperimento eigoje, visuomet naudojamas vezikulių pertekius, todėl reikalingi papildomi tyrimai.

4. Daugiakomponentės lipidinės membranos

Šiame darbe daugiausia eksperimentų atlikta su monokomponentėmis tBLM, suformuotomis iš paprastų, vienos rūšies fosfolipidų ir buvo detektuota jų sąveika su $A\beta_{1-42}$ oligomerais (rezultatai bus pateikti III skyriuje, Valincius ir kt., 2008) ir poras formuojančiais toksinais – α -HL ir PA63 (rezultatai II skyriuje, McGillivray and Valincius G ir kt., 2009).

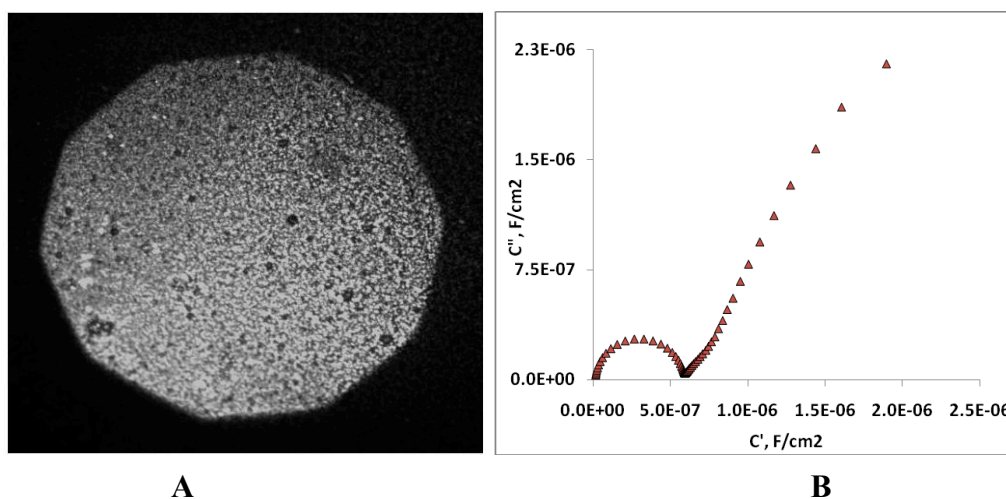
Šiame etape bus bandoma sukurti daugiakomponentes dirbtines neuronus imituojančias, ant kieto paviršiaus prijungtas dvisluoksnes lipidines sistemas, membranų modelius, panaudojant skirtingus fosfolipidinius komponentus (7 ar net 8 lipidiniai komponentai), kurių lipidų moliniai santykiai membranoje būtų fiziologiškai artimi neuronų ir glijų membranose sutinkamus santykius (Hamberger ir Svennerholm, 1971, Well ir kt., 1995). Suformuotos naujos, smegenų ląstelių membranas imituojančios (tBLM) sistemos buvo vaizdinamos fuorescentiniu mikroskopu ir analizuojamos EIS metodu, ištiriant jų elektrines savybes: suformuotos tBLM talpą, defektiškumo laipsnį ir laidumą. Optimizuojant tBLM kompoziciją, buvo bandoma įterpti į ją skirtingais santykiais lipidų: sočiųjų ir nesočiųjų fosfatidilcholinų, fosfatidilserinų, fosfatidiletanolaminų, sfingomielinų, cerebrozidų ir sterolių, reikiamas proporcijas.

4.1 Neuronų membraną imituojanti tBLM

Siekiant sustiprinti peptidų – $A\beta_{1-42}$ oligomerų (atitinkamai kitais atvejais, poras formuojančių toksinų – VLY) poveikį imobilizuotoms dvisluoksnioms membranoms ir priartinti *in vitro* sąlygas prie natūralių membranų, buvo kuriamos neuronus imituojančios membranos, kurių lipidų moliniai santykiai membranoje būtų artimi fiziologiškai membranose sutinkamus santykius. Ne visi tokių dirbtinių membranų konstravimui naudoti lipidai buvo tirpūs etanolyje, todėl buvo parenkami ir optimizuojami specialūs tirpiklių mišiniai, kurie leistų naudoti tirpiklio pakeitimo metodą sudėtingų daugiakomponenčių membranų sistemų gavimui.

Šiame etape buvo sėkmingai sukurtos imobilizuotos dvisluoksniės lipidinės membranos iš 5 lipidinių komponentų, turinčių svariausią indėlį neuronų membranos sudėčiai ir labiausiai turinčių įtakos $A\beta_{1-42}$ peptidų sąveikai su neuronų membrana. Kuriant neuronus imituojančių membranų modelį buvo pasirinkti fiziologiškai artimi lipidų moliniai santykiai: $[PE]/[PC] = 0,3$; $[CHO]/[fosfolipidai] = 0,36$; $[SM]/[visi fosfolipidai] = 0,05$,

[CS]/[visi fosfolipidai] = 0,03 (Hamberger and L. Svennerholm, 1971, Wells ir kt., 1995). Suformuotų, daugiakomponenčių (DOPC/DOPE/Chol/SM/CS, su 0,1% fluorescuojančiu DOPE) membranų fluorescencinės nuotraukos pavaizduotos I.11 A pav. Fluorescencijos nuotrauka vaizduoja, pakankamai homogenišką dvisluoksnį, bet joje matyti tamsių dėmelių (skylių), ir jos tolygiai pasklidusios po visą plotą. Toks rezultatas verčia daryti prielaidą, kad daugiakomponentės lipidinės sistemos formuoja skirtingos dielektrinės skvarbos domenų, ar saleles, kurių atsiradimą lemia cholesterolis ir jo mišiniai su sfingomielinu ir cerebrozidu. Fiziologinėse membranose būtent šie komponentai formuoja lipidinius plaustus. Gauti rezultatai gerai koreliavo su elektrocheminiais matavimais, kurie buvo atliekami ant to paties formavimo gautų, daugiakomponenčių lipidinių membranų.



I.11 pav. tBLM, suformuotos fluorescentinis vaizdas ir EIS talpos spektras. **A.** tBLM suformuota iš FC16/bME (30:70) ir (DOPC/DOPE/SM/chol/Cer), buvo žymėta LR-DOPE. Bendroji dažo koncentracija – 0,05 mol %. Nuotraukos matymo laukas yra 250 μm . **B.** Suformuotos daugiakomponentės tBLM EIS spektras. EIS spektro dažnių sritis nuo 0,1 iki 10^5 Hz. Abiem atvejais, pavaizduoti rezultatai yra to paties bandinio.

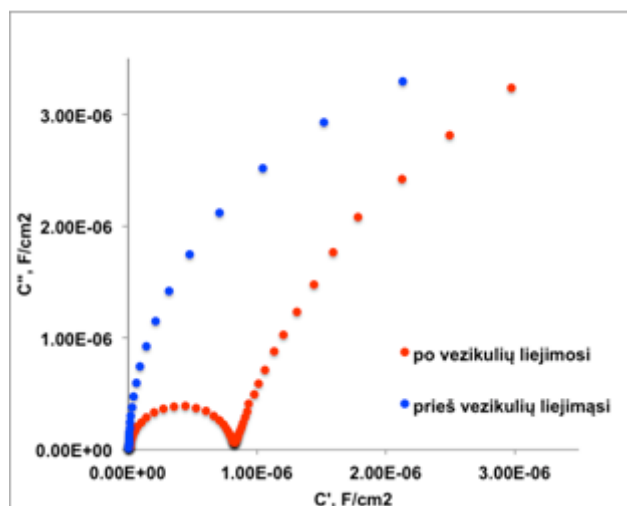
Suformuotų membranų elektrocheminio impedanso Cole – Cole spektras pateiktas I.11 B paveiksle. Iš EIS spektrų, pagal ekvivalentinį grandinės modelį, gauta membranos talpa $CPE_{\text{tBLM}} = 0,625 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, α_{tBLM} parametras, atspindintis membranos susiformavimo kokybę, gautas 0,99, rodo kompaktiškai ir tvarkingai susiformavusią membraną. Talpos vertė gaunama

mažesnė, nei įprastai tBLM, suformuotos ant FC16 30 %. Tai galima paaškinti, didelio cholesterolio kiekio (30 %) būvimu fosfolipidiniame mišinyje. Kaip jau buvo parodyta anksčiau, toks cholesterolio kiekis gali sumažinti membranos talpą apie 30 %.

4.2 Neuronų membranos lipidinio ekstrakto vezikulių liejimas

Lipidiniai ekstraktai, išskirti iš žiurkių smegenėlių membranų, buvo panaudoti vezikulių gamybai pagal įprastą vezikulių ruošimo protokolą (žr. Metodai). Kaip jau buvo minėta anksčiau (žr. 3.4 poskyryje), fosfolipidų lateralinis difuzijos koeficientas tokiose membranose siekia $24,74 \pm 2,02 \mu\text{m}^2/\text{s}$, o atitinkamai vezikulių diametras 87 nm. Gautas vezikulių dydis yra daug mažesnis, nei įprastai gaunamas, formuojant vezikules tomis pačiomis sąlygomis iš sintetinių lipidų. Kadangi tiksli neuronų lipidinio ekstrakto sudėtis nežinoma, spėjama, kad jame yra didelis kiekis įvairių lipidinių komponentų ar jų kompleksų, dėl kurių kinta vezikulių kreivumo spindulys ir dydis. Yra žinoma, jog vezikulių liejimasi skatina PE, o efektyviausiai liejasi vezikulės, sudarytos iš PC:PE:SM:CHOL (35:30:15:20) (Haque ir kt., 2001).

Vezikulės buvo panaudotos realių neuronų membranų modelių kūrimui ant paviršiaus. Vezikulės buvo liejamos ant mūsų jau gerai charakterizuotų paviršių, padengtų mišriais savitvarkais monosluoksniais. Šiam eksperimentui buvo pasirinktas tankios sudėties SAM, kuriame 70 % sudaro inkarinis junginys – HC18. Ankstesnė išsami SAM analizė parodė, kad tokios sudėties SAM pasižymi hidrofobiškumu, kuris reikalingas efektyviam vezikulių liejimuisi, bet išlieka mobilūs, kas reikalinga funkcionalios modelinės membranos sukūrimui (žr. I skyriaus 2 poskyris).



I.12 pav. Savitvarkio monosluoksnio ir suformuotos tBLM, EIS spektrai, talpos koordinatėse. Mėlyna pavaizduota SAM (β -ME : HC18 = 3:7) talpos kreivė. Raudona – tBLM, suformuota ant to paties SAM vezikulių liejimosi metodu naudojant neuronų membranos lipidinio ekstrakto vezikules.

I.12 paveiksle pateikti EIS spektrai, Cole – Cole koordinatėse, kurios vaizduoja talpos pokyčius prieš vezikulių liejimą ir po. Elektriniai parametrai, geriausiai modeliuojantys EIS spektrus (I.12 pav.) pateikti I.7 lentelėje. Matome, kad ant savitvarkio mišraus monosluoksnio, po lipidinio ekstrakto vezikulių liejimosi pusapskritimio diametras sumažėja beveik 10 kartų nuo ~ 6,3 iki 0,74 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Toks pokytis patvirtina dvisluoksnės membranos susiformavimą ant paviršiaus. Parametro α_{tBLM} vertė beveik 1, kas rodo susiformavusį, tvarkingą sluoksnį (I.7 lentelė).

I.7 lentelė. SAM ir tBLMs elektriniai parametrai, geriausiai modeliuojantys EIS spektrus pavaizduotus I.12 paveiksle, prieš ir po vezikulių liejimosi.

<i>EIS parametrai</i>	<i>SAM</i> <i>(β-ME : HC18 = 3:7)</i>	<i>Po liejimosi su</i> <i>Neuronų lipidinio</i> <i>ekstrakto vezikulėmis</i>
$CPE, \mu\text{F}/\text{cm}^2$	6,28	0,74
α_{tBLM}	0,9926	0.98
$R_{def}, \text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$	–	123,9
$Y_{tBLM}, \mu\text{S}/\text{cm}^2$	–	8,01

Susiformavusios realios tBLM foninis laidumas, palyginti aukštas, siekiantis $8 \mu\text{S}/\text{cm}^2$, todėl tokios tBLM būtų tik iš dalies tinkamos polipeptidų ($\text{A}\beta$ oligomerų) poveikio detekcijai, bet poras formuojančių toksinų pažaidų registravimui to pakaktų. Šis eksperimentas parodė, kad naudojant tokią technologiją, galima perkelti lipidinius ekstraktus iš gyvų objektų ant paviršiaus ir sukurti artimus realiems dirbtinius membranų modelius. Fiziologiškai artimų tBLM panaudojimas ateityje atvers naujų galimybių tiriant baltymų – lipidų sąveikas, ar transmembraninių baltymų veikimą, o taip pat ir struktūrinius matavimus. Patobulinus tBLM ruošimo technologijas, ateityje tikimasi sukurti lipidines sistemas, kurių liekamasis laidumas būtų mažesnis nei $100 \text{ nS}/\text{cm}^2$. Tuomet atsivertų galimybės, tokius modelius panaudoti efektyviai ir greitai amiloidinių darinių, toksiškai veikiančių fosfolipides membranas, detekcijai ir atrankai.

5. Apibendrinimas

Sukurtos ir charakterizuotos stabilios, prie paviršiaus per įvairius inkarinius junginius prijungtos fosfolipidinės dvisluoksnės membranos. Tokios, bioimituojančios, membranų sistemos gali būti pritaikomos biologinių membranų tyrimuose.

Apibendrinant, galima teigti, jog EIS spektroskopijos pagalba galima efektyviai tirti ir pilnai charakterizuoti prie paviršiaus prijungtų fosfolipidinių membranų elektrinius parametrus. Nustatyta, jog dirbtinių membranų defektiškumas auga naudojamų fosfolipidų eilėje: $\text{DPhPC} < \text{DOPC} < \text{DEcoPC} < \text{POPC} < \text{OPPC}$.

Nuoseklūs difuzijos ir elektrocheminiai matavimai parodė, kad sistemiškai analizuojami, jie duoda informaciją apie membranos architektūrą, o inkarinių lipidinių molekulių prigimtis veikia membranos dinamines ir izoliacines savybes. Buvo pademonstruota, kad didelio tankio (70 %) tBLM, suformuotos ant HC18, fosfolipidų judrumas yra žymiai didesnis, nei judrumas tBLM, suformuotų ant 70 % WC14 ir FC16. HC18 pagrindu sukurtos tBLM,

yra patogi platforma funkcionuojančių baltymų įterpimui (tai bus pademonstruota II rezultų aptarimo skyriuje), netgi tomis sąlygomis, kuriomis neįmanoma to padaryti naudojant WC14 ir FC16 junginius.

Pasiūlytas tBLM modifikacijos metodas, pagrįstas vezikulių liejimosi metodu, įgalinantis pakeisti membranos kompoziciją, norimais, sunkiai tirpiais arba netirpiais etanolyje, lipidiniais komponentais. Pademonstruota cholesterolio perkėlimo iš vezikulių į paviršiuje prikabintą dvisluoksnę membraną galimybė, bei galimybė suformuoti neuronus imituojančias paviršiuje prikabintas membranas naudojant daugiakomponentes vezikules. Darbe buvo įvertinti skirtingos kompozicijos vezikulių dydžiai ir difuzijos koeficientai ir skirtingais metodais gautas tiesinis sąryšis tarp vezikulių dydžio ir difuzijos, parodantis, jog skirtingais fiziniais principais veikiantys metodai duoda tą patį rezultatą.

Taip pat parodytos galimybės perkelti lipidinius gyvų ląstelių ekstraktus iš gyvų objektų ant paviršiaus ir sukurti dirbtinius – realius membranų modelius. Tokie modeliai ateityje būtų geras įrankis tiriant ir detektuojant baltymų, toksinų ir receptorių sąveikas su lipidinėmis membranomis, taip pat analizuojant baltymų afiniškumą tam tikriems lipidiniams komponentams atsakingiems už baltymų veikimą.

II SKYRIUS. Poras formuojančių toksinų ir fosfolipidinės membranos sąveikos eksperimentinis tyrimas

Ivadas

Poras formuojančių bakterinių toksinų poveikis yra tiesiogiai susijęs su ląstelių membranos ir baltymo (polipeptido) molekulės sąveika. Sąveikos pobūdis gali būti įvairus, specifinis arba nespecifinis. Infekcijos metu, jie formuoja poras membranoje ir taip sutrikdo natūralią ląstelės homeostazę, suardo pralaidumo barjerą, inhibuoja specifinius procesus ir galų gale sukelia ląstelių žūtį. Todėl fosfolipidų ir poras formuojančių toksinų sąveikos molekulinio lygio mechanizmo supratimas yra būtinas norint detektuoti toksinus bei sukurti efektyvius antitoksinio veikimo preparatus.

Šios darbo dalies tikslas buvo EIS metodu detektuoti tBLM sąveiką su poras formuojančiais toksinais: α -hemolizinu iš *Staphylococcus aureus*, juodligės toksinu iš *Bacillus anthracis* ir mažai tyrinētu, nuo cholesterolio priklausomu citolizinu – vaginolizinu iš *Gardnerella vaginalis*, bei ištirti kai kuriuos šių sąveikų mechanizmo aspektus. Tuo tikslu buvo analizuojami EIS spektrai ir nustatomi tipiniai PFTs sąveikos su tBLM detekcijos požymiai, bei baltymo įsiterpimo parametrai. EIS spektriniai pokyčiai buvo stebimi, esant skirtingoms toksinų koncentracijoms tirpaluose, taip pat stebimas membranos laidumo kitimas laike. Nuo cholesterolio priklausomo vaginolizino atveju, membranos pažeidimas buvo stebimas, varijuojant fosfolipidinės membranos sudėtį. EIS spektrų analizei buvo pritaikytas ekvivalentinis ir matematinis modelis, leidžiantis įvertinti, membranos dielektrinių savybių ir laidumo pokyčius po sąveikos su toksinais. Jonų aktyvacijos energijos (E_a) įvertinimui, buvo atliekamas temperatūrinis PTFs ir tBLM sąveikos tyrimas. Susiformavusių kanalų funkcionalumas buvo nustatomas osmosinio streso eksperimentu su skirtingos molekulinės masės polimerų tirpalais – polietilenglikoliais (PEG).

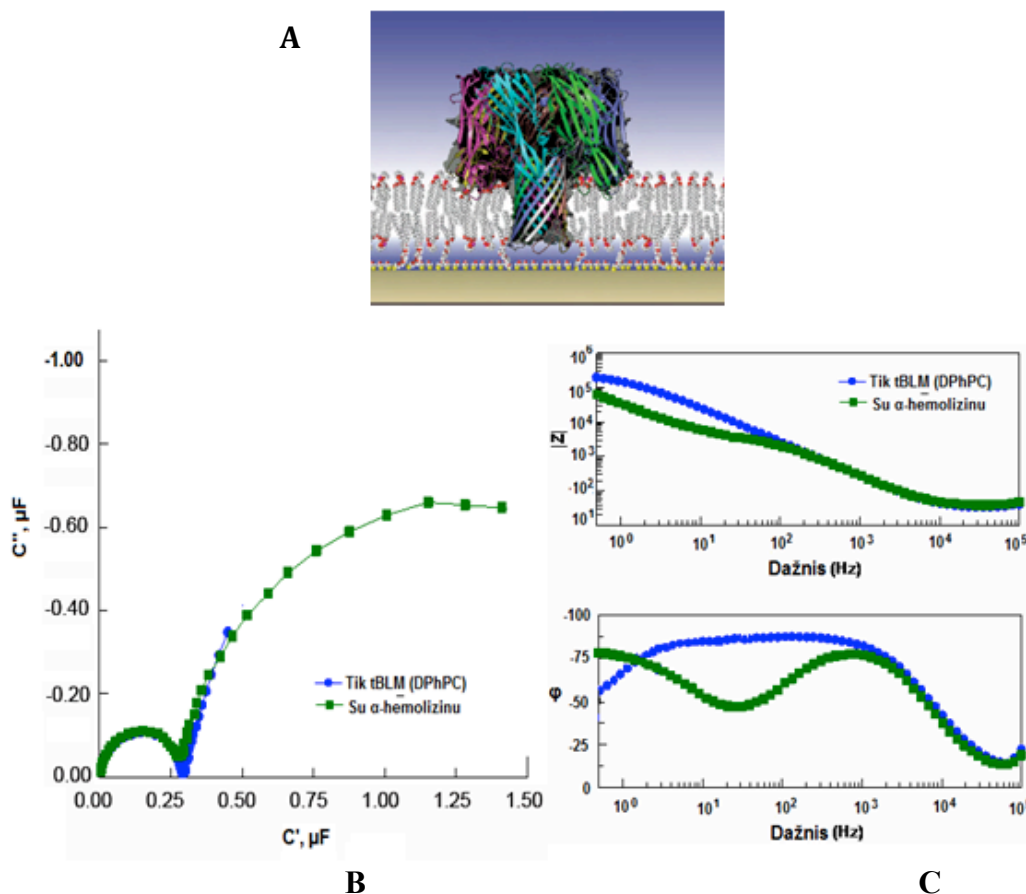
Rezultatai ir jų aptarimas

1. α -hemolizino ir PA₆₃ įsiterpimas į fosfolipidinę membraną

1.1 EIS spektrų ir elektrinių parametrų pokyčiai įsiterpiančiam α -hemolizinui

II.1 paveiksle pavaizduota iliustracinė schema, vaizduojanti α -hemolizino veikimo principą. Mūsų partnerių iš JAV atlikti neutronų reflektometriniai tyrimai šioje sistemoje (McGillivray, Valincius ir kt., 2009) patvirtino, jog α -hemolizino, įsiterpusio į membraną, struktūra sutampa su kristalografiniais matavimais gauta α -hemolizino struktūra (Song ir kt., 1996).

α -HL įsiterpimas į dvisluoksnią lipidinę membraną yra tiksliai ir greitai nustatomas elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) metodu. Pirmiausia, kompleksinės talpos koordinatėse (II.1 pav. **A**), po α -hemolizino inkubacijos matomas ryškus kompleksinės talpos išaugimas žemų dažnių srityje. Jis signalizuoja apie žymų membranos laidumo padidėjimą, siejamą su α -hemolizino rekonstitucija į membraną. Antra, pastebimas ir talpos pusapskritimio skersmens išaugimas aukštų dažnių srityje (II.1 pav. **A**), taigi α -toksinas, įsiterpdamas į tBLM, padidina jos efektyvinę dielektrinę konstantą. Šie pokyčiai dera ir su pokyčiais stebimais Bode koordinatėse, vaizduojančiose impedanso modulio ir fazės priklausomybę nuo dažnio (II.1 pav. **B**). Žemų dažnių srityje stebimas žymus impedanso modulio sumažėjimas (laidumo išaugimas), o fazinėje diagramoje atsiranda ryškus fazės ekstremumas (atitinkantis tBLM laidumo reikšmę), kurio padėtis priklauso nuo inkubacijos laiko ir baltymo koncentracijos (žr. toliau).



II.1 pav. Sąveika tarp α -HL ir imobilizuotos dvisluoksnės membranos suformuotos iš DPhPC. Abiejuose grafikuose yra tas pats pavyzdys. Savitvarkis monosluoksnis SAM – WC14:ME (30:70). **A.** Pavaizduota iliustracinė schema, vaizduojanti α -hemolizino veikimo principą (paveikslas adaptuotas iš McGillivray D.J., Valincius G. et.al., 2009). **B** – Kompleksinės talpos grafikas: mėlyna – pradinė kreivė; žalia – po 60 min 140 nM α -HL injekcijos. **C** – tBLM laidumo Bode grafikas: mėlyna – pradinė kreivė; žalia – po 60 min 140 nM α -HL injekcijos.

Modeliuojant kreives su ekvivalentiniu grandinės modeliu buvo išskaičiuotos membranos varžos ir talpos parametrų vertės (II.1 lentelė). Kai sistemoje įvedamas α -HL, stebimi tokie parametrų pokyčiai: 1) membranos talpos (CPE_{tBLM}) elemento reikšmės išaugimas – $\sim 20\%$ ir α_{tBLM} parametro nedidelis sumažėjimas; 2) didelis elektrinių parametrų pokyčiai, kurie susiję su membranoje esančiais defektais (poromis, skylutėmis) – tai maždaug dvidešimt kartų R_{def} vertės sumažėjimas ir CPE eksponentės išaugimas nuo 0,56 iki 0,82, rodo išaugusį dvisluoksnio defektiškumą, ir su juo susijusį membranos elektrinį laidumą. Visa tai sietina su joninių baltymo kanalų atsiradimu membranoje.

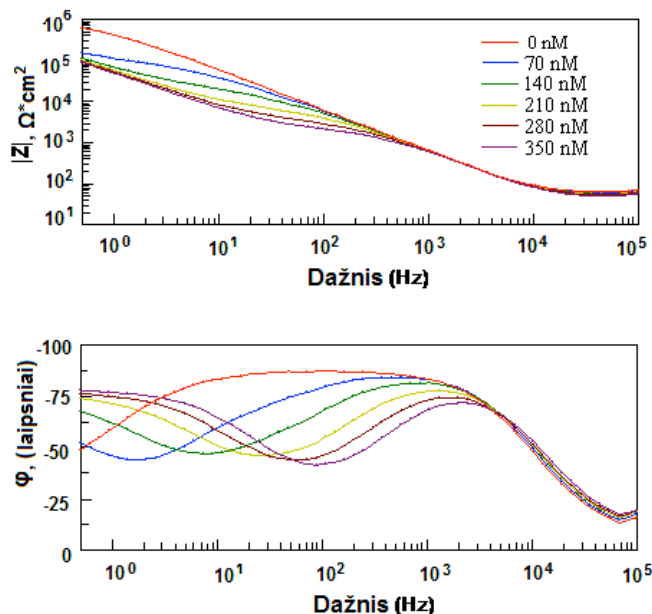
II.1 lentelė. tBLM (DPhPC) parametrai, prieš ir po α -HL įsiterpimo, geriausiai modeliuojantys EIS spektrų ekvivalentinę grandinę. Parametrų vertės yra suvidurkintos iš $n = 25$ matavimų ir normalizuotos į geometrinį plotą.

<i>Parametrai</i>	<i>Prieš α-HL įsiterpimą</i>	<i>Po α-HL įsiterpimo</i>
$CPE_{tBLM}, \mu F/cm^2$	0,83	1,00
α_{BLM}	0,9849	0,9791
$CPE_{def}, \mu F/cm^2$	6,18	9,97
α_{def}	0,56521	0,81906
$R_{def}, k\Omega \cdot cm^2$	202,88	10,19
Modelio atitikimo kokybė, $\chi^2 * 10^4$	2,38	1,37

1.2. tBLM sąveikos su α -HL priklausomybė nuo baltymo koncentracijos ir temperatūros

Toksino formuojamos poros membranos dvisluoksnyje stipriai padidina membranos laidumą. Laidumo padidėjimas priklauso nuo toksino koncentracijos tirpaluose. EIS spektrų priklausomybės nuo koncentracijos yra pateiktos II.2 paveiksle. Matome, kad didėjant α -hemolizino koncentracijai, impedanso modulis ($|Z|$) nuosekliai mažėja, o fazės postūmis (φ) nuosekliai didėja t.y tBLM laidumas, kuris yra proporcingas $1/|Z|$, nuosekliai auga (II.2 pav). Kaip matome, fazės postūmis yra labai jautrus toksino koncentracijai, o jos ekstremumo padėtis pakinta dažnių srityje per 2 eiles (nuo 1 iki 100 Hz), pakeitus toksino koncentraciją nuo 70 iki 350 nM. Visi šie požymiai rodo, kad α -HL sąveikauja su tBLM ir ji tampa pralaidi jonams, be to toksino indukuotas laidis priklauso nuo jo koncentracijos.

Matematinė spektrų analizė parodė, jog EIS spektriniai požymiai stipriai priklauso nuo defektų tankio variacijos (Valincius ir kt., 2012). II.2 paveiksle, Bode koordinatėse stebimas fazės minimumo stumimasis į aukštesnių dažnių sritį, o paties minimumo padėtis truputį slenkasi į apačią (II.2 pav.), Tokie spektriniai pokyčiai, pagal matematinį modelį reikštų, kad priklausomai nuo hemolizino koncentracijos, defektų, t.y., toksinų formuojamų laidžių porų, tankis membranoje didėja.



II.2 pav. Imobilizuotos dvisluoksnės membranos (BLM = β -ME : WC14 = 7:3 ir DPhPC) laidumo priklausomybė nuo skirtingų α -HL koncentracijų – Bode grafikas 37 °C temperatūroje. alfa-HL koncentracijų diapozonas (nM): raudona – 0, mėlyna – 70 nM, žalia – 140 nM, geltona – 210 nM, ruda – 280 nM, alyvinė – 350 nM. Kiekviena hemolizino koncentracija išlaikyta apie 1 val.

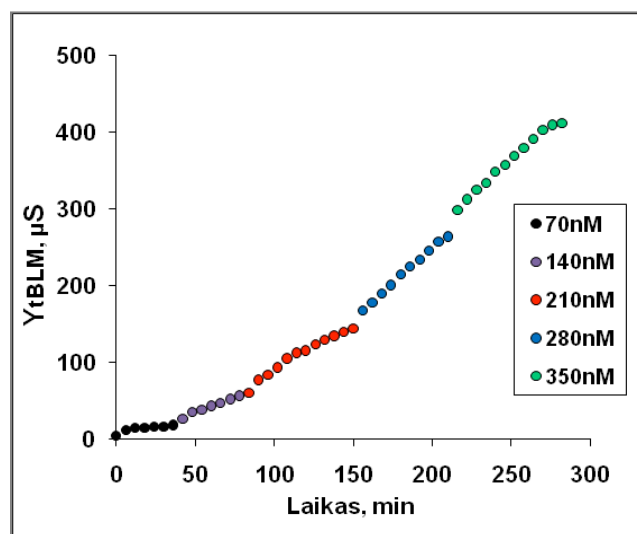
Panaudojant išvestą (Valincius ir kt., 2012) membranos impedanso fazės ekstremumo ir defektų tankio sąryšį:

$$\lg(N_{\text{def}}) = 0,93\lg(f_{\text{min}}) + 6.96,$$

pabandėme įvertinti α -hemolizino paviršinių tankių membranoje. Gavome, jog, kai hemolizino koncentracija 70 nM, $\min(-\varphi) = 1,2$ Hz, o koncentraciją padidinus iki 350 nM, $\min(-\varphi) = 80$ Hz. Pagal aukščiau pateiktą lygtį gauname, jog hemolizino paviršiniai tankiai 70 ir 350 nM baltymo tirpaluose pasiekia atitinkamai 0.1 ir 5.3 μm^{-2} . Taigi, matome, jog hemolizino rekonstituciją į fosfolipido membraną yra netiesinis toksino monomero koncentracijos atžvilgiu procesas, padidinus baltymo koncentraciją 5 kartus, per tą patį laiką membranoje pasiekiamas net 50 kartų didesnis toksino porų tankis.

