

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.845>

<https://orcid.org/0009-0001-2898-9864>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Rimgailė Tamulytė

Prouždegiminių S100 šeimos baltymų sukelta dirbtinių lipidinių membranų pertvarka

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2025

Disertacija rengta 2021–2025 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre.

Mokslinė vadovė – dr. Marija Jankunec (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Nariai:

Prof. dr. Vilma Kisnierienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011),

Dr. Tomas Šneideris (Kembridžo universitetas, Jungtinė Karalystė, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

Dr. Lidija Tetianec (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

Dr. Artūras Ulčinas (Fizinių ir technologijos mokslų centras, technologijos mokslai, matavimų inžinerija – T 010).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2025 m. lapkričio mėn. 12 d. 14 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius, Lietuva.

Tel. +37062172418; el. paštas ringaile.tamulyte@gmc.vu.lt

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

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.845>

<https://orcid.org/0009-0001-2898-9864>

VILNIUS UNIVERSITY

Rimgailė Tamulytė

Remodeling of Artificial Lipid Membranes Induced by Proinflammatory S100 Family Proteins

DOCTORAL DISSERTATION

Natural sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2025

The dissertation was prepared between 2021 and 2025 at Vilnius University Life Sciences Center.

Academic supervisor – dr. Marija Jankunec (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

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

Chairman – prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

Members:

Prof. dr. Vilma Kisnierienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics – N 011),

Dr. Tomas Šneideris (University of Cambridge, United Kingdom, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Dr. Lidiya Tetianec (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Dr. Artūras Ulčinas (Center for Physical Sciences and Technology, Technical Sciences, Measurement Engineering – T 010).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 14:00 on 12th of November 2025 in Room R401 of the Vilnius University Life Sciences Center.

Address: Saulėtekio Ave. 7, Vilnius LT-10257, Lithuania.

Tel. +37062172418; e-mail: rimgaile.tamulyte@gmc.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	9
MOKSLINIS NAUJUMAS	10
GINAMIEJI TEIGINIAI	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1. Neurouždegimas	12
1.1.1. Molekuliniai ir ląsteliniai komponentai	13
1.2. Neurodegeneracinės ligos	16
1.2.1. Neurouždegimo vaidmuo neurodegeneracijoje.....	17
1.3. S100 šeimos baltymai	19
1.3.1. S100A8 ir S100A9 vaidmuo neurodegeneracijoje.....	24
1.4. Ląstelės plazminė membrana.....	25
1.4.1. Lipidų polimorfizmas ir faziniai virsmai.....	29
1.4.2. Baltymo–lipido sąveikų tipai	33
1.4.3. Plazminės membranos pažaidos mechanizmai.....	35
1.4.4. S100 baltymų sąveikos su membranomis	37
1.4.5. Plazminės membranos modelinės sistemos.....	38
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	41
2.1. Medžiagos ir tirpalai	41
2.2. Metodai	42
2.2.1. Dirbtinių lipidinių membranų paruošimas	42
2.2.2. Baltymų struktūriniai tyrimai	45
2.2.3. Baltymo agregacijos kinetika: ThT fluorescencija.....	46
2.2.4. Lipidų susipakavimo įvertinimas	46
2.2.5. Liposomų integralumas: kalceino išlaisvinimo kinetika	47
2.2.6. Krio-transmisijos elektronų mikroskopija.....	48
2.2.7. Dinaminės šviesos sklaidos metodas.....	49
2.2.8. Elektrocheminio impedanso spektroskopija.....	49
2.2.9. Atominės jėgos mikroskopija.....	53
2.3. Bioinformatinė analizė.....	58

2.4.	Statistinė analizė	59
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	60
3.1.	S100 baltymų struktūrinės ypatybės	60
3.1.1.	Palyginamoji morfologijos analizė.....	60
3.1.2.	Dvivalenčių katijonų lemiami struktūriniai pokyčiai	62
3.2.	S100 baltymų tarpusavio sąveikų reiškiniai.....	64
3.2.1.	Sąveikų stiprumo tarp baltymų įvertinimas.....	64
3.2.2.	Agregacijos tyrimas.....	66
3.2.3.	Lipidų sąlygojama agregacija.....	70
3.3.	S100 baltymų sąveika su membranomis	75
3.3.1.	Sričių, sąveikaujančių su lipidais, nustatymas	75
3.3.2.	Naudotų lipidinių membranų charakteristikos	78
3.3.3.	Sąveika su kiaulės smegenų lipidų ekstrakto membrana ...	81
3.3.4.	Sąveika su cviterjonine membrana.....	86
3.3.5.	Sąveika su anijonine membrana	90
3.3.6.	Sąveika su dviejų fazių membranomis.....	104
3.3.7.	Membranų nanomechaninių savybių įvertinimas.....	110
3.3.8.	Kalcio jonų įtaka baltymo–lipido sąveikai	111
3.4.	Apibendrinimas.....	114
	IŠVADOS	119
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	120
	PRIEDAI.....	145
	SUMMARY.....	154
	PADEKA.....	188
	PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	189
	KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS.....	190
	APIE AUTORIŲ	192
	UŽRAŠAMS	193

SANTRUMPOS

AJM – atominės jėgos mikroskopija;
AL – Alzheimerio liga;
APP – amiloido pirmtako baltymas;
 $\arg Y$ – laidumo fazės kampas;
 $A\beta$ – amiloido β peptidas;
BLM – juodoji lipidinė membrana;
bSM – smegenų sfingomielinas;
BTLE – kiaulės smegenų lipidų ekstraktas;
CD – žiedinio dichroizmo spektroskopija;
CHOL – cholesterolis;
CNS – centrinė nervų sistema;
DAMP – pažeidimo sukelti molekuliniai modeliai;
DLS – dinaminė šviesos sklaida;
DOPC – 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcholinai;
DOPE – 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolaminas;
DOPG – 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilglicerolis;
DOPS – 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serinas;
DPPC – 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcholinai;
EIS – elektrocheminio impedanso spektroskopija;
 $f_{\min}$ – impedanso fazės minimumo taškas;
GM1 – ganglioizidas 1;
GP – bendrosios poliarizacijos (angl. *generalized polarization*) parametras;
hIAPP – žmogaus kasos salelių amiloido polipeptidas;
HC-18 – Z 20-(Z-oktadecil-9-eniloksi)-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksatetra-31-konteno-1-tiolis;
HS-AJM – greitai eiga atominės jėgos mikroskopija;
 $Y_{f\min}$ – laidumo vertė, apskaičiuota fazės minimumo taške;
IL – interleukinas;
 L_c – kietoji kristalinė fazė;
 L_d – skystoji netvarkingoji fazė;
 L_o – skystoji tvarkingoji fazė;
 L_β – gelinė fazė;
LUV – didelio dydžio vienasluoksnės liposomos;
MLV – daugiasluoksnės liposomos;
 N_{def} – lokalus defektų tankis;
PA – fosfatidinė rūgštis;
PC – fosfatidilcholinai;

PE – fosfatidiletanolaminas;
PG – fosfatidilglicerolis;
PI – fosfatidilinozitolis;
PL – Parkinsono liga;
PS – fosfatidilserinas;
 P_{β} – banguotoji fazė;
 R_a – vidutinis paviršiaus šiurkštumas;
RAGE – pažangių glikacijos galutinių produktų receptoriai;
SAM – savitvarakis monosluoksnis;
SLB – ant paviršiaus suformuoti lipidų dvisluoksniai;
s.v. – fluorescencijos intensyvumo santykiniai vienetai;
ŠAS – šoninė amiotrofinė sklerozė;
tBLM – prikabintos dvisluoksnės lipidinės membranos;
TEM – krio-transmisijos elektronų mikroskopija;
ThT – Tioflavinas-T;
TLR – Toll tipo receptoriai;
 T_m – fazinio virsmo temperatūra;
 $TNF-\alpha$ – naviko nekrozės faktorius- α ;
Trp – Triptofanas;
WC-14 – 20-tetradeciloksi-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontano-1-tiolis;
 α -Syn – α -sinukleinas.

IVADAS

Uždegimas yra natūrali organizmo gynybinė reakcija, padedanti apsisaugoti nuo įvairių kenksmingų vidinės ar išorinės kilmės veiksnių bei palaikyti homeostazę. Centrinėje nervų sistemoje pagrindinį vaidmenį neurowždegimo iniciacijoje bei reguliacijoje atlieka glijos ląstelės bei uždegiminiai mediatoriai, tokie kaip citokinai, chemokinai ir kiti signaliniai baltymai [1]. Kai uždegimo priežastys nėra pašalinamos arba sutrinka savireguliacijos mechanizmai, ūmus uždegimas gali pereiti į lėtinę formą, kuri prisideda prie audinių pažeidimo ir įvairių ligų, įskaitant centrinės nervų sistemos sutrikimus, atsiradimo [2]. Nors amiloidinių baltymų sankaupos tradiciškai buvo laikomos pagrindiniu neurodegeneracinių ligų iniciatoriumi, o neurowždegimas – tik šio proceso pasekmė, pastarieji tyrimai rodo, kad neuronų žūtis įvyksta dar prieš susidarant užląsteliniais baltymų agregatams [3]. Vis dažniau pripažįstama, kad uždegimas ne tik atlieka svarbų vaidmenį neurodegeneracinių ligų progresijoje, bet ir gali būti pirminis veiksnys, skatinantis patologiškų amiloidinių baltymų sankaupų formavimąsi ir nervinių ląstelių žūtį jau ankstyvose ligos stadijose [4].

Prie pagrindinių uždegiminio atsako iniciatorių vis dažniau priskiriami kalcį rišantys S100 šeimos baltymai, išskiriami neutrofilų, monocitų bei makrofagų. Šie baltymai veikia kaip pavojų signalizuojantys veiksniai ir, sąveikaudami su ląstelių paviršiaus receptoriais, skatina prouždegiminių signalinių kaskadų aktyvaciją bei imuninių ląstelių migraciją į pažeidimo vietą [5]. Bene plačiausiai ištirti S100 šeimos atstovai yra S100A8 ir S100A9 baltymai, kurie, dėl formuojamų homodimerų nestabilumo, dažniausiai aptinkami heterodimerinėje formoje (S100A8/A9) [6]. Kadangi šių baltymų raiškos padidėjimas yra būdingas daugeliui uždegiminių būsenų, S100A8/A9 yra dažnai pripažįstamas kaip galimas įvairių neurodegeneracinių sutrikimų biožymuo bei potencialius terapijos taikinytis [7].

Be amiloidinių baltymų sankaupų ir lėtinio neurowždegimo, neurodegeneracinių ligų patofiziologijai būdinga ir neuronų plazminės membranos pažeida [8]. Tyrimai rodo, jog S100 baltymai ne tik atlieka svarbų vaidmenį uždegiminių procesų reguliacijoje, tačiau kai kurie šios šeimos atstovai gali tiesiogiai sąveikauti su pagrindiniais ląstelės plazminės membranos komponentais – lipidais [9–11]. Vis dėlto, nepaisant plataus susidomėjimo, ryšys tarp neurowždegimo metu išskiriamų baltymų ir membranos integralumo praradimo vis dar lieka nenustatytas. Taigi, pagrindinis dėmesys šiame darbe buvo skiriamas prouždegiminiams S100A8,

S100A9 baltymams ir jų heterokompleksui S100A8/A9, siekiant įvertinti potencialias šių darinių sąveikas su ląstelės plazminė membrana.

Šio **darbo tikslas** – ištirti S100A8, S100A9 baltymų ir jų formuojamo komplekso, S100A8/A9, sąveikas su dirbtiniu, neuronų plazminę membraną imituojančiu, lipidų dvisluoksniu.

Šiam tikslui pasiekti buvo išsikelti sekantys **darbo uždaviniai**:

1. Įvertinti S100A8, S100A9 baltymų ir jų formuojamo S100A8/A9 komplekso struktūrinius ypatumus bei struktūrinį stabilumą.
2. Ištirti kalcio jonų ir lipidinio dvisluoksnio poveikį S100 baltymų agregacijai.
3. Nustatyti S100 baltymų poveikį lipidinės membranos integralumui ir įvertinti galimus dvisluoksnio pažaidos mechanizmus.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Prouždegiminių S100 šeimos baltymų raiška padidėja traumų ar įvairių, su uždegiminiais procesais susijusių, ligų atveju [12], todėl jų analizė yra svarbi ne tik fundamentalių mokslinių tyrimų kontekste, bet ir ateityje galėtų pasitarnauti kuriant naujus neurodegeneracinių ligų diagnostinius ir terapinius įrankius. Šiame darbe pirmą kartą parodyta, kad tiesioginė S100A8, S100A9 bei S100A8/A9 komplekso sąveika su anijonine membrana pažeidžia lipidų dvisluoksnio integralumą. Taikant didelio greičio atominės jėgos mikroskopijos metodą, realiuoju laiku buvo stebimi S100A8 ir S100A8/A9 baltymų sukelti lipidų dvisluoksnio morfologijos pokyčiai, leidę tiksliai identifikuoti membranos pažaidos mechanizmą. Tuo tarpu, klasikinės atominės jėgos mikroskopijos metodikos taikymas S100A9 sąveikų su lipidų dvisluoksniu vizualizacijai leido pasiūlyti galimus membranos pertvarkos mechanizmus. Pažymėtina, kad šiame darbe pasiūlyta metodika leido stebėti S100A8 membranos pažaidos aktyvumą esant patologiniam baltymo koncentracijos lygiui, kas ateityje galėtų reikšmingai prisidėti kuriant neurodegeneracinių ligų biojutiklius. Be to, išanalizavus baltymų oligomerizacijos procesus, nustatyta, jog lipidinių membranų sudėties pokyčiai turi reikšmingos įtakos S100 baltymų agregacijai bei potencialiai neurotoksiškų darinių susidarymui. Šie rezultatai pabrėžia plazminės membranos svarbą neurodegeneracijos iniciacijoje ir progresijoje.

GINAMIEJI TEIGINIAI

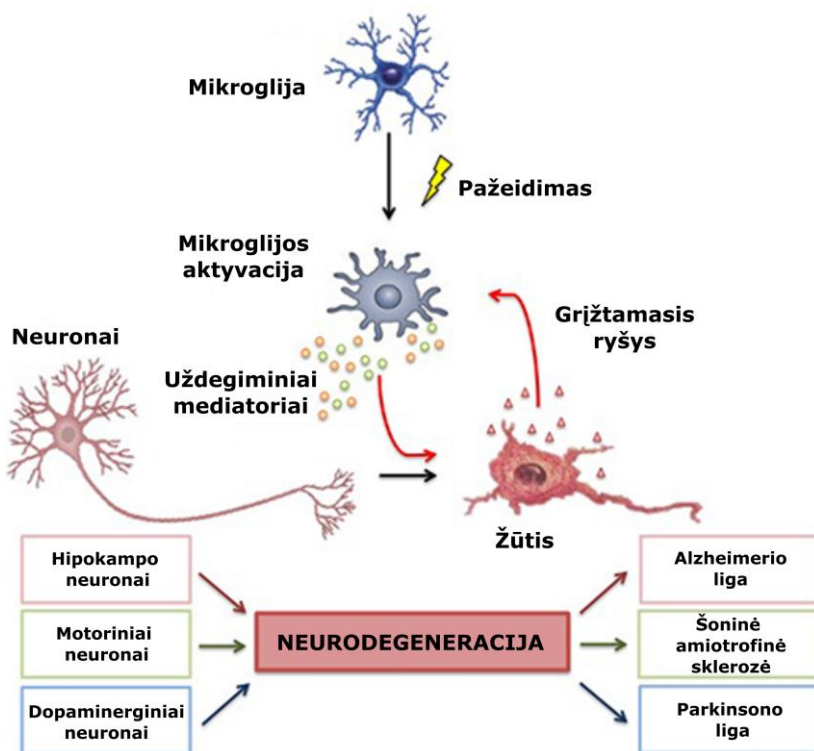
1. S100A8 baltymas sąveikauja su anijoninėmis, sudėtyje 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serino turinčiomis, membranomis ir pažeidžia jų integralumą veikdamas detergento mechanizmu.
2. S100A8 sąveika su sudėtyje 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serino turinčiomis membranomis spartina šio baltymo agregacijos procesus.
3. S100A9 baltymas gali įsiterpti į lipidų dvisluoksnį, taip sukeldamas lipidų molekulių lateralinį išsiplėtimą.
4. S100A8/A9 komplekso sukelta dirbtinių lipidinių membranų pertvarka yra nulemta S100A8 baltymo aktyvumo.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Neurouždegimas

Žmogaus centrinė nervų sistema (CNS), vidutiniškai sudaryta net iš 86,1 milijardo neuronų, yra laikoma sudėtingiausiu žinomu biologiniu audiniu [13]. Neurouždegimas yra gyvybiškai svarbi centrinės nervų sistemos reakcija į įvairius vidinius ir išorinius veiksnius, įskaitant senėjimą, autoimuninius sutrikimus, infekcijas, traumas ar toksinus [14]. Svarbu pabrėžti, kad neurouždegimas taip pat yra būtinas audinių regeneracijai, normaliam smegenų vystymuisi, homeostazės palaikymui ir smegenų plastiškumui svarbiais vystymosi laikotarpiais. Taigi, ūmus neurouždegimas yra natūrali organizmo gynybinė reakcija, skirta palaikyti organizmo homeostazę ir apsaugoti smegenis nuo tolimesnės žalos [15]. Vis dėlto, jei uždegimą sukeliantys veiksniai nėra pašalinami, išsivysto lėtinis uždegimas. Šio proceso metu pagrindiniai uždegiminio atsako reguliatoriai – glijos ląstelės – išlieka nuolat aktyvuotos, o tai lemia ilgalaikę uždegiminių mediatorių sekreciją. Nustatyta, kad šie mediatoriai gali būti citotoksiški ir lemti neuronų disfunkciją bei žūtį, taip skatindami įvairių neurologinių bei elgsenos sutrikimų progresavimą. Pažymėtina, kad neuronų žūties metu į užląstelinę terpę išsiskiria įvairios signalinės molekulės, kurios, atpažintos glijos ląstelių, toliau skatina uždegiminių mediatorių sekreciją ir sukuria neurouždegimo ciklinę reakciją [15] (**1.1 pav.**). Tokiais atvejais imuninė sistema, kurios pagrindinė funkcija yra apsaugoti CNS, gali tapti žalinga, dar labiau sutrikdydama natūralias smegenų funkcijas.

Atsižvelgiant į kompleksiską neurouždegimo prigimtį, toliau bus aptariami tik šio tyrimo kontekste svarbūs minėto proceso aspektai. Kadangi pagrindinis šio tyrimo objektas yra prouždegiminiai S100 šeimos baltymai, ypatingas dėmesys bus skiriamas jų struktūrinėms savybėms bei fiziologinių ir patologinių funkcijų apžvalgai. Galiausiai, paskutinėje literatūros apžvalgos dalyje, bus aptartos biologinių membranų struktūrinės ir funkcinės ypatybės, taip pat pagrindiniai lipidų dvisluoksnių sąveikų su baltymais principai.



1.1 pav. Neurouždegiminių procesų iliustracija. Parengta pagal [2].

1.1.1. Molekuliniai ir ląsteliniai komponentai

Vieni pirmųjų aprašytų neurouždegiminių mediatorių buvo **citokinai**, tokie kaip interleukinas-1 β (IL-1 β), naviko nekrozės faktorius- α (TNF- α) ir interleukinas-6 (IL-6). Šie citokinai buvo susieti ne tik su uždegimo poveikiu smegenų funkcionalumui, bet ir su įvairių patologinių būklių pasireiškimu [16]. Citokinai yra mažos molekulinės masės baltymai (< 40 kDa), išskiriami skirtingose smegenų srityse ir dalyvaujantys įvairiuose fiziologiniuose procesuose, įskaitant miego reguliaciją [17], neuronų vystymąsi [18], kraujo-smegenų barjero pokyčius [19], neuromediatorių metabolizmą ir sinapsių plastiškumą [20,21]. Be to, citokinai dalyvauja beveik visose imuninio atsako reakcijose, įskaitant antigenų pateikimą (angl. *antigen presentation*), kaulų čiulpų diferenciaciją, adhezijos molekulių raišką, imuninių ląstelių pritraukimą į uždegimo vietą bei jų aktyvaciją [22]. Citokinai pagal aktyvumą paprastai skirstomi į prouždegiminius (IL-1, IL-6, TNF) ir priešuždegiminius (IL-4, IL-10, TGF- β) [23]. Prouždegiminiai citokinai atlieka svarbų vaidmenį inicijuojant ir palaikant uždegimines reakcijas, tačiau pernelyg didelė jų sekrecija gali sukelti sinapsių disfunkciją, neuronų žūtį ir neurogenezės

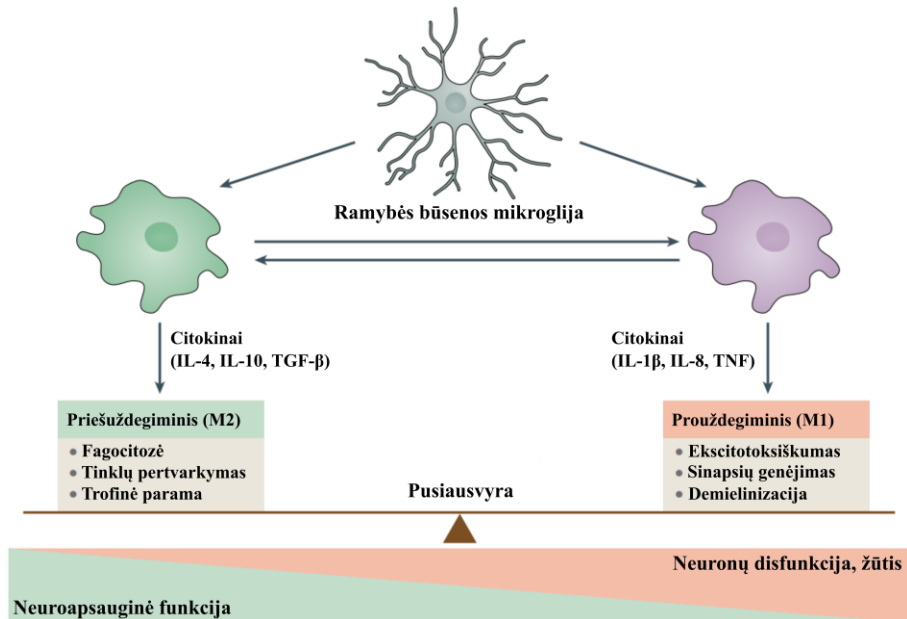
slopinimą [24]. Tuo tarpu, priešūždegiminiai citokinai, kurie taip pat yra sekretuojami neurouždegiminio proceso metu, yra atsakingi už imuninio atsako slopinimą. Taigi, šių dviejų priešingų jėgų pusiausvyra lemia neurouždegimo baigtį, o lėtinės neurouždegiminės ligos atspindi balanso tarp prouždegiminių ir priešūždegiminių mediatorių sutrikdymą [25].

Kitas svarbus neurouždegimo komponentas – tai nedidelio dydžio (8–12 kD) baltyminės kilmės molekulės, dar vadinamos chemokinais. Anksčiau **chemokinai** buvo apibūdinami tik kaip uždegiminiai mediatoriai, kurie išskiriami infekcijos vietoje reaguojant į uždegiminį stimulą. Tokie uždegiminiai chemokinai pritraukia ir aktyvuoja leukocitus, kad sukeltų imuninį atsaką ir aktyvintų žaizdų gijimą [26]. Tačiau pastaruoju metu nustatytas dar vienas chemokinų pogrupis, atliekantis homeostatines funkcijas. Šios funkcijos susijusios su įgytu imuniniu atsaku ir apima limfocitų migraciją, hematopoezę, dendritinių ląstelių ir makrofagų nukreipimą į antrinius limfoidinius audinius bei antigenų pateikimą T limfocitams [27].

Smegenyse uždegiminiai mediatoriai yra išskiriami įgimto imuninio atsako ląstelių reaguojant į kenksmingus dirgiklius. Tarp imuninių ląstelių, glija yra pagrindinis uždegimo reguliatorius CNS. Glijos ląstelės, priešingai nei neuronai, nėra elektriškai sužadinamos ir skirstomos į du pagrindinius tipus: mikrogliją bei makrogliją (apima astroцитus, oligodendroцитus ir ependimines ląsteles) [15]. Mikroglija sudaro 5–12 % visų smegenų ląstelių ir atlieka svarbų vaidmenį sinapsių genėjime vystymosi metu, neurogenezėje, angiogenezėje, homeostazės ir sinapsinio plastiškumo palaikyme [28,29]. Mikroglija taip pat dalyvauja apsaugant CNS nuo įvairių infekcijų, įskaitant virusines, bakterines ir parazitines [30].

Mikroglija yra laikoma specializuotais smegenų makrofagais, kurie ramybės būsenoje sukuria tankų tinklą ir šakotomis ataugomis seka CNS mikroaplinką dėl infekcijų ir homeostazės pokyčių [31]. Mikroglija aplinkos pokyčius aptinka per paviršinius membraninius receptorius, įskaitant Toll tipo receptorius (TLR), pažangių glikacijos galutinių produktų receptorius (RAGE), ciklinės GMP-AMP sintazės receptorius (cGAS). Šie receptoriai gali būti aktyvuojami su egzogeniniais patogenais susijusiais molekuliniiais modeliais (angl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), tokiais kaip bakterijos, virusai ar grybai, arba endogeniniais pažeidimo sukeltais molekuliniiais modeliais (angl. *damage-associated molecular patterns* DAMP), įskaitant oksidacijos produktus, amiloidinių baltymų agregatus, ATP, mitochondrijų DNR ir S100 šeimos baltymus [4]. Mikroglijos atsakas į pažeidimus gali būti įvairus, tačiau yra išskiriamos dvi pagrindinės būsenos: **prouždegiminė (M1)** ir **priešūždegiminė (M2)** (1.2 pav.). Šios būsenos

apibrėžiamos pagal mikroglijos morfologiją, išskiriamų citokinų pobūdį ir atsaką į aplinkos signalus. Esant sunkiam ar ilgalaikiam audinių pažeidimui yra siunčiamas signalas „suvalgyk mane“, tuomet mikroglija poliarizuoja į M1 fenotipą, kuriam būdingas didelis ląstelės kūnas, ameboidinė forma bei sumažėjęs ataugų skaičius. Šis fenotipas pasižymi reaktyvių deguonies formų, prouždegiminių citokinų išskyrimu bei citotoksiniu poveikiu, padedančiu greitai pašalinti infekuotas ląsteles ir mirstančių ląstelių liekanas uždegimo vietoje [32]. Tuo tarpu, esant lengvam audinių pažeidimui, yra siunčiamas signalas „surask mane“: mikroglija poliarizuoja į M2 fenotipą, kuriam būdinga šakota, panaši į ramybės būsenos, morfologija ir priešūždegiminių citokinų sekrecija. M2 mikroglija skatina audinių atsinaujinimą, pasižymi fagocitiniu aktyvumu bei atlieka neuroapsauginį vaidmenį. Pažymėtina, jog mikroglijos fenotipas nėra fiksuotas: ji, priklausomai nuo pažeidimo pobūdžio, gali pereiti iš M1 į M2 būseną ir atvirkščiai [33]. Toks plastiškumas leidžia mikroglijai efektyviai prisitaikyti prie CNS mikroaplinkos pokyčių. Svarbu paminėti, jog ankstyvosiose uždegimo stadijose vyrauja M2 fenotipas, tačiau šiam procesui užsitęsus, ima dominuoti M1 forma [34]. Dėl užsitęsusio M1 mikroglijos fenotipo aktyvumo yra nuolat išskiriami prouždegiminiai citokinai, kurie gali sukelti neuronų disfunkciją ir žūtį, taip toliau skatinant citokinų sekreciją ir sukuriant neurouždegiminę kaskadą [31].



1.2 pav. Skirtingi mikroglijos fenotipai. M1 fenotipo mikroglija (dešinėje) į aplinką išskiria prouždegiminius citokinus, pasižymi citotoksiškumu, skatina demielinizaciją. Tuo tarpu, M2 mikroglija (kairėje) pasižymi fagocitiniu aktyvumu ir atlieka neuroapsauginį vaidmenį. Parengta pagal [33].

Astroцитai yra labiausiai paplitę glijos ląstelių potipis, atliekantis esminį vaidmenį palaikant CNS homeostazę ir funkcionalumą. Šios žvaigždės formos ląstelės sudaro net iki 61 % visų CNS ląstelių [35]. Astroцитai tiekia neuronams metabolitus, augimo faktorius, palaiko sinapsių formavimąsi ir plastiškumą, reguliuoja jonų, skysčių ir neurotransmiterijų pusiausvyrą užląsteliniam skystyje, dalyvauja kraujo-smegenų barjero formavime ir imuninių ląstelių migracijos kontrolėje [36]. Be to, astroцитai formuoja glimfatinę sistemą, kuri pašalina neurotoksiškus produktus, įskaitant amiloidinius baltymus, iš CNS [33]. Nustatyta, jog aktyvūs astroцитai, kaip ir mikroglia, gali pasižymėti prouždegiminiu (A1) arba priešūždegiminiu (A2) fenotipais. A1 – tai neurotoksiškas astroцитų fenotipas, pasižymintis tirpių neurotoksinų sekrecija bei sukeliantis sinapsių praradimą, kraujo-smegenų barjero integralumo pažeidimus, neuronų ir kitų glijos ląstelių (pvz.: oligodendroцитų) žūtį. Priešingai, A2 astroцитai pasižymi neuroapsauginiu pobūdžiu ir, padidindami neurotrofinius ir priešūždegiminius baltymus koduojančių genų raišką, skatina neuronų augimą, atlieka reparacines funkcijas [37].

Oligodendroцитai yra specializuotos centrinės nervų sistemos ląstelės, kurių pagrindinė funkcija yra mielino, formuojančio kompaktišką, daugiasluoksnį lipidinį apvalkalą, gamyba. Mielinas apgaubia aksonus, užtikrina jų izoliaciją bei pagreitina elektrinio potencialo perdavimą tarp neuronų [38]. Taip pat, šios ląstelės atlieka svarbų vaidmenį neuronams tiekiant metabolitus (pvz: piruvatą, pieno rūgštį), naudojamus ATP sintezei [39]. Oligodendroцитai, dėl jų aukšto metabolinio aktyvumo ir energijos poreikių, yra ypač jautrūs reaktyvios M1 mikroglijos išskirtiems prouždegiminiams mediatoriams, kadangi yra sutrikdoma mielino gamyba, stebima aksonų degeneracija [40]. Mikroglijos, astroцитų ir oligodendroцитų tarpusavio sąveika fiziologinėmis sąlygomis atlieka kritinį vaidmenį centrinės nervų sistemos homeostazės palaikyme, o šios sąveikos disbalansas vis dažniau pripažįstamas kaip vienas pagrindinių neurodegeneracijos veiksnių [41].

1.2. Neurodegeneracinės ligos

Dėl sparčiai senstančios populiacijos, neurodegeneraciniai sutrikimai tampa vienu didžiausių sveikatos sistemos iššūkių šiuolaikinėje visuomenėje. Šiuo metu šie sutrikimai paveikia 57 mln. žmonių pasaulyje ir manoma, jog šis skaičius išaugs iki 153 mln. 2050 m. [42]. Klasikinės neurodegeneracinės ligos, tokios kaip Alzheimerio liga (AL), Parkinsono liga (PL), šoninė

amiotrofinė sklerozė (ŠAS), skiriasi savo molekuliniais mechanizmais, tačiau jas vienija bendra ypatybė – amiloidinių baltymų sankaupos smegenyse [43]. Amiloidiniais yra vadinami baltymai, galintys netaisyklingai susilankstyti ir formuoti fibriles. Tai – siūlo formos polimerinės struktūros, turinčios β -kryžminę struktūrą, kur β -klostės yra išsidėsčiusios statmenai fibrilės ašiai [44]. Ilgą laiką buvo manoma, kad šių baltymų agregatai yra idealūs neurodegeneracinių ligų terapijos taikiniai. Vis dėlto, daugybė klinikinių tyrimų, siekusių pašalinti įvairias amiloidinių baltymų formas iš pacientų smegenų, nedavė teigiamų rezultatų: nors amiloidinių baltymų kiekis organizme sumažėjo, pacientų kognityvinės funkcijos nepagerėjo [45,46].

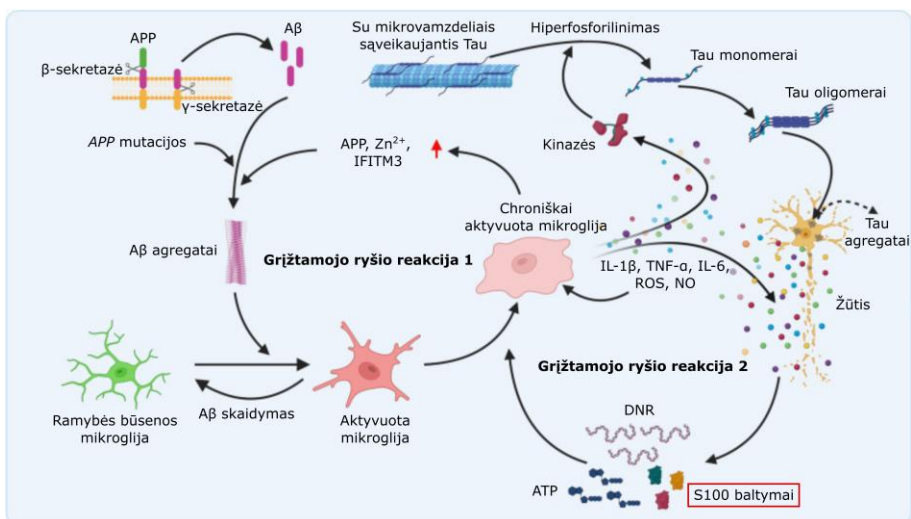
Manoma, jog amiloidinių baltymų agregacija gali būti ne vienintelis neurodegeneracinių ligų iniciatorius, o kiti veiksniai, įskaitant neurouždegimą, gali atlikti esminį vaidmenį šių sutrikimų vystymesi ir progresavime. Tai patvirtina padidėjęs uždegiminių žymenų lygis neurodegeneraciniais sutrikimais sergančių pacientų organizme [47] bei genų, susijusių su įgimtų imuninės sistemos funkcijų reguliavimu, raiškos pokyčiai [48]. Tačiau, nepaisant išsamių mokslinių tyrimų, tikslūs mechanizmai, lemiantys neurouždegimines reakcijas centrinės nervų sistemos sutrikimuose, vis dar nėra iki galo suprasti. Tolimesniame skyrelyje bus aptariamos molekulinės kaskados, įrodančios lėtinio uždegimo svarbą konkrečių neurodegeneracinių ligų atsiradime ir progresijoje.

1.2.1. Neurouždegimo vaidmuo neurodegeneracijoje

AL yra dažniausiai pasitaikanti demencijos priežastis. Šios ligos patologijai būdinga užląstelinių amiloidinių plokštelių, sudarytų iš amiloido β peptido ($A\beta$) ir viduląstelių neurofibrilinių raizginių, suformuotų iš hiperfosforilinto Tau baltymo formų, kaupimasis smegenyse [49]. Manoma, jog $A\beta$ agregatai gali funkcionuoti kaip DAMP, ir, aktyvindami mikroglijos paviršiaus receptorių, skatinti citokinų, chemokinų sekreciją bei pritraukti kitas imunines ląsteles į amiloidinių sankaupų vietą [50]. Tyrimai *in vitro* rodo, jog mikroglijos atsakas priklauso nuo $A\beta$ agregacijos formos. Esant fibrilinei $A\beta$ formai, aktyvuojamas fagocitinis mikroglijos fenotipas, tačiau $A\beta$ degradacija po fagocitozės vyksta lėtai, o tai kelia abejonių dėl glijos efektyvumo pašalinant amiloidines sankaupas [51]. Tuo tarpu oligomerinės $A\beta$ formos skatina prouždegiminių citokinų sekreciją bei pasižymi mikroglijos fagocitinio aktyvumo slopinimu [52].

Nustatyta, jog $A\beta$ aktyvuota prouždegiminio M1 fenotipo mikroglija dar labiau skatina $A\beta$ sankaupų susidarymą smegenyse. Šių procesų metu

aktyvuojama β -sekretazės ir amiloido pirmtako baltymo (APP) raiška bei sekretuojami įvairūs $A\beta$ agregaciją skatinantys veiksniai, įskaitant Zn^{2+} [4,50]. Negebėjimas efektyviai pašalinti susidariusių baltymų agregatų lemia lėtinį uždegimą, kuris sukelia neuronų žūtį ir DAMP molekulių, įskaitant **S100 šeimos baltymus**, išskyrimą [53]. M1 mikroglijos išskiriami prouždegiminiai mediatoriai aktyvina kinazes, įskaitant p38 mitogeno aktyvuotą baltymų kinazę (MAPK-p38), kurios fosforilina Tau baltymą, taip skatindamos neurotoksiškų neurofibrilinių raizginių formavimąsi [54]. Svarbu pažymėti, jog minėtų procesų metu aktyvinamos net dvi grįžtamojo ryšio reakcijos, skatinančios chronišką mikroglijos aktyvaciją ir neurouždegimo progresiją (**1.3 pav.**).



1.3 pav. Neurouždegimas AL progresijoje. Skaidant APP β - ir γ -sekretazėmis, susidaro $A\beta$ peptidas. $A\beta$ monomerai yra linkę formuoti amiloidines plokšteles, kurių kaupimąsi skatina APP mutacijos. $A\beta$ sankaupos yra šalinamos fagocitozės būdu, tačiau šiam procesui sutrikus mikroglia įgyja M1 fenotipą. Tai skatina APP ir interferono indukuoto transmembraninio baltymo 3 (*IFITM3*) genų raišką, bei metalų jonų išskyrimą. M1 mikroglia išskiria prouždegiminius citokinus ir reaktyvias deguonies formas, kurie skatina neuronų žūtį. Žuvusių neuronų išskiriamos DAMP molekulės (ATP, mitochondrijų DNR, S100 baltymai) aktyvina mikrogliją, sukeldamos lėtinį uždegimą. Prouždegiminiai citokinai aktyvina kinazes, kurios sukelia Tau baltymo hiperfosforilinimą. Parengta pagal [4].

PL yra antras pagal paplitimą neurodegeneracinis sutrikimas, pasižymintis dopaminerginių neuronų nykimu juodojoje medžiagoje ir pasireiškiantis progresuojančiu motorinių funkcijų sutrikimu [55]. Pagrindinis ligos patologijos požymis – citoplazminiai intarpai, dar vadinami Levi kūneliais, daugiausiai sudaryti iš fosforilintų α -sinukleino (α -Syn) agregatų [56]. Manoma, jog α -Syn agregacija nėra pagrindinė dopaminerginių neuronų

žūties priežastis, o Levi kūneliai gali atlikti neuroapsauginę funkciją, kadangi nervinių ląstelių nykimas yra stebimas dar prieš šių citoplazminių intarpų atsiradimą [57]. Iš tiesų, tiesioginis α -Syn agregatų poveikis dopaminerginiams neuronams vis dar lieka prieštaringas. Kai kuriuose tyrimuose pastebėta, jog oligomerinis α -Syn pasižymi neurotoksiškumu tik esant reaktyviai mikroglijai, kas pabrėžia įgimto imuninio atsako ir neurouždegimo svarbą PL patogenezėje [58]. Nors α -Syn daugiausia aptinkamas citozolyje, nedidelė dalis netaisyklingai susilanksčiusio baltymo gali būti išskirta į tarpląstelinį skystį ir, jungiantis prie specifinių paviršiaus receptorių, aktyvuoti glijos ląsteles [59]. Reaktyvios glijos ląstelės išskiria įvairius prouždegiminius citokinus ir chemokinus, kurie sukelia neuronų žūtį, DAMP molekulių išsiskyrimą ir toliau sekančią pakartotiną glijos aktyvaciją [60]. Reaktyvios glijos ląstelės taip pat skatina α -Syn agregatų perdavimą egzomosomis, taip infekuojant greta esančius dopaminerginius neuronus bei sukeliant lėtinį neurouždegimą [61].