Tiriant membranos laidumo priklausomybę nuo α -hemolizino koncentracijos, gautas labai įdomus rezultatas. Buvo gauta tBLM laidumo laiptinė priklausomybė nuo α -HL koncentracijos (II.3 pav). Šiuo atveju „membranos laidumu“ laikomas kompleksinio laidžio modulio vertė, impedanso fazės ekstremumo taške [Cornell ir kt. Nature 1998; McGillivray ir kt., Biophys J 2009]. Matematiškai griežtai ši laidumo

reikšmė nėra vien tik membranos savybė [Valincius ir kt., 2012], tačiau svarbu tai, jog Y_{tBLM} yra proporcinga defektų tankiui membranoje

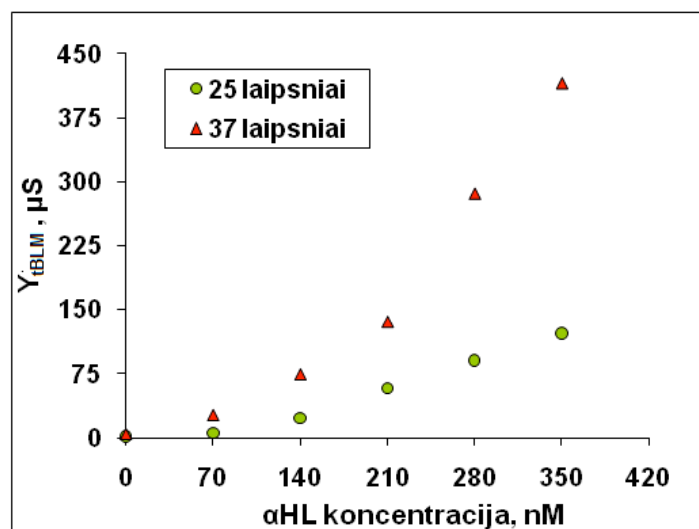


II.3 pav. Membranos (tBLM = β -ME : WC14 = 7:3 ir DPhPC) laidumo priklausomybės nuo α -hemolizino koncentracijos, fiksuotame laike. α -HL koncentracijų diapozonas (nM): juoda – 70 nM, alyvinė – 140 nM, raudona – 210 nM, mėlyna – 280 nM, žalia – 350 nM. Kiekviena hemolizino koncentracija išlaikyta apie 1 val. Eksperimentai atlikti 37 °C temperatūroje.

Esant sistemoje mažai toksino koncentracijai (70 nM), nestebime beveik jokių tBLM laidumo pokyčių, bet tik pridėjus antrąją porciją α -HL, laidumas iškart pastebimai didėja. Didesnėse α -hemolizino koncentracijose (280 nM), įsiterpimo į membraną greitis apie 7 kartus didesnis, nei esant mažai koncentracijai. Pirma, II.3 paveikslo kreivė rodo, jog įsiterpimas ir laidžių porų formavimasis vyksta nepusiausvyrinėmis sąlygomis; Antra, akivaizdžiai netiesinė laidžių porų formavimosi greičio priklausomybė nuo koncentracijos leidžia manyti jog būtent oligomerizacijos į heptamerą stadija gali būti limituojanti baltymo funkcionalaus įsiterpimo į membraną stadija.

Ta pati išvada seka ir iš II.4 paveiksle vaizduojamos membranos laidumo priklausomybės nuo α -hemolizino koncentracijos kreivė, gauta fiksuotam inkubacijos su toksinu laikui. Suvidurkinus daugelio eksperimentų rezultatus, gauta, jog laidumo priklausomybė nuo α -hemolizino koncentracijos yra eksponentinė. Elektrocheminiai matavimai buvo atliekami 25 °C ir 37 °C temperatūros elektrolitų tirpaluose. Atliekant eksperimentus skirtingose temperatūrose, galima įvertinti α -HL įsiterpimo į membraną greitį. Gauti rezultatai (II.4 pav) rodo, kad 37 °C temperatūroje α -

hemolizinas žymiai greičiau pažeidžia membraną ir įsiterpia į fosfolipidinį dvisluoksnį, negu, kad 25 °C temperatūroje pvz.: injektavus 140 nM α -HL, tBLM laidumas, 25 °C temperatūroje, per 1 val pasiekia tik 23,7 μ S, tuo tarpu 37 °C temperatūroje – net 74,04 μ S.



II.4 pav. Membranos (BLM = β -ME : WC14 = 7:3 ir DPhPC) laidumo priklausomybės nuo α -hemolizino koncentracijos, skirtingose temperatūrose. Eksperimentas atliktas 25 °C temperatūroje – mėlyna kreivė, o 37 °C temperatūroje – raudona. Kiekviena hemolizino koncentracija išlaikyta apie 1 val.

Tai rodo, kad padidinus tirpalo temperatūrą 12 K, laidis per tą patį fiksuotą laiko tarpą išaugo daugiau nei ~ 3 kartus (ties 350 nM, net ~ 4 kartus). Šis pokytis rodo, jog α -HL įsiterpimo į tBLM aktyvacijos energija yra ~70 kJ/mol (140 nM α -HL) ir net ~ 89 kJ/mol (350 nM α -HL) atvejais. Žinoma, darant šiuos apytikslus įverčius, neatsižvelgta į jonų judrio, kuris lemia absoliučias Y_{tBLM} vertės, priklausomybę nuo temperatūros, tačiau, kaip matysime toliau jonų judėjimo aktyvacijos barjeras tesudaro 5- 8 kJ/mol, taigi iš esmės negali būti atsakingas už tokią stiprią α -HL įsiterpimo greičio priklausomybę nuo temperatūros. Tai verčia manyti, kad α -HL įsiterpimo greitį kontroliuoja kinetiniai, o ne difuzijos faktoriai, gal būt tiesiogiai atsakingi už monomerų (oligomerų) jungimąsi membranoje arba monomero jungimosi prie membranos stadija.

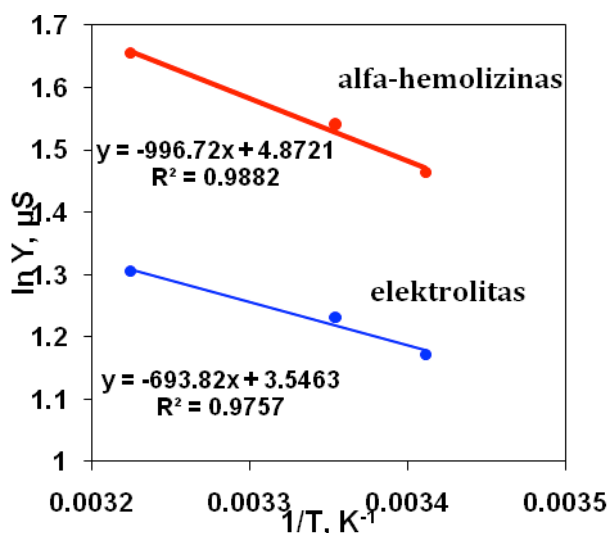
Visi prieš tai stebėti pokyčiai, vykstant α -HL įsiterpimui, (II.1 pav., II.2 pav.) yra negrįžtami ir stabilūs, todėl pašalinus (išplovus) α -hemolizina iš sistemos, paviršinė α -HL oligomerų koncentracija išlieka pastovi. Tokiomis sąlygomis galima

atlikti temperatūrinius toksino sukkelto laidumo priklausomybės tyrimus, eliminuojant porų koncentracijos, bei įsiterpimo kinetikos faktorius (žr. aukščiau). Tai leidžia nustatyti jonų judėjimo per toksino poveikyje atsiradusį tBLM defektą efektyvinę aktyvacijos energiją pasinaudojant Arėnijaus lygtimi:

$$Y_{\text{tBLM}} = Y_{\text{tBLM},0} \exp(E_a/RT) \quad (1);$$

$$E_a = -RT \partial \ln Y / \partial \ln(1/T) \quad (2),$$

Kur E_a – aktyvacijos energija (J/mol), R – universalioji dujų konstanta 8,31 (J/(K*mol)), T – absoliučioji temperatūra (K), Y_{tBLM} – tBLM laidumas (S) (čia, kaip ir aukščiau membranos laidumu laikomas Y modulio reikšmė impedanso fazės minimumo taške), $Y_{\text{tBLM},0}$ – priešeksponentinis daugiklis (S). II.5 paveiksle pavaizduotos α -HL indukuotas tBLM laidis Arėnijaus koordinatėse, kuriose mėlyna tiesė vaizduoja tirpalo, o raudona kreivė – α -hemolizino joninių kanalų laidumo priklausomybę nuo temperatūros. Matome, jog tiesių nuolinkio koeficientas yra beveik vienodas. Pagal lygtį (2) radome, kad jonų laidumo per α – HL kanalą aktyvacijos energija yra 8,7 kJ/mol, o jonų laidumo tirpale yra $\sim 5,5$ kJ/mol (II.2 lentelė).



II.5 pav. Arėnijaus koordinatės, kuriose mėlyna tiesė – elektrolito laidumo priklausomybė nuo temperatūros, o raudona tiesė – toksino joninių kanalų laidumo priklausomybė nuo temperatūros. Matavimai atlikti su tBLM (DPhPC), kuri buvo 60 min inkubuojama su 70nM α – HL tirpalu, kurio pH 7,5. Prieš Arėnijaus eksperimentą, siekiant išlaikyti fiksuotą paviršinę koncentraciją, toksinas buvo pašalintas iš sistemos.

Šie rezultatai patvirtina, jog α – hemolizinas tBLM, kaip ir biologinėse membranose, formuoja vandens pripildytą poras, kuriose jonai „keliauja“ aplinkoje, kuri yra panaši į tirpalo aplinką, todėl ir aktyvacijos barjerai yra panašūs.

Arenijaus eksperimentas buvo atliktas su tBLM, kurios 60 min buvo inkubuojamos su skirtingomis α -hemolizino monomerų koncentracijomis: 70 nM, 140 nM ir 280 nM. Jonų judėjimo aktyvacinis barjeras, per membranoje suformuotą α -HL kanalą, buvo įvertintas su sąlyga, kad kiekviena skirtinga paviršinė α -HL koncentracija būtų fiksuota. Išskaičiuotos jonų judėjimo aktyvacijos energijos (II.2 lentelė), rodo įdomų rezultatą. Iš laidumo, kurį indukavo skirtingos α -HL koncentracijos, išskaičiuoti jonų judėjimo aktyvaciniai barjerai yra panašūs ir visai nepriklauso nuo paviršinės toksino koncentracijos. Tai sutinka su prielaida, jog nepriklausomai nuo kanalų paviršinio tankio membranų laidumą indukuojantys α -HL dariniai yra tie patys – heptameriniai kanalai.

II.2 lentelė. Aktyvacijos energijų, išskaičiuotų iš Arėnijaus koordinačių (II.5 pav.), palygimas iš skirtingų α -HL indukuotų laidumų ir jonų laidumo elektrolite.

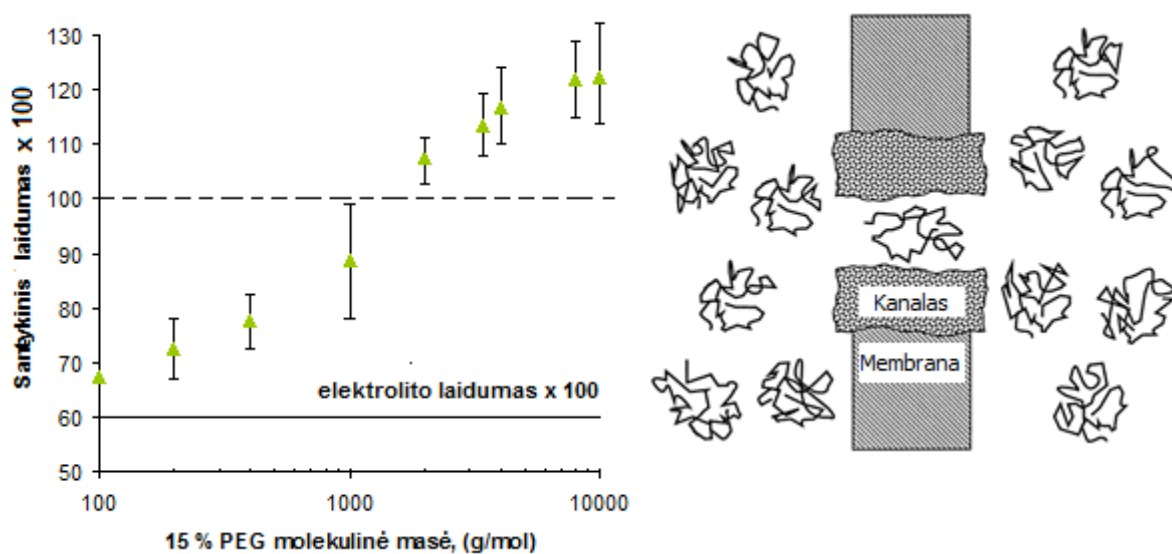
<i>Eksperimentinės sąlygos</i>	<i>Aktyvacijos energija, ΔE_a, kJ/mol</i>
tBLM inkubacija su 70 nM α -HL monomerų	8,7
tBLM inkubacija su 140 nM α -HL monomerų	8,1
tBLM inkubacija su 280 nM α -HL monomerų	8,3
tBLM elektrolito tirpale, 100 mM NaCl	5,5

1.3. α -hemolizino kanalo funkcionalumo tyrimas

Detektavus α -HL ir fosfolipidinio dvisluoksnio sąveiką, iškilo uždavinys patikrinti šio kanalo skerspjūvį, kas galutinai patvirtintų įterpto α -HL funkcionalumą. Viena iš tokio eksperimento strategijų, būtų bandymas “užkimšti“ kanalų angą, skirtingo dydžio vandenyje tirpiaais polimerais. Pagal literatūros duomenis, klasikinėse juodose lipidinėse membranose, naudojant neutralias polimerines medžiagas pvz: PEG (polietileno glikolis), α -HL joninio kanalo skerspjūvis yra toks, kad į kanalo vidų polimerai su didesne, nei 2000 Da molekuline mase, papulti nebegali (Bezrukov ir kt.,

1996). PEG eksperimentas leidžia apytiksliai įvertinti biologiškų jonų kanalų dydį ir taip pat stebėti osmosinio streso efektą. Biologinių molekulių savybės priklauso nuo druskų, pH, temperatūros ir ypač joms įtaką daro vanduo. Naudojant osmosinio streso metodiką, galima nustatyti vandens poveikį biologinėms molekulėms, išskaičiuoti hidratacijos ir kitas jėgas tarp fosfolipidinių dvisluoksnių. Taip pat tokia metodika naudojama studijuojant makromolekulių saviorganizacijos energetiką ir vienetinių makromolekulių konformacinius pasikeitimus. Tyrimams naudojami lankstūs neutralūs polimerai (PEG, dekstranas), kurių didelės koncentracijos pastebimai sumažina vandens aktyvumą, taigi ir cheminį vandens potencialą (Parsegian ir Rand, 1995).

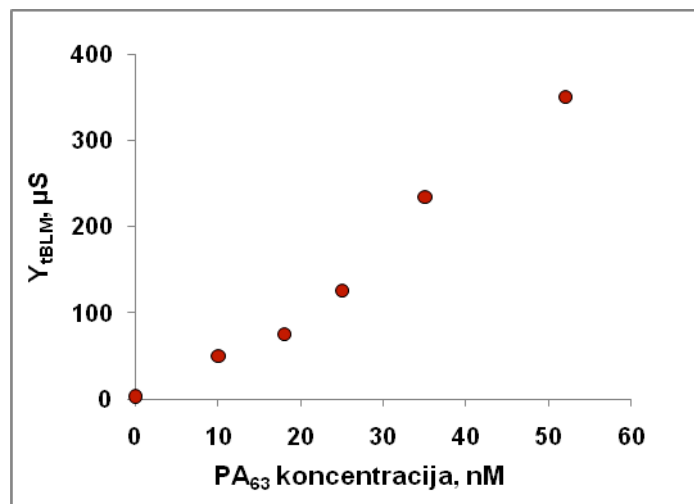
Mes atlikome eksperimentus su tBLM, įvairaus dydžio PEG polimerus. Juodose lipidinėse membranose nustatyta, jog mažesnės molekulinės masės polimerai blokuoja α -hemolizino poras, o didesnės molekulinės masės PEG neblokuoja (II.6 pav.) ir jie yra išstumiami (Bezrukov ir kt., 1996). Ištyrus α -hemolizino indukuoto membranos laidumo priklausomybes nuo skirtingos molekulinės masės PEG tirpaluose (II.6 pav), gautas tBLM laidumo kitimas beveik identiškas juodųjų lipidinių membranų kitimui (Bezrukov ir kt., 1996). Matome, kad, kai PEG molekulinė masė < 2000 , polimero pridėjimas pradeda mažinti α -HL indukuotą laidumą, o toliau mažėjant polimero molekulinėi masei, laidumas ima artėti į $\sim 60\%$ lygį, kuris atitinka šios sudėties buferio laidumą, esant 15% (pagal masę) PEG. Tuo tarpu didesnės molekulinės masės PEG ≥ 2000 , kurių dydis yra didesnis už kanalo skerspjūvį, lieka už α -HL kanalo ribų, todėl stebimas laidžio padidėjimas, lyginant su tirpalu, kuriame nėra PEG, kas pilnai atitinka laukiamo osmosinio streso efekto poveikį. Esant sistemoje didelės molinės masės PEG molekulėms, nepatenkančioms į toksino kanalo vidų, dėl sumažėjusio tirpale vandens cheminio potencialo, dalis vandens palieka kanalo vidų, ir tai santykinai padidina jonų cheminius potencialus. To pasekoje stebimas registruojamo laidžio išaugimas, siekiantis apie $115-120\%$ pradinio tirpalo (6 pav), laidžio.



II.6 pav. Santykinio laidumo, indukuoto α -HL įsiterpimo į tBLM, priklausomybė nuo skirtingos PEG molekulinės masės tirpale. PEG koncentracija tirpale yra 15 %. Šalia pavaizduota schema, vaizduojanti eksperimento eigą ir sukulto laidumo pokyčius (paveikslas adaptuotas iš Bezrukov ir kt., 1996, kurių eksperimentuose naudojamos juodosios lipidinės membranos). tBLM laidumo reikšmės išskaičiuotos iš ekvivalentinio modelio R_{sk} vertės, pagal formulę: $Y = 1/R_{sk}$.

1.4 PA_{63} ir tBLM sąveikos tyrimas nuo toksino koncentracijos ir temperatūros

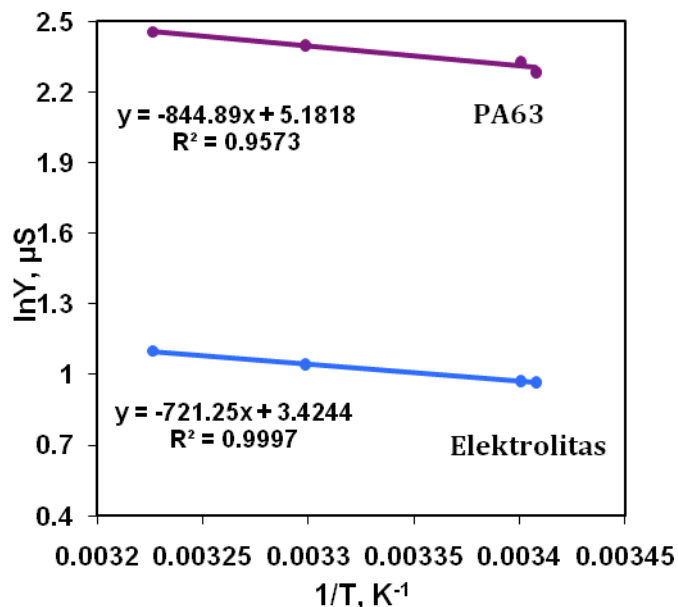
Poras formuojančio toksino, PA_{63} , įsiterpimas į dvisluoksnę lipidinę membraną nustatomas elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) metodu. Kadangi PA_{63} heptamero transmembraninis domenai yra pakankamai ilgai, 35 Å (Chauhan V. and Bhatnagar R., 2002), todėl PA_{63} tyrimuose, buvo pasirinktas ilgas, nesotus fosfolipidas, su ilgomis angliavandenilių grandinėmis – tai DecoPC, turintis po vieną nesočią jungtį kiekvienoje iš jų (20:1). Literatūrinėje dalyje, 1.4.2 skyriuje, buvo aprašyta, jog juodligės toksino veikimo natūrali endosomos membranos aplinka yra silpnai rūgštinė. Taigi, mūsų eksperimentai su PA_{63} buvo atliekami silpnai rūgštinėje terpėje, kai buferinio tirpalo buvo pH 5,5. Dėl PA_{63} sąveikos su tBLM, gautų EIS spektrų, kompleksinės talpos diagramose ir Bode koordinatėse, stebimi pokyčiai yra tokie patys kaip ir α – hemolizino sąveikos su tBLM atveju (žr. II.1 pav). Tiriant membranos laidumo priklausomybę nuo PA_{63} koncentracijos, gautas beveik tiesiškas tBLM laidumo, kuris yra $Y_{PA63} = 1/ R_{def}$, augimas (II.7 pav).



II.7 pav. Membranos (BLM = β -ME : WC14 = 7:3 ir EcoPC) laidumo priklausomybė nuo PA₆₃ koncentracijos (PA₆₃ koncentracijų diapozonas nuo 10 nM iki 52 nM, inkubacijos laikas 1 val) Vandeniame tirpale – 100 mM NaCl, 10 mM fosfatinėje buferinėje sistemoje, pH 5,5. tBLM laidumo reikšmės gautos modeliuojant EIS spektrus su ekvivalentiniu grandinės modeliu ir išskaičiuotos iš $Y_{tBLM} = 1/R_{def}$.

Gauti rezultatai rodo, jog esant sistemoje net labai mažai PA₆₃ koncentracijai (10 nM), tBLM laidumas pastebimai padidėja ir toliau didinant toksino koncentraciją iki 52 nM, jis tiesiškai didėja, o fosfolipidinė membrana tampa labai pralaidi jonams. Iš II.7 paveikslo grafiko matyti, kad didelis tBLM laidumas, ~ 355 μ S, pasiekiamas 25 °C temperatūroje, kai PA₆₃ koncentracija yra tik 52 nM, tuo tarpu α -HL atveju panašus fosfolipidinės membranos laidumas pasiekiamas tik prie 280 nM ir 37 °C temperatūroje. Daroma išvada, jog juodligės toksinas pasižymi žymiai didesniu tBLM membranos pažaidos efektu.

PA₆₃ įsiterpimas į membraną yra taip pat, kaip ir α -hemolizino atveju, negrįžtamas procesas. Ši savybė leidžia atlikti temperatūrinius PA₆₃ sąveikos su tBLM tyrimus, su fiksuota paviršine toksino koncentracija, ir išskaičiuoti Arenijaus aktyvacijos energijas. II.8 paveiksle pavaizduotos Arenijaus koordinatės, kuriose mėlyna tiesė vaizduoja tirpalo, o raudona kreivė – jonų, judančių per PA₆₃ suformuotus joninius kanalus, laidumo priklausomybę nuo temperatūros.



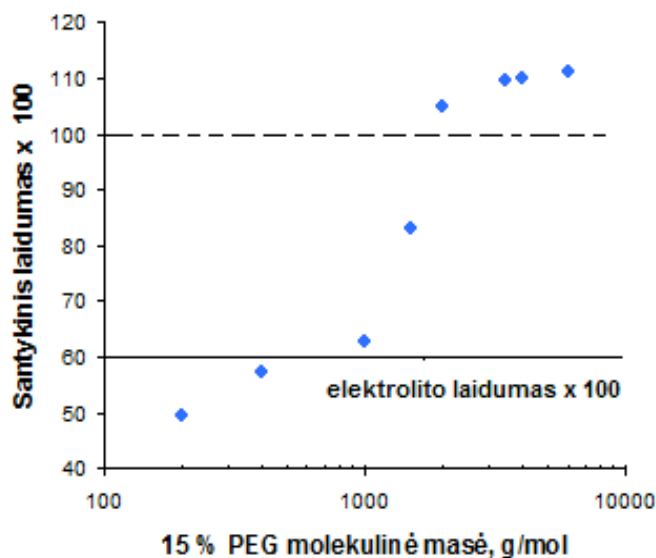
II.8 pav. Arėnijaus koordinatės, kuriose mėlyna tiesė – elektrolito laidumo priklausomybė nuo temperatūros, o raudona tiesė – jonų, judančių per PA₆₃ joninius kanalus, laidumo priklausomybė nuo temperatūros. Matavimai atlikti su tBLM (suformuota iš DEcoPC), kuri paveikta 25 nM PA₆₃, terpės pH 5,5, inkubacijos laikas 1 val.

II.8 paveikslo grafikas vaizduoja, kad nustatyta aktyvacijos barjero reikšmė yra panaši į prieš tai aprašyto poras formuojančio toksino, α -hemolizino, aktyvacijos energiją (II.5 pav). Jonų specifinio laidumo per PA₆₃ kanalą išskaičiuota aktyvacijos energija yra 7 kJ/mol (truputį mažesnė nei α -HL atveju), o elektrolite siekia apie 5,9 kJ/mol. Rezultatai įrodo PA₆₃ joninio kanalo, užpildyto vandeniniu elektrolitu tirpalu, susiformavimą, nes jonų judėjimas kanale vyksta panašiai, kaip ir elektrolito tirpalo tūryje.

1.5. PA₆₃ kanalo funkcionalumo tyrimas

PA₆₃ suformuoto kanalo membranoje funkcionalumo tyrimams buvo atliktas analogiškas, eksperimentas su skirtingos molekulinės masės PEG (aprašytas 1.3 skyriuje). Ištyrus laidumo, po PA₆₃ įsiterpimo į tBLM, priklausomybę nuo skirtingos PEG molekulinės masės tirpale (II.9 pav.), gautas tBLM laidumo kitimas yra panašus į tą, kurį indukavo α -HL (pavaizduotas II.6 pav). Ir šiuo atveju, kai PEG molekulinė masė mažesnė nei < 2000, polimero molekulė įlenda į PA₆₃ poras, jas „užkemša“ ir sumažina jonų pralaidumą per membraną. Tuo tarpu didesnės molekulinės masės PEG

≥ 2000 , neįlenda į PA₆₃ poras, ir lieka už kanalo ribų, taip padidindami fosfolipidinės membranos laidumą ir sukeldami osmosinio streso efektą..



II.9 pav. Santykinio laidumo, indukuoto PA₆₃ įsiterpimo į tBLM, priklausomybė nuo skirtingos PEG molekulinės masės tirpale. PEG koncentracija tirpale 15%.

Atkreiptinas dėmesys, jog laidumo kritimo kreivė PA₆₃ atveju yra statesnė. Nors iš literatūros yra žinoma jog PA₆₃ poros diametras 20 Å, o hemolizino – 30 Å ir galima būtų tikėtis, jog osmosinio streso efektas turėtų būti stebimas jau mažesnių PEG molinių masių diapozone, čia šito nestebime. Kol kas šio kiekybinio efekto paaiškinti negalime, nors kokybiškai, galime konstatuoti, jog stebime funkcionalios PA₆₃ susiformavimą tBLM sistemoje. Negalime ignoruoti ir to fakto, jog PA₆₃ įsiterpimo tyrimui buvo naudojami kiek kitokie, ilgesnės grandinės fosfolipidai. Tačiau pilnai paaiškinti laidžio mažėjimą < 60% pradinio (be PEG) tirpalo laidžio šiuo metu negalime.

2. Vaginolizino (VLY) sąveika su pavuršiuje imobilizuotomis fosfolipidų membranomis

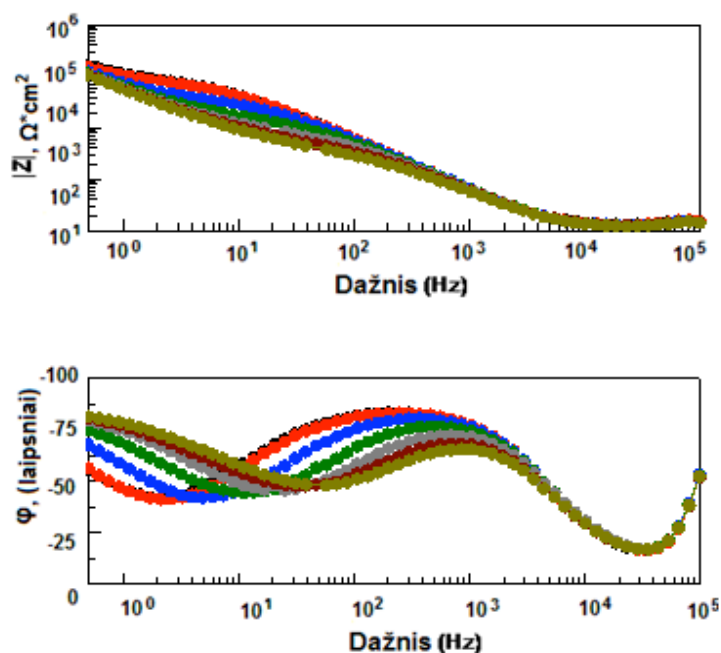
Poras formuojančio toksino, VLY įsiterpimas į dvisluoksnę lipidinę membraną buvo taip pat nustatomas elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) metodu. Kadangi, remiantis literatūra, VLY yra žinomas kaip nuo cholesterolio priklausomas citolizinas (CDC), tyrimuose, tBLM formavimui, buvo pasirenkamas fosfolipidų mišinys, turintis cholesterolio. Literatūrinėje dalyje, 1.4.3 skyriuje buvo aprašytas

CDC veikimas, kuris stebimas cholesterolio turinčiose membranose, kurio metu formuojamos labai didelės oligomerinės transmembraninės poros, sudarytos iš 50 monomerų, kurių diametras didesnis nei 150 Å ir gali siekti iki 450 Å.

2.1 VLY įsiterpimas į tBLM

VLY sukelti EIS spektrų pokyčiai (II.10 pav.) vizualiai yra panašūs į spektrus, kuriose poras formuojantis toksinas – α -HL įsiterpia į tBLM, suformuodamas poras ir stipriai padidindamas membranos laidumą (McGillivray, Valincius ir kt, 2009). Mūsų tyrimuose, tBLM formavimui buvo pasirinktas fosfolipidas DOPC, turintis abi simetrines alkanų grandinėse, kiekvienoje po nesočią jungtį (18:1), ir pasižymintis žema fazinio virsmo temperatūra, taip pat buvo varijuojamas cholesterolio kiekis membranose nuo 10 % iki 40 % (eritrocitų membranose cholesterolio kiekis yra 20 – 30 %).

tBLM sąveikaudamos su VLY, tampa taip pat stipriai pralaidžios jonams, to pasekoje smarkiai išauga elektrinis membranos laidumas. Tiriant membranos laidumo priklausomybę nuo VLY koncentracijos, gautas beveik tiesiškas tBLM laidumo, kuris apskaičiuotas pritaikius $Y_{tBLM} = 1/R_{def}$, augimas, Bode koordinatėse (II.10 pav). Gauti rezultatai rodo, jog esant sistemoje net labai mažai VLY koncentracijai (10 nM), tBLM laidumas pastebimai padidėja ir toliau didinant toksino koncentraciją iki 55,6 nM, jis tiesiškai didėja ir fosfolipidinė membrana tampa stipriai pralaidi jonams.



II.10 pav. Imobilizuotos dvisluoksnės membranos (tBLM = β -ME : HC18 = 7:3 ir DOPC/CHO 30%) laidumo priklausomybė nuo skirtingų VLY koncentracijų – Bode grafikas 20 °C temperatūroje. Vandeninis tirpalas – NaCl 0,1 M, 10 mM fosfatinėje buferinėje sistemoje, pH 7,4. alfa-HL koncentracijų diapozonas (nM): juoda – 0 nM, raudona– 5,8 nM, mėlyna – 15,6 nM, žalia – 25,6 nM, pilka – 35,6 nM, ruda – 45,6 nM, garstyčių – 55,6 nM. Kiekviena vaginolizino koncentracija sistemoje, išlaikyta apie 30 min.