ŠAS yra paralyžių sukelianti neurodegeneracinė liga, kuriai būdinga progresuojanti galvos ir smegenų motorinių neuronų degeneracija. Hiperfosforilinto ir ubikvitilinto transaktyvaus atsako DNR surišančio 43 kDa baltymo (angl. *TAR DNA-binding protein 43*, TDP-43) sankaupos yra dažniausiai pastebimas ŠAS požymis. Šis baltymas gali prasiskverbti į mitochondrijas, skatinti mitochondrijų DNR išsiskyrimą į citozolį ir, aktyvuojant cGAS/STING signalinę kaskadą, skatinti neurouždegimą [62]. Taip pat, pagrindinio citoplazminio antioksidacinio fermento – superoksido dismutazės-1 (SOD1) – agregacija sukelia oksidacinį stresą ir lemia mitochondrijų disfunkciją [63]. Į tarpląstelinę erdvę išskirtos amiloidinių baltymų sankaupos aktyvina mikrogliją ir skatina uždegiminių citokinių išsiskyrimą. Lėtinis uždegimas tiesiogiai pažeidžia motorinius neuronus, dar labiau stiprindamas ŠAS progresiją [4].

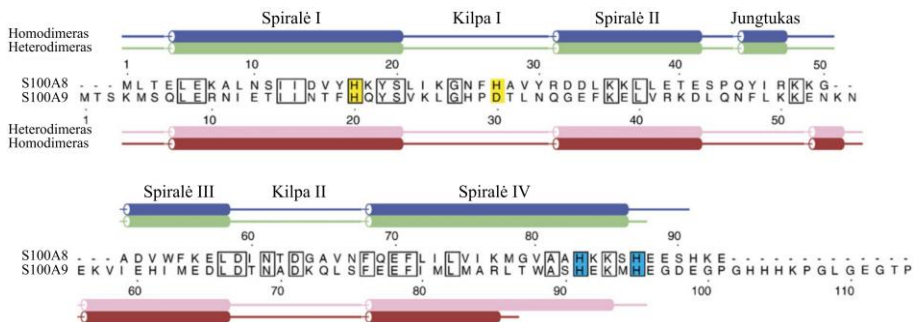
1.3. S100 šeimos baltymai

S100 šeimos baltymai yra pripažįstami kaip vieni pagrindinių uždegimo iniciatorių bei mediatorių [12]. Pirmieji šios šeimos nariai (S100A1 ir S100B) buvo išskirti iš galvijų smegenų 1965 m. ir pavadinti S100 dėl savo tirpumo sočiame (100 %) amonio sulfato tirpale [64]. Fiziologinėmis sąlygomis, šie mažos molekulinės masės (10–14 kDa), kalcį rišantys baltymai reguliuoja įvairius viduląstelinius ir užląstelinius procesus, įskaitant metabolizmą, baltymų fosforilinimą, ląstelių proliferaciją, neuritų augimą, citoskeleto dinamiką, ląstelių migraciją bei viduląstelinio kalcio homeostazę

[65]. Šių baltymų raiška vyksta išskirtinai stuburiniuose, o žmonėse iki šiol yra nustatyti 25 šios šeimos nariai [66]. Kiekvienas S100 baltymas yra koduojamas atskiro geno: 19 iš jų (A grupės S100 baltymai) yra lokalizuoti 1q21 chromosomos regione, tuo tarpu kiti (*S100A11P*, *S100B*, *S100G*, *S100P* ir *S100Z*) yra išsidėstę skirtingose genominių regionų vietose [67]. S100 baltymai pasižymi 25–65 % aminorūgščių sekos homologija [68] bei panašia antrine ir tretine struktūromis [69]. Tačiau, nepaisant struktūrinio panašumo, kiekvienas šios šeimos narys pasižymi įvairiais sąveikos partneriais, funkcijomis ir unikaliu raiškos profiliu skirtinguose audiniuose bei ląstelių tipuose [66,70].

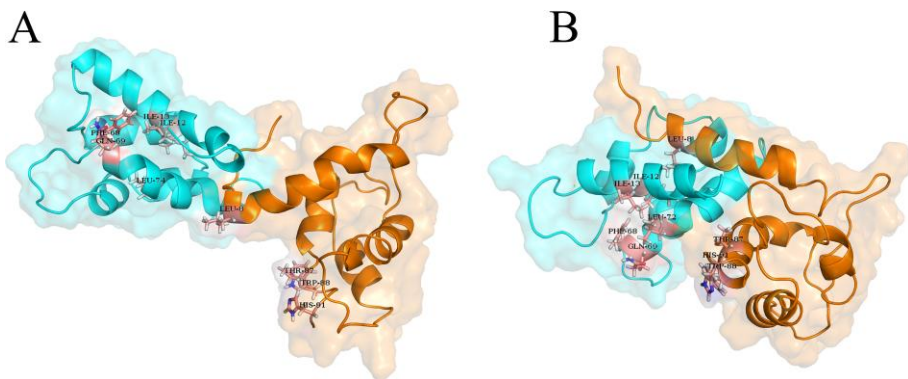
S100 baltymai dažniausiai egzistuoja kaip homodimerai [71], tačiau kai kurie šeimos nariai gali būti randami ir heterodimerinėje būsenoje, įskaitant S100A8/A9, dar žinomu kaip kalprotektinas (CP) [72], S100B/A1 [73], S100A6/B [74]. S100 baltymai taip pat gali formuoti ir funkcinis oligomerus, įskaitant tetramerus, heksamerus ir oktamerus, tačiau šis procesas yra griežtai reguliuojamas dvivalenčių katijonų prisijungimo [75]. Įrodyta, jog oligomerizacija gali keisti šių baltymų biochemines savybes, pavyzdžiui, S100A8/A9 heterotetramerai, priešingai nei heterodimerai, pasižymėjo dideliu stabilumu proteazėms *in vitro* [76].

Šiame darbe tirtų, S100 šeimai priskiriamų, baltymų struktūrinės ypatybės yra pateiktos **1.4 pav.** S100A8 baltymas yra sudarytas iš 93 aminorūgščių ir jo molekulinė masė yra 10,8 kDa, tuo tarpu S100A9 – iš 113 aminorūgščių, o jo molekulinė masė siekia 13,2 kDa [77]. Nors S100A8 ir S100A9 aminorūgščių sekų identiškumas siekia tik 27 %, abu šie baltymai pasižymi panašia antrine struktūra. S100A8 ir S100A9 monomerų struktūroje yra randamos keturios α -spiralės ir dvi kilpos. Nustatyta, jog susiformavus S100A8/A9 heterodimerui, S100A8 išlaiko homodimerinei formai būdingą antrinę struktūrą, tačiau S100A9 baltymo IV α -spirale tampa gerokai ilgesnė, palyginus su jo homodimerine forma [78]. Pažymėtina, jog kaip ir kitų S100 šeimos baltymų, S100A8 ir S100A9 struktūrinės ir funkcinės ypatybės yra reguliuojamos dvivalenčių katijonų, įskaitant Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ar Cu^{2+} , prisijungimo [79,80]. Už kalcio jonų surišimą yra atsakingi kiekvieno baltymo monomere esantys du EF-rankos motyvai, atskirti lanksčia jungtimi. C-galinė EF-ranka, apimanti III ir IV α -spirales, yra laikoma kanonine. Ji būdinga visiems kalmodulino/troponino/S100 superšeimos baltymams bei pasižymi aukštu afiniškumu Ca^{2+} jonams [81]. Tuo tarpu, N-galinė EF-ranka, apimanti I ir II α -spirales, yra būdinga tik S100 šeimos nariams bei pasižymi mažesniu afiniškumu Ca^{2+} [68]. Nustatyta, kad Ca^{2+} surišimas padidina S100 baltymų afiniškumą cinko jonams, tačiau Zn^{2+} prisijungimui Ca^{2+} jonai nėra būtini. Priešingai, Mn^{2+} prisijungimas galimas tik baltymui prieš tai surišus Ca^{2+} [77].



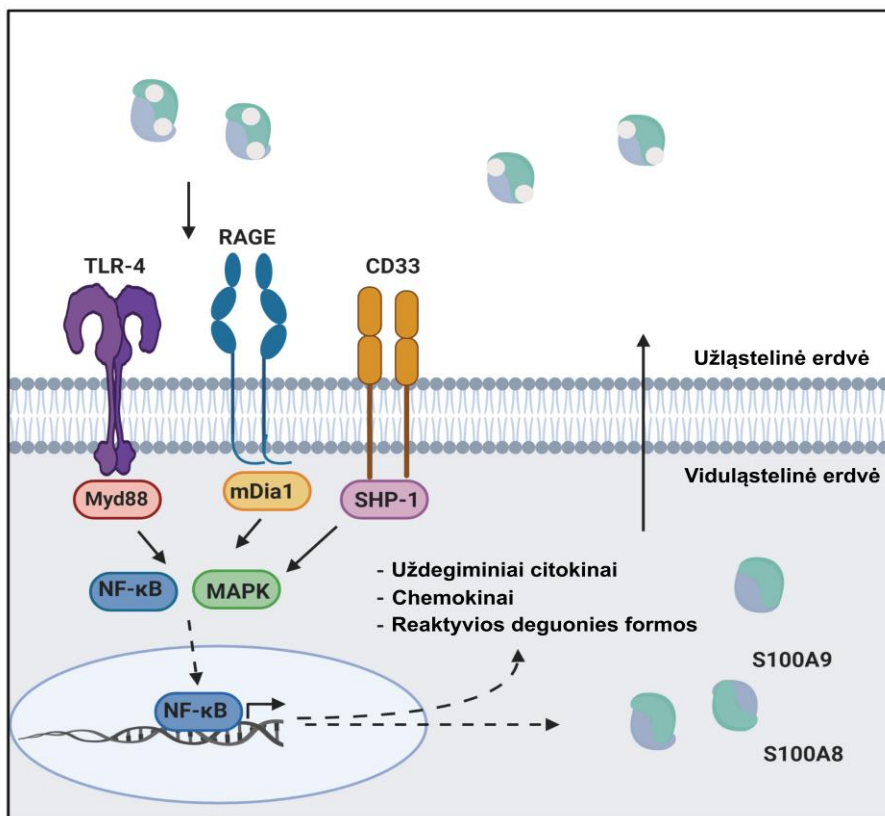
1.4 pav. S100A8 ir S100A9 baltymų aminorūgščių sekų palyginimas. S100A8 ir S100A9 homodimerinių formų antrinės struktūros yra pavaizduotos mėlyna ir raudona spalvomis, atitinkamai. Heterodimerinėje formoje šių baltymų antrinės struktūros pažymėtos žalia (S100A8) ir rožine (S100A9) spalvomis. Identiškos aminorūgštys išskirtos pilkais rėmeliais. C-gale esantys HXXXH motyvai, svarbūs Zn^{2+} jonų prisijungimui, yra pažymėti žydra spalva. N-galiniame regione esančios histidino ir asparto rūgšties šoninės grupės, dalyvaujančios Zn^{2+} koordinavime, yra paryškintos geltonai. Parengta pagal [78].

Literatūroje yra aprašomos trys pagrindinės S100 baltymų konformacijos: nesurišta (apo), surišta su Ca^{2+} (holo), arba prijungta prie tikslinio baltymo [82,83]. Pavyzdžiui, S100A8/A9 atveju, pridėjus kalcio jonų, abiejų komplekso subvienetų α -spiralės suartėja, formuojamas hidrofobinis plyšys, nulemiantis heterokomplekso afiniškumą tiksliniams baltymams, įskaitant receptorius ir kitus S100 šeimos narius (**1.5 pav.**). Aminorūgštys, įskaitant LEU9, ILE12, ILE13, PHE68, GLN69, LEU72 (S100A8) bei THR87, TRP88 ir HIS91 (S100A9), šiuo atveju atlieka svarbų vaidmenį ne tik jungiant du baltymų subvienetus tarpusavyje, bet ir reguliuojant heterokomplekso funkcionalumą [84].



1.5 pav. Struktūriniai S100A8/A9 pokyčiai po sąveikos su Ca^{2+} . Paveikus apo-S100A8/A9 (A) kalcio jonais, α -spiralės persiorientuoja, kompleksas įgyja holo formą (B). Aminorūgštys, įskaitant LEU9, ILE12, ILE13, PHE68, GLN69 ir LEU72 (S100A8) bei THR87, TRP88 ir HIS91 (S100A9) atlieka svarbų vaidmenį ne tik palaikant heterokomplekso struktūrą, bet ir dalyvauja hidrofobinio plyšio, atsakingo už tikslinių baltymų atpažinimą, formavime. Parengta pagal [84].

S100A8 ir S100A9 dalyvauja įgimto imuninio atsako procesuose, o jų raiška daugiausia vyksta mieloidinės kilmės ląstelėse, įskaitant makrofagus, monocitus ir neutrofilus, kur šie baltymai gali sudaryti net iki 50 % citoplazminių baltymų masės [12]. Svarbu paminėti, kad dėl didesnio stabilumo, minėtieji S100 šeimos nariai organizme dažniausiai aptinkami kaip S100A8/A9 heterodimerai arba tetramerai, kurie laikomi biologiškai aktyviausiomis šių baltymų formomis [6]. Nors S100 šeimos baltymai randami tiek viduląstelinuose, tiek užląstelinuose kompartmentuose, jie neturi transmembraninių domenų ar signalinių sekų, būtinų klasikiniam sekrecijos keliui iš ląstelės. Todėl jų pernaša per membraną vyksta alternatyviais, dar neištirtais, mechanizmais [85]. Kadangi Ca^{2+} funkcionuoja kaip antrinė signalinė molekulė, reguliuojanti įvairius ląstelinius procesus [66], galima manyti, jog nuo kalcio jonų priklausoma sąveika su ląstelės plazmine membrana galėtų būti pradinis žingsnis, vedintis link baltymo pernašos per lipidų dvisluoksnį. Tarpląsteliniam skystyje S100A8/A9 bei šio heterokomplekso subvienetų formuojami homodimerai gali veikti kaip DAMP molekulės ir aktyvuoti imuninių ląstelių, endotelio ir neuronų paviršiaus receptorius, įskaitant TLR, RAGE, CD33 [5]. Sąveikaudami su šiais receptoriais, S100 baltymai aktyvuoja NF- κ B ir p38 MAPK signalinius kelius, skatinama prouždegiminių citokinių, chemokinių ir reaktyvių deguonies formų produkcija bei imuninių ląstelių, įskaitant neutrofilų, monocitų ir makrofagų, migracija [86,87] (**1.6 pav.**). Be to, šios signalinės kaskados skatina ir paties ligando (S100A8/A9) bei jo receptoriaus raišką, taip sukuriant teigiamą grįžtamojo ryšio reakciją [88,89]. Svarbu pažymėti, jog S100A8/A9 kompleksas pasižymi ir plataus spektro antimikrobiniu aktyvumu prieš daugelį mikroorganizmų. Šis aktyvumas yra susijęs su S100A8/A9 gebėjimu surišti bakterijų augimui būtinus mikroelementus, įskaitant Zn^{2+} ir Mn^{2+} , bei reguliuoti jų lygį [90,91].



1.6 pav. S100A8/A9 vaidmuo įgimto imuninio atsako procesuose. S100A8/A9 veikia kaip ligandas uždegiminiams receptoriams, įskaitant RAGE, TLR4 ir CD33. Šių receptorių aktyvacija sužadina NF-κB ir MAPK signalines kaskadas, yra didinama prouždegiminių citokinų, chemokinų, reaktyvių deguonies formų, S100 baltymų gamyba, skatinamas uždegiminis atsakas. Parengta pagal [5].

Esant lėtiniam uždegimui, S100 baltymų lygis organizme smarkiai padidėja, o tai leidžia manyti, kad šie baltymai galėtų būti panaudoti ankstyvai uždegiminių ligų diagnostikai [12]. Pavyzdžiui, S100A8/A9 ateietyje potencialiai galėtų būti pritaikytas kaip biožymuo įvairių ligų, įskaitant vėžio [92], diabeto [93], reumatoidinio artrito [94], cistinės fibrozės [95], periodontito [96], širdies ir kraujagyslių ligų [97], infekcijų [98], autoimuninių [99] ir neurodegeneracinių ligų [100] diagnostikai bei terapijų efektyvumo įvertinimui. Taip pat, S100A8/A9 receptoriai ateietyje galėtų pasitarnauti kaip terapiniai taikiniai lėtinio uždegimo ir imuninės sistemos disfunkcijos sukeltų ligų gydymui [101].

1.3.1. S100A8 ir S100A9 vaidmuo neurodegeneracijoje

Iš visų iki šiol aprašytų 25-ių S100 šeimos baltymų, septyni yra aptinkami smegenyse bei siejami su neurodegeneracinių ligų progresija. Šiems baltymams priskiriami S100B, S100A1, S100A6, S100A7, S100A8, S100A9 ir S100A12 [71]. Vienas plačiausiai neurodegeneracijos kontekste ištirtų šios šeimos narių – prouždegiminis S100A9 baltymas. Nustatyta, jog S100A9 lygis padidėja ne tik AL pelių modelių smegenyse, bet ir šia liga sergančių pacientų audiniuose [102]. Taip pat reikšmingas S100A9 lygio padidėjimas buvo pastebėtas ir AL sergančių pacientų cerebrospinaliniame skystyje, patvirtinant S100A9, kaip biožymens, potencialą [103]. Svarbi S100A9 struktūrinė ypatybė yra gebėjimas agreguoti ir formuoti neurotoksiškas, β -klostėmis praturtintas oligomerines, fibrilines ir žiedines struktūras, sąveikaujančias su amiloidiniams baltymams jautriais fluoroforais [104]. Siūloma, jog S100A9, dėl savo gebėjimo tiesiogiai sąveikauti ir koagreguoti su A β , galėtų funkcionuoti kaip tiesioginė jungtis tarp amiloidinių sancaupų formavimosi ir neurouždegiminių procesų [71,105]. Svarbu paminėti, jog yra nustatytas tiesioginis ryšys tarp S100A9 ir A β sancaupų kiekio organizme. Pritaikant AL pelės modelį (Tg257) buvo parodyta, jog *S100a9* geno raiška yra skatinama A β ir APP C-galinio fragmento. Tuo tarpu, *S100a9* geno išveiklinimas skatina A β fagocitozę mikroglijos ląstelėse ir taip sumažina amiloidinių sancaupų kiekį smegenyse bei pagerina pelių kognityvinius gebėjimus [103,106]. APP/PS1 pelės modelyje pademonstruota, jog S100A9 ir jo heterodimerinis partneris, S100A8, sukelia M1 mikroglijos aktyvaciją bei įvairių uždegiminių veiksnių, įskaitant TNF- α ir interferono γ (IFN- γ), sekreciją. Šie uždegiminiai faktoriai skatina β -sekretazės 1 (*Bace1*) ir *Bace2* genų raišką bei slopina A β skaidančio fermento, neprilizino, raišką [103]. Taip pat buvo nustatyta ir atvirkštinė koreliacija tarp *S100a9* ir neamiloidogeninės α -sekretazės, *Adam-10*, genų raiškos [107]. Kadangi S100A9 agregacija į fibriles įvyksta dar prieš A β plokštelių susidarymą smegenyse, buvo pasiūlyta, jog prouždegiminis S100A9 baltymas galėtų funkcionuoti ir kaip jungtis tarp traumatinio smegenų pažeidimo bei AL [108].

S100A9 lygio padidėjimas buvo pastebėtas ir Parkinsono liga sergančių pacientų smegenyse bei PL pelės modelyje. Šiuo atveju, baltymo raiška daugiausia vyko astrocituose, o *S100a9* geno išveiklinimas skatino astrocitų poliarizaciją į neuroapsauginį A2 fenotipą [109]. Parodyta, kad S100A9 gali koagreguoti su α -Syn, taip reikšmingai sumažinant α -Syn fibrilizacijos greitį ribojančios, agregacijos branduolių susidarymo (lag), fazės

trukmę [110]. Taip pat nustatyta, jog traumatinio smegenų pažeidimo metu padidėjęs S100A9 lygis ir dėl to atsiradęs lėtinis uždegimas skatina S100A9 ir α -Syn koagratų susidarymą bei Parkinsono ligos vystymąsi [111]. Įdomu tai, jog šoninės amiotrofinės sklerozės pelės modelyje (hSOD1 G93A), S100a9 geno išveiklinimas neturėjo teigiamos įtakos motorinių neuronų būklei bei pelių išgyvenamumui ir net priešingai – paspartino ligos simptomų progresavimą. Šie rezultatai įrodo, jog, priešingai nei AL ir PL atvejais, S100A9 raiškos slopinimas nebūtų veiksminga strategija ŠAS gydymui [112].

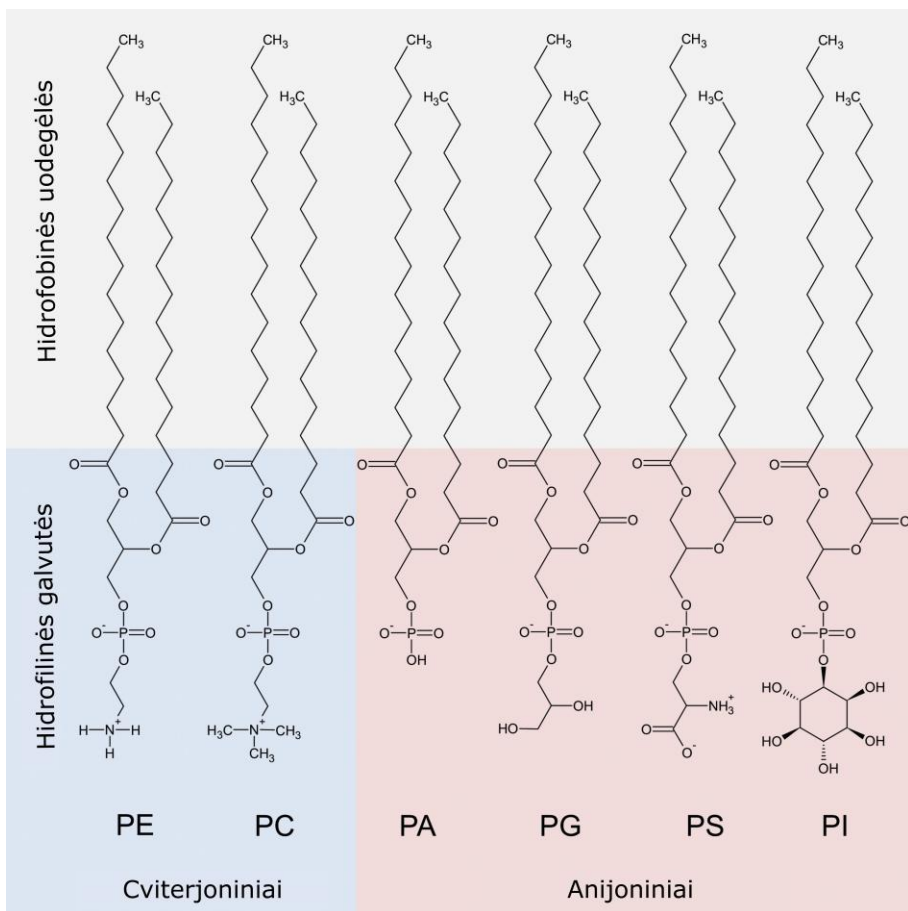
Prouždegiminio S100A8 baltymo atveju, padidėjęs jo lygis buvo stebimas AL sergančių pacientų kraujo serume [113] ir AL pelių modelių (Tg2576, TgAPP_{arc}) hipokampe [114]. Taip pat, S100A8 buvo nustatytas kaip vienas pagrindinių komponentų, skatinantis lengvo kognityvinio sutrikimo progresiją į AL [115]. Nustatyta, jog S100A8, priešingai nei S100A9, nesudaro fibrilinių struktūrų, tačiau gali agreguoti į potencialiai neurotoksiškus oligomerinius ir sferinius darinius, sąveikaujančius su amiloidiniams baltymams specifiniais fluoroforais [116]. Įvairūs tyrimai rodo tiesioginę koreliaciją tarp A β ir S100A8 baltymų kiekio organizme. Pastebėta, jog į mikroglijos ląstelių kultūrą pridėjus A β agregatų, padidėja S100A8 iRNR lygis, o tolimesnis kultūros augimas parodė, kad A β -indukuojama šio baltymo raiška gali lemti lėtinį prouždegiminio mikroglijos fenotipo aktyvumą [117]. Tuo tarpu neuroblastomos ląstelių kultūros inkubacija su S100A8 skatino neurotoksiškesnės A β ₄₂ ir slopino A β ₄₀, formų produkciją [114].

1.4. Ląstelės plazminė membrana

Plazminės membranos susiformavimas yra laikomas vienu esminių evoliucijos procesų ir pagrindu toliau vystytis gyvybei. Plazminė membrana, sudaryta iš 50 % lipidų ir 50 % baltymų [118], užtikrina erdvės skyrą tarp viduląstelių ir užląstelių kompartmentų, suteikia atrankų laidumą bei atlieka apsauginę funkciją. Biomolekulių prisijungimas prie išorėje esančių membranos receptorių inicijuoja įvairias signalines kaskadas, leidžiančias ląstelei jausti ir reaguoti į aplinkos pokyčius. Kruopščiai kontroliuojamos membranos poros ir jonų kanalai leidžia įsisavinti maistines medžiagas ir pašalinti metabolitus. Taip pat, greta esančios ląstelės gali būti sujungtos tarpusavyje per specifines adhezijos molekules, išsidėsčiusias plazminės membranos paviršiuje. Svarbu paminėti, jog kai kurie gyvybiškai svarbūs procesai, kaip fotosintezė ar kvėpavimas, vyksta būtent endomembranose [119,120]. Dėl tokios didelės plazminės membranos svarbos, nenuostabu, jog

daugelis kenksmingų išorinių veiksnių, įskaitant poras formuojančius toksinus [121], antimikrobinius peptidus [122] ir amiloidinius baltymus [123], veikia būtent per plazminės membranos pažeidimą.

Pagrindiniai membranos struktūriniai komponentai yra lipidai, kurie gali būti skirstomi į tris pagrindines klases: glicerofosfolipidus, sfingolipidus ir sterolius [120]. Glicerofosfolipidų molekulės susideda iš glicerolio grupės, sujungtos su dviem hidrofobinėmis riebalų rūgščių uodegomis ir viena hidrofiline fosfato esterio galvute. Riebalų rūgščių uodegos gali skirtis savo ilgiu (paprastai 12–24 anglies atomų) ir nesočiųjų jungčių skaičiumi. Šie skirtumai yra svarbūs, kadangi jie lemia glicerofosfolipidinių molekulių išsidėstymą ir veikia membranos takumą [119]. Fosfato grupė dažniausiai būna modifikuota įvairiomis funkcinėmis grupėmis, sudarant skirtingo krūvio molekules: cviterjoninius fosfatidilcholiną (PC) ir fosfatidiletanolaminą (PE), taip pat neigiamai įkrautus fosfatidilseriną (PS), fosfatidilinozitolį (PI), fosfatidilglicerolį (PG) ir fosfatidinę rūgštį (PA) [124] (**1.7 pav.**). Amfipatiniai glicerofosfolipidai vandeniniuose tirpaluose sudaro dvisluoksnes struktūras, kuriose polinės galvutės yra nukreiptos į aplinkines vandens molekules, o hidrofobinės angliavandenilių uodegos sąveikauja tarpusavyje, sudarydamos vidinį hidrofobinį sluoksnį. Lipidinio dvisluoksnio centras yra panašaus poliškumo kaip heksanas ir yra beveik nepralaidus hidrofilinėms molekulėms. Fosfolipidinio dvisluoksnio storis paprastai yra apie 30–35 Å, o kiekvieno fosfolipido molekulės užimamas plotas yra apie 70 Å² [119]. Žinduolių membranose, be glicerofosfolipidų, taip pat randamas sfingolipidas sfingomielinas (SM) ir cholesterolis – amfifilinis sterolis, kuris įsiterpia tarp fosfolipidų molekulių hidrofobinių uodegų ir reguliuoja membranos fluidiškumą [125].



1.7 pav. Glicerofosfolipidų struktūra ir galvučių krūvio charakteristikos. Fosfatidilcholinai (PC) ir fosfatidiletanolaminai (PE) yra cviterjoniniai glicerofosfolipidai, turintys neutralų krūvį. Fosfatidinė rūgštis (PA), fosfatidilglicerolis (PG), fosfatidilserinas (PS) ir fosfatidilinozitolis (PI), yra neigiamai įkrauti lipidai, kurių bendras krūvis yra -1 . Parengta pagal [126].

1972 m. mokslininkai S. Singeris ir G. Nicolsonas į membraną pasiūlė žiūrėti kaip į skystą lipidų dvisluoksne mozaiką, į kurią yra įterpti integraliniai baltymai, o periferiniai baltymai yra adsorbuoti prie dvisluoksniu paviršiaus. Nors šiame modelyje buvo numatyta dvisluoksniu asimetrija baltymų atžvilgiu, jie neįtraukė lipidų sudėties asimetrijos [127]. Dabar yra žinoma, jog tiek lipidų lateralinis, t. y. membranos plokštumoje, tiek transversinis, t. y. tarp dviejų membranos sluoksnių, išsidėstymas ženkliai skiriasi [128]. Lipidų transversinė asimetrija yra palaikoma tam tikros grupės membraninių baltymų, dar vadinamų lipidų translokazėmis (flipazės, flofazės, skramblazės), kurie perneša lipidų molekules tarp skirtingų monosluoksnių, taip pakaitomis praturtindami arba sumažindami tam tikros lipidų rūšies koncentraciją ir keisdami lokalaus krūvio pasiskirstymą [129]. Šis judėjimas,

dar vadinamas „flip-flop“, vyksta daug lėčiau nei lateralinė difuzija – jo pusėjimo trukmės gali siekti nuo kelių valandų iki kelių dienų, kadangi įkrautų galvucių pernešimas per hidrofobinę membranos dalį reikalauja didelės aktyvacijos energijos [130]. Svarbu paminėti, jog plazminės membranos lipidų kompozicija labai skiriasi, priklausomai nuo organizmo rūšies, ląstelės vystymosi stadijos, aplinkos veiksnių bei audinio tipo. Lipidų sudėties pokyčiai yra siejami ir su daugeliu ligų, įskaitant vėžį, ŽIV, diabetą, aterosklerozę, širdies ir kraujagyslių ligas bei Alzheimerio ligą [131].

Lyginant „vidutinės“ žinduolių ir, konkrečiai, smegenų audinio ląstelių plazminės membranos lipidų sudėtis, didžiausi skirtumai yra stebimi cholesterolio kiekyje: smegenų ląstelių membranoje cholesterolis vidutiniškai sudaro 44,5 % visų lipidų masės, o žinduolių plazminėje membranoje – 30 % (**1.1 lentelė**). Žinduolių ląstelių plazminėje membranoje stebima labiau išreikšta cholesterolio asimetrija, kadangi didesnė jo dalis lokalizuojasi išoriniame monosluoksnyje. Be to, smegenų ląstelių membranoje yra mažiau PC, SM, kurie pagrįdė aptinkami išoriniame membranos sluoksnyje bei daugiau PE, kurio didžioji dalis lokalizuota vidiniame monosluoksnyje. Smegenų ląstelėse stebimas ir šiek tiek mažesnis glikolipidų gangliozido 1 (GM1) ir gangliozido 3 (GM3) kiekis, lyginant su „vidutine“ žinduolių ląstelių plazmine membrana. Kadangi šie glikolipidai funkcionuoja kaip ligandai įvairiose ląstelės paviršiaus sąveikose, jie yra lokalizuoti išoriniame monosluoksnyje. Taip pat, smegenų ląstelių plazminėje membranoje stebimas didesnis polinesočiųjų fosfolipidinių uodegų kiekis (vidutiniškai 1,27 dvigubos jungties, žinduolių – 1,05) [132]. Svarbu paminėti, jog „vidutinė“ žinduolių ląstelių plazminė membrana aptartame tyrime atitinka idealizuotą mišinį, atspindintį vidutinį lipidų pasiskirstymą įvairių žinduolių ląstelių tipų, įskaitant eritrocitus, epitelio ląsteles ir kt., membranose.

1.1 lentelė. Pagrindiniai lipidiniai komponentai ir jų paplitimas „vidutinėje“ žinduolių ir, konkrečiai, smegenų audinio, ląstelių membranose. Lentelėje pateiktas kiekvieno lipidinio komponento kiekis (%) išoriniame ir vidiniame plazminės membranos monosluoksnyje. Parengta pagal [132].

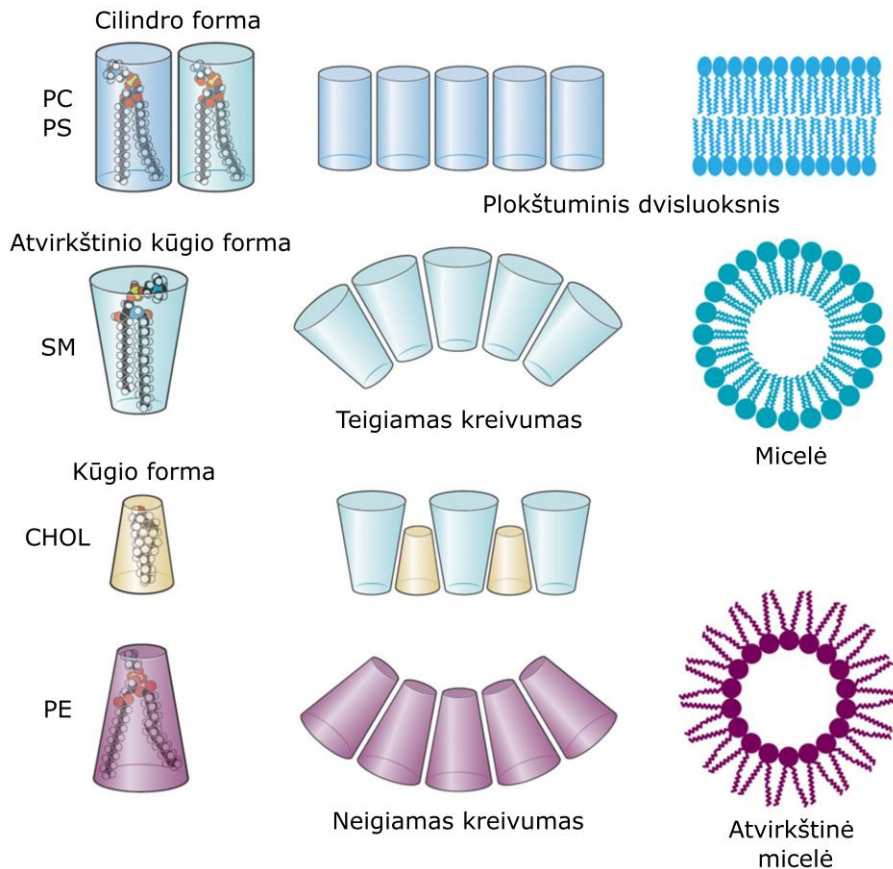
Komponentas	Žinduolių ląstelių membrana		Smegenų ląstelių membrana	
	Vidinė (%)	Išorinė (%)	Vidinė (%)	Išorinė (%)
PC	17,3	35,7	13,6	24,2
PE	25,4	5,6	21,3	11,0
PS	10,7	-	9,8	-
SM	9,3	19,2	2,3	8,9
GM1	-	2,6	-	1,4
GM3	-	2,6	-	1,4
CHOL	28,5	31,3	44,6	44,4

Nustatyta, jog krūvį turinčios fosfolipidų galvutės (PS, PG, PI, PA) sukuria jonų koncentracijos gradientus membranos paviršiuje ir atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant dvisluksnio sąveikas su periferiniais baltymais. Tokio tipo elektrostatinės sąveikos yra gana nespecifinės, tačiau sėkmingai pritraukia baltymus prie membranos paviršiaus remiantis krūvių komplementarumu [133]. Daugelis periferinių membraninių baltymų savo N-arba C-galiniuose fragmentuose turi kovalentiškai prijungtas miristoilo arba palmitoilo grandines, įsiterpiančias į lipidų dvisluksnį ir veikiančias kaip hidrofobiniai inkarai. Tačiau be hidrofobinių inkarų, šie baltymai galiniuose fragmentuose taip pat turi ir bazinių aminorūgščių (lizino ir arginino) sankaupas. Kadangi šios sankaupos yra teigiamai įkrautos fiziologiniame citoplazmos pH, jos gali sąveikauti su neigiamai įkrautomis fosfolipidų galvutėmis membranos paviršiuje. Tokių, su lipidų dvisluksniais elektrostatiškai asocijuotų, baltymų pavyzdžiai – Src kinazė, G baltymai, įvairios GTPazės, SH2B1β geno produktas, retrovirusų Gag baltymai ir Aβ [8,128]. Svarbu paminėti, jog periferiniai baltymai, veikiant elektrostatiniais efektams, gali būti ne tik pritraukiami, bet ir pašalinami nuo dvisluksnio paviršiaus. Nustatyta, jog baltymų galiniuose segmentuose, be bazinių aminorūgščių sankaupų, yra ir serino šoninių grupių, kurios yra baltymų kinazės C taikiniai [134]. Šių aminorūgščių šoninių grupių fosforilinimas suteikia neigiamą krūvį, taip susilpninant sąveiką su anijoninėmis fosfolipidinėmis galvutėmis. Kadangi hidrofobiniai miristoilo arba palmitoilo inkarai patys savaime neišlaiko baltymų membranos paviršiuje, jie atsiskiria į citoplazmą [135]. Elektrostatinė sąveika gali būti susilpninta ir iš viduląstelių rezervuarų išlaisvinant Ca^{2+} jonus, kurie prisijungia prie fosfolipidų anijoninių galvutėlių, taip neutralizuodami jų neigiamą krūvį [136].

1.4.1. Lipidų polimorfizmas ir faziniai virsmai

Lipidų molekulės, dėl savo amfifilinių savybių, vandeniniuose tirpaluose pasižymi polimorfizmu ir yra linkusios agreguoti į kompleksines struktūras, įskaitant mices, arba sudaryti lamelinę, kubinę ar atvirkštinę heksagoninę fazes [137]. Tokią savaiminę lipidų organizaciją lemia hidrofobinis efektas, kylantis dėl tirpiklio atostūmos jėgos. Kitaip tariant, hidrofobiniai lipidų regionai susitelkia tarpusavyje, siekdami sumažinti sąlytį su vandeniu, tuo tarpu polinės galvutės išlieka stipriai hidratuotos [138]. Fazinius virsmus į tam tikras struktūras lemia įvairūs veiksniai, įskaitant lipidų molekulių geometriją, koncentraciją, sistemos pH ir temperatūrą.