Įdomu pastebėti, kad tiesiškas laidumo didėjimas, gautas pritaikius ekvivalentinį elektrinį modelį ir išskaičiavus tBLM elektrinius parametrus. Toks modelis yra tinkamas esant nedideliems defektams membranoje < 1 nm, tuo tarpu vaginolizino atveju, poros membranoje gali siekti iki 45 nm, o laidumas iki 600 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$. Tokiu atveju, membranos laidumo įvertinimas tampa komplikuočiau, nes norint įvertinti tokios sistemos paviršiaus tankį iš EIS duomenų, būtina žinoti popaviršinio sluoksnio specifinę varžą ir storį (Valincius ir kt., 2012). Jeigu stebėtume EIS spektrų fazės minimumo poslinkį Bode koordinatėse (II.10 pav.), matome, kad spektras slenkasi į dešinę, bet minimumo padėtis taip pat kinta, ji auga į viršų, priešingai PFT atveju (II.2 pav.). Iš literatūros žinoma, kad fazės minimumas susietas su defektų skaičiumi, dydžiu, pomembrinio sluoksnio storiu, savitąja varža ir Helmholtco talpa, lygtimi (Valinčius ir kt., 2012):

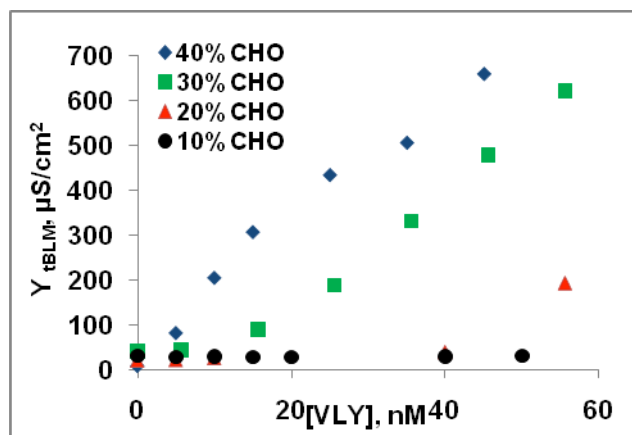
$$\lg(N_{\text{def}}) = 0,93 \lg(f_{\text{min}}) + \lg(k) + 0,2 \lg(r_0) + \text{const.} \quad (3)$$

$$k = d_{\text{sub}} / (\rho_{\text{sub}} * C_{\text{H}}) \quad (4)$$

Kur, $\text{const} = 1,24$, $r_0 =$ defektų dydis, nm, $k = 1,6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, $C_H = 10^{-5} \text{ F/cm}^2$, $f_{\text{min}} =$ fazės minimumo dažnis. Prikabintos fosfolipidinės membranos laike yra stabilios, taigi galime daryti prielaidą, kad natūralių defektų skaičius ir jų dydis taip pat pastovus, taigi spektriniai pokyčiai atsiranda tik dėl VLY įsiterpimo. Remiantis matematine analize, tokie spektriniai pokyčiai atsiranda keičiantis defektų dydžiams sistemoje (Valincius ir kt., 2012, 3 lygtis). Galime daryti prielaidą, kad didėjant VLY koncentracijai, didėja porų skaičius membranoje, kadangi poros susidarymui reikalingi apie 50 monomerų, stebime nevienodo dydžio pažaidas membranoje. Kita vertus yra žinoma, kad membraniniai baltymai, gali formuoti klasterius fosfolipidiniame dvisluoksnyje (Meilhac ir Destainville, 2011). Membraninės poros suformuotos tokių baltymų, linkusios agreguoti į subvienetus, kurie elektriškai elgiasi, kaip ištįsiniai defektai, besiskiriantys savo dydžiu (Valincius ir kt., 2012). Iš to seka, kad tokius spektriniais pokyčiams gali turėti įtakos ir pomembraninio (d_{sub}) storio kitimas, pomembraninio sluosnio savitosios varžos kitimas (ρ_{sub}) ar Helmholco talpos kitimas (C_H) (4 lygtis). Tokie pokyčiai verčia manyti, kad VLY oligomerizacijos į toksiškąją porą stadija gali būti limituojanti VLY įsiterpimo į membraną stadija.

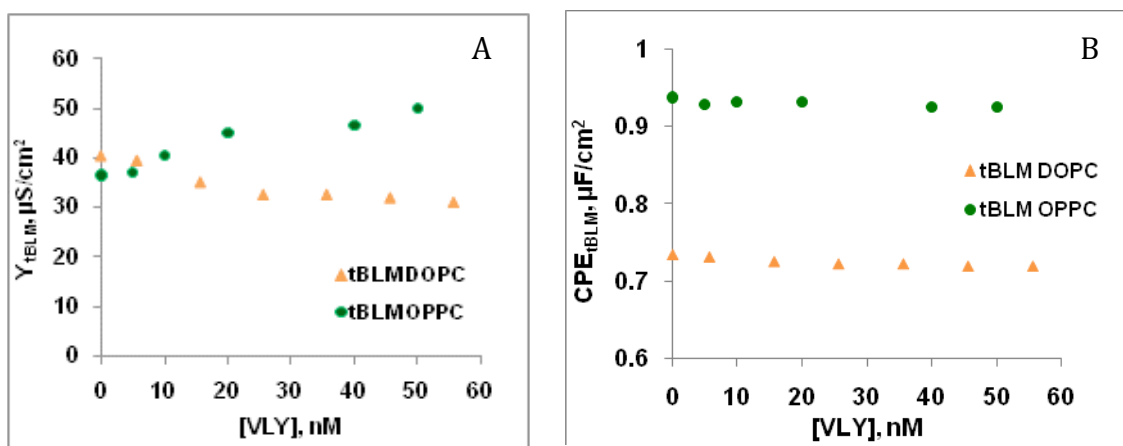
2.2 VLY veikimas priklausomas nuo membranos fosfolipidinės sudėties

Ištirta eilė fizinių parametrų, turinčių įtakos EIS signalams priklausomai nuo baltymo koncentracijos. II.11 pav. patekiamos tBLM membranų laidumo, išskaičiuotos iš $1/R_{\text{def}}$, priklausomybės nuo VLY koncentracijos, kintant membranos dvisluoksniu sudėčiai. Iš literatūros (Tweten, 2005) žinoma, jog VLY kanalų susidarymas yra stipriai veikiamas cholesterolio. Cholesterolio efekto analizei, atlikome membranos laidumo priklausomybės nuo VLY koncentracijos tyrimą, varijuodami cholesterolio kiekį membranoje tirpiklio pakeitimo metodu (žr. aukščiau). Aptikta labai stipri priklausomybė nuo cholesterolio kiekio ir VLY koncentracijos (II.11 pav.).



II.11 pav. VLY kanalų įsiterpimo dinamika, varijuojant membranos fosfolipidine sudėtimi. Membranos laidumo priklausomybė nuo VLY koncentracijos (VLY koncentracijų diapozonas nuo 5,8 nM iki 55,6 nM). Skirtingos sudėties dvisluoksnis buvo formuojamas ant SAM: β -ME : HC18 = 7:3. Dvisluoksniu formavimui, naudojami lipidų mišiniai: DOPC/CHO 10 %, DOPC/CHO 20 %, DOPC/CHO 30 % IR DOPC/CHO 40 %. Kiekviena vaginolizino koncentracija išlaikyta apie 30 min.

Palyginimui, ar toksino veikimas yra pilnai priklausomas nuo cholesterolio, buvo naudojamas DPhPC lipidas, turintis sočias riebalų rūgštis, kuris formuoja membranas, pasižyminčias žema dielektrine skvarba (duomenys nepateikti). Taip pat kontroliniams eksperimentams buvo naudojamos tBLM, suformuotos: tik iš DOPC ir tik iš OPPC. Atlikus eksperimentą su membranomis, neturinčiomis cholesterolio, vaginolizino poveikio membranai nestebime (II.12 pav.). Grafike (II.12 pav. A) pavaizduota tBLM, suformuotos iš DOPC ir OPPC, laidumo priklausomybės nuo VLY koncentracijos, kuriame aiškių laidumo pokyčių neaptikta, net veikiant 55,6 nM VLY koncentracija, kai tuo tarpu membranų, kurių sudėtyje buvo cholesterolio, laidumas išaugdavo iki 70 kartų (II.11 pav.), priklausomai nuo cholesterolio kiekio membranoje. Kitimo neaptikta ir tBLM talpos priklausomybėje nuo VLY koncentracijos, naudojant DOPC membraną (II.12 pav. B).



II.12 pav. Membranų (tBLM = β -ME : HC18 = 7:3 ir DOPC ir OPPC) laidumo (A) ir talpos (B) priklausomybės nuo VLY koncentracijos (VLY koncentracijų diapozonas nuo 5,8 nM iki 55.6 nM).

3. Apibendrinimas

Tiek PTF, α -HL ir PA₆₃, tiek ir nuo cholesterolio priklausomas citolizinas – VLY, sąveikaudami su membrana negrįžtamai jas pažeidžia, formuodami joninius kanalus. Apibendrinant galime teigti, jog EIS metodu detektuojami elektriniai parametrai, ypač R_{def} , taip pat fazės impedanso minimumas bei kompleksinis laidis fazės minimumo taške yra jautrūs funkcionaliai įterptų į tBLM poras formuojančių toksinų paviršiniam tankiui, todėl gali būti panaudojami toksinų ir fosfolipidinių membranų sąveikos tyrimams. EIS metodu, nustatyti poras formuojančių toksinų (α -hemolizino ir juodligės) sąveikos su tBLM detekcijos požymiai yra šie: (i) Cole – cole koordinatėse žemo dažnio srities stiprus EIS spektro išaugimas, dėl talpinio elemento, siejamo su defektais, atsiradimo. (ii) Bode koordinatėse, EIS spektre, atsiradęs fazės minimumas, atitinkantis suformuotos membranos laidumo reikšmę (Y_{tBLM}) ir sumažėjęs impedanso modulis ($|Z|$).

Ištirta tBLM laidumo priklausomybė nuo α -HL ir PA₆₃ koncentracijų tirpaluose. Gautos netiesinės „laiptuotos“, kintančios laike kreivės, kai toksino koncentracija pastovi, tBLM laidumo priklausomybės nuo α -HL koncentracijos, rodo, jog įsiterpimas vyksta nepusiausvyrinėmis sąlygomis. Apskaičiuoti nedideli jonų judėjimo aktyvaciniai barjerai per α -HL (8,7 kJ/mol) ir PA₆₃ (7 kJ/mol) suformuotas

poras rodo, jog abu toksinai formuoja vandens pripildytas poras membranoje, kuriose jonai „juda“ kanalo viduje, taip pat kaip ir tirpale. Įterptų į fosfolipidinę membraną, α -HL ir PA₆₃ toksinų kanalų funkcionalumas įrodytas atlikus eksperimentą su skirtingos molekulinės masės PEG.

Ištirta VLY sąveika su fosfolipidiniai membranų modeliais ir gauta apatinė toksino detekcijos riba 5,8 nM. Išaugęs tBLM elektrinis membranos laidumas, priklauso nuo vaginolizino koncentracijos ir nuo cholesterolio kiekio membranoje. VLY atveju atsirandantys EIS spektriniai pokyčiai, remiantis matematine analize (Valincius ir kt., 2012), susieti su besikeičiančiais defektų dydžiais sistemoje, didėjant VLY koncentracijai. Įrodyta, kad VLY veikime būtinas cholesterolis, kitaip toksinas išlieka nefunkcionalus.

III SKYRIUS. A β ₁₋₄₂ oligomerų ir tBLM sąveikos bei neurotoksiškumo tyrimas

Ivadas

Alzheimerio ligos metu, A β ₁₋₄₂ amiloidinių struktūrų sukiamas neurotoksiškas mechanizmas dar nėra pilnai suprastas. Dėl savo molekulinės struktūros, A β gali jungtis ir sąveikauti su įvairiomis biomolekulėmis: lipidais, baltymais, proteoglikanais. Sąveika su membranos lipidais, sukelia katastrofišką įvykių kaskadą: A β – lipidų sąveika padidina β -amiloidų išmetimą/fibriliaciją/agregaciją ir paeiliui pakeičia dvisluoksnio savybes, suardo membranos takumą ir funkcijas (Vestergaard ir kt., 2008). Galiausiai, vienareikšmio atsakymo, kaip tirpūs A β oligomerai sąveikauja su neuronų membrana ir kaip ją pažeidžia, sukeldami AL ligą, vis dar nėra aišku. Iškyla klausimas: kokios sąsajos yra tarp amiloidų morfologijos, struktūros ir toksiškumo? Galimas dalykas, kad amiloidų oligomerai nors ir formuojasi iš tos pačios baltymo sekos, bet priklausomai nuo paruošimo sąlygų, gaunami skirtingos ne tik morfologijos, bet ir struktūros amilodiniai dariniai (Glabe, 2008). Tam tikri tirpūs A β oligomerai matyt ir yra ankstyvosios AL ligos požymis, bet kurie iš jų yra toksiškiausi?

Šiame darbe pagrindinis tikslas buvo išsiaiškinti galimų veiksnių, kurie molekuliname lygyje gali būti susiję su biocheminiais ir biofizikiniiais reiškiniais, iššaukiančiais ar skatinančiais Alzheimerio ligą. Tuo tikslu buvo siekiama gauti maksimalaus citotoksinio poveikio A β ₁₋₄₂ oligomerus, kurie turi įtakos kultivuojamų žiurkės smegenėlių neuronų gyvybingumui. Siekiant pagrindinio darbo tikslo, pirmiausia buvo svarbu nustatyti *in vitro* suformuotų, toksiškųjų A β ₁₋₄₂ oligomerų morfologiją, pasitelkiant atominės jėgos mikroskopiją, DLS, fluorescentinės koreliacinės spektroskopiją (FCS). O antrinė A β ₁₋₄₂ oligomerų struktūra ir jos pakitimai buvo tiriami apskritiminiu dichroizmu (CD), FTIR, taip pat struktūriniai ypatumai buvo analizuojami SDG metodu fazių riboje vanduo – oras.

Tyrimo darbe, dėmesys buvo tikslingai nukreipiamas į A β ₁₋₄₂ oligomerų sąveiką su fosfolipidiniaisiais membranų modeliais, panaudojant FCS ir elektrocheminio impedanso metodus, bandant išsiaiškinti koku mechanizmu ar principu vyksta fosfolipidinės membranos pažeidimas.

Rezultatai ir jų aptarimas

1. A β ₁₋₄₂ agregatų morfologijos ir struktūros tyrimas

1.1 Patogeninių β – amiloido oligomerų (agregatų) formavimas *in vitro*

Daugelis skirtingų pasaulio laboratorijų priklausomai nuo paruošimo sąlygų *in vitro* aprašo oligomerus, kurie tarpusavyje skiriasi dydžiu, morfologija ir toksiškumu (Kayed ir kt., 2003, Blaine Stine ir kt., 2003). Amiloidų oligomerai nors ir formuojasi iš tos pačios baltymo sekos, bet priklausomai nuo paruošimo sąlygų gaunami skirtingos ne tik morfologijos, bet ir struktūros amilodiniai dariniai (Glabe, 2008). Taip pat buvo parodyta, kad tirpių amiloidų formos stipriai koreliuoja su AL ligos sunkumo lygiu (Bernstein ir kt., 2009). Šį teiginį pagrindė ir mūsų darbo grupė, pademonstravusi sąryšį tarp A β ₁₋₄₂ oligomerų toksiškumo ir dydžio, kuris yra detaliam aprašomas parengtoje publikacijoje: *Paulius Cizas**, *Rima Budvytyte**, *Ramune Morkuniene*, *Radu Moldovan*, *Matteo Broccio*, *Mathias Loesche*, *Gediminas Niaura*, *Gintaras Valincius*, *Vilmante Borutaite*. *Size – dependent neurotoxicity of β -amyloid oligomers. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2010:496(2):84 – 92.*

Tyrimų metu buvo siekiama ne tik gauti maksimalaus citotoksinio poveikio oligomerus, bet ir išsiaiškinti oligomerizacijos sąlygų, pirmiausia terpės, kurioje ji vyksta, sudėties įtaką oligomerizacijos spartai, gyliui bei besiformuojančių struktūrų dydžiui, todėl eksperimentai buvo atliekami skirtingomis oligomerizacijos sąlygomis.

Tam, kad fibrilės ir oligomerai susidarytų *de novo*, būtų išvengta nuosėdų (angl.: seeding), β -amiloidas pirmiausia buvo tirpinamas poliniame

fluorintame tirpiklyje HFIP, kuris suardo amiloido agregatus bei sukelia peptido α -spiralizaciją, nebelieka β klosčių darinių, galinčių skatinti priešlaikinę fibrilizaciją (Blaine Stine ir kt., 2003).

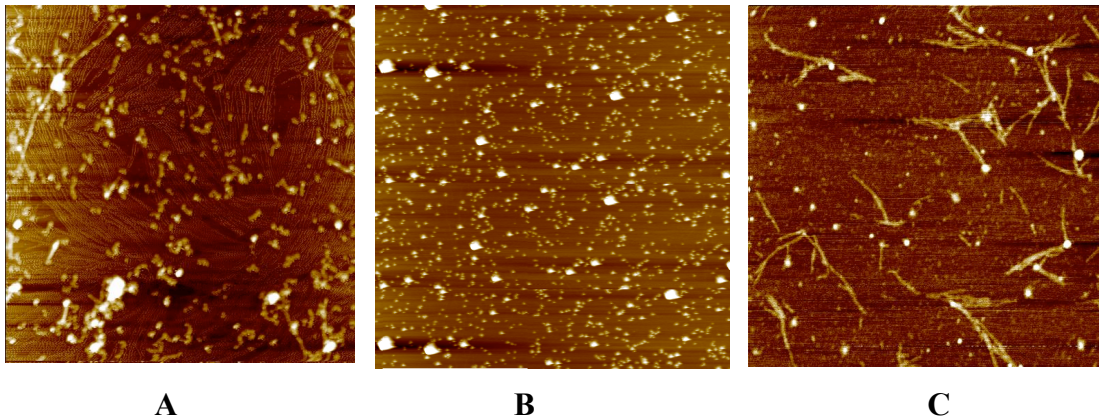
1.2 $A\beta_{1-42}$ oligomerų ir fibrilių charakterizavimas atominės jėgos mikroskopu

Oligomerinių darinių charakterizavimui bei oligomerizacijos proceso valdymui naudojome didelės skiriamosios gebos atominės jėgos mikroskopiją. Vienas iš pagrindinių šio darbo etapo tikslų – nustatyti oligomerizacijos sąlygų įtaką tiek oligomerinio ruošinio polimorfiškumui įvertinti, tiek detaliam iširti oligomerinių darinių morfologiją. Tuo tikslu buvo varijuojama $A\beta_{1-42}$ peptidų inkubacijos temperatūra, inkubacijos laiku ir HFIP skirtinga koncentracija, gauti pavyzdžiai vaizdinami atominės jėgos mikroskopu.

Inkubacijos laiko įtaka $A\beta_{1-42}$ peptidų savaiminei organizacijai. Siekiant įverti oligomerizacijos sąlygų įtaką amiloidų polimorfiškumui buvo tirta agregacijos lygio priklausomybė nuo inkubacijos laiko. Analizei imti mėginiai iš oligomerų formavimo sąlygomis paruoštų pavyzdžių po 24 val., 48 val. ir 72 val. inkubacijos laiko ir su AJM gauti kiekvieno pavyzdžio vaizdai nepateikti). Gauti rezultatai rodo, kad $A\beta_{1-42}$ oligomerų struktūra labai priklauso nuo inkubacijos laiko. Tomis pačiomis sąlygomis $A\beta_{1-42}$ oligomerų dydis po 24 val. $\sim 3 - 5$ nm, po 48 val jau pastebimi didesni oligomerai – $\sim 6 - 10$ nm, o po 72 val. net pastebimos fibrilių užuomazgos ir įvairūs protofibriliniai dariniai. Analizės rezultatai sutampa su skelbtais literatūroje (Blaine Stine ir kt., 2003), kurioje teigiama, kad $A\beta_{1-42}$ oligomerų agregacijai turi įtakos inkubacijos laikas ir, kad stabilūs oligomerai gaunami po 24 val. ir po 48 val. inkubacijos laiko.

Temperatūros įtaka $A\beta_{1-42}$ peptidų savaiminei organizacijai. Jau seniai žinoma, kad temperatūra yra svarus faktorius fibrilių formavime (Tjernberg ir kt., 1999) šiuo atveju buvo patikrinta temperatūros įtaka ruošiant $A\beta_{1-42}$ oligomerinėmis sąlygomis. Paruošti $A\beta_{1-42}$ monomerai buvo inkubuojami skirtingose: 4 °C, kambario ir 37 °C temperatūrose, o gauti pavyzdžiai vaizdinami atominės jėgos mikroskopu (III.1 pav). Buvo nustatyta, kad

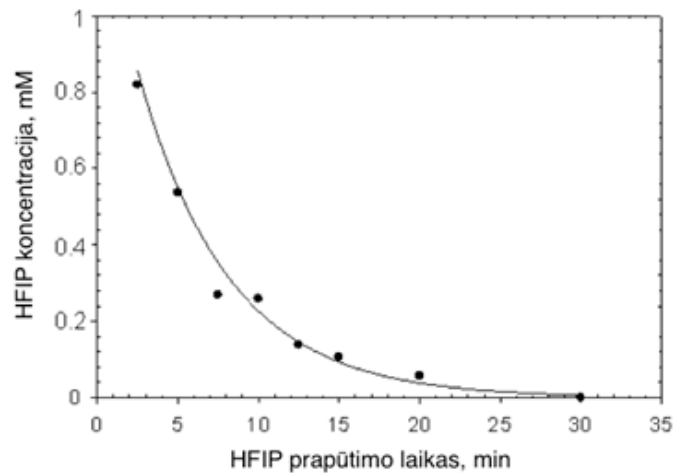
priklausomai nuo inkubacijos temperatūros susidaro skirtingų matmenų ir formos oligomerų agregatai. Aukštesnėje temperatūroje susidaro daugiau protofibrilės nei oligomerai (III.1 pav. C), o žemesnėje temperatūroje – kitokios morfologijos $A\beta_{1-42}$ dariniai (III.1 pav. A). Toks rezultatas pilnai sutampa su literatūros aprašu (Blaine Stine ir kt., 2003)



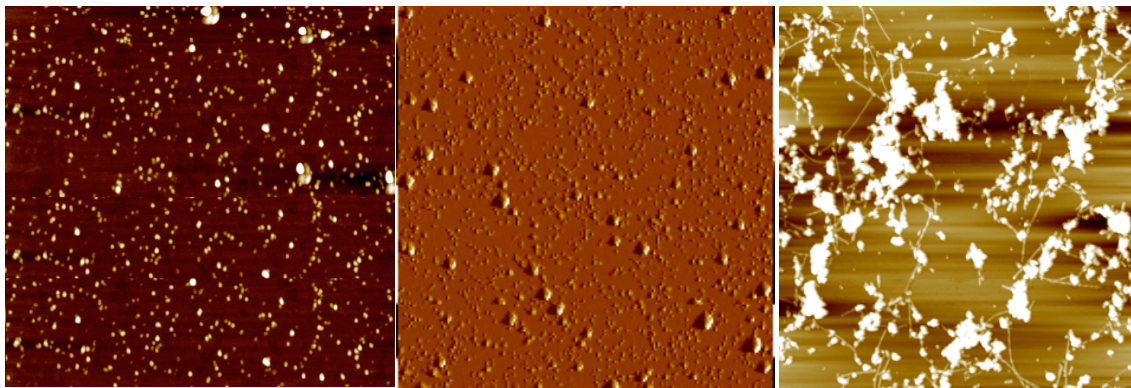
III.1 pav. $A\beta_{1-42}$ oligomerai, po 24 h inkubacijos oligomerizacijos sąlygomis 4 °C (A), kambario (B) ir 37 °C (C) temperatūroje. AFM pavaizduotų topografinių vaizdų skenavimo laukai: A ir C – 3,5 x 3,5 μm , o B – 8 x 8 μm , x – y. Visais atvejais $A\beta_{1-42}$ peptidų koncentracija ant žėručio buvo 10 μM .

$A\beta_{1-42}$ oligomerų morfologijos priklausomybė nuo HFIP koncentracijos.

Kaip jau buvo minėta, visi fluorinti alkoholiai, įskaitant ir HFIP, nutraukia baltymų β -klostes ir suardo hidrofobines sąveikas amiloidų agregatuose. $A\beta_{1-42}$ peptidų tirpinimas HFIP yra inicijuojanti oligomerizacijos stadija, kuri padeda atsiriboti nuo pradiniame tirpale jau preegzistuojančių struktūrų. Todėl svarbu nustatyti likusio, po prapūtimo azotu vienoje iš oligomerizacijos stadijų, HFIP kiekio įtaką oligomerizacijos procesams. Tuo tikslu buvo paruošti trys $A\beta_{1-42}$ oligomerų pavyzdžiai, turintys skirtingą HFIP kiekį, kuris buvo nustatytas iš IR spektroskopijos duomenų, reguliuojant N_2 prapūtimo laiką (III.3 pav) ir stebint kaip mažėja juostos, ties 1192 cm^{-1} , intensyvumas, kuri siejama su asimetriniu CF_3 grupių virpėjimu. Paruošti mėginiai analizuojami su AFM (III.3 pav).



III.2 pav. HFIP koncentracijos priklausomybė nuo prapūtimo laiko, vandeniniame tirpale, reikšmės išmatuota iš IR suderties ties 1192 cm^{-1} .



A

B

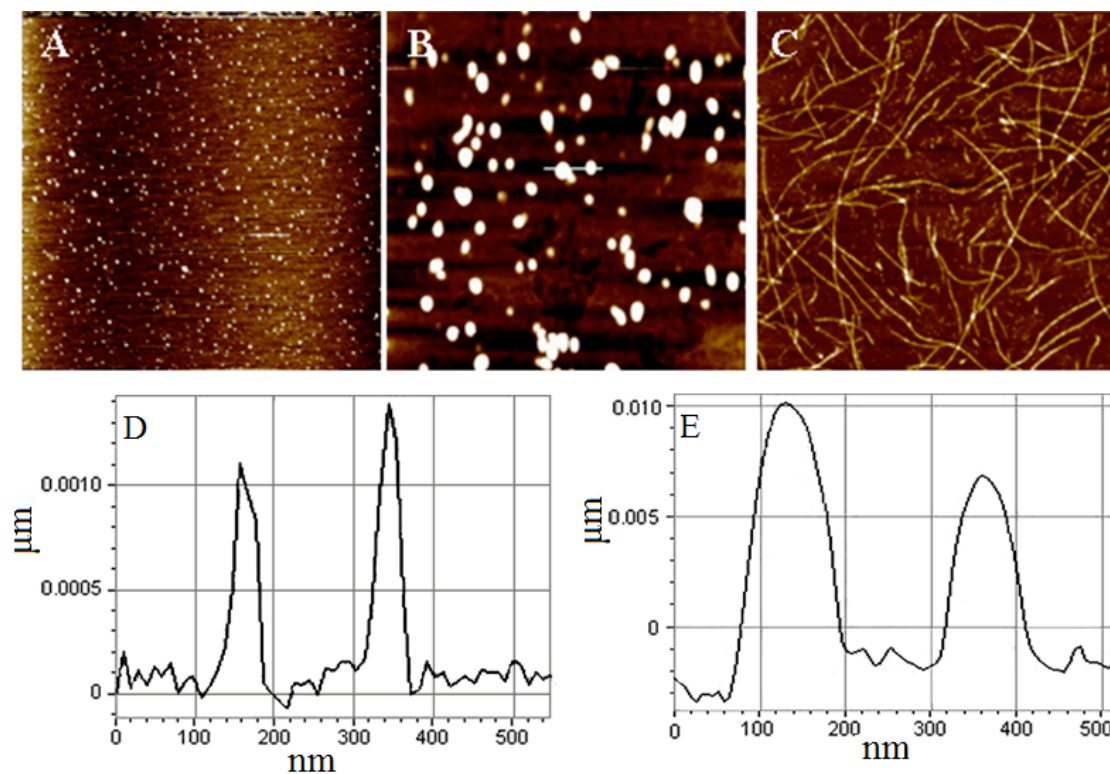
C

III.3 pav. $A\beta_{1-42}$ oligomerai, po 24 h inkubacijos, oligomerizacijos sąlygomis, kuriuose yra skirtingas HFIP kiekis: **(A)** 5 % – prapūtimo laikas azotu 5 min, **(B)** 3,5 % – prapūtimo laikas azotu 7 min ir **(C)** 0 % – prapūtimo laikas azotu 30 min. AJM pavaizduotų topografinių vaizdų skenavimo laukas: A ir B – $8 \times 8\ \mu\text{m}$, o C – $3,5 \times 3,5\ \mu\text{m}$. Visais atvejais $A\beta_{1-42}$ peptidų koncentracija ant žėručio buvo $10\ \mu\text{M}$.

Gauti rezultatai parodė, kad HFIP kiekis turi įtakos oligomerizacijos procesui ir yra kritiškas $A\beta_{1-42}$ oligomerų dydžiui: 5 % pavyzdyje oligomerų dydis $\sim 3 - 4,5\ \text{nm}$ (III.3 pav, **A**); 3,5 % pavyzdyje – $\sim 3 - 8\ \text{nm}$ (III.3 pav, **B**); 0 % pavyzdyje – jau susidaro įvairūs agregatai ir net fibrilių užuomazgos (III.3 pav, **C**).

Ištobulinus turimus protokolus gavome ryškiai skirtingas homogeniškas preparacijas, besiskiriančias oligomerų dydžiu ir morfologija

(III.4 pav). III.4 pav. pavaizduotos oligomerų formos, gautos atitinkamai panaudojus skirtingus paruošimo protokolus: *protokolą I, II ir III*. AJM pagalba gauti mikrovaizdai parodė, kad preparacijos skiriasi ne tik morfologija (oligomerai ir fibrilės), bet ir pačių oligomerų dydis priklauso nuo paruošimo protokolo. AJM vaizdų analizė, parodė, kad oligomerų, paruoštų pagal *protokolą I*, išmatuotas vidutinis dydis, pagal z – aukštį, 1 – 3 nm (III.4 pav. A ir oligomerų profilio pjūvis – D), pavieniais atvejais oligomerų dydis siekia 4 – 5 nm. Tuo tarpu ruošiant agregatus pagal *protokolą II*, gaunamos didesnės sferinės dalelės, kurių dydis 5 – 10 nm (III.4 pav. B ir oligomerų profilio pjūvis – E). Pagal III protokolą, gaunamos skirtingos morfologijos agregatai – netirpios fibrilės. Lateraliniam agregatų dydžiui turi įtakos naudojamų AJM adatų fiziniai parametrai.

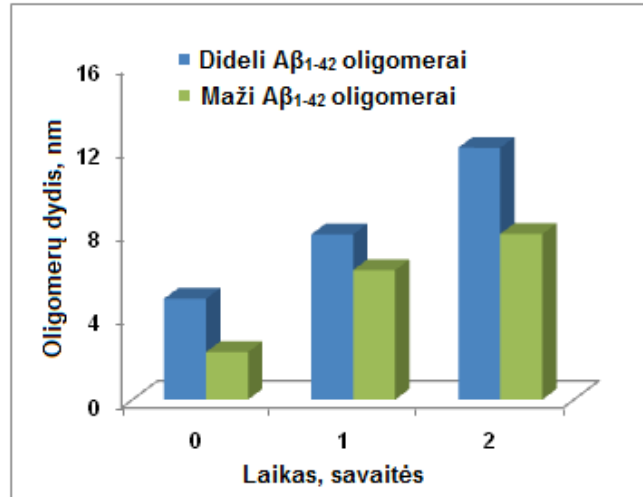


III.4 pav. $A\beta_{1-42}$ peptidai formuojant oligomerinėmis sąlygomis naudojant *I, II ir III protokolus*. **A, D** – $A\beta_{1-42}$ oligomerai po 24 val inkubacijos, naudojant *protokolą I*. Pavaizduotas AJM topografinis vaizdas $4 \times 4 \mu\text{m}$, x – y. Apačioje (**D**) pavaizduotas oligomerų profilio pjūvis, z – aukštis, pagal kurį gauname 1 – 3 nm dydžio daleles. **B, E** – $A\beta_{1-42}$ oligomerai po 24 val inkubacijos, suformuoti naudojant *protokolą II*. Pavaizduotas AJM topografinis vaizdas $4 \times 4 \mu\text{m}$, x – y. Apačioje (**E**) pavaizduotas oligomerų profilio pjūvis, z – aukštis, pagal kurį gauname 4–10 nm dydžio daleles. **C** – $A\beta_{1-42}$ fibrilės, suformuotos, naudojant *protokolą III*. Pavaizduotas AJM topografinis

vaizdas $4 \times 4 \mu\text{m}$, $x - y$, gaune iki $1 \mu\text{m}$ ilgio fibriles. Visais atvejais $A\beta_{1-42}$ peptidų koncentracija buvo $10 \mu\text{M}$.

Kaip parodė eksperimentai, $A\beta$ oligomerų toksiškumo lygis yra priklausomas nuo agregacijos, ir turi įtakos kultivuojamų žiurkių smegenėlių neuronų gyvybingumui. Didžiausiu neurotoksiškumo pasižymi oligomerai, kurių dydis, išmatuotas AJM yra $1 - 3 \text{ nm}$.

$A\beta_{1-42}$ oligomerų stabilumas laike. Siekiant įverti suformuotų $A\beta_{1-42}$ oligomerų stabilumą buvo tirtas skirtingų bandinių oligomerų dydžio pokytis laike. Tuo tikslu pavyzdžiai buvo laikomi $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje ir jų morfologija stebima AJM. Analizei imti mėginiai iš oligomerų, paruoštų pagal *I ir II protokolą*, po 1, 2 ir 3 savaičių ir su AJM gauti kiekvieno pavyzdžio vaizdai ir atidėta $A\beta_{1-42}$ oligomerų dydžio priklausomybė nuo laikymo trukmės (III.5 pav.). Matome, kad oligomerai yra nestabilios ir laike kintančios struktūros. Po dviejų savaičių bandinyje, mes jau turime didelius $\sim 10 \text{ nm}$ dydžio oligomeras, kurie nebepasižymi neurotoksiškumu (Cizas ir Budvytyte R ir kt., 2010).



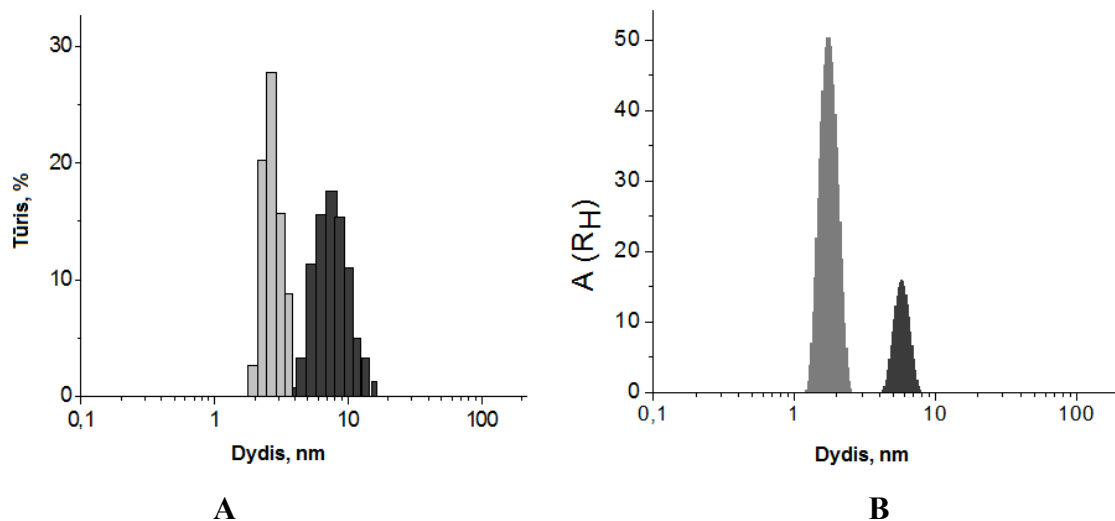
III.5 pav. $A\beta_{1-42}$ oligomerų, suformuotų pagal *I ir II protokolą*, stabilumas laike.

1.3 $A\beta_{1-42}$ oligomerų formų morfologiniai tyrimai koreliacinės fluorescencinės spektroskopijos ir dinaminės sklaidos metodais

Kadangi visi AFM tyrimai, buvo atliekami ore, buvo patikrinta ar tirpale taip pat gaunami skirtingo dydžio amiloidų bandiniai. Tuo tikslu, $A\beta_{1-42}$

oligomerinių darinių dydžio charakterizavimui buvo panaudoti du dalelių dydžiui jautrūs metodai - fluorescencijos koreliacijos ir dinaminės sklaidos metodai. FCS matavimams buvo naudojamas žymėtas HiLyte Fluor™ 555 Ab₁₋₄₂ peptidas, kuris oligomerų bandiniuose sudarė 0,2 mol%.

Naudojant FCS 3D difuzijos matavimus tirpale, buvo įvertinti β -amiloidų oligomerų difuzijos koeficientai ir išskaičiuojami dydžiai pagal Stokes – Einstein dėsnį. FCS ir DLS matavimų rezultatai sutapo tarpusavyje ir parodė tikslų A β_{1-42} oligomerų dydį tirpale (III.6 pav). Naudojant FCS 3D difuzijos matavimus tirpale, gaunamos oligomerų fluorescentinės koreliacinės kreivės ir panaudojus programos IGOR PRO logaritmą buvo gaunami skirtingų β -amiloidų oligomerų difuzijos koeficientai: mažų oligomerų (1 – 4 nm) atveju difuzijos koeficientas 81,64 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, didelių oligomerų (4 – 10 nm) atveju – 40,8 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Panaudojus *protokolus I, II*, gautos dydžio pasiskirstymo priklausomybės, besiskiriančios oligomerų dydžiu (III.6 pav). A β_{1-42} oligomerai po 24 val inkubacijos, naudojant *protokolą I*, gaunami 1 – 4 nm dydžio. Naudojant *protokolą II*, gaunama 4 – 10 nm dydžio A β_{1-42} oligomerus (III.6 pav.).

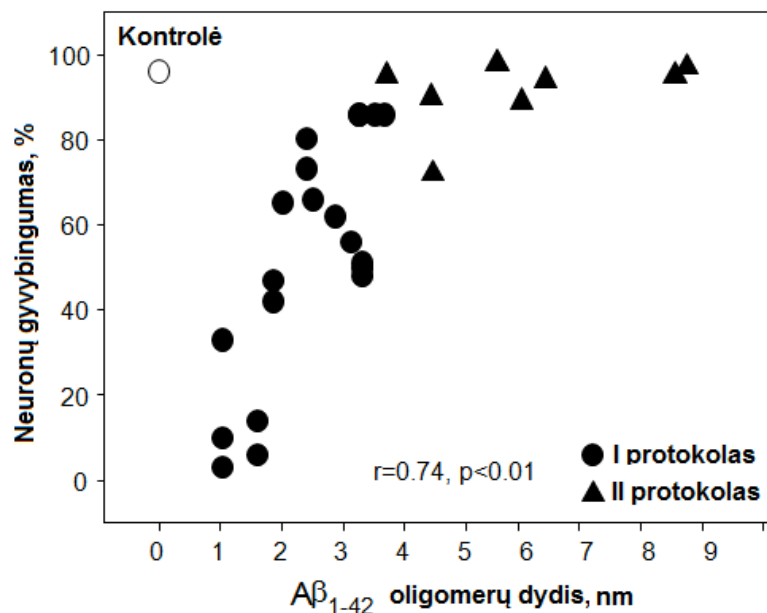


III.6 pav. Skirtingai paruoštų A β_{1-42} oligomerų pasiskirstymas pagal dydį. **A** DLS rezultatai: šviesiai pilka – mažieji oligomerai formuoti pagal *protokolą I*; tamsiai pilka – didieji oligomerai, formuoti pagal *protokolą II*. **B**. FCS rezultatai: A β_{1-42} oligomerų apskaičiuotas pasiskirstymas pagal dydį: šviesiai pilka – formuoti pagal *protokolą I*; tamsiai pilka – pagal *protokolą II*.

Skirtingais protokolais paruošti $A\beta_{1-42}$ oligomeriniai bandiniai buvo analizuojami masių spektrometrijos metodu. Išanalizavus masių spektrometrijos spektrus buvo gauta, kad mažų amiloidų oligomerų, suformuotų pagal *I protokolą*, mėginyje, aptikti 2 – 18 kDa m/z peptidai, tuo tarpu didelių amiloidų oligomerų, suformuotų pagal *II protokolą*, mėginyje aptikti 2 – 45 kDa m/z peptidai (Cizas, Budvytyte ir kt., 2010). Rezultatas patvirtino, kad turime ir tirpaluose ir „sausomis“ sąlygomis, skirtingi oligomerizacijos protokolai duodavo skirtingo dydžio $A\beta_{1-42}$ oligomerus.

1.4. $A\beta_{1-42}$ oligomerų neurotoksiškumo ir struktūros ryšio nustatymas

Ryšys tarp $A\beta_{1-42}$ oligomerų toksiškumo ir dydžio yra demonstruojamas ir detaliam aprašomam parengtoje, jau minėtoje publikacijoje (Cizas, Budvytyte ir kt., 2010) ir pateiktas III.7 paveiksle.



III.7 pav. Neurotoksiškumo priklausomybė nuo $A\beta_{1-42}$ oligomerų dydžio. Agregatų dydis įvertintas AJM metodu, pagal z – aukštį. $A\beta_{1-42}$ oligomerai paruošti panaudojant I ir II protokolus. Neuronų kultivuojamos ląstelės buvo veikiamos 1 μ M $A\beta_{1-42}$ oligomerais, 24 val. Kiekvienas taškas rodo skirtingų oligomerų poveikį, skirtingoms neuronų kultūroms¹.

¹ Šiame III.7 grafike, pateikti duomenys yra gauti kartu bendradarbiaujant su LSMU Biomedicinių Tyrimo instituto doktorantu. Pauliumi Čižu, kuris atliko neuronų gyvybingumo tyrimus (y ašis), o oligomerų dydį, kiekvienu konkrečiu atveju (x ašis) nustačiau aš, VU Biochemijos institute.

Gauta, kad mažos, 1 – 3 nm pagal z – aukštį, $A\beta_{1-42}$ dalelės (*protokolas I*), pasižymėjo didžiausiu citotoksiniu poveikiu kultivuojamų žiurkės smegenėlių neuronų gyvybingumui²: po 24 val. Inkubacijos tik 10 – 40 % išliko gyvybingi (III.7 pav.). Taip pat įrodyta, kad $A\beta_{1-42}$ neurotoksiškumas krenta, didėjant oligomerų dydžiui. Vidutinio dydžio $A\beta_{1-42}$ oligomerai, kurių dydis siekia 3 – 5 nm (pagal z – aukštį), atsitiktinai gali susidaro tiek naudojant tiek I, ir tiek II protokolus. Ląstelių gyvybingumas jų atveju, siekia 50 – 85 %. $A\beta_{1-42}$ oligomerai, kurių dydis 5 – 9 nm, pagal z – aukštį, (*protoklas II*), nebuvo toksiški neuronams, ląstelių gyvybingumas šiuo atveju išliko 90 % ir daugiau (III.7 pav.).

Rezultatai parodė, kad neurotoksiškumas visgi labiau priklauso nuo $A\beta_{1-42}$ oligomerų dydžio, nei nuo naudojimo protokolo jų paruošimui. Jeigu mažosios $A\beta_{1-42}$ frakcijos, paruoštos pagal protokolą I, yra pagrindinės citoksinės dalelės, tai didesnės dalelės, gautos naudojantis abiem protokolais, parodė palyginamai mažą citotoksiškumą. O $A\beta_{1-42}$ fibrilės buvo visai netoksiškos (rezultatas nepateiktas). Parodyta, kad $A\beta_{1-42}$ spontaniškai savaime linkę agreguotis į koegzistuojančias daugialypes fizikines formas: mažus oligomerus, didelius oligomerus, protofibriles, fibriles.

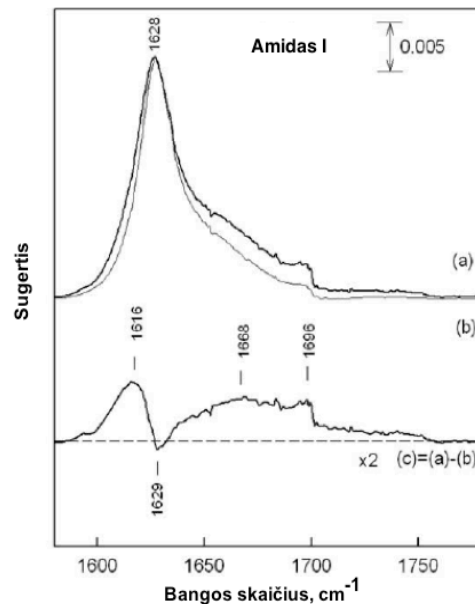
1.5. $A\beta_{1-42}$ oligomerų antrinės struktūros elementų nustatymas

FTIR spektroskopija

Virpesinė spektroskopija – vienas jautriausių, šiuo metu, žinomų metodų tinkamų molekulės struktūros ir sąveikos tyrimams. Galima tikėtis, jog skirtinga $A\beta_{1-42}$ polipeptidų organizacija (fibrilės ir oligomerai) pasižymės tam tikrais skirtumais virpesiniuose spektruose. Spektriniuose tyrimuose, naudojami tie patys pavyzdžiai kaip ir atominės jėgos mikroskopijos eksperimentuose, kadangi ieškoma koreliacijų tarp polipeptidinės grandinės morfologijos (oligomerai ir fibrilės) ir virpesinių juostų parametrų.

² Mišrios žiurkės smegenėlių neuronų-glijos kultūros buvo auginamos ir stebimas jų gyvybingumas mūsų partnerių iš LSMU, BMTI.

Nors iš pirmo žvilgsnio A β_{1-42} oligomerų, tiek dideliu, tiek mažų, FTIR spektrai 1000 – 1800 cm⁻¹ ruože gana panašūs (III.8 pav a ir b.), detalesnė analizė įgalino nustatyti keletą svarbių skirtumų. Abiejų A β_{1-42} oligomerinių pavyzdžių spektruose vyrauja juosta ties 1628 cm⁻¹, kuri atitinka oligomerų amidinio ryšio virpesį – amidas I (III.8 pav a ir b). Virpesio dažnis koreliuoja su polipeptido antrine struktūra (Chu ir Lin, 2001).



III.8 pav. FTIR pralaidumo spektrai 1000 – 1800 cm⁻¹ ruože: (a) toksiškų A β_{1-42} oligomerų, suformuotų pagal protokolą I; (b) Netoksiškų A β_{1-42} oligomerų, suformuotų pagal *protokolą II*; (c) skirtuminis spektras.

Amido I virpesio dažnis vienareikšmiškai rodo, kad polipeptido grandinės pagrindinė struktūra – β -klostės. Taigi, mūsų spektriniai duomenys rodo, jog vandeniniame tirpale A β_{1-42} oligomerų polipeptidinė grandinė pagrinde yra β -klostinės struktūros. Žemo intensyvumo, aiškiai neišreikšta juosta, ties 1662 – 1663 cm⁻¹ susijusi su peptidinės grandinės posūkais (III.8 pav). Skirtuminiame A β_{1-42} oligomerų FTIR spektre (III.8 pav. c) išryškėja skirtumai Amido I spektriniame regione. Skirtuminiame spektre išryškėja dvi teigiamos juostos ties 1616 ir 1696 cm⁻¹. Pirmoji juosta, toksiškųjų A β_{1-42} oligomerų atveju, šiek tiek pasislenka, kas gali būti siejama su kitokia β -klosčių struktūros organizacija dėl vidumolekulinės β -klosčių sąveikos (Khurana ir Fink, 2000). Aukšto dažnio komponentas (1696 cm⁻¹) yra taip pat

siejamas su vidumolekuline β -klosčių struktūra. Plati teigiama juosta ties 1668 cm^{-1} rodo didelį kiekį linkių ir kilpų.

Apskritiminis dichroizmas

Apskritiminis (žiedinis) dichroizmas (CD) apibrėžiamas kaip sugerties skirtumas tarp kairio- ir dešinio- sukinio sugeriant poliarizuotą šviesą. Atskirų molekulių apskritiminis dichroizmas atsiranda dėl molekulių chiralizmo ir asimetriškumo, todėl CD yra plačiai pritaikomas tiriant biomolekules (baltymus, nukleorūgštis) (Stephen ir kt., 2008). Baltymų antrinė struktūra nustatoma iš tolinojo UV spektro. Nors jis yra mažiau tikslus, nei NMR ar BMR, jis lengvas ir greitas ir turi privalumų, bes baltymai matuojami tirpale. CD baltymų spektrai matuojami nuo 180 iki 270 nm, kuriuose jei yra dominuojančių struktūrų pikai: α -spiralė – du neigiami pikai ties 208 nm ir 222 nm ir stipriai teigiama juosta ties 191–193 nm; antiparalelinė β -klostė – neigiama juosta ties 210 – 225 nm ir stipresnė teigiama ties 190 – 200 nm; β -linkis – neigiama juosta ties 220 – 225 nm ir stipresnė teigiama ties 207 nm; netaisyklingos struktūros – neigiama juosta ties 198 nm (Kelly ir kt., 2005).

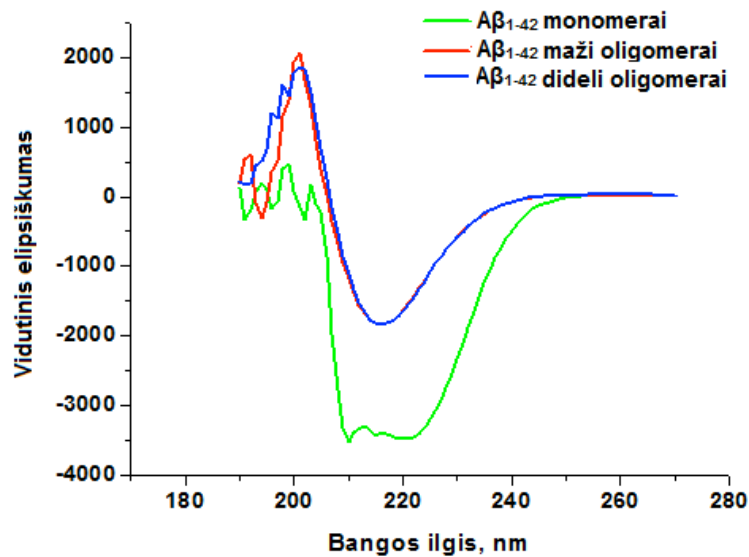
Gauti CD spektrai pateikti III.8 paveiksle ir perskaičiuoti į vidutinius aminorūgščių elipsinius vienetus pagal:

$$[\theta]_{\text{mrw}} = \frac{S \times \text{MRW}}{10 \times C_{\text{mg/ml}} \times L} \quad (1)$$

kur, θ – vidutinis aminorūgščių elipsinis vienetas, $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$; S = CD intensyvumas; MRW = baltymo molekulinė masė; C = baltymo koncentracija, mg/ml; L = kiuvetės ilgis, cm.

Iš pateiktų apskritiminio dichroizmo spektrų (III.9 pav.), matome, kad A β_{1-42} monomerų spektras (žalia spalva) atspindi dominuojančią α -spiralinę struktūrą, o A β_{1-42} mažų oligomerų (1 – 3 nm), suformuotų pagal I protokolą, spektras (raudona spalva) rodo dominuojančią β -klosčių struktūrą. A β_{1-42} didelių oligomerų (4 – 10 nm), suformuotų pagal II protokolą (mėlyna spalva),

dominuojanti struktūra – taip pat β -klostės, tai sutampa su FTIR spektriniais duomenimis (III.8 pav.).



III.9 pav. Apskritiminio dichroizmo spektrai. Žalia – $A\beta_{1-42}$ monomerų spektras; Tipinis spektras, atspindintis dominuojančią α -spiralinę struktūrą. Raudona – $A\beta_{1-42}$ maži oligomerai (1 – 3 nm), suformuoti pagal *I protokolą*. Dominuojanti struktūra – β -klostės. Mėlyna – $A\beta_{1-42}$ dideli oligomerai (4 – 10 nm), suformuoti pagal *II protokolą*. Dominuojanti struktūra – β -klostės.

Spektrų analizei buvo naudojama CDPro programa, naudojanti trijų CD analizės programų algoritmus: CONTIN, CDSSTR ir SELCON3. Nors ir $A\beta_{1-42}$ oligomerų toksiškumas ląstelėms, priklausomai nuo jų dydžio, žymiai skiriasi, tačiau išanalizavus CD spektrus, neaptikta skirtumų oligomerų antrinėje struktūroje.

III.1 lentelė. $A\beta_{1-42}$ oligomerų, suformuotų naudojant *I* ir *II protokolus*, ir $A\beta_{1-42}$ monomerų antrinės struktūros komponentų pasiskirstymas (Cizas, Budvytyte ir kt., 2010).

Peptidas $A\beta_{1-42}$	α -spiralės	β -klostės	Linkiai	Nenustatytos struktūros
$A\beta_{1-42}$ monomerai	71,1 %	12,5 %	8,0 %	8,4 %
$A\beta_{1-42}$ maži oligomerai, protokolai I	4,5 %	42,8 %	20,6 %	32,1 %
$A\beta_{1-42}$ dideli oligomerai, protokolai II	3,8 %	42,5 %	21,5 %	32,2 %

Gauti rezultatai, pateikti III.1 lentelėje, rodo kad $A\beta_{1-42}$ oligomeruose, suformuotuose skirtingais protokolais, dominuoja β -klostinės struktūros – 43%, taip pat yra apie 32 % nenustatytų struktūrų, apie 21 % linkių ir 4 % α -spiralių. Tuo tarpu užrašytas CD spektras $A\beta_{1-42}$ monomerų rodo, kad dominuojanti struktūra tokioje preparacijoje yra α -spiralės net 71 % (Cizas, Budvytyte ir kt., 2010), ši vertė didesnė nei literatūroje aprašyta 53 % (Blaine Stine ir kt., 2003), tokį rezultatą galėjo sąlygoti paruošime naudojamas veikimas ultragarsu.

1.6 $A\beta_{1-42}$ darinių detekcija suminio dažnio generacijos spektroskopijos metodu

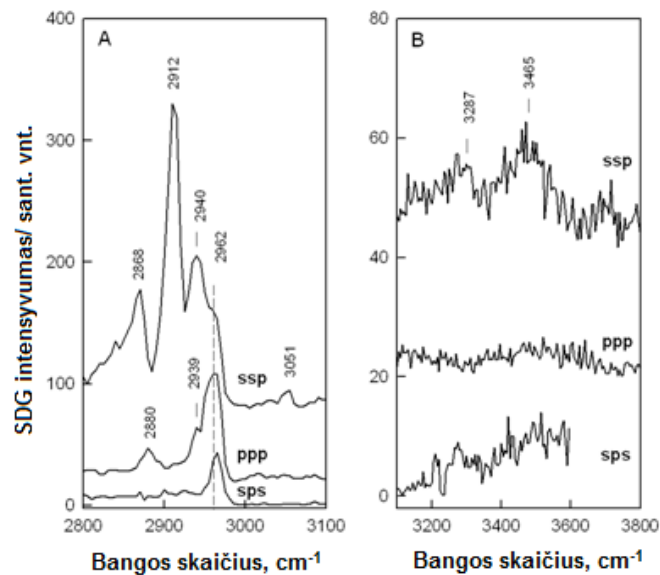
Kaip jau buvo minėta, oligomerų toksiškumas ypatingai stipriai priklauso nuo jų morfologijos. Palyginimui, skirtingo oligomerizacijos laipsnio $A\beta_{1-42}$ dariniai t.y. trys skirtingos preparacijos: maži ir dideli oligomerai ir fibrilės, buvo analizuojamos, suminio dažnio generacijos metodu, oro/vandens fazių riboje.

$A\beta_{1-42}$ darinių, atskirų funkcinių grupių orientacijos įvertinimui fazių riboje, buvo registruojami SDG spekrai, esant trimis skirtingoms spindulių poliarizacijų kombinacijoms: ssp (s – SDG spindulys, s – 532 nm spindulys, p – IR spindulys), ppp ir sps. Žinoma, kad ssp rezonansus generuoja tik tos molekulinės grupės, kurių virpesio perėjimo dipolis orientuotas statmenai paviršiaus atžvilgiu, tuo tarpu sps rezonansus generuoja molekulinės grupės, kurių virpesio perėjimo dipolis orientuotas lygiagrečiai fazių ribai (Shen, 1997, Niaura ir kt., 2008).

1.6.1 SDG spektroskopija tokiškųjų $A\beta_{1-42}$ oligomerų

Mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų (10 μ M), kurių dydis, pagal z – aukštį, 1 – 3 nm, SDG spektrai fazių riboje vanduo/oras pateikti III.10 paveiksle A ir B. Ssp poliarizacijos spektre vyrauja smailė ties 2912 cm^{-1} , susijęs su CH_2 grupių valentiniais asimetriniais virpesiais. Kiti trys rezonansai priskiriami metilo grupių virpesiams. Smailė ties 2940 cm^{-1} priskirtina metilo grupių valentiniais

virpesiams, veikiamiems Fermi rezonanso su deformaciniais CH₃ virpesiais (Voss ir kt., 2006) [$\nu_s(\text{CH}_3)_{\text{FR}}$]. Rezonansai ties 2868 ir 2962 cm⁻¹, susiję atitinkamai, su simetriniais [$\nu_s(\text{CH}_3)$] ir asimetriniais [$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$] metilo virpesiais (Miranda ir Shen, 1999). Taigi spektras rodo, kad fazių riboje yra orientuotos metilo ir metileno grupės. Smailė ties (3051 cm⁻¹) priskiriama aromatinio žiedo $\nu(=\text{C}-\text{H})$ virpesiui. Tai rodo, kad fazių riboje yra ir orientuotų aromatinių žiedų.

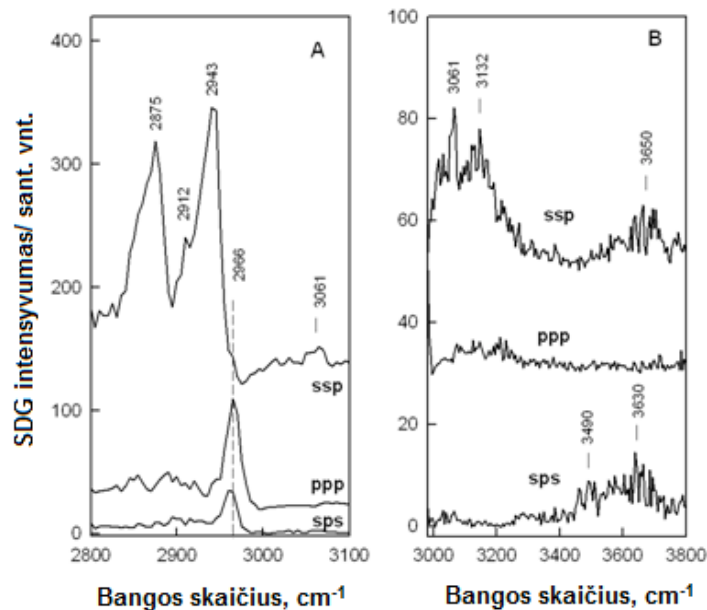


III.10 pav. Mažų A β_{1-42} oligomerų (10 μM) tirpalo SDG spektrai oro/vandens fazių riboje: **A** – 2800 – 3100 cm⁻¹ spektro srityje; **B** – 3100 – 3800 cm⁻¹ spektro srityje. Spindulių poliarizacija: ssp (s – SDG spindulys, s – 532 nm spindulys, p – IR spindulys), ppp ir sps.

Kadangi asimetrinio CH₃ virpesio (2962 cm⁻¹, pažymėta punktyrine linija III.10 pav. A) rezonansas matomas visuose trijuose spektruose galima daryti išvadą, kad metilo grupė yra pasvirusi fazių ribos atžvilgiu tam tikru kampu. Metileno grupių asimetrinio virpesio rezonansas (2912 cm⁻¹) visiškai išnyksta ppp ir sps poliarizuotuose spektruose. Tai rodo, kad grupės orientuotos beveik lygiagrečiai fazių ribos atžvilgiu. Aukšto dažnio (3100 – 3800 cm⁻¹) srityje matosi vandens O–H valentinių virpesių spektras (III.10 pav B), kuris, kaip matysime labai skiriasi nuo didelių oligomerų ir fibrilių vandens srities spektro (Niaura, Budvytyte ir kt., 2010).

1.6.2 SDG spektroskopija didžiųjų $A\beta_{1-42}$ oligomerų

Kitoks SDG spektras buvo užregistruotas 10 μM didelių $A\beta_{1-42}$ oligomerų (kurių dydis 5 – 10 nm) atveju (III.11 pav. **A** ir **B**). Ssp spektre vyrauja simetrinių valentinių CH_3 grupės virpesių rezonansai ties 2875 cm^{-1} [$\nu_s(\text{CH}_3)$] ir 2943 cm^{-1} [$\nu_s(\text{CH}_3)\text{FR}$]. Tuo tarpu asimetrinio metilo grupių rezonanso ties 2966 cm^{-1} beveik nesimato ssp poliarizuotame spektre (III.11 pav. **A**). Tačiau šis rezonansas ryškus ppp ir sps spektruose. Šie rezultatai rodo, kad skirtingai negu mažų oligomerų atveju, didelių oligomerų oro/vandens fazių riboje atsiranda CH_3 grupių, kurios orientuojasi statmenai fazių ribai. Ssp spektre taip pat matomas silpnas rezonansas ties 3061 cm^{-1} , susijęs su aromatinių grupių $\nu(\text{C-H})$ virpesiais. Ši smailė pasislinkusi lyginant su mažų oligomerų ssp spektru. Fazių riboje esančio vandens SDG spektras, ties $3000 - 3800\text{ cm}^{-1}$ (III.11 pav. **B**), taip pat žymiai pakitęs, lyginant su mažų $A\beta_{1-42}$ oligomerų vandens spektru. Ssp poliarizacijoje aiškiai matomas intensyvus ir platus surištų rezonansas ties 3132 cm^{-1} , kuris pranyksta sps spektre. Tai rodo, kad O-H dipoliai orientuoti beveik statmenai oro/vandens fazių ribai.



III.11 pav. Didelių oligomerų (10 μM) tirpalo SFG spektrai oro/vandens fazių riboje: **A** – $2800 - 3100\text{ cm}^{-1}$ spektro srityje; **B** – $2980 - 3800\text{ cm}^{-1}$ spektro srityje. Spindulių

poliarizacija: ssp (s – SDG spindulys, s – 532 nm spindulys, p – IR spindulys), ppp ir sps.

Aukšto dažnio srityje ssp ir sps spektruose matomas silpnas rezonansas ties 3630 – 3650 cm^{-1} , rodantis, kad O–H grupės yra susijusios silpnais vandeniliniiais ryšiais ir O–H dipoliai pasvirę tam tikru kampu fazių ribos atžvilgiu. Fibrilių (10 μM pagal A β_{1-42} monomerą) SDG spektras, gautas labai intensyvus (rezultatas nepavaizduotas), bet jis yra panašus į didelių A β_{1-42} oligomerų SDG spektrą (III.11 pav.) (Niaura, Budvytyte ir kt., 2010).