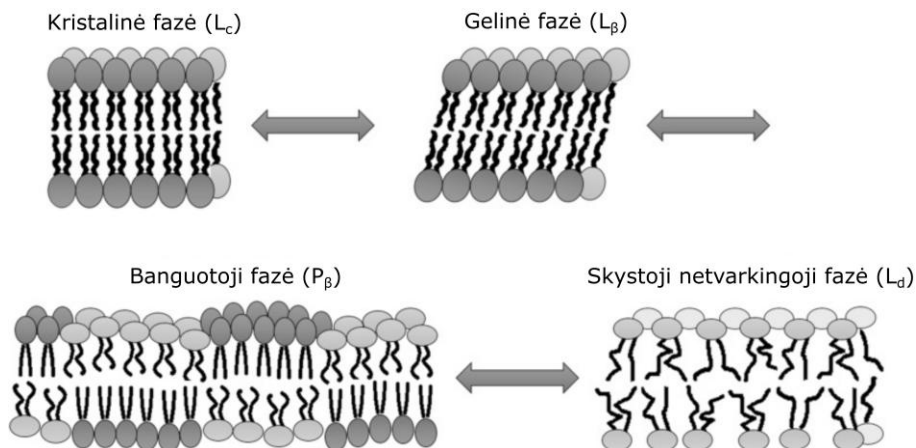
Lipidų geometriją lemia tiek polinės galvutės dydis, tiek nepolinių riebalų rūgščių grandinių nesotumo laipsnis, kadangi grandinės su *cis* dvigubomis jungtimis erdvėje užima daugiau vietos nei sočiosios arba *trans* dvigubas jungtis turinčios grandinės. Atsižvelgiant į molekulinę formą, lipidai skirstomi į tris pagrindines grupes: cilindro, kūgio ir atvirkštinio kūgio formos lipidus (**1.8 pav.**). Lipidai, kurių polinės galvutės ir nepolinės uodegėlės yra panašaus dydžio, pasižymi cilindro forma (pvz.: PC, PG, PI, PS). Jie nesukelia spontaninio membranos kreivumo ir yra linkę organizuotis į plokštuminius lipidų dvisluoksnius. Priešingai, kūgio formos lipidai, tokie kaip PA, PE ir diacilglicerolis (DAG), dėl mažos polinės galvutės ir didelių riebalų rūgščių grandinių, sukelia neigiamą membranos kreivumą. Šie lipidai dažniausiai organizuojasi į atvirkštinę micelinę arba heksagoninę (H_{II}) fazes. Galiausiai, lipidai, turintys didelę polinę galvutę ir tik vieną riebalų rūgšties grandinę, tokie kaip lizofosfolipidai, pasižymi atvirkštinio kūgio forma. Jie yra linkę formuoti sferines micles ir sukelti teigiamą membranos kreivumą. Šiai lipidų grupei yra priskiriamas ir sfingomielinas [139]. Svarbu paminėti, jog lipidų geometrija nulemia ir sąveiką su cholesterolium. Nustatyta, jog SM, pasižymintis atvirkštinio kūgio forma, efektyviau dengia hidrofobinę cholesterolio dalį nei kūgio formos lipidai, pavyzdžiui, PE. Dėl šios priežasties, lipidų dvisluoksniuose cholesterolis dažniausiai kaupiasi SM praturtintuose regionuose, tuo tarpu PE praturtintose membranose cholesterolio kiekis būna mažesnis [140]. Be to, kūginių ir atvirkštinių kūginių lipidų sukeltas membranos kreivumas yra būtinas įvairiems ląsteliniais procesams, įskaitant endocitozę, egzocitozę, baltymų erdvinę organizaciją, virusų patekimą į ląstelę ir kt. [141,142].



1.8 pav. Lipidų polimorfizmas ir faziniai virsmai. Cilindro formos lipidai (PC, PE, PS, PI) nesukelia spontaninio membranos kreivumo ir organizuojasi į lamelinius lipidų dvisluoksnius. Kūgio formos lipidai (PA, PE, DAG, CHOL) sukelia neigiamą membranos kreivumą ir formuoja nelamelines struktūras, įskaitant atvirkštinius micelinus ar heksagoninius agregatus. Atvirkštinio kūgio formos lipidai (SM, lizofosfolipidai) yra linkę formuoti sferines micleles ir indukuoti teigiamą membranos kreivumą. Parengta pagal [140].

Labiausiai gamtoje yra paplitusi lamelinė fazė, kurioje amfifilinės molekulės sudaro dvisluoksnes struktūras. Tokie lameliniai lipidų dvisluoksniai gali būti sutinkami įvairiose būsenose: kietojoje kristalinėje (L_c), gelinėje (L_β), banguotoje (P_β) arba skystojoje netvarkingoje (L_d) (**1.9 pav.**). Kietojoje kristalinėje fazėje lipidai yra išsidėstę tvarkingai, o jų angliavandenilių grandinės yra *trans* konformacijoje. Šioje fazėje sudaroma labai kompaktiška lipidinė struktūra, kuriai būdinga maža lateralinė lipidų difuzija ir žemas membranos hidratacijos lygis. Lipidai yra glaudžiai supakuoti lygiagrečiai vienas kitam į dvimatę heksagoninę gardelę [120]. Tačiau, tokia kristalinė būseną gamtoje yra stebima tik nevandeninėse terpėse arba užšaldyto vandens sąlygomis [143,144]. Lipidų angliavandenilių

grandinės gali būti pasvirusios kristalinės fazės atžvilgiu, taip sudarydamos gelinę fazę [145]. Toliau, keliant temperatūrą, membrana pereina į skystąją fazę. Priklausomai nuo dvisluoksnio sudėties ir nesotumo laipsnio, perėjimas tarp gelinės ir skystosios fazės įvyksta tam tikroje temperatūroje, vadinamoje fazinio virsmo temperatūra (T_m). Tarp šių procesų gali būti stebimas ir tarpinės, dar vadinamos banguotąja, fazės susidarymas, kuri pasižymi periodinėmis vienmatėmis bangėlėmis. Skystojoje netvarkingoje fazėje lipidų organizacija tampa labai chaotiška, o lipidų lateralinės ir sukamosios difuzijos greičiai padidėja [120]. Dvisluoksnyje, esant dideliame cholesterolio kiekiui, gali susidaryti ir penktoji būseną – skystoji tvarkingoji (L_o) fazė. Šioje fazėje cholesterolio molekulės dvisluoksnyje išsidėsto taip, kad jų hidroksilo grupės yra nukreiptos link fosfolipidinių galvučių, taip sumažinant angliavandenilių grandinių judrumą šiame regione. Ši fazė yra mažiau fluidiška nei skystoji netvarkingoji fazė, tačiau vis dar ne tokia kompaktiška, kaip gelinė fazė [119].



1.9 pav. Lipidų lamelinės fazės. Priklausomai nuo sudėties, aplinkos pH ir temperatūros, lipidų dvisluoksniai gali egzistuoti skirtingose būsenose: kristalinėje (L_c), gelinėje (L_β), banguotoje (P_β) ir skystojoje netvarkingoje (L_d). Parengta pagal [120].

Dviejų ar daugiau lipidinių fazių egzistavimas gali sukelti lateralinę fazių atsiskyrimą membranoje. Faziškai atskirti mikroregionai ląstelėje, dar vadinami lipidų plaustais, apibrėžiami kaip mažos (10–200 nm), heterogeniškos, labai dinamiškos, steroliais ir sfingolipidais praturtintos sritys [146]. Taip pat, be padidėjusios cholesterolio ir sfingolipidų koncentracijos, lipidų plaustai yra specifiškai praturtinti sočiaisiais glicerofosfolipidais, fosfatidilserinu, fosfatidilinozitolio 4,5-difosfatu ($PI(4,5)P_2$) ir arachidono rūgštimi [147]. Manoma, kad lipidų plaustai yra išsidėstę labiau organizuotoje būsenoje, panašioje į skystąją tvarkingą fazę, plačiai aprašytą modelinėse sistemose [148]. Tokia organizuota lipidų plaustų struktūra nulemia jų

atsparumą nejoniniams detergentams, pvz.: Triton X-100 [149]. Šių mikrodomenų formavimasis, dėl didesnio sfingomielino kiekio, dažniausiai yra stebimas išoriniame membranos sluoksnyje. Tuo tarpu lipidų plaustų buvimas vidinėje membranos pusėje yra mažiau ištirtas, tačiau manoma, jog tokie domenai citoplazminėje dvisluoksnio srityje taip pat galėtų egzistuoti dėl tankaus sočiųjų glicerofosfolipidų acilo grandinių susipakavimo [146,150]. Nustatyta, jog tokiuose mikrodomenuose preferentiškai organizuojasi baltymai, sudėtyje turintys glikofosfatidilinozitolio (GPI) inkarus, sočiąsias palmitoilies arba miristoilies grupes, taip pat cholesterolį jungiantys baltymai [147]. Lipidų plaustų praturtinimas įvairiais signaliniais baltymais ir lipidinės kilmės kofaktoriais leidžia manyti, jog jie ląstelėje funkcionuoja kaip signalų perdavimo platformos, taip padidindami signalinių virsmų efektyvumą ir specifiškumą [151].

1.4.2. Baltymo–lipido sąveikų tipai

Plazminėje membranoje lipidų ir baltymų sąveikos atlieka esminį vaidmenį užtikrinant membranos organizaciją ir funkcionalumą. Įrodyta, kad šios sąveikos yra būtinos daugeliui biologinių procesų, tokių kaip signalų perdavimas, medžiagų transportas per lipidinį dvisluoksnį, medžiagų apykaitos palaikymas bei patogenų prisitvirtinimas prie šeimininko ląstelių [152]. Lipidų ir baltymų sąveikos retai yra grindžiamos kovalentiniais ryšiais (pvz.: esteriniais), dažniausiai baltymai su lipidais sąveikauja per įvairias nekovalentines sąveikas. Tokios sąveikos apima:

I. Hidrofobinės sąveikos. Šiuo atveju baltymų nepolinių aminorūgščių šoninės grupės sąveikauja su membraninių lipidų hidrofobinėmis riebalų rūgščių uodegėlėmis. Šis vadinamasis hidrofobinis efektas pagrįstas tirpiklio (dažniausiai vandens) molekulių išstūmimu iš sąlyčio zonos tarp dviejų hidrofobinių paviršių [153]. Tai yra pagrindinė jėga, skatinanti integraliųjų baltymų įsiterpimą į lipidinį dvisluoksnį. Kaip ir juos supantys lipidai, transmembraniniai baltymai yra amfifilinės molekulės – turinčios tiek hidrofilinių, tiek hidrofobinių sričių. Hidrofobinės sritys išsidėsto membranos vidinėje dalyje, kur sąveikauja su lipidų riebalų rūgščių uodegėlėmis ir taip yra apsaugotos nuo sąlyčio su vandens molekulėmis. Tuo tarpu hidrofilinės sritys yra nukreiptos į ląstelės vidinę arba išorinę, vandeninę terpę. Integralieji membraniniai baltymai iš lipidinio dvisluoksnio gali būti pašalinti tik naudojant detergentus arba chaotropinius agentus, kurie suardo membranos struktūrą [154].

II. Elektrostatinės sąveikos. Elektrostatinės sąveikos yra vienas pagrindinių veiksnių, leidžiančių baltymams prisijungti prie biologinių membranų paviršiaus. Šios sąveikos yra ypač svarbios periferiniams membraniniams baltymams – pavyzdžiui, citochromas c ir mielino bazinis baltymas su lipidų dvisluoksniais daugiausia sąveikauja būtent per elektrostatines jėgas [155]. Nustatyta, jog anijoniniai lipidai atlieka reikšmingą vaidmenį amiloidogenezėje. Kai kurie katijoniniai, fibrilines struktūras formuojantys, baltymai ar peptidai yra pritraukiami prie membranos paviršiaus būtent dėl sąveikų su neigiamai įkrautomis lipidų galvutėmis, o tai lemia jų lokalsios koncentracijos padidėjimą, spartesnę agregaciją ir skatina neurotoksiškumą [156]. Be to, transmembraninių baltymų citoplazminiai domenai dažnai būna praturtinti bazinėmis aminorūgštimis, kurios taip pat sąveikauja su neigiamai įkrautais komponentais membranos paviršiuje. Skirtingai nei integralieji membraniniai baltymai, kurie tvirtai įsiterpia į lipidų dvisluoksnį per hidrofobines sąveikas, periferiniai baltymai prie membranos jungiasi laisviau ir gali būti lengvai pašalinami keičiant joninę jėgą ar pH [154]. Plačiau apie periferinių baltymų sąveikas su lipidų dvisluoksniais žiūrėti **skyrelį 1.4**.

III. Vandeniliniai ryšiai. Vandeniliniai ryšiai susidaro tarp baltymų polinių aminorūgščių šoninių grupių ir polinių lipidų galvutčių membranos paviršiuje. Tyrimai rodo, kad šie ryšiai ne tik užtikrina sąveikas tarp lipidų ir baltymo molekulių, bet ir reguliuoja baltymo konformacinius pokyčius, taip reikšmingai prisidedant prie jo struktūrinio stabilumo palaikymo [157].

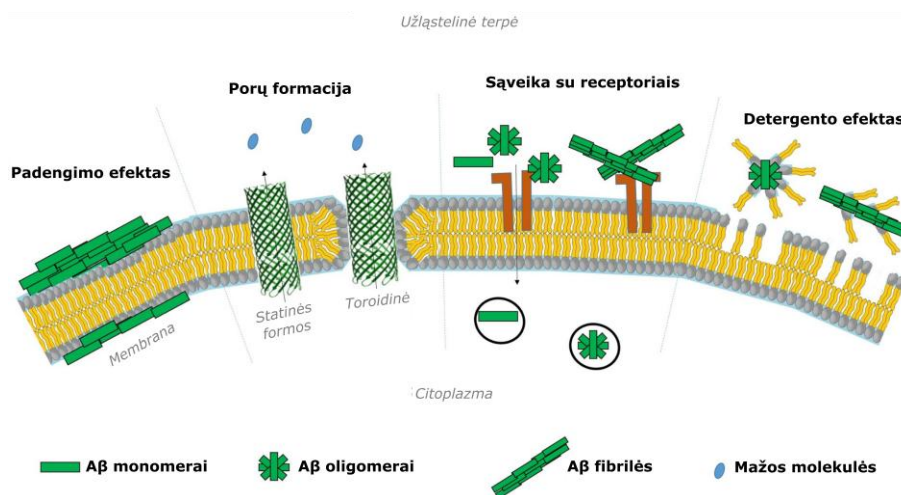
IV. Van der Valso jėgos. Susidarančius baltymo-lipidų kompleksus taip pat stabilizuoja trumpo nuotolio, nespecifinės Van der Valso jėgos, kylančios dėl greta esančių molekulių ar atomų tarpusavio sąveikų bei indukuoto dipolių atsiradimo. Nors pavieniui šios sąveikos yra labai silpnos, jų ansamblis gali reikšmingai prisidėti prie kompleksų stabilumo. Van der Valso jėgų stiprumas mažėja didėjant atstumui tarp molekulių, laikantis $1/R^6$ priklausomybės, todėl jos tampa reikšmingos tik tada, kai sąveikaujantys komponentai yra labai arti vienas kito [158].

Svarbu pažymėti, kad kai kurie baltymai turi specializuotus domenų, užtikrinančius jų tikslinį nukreipimą į konkrečias membranos sritis. Šių domenų sąveikos su membranos paviršiumi paprastai skirstomos į dvi pagrindines kategorijas: viena pasižymi aukštu specifiskumu ir stereocheminiu tam tikrų lipidinių komponentų atpažinimu, o kita apima nespecifines sąveikas, priklausančias nuo bendrų membranos fizinių savybių, tokių kaip krūvis, amfifiliškumas ar kreivumas. Pirmieji identifikuoti domenai, galintys specifiskai atpažinti lipidinius komponentus, buvo C1, C2

ir plekstrino homologijos (PH) domenas. C1 domenas specifiskai atpažista diacilglicerolio molekules, PH – fosfoinozitudus, o C2 – fosfatidilseriną [159].

1.4.3. Plazminės membranos pažaidos mechanizmai

Šiuo metu yra nustatyta keli šimtai peptidų, dar vadinamų citolitiniiais peptidais, galinčių pažeisti plazminę membraną, taip sukeliant ląstelės žūtį. Yra išskiriamos dvi pagrindinės citolitinių peptidų kategorijos: amiloidiniai baltymai ir antimikrobiniai peptidai. Pastarieji atlieka svarbų vaidmenį šeimininko įgimtojo imuninio atsako sistemoje ir padeda kovoti su įvairiais mikroorganizmais, įskaitant bakterijas, grybus, parazitus ir virusus [160]. Įdomu tai, jog nepaisant funkcinių ir struktūrinių skirtumų, šios dvi citolitinių peptidų kategorijos pažymi vienodais plazminės membranos pažaidos mechanizmais [161] (**1.10 pav.**). Tačiau toliau šiame skyrelyje dėmesys bus skiriamas tik membranos pažaidai amiloidiniais baltymais, skirtingus pažaidos mechanizmus pagrindžiant konkrečiais šių baltymų pavyzdžiais.



1.10 pav. Membranos pažaidos amiloidiniais baltymais mechanizmai. Yra išskiriami skirtingi amiloidinių baltymų sąveikos su plazmine membrana modeliai: padengimo efektas, porų formacija ir detergento mechanizmas. Amiloidiniai baltymai gali sąveikauti ir su plazminėje membranoje imobilizuotais receptoriais, taip aktyvindami jų įsisavinimo į ląstelę ir citotoksiškumo mechanizmus. Parengta pagal [8].

I. Jonams laidžių porų formacija. Nustatyta, jog amiloidinių baltymų monomerai gali įsiterpti į lipidų dvisluoksnį ir, agreguodami tarpusavyje, formuoti jonams laidžias poras. Šios poros pasižymi skirtinga morfologija ir gali būti skirstomos į du pagrindinius tipus: 1. Statinės formos pora, kur baltymo hidrofilinė dalis yra nukreipta poros centrą, o hidrofobinis regionas orientuotas į dvisluoksnio hidrofobinę šerdį; 2. Toroidinė pora, susidaranti dėl

lipidų dvisluoksniu išlinkimo. Šiuo atveju poros centras yra sudarytas ne tik iš baltymo, bet ir iš lipidų molekulių hidrofilinių galvučių. Nors kompiuterinio modeliavimo rezultatai parodė, jog statinės formos poros yra energetiškai palankesnės nei toroidinės, amiloidiniai baltymai, priklausomai nuo su lipidų dvisluoksniu sąveikaujančių aminorūgščių šoninių grupių, gali formuoti abiejų tipų kanalus. Svarbu paminėti, jog amiloidinių baltymų kilmės poros pasižymi skirtingu selektyvumu jonams. Pavyzdžiui, Aβ poros pasižymi specifiniu pralaidumu Ca^{2+} jonams [162], tuo tarpu K3 (β-mikroglobulino fragmentas) [163] ir žmogaus kasos salelių amiloido polipeptidas (hIAPP) [164] formuoja santykinai neselektyvius kanalus. Taip pat, amiloidinės poros, nepriklausomai nuo kilmės, pasižymi panašiomis struktūrinėmis ypatybėmis: vidinis poros skersmuo yra 1–2 nm, išorinis – 8–12 nm. Neuronų plazminėje membranoje, susiformavus poroms, yra sutrikdoma jonų homeostazė, ištinka ląstelių žūtis, stebima smegenų atrofija [165].

II. Padengimo efektas. Kai kurie tyrimai teigia, jog didelio dydžio amiloidiniai agregatai gali sąveikauti su membranos paviršiumi, taip sukeldami membranos suplonėjimą ir asimetrinį slėgio pasiskirstymą tarp dviejų sluoksnių [166]. Dėl tokios membranos paviršiaus ir agregatų tarpusavio sąveikos, padidėja membranos pralaidumas mažos molekulės masės dariniams. Šis efektas buvo stebimas Aβ, hIAPP ir insulino fibrilių augimo ant membranos paviršiaus metu [161]. Nors pastaruoju metu yra siūlomas tarpinių, oligomerinių darinių toksiškumas [167], šie duomenys pateikia papildomą mechanizmą, kuriuo amiloidinės fibrilės taip pat galėtų funkcionuoti kaip neurotokiški dariniai.

III. Detergento mechanizmas. Nustatyta, jog tam tikri amiloidiniai baltymai, kaip ir nejoniniai detergentai (pvz.: Triton X-100), sąveikaudami su lipidų dvisluoksniais gali formuoti miceles [8]. Šiuo atveju lipidinė membrana veikia kaip katalizatorius, skatinantis baltymų kaupimąsi ir agregaciją dvisluoksniu paviršiuje. Pradinė baltymų ir membranos sąveika yra skatinama elektrostatinė jėgų, kai peptidai selektyviai prisijungia prie fosfolipidų galvučių membranos paviršiuje. Tuomet baltymai orientuojasi taip, jog jų hidrofilinės sritys būtų nukreiptos į polines fosfolipidų galvutes, o hidrofobiniai regionai orientuoti į hidrofobinę dvisluoksniu šerdį [168], taip mažinant membranos paviršiaus įtempimą ir sukeliant jos fragmentaciją. Jei pažeidžiamas tik išorinis monosluoksniu, membrana suplonėja, tuo tarpu jei pažeidžia įvyko abiejuose sluoksniuose – susidaro skylės [166]. Pažeidžia detergento mechanizmu buvo stebima paveikus lipidų dvisluoksnius hIAPP [169] ir Aβ [170] oligomerais. Tačiau nustatyta, jog ne tik oligomeriniai, bet ir fibriliniai, dariniai gali ardyti dvisluoksnius detergento mechanizmu [161].

IV. Mažos molekulinės masės amiloidinių darinių įsiterpimas į membraną. Manomeriniai ir oligomeriniai dariniai gali įsiterpti į membraną ir, neformuodami porų, sukelti jos pralaidumo padidėjimą. Šis mechanizmas buvo stebimas hIAPP monomerų ir oligomerų, bet ne fibrilių, atveju [171]. Taip pat, tyrimai teigia, jog Tau baltymas gali įsiterpti į anijoninius lipidų monosluoksnius, taip sukeldamas jų morfologijos pokyčius bei sumažindamas lipidų susipakavimo efektyvumą [172].

V. Sąveika su membranos receptoriais. Skirtingos Aβ izoformos gali sąveikauti su neuronų ir glijos ląstelių paviršiaus receptoriais, įskaitant α7 nikotininį acetilcholino (α7nAChR), apolipoproteino E (APOE), mažo tankio lipoproteinų (LDLR), RAGE ir N-metil-D-aspartato (NMDA) receptorius. Tam tikrų receptorių aktyvacija skatina amiloidinių darinių pašalinimą iš smegenų, tuo tarpu kitų – lemia sinapsių praradimą, atminties sutrikimus ir neurotoksiškumą [8].

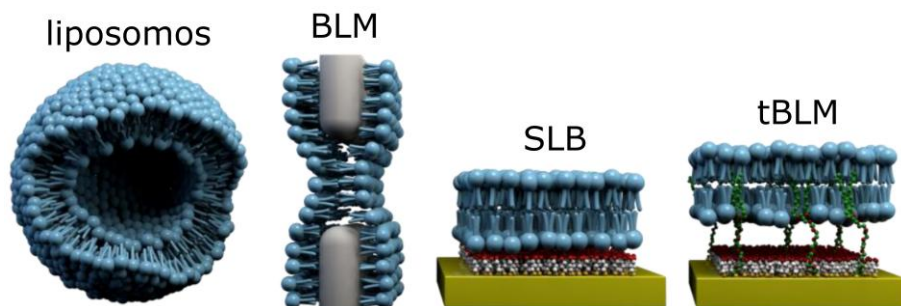
1.4.4. S100 baltymų sąveikos su membranomis

Atsižvelgiant į tai, jog plazminės membranos integralumas yra būtinas įvairių biologinių procesų ir viduląstelinio kalcio homeostazės reguliacijai, o net menkiausi pažeidimai gali sukelti apoptozę [165], S100 baltymų sąveikų su lipidų dvisluoksniais tyrimai pastaruoju metu sulaukė reikšmingo tyrėjų dėmesio. Nepaisant didelio struktūrinio panašumo [69], S100 šeimos nariai pasižymi skirtingais sąveikų su plazmine membrana mechanizmais. Dažniausiai šios sąveikos yra reguliuojamos dvivalenčių katijonų prisijungimo. Tyrimai rodo, jog S100A8/A9 baltymų heterokompleksas su Ca^{2+} surištoje konformacijoje gali prisijungti arachidono rūgštį ir reguliuoti jos metabolizmą organizme. Svarbu paminėti, jog sąveika vyksta tik susidarius funkcionaliam S100A8/A9 heterokompleksui, kadangi pavieniai šio komplekso komponentai afiniškumo riebalų rūgštims neparodė [173]. Taip pat, tyrimai su modelinėmis sistemomis atskleidė, jog apo-S100A8/A9 gali dalinai įsiterpti į cviterjoninius lipidų dvisluoksnius [174]. Sąveika su cviterjoniniais lipidų dvisluoksniais buvo stebima ir S100G baltymo atveju. Nustatyta, jog šis baltymas gali sąveikauti su dodecilo fosfocholino (DPC) micelėmis, o sąveikos specifiškumas yra reguliuojamas Ca^{2+} jonų prisijungimo [9]. Tuo tarpu, S100A12, nepriklausomai nuo dvivalenčių katijonų buvimo aplinkoje, sąveikauja tiek su cviterjoninėmis, tiek su neigiamai įkrautomis membranomis [10]. Kitas S100 šeimos narys – S100A10 – parodė didesnę afiniškumą neigiamai įkrautiems lipidų

dvisluoksniams. Svarbu paminėti, jog šio baltymo konformacija, priešingai nei kitų S100 šeimos narių, nėra reguliuojama Ca^{2+} jonų prisijungimo [11].

1.4.5. Plazminės membranos modelinės sistemos

Ląstelės plazminė membrana – kompleksinė struktūra, todėl jos tyrimams yra pasitelkiamos įvairios modelinės sistemos. Šios sistemos leidžia tirti įvairius biologinius procesus, vykstančius ląsteliniame lygmenyje, suteikdamos informacijos apie ligandų–receptorių sąveikas [175], virusines [176] ir bakterines [177] infekcijas, signalinius kelius [178] bei neurodegeneracijos mechanizmus [179]. Plazminės membranos modeliai gali būti skirstomi į dvi pagrindines grupes: tūriniai (liposomos, juodosios lipidinės membranos) ir ant kietojo paviršiaus suformuoti lipidų dvisluoksniai (1.11 pav.).



1.11 pav. Pagrindinės ląstelės plazminės membranos modelinės sistemos. Atsižvelgiant į tyrimų objektą bei matavimo metodiką, galima pasirinkti įvairaus dydžio bei formos liposomas, juodąsias lipidines membranas (BLM), ant kieto paviršiaus suformuotus lipidų dvisluoksnius (SLB) ir prikabinas dvisluoksnes lipidines membranas (tBLM). Parengta pagal [180].

Liposomos – sferinės formos lipidinės pūslelės – yra vienas pirmųjų sintetinių membranos modelių [181]. Priklausomai nuo struktūros, liposomos gali būti skirstomos į vienasluoksnes (sudarytos iš 1 lipidų dvisluoksniu) ir daugiasluoksnes (≥ 2 lipidų dvisluoksniai). Vienasluoksnių liposomos toliau savo ruožtu gali būti skirstomos į mažas (< 100 nm), didelės (> 100 nm ir < 1 μm) ir labai didelės (> 1 μm). Priklausomai nuo liposomų tipo, jų paruošimui yra taikomi įvairūs metodai, įskaitant elektroformaciją, hidrataciją, sonikaciją, ekstruziją ir kt. [182]. Šios modelinės sistemos, dėl galimybės nesunkiai reguliuoti liposomų skersmenį, kreivumą bei kompoziciją, yra laikomos vienu patogiausių įrankių biomolekulių-membranos sąveikų tyrimams [183]. Dėl savo uždaros dvisluoksnių struktūros, liposomos turi intraluminalinę vandeninę ertmę, kurioje gali būti

įkapsuliuojamos vandenyje tirpios medžiagos [184]. Ši savybė buvo panaudota kuriant vaistų pernašos sistemas [185]. Taip pat, įterpus fluorescuojančius hidrofilinius zondus, gali būti atliekami membranos pralaidumo [186] bei pūslelių susiliejo [184] tyrimai.

1962 m. mokslininkas Mueller sukūrė pirmąją sistemą, skirtą plokštuminio fosfolipidinio dvisluoksnio elektrinių savybių tyrimams [187]. Ši sistema buvo pavadinta juodąja lipidine membrana (BLM). Tokios dvisluoksnės lipidinės membranos yra formuojamos mažoje (1 mm) hidrofobinės medžiagos (polistireno, teflono) kiaurymėje, kai ši medžiaga yra patalpinta tarp dviejų vandeninių tirpalų kamerų [188]. Nuo šių modeliinių sistemų atradimo, jos buvo panaudotos įvairių biofizikinių procesų, įskaitant jonų kanalų formavimosi [189], baltymų [190] ir antibiotikų [191] aktyvumo, tyrimams. Kadangi juodosios lipidinės membranos yra suspenduotos tirpale, yra išvengiama nepageidaujamų sąveikų su kietųjų substratų paviršiais. Dėl šios ypatybės, dideli transmembraniniai baltymai gali lengvai įsiterpti į dvisluoksnį, neapribojant jų mobilumo bei aktyvumo. Tačiau, svarbu paminėti, jog BLM pasižymi trumpa gyvavimo trukme (< 1 val.) [192]. Taip pat, metodų kiekis, pasitelkiamas BLM tyrimams, yra ganėtinai ribotas – dažniausiai naudojami elektrinio laidumo, fluorescencinės ir šviesinės mikroskopijos, matavimai [188,193].

Kita plazminės membranos modelinė sistema – ant paviršiaus suformuoti lipidų dvisluoksniai (SLB), kurie, lyginant su BLM, pasižymi didesniu stabilumu ir platesnėmis detekcijos galimybėmis [188]. SLB formuojami ant švaraus hidrofilinio paviršiaus, o substrato medžiaga parenkama atsižvelgiant į tyrimo metodiką. Silicio ar žėručio pagrindai, dėl didelio paviršiaus lygumo, taikomi atominės jėgos mikroskopijos matavimuose, auksas ir sidabras – paviršiaus plazmonų rezonanso technikoje, silicio dioksidas ir boro silikatinis stiklas – optinėse technologijose, o indžio-alavo oksido (ITO) stiklas, dėl savo aukšto elektrinio laidumo, yra tinkamiausias elektroforezės tyrimams [194]. Vienas lengviausių ir universaliausių būdų suformuoti SLB yra paremtas nedidelio dydžio vienasluoksnių liposomų adsorbcija ir susiliejimu su substrato paviršiumi [195]. Adsorbcijos procesą gali paspartinti divalenčiai katijonai, įskaitant Ca^{2+} ir Mg^{2+} , aukšta temperatūra [196] ir susiliejimą skatinantys agentai (pvz.: polietilenglikolis) [197]. Tokios susiformavusios fosfolipidinės membranos virš substrato paviršiaus yra palaikomos Van der Valso ir elektrostatinių sąveikų [198]. Taip pat, šiai modelinei sistemai būdingas 10–20 Å storio vandens sluoksnis, kuris yra lokalizuotas tarp substrato ir lipidų dvisluoksnio bei atsakingas už membranos takumo palaikymą. Tačiau, svarbu paminėti, jog šis vandens rezervuaras yra per mažas, jog didelės transmembraninės

biomolekulės galėtų laisvai įsiterpti, judėti ir funkcionuoti membranoje, todėl dažniausiai jos sąveikauja su kietu paviršiumi, o tai gali lemti jų denatūraciją [188].

Siekiant dar geriau atkartoti plazminės membranos struktūrines ypatybes ir išvengti anksčiau aptartų modelių sistemų apribojimų, buvo pristatytas prikabinėtų dvisluoksnių lipidinių membranų (tBLM) modelis. Šios dvisluoksnės lipidinės membranos yra formuojamos keliais etapais, pradinis jų – metalinio elektrodo padengimas savitvarkiu monosluoksniu (angl. *self-assembled monolayer*, SAM), sudarytu iš inkarinio junginio bei skiediklio molekulių [199]. Sekančiame žingsnyje, taikant tirpiklio pakeitimo [200] arba liposomų liejimo [201] technologijas, ant SAM paviršiaus yra suformuojamas lipidų dvisluoksnis. Auksu dengtos stiklo plokštelės yra dažniausiai naudojami substratai tBLM formacijai, kadangi šis taurusis metalas pasižymi dideliu atsparumu oksidacijai [202] ir gali būti nesunkiai funkcionalizuojamas tiolio junginiais [177]. Tačiau egzistuoja ir kiti galimi substratai tBLM formavimui, įskaitant silicio (naudojama silano chemija) [203], aliuminio (fosforo rūgšties chemija) [204] ir gyvsidabrio (tiolių chemija) [205] paviršius. Kadangi lipidų dvisluoksnis prie substrato paviršiaus yra pritvirtintas kovalentiniais ryšiais, tokios membranos pasižymi ilgalaikiu stabilumu, galinčiu siekti net iki kelių mėnesių [206]. Taip pat, dėl paviršiaus funkcionalizavimo inkarinėmis molekulėmis, tarp lipidų dvisluoksnio ir substrato yra formuojamas citozolį imituojantis joninis rezervuaras, padedantis išvengti tiesioginio transmembraninių baltymų kontakto su kietuoju paviršiumi, taip išlaikant jų natyvią struktūrą ir funkcionalumą [207]. Tokie, ant elektrodo paviršiaus suformuoti, lipidų dvisluoksniai tapo patogia eksperimentine platforma, tyrimams leidžiančia taikyti ne tik įvairius spektroskopinius, mikroskopinius, bet ir itin jautrius elektrocheminius, metodus [208]. Nuo tBLM atradimo, ši modelinė sistema buvo sėkmingai pritaikyta įvairių membranos integralumą pažeidžiančių agentų (poras formuojančių toksinų, amiloidinių baltymų, antimikrobinių peptidų) mechanizmo tyrimams bei pasiūlyta kaip potenciali platforma kuriant didelio jautrumo elektrocheminio pagrindo biojutiklius [209].

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos ir tirpalai

Baltymai S100A8, S100A9 bei S100A8/A9 buvo išgryninti Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Amiloidų tyrimų sektoriuje pagal anksčiau aprašytą metodiką [116]. Baltymai išgryninti PBS arba HEPES buferiniuose tirpaluose, o jų koncentracija nustatyta spektrofotometru NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher*), matuojant absorbciją ties 280 nm bangos ilgiu. Baltymų koncentracijos tirpale skaičiavimams buvo naudoti moliniai sugerties koeficientai, įvertinti ProtParam (*ExPASy*) programine įranga: 6990 M⁻¹cm⁻¹ (S100A9), 11460 M⁻¹cm⁻¹ (S100A8), 18450 M⁻¹cm⁻¹ (S100A8/A9) [210]. Iki sekančio panaudojimo baltymai laikomi -80 °C temperatūroje.

Junginiai, naudoti savitvarkių monosluoksnių paruošimui: Z 20-(Z-oktadecil-9-eniloksi)-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksatetra-31-konteno-1-tiolis (HC-18), 20-tetradeciloksi-3,6,9,12,15,18,22-heptaoksaheksatrikontano-1-tiolis (WC-14), β-merkaptotetanolis (βME, *Sigma-Aldrich*). Inkariniai junginiai susintetinti David J. Vanderah grupėje pagal anksčiau aprašytą metodiką [199,211].

Dirbtinių membranų paruošimui naudoti lipidai pateikti **2.1 lentelėje**. Visi lipidai buvo ištirpinti arba praskiesti chloroforme, galutinė koncentracija – 10 mM (BTLE atveju – 12 mg/mL). Gauti tirpalai išpilstomi į 4 mL stiklines taras ir, iki sekančio panaudojimo, laikomi šaldiklyje (-20 °C).

2.1 lentelė. Lipidų, naudotų dirbtinių dvisluoksnių lipidų membranų paruošimui, sąrašas. Visi lipidai įsigyti iš *Avanti Polar Lipids*.

Santrumpa	Pilnas pavadinimas
CHOL	Cholesterolis
BTLE	Kiaulės smegenų lipidų ekstraktas
DOPC	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicerio-3-fosfatidilcholinai
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicerio-3-fosfatidilcholinai
DOPS	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicerio-3-fosfo-L-serinas
DOPG	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicerio-3-fosfatidilglicerolis
DOPE	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicerio-3-fosfatidiletanolaminas
bSM	Smegenų sfingomielinas
GM1	Ganglioizidas 1

Druskos ir kitos medžiagos: kalio chloridas (KCl), natrio chloridas (NaCl), kalcio chloridas (CaCl_2), magnio chloridas (MgCl_2), dinatrio fosfatas (Na_2HPO_4), kalio dihidrofosfatas (KH_2PO_4), natrio dihidrofosfato monohidratas ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetano sulfoninė rūgštis (HEPES), geležies (III) chloridas (FeCl_3), acetonas, natrio hidroksidas (NaOH), dimetilsulfoksidas (DMSO), chloroformas (CHCl_3), etanolis ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), 3-aminopropiltrietoksisilanas (APTES), glutaraldehidas, glicinas (Gly), kalceinas, 2-dimetilamino-6-lauroilnaftalenas (Laurdanas), Sephadex G-50, Tioflavinas T (ThT). Minėtos medžiagos įsigytos iš *Sigma-Aldrich*. Azotas (N_2 , *Elme Messer Lit*), Triton X-100 (*Loba Chemie*).

Naudotų tirpalų sudėtys:

- I. Druskų tirpalas* (pH = 4,5): NaCl (0,1 M), NaH_2PO_4 (0,01 M);
- II. Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS)* (pH = 7,2): NaCl (0,137 M), KCl (0,0027 M), Na_2HPO_4 (0,01 M), KH_2PO_4 (0,0018 M);
- III. 10 mM HEPES buferinis tirpalas, papildytas 100 mM NaCl* (pH = 7,4, koreguotas naudojant NaOH);
- IV. 60 mM kalceino tirpalas PBS arba HEPES buferiniame tirpale* (pH = 7,4, koreguotas naudojant NaOH);
- V. 10 mM CaCl_2 arba MgCl_2 tirpalai vandenyje;*
- VI. 7,9 mM Tioflavino T tirpalas vandenyje;*
- VII. 17 mM Laurdano tirpalas DMSO;*
- VIII. 10 % Triton X-100 tirpalas vandenyje;*
- IX. Tirpalai savitvarkių monosluoksnių paruošimui:* HC-18 ir βME (molinis santykis 5,5/4,5) tirpalas etanolyje (tolių koncentracija 0,1 mM); WC-14 ir βME (3/7) tirpalas etanolyje (tolių koncentracija 0,1 mM).

Vandeninių tirpalų paruošimui buvo naudojamas dejonizuotas vanduo (Milli-Q plus, savitoji varža $18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$).

2.2. Metodai

2.2.1. Dirbtinių lipidinių membranų paruošimas

Daugiasluoksnių liposomų (angl. *multilamellar vesicles*, MLV) paruošimas susideda iš kelių pagrindinių etapų: *I.* Chloroforme ištirpinti lipidai, kaip aprašyta **2.1 skyrelyje**, atšildomi iki kambario temperatūros ir sumaišomi reikiamomis proporcijomis; *II.* Tirpiklis garinamas veikiant silpnu azoto srautu 40 min., kol susidaro vienalytė lipidų plėvelė; *III.* Gauta lipidų plėvelė hidratuojama druskų tirpalu (pH = 4,5) ir kruopščiai suspenduojama,

kol gaunamas drumstas, homogeniškas tirpalas. Galutinė lipidų koncentracija suspensijoje yra 1 mM (BTLE atveju – 1,2 mg/mL). **Svarbu:** ThT eksperimentams lipidai buvo suspenduojami PBS (pH = 7,2) arba HEPES buferiniame tirpale (pH = 7,4).

Didelio dydžio **vienasluoksnių liposomų** (angl. *large unilamellar vesicles*, LUV) formavimui reikalingi šie papildomi žingsniai: *IV.* Paruošta MLV suspensija sonikuojama 1 val. ultragarso vonelėje; *V.* Surenkamas mini ekstruderis (*Avanti Polar Lipids*), kurio sudėtyje yra du 100 µm storio poliesterio filtrai ir polikarbonatinė membrana su 100 nm dydžio poromis; *VI.* Liposomų suspensija 21 kartą prastumiama per ekstruderį, palaikant jo temperatūrą aukštesnę už lipidų fazinio perėjimo į skystąją būseną. Visų, darbe naudotų, lipidinių sistemų kompozicijos yra pateiktos **2.2 lentelėje**.