Taigi, skirtingo oligomerizacijos laipsnio A β_{1-42} darinių tyrimai SDG metodu parodė, kad toksiškųjų oligomerų detekcijai galima panaudoti charakteringą rezonansą ties 2912 cm^{-1} , gaunamą nuo fazių sąlyčio ribos oras/vanduo, kuris yra labai silpnas didelių A β_{1-42} (netoksiškų) formų oligomerų bandiniuose. Ši juosta susijusi su metileno grupių asimetriniu virpesiu.

2. Tirpių A β_{1-42} oligomerų ir fosfolipidinės membranos sąveikos bei galimo toksiškumo tyrimas

Dalis, šiame darbo etape, pateiktų, A β_{1-42} oligomerų sąveikos su fosfolipidiniais dvisluoksniais tyrimo EIS metodu, rezultatų yra aprašyti bendradarbiaujant su partneriais JAV straipsnyje: *Gintaras Valincius, Frank Heinrich, Rima Budvytyte, David J. Vanderah, Yuri Sokolov, James E. Hall, and Mathias Loesche. Soluble amyloid β oligomers affect dielectric membrane properties by bilayer insertion and domain formation: Implications for cell toxicity. Biophysical Journal. 2008;(95):4845 – 61.* Straipsnyje sėkmingai pavaizduota, kad amiloidų oligomerų detekcijai gali būti panaudojamos paviršiuje imobilizuotos fosfolipidinės membraninės sistemos. A β_{1-42} oligomerai sąveikaudami pažeidžia membranų integralumą ir izoliuojančias jų savybes. Svarbi straipsnio išdava susijusi su toksiškųjų amiloidinių darinių sukulto membranos laidumo aktyvacijos energijos reikšmėms, kurios, lyginant su poras formuojančių toksinų: α -HL ir PA₆₃, yra labai didelės. Tai rodo

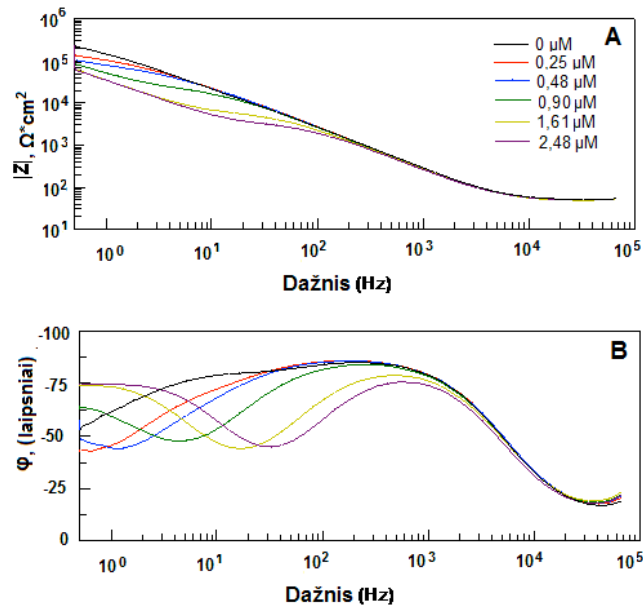
kitoki, nei poras formuojančių toksinų, $A\beta_{1-42}$ oligomerų sukulto joninio laidžio per membraną mechanizmą.

Taip pat šiame poskyryje pateikiami nauji, $A\beta_{1-42}$ oligomerų sąveikos ir afiniškumo fosfolipidiniams komponentams tyrimo, duomenys, rodantys stiprią amiloidinių darinių asociaciją membranoms, turinčioms sfingomielino. O vezikulių sąveika su skirtingais $A\beta_{1-42}$ oligomerais, gali būti panaudojama toksiškųjų formų atrankai ir detekcijai. Tyrimas atliktas stebint, pasikeitusias $A\beta_{1-42}$ oligomerų dinamines savybes FCS metodu.

2.1 Tirpių $A\beta$ oligomerų sukulto tBLM dielektrinio pažeidimo tyrimas

$A\beta_{1-42}$ sąveika su fosfolipidine membrana yra taip detektuojama elektrocheminio impedanso metodu. $A\beta$ oligomerų tyrimuose, fosfolipidas buvo renkamas pagal žinomus literatūros duomenis, kurie teigia, kad β -amiloidai žymiai labiau sąveikauja ir yra labiau pažeidžiantys nesočių ir didelio spūdumo fosfolipidų bisluoksnis. Todėl mūsų tyrimuose, tBLM formavimui buvo pasirinktas fosfolipidas DOPC, turintis abi simetrines alkanų grandinėse, kiekvienoje po nesočių jungtį (18:1), ir pasižymintis žema fazinio virsmo temperatūra. β -amiloidų sukelti EIS spektrų pokyčiai vizualiai yra panašūs į spektrus, kuriose poras formuojantys toksinai – α -HL ir PA_{63} įsiterpia į tBLM (II skyriaus, 1 ir 2 pav.), suformuodami poras ir stipriai padidindami membranos laidumą (III.12 pav).

Taigi, paviršiuje imobilizuotos membranos sąveikos su $A\beta_{1-42}$ oligomerais detekcijai naudojami tie patys EIS spektro pokyčiai, kaip ir α -HL ir PA_{63} atveju. III.12 paveiksle, Bode koordinatėse, vaizduojančiose Z ir fazės priklausomybę nuo dažnio, stebima spektrų pokyčių priklausomybė nuo tirpių $A\beta_{1-42}$ oligomerų koncentracijos. Kaip matome (III.11 pav, **A**), didėjant $A\beta_{1-42}$ koncentracijai, stebimas impedanso modulio sumažėjimas žemų dažnių srityje ir atsirandantis fazės minimumas (III.12 pav, **B**).



III.12 pav. Prijungtos prie paviršiaus dvisluoksnės membranos (BLM = β -ME:WC14 = 7:3 ir DOPC) laidumo priklausomybė nuo skirtingų $A\beta$ oligomerų koncentracijų – Bode koordinatės. $A\beta_{1-42}$ oligomerų koncentracijų diapozonas (μ M): juoda – 0 μ M, raudona – 0,25 μ M, mėlyna – 0,48 μ M, žalia – 0,90 μ M, geltona – 1,61 μ M, alyvinė – 2,48 μ M.

Nustatėme, jog fazės poslinkis nuosekliai seka $A\beta_{1-42}$ koncentracijos augimą, o fazės reikšmė nekinta (III.12 pav. B). Impedanso modulio reikšmė fazės minimumo taške, didėjant toksino koncentracijai, mažėja. Panašūs reikšiniai buvo stebimi ir jau aprašytu α -HL atveju (II skyrius, II.2 pav.). Tačiau, kaip matysime, vėliau, $A\beta_{1-42}$ oligomerais paveiktų membranų joninis transporto mechanizmas ryškiai skiriasi nuo jonų judėjimo per membranoje vandens pripildytas poras, suformuotas bakterinių toksinų.

Gauti EIS spektrai, prieš ir po membranos inkubacijos su toksiškais β -amiloidų oligomerais, yra modeliuojami tuo pačiu, anksčiau naudojamu ekvivalentiniu elektriniu modeliu, aprašytu tyrimo metodų dalyje. Vieno iš EIS spektrų (III.12 pav.) sumodeliuoti duomenys pavaizduoti III.2 lentelėje. Stebėtinai yra $A\beta_{1-42}$ sukkelto membranos pažeidimo beveik 100 % grįžtamumas. Po $A\beta_{1-42}$ atplovimo, tBLM elektriniai parametrai yra tokie, kokie buvo ir prieš $A\beta_{1-42}$ oligomerų inkubaciją (III.2 lentelė). Tai visiškai nebūdinga bakterinių toksinų kanalams (α –hemolizino ir juodligės toksino ar VLY atveju).

III.2 lentelė. tBLM (DOPC) parametrai, prieš ir po Aβ₁₋₄₂ oligomerų inkubacijos ir išplovus iš sistemos Aβ, geriausiai modeliuojantys EIS spektrus pagal ekvivalentinę grandinę. Parametrų vertės yra suvidurkintos iš n = 17 matavimų ir normalizuotos į geometrinį elektrodo plotą.

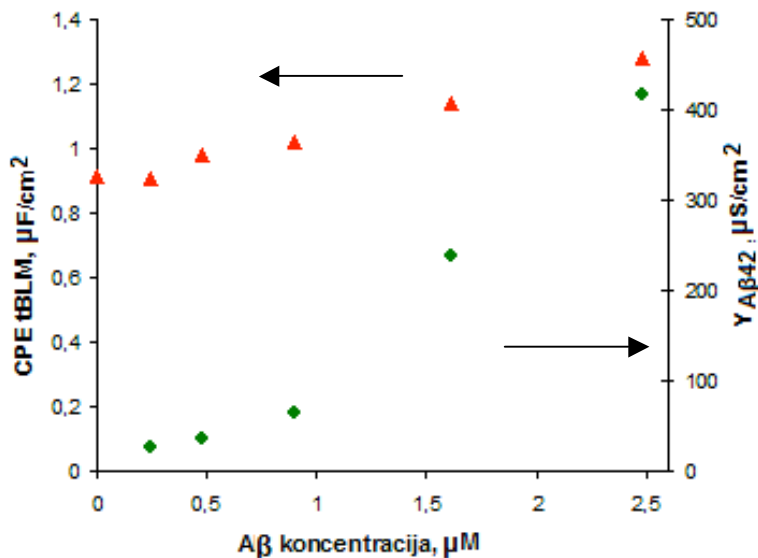
<i>Parametrai</i>	<i>Suformuota tBLM</i>	<i>tBLM +1,61 μM Aβ₁₋₄₂</i>	<i>Nuplauta tBLM</i>
CPE _{tBLM} , μF/cm ²	0,88	1,0	0,89
α _{tBLM}	0,986	0,973	0,985
CPE _{def} , μF/cm ²	4,9	8,0	5,3
α _{def}	0,494	0,944	0,535
R _{def} , kΩ*cm ²	140,0	5,6	142,7
Modelio atitikimo kokybė, χ ² * 10 ⁴	1,14	3,3	2,44

Kaip jau minėta anksčiau, paviršiuje imobilizuotos membranos savybes apibūdina parametras CPE_{tBLM}, kai jo eksponentė α_{tBLM} yra artima 1, jį galima laikyti elektrine talpa. Fosfolipidinio dvisluoksnio elektrinė talpa tiesiogiai priklauso nuo membranos dielektrinių savybių ir yra atvirkščiai proporcinga savo storiui. Suformuotos tBLM talpos vertė, nustatyta iš 17 nepriklausomų matavimų, yra 0,88 μF/cm², tuo tarpu po Aβ₁₋₄₂ inkubacijos, šis parametras jau siekia 1 μF/cm². Taigi talpos pokytis, atsirandantis dėl sąveikos su Aβ₁₋₄₂ oligomerais, siekia 12 %, ir tai pirmiausia sietume su membranos dielektrinės skvarbos pokyčiu (žr. toliau).

Paviršiuje imobilizuotos membranos, sąveikaudamos su tirpiaisiais β-amiloidų oligomerais, tampa stipriai pralaidžios jonams. Taigi, šį membranos pažeidimą modeliuoja, jau aprašyti ekvivalentinio modelio paralelinės grandinės elementai – CPE_{def} ir R_{def}. Kaip matome iš III.2 lentelėje pateiktų duomenų, R_{def} parametro vertė, po tBLM inkubacijos su Aβ₁₋₄₂, stipriai sumažėja: nuo 140 iki 5,6 kΩ·cm², beveik per dvi eiles. Defektų talpos (CPE_{def}) eksponentės pakitimas nuo 0,49 link 1, rodo augantį membranos defektiškumą. Abu parametrai yra beveik 100 % grįžtami, pašalinus iš sistemos Aβ₁₋₄₂ oligomeras.

Kaip jau buvo rašyta, laidumas yra apibrėžiamas tokia formule: $Y_{A\beta} = R_{def}^{-1}$ ir atspindi jonų transporto savybes per membraną, po sąveikos su Aβ₁₋₄₂

oligomerais. III.12 paveiksle atidėta laidumo, $Y_{A\beta}$, ir fosfolipidinės membranos talpos, CPE_{tBLM} , priklausomybė nuo $A\beta_{1-42}$ koncentracijos tirpale. CPE_{tBLM} beveik tiesiškai priklauso nuo $A\beta_{1-42}$ koncentracijos, o detektuojamas bendras talpos pokytis visame koncentracijų diapozone yra $\sim 20\%$ (III.13 pav). CPE_{tBLM} pokyčio, kuris bendru atveju gali būti indukuotas tiek membranos suplonėjimu, tiek dielektrinės skvarbos išaugimu, šiuo atveju negalime sieti su fosfolipidinio dvisluoksni storio pokyčiu. Nes, tiriant $A\beta_{1-42}$ įtaką tBLM geometrijai neutronų reflektometrijos metodu³ nebuvo stebimas bent kiek žymesnis nei 1 – 2 % dvisluoksni storio pokytis (Valincius ir kt., 2008).



III.13 pav. tBLM (suformuotos iš: WC14: β ME = 3:7 + DOPC) laidumo ir talpos priklausomybės nuo $A\beta_{1-42}$ koncentracijos. Raudoni/trikampiai – atitinka tBLM talpos kitimą, o žali/rutuliukai – tBLM laidumo kitimą priklausomai nuo $A\beta_{1-42}$ koncentracijos. Visos laidumo ir talpos reikšmės gautos iš EIS spektrų modeliuojant juos ekvivalentiniu elektriniu modeliu.

Taigi, stebimas membranos talpos pokytis siejamas su fosfolipido dielektrinės konstantos, ϵ_{DOPC} padidėjimu nuo 2,8 iki $\sim 3,4$. Dielektrinė konstanta didėja dėl $A\beta_{1-42}$ įsiterpimo į fosfolipidinį dvisluoksnį, nes baltymų ϵ yra didesnė už alkanų grandinių, ir todėl stebimas tiesiškas talpos kitimas nuo $A\beta_{1-42}$ oligomerų koncentracijos (III.13 pav). Užtat, dėl paviršiuje

³ Darbas atliktas kartu su partneriais iš prof. M. Loesche grupės Carnegie Mellon Universitete ir Nacionaliniame Standartų ir Technologijos Institute, JAV.

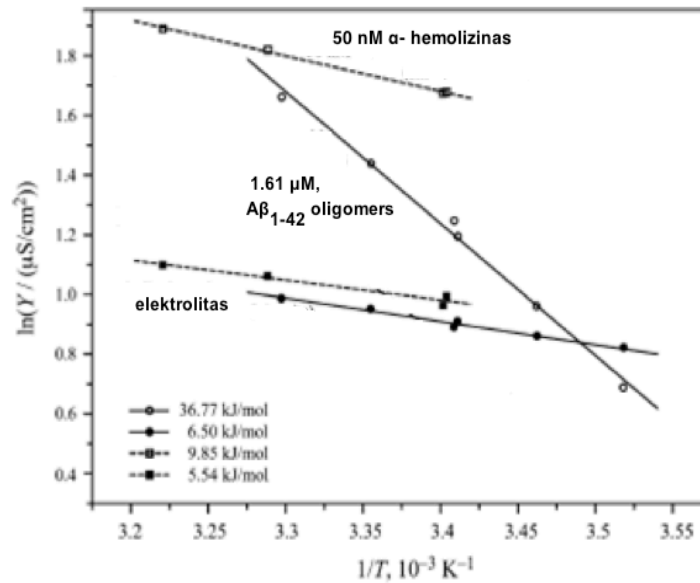
imobilizuotųjų membranų dielektrinio pažeidimo efekto smarkiai išauga elektrinis membranos laidumas, $Y_{A\beta}$. Jis kinta netiesiškai, o priklauso nuo $A\beta_{1-42}$ koncentracijos laipsniškai, pagal dėsnį artimą parabolės dėsniai (III.13 pav).

2.2 Jonų, judančių per $A\beta_{1-42}$ oligomerų paveiktą membraną, aktyvacijos barjero nustatymas

Kaip ir PTFs atveju, buvo pasinaudota temperatūros poveikio fosfolipidinių membranų, paveiktų $A\beta_{1-42}$ oligomerais, laidumo įvertinimu, kad apskaičiuotume efektyvinę jonų judėjimo per membraną energiją. Eksperimentiškai stebima, jog temperatūros įtaka membranoms, paveiktoms $A\beta_{1-42}$ oligomerais, yra žymi. Temperatūriniai eksperimentai buvo atliekami tBLM inkubuojant su $A\beta_{1-42} = 1,61 \mu\text{M}$. Eksperimentiniai duomenys atidėti pusiau logaritminėse Arenijaus koordinatėse (III.14 pav). Palyginimui įdėti duomenys: jonų judėjimo elektrolito tūryje ir jonų judėjimo per įterptą, funkcionuojantį α -hemolizino kanalą.

Jau iš paties III.14 paveikslo matosi, jog $A\beta_{1-42}$ oligomerų indukuoto laidumo priklausomybė nuo temperatūros yra žymiai stipresnė nei α -hemolizino (kreivės nuolinkio kampas didesnis). Efektyvinė aktyvacijos energija, apskaičiuota iš Arenijaus lygties, $A\beta_{1-42}$ atveju yra $E_a = 36,77 \text{ kJ/mol}$, ir yra stipriai didesnė nei aktyvacijos energija sukelta, laisvai elektrolito tirpale judančių jonų, kuri siekia tik $E_a \sim 6,5 \text{ kJ/mol}$ ir didesnė nei abiejų PTFs: atitinkamai $9,85 \text{ kJ/mol}$ α – HL atveju ir $7,0 \text{ kJ/mol}$ PA_{63} kanalo atveju.

Nustatėme, jog $A\beta_{1-42}$ sukulto membranos laidumo aktyvacijos energijos barjeras yra beveik 4 kartus didesnis nei laidumo, sukulto α -HL ir PA_{63} atveju. Palyginus šias reikšmes, matome, kad $A\beta_{1-42}$ oligomerų sukeltas jonų transporto per fosfolipidinę membraną molekulinis mechanizmas ryškiai skiriasi nuo PFT pažaidos mechanizmo. Skirtingai nei poras formuojančio toksino, α -hemolizino atveju, kai E_a visai nepriklauso nuo α -HL koncentracijos (žr. II skyrius, II.2 lentelė), $A\beta_{1-42}$ oligomerų sukelta tBLM laidumo aktyvacijos energija jau stipriai priklauso nuo $A\beta_{1-42}$ koncentracijos (Valinčius ir kt., 2008).



III.14 pav. Arenijaus koordinatės, kuriose: užpildytais simboliais (Apačioje) – elektrolitų; kvadratais (viršuje) – α -hemolizino joninio kanalo, apskritimais – $A\beta_{1-42}$, sukeltos laidumo priklausomybės nuo temperatūros. tBLM, suformuota iš DPhPC ir β -ME:WC14 = 7:3 prie pH 7,5, buvo 60 min inkubuojama su 140 nM α -HL tirpalu (kvadratai, tuščiaviduriai). Tiriant $A\beta_{1-42}$ sukeltą laidumo priklausomybę, tBLM buvo formuojamos iš DOPC ir β -ME:WC14 = 7:3 prie pH 7,5 ir inkubuojamos su 1,61 μ M $A\beta_{1-42}$ tirpalu. Abi kreivės (apačioje), atspindi laidumo kitimą elektrolite: 100 mM NaCl, 10 mM fosfatinėje buferinėje sistemoje.

Didelė aktyvacijos energija rodo, jog β -amiloidų sąveikoje su fosfolipidine membrana gerai molekulinės, vandeniui (elektrolitui) užpildytos mikroporos, nesusidaro, todėl iškeliamo prielaida, kad $A\beta_{1-42}$ oligomerai gali formuoti skirtingus regionus su lokaliai dideliomis dielektrinėmis konstantomis. tokiuose regionuose jonų pasyvaus judėjimo per membraną barjeras žymiai sumažėja (nuo >100 kJ/mol⁴ iki ~ 30 kJ/mol), ko pasėkoje judančių per tBLM krūvininkų (jonų) judriai padidėja tiek, kad užtikrina stebimą tBLM laidį. Kita prielaida – sąveikaudami su tBLM, $A\beta_{1-42}$ galbūt gali pakeisti lipidų dielektrinę struktūrą taip, kad palengvintų jonų translokaciją, toks mechanizmas labiau būdingas nuo įtampos priklausantiems baltymams (pvz.: sinapsių Ca^{2+} kanalas) (Valinčius ir kt., 2008).

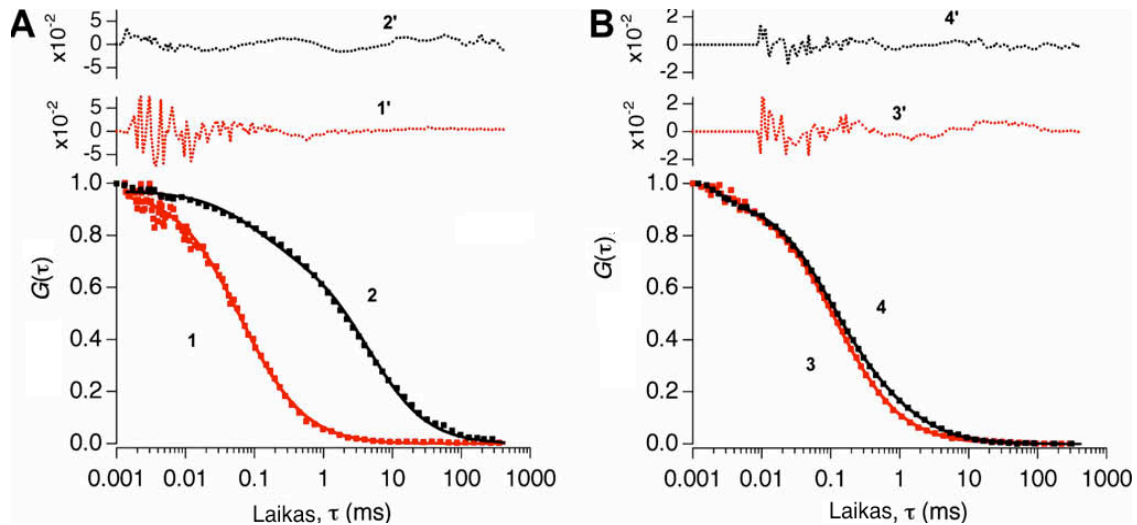
⁴ Fosfolipidinių membranų barjeras, įvertintas pagal Borno teoriją vienvaleiui Cl^- jonui yra apie 120 kJ/mol.

2.3 Toksiškųjų ir netoksiškųjų A β ₁₋₄₂ oligomerų formų sąveika su fosfolipidinėmis vezikulėmis

Fluorescencijos koreliacijos spektroskopija yra šiuolaikinis metodas greitai ir kiekybinei baltymų sąveikos su vezikulėmis analizei (Rhoades ir kt., 2006). Darbo metu buvo tiriamas skirtingos morfologijos A β ₁₋₄₂ oligomerų rišimasis prie skirtingos lipidinės kompozicijos vezikulių. Siekiant sustiprinti A β ₁₋₄₂ oligomerų poveikį fosfolipidiniams dvisluoksniams ir priartinti *in vitro* sąlygas, membranos modelius, prie natūralių membranų, buvo kuriamos vezikulės, turinčios savo sudėtyje įvairių lipidinių komponentų. Taip pat afiniškumo membranoms ir sąveikos stiprumo tyrimams buvo naudojami žiurkių smegenėlių neuronų lipidiniai ekstraktai.

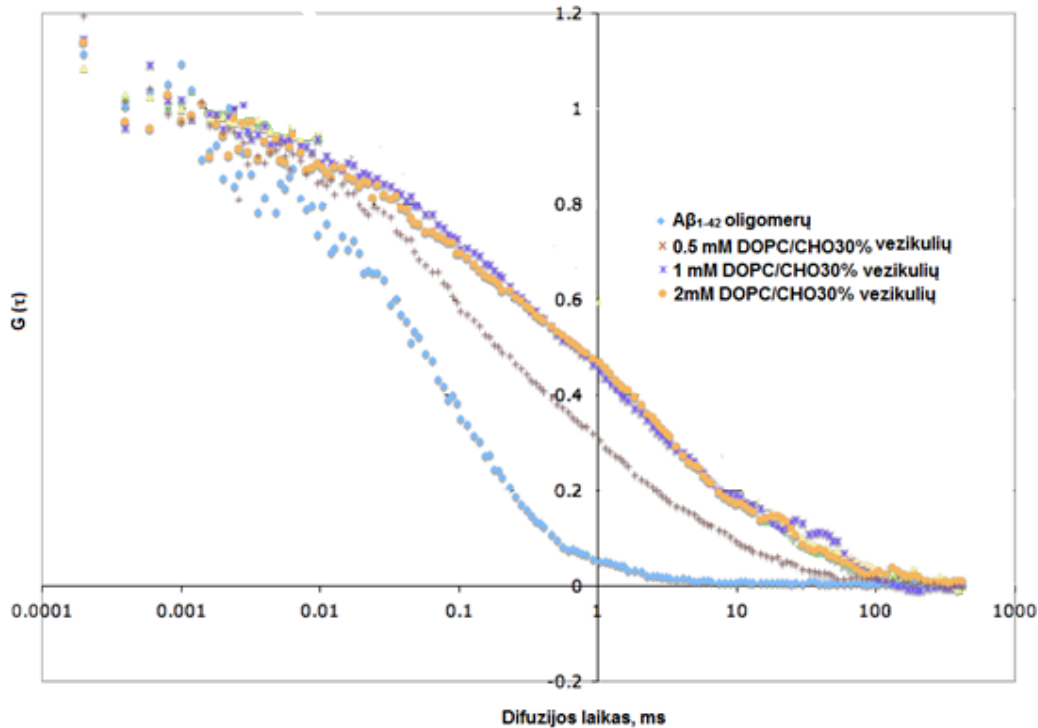
A β ₁₋₄₂ oligomerų sąveikos tyrimas buvo atliekamas su vezikulėmis, sudarytomis iš DOPC/CHO (santykis – 70/30). Prieš eksperimentą A β ₁₋₄₂ oligomerai buvo charakterizuojami, jau aprašytais metodais, o naudojant FCS 3D difuzijos matavimus tirpale ir DLS, buvo įvertinti pradiniai A β ₁₋₄₂ oligomerų difuzijos koeficientai ir jų dydžiai. Dinaminės šviesos sklaidos metodu išmatuotas vezikulių dydis buvo 120 nm. Vezikulės, eksperimento metu buvo be fluorescuojančios žymės, todėl difuzija stebima tik 0,2 % fluorescuojančių A β ₁₋₄₂ oligomerų. Eksperimento metu gaunama bendra A β ₁₋₄₂ oligomerų koreliacija tirpale (3D tirpale) ir fosfolipidinėje membranoje (3D vezikulėse). Gauti difuzijos skirtumai parodė sąveikos stiprumą, priklausomą nuo skirtingų A β ₁₋₄₂ oligomerų bandinių (III.15 pav **A** ir **B**). Iš koreliacinės kreivės, po sąveikos su vezikulėmis (III.15 pav, **A**) matomi du komponentai, besiskiriantys difuzijos laikais $\tau_{D1} \sim 0,3$ ms (kreivė raudona) and $\tau_{D2} \sim 100$ ms (kreivė juoda). Difuzijos laikas (τ_{D1}) yra mažųjų A β ₁₋₄₂ oligomerų, tuomet antrasis komponentas τ_{D2} yra gautas vezikulių kartu su A β ₁₋₄₂ oligomerais, kuris rodo, kad amiloidai sąveikauja ir rišasi su fosfolipidinėmis vezikulėmis. Po sąveikos stebimas stiprus difuzijos laiko sulėtėjimas, taigi, ir difuzijos

koeficiento sumažėjimas, kas rodo stiprią toksiškųjų oligomerų sąveiką su vezikulėmis.



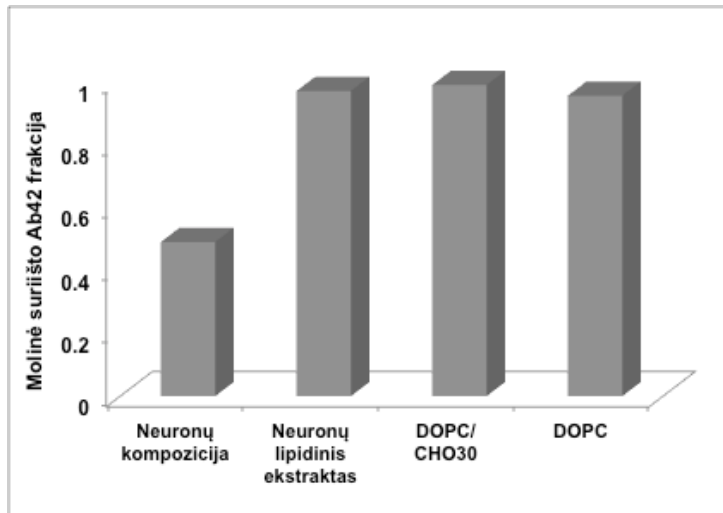
III.15 pav. FCS $A\beta_{1-42}$ oligomerų ir su vezikulėmis autokoreliacinės kreivės, sumodeliuotos su 3D modeliu (modelis su dviem 3D komponentais). **A.** Toksiškųjų $A\beta_{1-42}$ oligomerų difuzijos kreivė (raudona) ir sąveikoje su vezikulėmis (juoda kreivė). Gautas $A\beta_{1-42}$ oligomerų difuzijos laikas mažas – 0,3 ms, toks laikas atitinka apie 3 nm dydžio oligomeras, po sąveikos matomas labai staigus difuzijos laiko padidėjimas, kas rodo stiprią mažųjų $A\beta_{1-42}$ oligomerų asociaciją vezikulėms. **B.** Didžiųjų $A\beta_{1-42}$ oligomerų difuzijos kreivė (raudona) ir sąveikoje su vezikulėmis (juoda kreivė). Detektuota sąveika labai silpna, $A\beta_{1-42}$ oligomerų difuzijos laikas po sąveikos beveik nepakinta. Kiekvienos autokoreliacinės kreivės modelio neatitikimai, pavaizduoti kiekvieno paveikslo viršuje (kreivės 1' – 4').

Didžiųjų $A\beta_{1-42}$ oligomerų atveju (III.15 pav., **B**) detektuota labai silpna sąveika. Autokoreliacinių kreivių difuzijos laikai, prieš ir po sąveikos su vezikulėmis, beveik nekinta, kas rodo silpnesnę didžiųjų $A\beta_{1-42}$ oligomerų asociaciją vezikulėms. Didinant vezikulių koncentraciją stebimas difuzijos laiko (autokoreliacinių kreivių poslinkis į dešinę) sulėtėjimas, taigi ir difuzijos koeficiento sumažėjimas, kas rodo stiprią mažųjų $A\beta_{1-42}$ oligomerų, paruoštų pagal protokolą I, sąveiką su vezikulėmis (III.16 pav). Matome, kad jau ties 1 mM vezikulių, visi $A\beta_{1-42}$ oligomerai yra surišti, ir didinant toliau vezikulių koncentraciją iki 2 mM, surišimo frakcija nebekinta ir nestebime autokoreliacijos poslinkio. Eksperimento metu stebimas įsisotinimas oligomerais, kurio metu surištų $A\beta_{1-42}$ oligomerų frakcija pasiekia beveik 1 (III.16 pav.), kas rodo, kad visi oligomerai tirpale yra susirišę su vezikulėmis.



III.16 pav. FCS autokoreliacijos kreivių poslinkis didinant vezikulių koncentraciją. Mėlyna spalva – tai laisvų $A\beta_{1-42}$ oligomerų autokoreliacijos kreivė. Ruda – tai $A\beta_{1-42}$ oligomerų difuzija sąveikoje su 0,5 mM DOPC/CHO30% vezikulėmis. Violetinė – sąveikoje su 1mM DOPC/CHO30% vezikulėmis. Oranžinė – sąveikoje su 2 mM DOPC/CHO30% vezikulėmis.

Įvairios kompozicijos vezikulės, bei vezikulės iš lipidinio ekstrakto buvo naudojamos mažųjų $A\beta_{1-42}$ oligomerų afiniškumo membranoms tyrimams. Buvo pasirinktos tokios sąlygos, kurių metu vyksta visiškas $A\beta_{1-42}$ surišimas, kai surištų $A\beta_{1-42}$ oligomerų frakcija siekia 1. Tokiu atveju sąveikos stebimos, sąveikaujant 0,46 μM $A\beta_{1-42}$ oligomerų su 1 mM įvairios sudėties vezikulėmis. Rezultatai pateikti III.17 paveikslo diagramoje, kurioje $A\beta_{1-42}$ oligomerai rodo didelį afiniškumą DOPC ir DOPC/CHO30% vezikulėms. Taip pat didelis afiniškumas stebimas su natūralių neuronų lipidinių ekstraktų vezikulėmis. Mažesnis afiniškumas aptiktas su sintetinėmis daugiakomponentėmis vezikulėmis, turinčiomis sfingomielino, cerebrozido ir cholesterolio, tam galėjo turėti įtakos ir netinkamos vezikulių kompozicijos pasirinkimas.

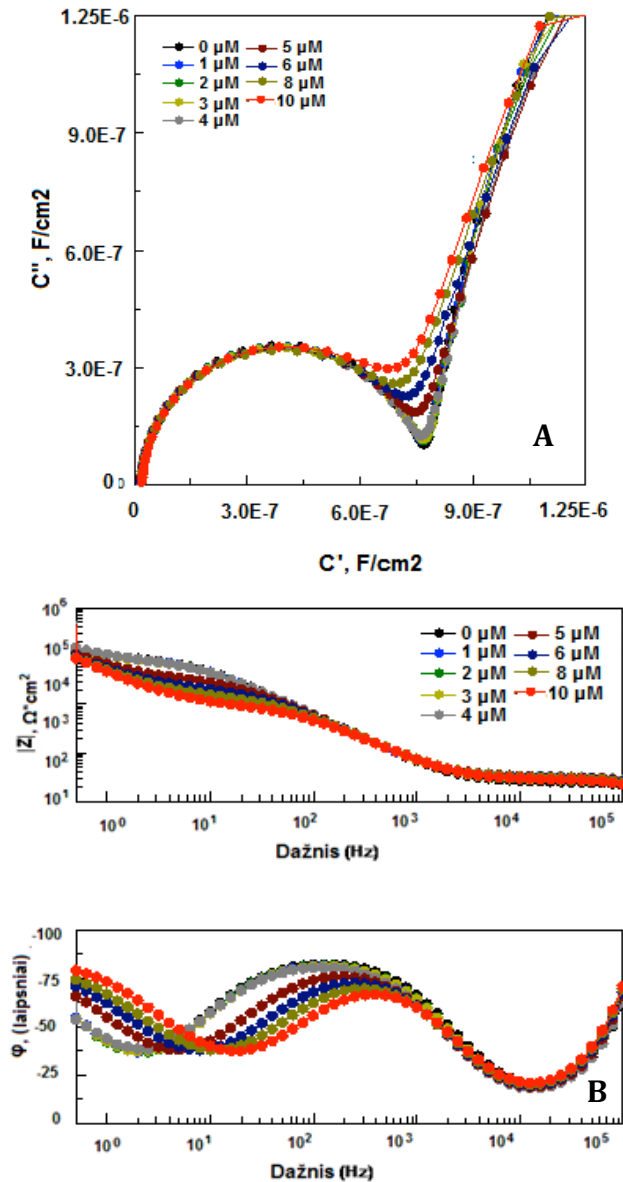


III.17 pav. Surištos $A\beta_{1-42}$ frakcijos priklausomybė nuo vezikulių sudėties. Priklausomybė gauta, sąveikaujant $0,46 \mu\text{M}$ $A\beta_{1-42}$ oligomerų su 1 mM įvairios fosfolipidinės sudėties vezikulėmis.

2.4 $A\beta_{1-42}$ oligomerų sąveikos ir afiniškumo fosfolipidiniams komponentams tyrimas

Šioje darbo dalyje buvo siekiama ištirti amiloidų oligomerų, kurių gaminimui nenaudojami fluoro organiniai oligomerizacijos inhibitoriai, tokie, kaip HFIP, suformuotų pagal, taip vadinamą *NaOH protokolą*, poveikis tBLM ir fosfolipidinėms vezikulėms. Kol kas toksiškumo tyrimai su šiais amiloidais nebuvo vykdomi.

Sąveikos su $A\beta_{1-42}$ oligomerais metu, prie paviršiaus prijungtų membranų EIS spektras kinta, ypatingai didesnėse peptido koncentracijose (III.18 pav.). Stebimi pokyčiai yra panašūs į jau aprašytus, tik skiriasi $A\beta_{1-42}$ oligomerų veikimo koncentracijos diapozonas, ir pirmiausia stebimi žemų dažnių srityje (III.18 pav. **A** ir **B**). III.17 **A** paveiksle pavaizduoti tBLM EI Cole-Cole spektrų priklausomybė nuo $A\beta_{1-42}$ oligomerų koncentracijos tirpale. Aptiktas spektro kitimo pobūdis - labai panašus į $A\beta_{1-42}$ oligomerų, suformuotų pagal protokolą I. Tik šiuo atveju peptido žymaus poveikio nematome net iki $4 \mu\text{M}$, o stiprus veikimas pradamas stebėti ties $5 \mu\text{M}$ (III.18 pav. **A** ir **B**).

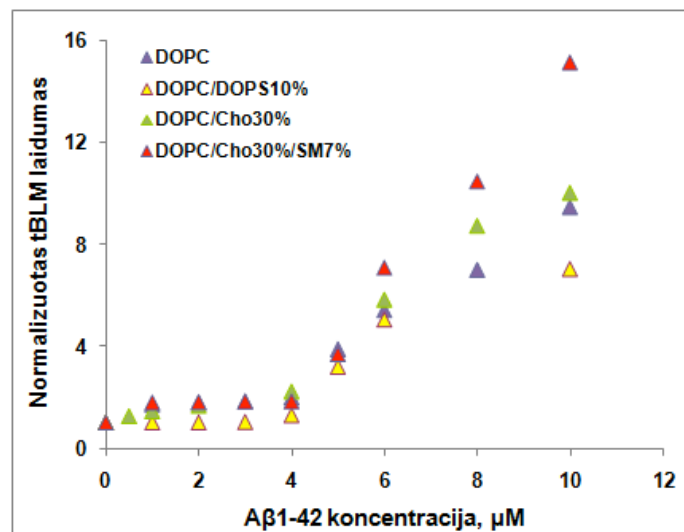


III.18 pav. A tBLM suformuotos iš HC18:bME (3:7 mol:mol, 0,1 M NaCl, pH 7.4 buferyje) ir DOPC/CHO/SM. EIS spektrų Cole Cole koordinatės, talpos priklausomybės nuo $A\beta_{1-42}$ oligomerų koncentracijos, kur: juoda – 0 μ M, mėlyna – 1 μ M, žalia – 2 μ M, geltona – 3 μ M, pilka – 4 μ M, ruda – 5 μ M, alyvinė – 6 μ M, garstyčių – 8 μ M, raudona – 10 μ M. Padidintas, talpos srities, vaizdas, spektras pavaizduotas dažnio diapozone nuo 100 kHz iki 1 Hz.

B tBLM suformuotos iš HC18:bME (3:7 mol:mol, 0,1 M NaCl, pH 7.4 buferyje) ir DOPC/CHO/SM. EIS spektrų Bode koordinatės, impedanso ir fazės priklausomybės nuo $A\beta_{1-42}$ oligomerų koncentracijos, kur: juoda – 0 μ M, mėlyna – 1 μ M, žalia – 2 μ M, geltona – 3 μ M, pilka – 4 μ M, ruda – 5 μ M, alyvinė – 6 μ M, garstyčių – 8 μ M, raudona – 10 μ M.

Matome, kad priklausomai nuo $A\beta_{1-42}$ oligomerų koncentracijos, kompleksinės talpos spektro pusapskritimio padėtis kinta, ji tolsta nuo x – ašies ir juda į kairę, bet tuo pačiu auga į viršų (“šiaurę”) (III.18 pav. **A**). Tokie Cole – Cole spektrų pokyčiai, pagal matematinę analizę (Valincius ir kt., 2012) yra diagnostinis, didėjančio defektų tankio atsiradimo, priklausomai nuo koncentracijos, kriterijus. EIS spektrų fazės minimumas Bode koordinatėse slenkasi į dešinę, ir panašiai, kaip ir PFT atveju, paties minimumo reikšmė nekinta (III.18 pav. **B**).

Tiriant membranos laidumo priklausomybę nuo $A\beta_{1-42}$ koncentracijos, gautas tBLM laidumas, kuris kaip jau buvo rašyta, apibūdinamas: $Y_{tBLM} = 1/R_{def}$ (III.19 pav). III.19 paveiksle atidėta normalizuotos pradinės reikšmės atžvilgiu skirtingos sudėties membranų laidumo priklausomybės nuo $A\beta_{1-42}$ koncentracijos tirpale.



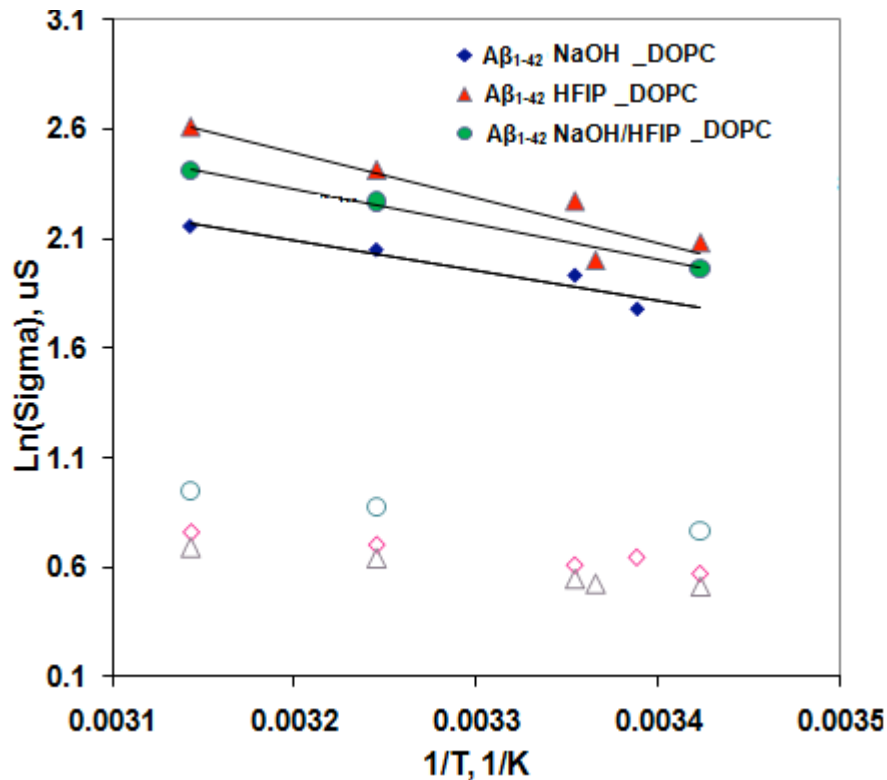
III.19 pav. Skirtingų lipidinių kompozicijų membranų (suformuotų ant SAM = β -ME : HC18 = 7:3) laidumo priklausomybės nuo $A\beta_{1-42}$ oligomerų koncentracijos, kur: violetinė spalva – tBLM, suformuota iš fosfolipido DOPC, Geltona – tBLM iš fosfolipidų mišinio DOPC/DOPS10%, žalia – tBLM iš fosfolipidų mišinio DOPC/CHO30%, raudona – tBLM iš fosfolipidų mišinio DOPC/CHO 30%/SM7%. Eksperimentai atlikti 20 °C temperatūroje.

Gauti rezultatai rodo, jog prie $A\beta_{1-42}$ oligomerų, suformuotų pagal *NaOH protokolą*, mažesnių nei 4 μ M koncentracijų nestebime jokių pokyčių EIS spektruose (III.19 pav). Tuo tarpu, kaip jau buvo rašyta, $A\beta_{1-42}$ oligomerų,

suformuotų pagal *protokolą I*, atveju, jau žymų poveikį stebime prie 0,25 μM (III.11 pav.) tBLM laidumas pastebimai pradeda didėti nuo 4 μM $A\beta_{1-42}$ koncentracijos. Toliau didinant toksino koncentraciją, stebime ryškius pokyčius, varijuojant membranų fosfolipidinei sudėčiai (III.19 pav). Stipriausias, tokių $A\beta_{1-42}$ oligomerų poveikis, matomas membranoms, sudarytomis iš DOPC/CHO/SM, kuriose SM sudarė 7 % visos fosfolipidinės sudėties. Ir lyginant su poveikiu DOPC/CHO membranoms, jis ryškiai skiriasi, kas rodo, kad pagrindinis komponentas, atsakingas už signalo amplifikaciją yra sfingomielinas. Tuo tarpu $A\beta_{1-42}$ poveikis įkrautai tBLM, sudarytai iš DOPC/DOPS, buvo mažiausias (III.19 pav.).

Nustačius, jog $A\beta_{1-42}$ oligomerai turi didelį poveikį sfingomielino tyrinėioms membranoms, be to poveikis yra stipriai įtakojamas tBLM fosfolipidinės sudėties, buvo pabandyta nustatyti jonų, judančių per $A\beta_{1-42}$ oligomerų paveiktas skirtingos sudėties membranas, aktyvacijos barjerus. Pirmiausia, eksperimentiškai stebima, jog temperatūros įtaka membranoms, paveiktoms $A\beta_{1-42}$ oligomerais, yra žymi. Temperatūriniai eksperimentai buvo atliekami tBLM, suformuotai iš DOPC inkubuojant su skirtingais paruoštais $A\beta_{1-42}$ oligomerais: pagal *NaOH protokolą*, naudojant 10 μM ; pagal *protokolą I*, naudojant 3 μM ; pagal *HFIP/NaOH protokolą*, naudojant 5 μM . Koncentracijos buvo pasirinktos tokios, kurių kiekvienos atveju, indukuotas membranos laidumas būtų vienodas. Eksperimentiniai duomenys atidėti pusiau logaritminėse Arenijaus koordinatėse (III.20 pav., spalvoti simboliai). Palyginimui įdėti jonų judėjimo elektrolito tūryje duomenys (III.20 pav. tuščiaviduriai simboliai). Jau iš paties 20 paveikslo kreivių nuolinkio kampo matosi, jog $A\beta_{1-42}$ oligomerų, suformuotų pagal *protokolą I* (III.20 pav., raudoni simboliai), indukuoto laidumo priklausomybė nuo temperatūros yra stipresnė nei $A\beta_{1-42}$ oligomerų, suformuotų pagal *NaOH protokolą* (III.20 pav., mėlyni simboliai). Išskaičiuotos aktyvacijos energijos iš Arenijaus koordinatinių veikiant: $A\beta_{1-42}$ oligomerais, pagal *NaOH protokolą*, siekia 11,6 kJ/mol; $A\beta_{1-42}$ oligomerais, pagal *protokolą I*, siekia 17,2 kJ/mol; $A\beta_{1-42}$ oligomerais, pagal *HFIP/NaOH protokolą*, siekia 13,4 kJ/mol. Tuo tarpu jonų judėjimo elektrolito

tūryje, aktyvacijos energija kiekvienoje sistemoje siekė apie 5,5 kJ/mol visais atvejais.



III.20 pav. Arenijaus koordinatės, kuriose pavaizduotos skirtingais protokolais paruoštų $A\beta_{1-42}$ oligomerų (spalvoti simboliai) sukeltos laidumo priklausomybės nuo temperatūros ir laidumo kitimai paprastame elektrolite (tuščiaviduriai simboliai). Visuose eksperimentuose tBLM buvo suformuota iš DOPC ir β -ME:HC18 = 7:3 prie pH 7,4. **Trikampiai raudoni** – vaizduoja $A\beta_{1-42}$ oligomerų, pagamintų pagal *NaOH protokolą*, poveikį. Naudojama $A\beta_{1-42}$ oligomerų koncentracija buvo 10 μ M. Atitinkamai atidėtas toje sistemoje atidėtas laidumo pokytis elektrolite (trikampiai tuščiaviduriai). **Apskritimai žali** – vaizduoja $A\beta_{1-42}$ oligomerų, pagamintų pagal *protokolą I*, poveikį, kurių koncentracija 3 μ M, o atitinkamai tuščiaviduriai apskritimai – pokytį elektrolite. **Rombai mėlyni** – vaizduoja $A\beta_{1-42}$ oligomerų, pagamintų pagal maišytą NaOH/HFIP *protokolą*, poveikį, kurių koncentracija 5 μ M, atitinkamai tuščiaviduriai rombai – poveikį tirpale.

Išskaičiuotos aktyvacijos energijos pateiktos III.3 lentelėje. Matome, kad didžiausia aktyvacijos energija gauna įkrautos membranos atveju (DOPC/DOPS), tuo tarpu jonų judėjimo, per membraną sudarytą iš DOPC ir DOPC/CHO30%, aktyvacijos energija buvo panaši apie 11 kJ/mol (III.3 lentelė). Netikėtas rezultatas, gautas kai, jonai lengvai juda per $A\beta_{1-42}$ oligomerų paveiktas membranas, turinčias sfingomielino. Šiuo atveju

išskaičiuota aktyvacijos energija siekia tik 7,1 kJ/mol (III.3 lentelė). Tokia vertė jau palyginama su apskaičiuota aktyvacijos energija poras formuojančių toksinų atveju ir elektrolite. Rezultatai rodo, kad A β_{1-42} oligomerų veikimo pobūdis, membranose, turinčiose sfingomielino, yra kitoks, nei jo neturinčiose. Tą patvirtina ir pastebimai didesnis amiloidų indukuotas tBLM laidumas.

III.3 lentelė. Aktyvacijos energijų, išskaičiuotų iš Arėnijaus koordinačių (III.20 pav.), palyginimas A β_{1-42} oligomerų (10 μ M, paruoštų pagal *NaOH protokolą*) indukuoto laidumo, skirtingos lipidinės kompozicijos membranose ir jonų laidumo elektrolite.

<i>Fosfolipidai</i>	<i>Aktyvacijos energija, ΔE_a defektų, kJ/mol</i>
<i>DOPC</i>	11,6
<i>DOPC/CHO30</i>	11,1
<i>DOPC/CHO/SM</i>	7,1
<i>DOPC/DOPS</i>	14,3
<i>tBLM elektrolito tirpale, 100 mM NaCl</i>	5,5

3. Apibendrinimas

Darbe optimizuoti toksiškųjų A β_{1-42} oligomerinių formų gavimo protokolai. Suformuotų *in vitro*, pagal *protokolus I, II*, A β_{1-42} agregatų morfologijos tyrimai, pasitelkiant paviršinį matavimo metodą: atominės jėgos mikroskopiją ir tūrinius metodus: DLS ir FCS, parodė turimas dvi dalelių populiacijas, besisikiriančias dydžiu. Buvo nustatyta sąsaja tarp A β_{1-42} oligomerinių dalelių dydžio ir neurotoksiškumo: didžiausiu toksiškumu pasižymi A β_{1-42} oligomerai, kurių dydis, pagal AFM yra 1 – 3 nm, tuo tarpu oligomerai, kurių dydis 5 – 10 nm nebuvo neurotoksiški kultivuojamoms neuronų kultūroms. Šių skirtingų A β_{1-42} oligomerų CD spektrų analizė, neparodė jokių žymių skirtumų jų antrinėje struktūroje, kurioje dominavo β -kolstės (43 %). SDG metodu parodyta, kad A β_{1-42} oligomerai ir fibrilės adsorbuojasi oro/vandens fazių riboje orientuotoje formoje, taigi, generuoja stiprius vibracinius signalus, besiskiriančius tarp įvairių formų agregatų, taigi

gali būti panaudoti, kaip spektriniai žymenys, toksiškųjų $A\beta_{1-42}$ oligomerų detekcijai.

Panaudojus FCS metodą, ištirta $A\beta_{1-42}$ oligomerų sąveika su sintetinėmis fosfolipidinėmis membranomis (veziuklėmis), taip pat su realiomis membranomis, gautomis iš žiurkių neuronų lipidinio ekstrakto. Po sąveikos stebima toksiškųjų $A\beta_{1-42}$ oligomerų sulėtėjusi difuzija, priklausoma nuo vezikulių koncentracijos, tuo tarpu sąveikos neaptikta didžiųjų oligomerų atveju.

EIS pagalba, darbe parodyta, jog $A\beta_{1-42}$ oligomerai pažeidžia dielektrinę fosfolipidinių membranų integralumą. Šis pažeidimas vyksta dėl oligomerų sąveikos su membranomis, kurios pasėkoje membranos dielektrinė konstanta smarkiai išauga, sudarydama sąlygas jonams judėti per membraną. Nustatyta, jog sukeltas tBLM dielektrinio pažeidimo pobūdis skiriasi, varijuojant $A\beta_{1-42}$ oligomerų paruošimo protokolus ir membranos lipidinę sudėtį. Stipresnis $A\beta_{1-42}$ oligomerų poveikis stebimas fosfolipidinėms membranoms, turinčioms sfingomielino. Jonų judėjimo, pro $A\beta_{1-42}$ oligomerų, paruoštų naudojant HFIP oligomerizacijos inhibitorių (protokolas I), aktyvacinis barjeras yra didelis (>30 kJ/mol). Tai rodo, rodo kokybiškai skirtingą jonų judėjimo mechanizmą, nei tas, kuris stebimas poras formuojančių toksinų atveju. Tačiau, paruošus oligomerus, nenaudojant HFIP inhibitoriaus, membranų, ypač turinčių sfingomielino, pažaida tampa panaši į tą, kuri stebima poras formuojančių toksinų atveju, o jonų judėjimo per membraną aktyvacijos barjeras sumažėja iki maždaug 7 kJ/mol.

IŠVADOS

1. Dirbtinių fosfolipidinių membranų fizinės savybės priklauso nuo molekulinio inkaro, naudojamo membranų imobilizavimui prigimties. Naudojant mononesočiųjų rūgščių fosfolipidinį inkarą HC18 (70%), paviršinis fosfolipidų difuzijos koeficientas yra $4.0 \mu\text{m}^2/\text{s}$, sočiųjų riebiųjų rūgščių fragmentus turinčių inkarų WC14(70%) ir FC16 (70%), atvejais difuzijos koeficientas siekė atitinkamai – $1,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ir $1,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$.
2. Nustatyta, jog dirbtinių membranų defektiškumas priklauso nuo fosfolipido prigimties ir auga fosfolipidų eilėje: DPhPC < DOPC < DEcoPC < POPC < OPPC.
3. Sukurtos daugiakomponentės (iki 5 komponentų) lipidinės sistemos, imituojančios neuronų membranas ir pademonstruota galimybė perkelti gyvųjų organizmų ląstelių lipidinius ekstraktus ant paviršiaus, suformuojant tBLMs.
4. Pademonstruota galimybė modifikuoti tBLM, gaunamų tirpiklio pakeitimo metodu, sudėti, naudojant tiesioginius lipido mainus tarp vezikulių ir paviršiuje imobilizuotos membranos.
5. EIS metodu, įrodytas poras formuojančių toksinų (α -HL, PA63) funkcionalus įsiterpimas į tBLM. Abu toksinai, α -HL ir PA₆₃, sąveikaudami su membrana jas pažeidžia negrįžtamai, jonų judėjimo per α -HL ir PA63 poras ktyvaciniai barjerai yra atitinkamai $8,7 \text{ kJ/mol}$ ir 7.0 kJ/mol .
6. EIS metodu įrodyta, jog vaginolizino įsiterpimui į membraną būtinas cholesterolis. Toksino sukeliama membranos pažaida stebėta iki apatinės baltymo detekcijos ribos maždaug 6 nM .
7. Aptikta stipri koreliacija tarp $A\beta_{1-42}$ oligomerų neurotoksiškumo ir jų dydžio: didžiausiu toksiškumu pasižymi oligomerai, kurių dydis, išmatuotas AFM yra $1-2 \text{ nm}$.
8. Gauta, jog oras/vanduo fazių riboje $A\beta_{1-42}$ oligomerai ir fibrilės adsorbuojasi orientuotoje būsenoje, ir generuoja stiprius vibracinius signalus, besiskiriančius tarp įvairių formų agregatų, o toksiškųjų $A\beta_{1-42}$ oligomerų detekcijai, galima panaudoti charakteringą rezonansą, spektrinį žymenį, ties 2912 cm^{-1} , siejamą su metileno grupių asimetriniu virpesiu.
9. Nustatyta, jog $A\beta_{1-42}$ oligomerai pažeidžia tBLM. Pažaidą lydi membranos dielektrinės konstantos padidėjimas. Pažaida priklausoma nuo $A\beta_{1-42}$ oligomerų koncentracijos.

10. Nustatyta, jog tBLM pažeidos pobūdis ir surišimo su membrana stipris skiriasi, priklausomai nuo $A\beta_{1-42}$ oligomerų paruošimo protokolo ir membranos lipidinės sudėties. Be oligomerizacijos inhibitoriaus HFIP gautų oligomerų pažeida pasižymi žemesne jonų judėjimo aktyvacijos energija, nei oligomerų gautų, naudojant HFIP.
11. $A\beta_{1-42}$ oligomerų sukeliama tBLM pažeida pastebimai stipresnė membranose, turinčiose sfingomielino.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

Publikacijos:

1. Valincius G., Heinrich F., **Budvytyte R.**, Vanderah DJ, Sokolov Y, Hall JE and Lösche M. Soluble amyloid β oligomers affect dielectric membrane properties by bilayer insertion and domain formation: Implications for cell toxicity. *Biophysical Journal*. 2008;95:4845–61.
2. Paulius Cizas*, **Rima Budvytyte***, Ramune Morkuniene, Radu Moldovan, Matteo Broccio, Mathias Loesche, Gediminas Niaura, Gintaras Valincius, Vilmante Borutaite. Size – dependent neurotoxicity of b-amyloid oligomers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010;496(2):8–92.
* Ruošiant publikaciją autorių indelis vienodas.
3. G. Niaura, **R. Budvytyte**, Z. Kuprionis, G. Valincius. Sum frequency generation spectroscopy of amyloid fibrils and oligomers at air/water interface. *Proc. SPIE*, 2010;(7376):1–7.

Rengiamos publikacijos:

1. **Rima Budvytyte**, Gintaras Valincius, Gediminas Niaura, Vlada Voiciuk, Hilary Stauffer Prabhanshu Shekhar, Frank Heinrich, Siddharth Shenoy, David J. Vanderah and Mathias Lösche. Anchor Molecules Affect Structure and Properties of Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Phys.Chem.Chem.Phys.* 2012. *BioFast*.
2. **Rima Budvytyte**, Mindaugas Mickevicius, David J. Vanderah, Frank Heinrich, Gintaras Valincius. Modification of tethered bilayer compositions by material exchange with vesicles. *Langmuir* 2012. *Paruoštas spaudai*.

Publikacijos neieinančios į disertaciją:

Vladislava Voiciuk, Gintaras Valincius, **Rima Budvytyte**, Algirdas Matijoska, Gediminas Niaura. Surface – enhanced Raman spectroscopy for detection of toxic amyloid β oligomers adsorbed on self – assembled monolayers. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012;(95): 526–532.

Tezės:

2010 02 20 – 24 Biophysical Society 54th Annual meeting. San Fransiskas, JAV. Stendinis pranešimas: Matteo Broccio, Rima Budvytyte, Gintaras Valincius and Mathias Loesche. Tethered lipid bilayers that mimic neuronal membranes. *Biophysical Journal*, 2010;(98)3:271a–271a.

2010 04 10 – 13 ACS Mid Atlantic Regional Meeting. Wilmington, Delaware. Skelbtas pranešimas: David J Vanderah, Gintaras Valincius, Rima Budvytyte, Gediminas Niaura, Vlada Voiciuk, Hilary Stauffer, Frank Heinrich, Prabhanshu Shekhar. Characterization of Tethered Bilayer Lipid Membranes.

2010 06 9 – 11 XII International conference on Laser Applications in Life Sciences 2010 (LALS–2010), Oulu, Suomija. Skaitytas pranešimas: G. Niaura, R. Budvytytė, G. Valincius, Z. Kuprionis. Sum frequency generation spectroscopy of amyloid fibrils and oligomers at air/water interface.

2010 06 15 – 17 XI Tarptautinė Lietuvos Biochemikų draugijos konferencija, Tolieja, Lietuva. Rima Budvytyte*, Paulius Cizas*, Ramune Morkuniene, Radu Moldovan, Matteo Broccio, Mathias Loesche, Gediminas Niaura, Gintaras Valincius, Vilmante Borutaite. Size dependent neurotoxicity of β -amyloid oligomers. *Both authors contributed equally.

2011 03 05 – 09 Biophysical Society 55th Annual Meeting, Baltimore, Merilendas, JAV. Rima Budvytyte, Paulius Cizas, Ramune Morkuniene, Sidd Shenoy, Vilmante Borutaite, Mathias Lösche, Gintaras Valincius. Membrane Affinity and Neurotoxicity of b-amyloid Oligomers. *Biophysical Journal*, 2011;(100)3:511a

2011 09 07 – 10 1st Central and Eastern European Conference on Thermal Analysis and Calorimetry (CEEC–TAC1). Craiova, Rumunija.. Stendinis pranešimas: Rima Budvytyte, David J. Vanderah, Gintaras Valincius. Formation and modification of Tethered Lipid Bilayer membrane (tBLM) by Vesicle Fusion.