Kalceinu užpildytų LUV paruošimui lipidų plėvelė, gauta po tirpiklio išgarinimo N₂ srove, buvo hidratuota koncentruotu kalceino dažo (60 mM) tirpalu, paruoštu 10 mM HEPES arba PBS buferiniame tirpale. Eksperimentams buvo ruošiamos 2 mM LUV suspensijos. Laisvasis kalceinas buvo atskirtas nuo įkapsuliuotų liposomų dydžio atskyrimo chromatografijos būdu, praleidžiant suspensiją per chromatografinę kolonėlę (*Lenz Laborglas GmbH & Co. KG*), užpildytą Sephadex G-50 sorbentu. Eliucija vykdoma HEPES arba PBS buferiniu tirpalu.

2.2 lentelė. Kompozicijų, tyrime naudotų dirbtinių dvisluoksnių lipidų membranų paruošimui, sąrašas.

Kompozicija	Molinis santykis
BTLE	–
DOPC/CHOL	6/4
DOPC/DPPC	6/4
DOPC/DOPS	6/4
DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1	4,4/2/3/0,5/0,1
DOPC/DOPE/DOPG/CHOL (DOPG 30 %)	2/3/3/2
DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (DOPS 30 %)	2/3/3/2
DOPC/DOPE/DOPS/CHOL*	3/3/2/2
DOPC/DOPE/DOPS/CHOL*	4/3/1/2
DOPC/DOPE/DOPS/CHOL*	4,5/3/0,5/2
DOPC/DOPE/CHOL*	5/3/2

* Pažymėtos kompozicijos naudotos tik 3.3.5.1 skyrelyje aprašytiems tyrimams atlikti.

Ant paviršiaus suformuoti lipidų dvisluoksniai (SLB) buvo formuojami ant hidrofilinio žėručio (IV klasė, *SPI Supplies*) plokštelės

naudojant LUV liejimo technologiją. Klasikiniams atominės jėgos mikroskopijos matavimams skirtų SLB paruošimui buvo naudojama 2 mL talpos celė, prie kurios dugno dvipuse lipnia juosta pritvirtinama žėručio plokštelė. Celė užpildoma 1 mM LUV suspensija druskų tirpale (pH = 4,5). Plokštelė su liposomų tirpalu inkubuojama 1 val., po to lipidų perteklius nuplaunamas PBS buferiniu tirpalu (pH = 7,2).

Greitai gėtos atominės jėgos mikroskopijos matavimams žėručio plokštelė, naudojant nagų laką, priklijuojama prie 1,5 mm skersmens stiklinio laikiklio. Ant švaraus žėručio paviršiaus užlašinamas 1 mM LUV suspensijos lašas (2 μ L) ir inkubuojamas drėgnoje kameroje 10–20 min. Po inkubacijos lipidų perteklius kruopščiai nuplaunamas HEPES buferiniu tirpalu (pH = 7,4).

Prikabintų dvisluoksnių lipidinių membranų (tBLM) paruošimo eiga. Substratai, skirti elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) matavimams, buvo paruošti ant 26 mm $\times$ 76 mm stiklo plokštelių (*Paul Marienfeld GmbH & Co. KG*), naudojant PVD75 magnetroninio garinimo sistemą (*Kurt J. Lesker Co.*). Substratai turėjo 10 nm storio apatinį chromo sluoksnį ir viršutinį 100 nm aukso sluoksnį. Šviežiai užgarintos plokštelės buvo panardintos į 0,1 mM tiolių tirpalą, sudarytą iš inkarinio WC-14 ir skiediklio β ME molekulių, sumaišytų moliniu santykiu 3/7 etanolyje (grynumas – 96,3 %). Ši procedūra buvo atlikta siekiant suformuoti savaime susirenkančius monosluoksnius (SAM). Po 12 val. inkubacijos, mėginiai buvo nuplauti etanoliumi ir džiovinami azoto srove. Aukso paviršiai, su suformuotais SAM, buvo patalpinti į elektrocheminę celę, turinčią 14 nepriklausomų šulinėlių. Kiekvieno šulinėlio paviršiaus plotas siekė 0,16 cm², o maksimalus tūris – 280 μ L. Prikabintos dvisluoksnės lipidinės membranos buvo formuojamos MLV liejimo metodu [201]. Trumpai tariant, į kiekvieną šulinėlį buvo įleista 100 μ L 1 mM MLV suspensijos ir inkubuota 1 val. Po inkubacijos mėginiai buvo nuplauti 5 mL 10 mM HEPES buferiniu tirpalu. Membranoms buvo leista stabilizuotis kambario temperatūroje 30 min., kol bus pasiekta pusiausvyra. Tolimesniems S100 baltymų sąveikų tyrimams buvo atrinktos tik stabiliomis dielektrinėmis savybėmis pasižyminčios tBLM. Eksperimentams su dvivalenčiais katijonais atlikti buvo naudojamas HEPES buferinis tirpalas, papildytas 1 mM arba 100 nM CaCl₂, arba 1 mM MgCl₂.

Klasikinės atominės jėgos mikroskopijos matavimams, šviežiai užgarintos žėručio plokštelės buvo panardintos į 0,1 mM tiolių tirpalą etanolyje, sudarytą iš HC-18 ir β ME (molinis santykis 5,5/4,5). SAM funkcionalizuoti žėručio paviršiai buvo tvirtinami prie matavimui naudojamos celės dugno, kaip aprašyta anksčiau. Celė užpildoma 1 mM MLV suspensija druskų tirpale (pH = 4,5), inkubuojama 1 val. Po inkubacijos liposomų perteklius nuplaunamas 50 mL PBS buferiniu tirpalu (pH = 7,2).

2.2.2. Baltymų struktūriniai tyrimai

S100A8 baltymo antrinės struktūros įvertinimui buvo taikyta **žiedinio dichroizmo** (angl. *circular dichroism*, CD) **spektroskopija**. Šis metodas pagrįstas diferencialine kairės ir dešinės rankos žiedinės poliarizacijos šviesos sugertimi [212]. Matavimai buvo atlikti kambario temperatūroje (22 °C), naudojant J-815 spektrofotometrą (*Jasco*), prieš tai sistemą išvalius azoto srautu. Siekiant įvertinti divalenčių katijonų poveikį baltymo konformacijai, buvo paruošti 20 μM šviežiai išgryninto S100A8 tirpalai 10 mM HEPES buferiniame tirpale (pH = 7,4), pridedant 2 mM CaCl₂ arba MgCl₂. Kontroliniai mėginiai ruošiami be šių pridėtinių katijonų. Matavimai atlikti iš karto po mėginių paruošimo arba po 4 val. inkubacijos kambario temperatūroje. Spektrai buvo registruojami naudojant kvarcinę kiuvetę (optinis kelias – 0,1 cm) 190–260 nm bangos ilgių diapazone, su 0,5 nm duomenų rinkimo intervalu, 1 nm pločio spektrinės juostos plyšiu ir 50 nm/min skenavimo greičiu. Galutiniai spektrai buvo gauti suvidurkinus tris atskirus matavimus ir eliminavus foninę (buferinio tirpalo) sugertį. Spektrų analizė ir vizualizacija atlikta naudojant Spectragryph v1.2.16.1 programinę įrangą [213]. Gautame CD spektre neigiami sugerties minimumai 211–218 nm srityje rodo β-klosčių struktūrą, o neigiami minimumai ties 207 nm ir 220–221 nm bei teigiamas maksimumas ties 193 nm yra būdingi α-spiralinei struktūrai. Be to, neigiamas sugerties signalas ties 225 nm gali būti susijęs su β-linkių formavimusi [214].

Triptofano fluorescencijos spektroskopijos matavimai. Triptofano (Trp) aminorūgščių šoninės grupės yra natūraliai aptinkamos daugumoje baltymų bei pasižymi savaimine fluorescencija. Nustatyta, jog triptofano fluorescencijos emisijos spektro ypatybės stipriai priklauso nuo šios aminorūgšties aplinkos: kai Trp yra veikiamas polinės aplinkos, emisijos maksimumas lokalizuotas ties 350 nm, o hidrofobinėje aplinkoje – ties 310 nm, kas atspindi spektrinį poslinkį į mėlynąją spektro sritį. Be emisijos maksimumo padėties, aplinka taip pat lemia ir fluorescencijos intensyvumą: kvantinė išeiga yra didesnė nepolinėje aplinkoje palyginus su poline [215].

Triptofano fluorescencijos spektroskopijos eksperimentai buvo atlikti kambario temperatūroje (22 °C), naudojant CARY Eclipse fluorescencinį spektrofotometrą (*Varian Inc.*). Matavimams naudota kvarcinio stiklo kiuvetė (optinis kelias – 0,3 cm). Sužadinimo bangos ilgis buvo nustatytas ties 290 nm, siekiant sumažinti galimą tirozino fluorescencijos įtaką. Emisijos spektrai buvo registruojami 300–400 nm diapazone, naudojant 5 nm pločio sužadinimo ir emisijos spektrinės juostos plyšius bei 0,5 s registravimo

trukmę. Matavimai atlikti HEPES buferiniame tirpale (pH = 7,4), naudojant 20 μ M baltymo ir 2 mM MgCl_2 arba CaCl_2 koncentracijas.

2.2.3. Baltymo agregacijos kinetika: ThT fluorescencija

Tioflavinas T (ThT) – benzotiazolo pagrindu sukurtas fluoroformas, laikomas „auksiniu standartu“ baltymų agregacijos tyrimuose. Šis fluoroformas sąveikauja su β -klosčių struktūromis baltymo molekulėje, taip įgaudamas plokštuminę konformaciją, leidžiančią vidinę krūvio pernašą, dėl kurios stebimas reikšmingas fluorescencijos intensyvumo augimas [216]. Tyrimams naudotas ThT buvo ištirpintas dejonizuotame vandenyje, o gautas tirpalas filtruotas per polivinilideno fluorida membraną, kurios porų dydis – 0,22 μ m. Gauta tirpalo sugertis matuojama spektrofotometru UV-1800 (*Shimadzu*) ties 412 nm bangos ilgiu, o koncentracija apskaičiuojama pagal Bero-Lamberto dėsnį (1):

$$A = \epsilon cl \quad (1)$$

kur A – sugertis; ϵ – molinis sugerties koeficientas (ThT – 31600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$); c – molinė koncentracija; l – optinio kelio ilgis.

ThT fluorescencijos intensyvumo augimo kinetika buvo registruojama 37 °C temperatūroje naudojant fluorescencinį spektrofotometrą ClarioStar Plus (*BMG Labtech*). Mėginiai prieš matavimą buvo išpilstomi į 96 šulinėlių mikroplokštelę (*Corning Inc.*). Šulinėliuose baltymo koncentracija buvo 25–100 μ M, ThT koncentracija – 50–200 μ M (baltymo ir ThT santykis – 1/2), o galutinis mėginio tūris – 100 μ L. Liposomų sąlygojamos S100 baltymų agregacijos tyrimuose, lipidų koncentracija mėginyje buvo 500 μ M. ThT fluorescencijos intensyvumas buvo registruojamas kas 5 min., naudojant 440 nm sužadinimo ir 490 nm emisijos filtrus. Sužadinimo ir emisijos spektrinės juostos plyšių plotis – 10 nm. Tarp matavimų mėginiai buvo nuolat maišomi 400 aps./min. greičiu.

2.2.4. Lipidų susipakavimo įvertinimas

Biologinių membranų lateralinis susipakavimas ir fluidiškumas dažnai tiriami naudojant fluorescuojančius zondus, vienas jų – 2-dimetilamino-6-lauroilnaftalenas (Laurdanas). Dėl dipolinės relaksacijos efekto, šis zondas jautriai reaguoja į vandens įsiskverbimą į membraną, kuris tiesiogiai susijęs su lipidų susipakavimu ir membranos takumu. Laurdano emisijos spektro maksimumo vertė yra lokalizuota ties 440 nm, kai membrana

yra skystojoje tvarkingoje fazėje, o perėjus į skystąją netvarkingą fazę, ši reikšmė pasislenka į ilgesnių bangų sritį – apie 490 nm [217].

Tyrimams paruoštos LUV suspensijos buvo sumaišytos su Laurdanu, ištirpintu DMSO. Galutinė lipidų koncentracija mėginyje – 500 μM, Laurdano – 2,5 μM (lipidų ir zondo santykis – 200/1). Paruošti mėginiai buvo inkubuojami 1 val. kambario temperatūroje, tuomet supilstomi į 96 šulinėlių mikroplokštelę. Galutinis mėginio tūris šulinėlyje – 100 μL. Matavimai buvo atlikti naudojant mikroplokštelių skaitytuvą ClarioStar Plus esant skirtingoms temperatūroms: 22, 37 ir 60 °C. Emisijos spektrai buvo registruojami intervale nuo 400 iki 600 nm, naudojant 340 nm sužadinimo bangos ilgį. Sužadinimo ir emisijos spektrinės juostos plyšių plotis – 10 nm.

Svarbu pažymėti, kad vien spektrinių savybių analizė dažnai nėra pakankamai tiksli siekiant įvertinti membranos fazinę būseną, ypač esant kelių fazių koegzistavimui. Todėl papildomai yra taikomi įvairūs kiekybiniai rodikliai, iš kurių vienas dažniausiai naudojamų yra bendrosios poliarizacijos (angl. *generalized polarization*, GP) parametras, apskaičiuojamas pagal formulę (2):

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (2)$$

čia I_{440} ir I_{490} – fluorescencijos emisijos intensyvumai, užregistruoti prie bangos ilgių 440 ir 490 nm, atitinkamai. Teoriškai GP vertė gali svyruoti nuo 1 iki –1; tačiau realiose lipidinėse sistemose ji retai pasiekia šias kraštutines reikšmes ir dažniausiai kinta nuo 0,6 (atitinka skystąją tvarkingą fazę, L_o) iki –0,1 (atitinka skystąją netvarkingą fazę, L_d). Tarpinės GP reikšmės gali rodyti dviejų fazių koegzistavimą [218]. Kadangi šiame darbe buvo atlikti spektroskopiniai matavimai, nustatytos GP vertės atspindi suvidurkintą visos sistemos būvį, be erdvinio fazių pasiskirstymo detalių, kurios galėtų būti nustatomos mikroskopiniais metodais.

2.2.5. Liposomų integralumas: kalceino išlaisvinimo kinetika

Vienas paprasčiausių membranos integralumo įvertinimo metodų yra fluorescuojančio dažo išlaisvinimo iš liposomų detekcija. Vandenyje tirpus fluoroforas kalceinas yra ypač tinkamas membranos pažeidų tyrimams, kadangi aukšta jo koncentracija liposomų intraluminalinėje erdvėje lemia savaiminį fluorescencijos gesinimą. Tačiau membranai suirus ir kalceinui patekus į išorinę terpę, fluorescencijos intensyvumas ženkliai padidėja [219]. Per chromatografinę kolonėlę nuo laisvojo kalceino atskirtos LUV po 50 μL išpilstomos į 96 šulinėlių mikroplokštelę. Plokštelė dedama į mikroplokštelių

skaitytuvą ClarioStar Plus, po to 20 min. matuojama bazinė fluorescencijos linija. Sustabdžius matavimą, į šulinėlius išpilstomi iš anksto paruošti baltymo tirpalai. Galutinė lipidų koncentracija šulinėlyje – 100 μM (BTLE – 120 $\mu\text{g/ml}$), baltymo koncentracija – 5 arba 10 μM (baltymo/lipido molinis santykis 1/20 arba 1/10), matavimo tūris – 100 μL . Fluorescencijos intensyvumas buvo registruojamas kas 10 min., naudojant 490 nm sužadinimo ir 540 nm emisijos filtrus. Sužadinimo ir emisijos spektrinės juostos plyšių plotis – 8 nm. Tarp matavimų mėginiai buvo nuolat maišomi 400 aps./min. greičiu. Visi matavimai buvo atlikti kambario (22 $^{\circ}\text{C}$) arba 37 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Kiekvieno matavimo pabaigoje maksimali išeiga buvo nustatyta liposomas suardžius su Triton X-100 (galutinė detergento koncentracija tirpale – 1 %). Kalceino išlaisvinimas iš liposomų buvo įvertintas pagal formulę (3):

$$\% \text{ Dažo išlaisvinimas} = \frac{(I - I_0)}{(I_{\max} - I_0)} \times 100 \quad (3)$$

kur I_0 – pradinė fluorescencijos intensyvumo vertė prieš baltymo pridėjimą; I – fluorescencijos intensyvumo vertė nurodytu laiko momentu; $I_{\max}$ – fluorescencijos intensyvumo vertė po LUV suardymo Triton X-100.

Lygiagrečiai kalceino išlaisvinimo iš S100 baltymais paveiktų liposomų matavimų, buvo registruojama ir savaiminio dažo išlaisvinimo iš kontrolinių LUV kinetika. Kadangi liposomos yra metastabilios struktūros, siekiant tiksliai įvertinti baltymų poveikį, apskaičiuotos kalceino išlaisvinimo vertės iš baltymais paveiktų LUV buvo koreguotos, atimant tuo pačiu laiko momentu įvertintas bei suvidurkintas ($n = 4$) dažo išlaisvinimo iš kontrolinių LUV vertes.

2.2.6. Krio-transmisijos elektronų mikroskopija

Liposomų morfologija prieš ir po poveikį S100A8/A9 heterokompleksu buvo analizuojama naudojant krio-transmisijos elektronų mikroskopiją (TEM). Vizualizacijai buvo paruošti dviejų tipų mėginiai: *I.* kontrolinės LUV (2 mM) HEPES buferiniame tirpale (pH = 7,4) ir *II.* LUV (2 mM), kurios prieš matavimą buvo 30 min. inkubuotos su S100A8/A9 (10 μM). Tuomet po 5 μL paruoštų mėginių buvo užlašinta ant anglies plėvele dengto varinio tinklelio (*Agar Scientific*) ir inkubuota 1 min. Skysčio perteklius buvo pašalintas filtravimo popieriumi, po to ant tinklelio užlašinta 5 μL 1 % uranilacetato tirpalo ir mėginys dar kartą inkubuotas 1 min. Nusausinus tinklelį, buvo atlikti trys plovimai distiliuotu vandeniu (po 5 μL

kiekvienam plovimui). Vaizdinimui naudotas krio-transmisijos elektronų mikroskopas Talos L120C (*Thermo Fisher*), veikiantis 120 kV įtampa ir aprūpintas Ceta CMOS 4k × 4k kamera. Mėginių vizualizaciją atliko dr. Darius Šulskis (Biotechnologijos institutas, Gyvybės mokslų centras).

2.2.7. Dinaminės šviesos sklaidos metodas

Dinaminės šviesos sklaidos (DLS) matavimai buvo atlikti naudojant Malvern Zetasizer μ V (*Malvern Panalytical*) prietaisą su 830 nm bangos ilgio lazerio šaltiniu. Eksperimentuose naudotos 2,5 mL talpos polistireno kiuvetės, baltymo arba LUV koncentracija matavimo tirpale siekė 100 μ M, matavimo tūris – 1 mL. Matavimai buvo atliekami 22 °C temperatūroje, registruojant išsklaidytą šviesą 90° kampu. Surinkti duomenys buvo analizuojami naudojant Malvern Zetasizer programinę įrangą (versija 6.30). Darbe pateikiamos išmatuotų darinių vidutinio skersmens ir polidispersiškumo (PD) vertės. Polidispersiškumas – tai bematis parametras, apibūdinantis dalelių dydžio variaciją sistemoje. Jis yra apskaičiuojamas pagal formulę (4):

$$PD = \left(\frac{SD}{D} \right)^2 \quad (4)$$

kur SD – standartinis nuokrypis, D – vidutinis dalelių skersmuo. Mėginiai yra laikomi monodispersiniais, jei $PD \leq 0,1$ [220].

2.2.8. Elektrocheminio impedanso spektroskopija

2.2.8.1. Metodo principas

Elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS) – tai metodas, skirtas tirti sistemos atsaką į kintamosios elektros srovės arba įtampos poveikį. Nuolatinės srovės atveju elektrolitų tirpalams taikomas Omo dėsnis (5), kuris apibrėžia laidininko gebėjimą priešintis srovės tekėjimui grandine:

$$R = \frac{U}{I} \quad (5)$$

kur R – laidininko varža, matuojama omais (Ω), U – įtampa, matuojama voltais (V), I – srovės stipris, matuojamas amperais (A).

Nors šis dėsnis yra gerai žinomas, jis taikomas tik idealiems atvejams, kai: *I.* srovės atsakas į suteiktą potencialą yra tiesinis; *II.* sistemos varžos vertė nepriklauso nuo dažnio; ir *III.* srovė bei įtampa yra vienodoje fazėje. Tačiau

realiame pasaulyje elektrocheminės sistemos pasižymi daug sudėtingesne elgsena, todėl vietoj varžos naudojamas bendresnis elektrinės grandinės parametras – impedansas arba kompleksinė varža. Skirtingai nei varža, impedansas nėra ribojamas minėtų sąlygų ir aprašomas lygtimi (6):

$$Z = \frac{U(\omega)}{I(\omega)} \quad (6)$$

čia Z – sistemos impedansas, matuojamas Ω , $U(\omega)$ – nuo dažnio priklausoma įtampa (V), $I(\omega)$ – nuo dažnio priklausomas srovės stipris (A).

EIS matavimai paprastai atliekami naudojant mažos įtampos (1-10 mV) sužadinimo signalą. Taip užtikrinama, kad sistemos atsakas būtų pseudotiesinis. Tiesinėje (arba pseudotiesinėje) sistemoje išmatuotas srovės atsakas pasižymės tuo pačiu dažniu kaip ir įvesties signalas tik bus pasislinkęs per fazės kampą (φ) bei turės kitokią amplitudę [221] (**2.1 pav.**). Potenciostatinės EIS atveju, sužadinamo signalas, kaip funkcija nuo laiko, gali būti išreiškiamas lygtimi (7):

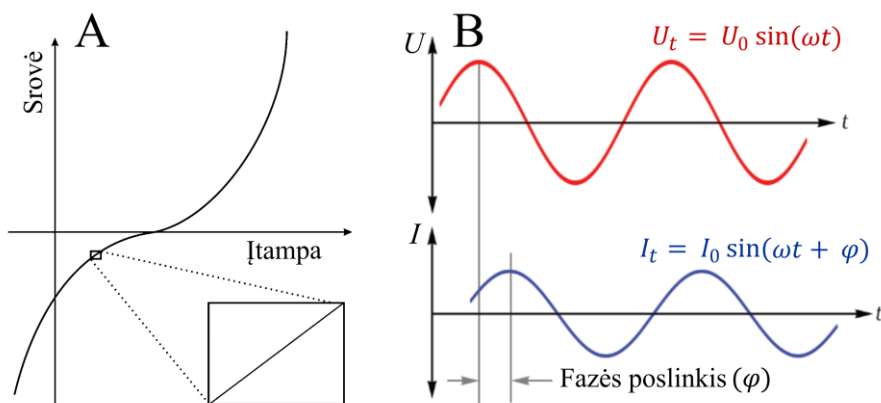
$$U_t = U_0 \sin(\omega t) \quad (7)$$

čia U_t – įtampa laiko momentu t , U_0 – įtampos signalo amplitudė, ω – kampinis dažnis, matuojamas radianais per sekundę (rad/s).

Išmatuotas srovės atsakas gali būti išreiškiamas lygtimi (8):

$$I_t = I_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (8)$$

čia I_t – srovės atsakas laiko momentu t , I_0 – srovės signalo amplitudė, ω – osciliuojančios sinusoidinės bangos kampinis dažnis, φ – fazės poslinkio kampas ($^\circ$).



2.1 pav. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos principai. (A) Kreivė, rodanti srovės stiprio priklausomybę nuo įtampos. Paveiksle pažymėtas tiesinis intervalas, kuriame yra atliekami EIS matavimai. (B) Sinusoidinės kintamos srovės atsakas į suteiktą potencialą tiesinėse sistemose. Parengta pagal [222].

Nustatyta, jog padengus elektrodą plonu lipidinių molekulių sluoksniu ir sumaišius jį su elektrolito tirpalu, sistema pradeda veikti kaip plokščiasis kondensatorius. Kondensatorius yra elektrinis komponentas, kuris kaupia elektros energiją, sukuriant elektrinį lauką tarp dviejų laidininkų, atskirtų nelaidžia terpe, vadinama dielektriku. Membranos atveju organinis fosfolipidų sluoksnis veikia kaip dielektrikas. Tokios sistemos kompleksinis impedanso atsakas gali būti išreikštas lygtimi (9):

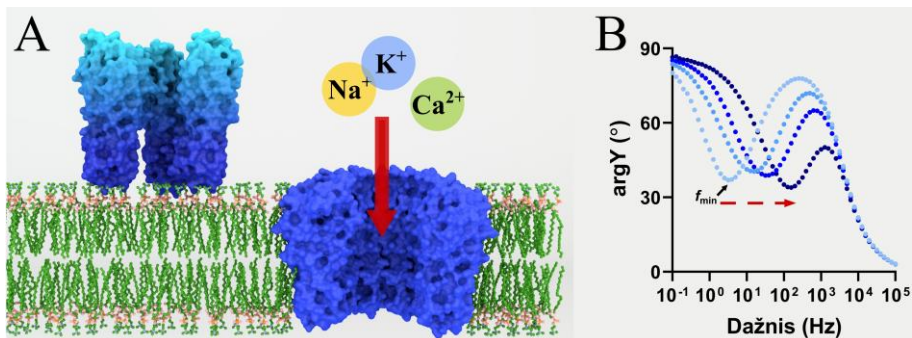
$$Z = \frac{1}{j\omega C} \quad (9)$$

čia j – menamasis vienetas, lygus $\sqrt{-1}$, ω – kampinis dažnis (rad/s), C – dielektrinio sluoksnio talpa (F).

Norint kiekybiškai įvertinti lipidų dvisluoksnio pažeidimo mastą baltymais, dažniausiai naudojamas parametras, vadinamas admitansu, arba paprasčiausiai laidumu [223]. Admitansas (Y) yra elektrocheminiam impedansui priešingas dydis, matuojamas simensais (S) ir išreiškiamas lygtimi (10):

$$|Y| = \frac{1}{|Z|} \quad (10)$$

Elektrocheminio impedanso spektroskopijos duomenų atvaizdavimui gali būti pasitelkiami įvairūs metodai, pagrindinis jų – Bode grafikai. Bode grafikuose vaizduojama impedanso absoliuti vertė ($|Z|$) arba fazės kampas ($\arg Y$) kaip funkcija nuo dažnio. Esant šiam grafiniam atvaizdavimui, žemų dažnių diapazone stebimas impedanso fazės minimumo taškas ($f_{\min}$), kurio padėtis gali būti naudojama membranos defektų tankiui įvertinti [224]. Nustatyta, jog vykstant lipidų dvisluoksnio pažeidai citolitiniais peptidais, pasikeičia jonų judėjimas per jį. Šis efektas yra lydimas spektrinių pokyčių, kurių metu $f_{\min}$ taško pozicija pasislenka į didesnių dažnių sritį [225] (**2.2 pav.**).



2.2 pav. Membranos pažaidos įvertinimas elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu. Defektų susidarymas membranoje yra siejamas su dvisluoksnio laidumo pokyčiais (A), kurie atspindi Bode spektruose (B). Parengta pagal [226].

2.2.8.2 Matavimo eiga

Elektrocheminio impedanso spektroskopijos matavimai buvo atlikti naudojant PalmSens4 elektrocheminę darbo stotį kartu su PSTrace 5.9 programine įranga (*PalmSens BV*). Spektrai buvo registruojami nuo 0,1 Hz iki 100 kHz dažnių diapazone, naudojant 10 logaritmiškai paskirstytų matavimo taškų kiekvienoje dekadėje. Sužadinimo signalo amplitudė buvo 10 mV. Visi matavimai atlikti kambario temperatūroje (22 °C) HEPES buferiniame tirpale. Siekiant užtikrinti rezultatų patikimumą, matavimai kartoti tris kartus.

Matavimų metu auksu dengta stiklo plokštelė funkcionavo kaip darbinis elektrodas, o 1,5 mm skersmens sidabro viela (*Sigma-Aldrich*) buvo naudojama kaip palyginamasis–pagalbinis elektrodas. Prieš naudojimą sidabro viela buvo 30 sekundžių veikiamą 50 mM geležies (III) chlorido tirpalu. Elektrodo validacija buvo atliekama matuojant potencialų skirtumą 3 M KCl tirpale ir lyginant su Ag/AgCl etaloniniu elektrodu, užpildytu 3 M KCl tirpalu (*Sigma-Aldrich*). Elektrodas buvo laikomas tinkamu naudoti, jei potencialo skirtumas neviršijo 0 ± 20 mV. tBLM laidumas buvo apskaičiuotas iš elektrocheminio impedanso spektrų pagal lygtį $Y_{\min} = 1/Z_{\min}$, kur $Z_{\min}$ – impedanso modulis, išmatuotas fazės minimumo taške ($f_{\min}$).

Defektų tankio pasiskirstymo membranoje įvertinimui buvo pasitelktas Vilniaus universiteto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje išvystytas EIS spektrų analizės įrankis tblm–dash [227]. Taikyta metodika remiasi prielaida, kad membranos paviršius sudarytas iš sričių, kuriose defektai išsidėsto idealiais heksagonų tinkeliais, tačiau defektų tankis skirtingose membranos srityse gali skirtis. EIS spektrų bioinformatinė analizė buvo atlikta remiantis anksčiau aprašytais tyrimais [224,228]. Baltymų

sukeltų defektų spindulys (r_0) ir laidumas buvo nustatyti ties 25,9 nm ir 50 pS, atitinkamai. Nors atominės jėgos mikroskopijos būdu įvertinta r_0 vertė gali turėti paklaidų dėl adatos-mėginio konvoliucijos (sąsukos) efekto, šie netikslumai minimaliai veikia modelio kokybę bei defektų tankio pasiskirstymą [228]. Pomembraninio sluoksnio savitoji varža (ρ_{sub}) buvo laikoma lygi $10^{4.5} \Omega$, o šio sluoksnio storis (d_{sub}) nustatytas ties $\sim 1,8$ nm, remiantis neutronų reflektometrijos eksperimentais [229].

Bioinformatinės analizės metu gautus duomenis galima atvaizduoti defektų tankio pasiskirstymo kreivėmis, kurių X ašyje yra pateikiamos lokalaus defektų tankio membranoje vertės, o Y ašyje – tikimybės tankis. Kreivėse stebimi maksimumai atitinka didžiausio tikimybės tankio regionus – tai reiškia, kad pagrindinė membranos paviršiaus dalis bus padengta atitinkamo tankio defektais. Tikimybę (P), kad membranos paviršiuje bus rastas regionas, kurio defektų tankis pakliūs į konkretų intervalą $[N1, N2]$ galima išreikšti lygtimi (11):

$$P = \int_{N1}^{N2} P(N_{def}) dN_{def} \quad (11)$$

kur N_{def} – lokalus defektų tankis vienoje membranos zonoje, $P(N_{def})$ – defektų tankio pasiskirstymo funkcija. Jei $N1 = 0$, o $N2 = \infty$, tuomet $P = 1$.

Vidutinis defektų tankis ($\langle N_{def} \rangle$) gali būti apskaičiuojamas iš defektų tankio pasiskirstymo funkcijos pagal formulę (12):

$$\langle N_{def} \rangle = \int_0^{\infty} P(N_{def}) N_{def} dN_{def} \quad (12)$$

2.2.9. Atominės jėgos mikroskopija

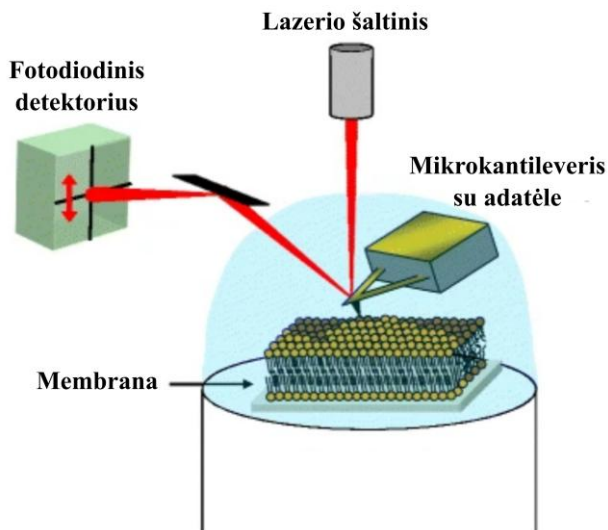
2.2.9.1. Metodo principas

Šiame darbe, baltymų ir lipidinių membranų tarpusavio sąveikų vizualizacijai, buvo taikytas atominės jėgos mikroskopijos (AJM) metodas. AJM, priešingai nei kiti mikroskopijos tipai, yra paremtas mechaninių sąveikų tarp zondo ir mėginio paviršiaus registravimu [230]. Zondas, naudojamas AJM matavimų metu, susideda iš trijų pagrindinių komponentų: atraminės pagrindo medžiagos, lankstaus mikrokantileverio bei jo gale esančios adatėlės. Mikrokantileveris yra padengtas šviesą atspindinčia medžiaga, o į jo galiuką yra fokusuojamas lazerio spindulys, kuris atsispindi į fotodiodinį detektorių (2.3 pav.). Vykstant mėginių vizualizacijai, zondas juda išilgai mėginio paviršiaus, o šio proceso metu, pakitus sąveikos jėgoms tarp adatėlės

ir analitės, mikrokantileveris išlinksta. Mikrokantileverio išlinkimus fiksuoja fotodiodinis detektorius, kadangi pasikeičia lazerio atspindžio padėtis jame. Lazerio atspindžio padėties fotodetektoriuje pokyčiai yra proporcingi mikrokantileverio deformacijai, o ši informacija yra naudojama trimačiam mėginio paviršiaus vaizdui generuoti [231]. Pažymėtina, jog mikrokantileveris yra traktuojamas kaip spyruoklė, o jėga, veikianti tarp adatos ir paviršiaus, gali būti apibūdinama remiantis Hooke dėsniu (13):

$$F = k \times \Delta \quad (13)$$

kur F – jėga, veikianti tarp adatos ir paviršiaus, k – mikrokantileverio lankstumo konstanta, Δ – mikrokantileverio deformacija [232].



2.3 pav. Atominės jėgos mikroskopijos veikimo principas. Parengta pagal [233].

AJM, lyginant su kitais mikroskopijos tipais (fluorescencine, elektronų mikroskopija) turi keletą reikšmingų pranašumų: *I.* Šis metodas leidžia generuoti aukštos raiškos trimatį mėginio vaizdą. Vaizdų skiriamoji geba vertikalia kryptimi gali siekti 0,1 nm, lateralinė skiriamoji geba yra nm skalėje; *II.* Yra nedestruktyvus metodas, tinkamas mėginių vizualizacijai vakuume, ore ar net skystyje. Dėl šios priežasties biologiniai mėginiai gali būti analizuojami buferiniame tirpale, išlaikant jų natyvią konformaciją; *III.* Nereikalauja specialaus mėginio paruošimo (pvz.: dehidratacijos, dažymo, šaldymo); *IV.* Naudojant greitaeigę AJM galima stebėti pavienių molekulių dinamiką realiuoju laiku; *V.* Be topografijos vaizdų, galimas ir mėginio nanomechaninių savybių įvertinimas [234].

Yra išskiriami trys pagrindinis AJM veikimo režimai: nekontaktinis, kontaktinis ir tapšnojimo [235]:

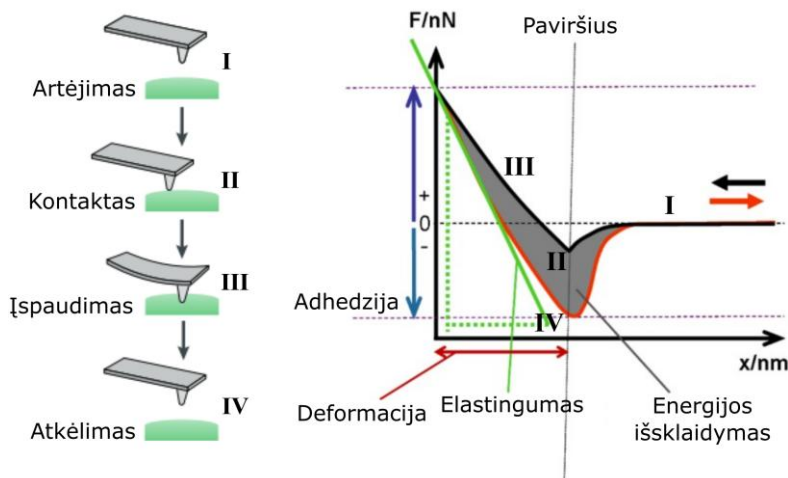
I. Nekontaktiniame režime mikrokantileveris yra virpinamas netoli savo rezonansinio dažnio esant < 10 nm amplitudei, o adata tiesiogiai nesiliečia su mėginio paviršiumi. Pagrindinis šio režimo trūkumas – sudėtingas matavimas atmosferos sąlygomis, kadangi mėginio paviršiuje susidaro plonas vandens sluoksnis, tarp kurio ir adatos veikia kapiliarinės jėgos, todėl adata gali prilipti prie paviršiaus.

II. Kontaktinis režimas – tai dažniausiai naudojamas AJM režimas, kuriame adata tiesiogiai liečiasi su mėginio paviršiumi, o tarp jų vyrauja atostūmio jėgos. Nors kontaktinis AJM režimas leidžia pasiekti itin aukštą – net atominę – skiriamąją gebą, jis nėra tinkamas minkšties biologiniams mėginiams vizualizuoti, nes nuolatinis adatos kontaktas su paviršiumi gali sukelti mechaninius pažeidimus.

III. Tapšnojimo režime mikrokantileveris virpinamas arti savo rezonansinio dažnio, o jo svyravimo amplitudė paprastai siekia 20 – 100 nm. Periodiškai liečiant paviršių yra užtikrinama aukšta skiriamoji geba, tačiau po kiekvieno prisilietimo adata pakeliama, taip išvengiant brūkštelėjimo per mėginį. Vienas iš pagrindinių tapšnojimo režimo pranašumų yra tai, kad jis padeda išvengti trinties, adhezijos ir kitų kontaktiniame režime pasireiškiančių problemų. Be to, šis metodas vienu metu generuoja du skirtingus vaizdus: aukščio ir fazės. Fazės vaizdinimas leidžia atskleisti medžiagų cheminių ir fizikinių savybių skirtumus, tokius kaip adhezija, trintis ir viskoelastingumas [236]. PeakForce QNM yra patobulinta klasikinio tapšnojimo režimo versija, pristatyta 2010 m. Šis metodas suteikia galimybę tiksliai kontroliuoti maksimalią kontakto jėgą tarp zondo ir mėginio, todėl yra ypač tinkamas itin aukštos skiriamosios gebos vaizdinimui, ypač biologiškai minkšties mėginiams [237].

Nors AJM dažniausiai siejama su paviršiaus vizualizacija, svarbu paminėti, jog ji taip pat yra plačiai taikoma mėginių nanomechaninių savybių tyrimui. Nanomechanikos matavimai paremti vienu esminiu žingsniu – adatos nuleidimu prie paviršiaus ir jos atkėlimu. Šio proceso metu nustatomas adatos poslinkis ir jėga, veikianti tarp adatos bei mėginio, o šiuos duomenis atvaizduojant X ir Y koordinatėse, gaunama jėgos kreivė (**2.4 pav.**) [238]. Pradiniame etape (I) adata yra nutolusi nuo paviršiaus, todėl tarp jų neveikia jokios jėgos. Adatai artėjant prie paviršiaus, ima veikti traukos jėgos, tokios kaip Van der Valso, elektrostatinės ar kapiliarinės sąveikos. Kai šios jėgos ima dominuoti, adata staigiai pritraukiama prie paviršiaus (II). Tuomet adata toliau spaudžiama į mėginį iki nustatytos maksimalios jėgos (III), o šiame etape tarp zondo ir paviršiaus dominuoja trumpojo nuotolio atostūmio jėgos. Galiausiai, adata palaipsniui atitraukiama, kol pasiekiamas atsiskyrimo taškas (IV), nusakantis sąveikos tarp adatos ir paviršiaus stiprumą. Funkcionalizavus AJM

zondus, šis kreivės regionas gali būti naudojamas tarpmolekulinių ir tarpląstelių sąveikų stiprumui, taip pat baltymų išsivyniojimo procesams, tirti. Matuojant jėgos kreives kiekviename mėginio taške, lygiagrečiai topografijos vaizdams galima generuoti ir paviršiaus nanomechaninių savybių žemėlapius [239].