2012 07 23 –27 ICNT, Interncional Conference on Nanoscience +Tecnology, Paris, France. Rima Budvytyte, Tadas Ragaliauskas, Gintaras Valincius. “Multicomponrnt tethered bilayers by lipid exchanges with vesicles.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. Caffrey Ai X. Cubic Phases and Isotropic Structures Formed by Membrane Lipids — Possible Biological Relevance. *Biophys. J.* 2000;(79):394–402.
2. Albertorio F., Diaz A.J., Yang T., Chapa V.A., Kataoka S., Castellana E.T, and Cremer P.S. Fluid and Air-stable Lipopolymer Membranes for Biosensor Applications. *Langmuir.* 2005;(21):7476–84.
3. Andersen O.S. and Koeppe R.E. Bilayer Thickness and Membrane Protein Function: An Energetic Perspective. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2007;(36):107–30.
4. Anglin T.C. and Conboy J.C. Lateral Pressure Dependence of the Phospholipid Transmembrane Diffusion Rate in Planar-Supported Lipid Bilayers. *Biophys. J.* 2008;(95):186–93.
5. Arispe N., Diaz J.C., Simakova O. Prospects for Treating Alzheimer’s Disease with Ab Channel Blockers. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007;(1768):1952–65.
6. Arispe N., Rojas E., Pollard H.B. β -amyloid Ca^{2+} - Channel Hypothesis for Neuronal Death in Alzheimer’s Disease. *Mol. Cell Biochem.* 1994;(140):19–125.
7. Ash E.A. and Nicholls G. Super-Resolution Aperture Scanning Microscope. *Nature.* 1972;(237):510–13.
8. Atanasov V., Atanasova P.P., Vockenroth I.K., Knorr N. and Koper I. A Molecular Toolkit for Highly Insulating Tethered Bilayer Lipid Membranes on Various Substrates. *Bioconjugate Chem.* 2006;(17):631–37.
9. Bacia K. and Schwille P. A Dynamic View Of Cellular Processes By In Vivo Fluorescence Auto- And Cross-Correlation Spectroscopy. *Methods.* 2003;(29):74–85.
10. Backer J.M. & Dawidowicz E.A. The Rapid Transmembrane Movement Of Cholesterol In Small Unilamellar Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta,* 1979;(551):260–70.
11. Banerjee R. Liposomes: Applications in Medicine. *J. Biomater. Appl.* 2001;(16):3–21.
12. Bard A.J. and Faulkner L.R. Techniques Based On Concepts Of Impedance. In: *Electrochemical Methods Fundamentals And Applications*, 2th Ed. John Wiley And Sons: USA, 2001. P. 368–417.
13. Barsoukov E. and Macdonald J. Impedance spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications 2th ed. John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, New Jersey, 2005.
14. Basañe G. Membrane fusion: the Process and Its Energy Suppliers. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2002;(59):1478–90.
15. Bayley H. and Cremer P.S. Stochastic Sensors Inspired by Biology. *Nature.* 2001;(413):226–30.
16. Bechinger B. Understanding Peptide Interactions With The Lipid Bilayer: A Guide To Membrane Protein Engineering. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2000;(4):639–44.
17. Benda A., Benes M., Marecek V., Lhotsky A., Hermens W.T. and Hof M. How To Determine Diffusion Coefficients in Planar Phospholipid Systems by

- Confocal Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Langmuir*, 2003;(19):4120–26.
18. Benilova I., Karran E. & De Strooper B. The Toxic A β Oligomer And Alzheimer's Disease: An Emperor In Need Of Clothes. *Nature Neuroscience*. 2012;(15)3:349–57.
 19. Bennett W.F., Maccallum J.L., Hinner M.J., Marrink S.J. & Tieleman D.P. Molecular View Of Cholesterol Flip-Flop And Chemical Potential In Different Membrane Environments. *J Am Chem Soc.* 2009;(131):12714–20.
 20. Benz M., Gutschmann T., Chen N., Tadmor R., Israelachvili J. Correlation Of AFM And SFA Measurements Concerning The Stability Of Supported Lipid Bilayers. *Biophys. J.* 2004;(86):870–79.
 21. Bernstein S.L., Dupuis N.F., Lazo N.D., Wyttenbach T., Condrón M.M., Bitan G., Teplow D.B., Shea J.E., Ruotolo B.T., Robinson C.V. and Bowers M.T. Amyloid-B Protein Oligomerization and the Importance of Tetramers and Dodecamers in the Aetiology of Alzheimer's Disease. *Nature chemistry*;(1):326–31.
 22. Bevers E.M., Comfurius P., van Rijn J.L.M.L., Hemker H.C. and Zwaal R.F.A. Generation Of Platelet Prothrombin Converting Activity And The Exposure Of Phosphatidylserine At The Platelet Outer Surface. *Eur. J. Biochem.* 1982;(122):429–36.
 23. Bezrukov S.M. Functional Consequences Of Lipid Packing Stress. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2000;(5):237–43.
 24. Bhakdi S. and Tranum-Jensen J. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiological reviews*. 1991;(4):733–51.
 25. Binnig G., Quate C.F. and Gerber C. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 1986;(56):930–33.
 26. Bischofberger M. , Gonzalez M.R. and Gisou van der Goot F. Membrane Injury By Pore-Forming Proteins. *C Opin. Cell Biol.* (2009);21:589–95.
 27. Blaine Stine Jr.W, Dahlgren K.N, Krafft G.A. and LaDu M.J. *In Vitro* Characterization of Conditions for Amyloid-beta Peptide Oligomerization and Fibrillogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;(278):11612–22.
 28. Bourdeau, R.W., Malito E., Chenal A., Bishop B.L., Musch M.W., Villereal M.L., Chang E.B., Mosser E.M., Rest R.F., Tang W.J. Cellular Functions And X-Ray Structure Of Anthrolysin O, A Cholesterol-Dependent Cytolysin Secreted By *Bacillus Anthracis*. *J. Biol. Chem.* 2009;(284):14645–56.
 29. Braha O., Gu L.Q., Zhou L., Lu X., Cheley S. And Bayley H. Simultaneous Stochastic Sensing Of Divalent Metal Ions. *Nat Biotechnol.* 2000;(18):1005–07.
 30. Bretschneider F. and Weille de J. Electrochemistry. In: Introduction to Electrophysiological Methods And Instrumentation. London: Elsevier/Academic Press. 2006. p. 103–15.
 31. Burgess M., Li S.L., Horswell G., Szymanski J., Lipkowski J., Majewski and Satija S. Electric Field-driven Transformations of a Supported Model Biological Membrane{an Electrochemical and Neutron Reflectivity Study. *Biophys.J.* 2004;(86):1763.
 32. Caughey B and Lansbury, Jr P.T. *Annu. Rev. Neurosci.* (2003);26:267–98.

33. Chauhan V. and Bhatnagar R. Identification of Amino Acid Residues of Anthrax Protective Antigen Involved in Binding with Lethal Factor. *Infection And Immunity*. 2002;(70)8:4477–84.
34. Chen X. and Chen Z. SFG Studies on Interactions Between Antimicrobial Peptides and Supported Lipid Bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006;(1758):1257–73.
35. Chen X., Clarke M.L., Wang J., Chen Z. Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy Studies on Molecular Conformation and Orientation of Biological Molecules At Interfaces. *Int. J. Mod. Phys. B*. 2005;(19):691–713.
36. Chen X., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Williams P.M., Davies J., Dawkes A. C. and Edwards J. C. Interpretation of tapping mode atomic force microscopy data using amplitude-phase-distance measurements. *Ultramicroscopy* 1998;(75):171–81.
37. Chiang J.Y. Regulation of Bile Acid Synthesis. *Front Biosci*. 1998;(3):176–93.
38. Chiti F., Dobson C.M. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 2006;(75):333–66.
39. Chung M., Lowe R.D., Chan Y.H.M., Ganesan P.V., Boxer S.G. DNA-Tethered Membranes Formed by Giant Vesicle Rupture. *Journal of Structural Biology* 2009;(168):190–99.
40. Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L, Pericak-Vance M.A. Gene Dose Of Apolipoprotein E Type 4 Allele And The Risk Of Alzheimer's Disease In Late Onset Families. *Science*. 1993;(261):828–9.
41. Cornell A.B., Krishna G., Osman D.P., Pace D.R. and Wieczorek L. Tethered - Bilayer Lipid Membranes as a Support for Membrane – Active Peptides. *Biochemical Society Transactions*. 2001;(29):613–17.
42. Cornell B.A., Braach-Maksvytis V.L.B., King L.G., Osman P.D.J., Wieczorek L., Raguse B., Pace R.J. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature* 1997;(387):580–83.
43. Cullis P.R., Fenske D.B. and Hope M.J. Physical Properties and Functional Roles of Lipids in Membranes. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes., Elsevier 1996:1–33*.
44. Curtain C.C., Ali F.E., Smith D.G., Bush A.I., Masters C.L., Barnham K.J. Metal Ions, pH, and Cholesterol Regulate the Interactions of Alzheimer's Disease Amyloid-B Peptide With Membrane Lipid. *J Biol Chem*. 2003;(278):2977–82.
45. Dale G.L., Tweten R.K. Characterization of a Streptococcal Cholesterol-Dependent Cytolysin with A Lewis Y and B Specific Lectin Domain. *Biochemistry*. 2008;(47): 7097–07.
46. Danelon C., Terrettaz S., Guenat O., Koudelka M., Vogel H. Probing The Function f Ionotropic and G Protein-Coupled Receptors in Surface-Confined Membranes. *Methods* 2008;46:104–15.
47. De S. and Olson R. Crystal Structure of the Vibrio Cholerae Cytolysin Heptamer Reveals Common Features Among Disparate Pore-Forming Toxin. *PNAS*. 2011; (108):7385–90.
48. Devaux P.F. Protein Involvement in Transmembrane Lipid Asymmetry. *Annu*.

- Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1992;(21):417–43.
49. Devaux P.F. Static and Dynamic Lipid Asymmetry in Cell Membranes. *Biochemistry*. 1991;(30):1163–73.
 50. Dinges M.M., Orwin P.M. and Schlievert P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000;(1):16–34.
 51. Doyle A.W., Fick J., Himmelhaus M., Eck W., Graziani I., Prudovsky I., Grunze M., Maciag T., Neivandt D.J. Protein Deformation of Lipid Hybrid Bilayer Membranes Studied by Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy. *Langmuir*. 2004;(20):8961–65.
 52. Duschl C., Liley M., Lang H, Ghandi A., Zakeeruddin S.M., Stahlberg H., Dubochet J., Nemetz A., Knoll W., Vogel H. Sulfur-Bearing Lipids for the Covalent Attachment of Supported Lipid Bilayers to Gold Surfaces: A Detailed Characterization and Analysis. *Materials Science And Engineering C4*. 1996;7-18
 53. Eehalt R., Keller P., Haass C., Thiele C., Simons K. Amyloidogenic Processing Of The Alzheimer Beta-Amyloid Precursor Protein Depends on Lipid Rafts. *J Cell Biol*. 2003;(160):113–23.
 54. Hotze M.E. and Tweten R.K.. Membrane Assembly of The Cholesterol-Dependent Cytolysin Pore Complex. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;(1818): 1028–38.
 55. Elliot J.T., Meuse C.W., Silin V., Kreuger S., Woodward J.T., Mallow T., Plant A.L. Biomimetic Membranes on Metal Supports. In: Rusling JF, editor. *Films: Design, Function and Applications*. New York: Marcel Dekkar. 2003. p. 99–18.
 56. Epand R.M. Lipid Polymorphism and Protein–Lipid Interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Biomembranes*. 1998;(1376):3353–68.
 57. Erbe A., Bushby R.J., Evans S.D. and Jeuken L.J.C. Tethered Bilayer Lipid Membranes Studied by Simultaneous Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy and Electrochemical Impedance Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 2007;(111):3515–24.
 58. Fadeel B. and Xue D. The Ins and Outs of Phospholipid Asymmetry in the Plasma Membrane: Roles in Health and Disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2009;44(5):264–77.
 59. Farrand S., Hotze E., Friese P., Hollingshead S.K., Smith D.F., Cummings R.D., G.L., Dale G.L. and Tweten R.K. Characterization of a Streptococcal Cholesterol-Dependent Cytolysin with a Lewis y and b Specific Lectin Domain. *Biochemistry*. 2008;47(27):7097–107.
 60. Fattal D.R., Ben-Shaul A. A molecular model for lipid-protein interaction membranes: the role of hydrophobic mismatch. *Biophys J*. 1993;65(5): 1795–809.
 61. Fezoui Y., Teplow D.B. Kinetic Studies of Amyloid β - Protein Fibril Assembly. Differential Effects of α -Helix Stabilization. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002;(277):36948–54.
 62. Findeis M.A. The Role of Amyloid β Peptide 42 in Alzheimer's Disease. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007;(116):266–86.

63. Fontell K. Cubic Phases in Surfactant and Surfactant-Like Lipid Systems. *Colloid Polym. Sci.* 1990;(268):264–85.
64. Frasconi M., Mazzei F., and Ferri T. Protein Immobilization at Gold–Thiol Surfaces and Potential for Biosensing. *Anal Bioanal Chem* 2010;(398):1545–64.
65. Freer J.H. and Arbuthnott J.P. Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Pharmac Ther.* 1983;(19):55–106.
66. Frolov V.A., Shnyrova A.V. and Zimmerberg J. Lipid Polymorphisms and Membrane Shape. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;(3):a004747.
67. Galdiero S. and Gouaux E. High Resolution Crystallographic Studies of A-Hemolysin–Phospholipid Complexes Define Heptamer–Lipid Head Group Interactions: Implication for Understanding Protein–Lipid Interactions. *Prot Sci.* 2004;(13):1503–11.
68. Gamblin T.C., Chen F., Zambrano A., Abraha A., Lagalwar S., Guillozet A.L., Lu M., Fu Y., Garcia-Sierra F., LaPointe N., Miller R., Berry R.W., Binder L.I. and Vincent L. Cryns. Caspase Cleavage of Tau: Linking Amyloid and Neurofibrillary Tangles in Alzheimer’s Disease. *PNAS.* 2003;(Early Edition):1–6.
69. Gandy S.J. The Role of Cerebral Amyloid β Accumulation in Common Forms of Alzheimer Disease. *Journal of Clin Invest.* 2005;(115):1121–29.
70. Gao M. and Schulten K. Onset of Anthrax Toxin Pore Formation. *Biophysical Journal.* 2006;(90):3267–79.
71. Garcia R. and San Paulo A. Attractive and Repulsive Tip-Sample Interaction Regimes in Tapping-Mode Atomic Force Microscopy. *Physical Review B (Condensed Matter)* 1999;(60):4961–67.
72. Geisse N.A. AFM and combined optical techniques. *MaterialToday.* 2009;(12):40–5.
73. Gelber S.E., Aguilar J.L., Kanako L.T. and Ratner A.J. Functional and Phylogenetic Characterization of Vaginolysin, the Human-Specific Cytolysin from *Gardnerella vaginalis*. *Journal of Bacteriology.* 2008: 3896–03.
74. Geny B. and Popoff M.R. Bacterial Protein Toxins and Lipids: Pore Formation or Toxin Entry Into Cells. *Biology of the Cell.* 2006;98(11):667–78.
75. Giddings K.S., Johnson A.E. and Tweten R.K. Redefining Cholesterol’s Role in the Mechanism of the Cholesterol-Dependent Cytolysins. *PNAS.* 2003;(100):11315–20.
76. Giess F., Friedrich M.G., Heberle J., Naumann R.L. and Knoll W. The Protein-Tethered Lipid Bilayer: A Novel Mimic of the Biological Membrane. *Biophysical Journal.* 2004;(87):3213–20.
77. Giessibl F.J. Advances in Atomic Force Microscopy. *Reviews of Modern Physics.* 2003;(75):949–83.
78. Gilbert R.J.C. Inactivation and Activity of Cholesterol-Dependent Cytolysins: What Structural Studies Tell Us. *Structure.* 2005;(13):1097–106.
79. Gilbert R.J.C. Pore-Forming Toxins. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002;(59):832–44.
80. Gimpl G. Cholesterol-Protein Interaction: Methods and Cholesterol Reporter Molecules. *Subcell Biochem.* 2010;(51):1–45.

81. Glabe C.G. Structural Classification of Toxic Amyloid Oligomers. *J Biol Chem.* 2008;(283):29639–43.
82. Glazier A.S., Vanderah J.D., Plant L.A., Bayley H., Valinčius G. and Kasianowicz J.J. Reconstitution of the Pore-Forming Toxin r-Hemolysin in Phospholipid/18-Octadecyl-1-thiahexa (ethylene oxide) and Phospholipid/*n*-Octadecanethiol Supported Bilayer Membranes. *Langmuir.* 2000;(16):10428–35.
83. Gong, Y., Chang L., Viola K.L., Lacor P.N., Lambert M.P, Finch C.E., Krafft G.A. and Klein W.L.. Alzheimer's Disease-Affected Brain: Presence of Oligomeric A β Ligands (Addls) Suggests a Molecular Basis for Reversible Memory Loss. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003;(100):10417–422.
84. Gorelick P.B. Risk Factors for Vascular Dementia and Alzheimer Disease. *Stroke.* 2004;(35):2620–22.
85. Gouaux E. Alpha-Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an Archetype of Beta-Barrel, Channel-Forming Toxins. *J Struct Biol.* 1998;121(2):110–22.
86. Gouaux E. Channel-Forming Toxins: Tales of Transformation. *Nature Struct Biol.* 1997;(7):566–73.
87. Groves T.J, Dustin L.M. Supported Planar Bilayers in Studies on Immune Cell Adhesion and Communication. *Journal of Immunological Methods.* 2003;(278):19–32.
88. Groves T.J. and Dustin L.M. Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *Journal of Immunological Methods.* 2003;(278):19–32.
89. Groves T.J., Ulman N., Boxer G.S. Micropatterning Fluid Lipid Bilayers on Solid Supports. *Science* 1997;(275):650–3.
90. Gu L.Q., Braha O., Conlan S., Cheley S. and Bayley H. Stochastic Sensing of Organic Analytes By a Pore-Forming Protein Containing a Molecular Adapter. *Nature.* 1999;(398):686–90.
91. Gustafsson J., Ljusberg-Wahren H., Almgren M., Larsson K. Submicron Particles of Reversed Lipid Phases in Water Stabilized by a Nonionic Amphiphilic Polymer. *Langmuir.* 1997;(13):6964–71.
92. Guyot-Sionnest P., Hunt J. H., Shen Y. R. Sum-Frequency Vibrational Spectroscopy of a Langmuir Film: Study of Molecular Orientation of a Two-Dimensional System, *Phys. Rev. Lett.* 1987;(59):1597–00.
93. Haas H., Lamura G., Gliozzi A. Improvement of the Quality of Self Assembled Bilayer Lipid Membranes by Using a Negative Potential. *Bioelectrochemistry.* 2001;(54):1–10.
94. Haass C. and Selkoe D.J. Soluble Protein Oligomers in Neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's Amyloid B-Peptide. *Molecular Cell Biology.* 2007;(8):102–12.
95. Halverson K.M., Panchal R.G., Nguyen T.L., Gussio R., Little S.F., Misakian M., Bavari S. and Kasianowicz J.J. Anthrax Biosensor, Protective Antigen Ion Channel Asymmetric Blockade. *The Journal of Biological Chemistry.* 2005;(280)40:34056–62.
96. Hamai C.K., Higuchi M., Iwai H. and Miyahara Y. Detergent-Mediated Formation of Polymer-Supported Phospholipid Bilayers. *Langmuir* 2010;

- 26(18):14600–05.
97. Hamberger and Svennerholm L. Composition of Cangliosides and Phospholipids of Neural and Glial Cell Enriched fractions. *J. Neurochem.* 1971;(18):1821–29.
 98. Hansma H.G. and Hoh J.H. Biomolecular imaging with the atomic force microscope. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1994;(23):115–39.
 99. Hansma P.K., Cleveland J.P., Radmacher M., Walters D.A., Hillner P.E., Bezanilla M., Fritz M, Vie D., Hansma H.G., Prater C.B., Massie J., Fukunaga L., Gurley J. and Elings V. Tapping Mode Atomic Force Microscopy in Liquids. *Applied Physics Letters.* 1994;(64):1738-40.
 100. Hardy J., Selkoe D.J. The Amyloid Hypothesis Of Alzheimer'S Disease: Progress And Problems On The Road To Therapeutics. *Science's Compass.* 2007;(297):353–56
 101. Harwich M.D., Alves J.M., Buck G.A., Strauss J.F., Patterson J.L., Oki A.T., Girerd P.H. and Jefferson K.K. Drawing the Line Between Commensal and Pathogenic *Gardnerella Vaginalis* Through Genome Analysis and Virulence Studies. *Genomics* 2010;(11):375-87.
 102. Haustein E. and Schwille P. Fluorescence Correlation Spectroscopy: Novel Variations of an Established Technique. *Annu. Rev Biophys. Biomol. Struct.* 2007;(36):151–69.
 103. Heimburg T., Physical Properties of Biological Membranes. Handbook of Molecular Biophysics. Ed. H. G. Bohr. Wiley-VCH 2009, pp. 593–16.
 104. Heinrich F., Ng T., Vanderah D.J., Shekhar P., Mihailescu M., Nanda H. and Losche M. A New Lipid Anchor for Sparsely Tethered Bilayer Lipid Membranes *Langmuir* 2009;(25):4219–29.
 105. Heinz W.F. and Hoh J.H. Spatially Resolved Force Spectroscopy of Biological Surfaces Using the Atomic Force Microscope. *Trends Biotechnol.* 1999;(17):143–50.
 106. Hoh J.H. and Hansma P.K. Atomic Force Microscopy for High–Resolution Imaging In Cell Biology. *Trends Cell Biol.* 1992;(2):208–13.
 107. Hong S.S., Cha J.J. and Cui Y. One Nanometer Resolution Electrical Probe via Atomic Metal Filament Formation. *Nano Lett.*, 2011;(11)1:231–35.
 108. Hoshi M. *et al.* Spherical Aggregates of Beta-Amyloid (Amylospheroid) Show High Neurotoxicity and Activate Tau Protein Kinase I/Glycogen Synthase Kinase-3beta. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003;(100):6370–75.
 109. Hotze E.M. and Tweten R.K. Membrane Assembly of the Cholesterol-Dependent Cytolysin Pore Complex. *Biochimica Et Biophysica Acta* 2012;(1818):1028–1038.
 110. Hubner U., Morgenroth W., Meyer H.G., Sulzbach T., Brendel B. and Mirande W. Downwards to Metrology in Nanoscale: Determination of the AFM Tip Shape With Well-Known Sharp-Edged Calibration Structures. *Applied Physics A (Materials Science Processing) A.* 2003;(76):913–17.
 111. Israelachvili J.N. and Wennerstrom H. Entropic Forces Between Amphiphilic Surfaces In Liquids. *J Phys Chem.* 1992;(96):520–31.
 112. Israelachvili J.N. Intermolecular and Surface Forces; 2nd ed.; Academic Press: San Diego, 1992.

113. Israelachvili J.N., Mitchell D.J. and Ninham B.W. Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles Into Micelles and Bilayers. *J Chem Soc Faraday Trans II*. 1976;(72):1525–68.
114. Jahn R. and Südhof T.C. Membrane Fusion and Exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1999; (68):863–11.
115. Janmey P.A. and Kinnunen P.K.J. Biophysical Properties of Lipids and Dynamic Membranes. *TRENDS in Cell Biology*. 2006;16(10):538–46.
116. Janshoff A. and Steinem C. Transport Across Artificial Membranes—an Analytical Perspective. *Anal Bioanal Chem.*, 2006;385(3):433–51.
117. Jellinger K.A. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm* 2009;(116):1111–62.
118. Jeuken L.J.C., Connell S.D., Henderson P.J.F., Gennis R.B., Evans S.D. and Bushby R.J. Redox Enzymes in Tethered Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 2006;(128):1711–16.
119. Jeuken L.J.C., Connell S.D., Nurnabi M., O'Reilly J., Henderson P.J.F., Evans S.D. and Bushby R.J. Direct Electrochemical Interaction between a Modified Gold Electrode and a Bacterial Membrane Extract. *Langmuir*. 2005;(21):1481–88.
120. Jonas D., Walev I., Berger T., Liebetrau M., Palmer M. and Bhakdi S. Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect Immun*. 1994;62(4):1304–12.
121. Junghans A. and Koper I. Structural Analysis of Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Langmuir* 2010; 26(13):11035–40.
122. Kalb E., Frey S. and Tamm K.L. Formation of Supported Planar Bilayers by Fusion of Vesicles to Supported Phospholipid Monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992;(1103):307–16.
123. Kasianowicz J.J., Henrickson E.S., Weetall H.H. and Robertson B. Simultaneous Multianalyte Detection with a Nanometer – Scale Pore. *Anal Chem*. 2001;(73):2268–72.
124. Kasianowicz J.J., Robertson J.W.F., Chan E.R., Reiner J.E., and Stanford V.M. Nanoscopic Porous Sensors. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2008;(1):737–66.
125. Kaye R., Head E., Thompson J.L., McIntire T.M., Milton S.C., Cotman C.W., Glabe C.G. Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis. *Science*. 2003;(300):486–9.
126. Ke-Jian D., Hai-Yan Z., Hong-Gang H., Hong-Min Z, Wei-Jun G., Yue-Hui M. Progress of Research on Nanopore-Macromolecule Detection. *Chin J Anal Chem*, 2010;38(2):280–5.
127. Keyser U.F. Controlling Molecular Transport Through Nanopores. *J. R. Soc. Interface*. 2011;1–10
128. Kiessling V., Crane J.M., and Tamm L.K. Transbilayer Effects of Raft-like Lipid Domains in Asymmetric Planar Bilayers Measured by Single Molecule Tracking. *Biophys. J*. 2006;(91):3313–26.
129. Killian J.A. and Gunnar von Heijne. How Proteins Adapt to a Membrane–Water Interface. *Trends in Biochemical Sciences* 2000; (25):429–34.
130. Killian J.A. Synthetic Peptides as Models for Intrinsic Membrane Proteins.

- FEBS Letters*. 2003;(555):134–8.
131. Kim S.A. and Schwille P. Intracellular Applications of Fluorescence Correlation Spectroscopy: Prospects for Neuroscience. *Current Opinion in Neurobiology*. 2003;(3):583–90.
 132. Knoll W., Frank C.W., Heibel C., Naumann R., Offenhausser A., Ruhe J., Schmidt E.K., Shen W.W., Sinner A. Functional tethered lipid bilayers. *Reviews in Molecular Biotechnology* 2000;(74):137–58.
 133. Krishna G., Schulte J., Cornell B.A., Pace R.J. and Osman P.D. Tethered Bilayer Membranes Containing Ionic Reservoirs: Selectivity and Conductance. *Langmuir*. 2003;(19):2294.
 134. Kullman L., Winterhalter M., Bezrukov S.M. Transport of Maltodextrins Through Maltoporin: a Single-Channel Study. *Biophys. J.* 2002.;(82):803–12.
 135. Kumar S., Rezaei-Ghaleh N., Terwel D., Thal D.R, Richard M., Hoch M., Mc Donald J.M., Wullner U., Glebov K., Heneka M.T., Walsh D.M., Zweckstetter M. and Walter J. Extracellular Phosphorylation of the Amyloid B-Peptide Promotes Formation of Toxic Aggregates During the Pathogenesis Of Alzheimer’s Disease. *The EMBO Journal*. 2011;(30):2255–65.
 136. Kuntze A. Svedhem S. and Kasemo B. Lipid Transfer between Charged Supported Lipid Bilayers and Oppositely Charged Vesicles. *Langmuir* 2009;(25):5146–58.
 137. Kusumi A., Subczynski W.K., Pasenkiewicz-Gierula M., Hyde J.S. and Merkle H. Spin Label Study on Phosphatidylcholine-Cholesterol Membranes: Effect of Alkyl Chain Length and Unsaturation in Fluid Phase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1986;(854): 307–17.
 138. Kuypers F.A., Lewis R.A., Hua M., Schott M.A., Discher D., Ernst J.D. and Lubin B.H. Detection of Altered Membrane Phospholipid Asymmetry in Subpopulations of Human Red Blood Cells Using Fluorescently Labeled Annexin V. *Blood* 1996;87(3):1179–87.
 139. Lacy D.B., Lin H.C, Melnyk R.A., Schueler-Furman O., Reither L., Cunningham K., Baker D. and Collier R.J. A Model of Anthrax Toxin Lethal Factor Bound to Protective Antigen. *PNAS*. 2005;(102)45:16409–14.
 140. Lacy D.B., Wigelsworth D.J, Melnyk R.A., Harrison S.C. and Collier R.J. Structure of Heptameric Protective Antigen Bound to an Anthrax Toxin Receptor: a Role for Receptor in Ph-Dependent Pore Formation. *PNAS*, 2004;(101):13147–51.
 141. Lal, R. and John S.A. Biological Applications of Atomic Force Microscopy. *Am. J. Physiol* 1994;(266):1–21.
 142. Lambert M.P., Viola K.L., Chromy B.A., Chang L., Morgan T.E., Yu J., Venton D.L., Krafft G.A., Finch C.E. & Klein W.L. Vaccination with Soluble Abeta Oligomers Generates Toxicity-Neutralizing Antibodies. *J Neurochem*. 2001;(79):595–05.
 143. Lang H., Duschl C., Vogel H. A New Class of Thiolipids for the Attachment of Lipid Bilayers on Gold Surfaces. *Langmuir* 1994;(10):197–10.
 144. Lange Y., Ye J. & Steck T.L. How Cholesterol Homeostasis is Regulated by Plasma Membrane Cholesterol in Excess of Phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;(101):11664–7.

145. Larsson K. Aqueous Dispersions of Cubic Lipid–Water Phases. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2000;(5):64–9.
146. Lasagna-Reeves C.A., Glabe C.G. & Kaye R. Amyloid- β Annular Protofibrils Evade Fibrillar Fate in Alzheimer’s Disease Brain. *J Biol Chem.* 2011;(286):22122–30.
147. Lashuel H.A., Hartley D., Petre B.M., Walz, T. & Lansbury P.T.Jr. Neurodegenerative Disease: Amyloid Pores From Pathogenic Mutations. *Nature.* 2002;(418):291.
148. Lasic D.D. Novel Applications of Liposomes. *Trends Biotechnol.* 1998;(16):307–21.
149. Lau T.L., Ambroggio E.E. Tew D.J., Cappai R., Masters C.L., Fidelio G.D., Barnham K.J., Separovic F. Amyloid-B Peptide Disruption of Lipid Membranes and the Effect of Metal Ions. *J Mol Biol.* 2006;(356):759–70.
150. Lauren J., Gimbel D.A., Nygaard H.B., Gilbert J.W. & Strittmatter S.M. Cellular Prion Protein Mediates Impairment of Synaptic Plasticity by Amyloid-Beta Oligomers. *Nature.* 2009;(457):1128–32.
151. Lee A.G. Effects Of Lipid-Protein Interactions on Membrane Function. *Biomembranes*, Vol. 1, JAI Press, London, pp. 1995;187–24.
152. Lee A.G. How Lipids Affect The Activities of Integral Membrane Proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2004;(1666):62–87.
153. Lee A.G. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003;(1612):1–40.
154. Lee I., Wang X., Zhu C.F., Wang C., and C. Bai. Investigation Of Polystyrene Nanoparticles and DNA-Protein Complexes by AFM with Image Reconstruction. *Applied Surface Science* 1998;(126):281–6.
155. Leonenko V.Z., Carnini A., Cramb T.D. Supported planar Bilayer Formation by Vesicle Fusion: the Interaction of Phospholipid Vesicles with Surfaces and the Effect of Gramicidin on Bilayer Properties Using Atomic Force Microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2000;(1509):131–47.
156. Lesne, S., Koh M.T., Kotilinek L., Kaye R., Glabe C.G., Yang A., Gallagher M. and Karen H. Ashe A Specific Amyloid-B Protein Assembly in the Brain Impairs Memory. *Nature.* 2006;(440):352–57.
157. Leventis R. & Silvius J.R. Use of Cyclodextrins to Monitor Transbilayer Movement and Differential Lipid Affinities of Cholesterol. *Biophys J.* 2001;(81):2257–67.
158. Lindblom G., Rilfors L. Cubic Phases and Isotropic Structures Formed by Membrane Lipids — Possible Biological Relevance. *Biochim. Biophys. Acta* 1989;(988):221–56.
159. Lioudyn M.I., Broccio M., Sokolov Y., Rasool S., Wu J., Alkire M.T., Liu V., Kozak J.A., Dennison P.R., Glabe C.G., Losche M., Hall J.E. Effect of Synthetic Ab Peptide Oligomers and Fluorinated Solvents on Kv1.3 Channel Properties and Membrane Conductance. *PLoS ONE* 2012;(7)4: e35090.
160. Lipowsky R. and Seifert U. Adhesion of Vesicles and Membranes. *Mol Cryst Liq Cryst.* 1990;(202):17–25.
161. Livengood C.H. Bacterial Vaginosis: an Overview for 2009. *Rev. Obstet. Gynecol.* 2009;(1):28–37.