2.4 pav. Mėginio nanomechaninių savybių įvertinimas AJM metodu. Adata yra spaudžiama į mėginį, kol pasiekama maksimali nustatyta jėga, po to atitraukiama (juoda – priartėjimo kreivė, raudona – atitraukimo kreivė). Parengta pagal [238].

Jėgos kreivių analizė leidžia įvertinti įvairius mėginio parametrus, tokius kaip adhezija, deformacija ir elastingumas. Pastarąjį apibūdina Jungo modulis, rodantis medžiagos atsparumą deformacijai – kuo jo vertė didesnė, tuo standesnis mėginys. Jungo modulis apskaičiuojamas iš kontakto su paviršiumi zonos (III), taikant vieną iš kontakto mechanikos modelių [234]. Praktikoje Jungo modulio apskaičiavimui dažniausiai taikomas Hertzo modelis, aprašomas lygtimi (14):

$$F = \frac{4E}{3(1-\nu^2)}\sqrt{R}\delta^{\frac{3}{2}} \quad (14)$$

kur F – jėga, veikianti tarp adatos ir mėginio, E – Jungo modulis, ν – Poissono santykis (biologiškai minkštiems mėginiams $\nu = 0,5$), R – adatos galiuko spindulys, δ – adatos įdubimas į paviršių [231].

2.2.9.2 Topografijos vaizdų gavimas klasikine AJM

I. Baltymo morfologijos charakterizavimas ore. Mėginys užlašinamas ant šviežiai nuplėšto atomiškai lygaus hidrofilinio žėručio paviršiaus, inkubuojamas 2–3 minutes, nuplaunamas dejonizuotu vandeniu ir

nudžiovinamas azoto srove. Prieš matavimus plokštelės apatinė dalis priklijuojama prie magneto dvipuse lipnia juosta. Matavimams ore buvo naudojami TESP-V2 (adatos galiuko spindulys – 7 nm, lankstumo konstanta ore – 37 N/m) ir FESP-V2 (adatos galiuko spindulys – 8 nm, lankstumo konstanta ore – 2,8 N/m) stačiakampio formos zondai (*Bruker*). Matavimai atlikti kambario temperatūroje, naudojant Dimension Icon (*Bruker*) AJM sistemą, veikiančią tapšnojimo režimu. Matavimo plotas $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ arba $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, matavimo greitis – nuo 0,6 iki 0,8 Hz, raiška – 512×512 pikselių.

II. Baltymo sąveikos su lipidinėmis membranomis tyrimai atliekami 2 mL talpos celėje, užpildytoje PBS buferiniu tirpalu (pH = 7,2). Eksperimentams naudoti dviejų tipų membranų modeliai: SLB ir tBLM, paruošti kaip aprašyta **2.2.1 skyrelyje**. Matavimams skystoje terpėje naudojami SNL-C trikampio formos zondai (adatos galiuko spindulys – 25 nm, lankstumo konstanta skystyje – 0,4 N/m) (*Bruker*). Topografinių vaizdų gavimui pasirinktas tapšnojimo arba PeakForce QNM režimas. Matavimo plotas $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ arba $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, greitis – nuo 0,3 iki 0,5 Hz, raiška – 512×512 pikseliai. Gauti vaizdai apdoroti WSxM 4.0 Beta 9.3 programine įranga [240]. Aukščio pasiskirstymo analizė bei vidutinio paviršiaus šiurkštumo (R_a) skaičiavimai atlikti naudojantis NanoScope Analysis (*Bruker*) programine įranga (versija 1.4).

2.2.9.3 Greitaeigės AJM matavimai

Greitaeigės atominės jėgos mikroskopijos (HS-AJM) nuotraukos buvo užfiksuotos naudojant SS-NEX (*RIEM*) mikroskopą, dirbantį tapšnojimo režimu. Matavimams buvo naudojami Si_3N_4 stačiakampio formos zondai (BL-AC10DS-A2, *Olympus*), kurių adatos galiuko spindulys yra 24 nm, lankstumo konstanta – 0,1 N/m, o rezonansinis dažnis skystyje – apie 0,5 MHz. S100A8 arba S100A8/A9 baltymai nepertraukiamo matavimo metu buvo įleisti į celę, užpildytą 10 mM HEPES buferiniu tirpalu (pH = 7,4). Visi matavimai buvo atlikti kambario temperatūroje (22 °C), galutinė baltymo koncentracija celėje siekė 10 μM . Matavimo greitis – viena nuotrauka per 5 s, skiriamoji geba – 200×200 pikseliai. Duomenų analizė buvo atlikta naudojant NanoLocz 1.20 programinę įrangą [241].

2.2.9.4 Jėgos spektroskopijos matavimai

Prieš kiekvieną jėgos spektroskopijos matavimą buvo atliekama zondu kalibracija. Pirmiausia, ore matuojant kalibracinę titano plokštelę

(Bruker), buvo įvertintas adatos galiuko spindulys. Tuomet, matavimo terpėje, stiklo paviršiuje buvo išmatuojama jėgos kreivė ir apskaičiuojamas mikrokantileverio atsilenkimo jautrumas (angl. *deflection sensitivity*). Galiausiai, matuojant mikrokantileverio laisvuosius virpesius, buvo nustatyta lankstumo konstanta.

Lipidų dvisluoksnių nanomechaninių savybių tyrimui buvo naudojamas PeakForce QNM tapšnojimo režimas. Matavimai atlikti kambario temperatūroje, naudojant SNL-C adatas. Dvisluoksio storio ir pralaužimo jėgos įvertinimui buvo taikoma funkcija „Ramp“, kai adata į mėginį įsmeigiama 7–35 nN maksimalia jėga. Jungo modulio įvertinimui per matavimo plotą buvo išsaugomos 4–5 eilės jėgos kreivių. Jėgos kreivės buvo matuojamos kiekviename vaizdo taške, mėginį veikiant 0,5 nN jėga. Jėgos kreivių analizė atlikta naudojant NanoScope Analysis v1.4 (Bruker) programinę įrangą. Jungo modulis apskaičiuotas 10–70 % jėgos kreivės ribose, taikant Hertzo modelį.

Sąveikų tarp S100 baltymų nustatymui buvo naudojami funkcionalizuoti zondai. Zondo funkcionalizavimas vyko keliais etapais: *I.* Pirmiausia, FESP-V2 zondai 30 min. veikiami UV spinduliuote, o vėliau inkubuojami acetone 5 min.; *II.* Adata silanizuojama 2 % 3-aminopropiltrietoksisilano (APTES) tirpale 10 min., tuomet kruopščiai praplaunama dejonizuotu vandeniu; *III.* Zondas įmerkiamas į 0,5 % glutaraldehido tirpalą ir inkubuojamas 30 min., po ko dar kartą praplaunamas dejonizuotu vandeniu; *IV.* Sekančiame etape adata inkubuojama 1,5 μM baltymo tirpale 1 val.; *V.* Po baltymo imobilizacijos, perteklinės glutaraldehido grupės blokuojamos inkubuoiant zondą 10 mM glicino tirpale 1 val. Iki sekančio naudojimo funkcionalizuoti zondai buvo laikomi 4 °C temperatūroje PBS buferiniame tirpale (pH = 7,2). Žėručio plokštelės funkcionalizuotos adsorbuojant S100 baltymus ant paviršiaus, kaip aprašyta **2.2.9.2 skyrelyje**. Jėgos kreivės buvo matuojamos ore, naudojant funkciją „Ramp“, 500 nm/s greičiu, paviršių veikiant maksimalia 10 nN jėga. Tarp molekulinį sąveikų stiprumas buvo įvertintas pagal adhezijos zoną adatos atitraukimą nuo paviršiaus atspindinčioje kreivėje, kaip parodyta **2.4 pav.**

2.3 Bioinformatinė analizė

S100A8 ir S100A9 baltymų aminorūgščių sekų hidrofobiškumas ($\langle H \rangle$), hidrofobinis momentas ($\langle \mu H \rangle$) ir bendras krūvis (z) buvo apskaičiuoti naudojant Heliquest serverį [242]. Gauti rezultatai pavaizduoti

Eisenbergo grafike [243], kuriame skirtingi segmentai klasifikuojami pagal jų hidrofobiškumo savybes: *I.* Žemos $\langle H \rangle$ ir $\langle \mu H \rangle$ reikšmės rodo hidrofilinius segmentus, orientuotus į vandeninę terpę; *II.* Didelės $\langle \mu H \rangle$ ir vidutinės arba didelės $\langle H \rangle$ reikšmės būdingos amfipatiniams regionams, galintiems sąveikauti su lipidiniu dvisluoksniu. Tokie segmentai dažniausiai orientuojasi lygiagrečiai membranos paviršiui. Jie identifikuojami Eisenbergo grafike kaip sritys, kuriose hidrofobiškumo reikšmės yra virš linijos, apibrėžtos lygtimi $\langle \mu H \rangle = 0,645 - 0,324(\langle H \rangle)$; *III.* Žemas $\langle \mu H \rangle$ ir didelis $\langle H \rangle$ nurodo segmentus, įsiterpusius į lipidų dvisluoksnį. Potencialūs transmembraniniai segmentai Eisenbergo grafike atitinka sritis, kuriose $\langle H \rangle$ reikšmė viršija 0,75.

Analizuojant baltymų sąveiką su lipidų dvisluoksniu, kiekvienai sekai buvo taikomas 18 aminorūgščių ilgio slenkantis langas. Siekiant papildomai identifikuoti su membrana sąveikaujančias α -spirales, buvo apskaičiuotas diskriminacijos faktorius (D), aprašomas lygtimi (15):

$$D = 0,944 (< \mu H >) + 0,33 (z) \quad (15)$$

čia z – krūvis. Jei D reikšmė viršijo 0,68, atitinkamas segmentas buvo laikomas potencialia lipidus surišančia α -spirale.

Apo-S100A8, apo-S100A9 homodimerų ir apo-S100A8/A9 heterodimero trimatės struktūros buvo prognozuotos naudojant AlphaFold 3 serverį [244], o baltymų paviršiaus vaizdai sugeneruoti naudojant PyMOL molekulinės vizualizacijos kompiuterinę programą (versija 3.0). Schemos, iliustruojančios baltymo-lipido sąveikos mechanizmus, sugeneruotos vektorinės grafikos programa Inkscape (versija 1.2.2).

2.4 Statistinė analizė

Statistinė analizė buvo atlikta naudojant GraphPad Prism 8.4.3 programinę įrangą (*GraphPad Software*). Tyrime taikytas reikšmingumo lygmuo (α) = 0,05. Duomenų normalusis pasiskirstymas buvo vertinamas naudojant Shapiro-Wilk testą. Grupėms, kurių duomenys pasiskirstė pagal normalųjį skirstinį, palyginti buvo taikomas t-testas arba ANOVA su Bonferroni post hoc testu. Kiekybiniai duomenys šiame darbe pateikti kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

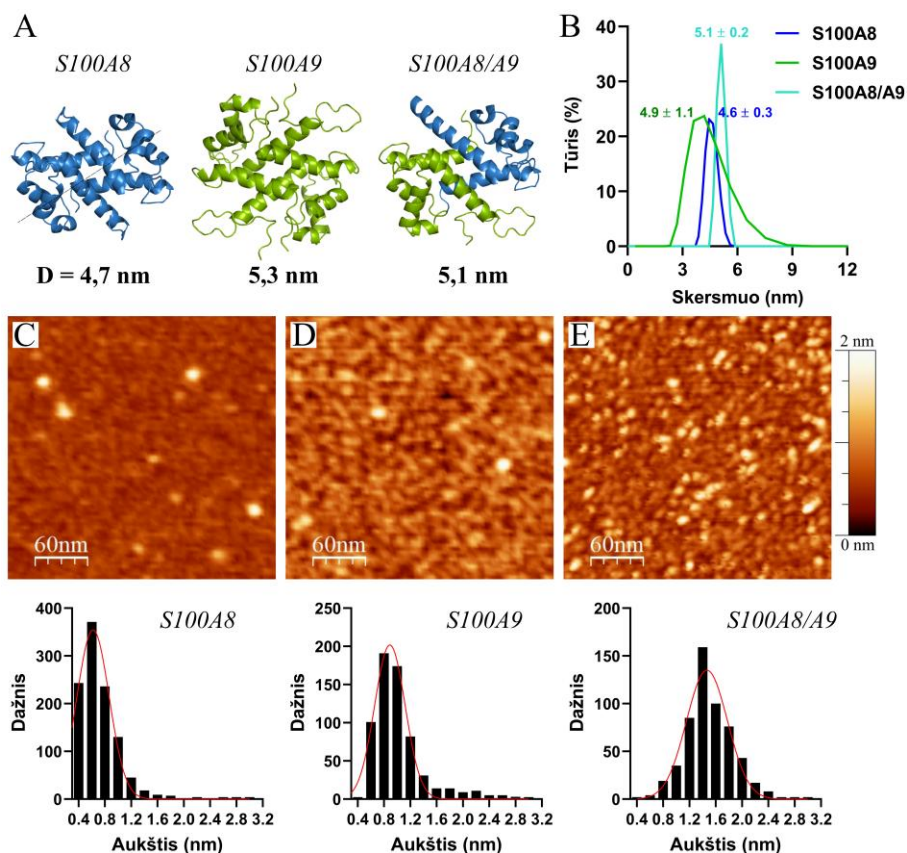
Šiame darbe siekėme įvertinti, ar šiuo metu vis labiau su neurodegeneracijos progresija siejamas baltymas, S100A9, ir jo funkcinis partneris, S100A8, sąveikaudami su dirbtinėmis lipidinėmis membranomis keičia jų biofizikines ir struktūrines savybes. Mūsų tyrimų rezultatai atskleidė, jog baltymų sukeltamų dvisluoksnių pažaidų iniciacijai reikalingos skirtingos inkubacijos trukmės, varijuojančios nuo kelių sekundžių iki paros. Dėl šios priežasties, vienas pirmųjų tyrimo uždavinių buvo įsivertinti rekombinantinių S100 šeimos narių struktūrines ypatybes bei stabilumą laike. Taip pat, atsižvelgiant į prielaidą, jog artimas kontaktas su membrana didina lokalią baltymų koncentraciją bei spartina fibrilizaciją, buvo tirama ir lipidų dvisluoksnių įtaka potencialiai neurotoksiškų amiloidinių agregatų susidarymui. Kitoje tyrimų dalyje buvo vertinama S100 šeimos baltymų įtaka lipidų dvisluoksnių integralumui, tiriant ne tik modelinių lipidinių sistemų integralumo pokyčius, bet ir vizualizuojant paviršiaus morfologiją, taip siekiant nustatyti sąveikos su membranomis mechanizmus. Kadangi S100 šeimos baltymų funkcionalumas yra reguliuojamas kalcio jonų prisijungimo (žr. skyrelį 1.3), toliau nagrinėjome dvivalenčių katijonų poveikį S100-lipido sąveikų efektyvumui. Galiausiai, pasitelkdami jėgos spektroskopijos tyrimus, vertinome ne tik tarpmolekulinių sąveikų tarp S100 baltymų stiprumą, bet ir membranų nanomechaninių savybių pokyčius po poveikio S100A9 baltymu.

3.1. S100 baltymų struktūrinės ypatybės

3.1.1 Palyginamoji morfologijos analizė

Didžioji dalis šio tyrimo rezultatų buvo gauti atominės jėgos mikroskopijos (AJM) metodu, todėl pirmine darbo užduotimi tapo įsivertinti S100A8, S100A9 baltymų ir jų formuojamo komplekso S100A8/A9 fizikinius parametrus. Norėdami įvertinti tiriamų S100 šeimos baltymų teorinius dydžius, pasinaudojome internetiniu serveriu HullRad [245]. Atsižvelgiant į literatūroje aprašytą S100 baltymų polinkį dimerizuotis [71], kompiuterinei dydžių analizei buvo pasirinktos trimatės apo būsena dimerinės struktūros, sugeneruotos naudojant AlphaFold 3 serverį [244]. Remiantis šia analize, nustatyta, kad teoriniai S100A8, S100A9 homodimerų ir S100A8/A9 heterodimero hidrodinaminiai skersmenys yra 4,7, 5,3 ir 5,1 nm, atitinkamai (**3.1 pav. A**). Siekdami įvertinti, ar mūsų tyrimų metu naudojami baltymai taip pat egzistuoja dimerinėje formoje, S100A8, S100A9 ir S100A8/A9

komplekso dydžio analizei pasitelkėme dinaminės šviesos sklaidos (DLS) metodą. Matavimų metu nustatyta, kad vidutinis S100A8 hidrodinaminis skersmuo siekia $4,6 \pm 0,3$ nm (**3.1 pav. B**). Tuo tarpu, S100A9 ir S100A8/A9 pasižymėjo didesnėmis dydžio vertėmis – $4,9 \pm 1,1$ nm ir $5,1 \pm 0,2$ nm, atitinkamai. Pastebėta, kad S100A9 pasižymi didesniu polidispersiškumu (0,22), palyginus su S100A8 (0,065) ir S100A8/A9 (0,034), o tai rodo mažesni šio baltymo stabilumą laike bei didesnę polinkį agreguoti. Svarbu pažymėti, kad DLS metodu gauti rezultatai buvo artimi bioinformatinės analizės metu įvertintoms reikšmėms. Šie duomenys patvirtina, jog pradinuose baltymų tirpaluose aptinkami tik mažos molekulinės masės dariniai, tarp kurių vyrauja dimerinė forma.



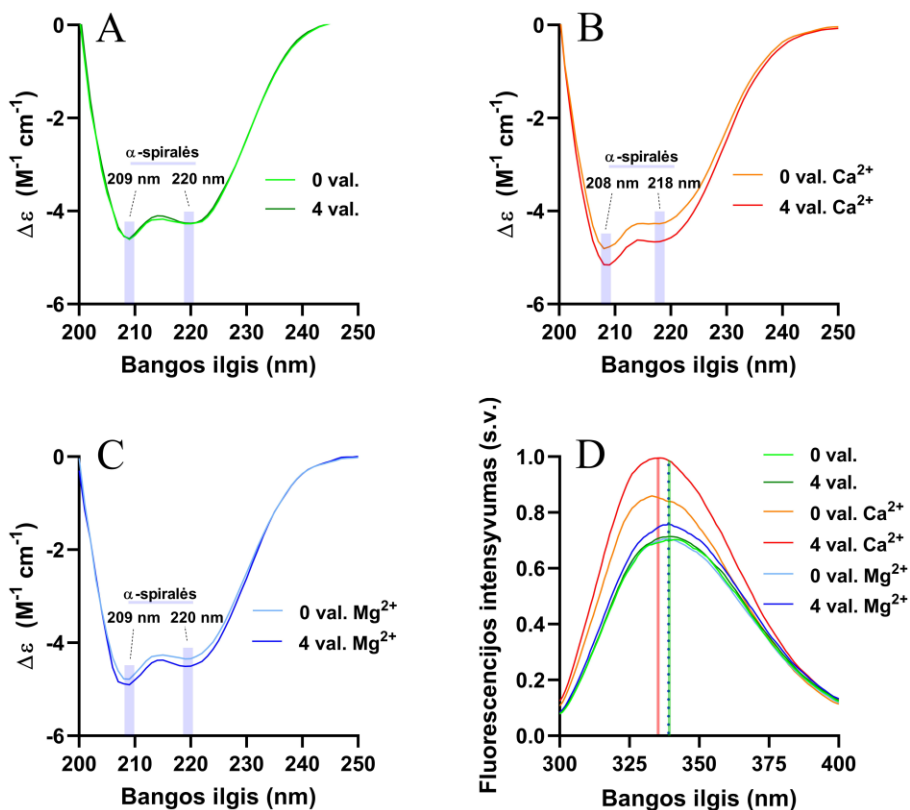
3.1 pav. Rekombinantinių S100 baltymų morfologijos ir dydžio analizė. (A) S100A8, S100A9 homodimerų ir S100A8/A9 heterodimero struktūros, sugeneruotos naudojant AlphaFold 3 serverį. Po kiekviena struktūra nurodyta atitinkama teorinė hidrodinaminio skersmens vertė. (B) S100A8, S100A9 ir S100A8/A9 hidrodinaminiai skersmenys, įvertinti dinaminės šviesos sklaidos metu. (C-E) S100A8, S100A9 ir S100A8/A9 baltymų topografijos vaizdai bei darinių aukščio pasiskirstymai. Vaizdų laukas – $0,3 \times 0,3 \mu\text{m}^2$.

Kadangi DLS metodas pateikia suvidurkintą visų tirpale esančių dalelių dydį, siekdami išsamiau įvertinti pavienių baltymų morfologiją, pasitelkėme atominės jėgos mikroskopijos metodą. Šio metodo pagalba vizualizavome šviežiai išgrynintų baltymų frakcijas ir nustatėme, kad jose vyrauja globulinės formos dariniai, pasižymintys įvairiomis dydžių vertėmis (**3.1 pav. C-E**). S100A8, S100A9 ir S100A8/A9 baltymų aukščio Gauso vidurkiai siekė $0,6 \pm 0,2$ nm, $0,9 \pm 0,2$ nm, bei $1,5 \pm 0,3$ nm, atitinkamai. Pažymėtina, jog nustatytos vertės buvo net iki 8 kartų mažesnės, palyginus su DLS metodu gautomis baltymų dydžio vertėmis. Šiuo atveju svarbu paminėti, kad mūsų pasirinkta matavimo metodika turi keletą apribojimų, o nustatytos aukščio reikšmės gali neatspindėti natūralaus darinių dydžio. Džiovinimo oro srove metu baltymai paprastai praranda savo hidratacinį sluoksnį, kurio storis siekia maždaug 1–1,2 nm [246], o adsorbcija ant paviršiaus gali sukelti baltymų denatūraciją [247], dėl ko yra stebimi dydžio pokyčiai. Taip pat, matuojamų darinių dydžio neatitikimai gali būti nulemti ir AJM adatos matmenų. Taigi, nors AJM metodas yra tinkamas morfologijos analizei, natyviai baltymų dydžiui įvertinti reikėtų naudoti kitas metodikas, leidžiančias tyrimus atlikti artimesnėmis fiziologinėms sąlygomis.

3.1.2 Dvivalenčių katijonų lemiami struktūriniai pokyčiai

S100 šeimos baltymų oligomerizacija ir biologinis aktyvumas yra griežtai reguliuojami dvivalenčių katijonų prisijungimo (**žr. skyrelį 1.3**). Siekiant įvertinti Ca^{2+} ir Mg^{2+} įtaką S100A8 baltymo antrinei struktūrai, buvo pasitelkti žiedinio dichroizmo (CD) ir triptofano (Trp) fluorescencijos intensyvumo matavimai. Rezultatai atskleidė, kad šviežiai išgrynintas S100A8 baltymas įgyja α -spiralinę struktūrą – tai patvirtina CD spektre stebimi sugerties intensyvumo minimumai ties 209 ir 220 nm (**3.2 pav. A**). Taip pat, matavimai parodė, jog inkubuojant S100A8 baltymą kambario temperatūroje, jis išlieka stabilus 4 val. laikotarpyje – šiuo laikotarpiu reikšmingų pokyčių CD spektre nustatyta nebuvo. Vykstant Ca^{2+} jonų prisijungimui, buvo stebimas sugerties minimumų verčių poslinkis ties 208 ir 218 nm (**3.2 pav. B**). Be to, molinių CD intensyvumų ($\Delta\epsilon$) skaitinės vertės ties minėtais bangos ilgiais padidėjo: tai patvirtina $\Delta\epsilon_{218\text{nm}}$ pokytis nuo $-4,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (0 val.) iki $-4,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (4 val.). Padidėjęs CD signalo intensyvumas gali reikšti α -spiralių reorientaciją [248], kuri yra susijusi su baltymo fiziologinėmis funkcijomis, įskaitant molekulinį taikinių, tokių kaip receptoriai ar kiti S100 baltymai, atpažinimą [249,250]. Panašūs, nors kiek mažiau išreikšti, efektai buvo stebimi ir inkubuojant S100A8 baltymą su

Mg²⁺; per 4 val. laikotarpį $\Delta\epsilon_{220\text{nm}}$ vertė padidėjo nuo -4,3 iki -4,5 M⁻¹ cm⁻¹ (3.2 pav. C).



3.2 pav. Dvivalenčių katijonų sukelti S100A8 konformacijos pokyčiai. Žiedinio dichroizmo spektrai, išmatuoti S100A8 inkubuojant be papildomų katijonų (A), su 2 mM Ca²⁺ (B) ar 2 mM Mg²⁺ (C). Bangos ilgiai, atitinkantys α -spiralių signalus, pažymėti mėlynomis vertikaliomis juostomis. (D) S100A8 triptofano fluorescencijos spektrai. Fluorescencijos intensyvumo maksimumų vertės po 4 val. inkubacijos be papildomų katijonų arba su Ca²⁺ nurodytos žalia ir raudona vertikaliomis linijomis, atitinkamai. Maksimumo vertė, gauta S100A8 inkubuojant su Mg²⁺, pažymėta mėlyna taškine linija. Matavimai atlikti HEPES buferiniame tirpale, 22 °C, naudojant 20 μ M baltymo koncentraciją. s.v. – Fluorescencijos intensyvumo santykiniai vienetai.

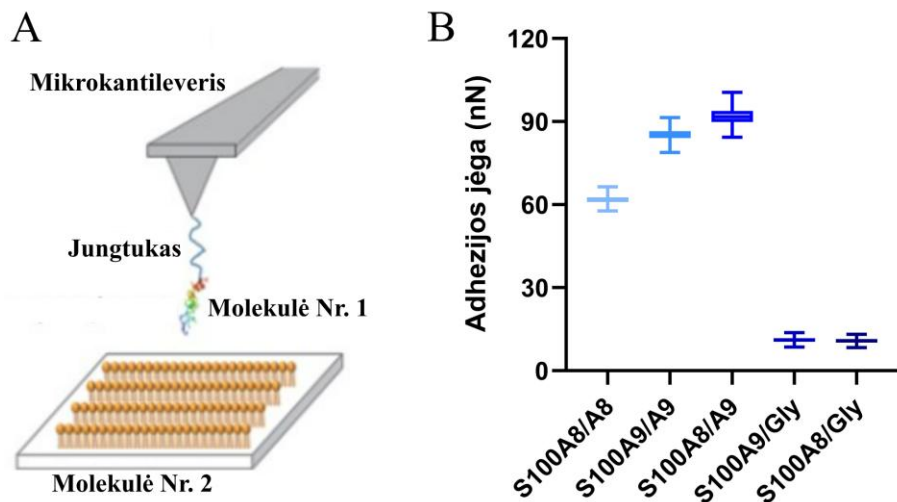
Gauti rezultatai buvo patvirtinti savaiminės Trp fluorescencijos intensyvumo duomenimis, kurie parodė reikšmingą, iki 29 %, fluorescencijos intensyvumo padidėjimą, kai S100A8 baltymas buvo inkubuojamas su Ca²⁺ jonais (3.2 pav. D). Šis fluorescencijos intensyvumo padidėjimas buvo lydimas emisijos maksimumo poslinkiu į mėlynąją spektro pusę (nuo 339 iki 335 nm), kas iliustruoja konformacinius pokyčius S100A8 struktūroje, kai Trp₅₄ šoninė grupė tampa paslėpta baltymo hidrofobinėje šerdyje. Tuo tarpu, Mg²⁺ jonų pridėjimas į terpę nesukėlė reikšmingo Trp emisijos maksimumo poslinkio. Šie rezultatai sutampa su literatūros duomenimis, įrodančiais, kad

Mg²⁺ jonų pridėjimas, priešingai nei Ca²⁺, nesukelia reikšmingų S100 šeimos baltymų konformacijos pokyčių [80]. Atsižvelgiant į S100 šeimos narių struktūrinį panašumą [68], galima daryti prielaidą, jog analogiškai pokyčiai galėtų pasireikšti ir S100A9 baltymo antrinėje struktūroje, paveikus jį minėtais divalenčiais katijonais.

3.2 S100 baltymų tarpusavio sąveikų reiškiniai

3.2.1. Sąveikų stiprumo tarp baltymų įvertinimas

Organizme pavienės baltymų molekulės sąveikauja tarpusavyje, taip susitelkdamos į aukštesnės struktūrinės organizacijos darinius, būtinus jų biologinėms funkcijoms palaikyti. AJM leidžia ne tik vizualizuoti baltymų molekules *in situ*, bet ir itin dideliu tikslumu nustatyti jų tarpusavio sąveikas [251]. S100A8 ir S100A9 tarpusavio sąveikų įvertinimui buvo naudojami AJM zondai bei žėručio paviršiai, funkcionalizuoti S100 šeimos baltymais, kaip aprašyta **2.2.9.4 skyriuje**. Tarpmolekulinių sąveikų stiprumas buvo įvertintas pagal atplėšimo jėgą, reikalingą jungčiai, susidariusiai adatos nuleidimo ciklo metu, nutraukti. Gauti duomenys atskleidė, kad stipriausiomis tarpusavio sąveikomis pasižymėjo S100A8 ir S100A9 baltymai – jėga, reikalinga susidariusiam heterokompleksui išardyti siekė net $91,8 \pm 2,9$ nN (**3.3 pav.**). Silpniausios tarpusavio sąveikos buvo nustatytos tarp S100A8 baltymų ($61,8 \pm 1,3$ nN). Šie rezultatai sutampa su literatūros duomenimis, įrodančiais, kad S100A8 ir S100A9 baltymai, dėl didesnio stabilumo, organizme dažniausiai formuoja heterodimerines ir heterotetramerines struktūras, laikomas biologiškai aktyviausiomis šių baltymų formomis [6]. Reprezentatyvios jėgos kreivės, naudotos tarpmolekulinių sąveikų įvertinimui, pateiktos **1 priede**.



3.3 pav. S100A8 ir S100A9 baltymų tarpusavio sąveikų įvertinimas. (A) Pavienių molekulių tarpusavio sąveikų įvertinimo AJM metodu principas. Parengta pagal [252]. (B) Adhezijos jėgos, veikiančios tarp AJM zondo ir žėručio paviršių, funkcionalizuotų nurodytais baltymais arba glicino (Gly) molekulėmis.

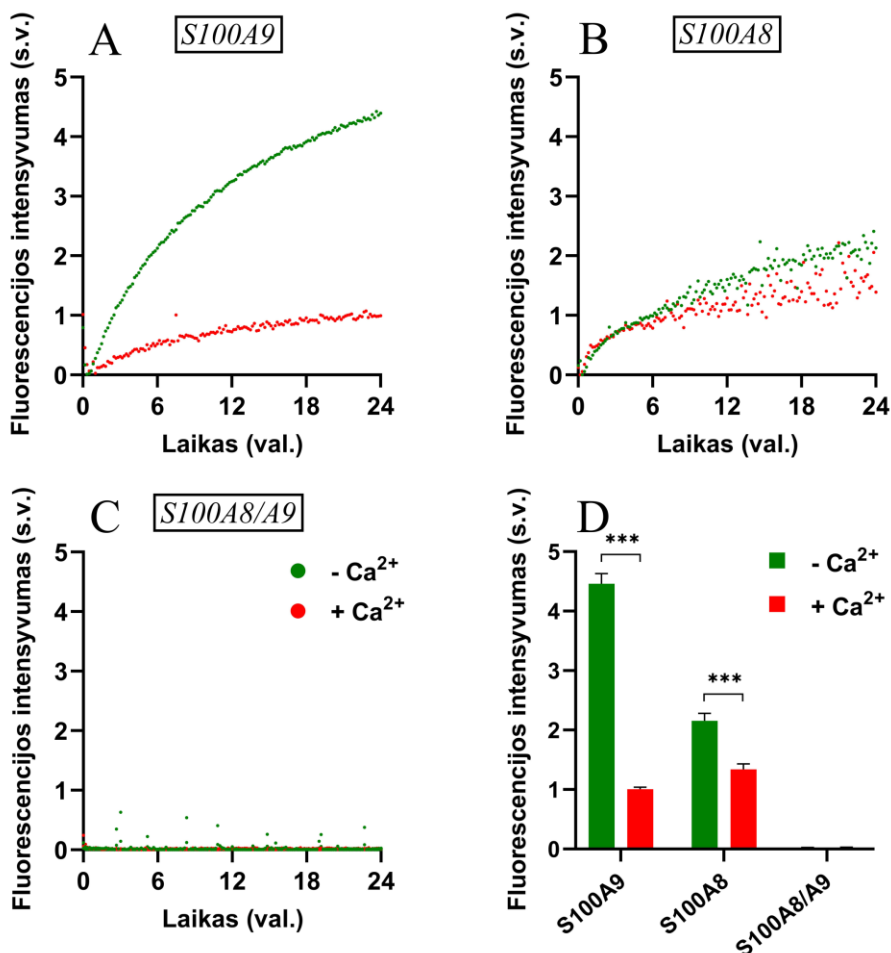
S100A8 ir S100A9 molekulių pritvirtinimui prie AJM zondų paviršiaus buvo taikytas klasikinis metodas, pagrįstas baltymo aminogrupių reakcija su paviršiuje imobilizuotu glutaraldehidu. Ši strategija yra plačiai naudojama tiriant įvairius baltymų ir nukleorūgščių kompleksus bei baltymų tarpusavio sąveikas [253]. Vis dėlto, mūsų pasirinkta zondų funkcionalizavimo strategija turi kelis apribojimus. Pirmiausia, APTES molekulės, naudojamos AJM zondų funkcionalizavimui, yra linkusios agreguoti, todėl baltymai ant zondo paviršiaus pasiskirstys netolygiai [251]. Be to, efektyvioms baltymų tarpusavio sąveikoms dažnai reikalinga specifinė jų orientacija paviršiuje. Tačiau, šiuo atveju, baltymo N-galinės aminogrupės nėra vienintelės galimos jungimosi prie glutaraldehido sritys: šios procedūros metu prie glutaraldehido taipogi prijungiamos ir tam tikrų aminorūgščių (pvz.: lizino) šoninės grupės. Dėl to baltymų molekulės ant paviršiaus orientuojasi atsitiktinai, o tai gali lemti tarpmolekulių sąveikų kintamumą matavimų metu.

Pažymėtina, jog sąveikų stiprumas tarp baltymų molekulių paprastai svyruoja nuo kelių iki kelių šimtų pN [254]. Tačiau, mūsų atveju, nustatytos tarpmolekulinės sąveikos jėgos siekė net iki 90 nN. AJM zondų funkcionalizavimo metu, siekiant neutralizuoti nesureagavusias glutaraldehido grupes, buvo naudojamos glicino molekulės. Vis dėlto, įvertinus sąveikos jėgas tarp paviršiuje imobilizuoto glicino ir S100 šeimos baltymų, taip pat buvo nustatyta stipri adhezija, siekianti net iki 15 nN. Stebimi jėgos skirtumai galėjo būti susiję su matavimo sąlygų pasirinkimu –

dauguma literatūroje pateiktų tyrimų atliekami skystyje, tuo tarpu mūsų matavimai buvo atlikti ore. Matavimų ore metu dažnai stebima stipri adhezija, sukeliama nespecifinių kapiliarinių jėgų, atsirandančių vandens garams kondensuojantis ant mėginio ir AJM zondo paviršių. Šios jėgos yra laikomos dominuojančiomis ir gali apsunkinti specifinių tarp molekulinę sąveiką įvertinimą. Literatūroje pabrėžiama, kad adhezijos jėgos, išmatuotos skystyje, paprastai būna net iki dviejų kartų mažesnės, palyginti su sąveikomis, nustatytomis atmosferos sąlygomis [255]. Be to, dėl zondų ir žėručio plokštelių funkcionalizavimui naudotų didelių baltymo koncentracijų (1,5 μM), tikėtina, kad matavimų metu buvo nustatytos ne pavienių baltymų, o viso molekulių ansamblio, sąveikos jėgos. Taigi, dėl minėtų veiksnių, galima daryti prielaidą, kad nustatytos vertės neatspindi realių tarpusavio sąveikų, stebimų *in vivo*, tačiau jos suteikia vertingos informacijos apie bendrus S100 baltymų tarpusavio sąveikų dėsninumus.

3.2.2 Agregacijos tyrimas

Netaisyklingas baltymų susilankstymas ir agregacija yra siejami su įvairių neurodegeneracinių ligų patologija (žr. skyrelį 1.2). Siekiant įvertinti S100 šeimos baltymų polinkį agreguoti, buvo naudojamas Tioflavino T (ThT) zondas, leidžiantis kokybiškai įvertinti amiloidinių fibrilių susidarymą mėginyje [256]. Kaip galime pastebėti iš agregacijos kreivių, pateiktų **3.4 pav.** A ir B sekcijose, S100A9 ir S100A8 pasižymėjo amiloidinėmis savybėmis, o laike buvo stebimas staigus ThT fluorescencijos augimas. Paprastai, agreguojant amiloidiniams baltymams, yra stebima sigmoidinė kinetika, kuri gali būti skirstoma į 3 pagrindinius etapus: agregacijos branduolių susidarymo (lag), eksponentinio augimo (elongacijos) ir išotinio (plateau) [257]. Tačiau, šiuo atveju, buvo stebima hiperbolinė agregacijos kinetika, o lag fazės nebuvimą būtų galima paaiškinti tuo, jog agregacijos branduoliai susiformuoja labai greitai arba agregacijos procesas vyksta alternatyviu, ne agregacijos branduolių susidarymu paremtu, mechanizmu. Tokių, alternatyvių, agregacijos mechanizmų pavyzdžiai: kritinių oligomerų klasterizacija [258], tiesinė polimerizacija (angl. *isodesmic (linear) polymerization*) [259] bei nuožulnioji polimerizacija (angl. *downhill polymerization*) [260]. Hiperbolės formos agregacijos kinetikos kreivės yra sutinkamos ir literatūroje, aprašant įvairių baltymų, įskaitant serumo albumino, transtiretino, β -2-mikroglobulino, Tau baltymo keturių pasikartojančių domenų, apolipoproteino, A β , agregacijos procesus [261].



3.4 pav. S100 baltymų agregacijos kinetika. S100A9 (A), S100A8 (B) ir S100A8/A9 (C) agregacija buvo tiriama matuojant ThT fluorescencijos intensyvumą, į mėginį papildomai ne pridėjus (žalia kreivė) arba pridėjus (raudona kreivė) Ca^{2+} . (D) Fluorescencijos intensyvumo vertės po 24 val. inkubacijos. Inkubacija buvo atliekama HEPES buferiniame tirpale, 37 °C temperatūroje. Baltymų koncentracija: 100 μM (S100A9) arba 50 μM (S100A8, S100A8/A9). Mėginiuose su Ca^{2+} , CaCl_2 koncentracija – 1 mM. Statistinis reikšmingumas žymimas *** ($p \leq 0,001$).

Tiriant S100A8/A9 agregacijos ypatybes, ryškūs pokyčiai ThT fluorescencijos intensyvumo spektre stebimi nebuvo (**3.4 pav.** C). Šie duomenys rodo didesnę heterokomplekso stabilumą laike, palyginus su S100A8 ar S100A9. Atsižvelgiant į tai, kad S100A8/A9 yra dominuojanti S100A8 ir S100A9 forma *in vivo*, šio heterokomplekso formavimasis galėtų veikti kaip neuroapsauginis mechanizmas, užkertantis kelią pavienių baltymų agregacijai. Tuo tarpu, neurouždegimo metu, esant netolygiai padidėjusiai

S100A8 bei S100A9 raiškiai [71], heterokomplekso formavimasis gali sutrikti, taip sąlygojant potencialiai neurotoksiškų amiloidinių agregatų kaupimąsi smegenyse bei ligos progresiją.

Įdomu tai, jog ankstesni tyrimai parodė S100A8/A9 fibrilinių agregatų susidarymą prostatos vėžiu sergančių pacientų priešinės liaukos mėginiuose [262]. Nors S100A8/A9 fibrilių susidarymas gali būti stebimas ir *in vitro*, tačiau tai įvyksta kitomis sąlygomis, nei taikytomis mūsų eksperimento metu – esant rūgštiniam pH arba prailgintam inkubacijos laikui (8 sav.). Svarbu paminėti, jog rūgštinėje terpėje S100 baltymai yra linę disocijuoti iš dimerų į monomeras [263], todėl labai tikėtina, jog tokiomis sąlygomis baltymai agregavo kaip pavieniai monomerai, o AJM metodu buvo stebimas ne heterokomplekso, o S100A9 fibrilinių agregatų susidarymas.

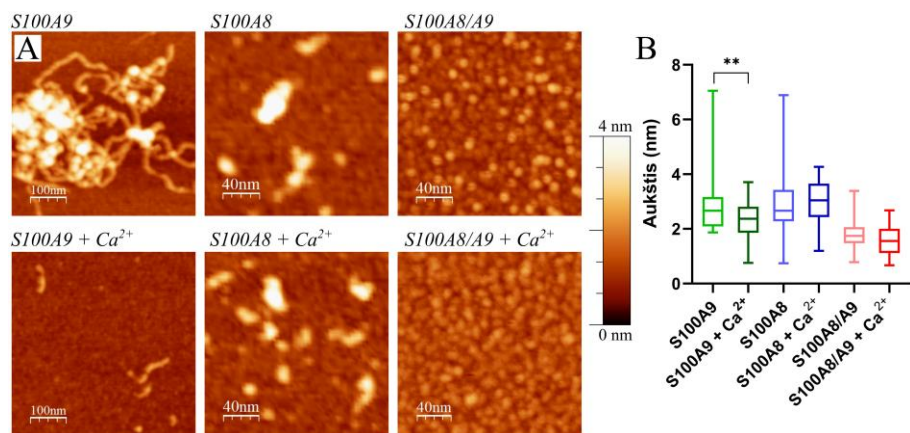
Kadangi S100A8 ir S100A9 yra Ca^{2+} rišantys baltymai, sekančiame žingsnyje buvo tiriama šio katijono įtaka baltymų agregacijos procesams. Nustatyta, jog kalcio jonų pridėjimas nulėmė didesnę S100A9 baltymo struktūrinį stabilumą bei mažesnę polinkį agreguoti, ką patvirtina reikšmingai sumažėjęs ThT fluorescencijos intensyvumas (**3.4 pav. D**). Kiek mažiau išreikštas kalcio jonų efektas buvo nustatytas ir S100A8 baltymo agregacijos procesams. Nors pradiniais agregacijos etapais fluorescencijos intensyvumas abiem sąlygomis didėjo panašiu greičiu, po 24 val. mėginiuose su Ca^{2+} ThT signalas buvo statistiškai reikšmingai mažesnis, palyginti su mėginiais, inkubuotais be šių katijonų. Pažymėtina, kad viena pagrindinių jėgų, skatinančių baltymų agregaciją, yra aromatinių aminorūgščių šoninių grupių tarpusavio sąveikos [264]. Mūsų ankstesni tyrimai parodė, jog vykstant Ca^{2+} jonų prisijungimui, aromatinės aminorūgštys yra paslepiamos S100 baltymų hidrofobinėje šerdyje (žr. skyrelį 3.1.2), taip ribojant jų prieinamumą ir užkertant kelią agregatų susidarymui. Gauti duomenys sutampa su ankstesniais S100 šeimos narių tyrimais [265], o reikšmingas kalcio jonų vaidmuo baltymų agregacijos reguliacijoje gali būti grindžiamas tuo, jog visos identifikuotos oligomerizacijos sritys yra EF-rankų domenų, jungiančių Ca^{2+} , dalis [116]. Taigi, kalcio jonų prisijungimas stabilizuoja S100A8 ir S100A9 baltymų homodimerines struktūras, taip užkertant kelią tolimesnei jų agregacijai. Pažymėtina, jog neurodegeneracinių ligų metu stebima kalcio jonų dishomeostazė [266] galėtų paspartinti spontanišką amiloidinių sankauptų formavimąsi organizme.

Svarbu paminėti, jog mūsų eksperimentų metu buvo pasirinktos itin didelės, fiziologinių sąlygų neatitinkančios, S100 baltymų koncentracijos, taip siekiant paspartinti lėtai vykstantį agregacijos procesą. Tačiau, net ir esant 50–100 μM baltymo koncentracijai, reakcija per 24 val. laikotarpį nepasiekė įsotinimo. Amiloidinių baltymų agregacija yra stipriai nuo koncentracijos

priklausomas procesas [267], todėl tyrimams pasirinkta didesnė S100A9 koncentracija (100 μ M) galėjo lemti spartesnę šio baltymo agregaciją bei didesnį ThT fluorescencijos intensyvumą eksperimento pabaigoje, palyginus su S100A8 (50 μ M) (**žr. 3.4 pav.**). Nustatyta, kad sumažinus S100A9 koncentraciją nuo 100 iki 50 μ M, po 24 val. fiksuotas ThT fluorescencijos intensyvumas sumažėjo 3,5 karto (**2 priedas**). Šiuo atveju, išmatuota ThT signalo vertė buvo mažesnė nei fiksuota S100A8 baltymo agregacijos metu. Vertėtų atkreipti dėmesį, jog **2 priede** pateikti agregacijos duomenys buvo gauti tyrimus atlikus PBS buferiniame tirpale (pH = 7,2). Tačiau, dėl PBS buferiniame tirpale susidarančių $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ nuosėdų, matavimai Ca^{2+} jonų aplinkoje yra apsunkinami, o gauti spektrai pasižymi aukštu triukšmo lygiu. Dėl šios priežasties, šiame skyrelyje pateikiami HEPES buferiniame tirpale (pH = 7,4) gauti duomenys, taip užtikrinant didesnį rezultatų su Ca^{2+} jonais patikimumą. Pažymėtina, jog iš gautų duomenų galėjome kokybiškai įvertinti susidarančių amiloidinių agregatų kiekį, tačiau, kadangi matavimo metu nebuvo pasiekta įsotrinimo fazė, negalėjome tiksliai įvertinti skirtingomis eksperimentinėmis sąlygomis vykusių reakcijų pusėjimo trukmių ir kitų kinetinių parametrų.

Siekiant nustatyti agregacijos metu susidarančių darinių morfologiją, po 24 val. inkubacijos 37 °C temperatūroje, mėginiai buvo adsorbuoti ant žėručio paviršiaus ir vizualizuoti AJM metodu. Nustatyta, kad S100A9 baltymas agregacijos metu formuoja fibrilinius raizginius (**3.5 pav. A**). Šios fibrilės morfologiškai skyrėsi nuo kitų amiloidinių baltymų, tokių kaip A β ar α -Syn, formuojamų fibrilių, kadangi pastarosios dažniausiai sudaro ilgas, net kelis mikrometrus siekiančias, struktūras [268]. Dėl struktūrinių ypatybių, S100A9 baltymo fibrilės literatūroje prieš tai buvo įvardintos kaip „kirmelės formos“ [269]. Pastebėta, kad pridėjus Ca^{2+} jonų, susidarančių fibrilių kiekis buvo ženkliai mažesnis. Taip pat, atlikus topografinių vaizdų analizę, nustatėme, jog šių fibrilių aukštis buvo statistiškai reikšmingai mažesnis, palyginus su fibrilėmis, gautomis aplinkoje nesant Ca^{2+} (**3.5 pav. B**). Tuo tarpu, S100A8 baltymas fibrilinių struktūrų neformavo, tačiau po 24 val. buvo aptikti oligomeriniai bei aiškiai neapibrėžtos formos dariniai. Kadangi susidarę agregatai buvo jautrūs amiloidiniams baltymams specifiniam dažui, ThT, potencialiai jie galėtų priklausyti patogeninėms baltymų formoms [270]. Įdomu tai, kad net agregacijos metu pridėjus Ca^{2+} jonų, šių darinių morfologija ir vidutinis aukštis išliko reikšmingai nepakitę. Pažymėtina, kad AJM metodas leidžia įvertinti darinių morfologiją, tačiau nesuteikia informacijos apie jų antrinės struktūros skirtumus. Todėl, šiuo atveju, neatitikimą tarp AJM ir ThT fluorescencijos intensyvumo rezultatų galima aiškinti tuo, kad skirtingomis sąlygomis susiformavę dariniai galėjo skirtis antrine struktūra arba Ca^{2+} jonų

buvimas lėmė mažesnę bendrą agregatų skaičių mėginyje. Galiausiai, S100A8/A9 atveju, nepriklausomai nuo Ca^{2+} jonų buvimo, buvo stebimi nedidelio dydžio (iki 3,5 nm) sferiniai oligomeriniai dariniai, taip dar kartą patvirtinant šio heterokomplekso stabilumą laike.



3.5 pav. S100 baltymų agregacijos metu susidarančių darinių morfologijos analizė. (A) AJM metodu vizualizuotos S100A9 baltymo formuojamos fibrilinės struktūros bei S100A8 ir S100A8/A9 agregacijos metu susidarančių oligomeriniai dariniai. Vaizdų laukas $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}^2$ (S100A9 atveju – $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}^2$). (B) Susidariusių darinių aukščio analizė ($n > 100$). Statistinis reikšmingumas žymimas ** ($p \leq 0,01$).

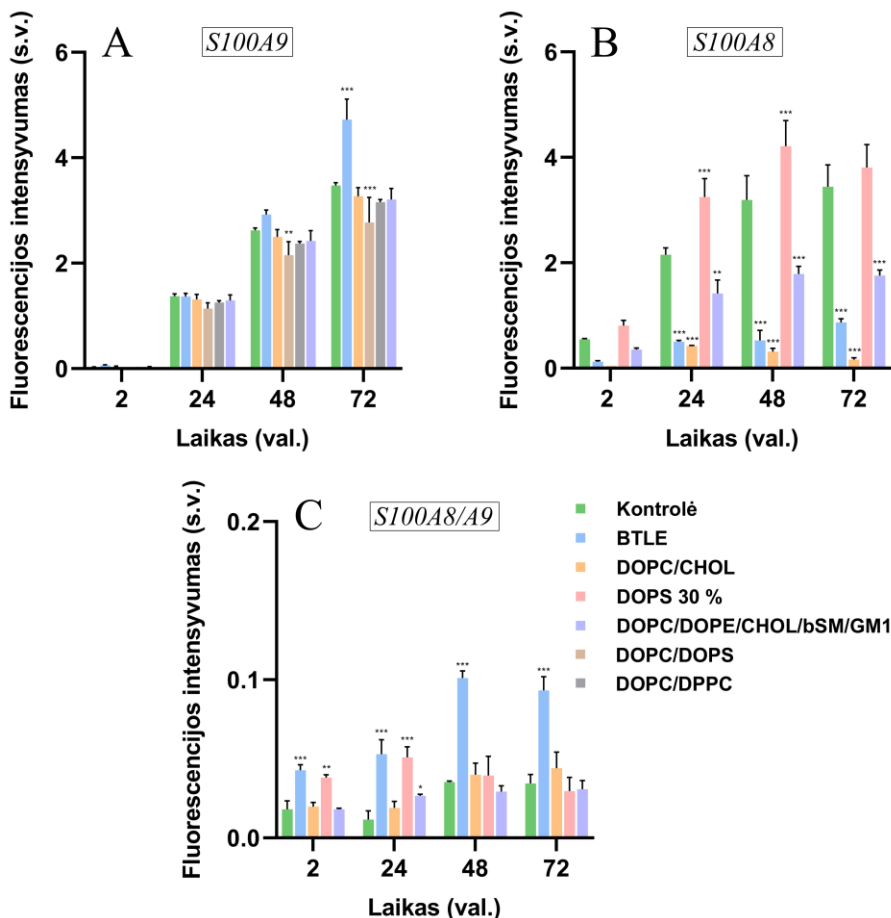
3.2.3. Lipidų sąlygojama agregacija

Amiloidiniams baltymams sąveikaujant su ląstelės plazminės membranos lipidais, jų konformacija pakinta. Be to, daugelis tyrimų rodo, kad sąveika su membrana skatina šių baltymų fibrilizaciją ir didina neurotoksiškumą [271]. Ankstesniuose skyreliuose aptarėme pavienių S100 baltymų polinkį agreguoti (žr. skyrelį 3.2.2). Tačiau, lipidų įtaka S100 baltymų agregacijai dar liko neaptarta. Taigi, šioje tyrimų dalyje buvo siekiama įvertinti skirtingomis biofizikinėmis savybėmis pasižyminčių lipidinių kompozicijų įtaką S100A9, S100A8 bei jų formuojamo heterokomplekso, S100A8/A9, agregacijai. Tyrimams buvo pasirinktos įvairios kilmės lipidinės membranos: *I.* suformuotos iš natūralaus kiaulės smegenų lipidų ekstrakto; *II.* neutralų krūvį turinčios (cviterjoninės) DOPC/CHOL; *III.* anijoninės DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (DOPS 30 %) ir DOPC/DOPS bei *IV.* sudėtyje turinčios L_0 (DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1) arba L_β (DOPC/DPPC) fazių domenų. Platesnė informacija apie darbe naudotų lipidinių kompozicijų fazinius būvius pateikta 3.3.2 skyrelyje.

Gauti rezultatai atskleidė, kad S100 baltymų oligomerizacija yra nuo lipidinės aplinkos sudėties priklausomas procesas – tai atspindi agregacijos

kinetikos pokyčiai, nustatyti pagal ThT fluorescencijos intensyvumo kreives (**3 priedas**). Tolimesnėje dalyje bus aptariama pavienių lipidinių kompozicijų įtaka S100 baltymų agregacijos procesams.

I. S100 baltymų agregacija kiaulės smegenų lipidų ekstrakto (BTLE) membranų aplinkoje. Tyrinėjant S100A9 agregacijos procesus BTLE liposomų aplinkoje, pirminėmis inkubacijos valandomis reikšmingas efektas baltymo fibrilizacijai nustatytas nebuvo (**3.6 pav. A**). Tačiau, po 72 val. inkubacijos, išmatuotas ThT fluorescencijos intensyvumas mėginiuose su liposomomis buvo statistiškai reikšmingai didesnis, palyginus su kontroline grupe. Gauti rezultatai rodo, jog ši lipidinė kompozicija skatina S100A9 baltymo agregatų formavimąsi tirpale. Pažymėtina, kad iš visų mūsų darbe taikytų lipidinių kompozicijų, BTLE išsiskyrė didžiausiu membranos tvarkos laipsniu ir standumu (**žr. skyrių 3.3.2**). Šios struktūrinės ypatybės galėjo apsunkinti baltymo įsiterpimą į lipidinės membranos hidrofobinę šerdį, tuo pačiu didinant lokalią S100A9 koncentraciją liposomų paviršiuje. Minėtieji veiksniai galėtų skatinti agregacijos branduolių susidarymą ir galimai neurotoksišką fibrilizacijos procesą [271]. Kaip ir S100A9 atveju, S100A8/A9 agregacija taip pat buvo skatinama BTLE liposomų buvimo aplinkoje, o šis efektas pasireiškė jau pirmosiomis inkubacijos valandomis (**3.6 pav. C**). Įvertinus BTLE kompozicijos įtaką S100A8 oligomerizacijai, buvo stebimas priešingas efektas, kadangi šios sudėties liposomos statistiškai reikšmingai slopino baltymo agregacijos procesus (**3.6 pav. B**). Gautas rezultatas galėtų būti aiškinamas S100A8 įsiterpimu į hidrofobinę dvisluoksnio sritį, tačiau, svarbu pažymėti, kad esant stiprioms elektrostatinėms sąveikoms, net ir liposomų paviršiuje lokalizuoto baltymo agregacija tam tikrais atvejais gali būti slopinama. Tai įvyksta dėl apribotų baltymo konformacijos pokyčių, kuomet yra užkertamas kelias agregacijos branduolių susidarymui [272].



3.6 pav. Lipidų įtaka S100 baltymų agregacijai. S100A9 (A), S100A8 (B) ir S100A8/A9 (C) agregacijos kinetika tirpale be liposomų (kontrolė) ir esant įvairių kompozicijų liposomoms. Tyrimai atlikti HEPES buferiniame tirpale (S100A9 atveju – PBS), 37 °C temperatūroje. S100 baltymų koncentracija tirpale – 50 μM, lipidų – 500 μM. Statistinis reikšmingumas žymimas: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$). Statistinis reikšmingumas įvertintas lyginant skirtingas grupes su kontrolinėmis vertėmis atitinkamais laiko momentais.

II. S100 baltymų agregacija cviterjoninių (DOPC/CHOL) membranų aplinkoje. Tyrimų rezultatai parodė, kad DOPC/CHOL kompozicijos membranos, kaip ir BTLE, pasižymi itin aukštu lipidų molekulių susipakavimo efektyvumu bei tvarkos laipsniu (žr. skyrių 3.3.2). Tačiau, analizuojant šių dvisluoksnių poveikį S100A9 ir S100A8/A9 baltymų agregacijos procesams, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta. Vis dėlto, S100A8 baltymo atveju, buvo stebimas reikšmingas agregacijos procesų slopinimas.

III. S100 baltymų agregacija anijoninių membranų aplinkoje. Įvertinus anijoninių, DOPS praturtintų, membranų įtaką S100A9 baltymo

agregacijos procesams, pirmųjų 24 val. laikotarpyje statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta. Tačiau, po 48 val. inkubacijos išmatuotas ThT fluorescencijos intensyvumas mėginiuose su liposomomis buvo statistiškai reikšmingai mažesnis, palyginus su kontroline grupe. Analogiški skirtumai išliko ir po 72 val. inkubacijos, o gauti duomenys indikuoja apie mažesnę agregatų kiekį, susidarantį anijoninių membranų aplinkoje. Priešingas efektas buvo stebimas tiriant lipidinių membranų įtaką S100A8 oligomerizacijai: jau po 24 val. inkubacijos nustatytas ThT fluorescencijos intensyvumas buvo statistiškai reikšmingai didesnis, palyginus su kontroline grupe. Analogiškai, anijoninės, sudėtyje 30 % DOPS turinčios, liposomos skatino ir S100A8/A9 agregatų formavimąsi. Vis dėlto, šis efektas buvo stebimas tik pirmųjų 24 val. laikotarpiu, o vėlesnėmis inkubacijos valandomis nustatytos ThT fluorescencijos intensyvumų vertės sutapo su kontrolinės grupės vertėmis. Nepaisant to, jog S100A9 agregacijos tyrimo metu buvo stebimas priešingas efektas, svarbu pabrėžti, kad abiejų eksperimentų metu naudotos lipidinės kompozicijos skyrėsi. S100A9 baltymo agregacijos metu naudota lipidinė kompozicija buvo sudaryta tik iš DOPC ir DOPS, tuo tarpu, S100A8 ir heterokomplekso agregacijos tyrimo metu buvo naudotos liposomos, turinčios reikšmingą cholesterolio kiekį (20 %). Dėl sudėtyje esančio cholesterolio, DOPS 30 % kompozicija pasižymėjo didesniu standumu, kas galėjo apsunkinti baltymo įsiterpimą į lipidinio dvisluoksnio šerdį. Todėl, S100A8 ir S100A8/A9 potencialiai buvo lokalizuoti liposomų paviršiuje, taip didinant jų lokalią koncentraciją bei skatinant agregatų formavimąsi. Taip pat, terpėje esantys katijonai galėjo dalinai neutralizuoti liposomų paviršiaus krūvį [273], taip palengvindami iš prigimties neigiamai įkrautų S100A8 ir S100A9 baltymų bei lipidų sąveiką.

IV. S100 baltymų agregacija dviejų fazių membranų aplinkoje.

Atliekant S100 baltymų agregacijos tyrimus dviejų fazių membranų aplinkoje, itin ryškūs skirtumai buvo pastebėti naudojant penkiakomponenčius DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 lipidų dvisluoksnius. Šios kompozicijos liposomos neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos S100A9 baltymo fibrilizacijai, tačiau S100A8 baltymo atveju buvo užfiksuotas ryškus agregacijos slopinimas. Priešingai, S100A8/A9 komplekso agregacija pirmųjų 24 val. laikotarpyje buvo skatinama, tačiau vėlesnėmis inkubacijos valandomis ThT fluorescencijos intensyvumo skirtumų, palyginus su kontroline grupe, nustatyta nebuvo. Įvertinus L_{β} fazės domenais praturtintos DOPC/DPPC membranos įtaką S100A9 baltymo agregacijai, statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta. Verta paminėti, kad šios lipidinės kompozicijos įtaka kitų S100 baltymų agregacijos procesams tirta nebuvo.

Pažymėtina, jog liposomų dydis, dėl paviršiaus kreivumo efekto, daro reikšmingą įtaką amiloidinių baltymų agregacijai [272]. Siekiant išvengti minėto efekto, šiame tyrime buvo naudojamos panašaus dydžio (~ 100 nm) vienasluoksnės liposomos. Tyrimų metu naudotų liposomų pradinis dydis bei stabilumas 72 val. laiko bėgyje buvo patvirtinti DLS metodu (**4 priedas**). Kadangi iš ThT fluorescencijos intensyvumo grafikų matome, kad S100A9 agregacija yra nuo lipidų buvimo aplinkoje priklausomas procesas, tikėtina, jog liposomų dydis inkubacijos su baltymu metu, dėl S100A9 prisijungimo prie paviršiaus, galėtų keistis. Vis dėlto, atliekant S100A9 inkubaciją su BTLE ir DOPC/CHOL liposomomis, statistiškai reikšmingi liposomų dydžio pokyčiai 24 val. bėgyje nepastebėti (**3.1 lentelė**). Tuo tarpu, S100A9 hidrodinaminis skersmuo inkubacijos metu padidėjo beveik 9 kartus, o tai dar kartą patvirtina šio baltymo polinkį agreguoti laike.

3.1 lentelė. Liposomų ir S100A9 baltymo dydžio įvertinimas. Baltymas buvo inkubuojamas 24 val. 37 °C temperatūroje, į inkubacijos tirpalą pridedant arba nepridedant liposomų. Susidariusių darinių hidrodinaminis skersmuo buvo įvertintas dinaminės šviesos sklaidos metodu.

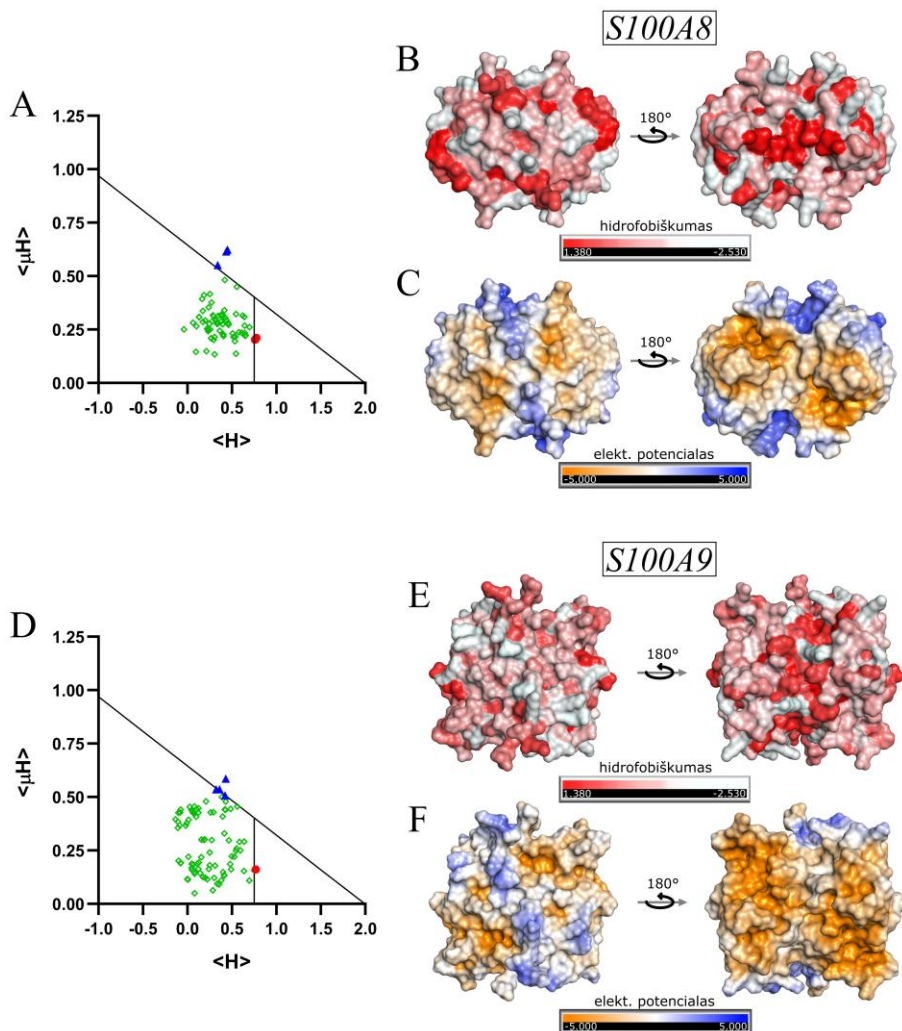
Laikas (val.)	Kompozicija	Skersmuo (nm)
0	S100A9	4,9 ± 1,1
	BTLE + S100A9	127,4 ± 30,2
	DOPC/CHOL + S100A9	133,8 ± 21,0
24	S100A9	43,8 ± 4,6
	BTLE + S100A9	137,4 ± 11,8
	DOPC/CHOL + S100A9	135,6 ± 12,6

Apibendrinant, atlikti tyrimai atskleidė, kad S100 baltymų agregacija yra glaudžiai susijusi su lipidinių membranų savybėmis. Skirtingos membranų fizikinės ir struktūrinės charakteristikos – tokios kaip dvisluoksnio standumas bei paviršiaus krūvis – gali lemti baltymų adsorbciją membranos paviršiuje ir jų įsiskverbimą į lipidų dvisluoksnį. Šie procesai daro reikšmingą įtaką agregacijos branduolių formavimuisi bei fibrilizacijos eigai. Reikėtų atkreipti dėmesį, jog nepaisant anksčiau aptarto struktūrinio S100A8/A9 stabilumo, BTLE ir anijoninės liposomos skatino šio heterokomplekso agregaciją. Vis dėlto, atsižvelgiant į itin žemas ThT fluorescencijos intensyvumo vertes, siekiant įvertinti gautų rezultatų biologinį reikšmingumą, būtini papildomi tyrimai.

3.3. S100 baltymų sąveika su membranomis

3.3.1. Sričių, sąveikaujančių su lipidais, nustatymas

S100A8 ir S100A9 baltymai, kurių izoelektrinių taškų (pI) vertės yra 6,6 ir 5,7, atitinkamai, fiziologiniame pH galėtų elektrostatiškai sąveikauti su lipidų dvisluoksniais. Šios sąveikos galėtų ne tik sąlygoti anksčiau aptartus baltymų agregacijos pokyčius (**žr. skyrelį 3.2.3**), tačiau ir pažeisti lipidinių membranų integralumą. Siekiant identifikuoti potencialias, aminorūgščių sekoje užkoduotas, sąveikas su lipidiniais paviršiais, S100A8 ir S100A9 baltymų sekos buvo analizuojamos pasitelkiant Heliquest internetinį serverį [242]. Norint klasifikuoti konkrečius baltymų segmentus pagal jų hidrofobiškumo savybes – t. y. ar jie yra hidrofiliniai, sąveikaujantys su membranos paviršiumi ar transmembraniniai – buvo pritaikytas Eisenbergo metodas [243]. Šio metodo esmė – grafiškai atvaizduoti vidutinį hidrofobiškumą ($\langle H \rangle$) bei hidrofobinį momentą ($\langle \mu H \rangle$), kuris atspindi polinių ir nepolinių aminorūgščių pasiskirstymą baltymo struktūroje [274]. Kaip matyti iš S100A8 Eisenbergo diagramos (**3.7 pav. A**), dauguma baltymo segmentų yra hidrofiliniai ir orientuoti į vandeninę terpę. Tačiau AA64–83 sritis, kurios $\langle H \rangle$ reikšmė viršija 0,75, gali funkcionuoti kaip potencialus transmembraninis domenas. Tuo tarpu AA1–20 sritis, pasižyminti didele $\langle \mu H \rangle$ ir vidutinio dydžio $\langle H \rangle$ reikšmėmis, tikėtina, funkcionuoja kaip su membranos paviršiumi sąveikaujantis segmentas.



3.7 pav. S100 baltymų regionai, potencialiai sąveikaujantys su lipidais. (A, D) S100A8 ir S100A9 baltymų Eisenbergo diagramos. Segmentai, identifikuoti kaip hidrofiliniai, yra pažymėti žaliu kvadratu, sąveikaujantys su membranos paviršiumi – mėlynu trikampiui ir transmembraniniai – raudonu apskritimu. S100A8 ir S100A9 apo formų homodimerinės struktūros, sugeneruotos naudojant AlphaFold 3 serverį (dešinėje). Baltymų struktūrų paviršiuje esantys regionai pažymėti pagal jų hidrofobiškumo laipsnį: balta spalva žymi labiausiai hidrofilinius regionus, raudona – labiausiai hidrofobinius (B, E), bei elektrostatinį potencialą: mėlyna spalva žymi teigiamą krūvį, geltona – neigiamą (C, F).

Siekiant nustatyti α -spiralių potencialą sąveikauti su lipidinėmis membranomis, papildomai buvo atlikta diskriminacijos faktoriumi (D) paremta analizė (3.2 lentelė). Iš keturių žinomų S100A8 α -spiralių, tik IV spiralė (AA68–86) pasižymėjo D reikšme $> 0,68$, kas rodo jos potencialą sąveikauti su membranomis ar jas imituojančiais paviršiais. Svarbu pažymėti,

kad ši spiralė taip pat buvo identifikuota kaip transmembraninė sritis ir Eisenbergo diagramoje. **3.7 pav.** B ir C dalyse pavaizduota apo-S100A8 homodimero 3D struktūra, sugeneruota naudojant AlphaFold 3 serverį [244]. Baltymo struktūros paviršiuje esantys regionai pažymėti pagal jų hidrofobiškumo laipsnį bei elektrostatinį potencialą.

3.2 lentelė. S100A8 ir S100A9 baltymų α -spiralinės sritys su apskaičiuotu diskriminacijos faktoriumi (D), vidutiniu hidrofobiškumu ($\langle H \rangle$), hidrofobiniu momentu ($\langle \mu H \rangle$) ir bendroju krūviu (z).

	Seka	$\langle H \rangle$	$\langle \mu H \rangle$	z	D
S100A8	4ELEKALNSIIDVYHKYS ₂₀	0,345	0,597	-1	0,234 (NE)
	31RDDLKLLLETE ₄₁	-0,041	0,489	-1	0,132 (NE)
	51ADVWFKELD ₅₉	0,456	0,612	-2	-0,082 (NE)
	68FQEFLILVIKMGVAAHKK ₈₆	0,586	0,296	2	0,939 (TAIP)
S100A9	6SQLERNIETIINTFHQYSV ₂₄	0,406	0,455	-1	0,099 (NE)
	34QGEFKELVRKD ₄₄	-0,050	0,448	0	0,423 (NE)
	49LKKENKNEKVIEHIMEDLD ₆₇	0,017	0,404	-2	-0,279 (NE)
	76FEEFIMLMARLTWASHEKM ₉₄	0,619	0,339	-1	-0,010 (NE)

Įdomu tai, jog esant fiziologiniam pH (7,4), S100A8 baltymas įgyja neigiamą krūvį (-1,7), tačiau IV α -spiralė, identifikuota kaip potenciali transmembraninė sritis, tomis pačiomis sąlygomis pasižymi teigiamu krūviu. Ši teigiamai įkrauta sritis galėtų padėti sumažinti elektrostatinę atostumą tarp baltymo ir neigiamai įkrautų fosfolipidinių galvučių, taip užtikrinant sąveiką su anijoninėmis membranomis. Be to, N-galiniam regione nustatytas, su membranos paviršiumi sąveikaujantis, segmentas yra išsidėstęs I-oje EF-rankoje bei praturtintas bazinėmis aminorūgštimis. Ši bazinė sritis yra konservatyvi tarp S100 šeimos narių [275], o tai pabrėžia jos svarbą šių baltymų funkcionalumo reguliacijoje.

Atliekant S100A9 aminorūgščių sekos analizę, buvo identifikuotas vienas segmentas (AA4–23), potencialiai sąveikaujantis su membranos paviršiumi (**3.7 pav.** D–F). Šis segmentas, kaip ir S100A8 baltymo atveju, yra lokalizuotas N-galinėje EF-rankoje – konservatyvioje srityje, praturtintoje bazinėmis aminorūgštimis [275]. Be to, Eisenbergo diagramoje galime identifikuoti ir vieną potencialų baltymo transmembraninį segmentą (AA74–91). Šis nustatytas baltymo regionas yra orientuotas IV α -spiralėje ir apima C-

galinį kalę rišančios EF-rankos motyvą. Skirtingai nuo N-galinės EF-rankos, ši sritis pasižymi anijoninėmis savybėmis ir yra praturtinta rūgštinėmis aminorūgščių šoninėmis grupėmis. Vis dėlto, atsižvelgiant į diskriminacijos faktoriumi paremtos analizės duomenis, ši α -spirale nebuvo identifikuota kaip regionas, galintis sąveikauti su lipidų dvisluoksniais (**3.2 lentelė**). Nors diskriminacijos faktoriaus metodas pasižymi dideliu tikslumu (apie 86 %), jis ne visuomet leidžia tiksliai nustatyti transmembraninius baltymų segmentus [274]. Todėl, siekiant užtikrinti aukščiausią bioinformatinės analizės tikslumą, rekomenduojama apjungti abu minėtus metodus – tiek Eisenbergo diagramas, tiek diskriminacijos faktoriaus įvertinimą.

Apibendrinant, bioinformatinės analizės rezultatai atskleidė, kad abiejų tirtų S100 šeimos baltymų aminorūgščių sekose yra segmentų, kurie galėtų sąveikauti su lipidinių membranų paviršiumi. Vis dėlto, tik S100A8 baltymo struktūroje buvo aptiktas α -spiralinis segmentas, kurio potencialas perverti lipidų dvisluoksnio hidrofobinę šerdį buvo patvirtintas abiem bioinformatinės analizės metodais. Tuo tarpu, S100A9 baltymo atveju gauti rezultatai buvo kontraversiški – nors Eisenbergo diagramoje ir buvo identifikuotas transmembraninis segmentas, lokalizuotas IV baltymo α -spiraleje, diskriminacijos faktoriumi paremta analizė to nepatvirtino.

3.3.2 Naudotų lipidinių membranų charakteristikos

Laurdano fluorescuojantis zondas buvo pasitelktas šio darbo metu naudotų dirbtinių lipidinių membranų faziniam būviui įvertinti. Pažymėtina, kad trijų iš šešių tirtų lipidinių sistemų fazinės būsenos yra plačiai aprašytos mokslinėje literatūroje. Dvikomponentės sistemos, sudarytos iš cviterjoninio DOPC ir cholesterolio (6/4 mol. santykiu), atveju, literatūroje pateikiami duomenys yra kontraversiški: vienuose šaltiniuose yra išskiriama vienalytė fazė, savo biofizikinėmis savybėmis prilygstanti L_o būsenai [276], o kituose – aprašomas L_o ir L_d fazių koegzistavimas [277]. Pastaruoju atveju fazių atsiskyrimas galėtų būti aiškinamas cholesterolio sukeliama lokaliu dvisluoksnio sukietėjimu [278]. Tuo tarpu, sistema, sudaryta iš cviterjoninio DOPC ir anijoninio DOPS (6/4), kurių fazinio virsmo temperatūros (T_m) yra -17 ir -11 °C, atitinkamai, kambario temperatūroje formuoja vienalytę L_d fazę [279]. Galiausiai, DOPC/DPPC (6/4) membranų atveju, dėl sočiųjų DPPC angliavandenilinių grandinių, šio fosfolipido T_m siekia $41,3$ °C, o kambario temperatūroje yra stebimas atsiskyrimas tarp L_d ir L_β fazių [280]. Vis dėlto, sudėtingesnių sistemų, tokių kaip kiaulės smegenų lipidų ekstraktas, DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2; darbe įvardijama kaip DOPS 30 %) ar

DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 (4,4/2/3/0,5/0,1), fazinės savybės iki šiol nebuvo aprašytos mokslinėje literatūroje. Kambario temperatūroje įvertinus skirtingų lipidinių kompozicijų bendrosios poliarizacijos (GP) parametrus buvo nustatyta:

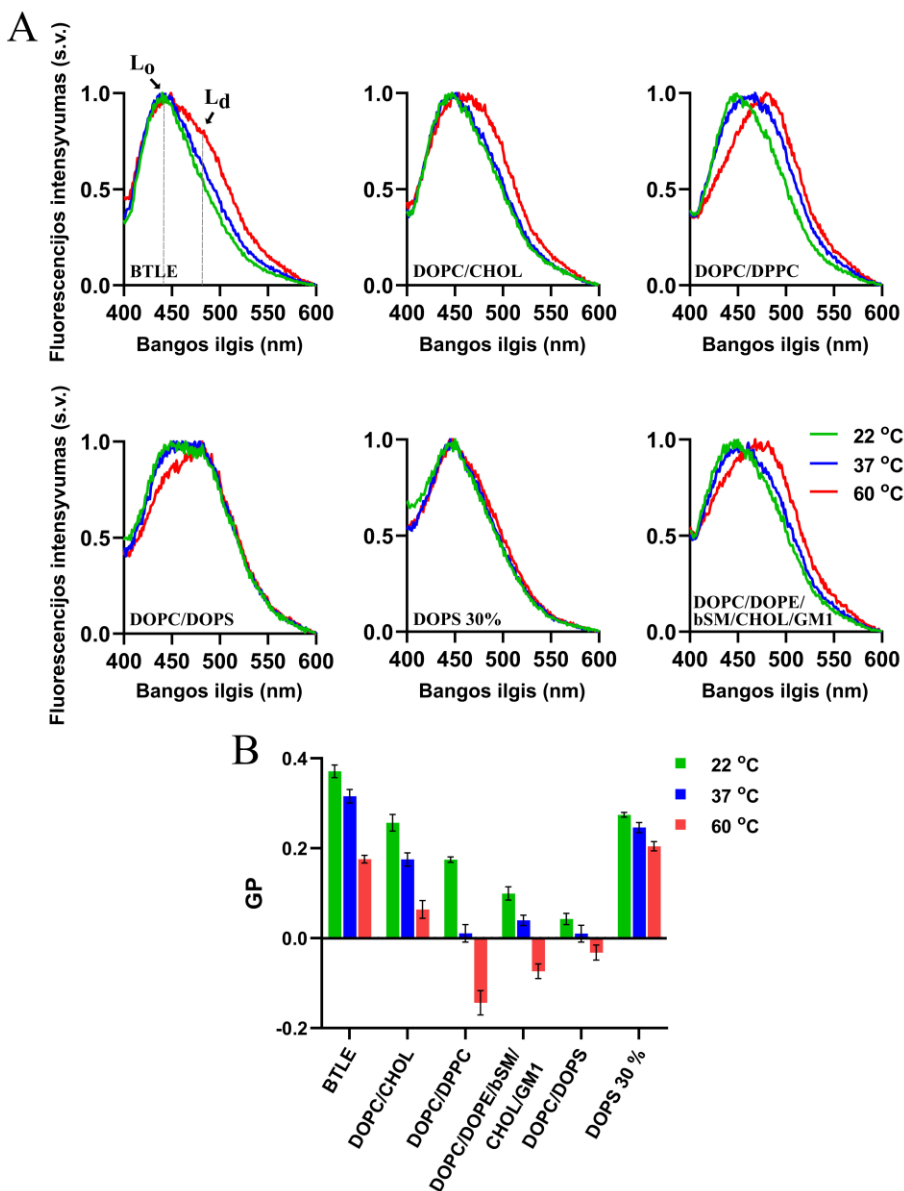
I. DOPC/CHOL ir DOPC/DPPC sistemų GP reikšmės siekė $0,26 \pm 0,02$ ir $0,17 \pm 0,01$, atitinkamai (**3.8 pav.**). Šios vertės dar kartą patvirtina L_d ir L_o/L_β fazių koegzistavimą abiejose sistemose. Nors DOPC kiekis minėtose kompozicijose yra vienodas, liposomos, turinčios 40 % cholesterolio, pasižymėjo didesniu standumu palyginus su liposomomis, sudėtyje turinčiomis 40 % DPPC. Šie duomenys sutampa su literatūros duomenimis, įrodančiais, kad cholesterolis yra pagrindinis alkilinių grandinių tvarkos reguliatorius ir stipriau veikia dvisluoksnio fluidiškumą bei Laurdano spektrinį atsaką nei fosfolipidai, turintys sočiąsias hidrofobines uodegėles (pvz.: DPPC) [218].