162. Love J.C., Estroff L.A., Kriebel J.K., Nuzzo R.G. and Whitesides G.M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem Rev.* 2005;(105):1103–69.
163. Manno S., Takakuwa Y., and Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *PNAS.* 2002;99(4):1943–48.
164. Marrazzo J.M., Thomas K.K., Fiedler T.L., Ringwood K., Fredricks D.N. Relationship of Specific Vaginal Bacteria and Bacterial Vaginosis Treatment Failure in Women Who Have Sex With Women. *Ann Intern Med.* 2008;(149):20–28.
165. Marsh D. Protein modulation of lipids, and vice-versa, in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2008;(1778):1545–75
166. Martin S.R. and Schilstra M.J. Circular Dichroism and Its Application to the Study of Biomolecules. *METHODS IN CELL BIOLOGY.* 2008;(84):263–93.
167. Maxfield F.R. & Mondal M. Sterol and Lipid Trafficking in Mammalian Cells. *Biochem Soc Trans,* 2006;(34):335–9.
168. McGillivray D.J., Valincius G., Heinrich F., Robertson J.W.F., Vanderah D.J., Febo-Ayala W., Ignatjev I., Losche M., Kasianowicz J.J. Structure of Functional *Staphylococcus aureus* alpha-Hemolysin Channels in Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Biophysical Journal.* 2009;96(4):1547–53.
169. McGillivray D.J., Valincius G., Vanderah D.J., Febo-Ayala W., Woodward J.T., Heinrich F., Kasianowicz J.J., Losche M. Molecular-Scale Structural and Functional Characterization of Sparsely Tethered Bilayer Lipid Membranes. *Biointerphases* 2007;(2):21–33.
170. Medina M.A. and Schwille P. Fluorescence Correlation Spectroscopy For The Detection and Study of Single Molecules in Biology. *BioEssays.* 2002;(24):758–64.
171. Menzies B.E. and Kernodle D.S. Site-Directed Mutagenesis of the Alpha-Toxin Gene of *Staphylococcus Aureus*: Role of Histidines in Toxin Activity in Vitro And in a Murine Model. *Infect Immun.* 1994;(62):1843–7.
172. Middleton E.R. and Rhoades E. Effects of Curvature and Composition on α -Synuclein Binding to Lipid Vesicles. *Biophysical Journal.* 2010;(99):2279–88.
173. Mildažienė V., Jarmalaitė S., Daugelavičius R. *Laštelės Biologija.* Kaunas, 2004
174. Montoya M. and Gouaux E. B-Barrel Membrane Protein Folding and Structure Viewed Through the Lens of A-Hemolysin. *Biochim Biophys Acta.* 2003;(1609):19–27.
175. Mourez M., Lacy D.B, Cunningham K., Legmann R., Sellman B.R., Mogridge J., Collier R.J. 2001: A Year of Major Advances in Anthrax Toxin Research. *Trends Microbiol.* 2002;(10):287–93.
176. Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system *Nature.* 1962;(194):979.

177. Munro J.C. and Frank C.W. In Situ Formation and Characterization of Poly(ethyleneglycol)-Supported Lipid Bilayers on Gold Surfaces. *Langmuir* 2004;(20):10567–75.
178. Mutze J., Ohrt T., and Schwille P. Fluorescence Correlation Spectroscopy in Vivo. *Laser Photonics Rev.* 2011;(5)1:52–67.
179. Nablo B.J, Halverson K.M., Robertson J.W.F., Nguyen T.L., Panchal R.G., Gussio R., Bavari S., Krasilnikov O.V. and Kasianowicz J.J. Sizing the Bacillus anthracis PA63 Channel with Nonelectrolyte Poly(Ethylene Glycols). *Biophysical Journal* 2008;(95):1157–64.
180. Nagamune Hohnishi C., Katsuura A., Fushitani K., Whiley R.A., Tsuji A., Matsuda Y. Intermedilysin, a Novel Cytotoxin Specific for Human Cells Secreted by *Streptococcus Intermedius* UNS46 Isolated from a Human Liver Abscess. *Infect Immun.* 1996;64(8): 3093–100.
181. Nagao E. and Dvorak J.A. An Integrated Approach to the Study of Living Cells by Atomic Force Microscopy. *Journal of Microscopy* 1998;(191):8–19.
182. Nakamura M., Sekino N., Iwamoto M., Ohno-Iwashita Y. Interaction of Thetatoxin (Perfringolysin O), a Cholesterol-Binding Cytolysin, with Liposomal Membranes: Change in the Aromatic Side Chains Upon Binding and Insertion. *Biochemistry.* 1995;(34):6513–20.
183. Nassi S., Collier R.J. and Finkelstein A. PA63 Channel of Anthrax Toxin: An Extended α -Barrel. *Biochemistry* 2002;(41)5:1445–50.
184. Naumann R., Schiller S.M., Giess F., Grohe B., Hartman K.B., Karcher I., Koper I., Lubben J., Vasilev K., Knoll W. Tethered Lipid Bilayers on Ultraflat Gold Surfaces. *Langmuir* 2003a;(19):5435–43.
185. Nguyen V.T. and Kamio Y. Cooperative Assembly of β -Barrel Pore-Forming Toxins. *J. Biochem.* 2004;(136):563–67.
186. Niaura G., Budvytyte R., Kuprionis Z., Valincius G. Sum Frequency Generation Spectroscopy of Amyloid Fibrils And Oligomers at Air/Water Interface. *Proc. SPIE*, 2010, vol 7376, 73760Q1–7.
187. Niaura G., Kuprionis Z. Suminio Dažnio Generacija. Vilnius 2009: 153–84.
188. Niaura G., Kuprionis Z., Ignatjev I., Kazemekaite M., Valincius G., Talaikyte Z., Razumas V. and Svendsen A. Probing of Lipase Activity at Air/Water Interface by Sum-Frequency Generation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 2008;(112):4094–01.
189. Niaura G., Kuprionis Z., Ignatjev I., Kazemekaitė M., Valinčius, Talaikytė Z., Razumas V., Svendsen A. *J. Phys. Chem B.* 2008;(112)4094–101.
190. Onogawa T. Local Delivery of Soluble Interleukin-6 Receptors to Improve the Outcome of Alpha-Toxin Producing *Staphylococcus Aureus* Infection in Mice. *Immunobiology.* 2005;(209):651–60.
191. Parker M.W. and Feil S.C. Pore-Forming Protein Toxins: from Structure to Function. *Biophysics & Molecular Biology.* 2005;(88):91–142.
192. Pastan I., Kreitman R.J. Immunotoxins in Cancer Therapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2002;(3):1089–91.
193. Perez-Salas U.A, Faucher K.M., Majkrzak C.F., Berk N.F., Chaikof E.L. and Krueger S. Characterization of a Biomimetic Polymeric Lipid Bilayer by Phase Sensitive Neutron Reflectometry. *Langmuir.* 2003;(19):7688–94.

194. Petosa C., Collier R.J., Klimpel K.R., Leppla S.H., Liddington R.C. Crystal Structure of The Anthrax Toxin Protective Antigen. *Nature*. 1997;(385): 833–838.
195. Petty H.R. *Molecular Biology of Membranes: Structure and Function*; Plenum Press: New York, 1993.
196. Pike L.J. Lipid rafts: Heterogeneity on the High Seas. *Biochem J*. 2004;(378):281–92.
197. Plant L.A., Gueguetchkeri M. and Yap W. Supported Phospholipid/Alkanethiol Biomimetic Membranes: Insulating Properties. *Biophysical Journal*. 1994;(67):1126–33.
198. Plant L.A. Self – Assembled Phospholipid/Alkanethiol Biomimetic Bilayers on Gold. *Langmuir* 1993;(9):2764–67.
199. Pleckaityte M., Mistiniene E., Lasickiene R., Zvirblis G. and Zvirbliene A. Generation of Recombinant Single-Chain Antibodies Neutralizing the Cytolytic Activity of Vaginolysin, the Main Virulence Factor of *Gardnerella vaginalis*. *Biotechnology*. 2011;(11):100–9.
200. Polekhina G., Giddings K.S., Tweten R.K., Parker M.W. Insights into the Action of the Superfamily of Cholesterol-Dependent Cytolysins from Studies of Intermedilysin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005;(102):600–5.
201. Politz J.C., Browne E.S., Wolf D.E., Pederson T. Intranuclear Diffusion and Hybridization State of Oligonucleotides Measured by Fluorescence Correlation Spectroscopy in Living Cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;(95):6043–8.
202. Posse de Chaves E. and Sipione S. Sphingolipids and Gangliosides of the Nervous System in Membrane Function and Dysfunction. *FEBS Lett*. 2010;(584):1748–59.
203. Praškevičius A., Ivanovienė L., Stasiūnienė N. ir kt. *Biochemija*. Kaunas: KMU leidykla, 2003. p.103–18.
204. Przybylo M., Sýkora J., Humpolíčková J., Benda A., Zan A. and Hof M. Lipid Diffusion in Giant Unilamellar Vesicles Is More than 2 Times Faster than in Supported Phospholipid Bilayers under Identical Conditions. *Langmuir*, 2006;(22):9096–99.
205. Querfurth H.W. and LaFerla F.M. Alzheimer’s Disease. *N Engl J Med*. 2010;(362):329–44.
206. Ragure B., Braach-Maksvytis B., Cornell A.B., King G.L., Osman P.D.J., Pace R.J. Wiczorel L. Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation and Ionic Reservoir Characterization. *Langmuir* 1998;(14):648–59.
207. Ramirez-Aguilar K.A. and Rowlen K.L. Tip Characterization from AFM Images of Nanometric Spherical Particles. *Langmuir* 1998;(14):2562–6.
208. Randis T.M., Kulkarni R., Aguilar J.L., Ratner A.J. Antibody-Based Detection and Inhibition of Vaginolysin, the *Gardnerella vaginalis* Cytolysin. *PLoS ONE*. 2009;(4):e5207.
209. Rao N.M., Plant L.A., Silin V., Wight S. and Hui W.S. Characterization of Biomimetic Surfaces Formed from Cell Membranes. *Biophysical Journal*. 1997;(73):3066 – 77.
210. Reimhult E., Höök F., Kasemo B. Intact Vesicle Adsorption and Supported

- Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure. *Langmuir* 2003;(19):1681–91.
211. Rémigy H., Caujolle-Bert D., Suda K., Schenk A., Chami M., Engel A. Membrane Protein Reconstitution and Crystallization by Controlled Dilution. *FEBS Letters*. 2003;(555):160–9.
 212. Renner L., Osaki T., Chiantia S., Schwille P., Pompe T., and Werner C. Supported Lipid Bilayers on Spacious and pH-responsive Polymer Cushions with Varied Hydrophilicity. *J. Phys. Chem. B* 2008;(112):6373.
 213. Rhee M. and Burns M.A. Nanopore Sequencing Technology: Research Trends and Applications. *TRENDS in Biotechnology*. 2006;(24)12:580–86
 214. Rhoades E., Ramlall T.F., Webb W.W. and Eliezer D. Quantification of Alpha-Synuclein Binding to Lipid Vesicles Using Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal*. 2006;(90):4692–700.
 215. Richmond G.L. Molecular Bonding and Interactions at Aqueous Surfaces as Probed by Vibrational Sum Frequency Spectroscopy. *Chem. Rev.* 2002;(102):2693–724.
 216. Robertson J.W.F, Rodrigues C.G, Stanford V.M, Rubinson K.A, Krasilnikov O.V and Kasianowicz J.J. Single-Molecule Mass Spectrometry in Solution Using a Solitary Nanopore. *PNAS*. 2007;(104):8027–11
 217. Rollins S.A., Sims P.J. The Complement-Inhibitory Activity Of CD59 Resides in Its Capacity to Block Incorporation of C9 into Membrane C5b-9. *J. Immunol*. 1990;(144):3478–83.
 218. Römer W. and Steinem C. Impedance Analysis and Single – Channel Recordings on Nano- Black Lipid Membranes Based on Porous Alumina. *Biophysical Journal*. 2004;(86):955–65.
 219. Rose F., Dahlem G., Guthmann B., Grimminger F., Maus U., Deummer N., Seeger G.W. and Ghofrani H.A. Mediator Generation and Signaling Events in Alveolar Epithelial Cells Attacked by *S. Aureus* A-Toxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;(282):207–14.
 220. Ross C.A. and Poirer M.A. Protein Aggregation and Neurodegenerative Disease. *Nature Medicine* (2004);10:S10–S17.
 221. Rossetti F.F., Bally M., Michel R., Textor M., Reviakine I. Formation and Patterning of Supported Phospholipid Bilayers on the Surface of a Medically Relevant Material. *Langmuir*. 2005;21(14):6443–50.
 222. Rossi C., Homand J., Bauche C., Hamdi H., Ladant D., and Chopineau J. Differential Mechanisms for Calcium-Dependent Protein/Membrane Association as Evidenced from SPR-Binding Studies on Supported Biomimetic Membranes. *Biochemistry*. 2003;(42):15273.
 223. Rossjohn J., Feil S.C., McKinstry W.J., Tweten R.K., Parker M.W. Structure of a Cholesterol-Binding, Thiol-Activated Cytolysin And a Model of Its Membrane Form. *Cell*. 1997;(89):685–92.
 224. Roychaudhuri R., Yang M., Hoshi M.M., Teplow D.B. Amyloid β -protein Assembly and Alzheimer Disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009;(284)8:4749–53.

225. Sackmann E. Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. *Science*. 1996;(271):43.
226. Sader J.E., Chon J.W.M. and Mulvaney P. Calibration of Rectangular Atomic Force Microscope Cantilevers. *Review of Scientific Instruments*. 1999;(70):3967–69.
227. Sader J.E.. Calibration of Atomic Force Microscopy Cantilevers. *Encyclopedia of Surface and Colloidal Science*. Marcel Dekker Inc. 2002. 846–56.
228. Sakono M. and Zako T. Amyloid Oligomers: Formation And Toxicity Of Ab Oligomers. *FEBS Journal*. 2010;(277):1348–58.
229. Santelli E., Bankston L.A., Leppla S.H., Liddington R.C. Crystal Structure Of A Complex Between Anthrax Toxin and Its Host Cell Receptor. *Nature*. 2004;(430):905–08.
230. Schwarz U.S. Phase Behavior of Amphiphilic Systems. *Acta Physica Polonica B*. 1998;(29):1815–25.
231. Schwille P., Haupts U., Maiti S., Webb W.W. Molecular Dynamics in Living Cells Observed B Fluorescence Correlation Spectroscopy With One– and Two-Photon Excitation. *Biophys J*. 1999;(77):2251–65.
232. Seddon J.M. and Templer R.H. Handbook of Biological Physics Polymorphism of Lipid-Water Systems. 1995;(1):95–157.
233. Selkoe D.J. Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer’s and Parkinson’s diseases. *Nature Cell Biology*. 2004;(6):105–61.
234. Sevenich F., Langowski J., Weiss V., Rippe K. DNA Binding and Oligomerization of Ntrc Studied by Fluorescence Anisotropy and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Nucleic Acid Res* 1998;(26):1373–81.
235. Sharonov A., Bandichhor R., Burgess K., Petrescu A.D., Schroeder F., Kier A.B. and Hochstrasser R.M. Lipid Diffusion from Single Molecules of a Labeled Protein Undergoing Dynamic Association with Giant Unilamellar Vesicles and Supported Bilayers. *Langmuir* 2008;(24):844–50.
236. Sheikh K.H., Christenson H.K., Bushby R.J. and Evans S.D. A Model System To Study the Insertion of Cholesterol into a Phospholipid Monolayer. *J. Phys. Chem. B* 2007;(111):379–86 .
237. Shen J. and Shi Y. Current Status on Single Molecular Sequencing Based on Protein Nanopores. *Nano Biomed. Eng.* 2012;(4):1–5.
238. Shen Y. R. Wave mixing spectroscopy for surface studies. *Solid State Communications*. 1997;(102):221–9.
239. Shenoy S., Moldovan R., Fitzpatrick J., Vanderah D.J., Deserno M. and Lösche M. In-plane Homogeneity and Lipid Dynamics in Tethered Bilayer Lipid Membranes (Tblms). *Soft Matter*. 2010;(6):126–74 .
240. Shipton O.A., Dworzak J., Acton C.E.J., Tunbridge E.M., Denk F., H.N. Dawson, Vitek M.P., Wade-Martins F., Paulsen O. and Vargas-Caballero M. Tau Protein is Required for Amyloid B–Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation. *J. Neurosci*. 2011;(31):1688–92.

241. Shogomori H. and Kobayashi T. Lysenin: A Sphingomyelin Specific Pore-Forming Toxin. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008;(1780):612–18.
242. Simons K. and. Sampaio J.L. Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;(31):1–17.
243. Simons K., Ikonen E. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature*. 1997;(387):569–72.
244. Sinner E.K., Ritz S., Wang Y., Dostálek J., Jonas U. and Knoll W. Molecularly Controlled Functional Architectures. *Material today* 2010;13(4):46–55.
245. Soltani C.E., Hotze E.M., Johnson A.E., and Tweten R.K. Structural Elements of the Cholesterol-Dependent Cytolysins that are Responsible for their Cholesterol-Sensitive Membrane Interactions. *PNAS*. 2007;(104)51:20226–31.
246. Song L., Hobaugh M., Shustak C., Cheley S., Bayley H., Gouaux J.E. Structure of Staphylococcal α -Hemolysin, a Heptameric Transmembrane Pore. *Science*. 1996;(274):1859–66.
247. Sonnleitner A., Schütz G.J., Schmidt Th. Free Brownian Motion of Individual Lipid Molecules in Biomembranes. *Biophys. J.* 1999;(77):2638–42.
248. Spencer R.C. *Bacillus anthracis*. *J Clin Pathol*. 2003;(56):182–87.
249. Starr T.E., Thompson N.L. Formation and Characterization of Planar Phospholipid Bilayers Supported on Tio_2 And SrTiO_3 Single Crystals. *Langmuir*. 2000;(16):10301–08.
250. Steck T.L., Ye J. and Lange Y. Probing Red Cell Membrane Cholesterol Movement with Cyclodextrin. *Biophys J.* 2002;(83):2118–25.
251. Steinem C. Impedance Analysis of Supported Lipid Bilayer Membranes: a Scrutiny of Different Preparation Techniques. *Biochim. Biophys. Acta*. 1996; (1279):169–75.
252. Stine W.B.Jr., Dahlgren K.N., Krafft G.A. and LaDu M. *In Vitro* Characterization of Conditions for Amyloid- Peptide Oligomerization and Fibrillogenesis. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2003;(278)13:11612–22.
253. Stokes R. and Evans D. Fundamentals of Interfacial Engineering. Wiley. 1997.
254. Sun J., Vernier G., Wigelsworth D.J, and Collier R.J. Insertion of Anthrax Protective Antigen into Liposomal Membranes. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2007;(282)2:1059–65.
255. Tabaei S.R., Jönsson P., Brändén M., Höök F. Self-Assembly Formation of Multiple DNA-Tethered Lipid Bilayers. *Journal of Structural Biology* 2009;(168):200–06.
256. Tamm K.L. and McConnel M.H. Supported Phospholipid Bilayers. *Biophysical Journal*. 1985;(47):105 – 13.
257. Tanaka M., Sackmann E. Polymer – Supported Membranes as Model of the Cell Surface. *Nature*. 2005;(437):65663.
258. Tanaka M.. Polymer-Supported Membranes: Physical Models of Cell Surfaces. *MRS Bull*. 2006;(31):513.

259. Tanaka Y. and Schroit A.J. Insertion of fluorescent phosphatidylserine into the plasma membrane of red blood cells: recognition by autologous macrophages. *J. Biol. Chem.* 1983;(258):11335–43.
260. Tanford C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*; 2nd ed.; Krieger Publishing Company: Florida, 1991.
261. Terrettaz S. and Vogel H. Investigating the Function of Ion Channels in Tethered Lipid Membranes by Impedance Spectroscopy. *Mrs Bulletin.* 2005;(30):207–10.
262. Terrettaz S., Follonier S., Makohliso S., Vogel H. A Synthetic Membrane Protein in Tethered Lipid Bilayers for Immunosensing in Whole Blood. *Journal of Structural Biology* 2009;(168):177–82.
263. Thompson J.R., Cronin B., Bayley H., and Wallace M.I. Rapid Assembly of a Multimeric Membrane Protein Pore. *Biophysical Journal.* 2011;(101):2679–83.
264. Tilley L., Morgan K. & Kalsheker N. Genetic Risk Factors in Alzheimer's disease. *J Clin Pathol Mol Pathol.* 1998;(51):293–04.
265. Tilley S.J. and Saibil H.R. The Mechanism of Pore Formation by Bacterial Toxins *Current Opinion in Structural Biology.* 2006;(16):230–6.
266. Tjernberg L.O., Callaway David J.E., Tjernberg A., Hahne S., Lilliehook C., Terenius L., Thyberg J. and Nordstedt A. Molecular Model of Alzheimer Amyloid b-Peptide Fibril Formation. *The Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(18):12619–25.
267. Tsui-Pierchala B.A, Encinas M., Milbrandt J, Johnson E.M. Lipid Rafts in Neuronal Signaling and Function. *Trends Neurosci.* 2002; 25(8):412–7.
268. Tun T.N. and Jenkins A.T.A. An Electrochemical Impedance Study of the Effect of Pathogenic Bacterial Toxins on Tethered Bilayer Lipid Membrane. *Electrochemistry Communications* 2010;(12):1411–15.
269. Tweten R.K. and Johnson A.E. Assembly and Topography of the Prepore Complex in Cholesterol-dependent Cytolysins. *The Journal Of Biological Chemistry.* 2003;(278)33:31218–25.
270. Tweten R.K.. Cholesterol-Dependent Cytolysins, a Family of Versatile Pore-Forming Toxins. *Infection and Immunity.* 2005;(73)10:6199–209.
271. Vaičikauskas V., Babonas G.J. Kuprionis Z., Niaura G., Šablinskas V. Paviršiaus Optinė Spektroskopija. Vilnius 2008, TEV, p. 126–59.
272. Valincius G., Heinrich F., Budvytyte R., Vanderah D.J., McGillivray D.J., Sokolov Y., Hall J.E., Losche M. Soluble Amyloid beta-Oligomers Affect Dielectric Membrane Properties by Bilayer Insertion and Domain Formation: Implications for Cell Toxicity. *Biophysical Journal* 2008; 95(10): 4845–61.
273. Valincius G., McGillivray D.J., Febo-Ayala W., Vanderah D.J., Kasianowicz, J.J., Losche, M. Enzyme Activity to Augment the Characterization of Tethered Bilayer Membranes *J. Phys. Chem. B* 2006;(110):10213–16.
274. Valincius G., Meskauskas T., and Ivanauskas F. Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes. *Langmuir* . 2012;(28):977.

275. Vallejo A.E. and Gervasi C.A. EIS Studies of Valinomycin-Mediated K⁺ Transport Through Supported Lipid Bilayers. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2007;(603):51–58.
276. Van Craenenbroeck E., Engelborghs Y. Quantitative Characterization of the Binding of Fluorescently Labeled Colchicine to Tubuline in Vitro Using Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biochemistry* 1999;(38):5082–88
277. Vanderah D.J., Gates R.S., Silin V., Zeiger D.N., Woodward J.T., Meuse C.W., Valincius G. and Nickel B. Isostructural Self-Assembled Monolayers. 1. Octadecyl 1-Thiaoligo(ethylene oxides). *Langmuir*. 2003;(19):2612.
278. Vengris M. Eksperimentinės biofizikos metodai: Paskaitų Konspektas. Vilnius 2008; 72–84.
279. Venkatesan B.M. and Bashir R. Nanopore Sensors for Nucleic Acid Analysis. *Nature Nanotechnology*. 2011;(6):615–24.
280. Verhoven B., Schlegel R.A., Williamson P. Mechanisms of Phosphatidylserine Exposure, Phagocyte Recognition Signal, on Apoptotic T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1995.(182):1597–601.
281. Vestergaard M, Hamada T, Takagi M. Using Model Membranes for the Study of Amyloid Beta: Lipid Interactions and Neurotoxicity. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008;(99):753–63.
282. Vial F., Cousin F., Bouteiller L. and Tribet C. Rate of Permeabilization of Giant Vesicles by Amphiphilic Polyacrylates Compared to the Adsorption of These Polymers onto Large Vesicles and Tethered Lipid Bilayers. *Langmuir* 2009; 25(13):7506–13.
283. Vidal F. and Tadjeddine A. Sum-Frequency Generation Spectroscopy of Interfaces. *Rep. Prog. Phys.* 2005;(68):1095–127.
284. Vockenroth I.K., Atanasova P.P., Jenkins A.T.A. and Koper I. Incorporation of α -Hemolysin in Different Tethered Bilayer Lipid Membrane Architectures. *Langmuir* 2008;(24):496–02.
285. Vockenroth I.K., Rossi C., Shah M.R., Köper. Formation of Tethered Bilayer Lipid Membranes Probed by Various Surface Sensitive Techniques. *Biointerphases* 2009;4(2):19–26.
286. Wacklin H.P. Composition and Asymmetry in Supported Membranes Formed by Vesicle Fusion. *Langmuir*. 2011;(27):7698–07.
287. Wacklin H.P. Neutron Reflection from Supported Lipid Membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2010;(15):445–454
288. Wagner L.M. and Tamm K.L. Tethered Polymer-Supported Planar Lipid Bilayers for Reconstitution of Integral Membrane Proteins: Silane-Polyethyleneglycol-Lipid as a Cushion and Covalent Linker. *Biophysical Journal*. 2000;(79):1400–14.
289. Walde P., Cosentino K., Engel H. and Stano P. Giant Vesicles: Preparations and Applications. *ChemBioChem*. 2010;(11):848 – 65.
290. Walker J.A., Allen R.L., Falmagne P., Johnson M.K., Boulnois G.J. Molecular Cloning, Characterization, and Complete Nucleotide Sequence of the Gene for Pneumolysin, the Sulfhydryl-Activated Toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1987;(5):1184–89.

291. Walmrath D, Schneider T, Pilch J, Grimminger F and Seeger W. Aerosolized Prostacyclin Reduces Pulmonary Artery Pressure and Improves Gas Exchange in the Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *Lancet*.1993;(342): 961–2.
292. Walsh D.M. and Selkoe D.J. A β Oligomers – a Decade of Discovery. *Journal of Neurochemistry*. 2007;(101):1172–84.
293. Walsh D.M., Lomakin A., Benedek G.B., Condron M.M. & Teplow D.B. Amyloid B-Protein Fibrillogenesis Detection of a Protofibrillar Intermediate. *J. Biol. Chem.* 1997;(272):22364–72.
294. Walsh, D. M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J. & Selkoe D.J. Naturally Secreted Oligomers Of Amyloid B Protein Potently Inhibit Hippocampal Longterm Potentiation *in vivo*. *Nature*. 2002;(416):535–59.
295. Wang J., Chen X., Clarke M.L., Chen Z. Detection of Chiral Sum Frequency Generation Vibrational Spectra of Proteins and Peptides at Interfaces in Situ.
296. Watry M. R., Brown M. G., Richmond G. L. Probing Molecular Structure at Liquid Surfaces with Vibrational Sum Frequency Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **55** (2001), 321A–40A.
297. Wells K., Farooqui A.A., Liss L. and Horrocks L.A. Neural Membrane Phospholipids in Alzheimer Disease. *Neurochem. Res.* 1995;(20):1329–33.
298. White S.H. and Wimley W.C. Membrane Protein Folding and Stability: Physical Principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1999;(28):319–65.
299. White S.H. How Hydrogen Bonds Shape Membrane Protein Structure. *Advances in Protein Chemistry*. 2006;(72):157–72.
300. Wickham S.E., Hotze E.M., Farrand A.J, Polekhina G., Nero T.L., Tomlinson S., Parker M.W., Tweten R.K. Mapping The Intermedilysin-Human CD59 Receptor Interface Reveals a Deep Correspondence with the Binding Site on CD59 Forcomplement Binding Proteins C8{Alpha} and C9. *J. Biol. Chem.* 2011;(286):20952–62.
301. Wiegand G., Arribas-Layton N., Hillebrandt H., Sackmann E., Wagner P. Electrical properties of supported lipid bilayer membranes. *J. Phys. Chem. B.* 2002;(106):4245–54.
302. Williams A.J. An introduction to the methods available for ion channel reconstitution. In: Ogden D, Editor. *Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook*, 2nd edition. The Company of Biologists, Cambridge, 1994. p. 79–100.
- Williamson P. & Schlegel R.A. Back and Forth: The Regulation and Function of Transbilayer Phospholipid Movement in Eukaryotic Cells. *Mol. Membr. Biol.* 1994;(11):199–216.
303. Wolfe J.T. , Krantz B. A., Rainey G.J.A., Young J.A.T. and Collier R.J. Whole-cell Voltage Clamp Measurements of Anthrax Toxin Pore Current. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;(280)47:39417–22.
304. Woodhouse G., King L.G., Wieczorek L., Osman P.D., Cornell B.A. The Ion Channel Switch Biosensor. *J Mol Recognition* 1999;(12):328–34.
305. Wymann M.P. Schneiter R. Lipid Signalling in Disease. *Nat. Rev. Mol. Cell*

- Biol.* 2008;(9):162–176.
306. Xu L., Huang B., Du H., Zhang X.C, Xu J., Li X., Rao Z. Crystal structure of cytotoxin protein sulysin from *Streptococcus suis*. *Protein Cell.* 2010;(1):96–105.
307. Yamamoto N., Matsubara E., Maeda S., Minagawa H., Takashima A., Maruyama W., Michikawa M. & Yanagisawa K. A Ganglioside-Induced Toxic Soluble Abeta Assembly. Its Enhanced Formation from Abeta Bearing The Arctic Mutation. *J Biol Chem.* 2007;(282):2646–55.
308. Ye S., Nguyen K.T., Le Clair S.V., Chen Z. In Situ Molecular Level Studies on Membrane Related Peptides and Proteins in Real Time Using Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy. *Journal of Structural Biology.* 2009;(168):61–77.
309. Yin P., Burnsa C.J., Osmana P.D.J., Cornell B.A. A Tethered Bilayer Sensor Containing Alamethicin Channels and Its Detection of Amiloride Based Inhibitors. *Biosens Bioelectronics* 2003;(18):389–97.
310. Yoon H.J., Chun J., Kim J.H., Kang S.S., Na D.J. *Gardnerella Vaginalis* Septicaemia with Pyelonephritis, Infective Endocarditis and Septic Emboli in the Kidney and Brain of an Adult Male. *Int J STD AIDS.* 2010;(21):653-57.
311. Young J.A.T. and Collier R.J.. Anthrax Toxin: Receptor Binding, Internalization, Pore Formation, and Translocation. *Annu Rev Biochem.* 2007;(76):243–65.
312. Zhang S., Udho E., Wu Z., Collier R.J. and Finkelstein A. Protein Translocation Through Anthrax Toxin Channels Formed in Planar Lipid Bilayers. *Biophys. J.* 2004;(87):3842–49.
313. Zhao J. and Tamm L.K. FTIR and Fluorescence Studies of Interactions of Synaptic Fusion Proteins in Polymer-Supported Bilayers. *Langmuir* 2003;(19):1838–46.
314. Zhao W.Q., De Felice F.G., Fernandez S., Chen H., Lambert M.P., Quon M.J., Krafft G.A. & Klein W.L. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J* 2008;(22):246–60.
315. Zvirbliene A., Pleckaityte M., Lasickiene R., Kucinskaite-Kodze I., Zvirblis G. Production And Characterization of Monoclonal Antibodies Against Vaginolysin: Mapping Of A Region Critical for its cytolytic activity. *Toxicon.* 2010;(56):19–28.