II. Keturių komponentų bei neigiamą krūvį turinčioje DOPC/DOPE/DOPS/CHOL sistemoje, GP reikšmė siekė $0,27 \pm 0,01$. Nors cholesterolio kiekis šioje sistemoje yra perpus mažesnis nei DOPC/CHOL liposomų atveju, vidutinis membranos fluidiškumas nepakito, o GP reikšmė vis dar rodo L_o ir L_d fazių koegzistavimą.

III. DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 penkiakomponentėje membranoje nustatyta GP reikšmė – $0,10 \pm 0,01$ – rodo dviejų fazių (L_o ir L_d) būseną. Anksčiau atlikti tyrimai rodo, kad bSM, CHOL ir GM1 sudėtyje turinčios membranos formuoja L_o fazės domenų, kurių lipidinė sandara artima natūraliems lipidų plauštams *in vivo* [281].

IV. BTLE liposomose nustatyta GP reikšmė – $0,37 \pm 0,01$ – buvo didžiausia tarp visų tirtų sistemų. Tai rodo aukštą lipidų tvarkos laipsnį ir galimą L_o fazės dominavimą šioje biologinės kilmės membranoje.

V. Galiausiai, DOPC/DOPS dvisluoksniuose nustatyta GP reikšmė siekė $0,04 \pm 0,01$. Nors, įvertinus pavienių lipidų T_m vertes, galime nuspėti, jog sistema turėtų egzistuoti vienalytėje L_d fazėje, apskaičiuota GP reikšmė yra didesnė už teorinę, grynos L_d fazės, vertę ($\sim -0,1$) [218]. Nustatyta, jog DOPC/DOPS dvisluoksniuose, DOPS molekulės yra linkusios formuoti kompaktiškesnius nanodomenus, kuriuose alkilinių grandinių tvarka yra didesnė [282]. Be to, dėl didesnio poliškumo ir neigiamo krūvio, DOPS sudaro stipresnius ryšius su vandens molekulėmis nei DOPC, o tai lemia sulėtėjusią vandens molekulių dinamiką šiuose dvisluoksniuose [283]. Taigi, šie aptarti veiksniai galėtų paaiškinti didesnę GP vertę DOPC/DOPS membranose, palyginus su literatūroje įvardijama verte, nustatyta vienkomponenčiuose DOPC dvisluoksniuose.



3.8 pav. Membranų fazinių būsenų įvertinimas. (A) Laurdano emisijos spektrai, užregistruoti 22, 37 ir 60 °C temperatūrose. Fluorescencijos emisijos maksimumai ties 440 ir 490 nm, atitinkantys skystąją tvarkingą (L_0) ir skystąją netvarkingą (L_d) fazes, atitinkamai, pažymėti punktyrinėmis linijomis. (B) Nurodytų lipidinių kompozicijų bendrosios poliarizacijos (GP) parametrai. DOPS 30 % žymi DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2) lipidinę kompoziciją.

Kylant temperatūrai, visais atvejais buvo stebimas Laurdano emisijos maksimumo poslinkis į raudonąją spektro sritį, kartu su atitinkamu GP verčių sumažėjimu, kas rodo sistemų perėjimą į fluidiškesnę fazę. Apibendrinant, sistemų GP parametų analizė atskleidžia ne tik bendrą fazinę būseną, bet ir

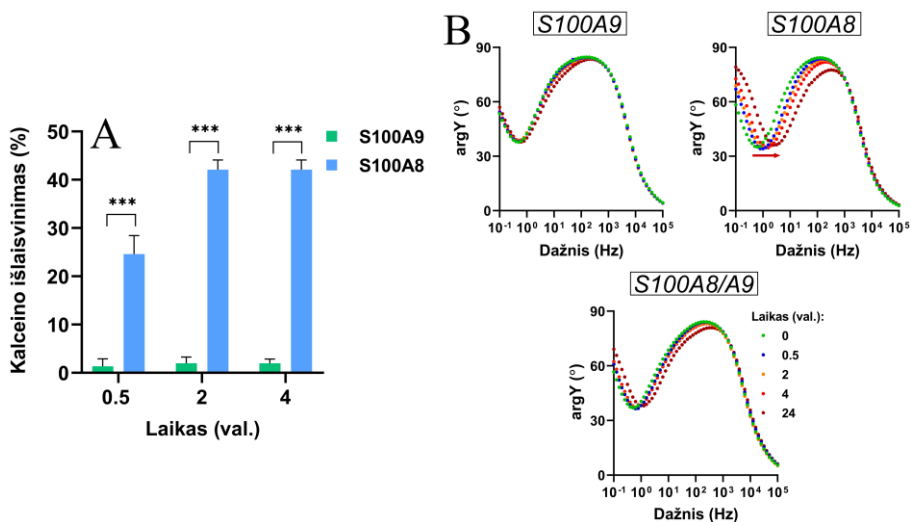
leidžia įvertinti skirtingų komponentų – ypač cholesterolio, nesočiųjų ir krūvį turinčių lipidų, tokių kaip DPPC ar DOPS – įtaką membranos fazinėms ypatybėms.

3.3.3. Sąveika su kiaulės smegenų lipidų ekstrakto membrana

Ankstesnėse šio darbo dalyse nustatėme S100 šeimos baltymų fragmentus, pasižyminčius potencialiomis sąveikomis su lipidų dvisluoksniu (**žr. skyrelį 3.3.1**). Šioje darbo dalyje, taikant skirtingas modelines plazminės membranos sistemas ir įvairius eksperimentinius metodus, siekta nustatyti, ar baltymų sąveika su lipidais lemia membranų integralumo bei struktūrinius pokyčius. Pažymėtina, jog ląstelės plazminė membrana yra itin kompleksiška ir heterogeniška struktūra, pasižyminti didele lipidine įvairove. Dėl šios priežasties, siekiant tiksliau atkartoti neuronų membranų struktūrinės ir biofizikines ypatybes, pirminiame šio tyrimo etape buvo pasirinkta sistema, sudaryta iš natūralaus kiaulės smegenų lipidų ekstrakto. Ši kompozicija atspindi fiziologinį neutralių ir anijoninių fosfolipidų santykį, būdingą neuronų membranoms, tačiau jos tiksli sudėtis nėra pilnai žinoma. Tiekėjo pateikti duomenys teigia, kad BTLE kompoziciją sudaro apie 9,6 % fosfatidilcholino, 16,7 % fosfatidiletanolamino, 10,6 % fosfatidilserino, o 58,7 % komponentų lieka nenustatyti.

Vienas iš plačiausiai taikomų metodų lipidinių membranų pažeidimams vertinti – fluorescuojančio žymens (pvz.: kalceino) išlaisvinimo iš liposomų analizė. Atsižvelgiant į trumpalaikį liposomų stabilumą [284], membranos pažeidų įvertinimui buvo pasirinktas 4 val. inkubacijos laikotarpis. Pažymėtina, kad šiuo laikotarpiu savaiminis kalceino išlaisvinimas iš cholesterolio turinčių liposomų neviršijo 20 %. Tuo tarpu liposomos, sudėtyje neturinčios cholesterolio, pasižymėjo itin mažu struktūriniu stabilumu, o išlaisvinto kalceino kiekis 4 val. laikotarpyje kai kuriais atvejais siekė net 50 %. Dėl šios priežasties, siekiant įvertinti tik baltymo sukeltą poveikį, visi rezultatai buvo koreguoti, eliminuojant foninį dažo išlaisvinimą iš liposomų. Rezultatų korekcijai taikytos skaitinės vertės yra pateiktos **5 priede**. Paveikus kiaulės smegenų lipidų ekstrakto pagrindu suformuotas liposomas S100A9 baltymu, dvisluoksniu pažeida nebuvo nustatyta, o per 4 val. išlaisvinto kalceino kiekis siekė vos $2,0 \pm 0,9$ % (**3.9 pav. A**). Pažymėtina, jog ryški membranos pažeida buvo stebima, kai šios kompozicijos liposomos buvo veikiamos S100A8 baltymu. Nustatyta, kad membranos pažeidos mastas priklausė nuo inkubacijos trukmės: per pirmąsias

0,5 val. išlaisvinto kalceino kiekis siekė $24,6 \pm 3,8$ %, o po 4 val. – net $42,1 \pm 2,0$ %.



3.9 pav. S100 baltymų poveikis kiaulės smegenų lipidų ekstrakto membranos integralumui. Membranos pažeida įvertinta matuojant kalceino išlaisvinimą iš liposomų (A) ir dvisluksnio dielektrinių savybių pokyčius EIS metodu (B). S100A9 atveju, kalceino išlaisvinimo eksperimentai atlikti PBS buferiniame tirpale, 22 °C, naudojant 5 μ M baltymo koncentraciją. S100A8 kalceino išlaisvinimo tyrimai atlikti HEPES buferiniame tirpale, 37 °C, naudojant 10 μ M baltymo koncentraciją. Visi EIS matavimai atlikti 22 °C temperatūroje HEPES buferiniame tirpale, naudojant 10 μ M S100 baltymų koncentracijas. Statistinis reikšmingumas žymimas: *** ($p \leq 0,001$).

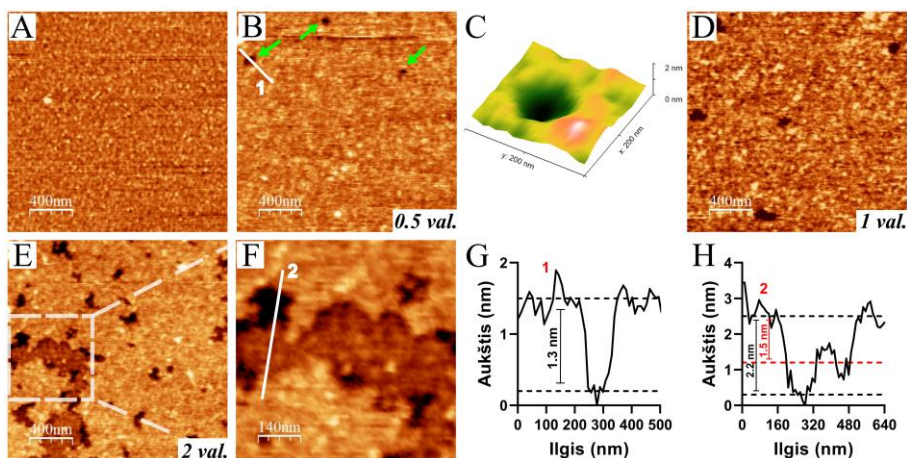
Svarbu paminėti, kad kalceino išlaisvinimas detektuojamas tik tuo atveju, jei membranos defekto (integralumo pažeidos) dydis viršija 1,3 nm [285]. Fosfatidilcholino hidrofilinės galvutės užimamas plotas yra 0,71 nm² [286], taigi defektas membranoje turi būti mažiausiai dviejų lipidų molekulių dydžio, jog būtų detektuojamas kalceino išlaisvinimo metodika. Tačiau jonų judėjimui per lipidų dvisluoksnį pakanka ir gerokai mažesnių pažeidimų – pavyzdžiui, natrio jono hidrodinaminis spindulys siekia vos 0,19 nm [287]. Taigi, šiuo atveju, lokalus, mažesnis nei 1,3 nm dydžio, defektai yra eliminuojami ir tikras, potencialiai toksiškas, baltymo poveikis vis dar lieka nenustatytas. Siekiant išvengti šio metodologinio apribojimo, membranų, suformuotų ant kietojo substrato, dielektrinės savybės buvo vertinamos elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu, leidžiančiu aptikti net ir pavienių jonų judėjimą per lipidų dvisluoksnį. Šįkart buvo pasirinktas ilgesnis – 24 val. – stebėjimo laikotarpis. Lipidų dvisluoksnių izoliacinės savybės gali būti charakterizuojamos pagal minimumo tašką ($f_{\min}$) Bode spektruose, atspindinčiuose fazės kampo priklausomybę nuo dažnio (**3.9 pav. B**). Nustatyta, kad baltymais nepažeistų, kiaulės smegenų lipidų ekstrakto

pagrindu suformuotų, membranų spektrai pasižymėjo $f_{\min}$ vertėmis, svyruojančiomis tarp 0,5 ir 0,6 Hz, kas įrodo itin mažą defektų tankį šviežiai suformuotuose dvisluoksniuose [228]. Taip pat įvertinta, jog visų, šiame darbe taikytų, lipidinių kompozicijų membranos išliko stabilios 4 val. bėgyje, o po 24 val. inkubacijos buvo stebėti tik nežymūs spektriniai pokyčiai – $f_{\min}$ poslinkis neviršijo 2 Hz (**6 priedas**). Šis poslinkis gali būti susijęs su natūralių defektų persitvarkymu membranos struktūroje.

Pažymėtina, kad S100A9 baltymo atveju, kalceino išlaisvinimo ir EIS tyrimuose buvo naudojami skirtingų sudėčių buferiniai tirpalai. PBS, naudotas kalceino išlaisvinimo eksperimentuose, pasižymėjo didesne jonine jėga, kuri galėjo spartinti baltymo agregaciją [288], taip potencialiai sąlygojant skirtingus sąveikų su lipidinėmis membranomis mechanizmus. Vis dėlto, nepaisant buferinių tirpalų skirtumų, EIS rezultatai koreliavo su kalceino išlaisvinimo duomenimis, kadangi membranos pažaida abiem atvejais fiksuota nebuvo. Dvisluoksniu dielektrinių savybių pokyčiai nebuvo nustatyti ir kiaulės smegenų lipidų ekstrakto pagrindu suformuotas membranas paveikus baltymų heterokompleksu S100A8/A9. Įdomu tai, jog nepaisant ryškios dvisluoksniu integralumo pažaidos, nustatytos kalceino išlaisvinimo metodu, S100A8 baltymas sukėlė tik minimalius membranų dielektrinių savybių pokyčius, o per 24 val. inkubacijos laikotarpį, $f_{\min}$ vertės poslinkis neviršijo 2 Hz. Rezultatų neatitikimą tarp dviejų taikytų matavimo metodikų galėjo lemti tiek skirtingos eksperimentinės sąlygos, tiek naudojamų modelių sistemų struktūriniai skirtumai. EIS matavimai buvo atlikti kambario temperatūroje (22 °C), o kalceino išlaisvinimo eksperimentai – 37 °C temperatūroje, galėjusioje padidinti membranos fluidiškumą (**žr. 3.3.2 skyrelį**). Be to, liposomos, priešingai nei plokštuminės membranos, pasižymi kreivumu, kuris nulemia didesnę lipidų susipakavimo defektų kiekį [289], galintį palengvinti baltymo įsiterpimą į dvisluoksnį. Galiausiai, ant kieto paviršiaus suformuotos lipidinės membranos pasižymi didesniu mechaniniu stabilumu [290], todėl gali būti atsparesnės baltymo sukeliams pokyčiams. Taigi, nepaisant aukšto EIS metodo jautrumo, didesnė pažaida, nustatyta kalceino išlaisvinimo būdu liposomose, tikėtina, buvo nulemta būtent šių aptartų veiksnių kombinacijos.

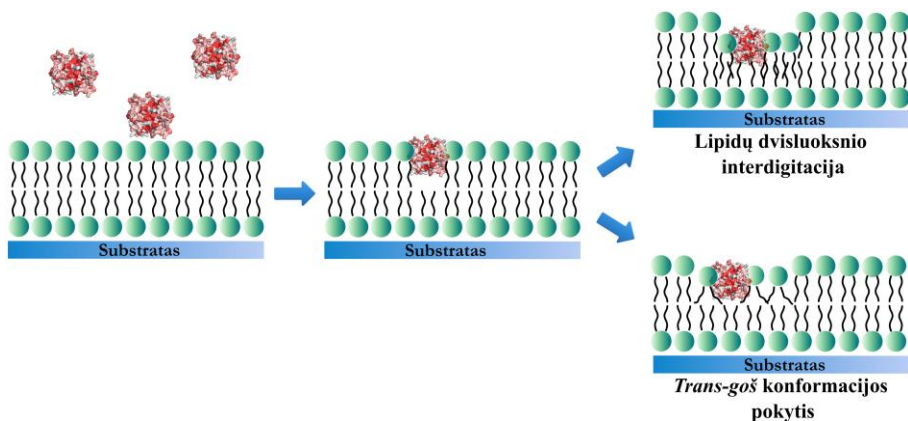
Anksčiau aptarti metodai, tokie kaip EIS ir kalceino išlaisvinimo tyrimai, suteikia globalią ir apibendrintą informaciją apie bendrą membranos būklę, tačiau neatskleidžia specifinių baltymo ir lipido sąveikos mechanizmų. Siekiant geriau suprasti šiuos procesus, buvo pasitelktas atominės jėgos mikroskopijos metodas, leidžiantis atlikti lokalizuotą, didelės raiškos membranos paviršiaus vizualizaciją bei stebėti konkrečių dvisluoksniu regionų morfologinius pokyčius nanomasteliu.

Nepaisant to, jog Laurdano spektroskopijos duomenys atskleidė, kad BTLE kompozicijos liposomos pasižymi L_o ir L_d fazių koegzistavimu, AJM analizė parodė homogenišką membranos paviršiaus morfologiją be aiškių fazių atsiskyrimo ženklų (**3.10 pav. A**). Suformuotų prikabinutų dvisluoksnių lipidinių membranų storis siekė 5,3 nm (**7 priedas**), kas atitinka literatūroje nurodytas BTLE dvisluoksnių storio reikšmes [291]. Paveikus BTLE dvisluoksnius S100A9 baltymu, buvo stebimas spontaniškas defektų susidarymas bei jų progresavimas laike (**3.10 pav. B–F**). Po 30 min. inkubacijos susiformavo pirmieji pavieniai, nedidelio pločio (< 100 nm) defektai, kurių gylis siekė $1,3 \pm 0,2$ nm. Praėjus 2 val., buvo stebima dar viena, didesnio pločio, defektų populiacija, pasižymėjusi didesnėmis gylio vertėmis – $2,2 \pm 0,3$ nm (**3.10 pav. G–H**). Kadangi abiejų tipų defektų gylio vertės yra mažesnės už lipidų dvisluoksnių ar net vieno monosluoksnių storį, galima teigti, jog baltymas veikia membraną ne porų formacija ar detergento efektu pagrįstu mechanizmu. Šią prielaidą patvirtina ir EIS bei kalceino išlaisvinimo duomenys, kurie rodo, kad, paveikus BTLE dvisluoksnius S100A9 baltymu, membranos laidumas reikšmingai nepasikeičia (**3.9 pav.**). Svarbu paminėti, kad stebimo efekto atsikartojamumas buvo patikrintas naudojant kitą modelinę sistemą – ant kieto paviršiaus suformuotus lipidų dvisluoksnius. Paveikus šiuos dvisluoksnius S100A9 baltymu, gauti rezultatai buvo tapatūs: AJM metodu pat buvo stebimi lokalūs membranos aukščio sumažėjimai (**8 priedas**).



3.10 pav. S100A9 baltymo sąveikų su kiaulės smegenų lipidų ekstrakto membrana vizualizacija. Membranos morfologijos analizė atlikta prieš poveikį baltymu (A) ir praėjus 0,5 (B, C), 1 (D) ir 2 val. (E, F) po S100A9 injekcijos. Vaizdų laukas $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ (C dalyje – $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}^2$, F – $0,7 \times 0,7 \mu\text{m}^2$). (G, H) Paviršiaus topografijos pjūviai, atitinkantys (B) ir (F) vaizduose pažymėtas sritis, atitinkamai. Matavimai atlikti PBS buferiniame tirpale, 22 °C, naudojant 5 μM S100A9 koncentraciją.

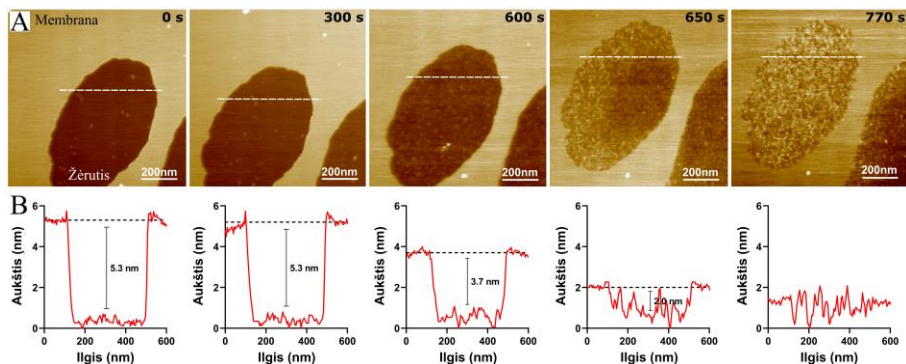
Remiantis stebėtais morfologiniais pokyčiais, galima manyti, jog S100A9 įsiterpia į hidrofiline dvisluoksnio sritį, sukeldamas lipidų molekulių lateralinį išsiplėtimą. Šis procesas gali progresuoti į membranos suplonėjimą, kuris vyksta dviem potencialiais mechanizmais: *I.* lipidų angliavandenilių grandinių konformaciniu perėjimu iš *trans* į *goš* formą; *II.* angliavandenilinių grandinių persidengimu tarp abiejų monosluoksnių (interdigitacija) [291] (**3.11 pav.**). Reikšminga tai, kad BTLE sudėtyje yra santykinai daug PE – kūginės formos lipido, kuris gali destabilizuoti membranos struktūrą ir sukelti lokalią mechaninę įtampą. Tokiuose, PE praturtintuose, regionuose, kur lipidų galvucių susipakavimas yra mažiau kompaktiškas, susidaro mažo dydžio struktūriniai defektai (pakavimosi netobulumai) [292], kurie, tikėtina, leidžia S100A9 lengviau įsiterpti į dvisluoksnį ir inicijuoti stebėtus membranos struktūrinius pokyčius.



3.11 pav. Siūlomas S100A9 baltymo sąveikos su kiaulės smegenų lipidų ekstrakto membrana mechanizmas. Baltymas sukelia lokalius membranos storio sumažėjimus, kurie galėtų būti paaiškinami lipidų molekulių interdigitacija (persikryžiavimu) arba fosfolipidinių uodegėlių konformacijos pokyčiais (perėjimu iš *trans* į *goš* būseną).

Siekiant įvertinti S100A8 baltymo sukeltus membranos morfologijos pokyčius, buvo pasitelkta greitaieigė atominės jėgos mikroskopija (HS-AJM). Skirtingai nuo S100A9 baltymo tyrimų, šiuo atveju buvo naudojama ne prikabinčių, o ant kieto paviršiaus suformuotų lipidinių membranų sistema. Išliejus vienasluoksnes liposomas ant atomiškai lygaus žėručio paviršiaus, vizualizacijai buvo pasirinkta zona, kurioje aiškiai matėsi tiek membranos, tiek substrato paviršiaus sritys. Paveikus ant kietojo paviršiaus suformuotą membraną S100A8, buvo stebimas baltymo kaupimasis aplink lipidų dvisluoksnį, srityse, atitinkančiose neigiamai įkrautą žėručio paviršių (**3.12 pav.** A, B). S100A8 sankaupos ant substrato paviršiaus buvo aiškiai matomos jau po 10 min. inkubacijos, o per 12,8 min. laikotarpį, baltymas pilnai padengė visą žėručio paviršių. Pažymėtina, kad per visą stebėjimo laikotarpį

(~ 13 min.) nebuvo užfiksuota jokių aiškių lipidų dvisluoksnio morfologijos pokyčių ar baltymo sąveikos membrana požymių. Tikėtina, kad S100A8 afiniškumas šios kompozicijos plokštuminiam lipidų dvisluoksniui buvo nepakankamas, jog sukeltų membranos integralumo pažeidimus.



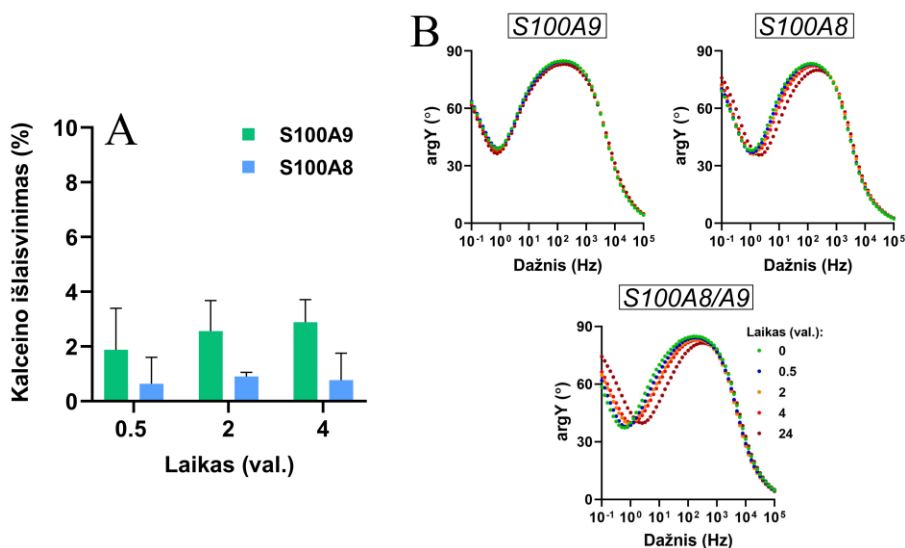
3.12 pav. S100A8 baltymo sąveikos su kiaulės smegenų lipidų ekstrakto membrana vizualizacija. (A) HS-AJM topografijos vaizdai, atspindintys lipidų dvisluoksnio morfologiją prieš S100A8 baltymo poveikį (0 s) ir skirtingais laiko momentais po baltymo injekcijos. Vaizdų laukas $1 \times 1 \mu\text{m}^2$. (B) Topografijos pjūviai, atitinkantys vaizduose baltomis punktyrinėmis linijomis pažymėtas sritis. Tyrimai atlikti HEPES buferiniame tirpale, 22 °C temperatūroje, naudojant 10 μM S100A8 koncentraciją.

Apžvelgus S100 šeimos baltymų sąveikų su kiaulės smegenų lipidų ekstrakto membrana rezultatus, galime teigti, jog S100A9 baltymas įsiterpia į lipidų dvisluoksnį, taip sutrikdydamas lipidų molekulių organizaciją bei sukeldamas lokalius membranos storio sumažėjimus. Įdomu tai, jog stebėti paviršiaus morfologijos pokyčiai nebuvo lydimi membranos laidumo verčių padidėjimo. Tuo tarpu, atliekant tyrimus su S100A8 baltymu, nors ir buvo fiksuotas ženklus liposomų integralumo praradimas, EIS ir HS-AJM duomenys to nepatvirtino. Šiuo atveju, tikėtina, jog rezultatų neatitikimas tarp matavimo metodikų buvo nulemtas tiek nevienodų temperatūros sąlygų, tiek struktūrinių skirtumų tarp naudotų membranų modelinių sistemų.

3.3.4. Sąveika su cviterjonine membrana

Ankstesnėje šio tyrimo dalyje parodėme, jog S100 šeimos baltymai gali sąveikauti su kiaulės smegenų lipidų ekstrakto pagrindu suformuotomis membranomis. Siekiant identifikuoti konkrečius lipidinius komponentus, lemiančius **3.3.3 skyrelyje** aptartas sąveikas, tolimesnėse šio darbo dalyse buvo pasitelktos mažiau kompleksiškos bei tiksliai žinomų sudėčių modelinės sistemos. Vienos jų – cviterjoninės membranos, sudarytos iš DOPC ir cholesterolio. Atsižvelgiant į tai, kad cholesterolis ir fosfatidilcholinai sudaro

net iki 70 % žinduolių plazminės membranos lipidų masės (žr. skyrelį 1.4), DOPC/CHOL dvisluoksniai yra vieni plačiausiai taikomų modelių, siekiant atkartoti eukariotinių ląstelių plazminės membranos biofizikines savybes. Nustatyta, jog paveikus cviterjonines liposomas S100A8 ir S100A9, kalceino išlaisvinimas per 4 val. laikotarpį neviršijo 4 %, kas leidžia daryti prielaidą apie minimalią baltymų sukeltą membranos integralumo pažaidą (3.13 pav. A).

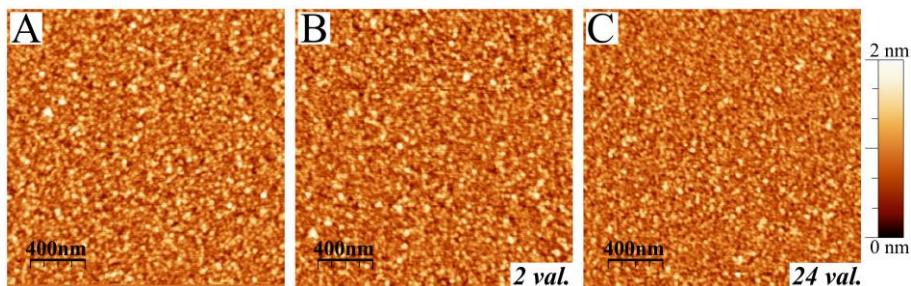


3.13 pav. S100 baltymų poveikis cviterjoninės membranos integralumui. Baltymų sukeliama membranos pažaida buvo vertinama stebint kalceino išlaisvinimą iš liposomų (A) bei dvisluoksnio dielektrinių savybių pokyčius EIS metodu (B). Membranų dielektrinės savybės vertintos prieš poveikį baltymų (žalia kreivė), taip pat praėjus 0,5 (mėlyna), 2 (oranžinė), 4 (raudona) ir 24 (tamsiai raudona) val. inkubacijos su S100A9, S100A8, S100A8/A9 baltymais.

Atsižvelgiant į kalceino išlaisvinimo metodikos ribotumą aptikti itin smulkius membranos pažeidimus, S100 šeimos baltymų poveikis cviterjoninių dvisluoksnių integralumui papildomai buvo vertintas taikant elektrocheminio impedanso spektroskopiją. Paveikus cviterjonines membranas S100A8 ir S100A9 baltymais, per 24 val. laikotarpį nebuvo užfiksuoti reikšmingi dvisluoksnių dielektrinių savybių pokyčiai, o $f_{\min}$ vertės poslinkis per visą inkubacijos laiką neviršijo 1 Hz (3.13 pav. B). Kadangi statistškai reikšmingų pokyčių nebuvo detektuota ir kalceino išlaisvinimo iš liposomų vertėse, tai dar kartą patvirtina cviterjoninių sistemų atsparumą S100A8 ir S100A9 sukeltai pažaidai. Vis dėlto, paveikus lipidų dvisluoksnį S100A8/A9 heterokompleksu, per 24 val. laikotarpį buvo nustatyti ryškesni laidumo pokyčiai, nors $f_{\min}$ poslinkis neviršijo 2 Hz. Atsižvelgiant į tai, kad nežymūs spektriniai pokyčiai (< 2 Hz) gali būti stebimi ir baltymo

nepaveiktuose dvisluoksniuose, nustatytus membranos dielektrinius pokyčius sunku vienareikšmiškai priskirti baltymų heterokomplekso sukeltai pažaidai.

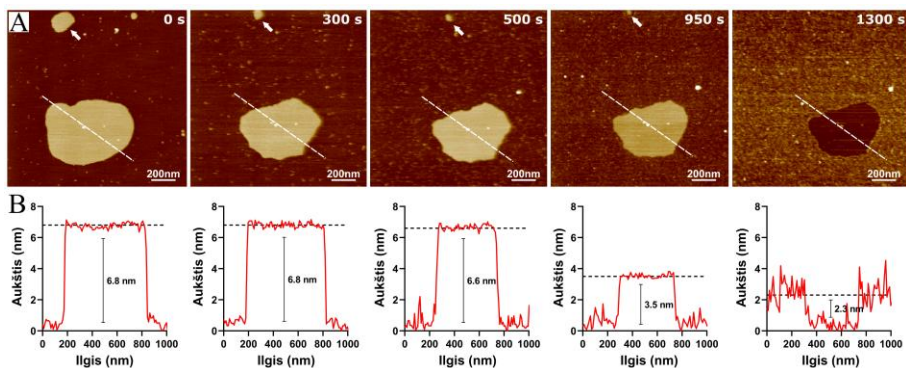
Cviterjoninių lipidinių membranų sąveikų su S100 šeimos baltymais ypatybės toliau buvo tyrinėjamos pasitelkiant AJM metodus. Ankstesni šio tyrimo rezultatai parodė, jog DOPC/CHOL kompozicijos lipidinės sistemos, dėl cholesterolio sukulto lokalaus dvisluoksnio sukietėjimo [278], formuoja L_o ir L_d fazes (**žr. 3.3.2 skyrelį**). Tačiau, atlikus membranos morfologijos analizę, nustatyta, jog šių lipidinių dvisluoksnių paviršius yra homogeniškas, išskyrus iki 2 nm aukščio nelygumus, susidariusius dėl ant žėručio pagrindo užgarinto aukso suformuotų „nanosalelių“ (**3.14 pav. A**). Paveikus suformuotus dvisluoksnius S100A9 baltymu, membranos buvo pakartotinai vizualizuotos po 2 ir 24 val. inkubacijos (**3.14 pav. B, C**). Per šį laikotarpį reikšmingų paviršiaus morfologijos pokyčių nepastebėta, o tai atitinka kalceino išlaisvinimo ir EIS rezultatus, įrodančius šios lipidinės kompozicijos atsparumą S100A9 sukeltai pažaidai. Siekiant lipidų dvisluoksnio pokyčius įvertinti ne tik vizualiai, bet ir kiekybiškai, buvo apskaičiuojamas vidutinis paviršiaus šiurkštumas (R_a). Pradinė R_a reikšmė siekė 0,35 nm ir per 2 val. inkubaciją su S100A9 baltymu visiškai nepakito (**9 priedas**), taip dar kartą patvirtinant šios kompozicijos membranų struktūrinį stabilumą.



3.14 pav. S100A9 sąveikos su cviterjonine lipidine membrana vizualizacija. Membranos morfologija buvo analizuota AJM metodu prieš poveikį baltymu (A), taip pat praėjus 2 (B) ir 24 val. (C) po baltymo injekcijos. Vaizdų laukas $2 \times 2 \mu\text{m}^2$. Matavimai atlikti PBS buferiniame tirpale, esant 22°C temperatūrai, naudojant $5 \mu\text{M}$ S100A9 baltymo koncentraciją.

Kaip ir minėta anksčiau, S100A8 baltymo sąveikų su membranomis vizualizacijai buvo pasitelkti ant kietojo paviršiaus suformuoti lipidų dvisluoksniai. Nustatyta, jog pradinė, baltymu dar nepaveikta, membrana pasižymėjo homogenišku ir lygiu paviršiumi, o dvisluoksnio storis siekė 6,8 nm (**3.15 pav. A**). Kaip ir kiaulės smegenų lipidų ekstrakto atveju, paveikus suformuotą cviterjoninį lipidų dvisluoksnį S100A8, laike buvo stebima baltymo adsorbcija ant žėručio paviršiaus. Nustatyta, jog žėručio paviršius buvo pilnai padengtas baltymu per 15,8 min. matavimo laikotarpį, o

po 21,6 min. inkubacijos, paviršiuje susiformavo ryškios baltymų sankaupos, sukėlusios iki 2,3 nm aukščio iškyšas aplink membraną (**3.15 pav. B**). Atlikus ant žėručio adsorbuotų baltymų morfologijos analizę, nustatyta, jog dauguma dalelių buvo sferinės formos, o jų aukštis svyravo nuo 1,1 iki 6,5 nm (**10 priedas**). Atsižvelgiant į tai, kad šviežiai išgryninto S100A8 skersmuo, priklausomai nuo matavimo sąlygų ir metodikos, gali svyruoti nuo $0,6 \pm 0,2$ iki $4,6 \pm 0,3$ nm (**žr. skyrelį 3.1.1**), galima daryti prielaidą, jog ant žėručio paviršiaus adsorbuotos struktūros atspindi ne tik monomerines ar homodimerines, bet ir aukštesnio oligomerizacijos laipsnio, baltymo formas. Gautą rezultatą galima paaiškinti literatūros duomenimis, įrodančiais, jog mažos molekulinės masės formų jungimasis prie paviršiaus didina lokalią baltymo koncentraciją, taip spartinant agregacijos procesą [293]. Taip pat tirpale, prie neigiamai įkrauto paviršiaus, yra lokalizuojami H^+ katijonai, taip sąlygojant lokalų pH sumažėjimą substrato–skysčio sąlyčio riboje [294] bei skatinant amiloidinių baltymų denatūraciją [295].



3.15 pav. S100A8 baltymo sąveikos su cviterjonine lipidine membrana vizualizacija. (A) HS-AJM topografijos vaizdai, atspindintys membranos morfologiją prieš S100A8 baltymo poveikį (0 s) ir skirtingais laiko momentais po baltymo injekcijos. Vaizdų laukas $1,5 \times 1,5 \mu m^2$. (B) Topografijos pjūviai, atitinkantys vaizduose baltomis punktyrinėmis linijomis pažymėtas sritis. Tyrimai atlikti HEPES buferiniame tirpale, esant 22 °C temperatūrai, naudojant 10 μM S100A8 baltymo koncentraciją.

Svarbu pabrėžti, kad be S100A8 baltymo adsorbcijos ant neigiamai įkrauto substrato paviršiaus, šiame tyrime taip pat buvo užfiksuota baltymo sąveika su cviterjonine membrana. Tai patvirtina visiškas 215 nm skersmens lipidų salelės suardymas per 15,8 min. laikotarpį (**žr. 3.15 pav. A**, pažymėta baltomis rodyklėmis). Per atitinkamą inkubacijos laikotarpį buvo stebimas ir centrinės lipidų salelės paviršiaus ploto sumažėjimas 35 %. HS-AJM topografijos vaizdai rodo, kad S100A8 sukeltas membranos ardymas prasidėjo nuo lipidų dvisluoksniu kraštų, o tai leidžia manyti, jog lokaliūs lipidų susipakavimo netolygumai membranoje gali veikti kaip iniciacijos

taškai baltymo lemiamai pažaidai. Toks membranos ardymo pobūdis, kai lipidų molekulės yra išplėšiamos iš dvisluoksnio aplinkos, yra įvardijamas kaip detergento mechanizmas. Ši prielaida grindžiama literatūros duomenimis, rodančiais analogiškų procesų vyksmą, kai lipidų dvisluoksniai yra veikiami nejoniniu detergentu Triton X-100, kai jo koncentracija viršija kritinę micelių susidarymo koncentraciją [296]. Detergento mechanizmu grįstas dvisluoksnio ardymas buvo aprašytas AJM metodais tiriant ir antimikrobinių peptidų [297], A β [123], fosfolipazių A₂ ir D [298,299] bei prionų baltymų [300] sąveiką su membranomis. Nors mūsų tyrimuose šis reiškinys buvo stebėtas tik modelinėse sistemose, tikėtina, kad analogiški procesai galėtų vykti ir gyvuose organizmuose. Ląstelių plazminėje membranoje, baltymams sąveikaujant su lipidų dvisluoksniumi, gali atsirasti lipidų molekulių susipakavimo defektų, kurie struktūriškai primintų mūsų stebėtų lipidinių salelių kraštus ir galėtų veikti kaip iniciacijos taškai S100A8 sukeliama membranos pažaidai.

Apžvelgus S100 šeimos baltymų sąveiką su cviterjoninėmis membranomis rezultatus, galime teigti, jog S100A9 nepažeidžia šios kompozicijos dvisluoksnio integralumo. Šis rezultatas buvo patvirtintas ir AJM tyrimų duomenimis – per 24 val. laikotarpį nebuvo stebėta nei membranos morfologijos pokyčių, nei baltymo sąveikos su lipidų dvisluoksniumi požymių. Priešingai, S100A8 baltymo atveju, HS-AJM tyrimuose buvo užfiksuotas cviterjoninės membranos ardymas, nepaisant to, jog EIS duomenys neparodė statistiškai reikšmingų šios kompozicijos dvisluoksnio dielektrinių savybių pokyčių net ir praėjus 24 val. po baltymo injekcijos. Šis skirtumas gali būti siejamas su naudojamų modelių sistemų struktūriniais ypatumais: EIS eksperimentuose naudotos membranos yra stipriai izoliuojančios ir pasižymi mažu defektų tankiu. Priešingai, HS-AJM metodu tirti lipidų dvisluoksniai turi daugiau atvirų hidrofobinių sričių, kurios, tikėtina, skatina S100A8 baltymo ir lipido sąveiką, taip inicijuojant membranos pažaidas, stebėtas šių eksperimentų metu.

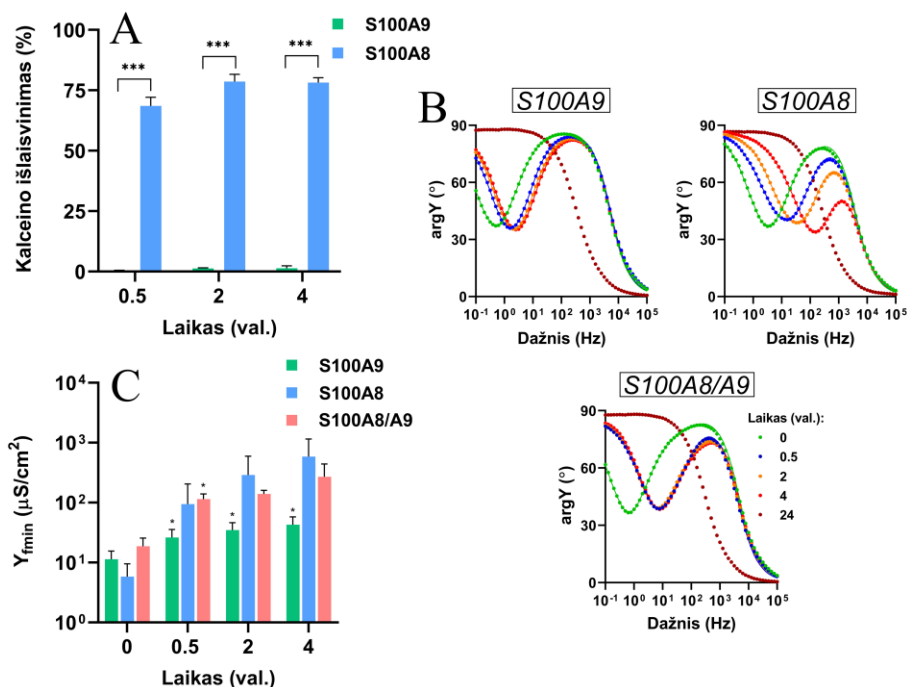
3.3.5. Sąveika su anijonine membrana

Fosfatidilserinas – tai pagrindinis anijoninis fosfolipidas žinduolių ląstelių plazminėje membranoje, kuris, fiziologinėmis sąlygomis, lokalizuojasi vidiniame membranos monosluoksnyje. Patologijų, tokių kaip vėžys ar neurodegeneracinės ligos, metu PS yra pernešamas į išorinį sluoksnį, taip veikdamas kaip „suvalgyk mane“ signalas fagocituojančioms imuninėms ląstelėms [301,302]. Pažymėtina, kad tokie lipidinės kompozicijos pokyčiai,

kuomet išoriniame monosluoksnyje padidėja anijoninių ir cviterjoninių fosfolipidų santykis, gali didinti amiloidinių baltymų afiniškumą, taip skatinant plazminės membranos pažaidas bei neurodegeneracinių ligų progresiją [303]. Siekiant ištirti neigiamą krūvį turinčių fosfolipidų įtaką S100 baltymų sąveikai su membranomis, buvo pasitelkti DOPS praturtinti lipidiniai dvisluoksniai. Verta paminėti, jog S100A9 baltymo atveju, kalceino išlaisvinimo tyrimams buvo pasitelkta DOPC/DOPS lipidinė kompozicija, o kituose šioje darbo dalyje aptariamuose eksperimentuose – DOPC/DOPE/DOPS/CHOL dvisluoksniai. Nepaisant ryškių fluidiškumo skirtumų tarp minėtų sudėčių membranų, DOPS kiekio skirtumai šiose kompozicijose neviršijo 10 %.

Tiriant S100 šeimos baltymų sąveiką su anijoninėmis membranomis, didžiausia pažaida buvo stebima S100A8 baltymo atveju. Nustatyta, jog per pirmas 0,5 val., išlaisvinto kalceino kiekis iš S100A8 baltymu paveiktų anijoninių liposomų siekė $68,5 \pm 3,5$ %, o po 4 val. inkubacijos, ši vertė išaugo iki $78,2 \pm 1,9$ % (**3.16 pav. A**). Gauti duomenys buvo patvirtinti EIS rezultatais – jau po 4 val. inkubacijos, $f_{\min}$ vertė Bode spektruose buvo pasislinkusi beveik dviem eilėmis aukštesnių dažnių kryptimi, kas rodo pablogėjusias membranos izoliacines savybes ir pakitusį jonų srautą per ją (**3.16 pav. B**). Papildomai, membranos pažaidos mastas buvo kiekybiškai įvertintas pagal laidumo vertę ties $f_{\min}$ tašku ($Y_{f_{\min}}$), kuri tiesiogiai koreliuoja su defektų tankiu membranoje [225]. Nustatyta, jog anksčiau aptartą spektrinę poslinkį lydėjo net 100 kartų padidėjusi $Y_{f_{\min}}$ vertė per atitinkamą 4 val. inkubacijos laikotarpį (**3.16 pav. C**). Panaši tendencija buvo stebima ir anijoninius lipidų dvisluoksnius paveikus S100A8/A9 – nors šiuo atveju pažaidos mastas buvo mažesnis nei detektuotas S100A8 baltymo atveju, per pirmąsias 4 inkubacijos valandas, $f_{\min}$ vertės poslinkis siekė 7 Hz, o šį pokytį lydėjo net 15 kartų išaugusi $Y_{f_{\min}}$ vertė. Svarbu pabrėžti, kad, priešingai nei S100A8 ir S100A8/A9 atvejais, tiriant S100A9 baltymo sąveiką su anijoninėmis membranomis, po 4 val. inkubacijos buvo užfiksuoti minimalūs dvisluoksnio dielektrinių savybių pokyčiai, o $Y_{f_{\min}}$ vertė padidėjo tik 3,8 karto.

Pažymėtina, jog po 24 val. inkubacijos, S100 baltymais paveiktų anijoninių dvisluoksnių Bode spektruose nebebuvo detektuojamas fazės minimumo taškas, charakteringas geromis izoliacinėmis savybėmis pasižyminčioms membranoms. Tai rodo, kad visais atvejais membranos pažaidos mastas buvo toks didelis, jog EIS metodas nebegalėjo patikimai įvertinti jos dielektrinių savybių. Apžvelgus gautus duomenis, galime teigti, jog didžiausiu afiniškumu DOPS praturtintoms membranoms pasižymėjo S100A8 baltymas, tuo tarpu S100A9 baltymo atveju, pažaidoms inicijuoti yra reikalingos ilgesnės inkubacijos trukmės (> 4 val.).

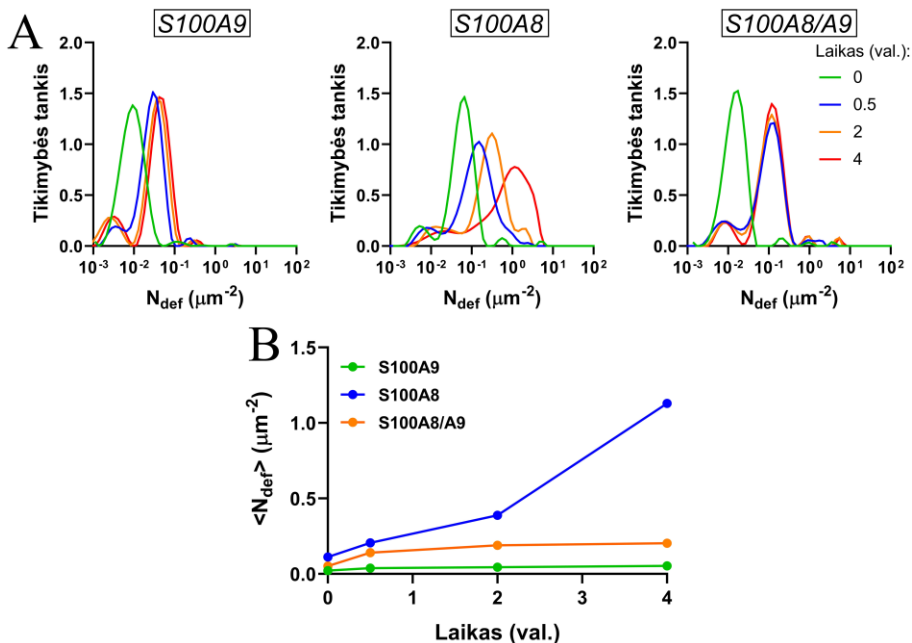


3.16 pav. S100 baltymų poveikis anijoninės membranos integralumui. Baltymų sukeliama membranos pažeidimo buvo vertinama stebint kalceino išlaisvinimą iš liposomų (A) ir dvisluoksnio dielektrinių savybių pokyčius EIS metodu (B, C). Taškai Bode grafikuose žymi eksperimentų metu gautas vertes, linijos – bioinformatinės analizės metu pritaikytus spektrus. S100A9 atveju, kalceino išlaisvinimo tyrimams pasitelkta DOPC/DOPS (6/4) lipidinė kompozicija, kiti pateikti duomenys gauti naudojant DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2) lipidų dvisluoksnius. Statistinis reikšmingumas žymimas: * ($p \leq 0,05$), *** ($p \leq 0,001$).

Ankstesni tyrimai parodė, jog EIS spektruose slypi ne tik informacija apie lipidinių membranų dielektrines ir struktūrines savybes, bet ir apie lateralinę defektų pasiskirstymą tokiose sistemose [228]. Membranos defektai gali būti dviejų tipų: natūralūs – susidarantys dėl lipidų susipakavimo netobulumų ar paviršiaus, ant kurio formuojamas dvisluoksnis, nelygumų, ir dirbtiniai – atsirandantys membraną paveikus citolitiniais peptidais arba pritaikius metodikas, tokias kaip elektroporacija [304,305]. Siekiant detaliau įvertinti S100 šeimos baltymų sukeltų defektų pasiskirstymą anijoninėse lipidinėse membranose, buvo pasitelkta Vilniaus universiteto Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriuje sukurta EIS spektrų bioinformatinės analizės metodika. Pažymėtina, jog eksperimentų metu gautos vertės Bode grafikuose pavaizduotos taškais, o bioinformatinės analizės metu pritaikyti spektrai – linijomis (3.16 pav. B). Platesnė informacija apie duomenų analizei taikytą įrankį pateikta skyrelyje 2.2.8.2.

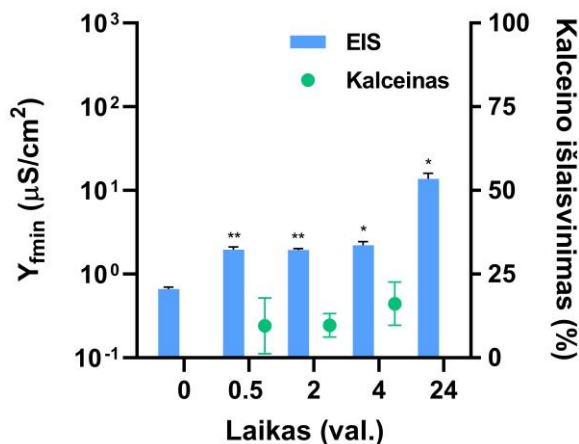
Atlikus anksčiau aptartų EIS spektrų bioinformatinę analizę nustatyta, kad natūralūs defektai neigiamai įkrautose lipidinėse membranose buvo pasiskirstę heterogeniškai. Šiuo atveju, defektų tankio pasiskirstymo kreivėse, be aiškiai išreikšto pagrindinio maksimumo, buvo stebimi ir papildomi, mažesnio tikimybės tankio, pikai, žymintys kelias, skirtingo tankio, defektų populiacijas (**3.17 pav. A**). Itin ryškūs lokalaus defektų tankio (N_{def}) verčių pokyčiai buvo detektuoti paveikus lipidų dvisluoksnius S100A8 baltymu. Šiuo atveju, pradinėse, baltymo nepaveiktose, membranose, didžiausia paviršiaus dalis buvo padengta defektais, kurių tankis siekė maždaug $0,06 \mu\text{m}^{-2}$, o po 4 val. inkubacijos ši reikšmė išaugo net iki $1,1 \mu\text{m}^{-2}$. Be to, keli aiškiai išreikšti maksimumai ties skirtingomis N_{def} reikšmėmis defektų tankio pasiskirstymo kreivėse iliustruoja itin heterogenišką S100A8 baltymo sukeltų defektų pasiskirstymą membranos paviršiuje. Analogiškas, nors kiek mažiau išreikštas, efektas buvo stebimas paveikus lipidų dvisluoksnius S100A8/A9 bei S100A9 baltymais. Šiais atvejais, be N_{def} verčių augimo, taip pat buvo detektuotas ir kelių, skirtingo tankio, defektų populiacijų atsiradimas. Praėjus 4 val. po pirminės membranos sąveikos su S100A8/A9 kompleksu, dvisluoksio paviršiuje buvo aptinkamos dvi aiškiai išreikštos defektų populiacijos, kurių tankis siekė maždaug $0,08$ ir $0,12 \mu\text{m}^{-2}$. Pažymėtina, jog S100A9 baltymo atveju, po 4 val. inkubacijos nustatytos lokalaus defektų tankio vertės buvo ženkliai mažesnės ir siekė apytiksliai $0,003$ ir $0,04 \mu\text{m}^{-2}$.

Siekiant kiekybiškai įvertinti defektų tankio kitimo dėsningumus, iš gautų kreivių buvo apskaičiuotas vidutinis defektų tankis ($\langle N_{def} \rangle$) membranoje skirtingais laiko momentais. Kaip ir tikėtasi, ryškiausi pokyčiai buvo fiksuoti S100A8 atveju, kur buvo stebėtas vidutinio defektų tankio augimas laike – nuo $0,1 \mu\text{m}^{-2}$ nepažeistoje membranoje iki $1,1 \mu\text{m}^{-2}$ po 4 val. inkubacijos su baltymu (**3.17 pav. B**). Pažymėtina, kad po 4 val. inkubacijos, S100A8 baltymo sukeltų defektų vidutinis tankis buvo 5,6 karto didesnis nei S100A8/A9 pažaidos atveju ir net 21,5 kartų didesnis, palyginti su S100A9 baltymo sąlygotomis vertėmis.



3.17 pav. S100 baltymų sukeltų defektų pasiskirstymo membranoje įvertinimas. (A) Defektų tankio pasiskirstymo kreivės, gautos kompiuteriniu būdu sumodeliautus 3.16 pav. pateiktus spektrus. Defektų pasiskirstymai membranoje buvo įvertinti prieš poveikį baltymais (žalia kreivė), praėjus 0,5 (mėlyna), 2 (oranžinė) ir 4 (raudona) val. po baltymų injekcijos. (B) Vidutinio defektų tankio pokyčiai laike.

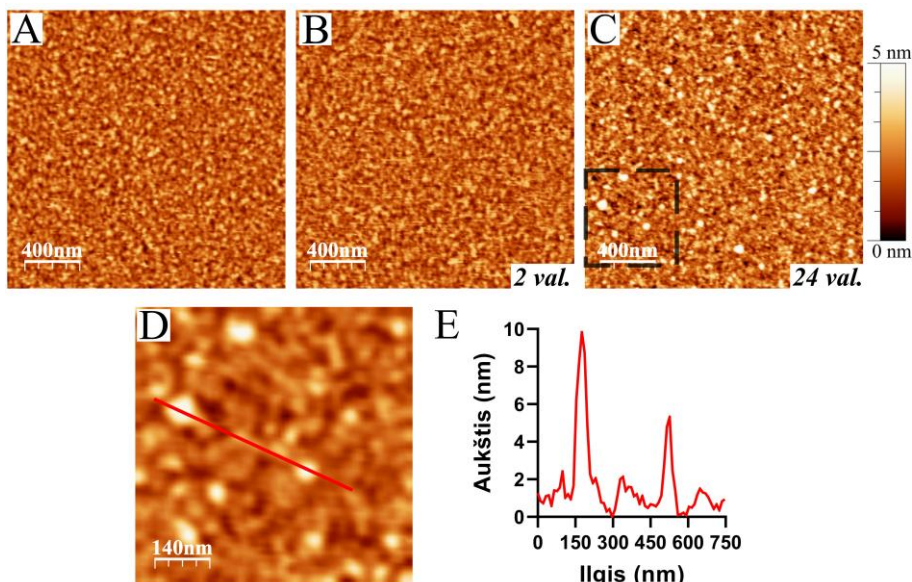
Siekiant nustatyti, ar S100A8 baltymas pasižymi specifiskumu DOPS, ar sąveikauja su įvairiais, neigiamą krūvį turinčiais, fosfolipidais, buvo pasitelktos membranos, sudėtyje turinčios DOPG. Tačiau, šiuo atveju, po 4 val. inkubacijos, iš sudėtyje DOPG turinčių liposomų išlaisvinto kalceino kiekis buvo ženkliai mažesnis ($16,1 \pm 6,5 \%$), palyginti su DOPS turinčiomis sistemomis ($78,2 \pm 1,9 \%$) (**3.18 pav.**). Įvertinus šios kompozicijos dvisluoksnių dielektrines savybes nustatyta, jog pirmieji membranos laidumo pokyčiai pasireiškė jau po 0,5 val. inkubacijos. Tačiau, tikėtina, kad šie pokyčiai buvo susiję su natūraliais persitvarkymais membranos struktūroje, kadangi analogiški svyravimai buvo stebėti ir kontrolinėse sistemose (**6 priedas**). Vis dėlto, papildomas laidumo verčių padidėjimas šiose membranose buvo užfiksuotas ir po 24 val. inkubacijos, o bendras $Y_{\min}$ pokytis per visą inkubacijos trukmę siekė 20 kartų, t.y. 5 kartus mažiau, palyginus su DOPS turinčiomis sistemomis.



3.18 pav. S100A8 baltymo poveikis anijoninės, DOPC/DOPE/DOPG/CHOL kompozicijos, membranos integralumui. S100A8 baltymo sukelta lipidų dvisluoksnių pažeidimo buvo vertinama stebint kalceino išlaisvinimą iš liposomų (žali taškai) bei dvisluoksnių dielektrinių savybių pokyčius EIS metodu (mėlyni stulpeliai). Statistinis reikšmingumas žymimas: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$).

Nepaisant to, jog tiek DOPS, tiek DOPG fiziologiniame pH pasižymi vienuodu neigiamu krūviu (-1), jų krūvio pasiskirstymas skiriasi. PS turi neigiamai įkrautą fosfato grupę, kuri sąveikauja su serino šonine grupe, turinčia tiek teigiamą (NH_3^+), tiek neigiamą (COO^-) krūvį. Tuo tarpu PG galvutės grupė išlieka neutrali – jos neigiamas krūvis kyla vien iš fosfato grupės, prijungtos prie glicerolio karkaso. Dėl šios priežasties, PS turinčios liposomos fiziologinėmis sąlygomis yra labiau anijoninės, palyginus su PG turinčiomis sistemomis [306]. Svarbu paminėti ir tai, jog PS polinė galvutė užima didesnę plotą ($0,97 \text{ nm}^2$ vienam lipidui), palyginti su PG ($0,8 \text{ nm}^2$) [11,307], taip potencialiai nulemiant stipresnę šio fosfolipido sąveiką su S100A8 baltymu bei didesnę membranos pažeidimo mastą.

Atsižvelgiant į didelį anijoninių lipidų dvisluoksnių pažeidimo mastą po poveikio S100 šeimos baltymais, kitame žingsnyje buvo siekiama ištirti galimus šių sąveikų mechanizmus. Šiam tikslui pasiekti, neigiamą krūvį turinčių lipidinių membranų morfologija buvo vizualizuojama prieš ir po sąveikos su baltymais. Paveikus prikabinatas dvisluoksnes lipidines membranas S100A9 baltymu, pirmųjų 2 val. inkubacijos laikotarpiu paviršiaus morfologijos pokyčiai nedetektuoti (**3.19 pav.**), o R_a reikšmė liko praktiškai nepakitusi – $0,38$ ir $0,40 \text{ nm}$, atitinkamai (**9 priedas**). Visgi, po 24 val. inkubacijos, ant membranos paviršiaus buvo užfiksuoti iki 10 nm aukščio oligomeriniai dariniai.

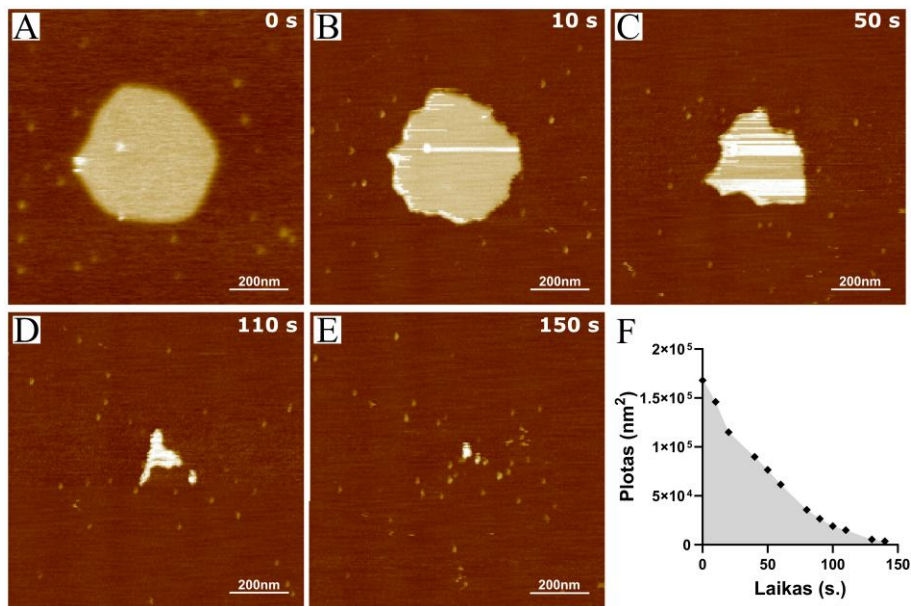


3.19 pav. S100A9 baltymo sąveikų su anijonine lipidine membrana vizualizacija. DOPC/DOPS membranos topografijos analizė atlikta prieš poveikį baltymu (A), taip praėjus 2 (B) ir 24 val. (C) po baltymo injekcijos. (D) Išdidintas vaizdas zonos, pažymėtos (C) dalyje. (E) Paviršiaus topografijos pjūvis, atitinkantis (D) vaizde pažymėtą sritį. Vaizdų laukas $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ (D dalyje – $0,7 \times 0,7 \mu\text{m}^2$). Matavimai atlikti PBS buferiniame tirpale, 22°C temperatūroje, naudojant $5 \mu\text{M}$ baltymo koncentraciją.

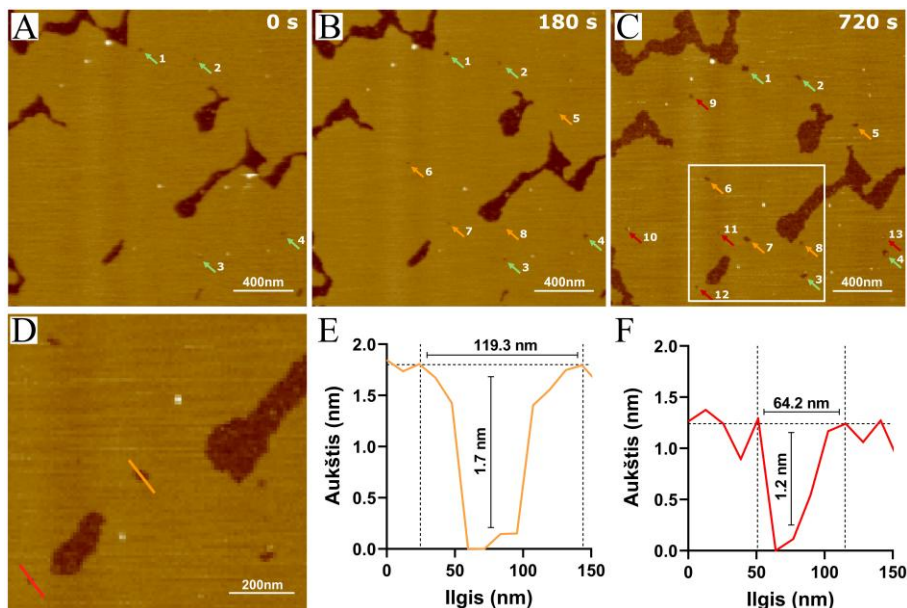
Gauti rezultatai, iš pirmo žvilgsnio, gali atrodyti prieštaringi ThT fluorescencijos intensyvumo duomenims, kurie rodo, kad ši lipidinė kompozicija, dėl potencialaus baltymo įsiterpimo į membraną, slopina S100A9 agregaciją (žr. skyrelį 3.2.3). Vis dėlto, svarbu pažymėti, kad paviršiaus topografijos analizė neleidžia tiesiogiai įvertinti dalinio baltymo įsiterpimo į dvisluoksnį. Be to, nepaisant EIS duomenimis pagrįsto S100A9 gebėjimo pažeisti neigiamai įkrautas, sudėtyje DOPS turinčias, membranas (3.16 pav), šiuo atveju, net ir po 24 val. inkubacijos, vizualiai pastebimų paviršiaus defektų nebuvo užfiksuota. Reikėtų atkreipti dėmesį į tai, kad vienas iš AJM metodologinių apribojimų yra lokalus paviršiaus vizualizacijos pobūdis. Mūsų tyrimo sąlygomis vieno vaizdo laukas tesiekė apie $4 \mu\text{m}^2$, tad net jei paviršius buvo vizualizuotas keliuose skirtinguose lokacijose, gauti vaizdai gali neatspindėti viso membranos paviršiaus būklės. Be to, matavimo metu naudojamo zondo galiuko spindulys siekė 25 nm, todėl šiuo atveju efektyviai galėjo būti aptinkami tik tie defektai, kurių skersmuo viršijo 50 nm. Atsižvelgiant į šiuos apribojimus, negalima atmesti galimybės, kad mažesni arba lokaliai pasiskirstę defektai membranos paviršiuje liko nedetektuoti.

Itin ryškus membranos pažaidos efektas buvo stebimas paveikus anijoninius, sudėtyje 30 % DOPS turinčius, lipidų dvisluoksnius S100A8

baltymu. Šiuo atveju, dvisluoksnio pažaida buvo užfiksuota jau netrukus po baltymo injekcijos, o maždaug 460 nm skersmens lipidų salelė buvo visiškai suardyta per mažiau nei 3 min. laikotarpį (**3.20 pav.** A–F). Kaip ir cviterjoninės membranos atveju, S100A8 sukeltas anijoninio dvisluoksnio ardymas prasidėjo nuo membranos kraštų, taip dar kartą patvirtinant, kad procesas vyksta vadinamuoju detergento mechanizmu. Siekiant tiksliau palyginti EIS ir HS-AJM eksperimentų rezultatus, buvo suformuotas lipidų dvisluoksnis, dengiantis daugiau nei 90 % žėručio paviršiaus. Šiuo atveju, per 12 min. inkubacijos laikotarpį, buvo stebėtas ne tik naujų defektų atsiradimas, bet ir esamų plėtimasis laike (**3.21 pav.**). Darant prielaidą, kad defektai yra sferinės formos, apskaičiuota, jog naujai susiformavusių defektų vidutinis spindulys siekė $25,9 \pm 3,9$ nm (**11 priedas**), o vidutinis gylis – $0,9 \pm 0,3$ nm (**12 priedas**). Pabrėžtina, jog apskaičiuotas defektų gylis yra mažesnis už membranos ($\sim 4,4$ nm) ar net vieno lipidų monosluoksnio storį, vis dėlto, gautos reikšmės gali neatitikti realių verčių dėl adatos ir mėginio konvoliucijos (sąsukos) efekto.



3.20 pav. S100A8 baltymo sąveikos su anijonine membrana vizualizacija. HS-AJM topografijos vaizdai, atspindintys DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2) lipidų dvisluoksnio morfologiją prieš baltymo poveikį (A) ir skirtingais laiko momentais po S100A8 (10 μ M) injekcijos (B-E). Vaizdų laukas $1 \times 1 \mu\text{m}^2$. (F) Membranos paviršiaus ploto pokyčiai laike.

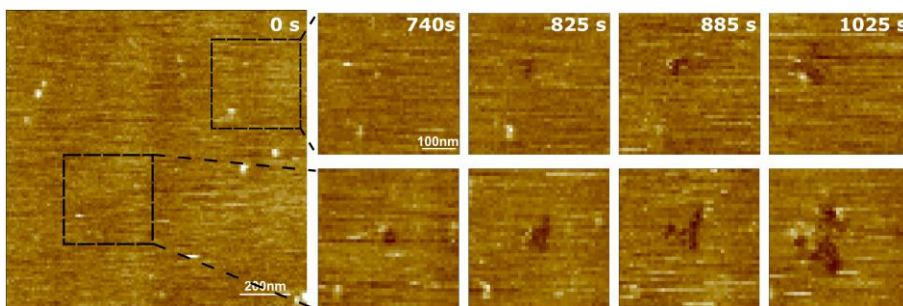


3.21 pav. S100A8 sąveikos su anijonine membrana vizualizacija. HS-AJM topografijos vaizdai, atspindintys DOPC/DOPE/DOPS/CHOL membranos morfologiją prieš baltymo poveikį (A) ir skirtingais laiko momentais po S100A8 (10 μ M) injekcijos (B-C). (D) Išdidintas vaizdas srities, pažymėtos (C) sekcijoje. Vaizdų laukas $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ (D dalyje – $0,9 \times 0,9 \mu\text{m}^2$). Natūralūs defektai membranoje pažymėti žaliomis rodyklėmis, naujai susiformavę defektai 3 min. laiko momentu – oranžinėmis, o defektai, pasirodę po 12 min. inkubacijos – raudonomis. (E, F) Defektų, (D) dalyje pažymėtų oranžinėmis ir raudonomis linijomis, aukščio profiliai. Tyrimai atlikti HEPES buferiniame tirpale, 22 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Pažymėtina, kad, kaip ir DOPC/CHOL bei BTLE membranų atvejais, tiriant anijoninį lipidų dvisluoksnį, ilgesnės inkubacijos metu (≥ 12 min.) buvo stebėtas S100A8 kaupimasis ant neigiamai įkrauto žėručio paviršiaus. Vis dėlto, HS-AJM vaizduose tiesioginė S100A8 baltymo molekulių sąveika su lipidine membrana užfiksuota nebuvo. Manome, kad stiprus S100A8 afiniškumas DOPS praturtintoms membranoms lemia greitą baltymo difuziją dvisluoksnio paviršiumi. Ši sparti difuzija, kartu su greita S100A8 integracija į membraną, gali apsunkinti baltymo detekciją HS-AJM metodu. Pažeidus membraną, tikėtina, kad baltymas lieka stipriai asocijuotas su išplėstomis lipidų molekulėmis, formuodamas mišrias baltymo ir lipido micles, kurios išlieka tirpale. Kita svarbi mūsų tyrimų įžvalga – reikšmingas S100A8 sukeltos membranos pažaidos greičio kintamumas. Nors visų tyrimų metu buvo taikoma ta pati – 10 μ M – baltymo koncentracija, **3.20** ir **3.21 pav.** pateikti rezultatai atskleidžia, kad laikas, reikalingas membranos pažaidos iniciacijai, ženkliai skyrėsi. Izoliuotos lipidų salelės atveju, dvisluoksnis buvo visiškai suardytas per mažiau nei 3 min., tuo tarpu atliekant didesnio ploto

membranos vizualizaciją, ši išliko net po 12 min. matavimo. Tokį skirtumą, tikėtina, lemia ne tik globali baltymo koncentracija tirpale, bet ir lokali koncentracija virš vizualizuojamos srities. Šios lokalsios koncentracijos tiksliai kontroliuoti neįmanoma dėl įvairių veiksnių, tokių kaip HS-AJM adatos judėjimas ar atstumas tarp pipetės antgalio ir mėginio paviršiaus baltymo injekcijos metu. Taip pat galima manyti, kad ir paties lipidų dvisluoksniu morfologija gali turėti įtakos S100A8 baltymo sąlygojamo membranų ardymo efektyvumui.

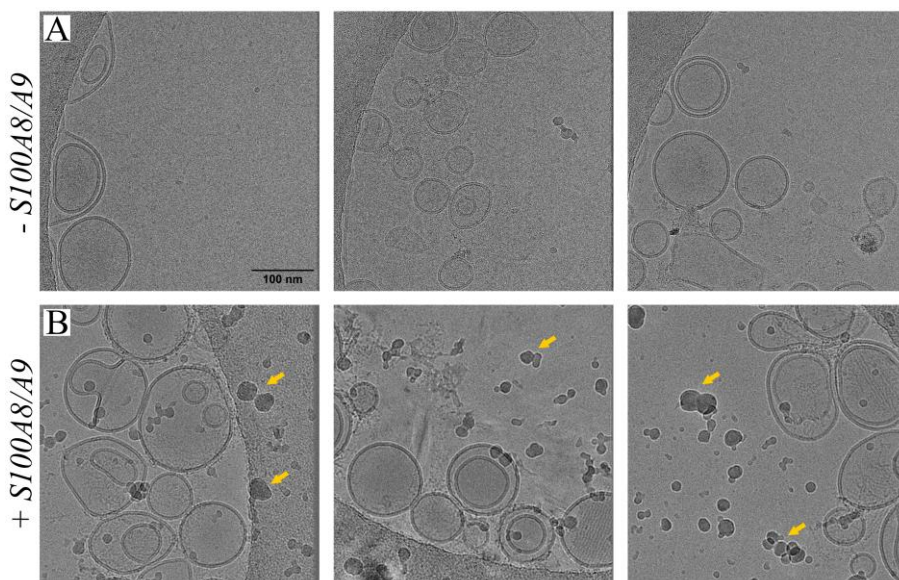
Paveikus suformuotą anijoninę membraną S100A8/A9 kompleksu, pirmieji lipidų dvisluoksniu paviršiuje atsirandantys defektai buvo detektuoti po 12,3 min. inkubacijos (**3.22 pav.**). Nustatyta, kad susiformavusių defektų skersmuo viršijo 50 nm, o jų dydis nuolat plėtėsi. Atsižvelgiant į šiuos faktorius, galime teigti, kad baltymų heterokompleksas sąveikauja su membrana ne tradiciniu, porų formacija paremtu, mechanizmu, kadangi porų dydis paprastai neviršija 10 nm [168]. Priešingai, šiuo atveju siūlome, kad baltymų heterokompleksas, kaip ir jo komponentas S100A8, lipidų dvisluoksnį pažeidžia ištraukdamas lipidų molekules iš membranų aplinkos, t.y., detergento mechanizmu.



3.22 pav. S100A8/A9 baltymų heterokomplekso sąveikos su anijonine membrana vizualizacija. HS-AJM topografijos vaizdai, atspindintys DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2) membranų morfologiją prieš poveikį S100A8/A9 (0 s) ir nurodytais laiko momentais po S100A8/A9 injekcijos. Vaizdo laukas $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ (išdidintų vaizdų – $0,4 \times 0,4 \mu\text{m}^2$). Tyrimai atlikti HEPES buferiniame tirpale, esant 22°C temperatūrai, naudojant $10 \mu\text{M}$ S100A8/A9 koncentraciją.

Baltymų heterokomplekso sąveika su anijoninėmis lipidinėmis membranomis papildomai buvo tiriama pasitelkiant krio-transmisijos elektronų mikroskopijos (TEM) metodą. Nepaisant to, jog modelių sistemų paruošimui buvo pasirinkta plačiai taikoma ir standartizuota metodika, naudojama vienasluoksnių ir panašaus ($\sim 100 \text{ nm}$) dydžio liposomų formavimui (**žr. skyrelį 2.2.1**), TEM vaizduose pastebėta, kad dalis šviežiai suformuotų liposomų buvo daugiasluoksnės, t. y. sudarytos iš dviejų lipidų

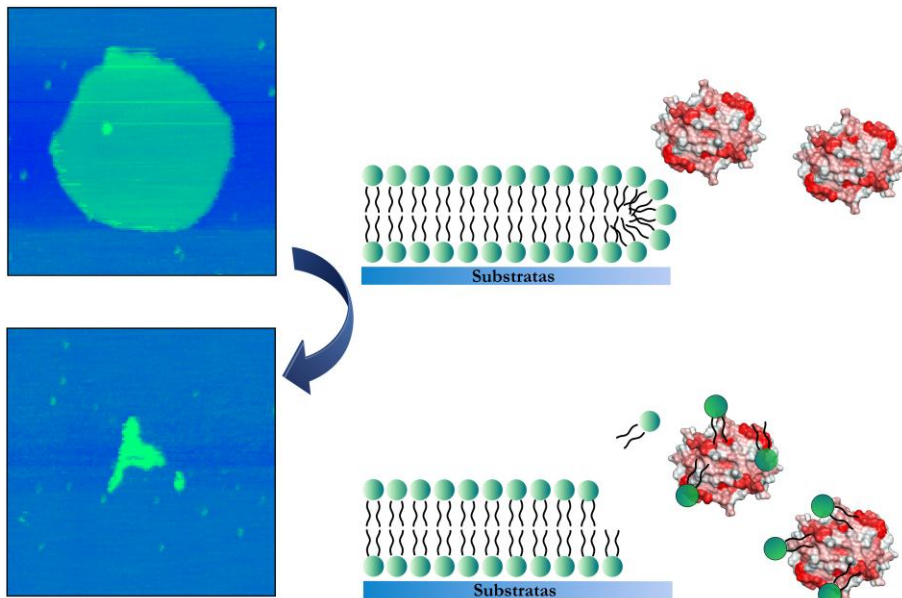
dvisluoksnių (**3.23 pav. A**). Be to, liposomos pasižymėjo ir reikšminga dydžio variacija – nuo 20 iki 120 nm. Svarbu pažymėti, jog dydžio svyravimai buvo užfiksuoti ir kitų kompozicijų liposomose, įvertinus jų skersmenį dinaminės šviesos sklaidos metodu (**žr. 4 priedą**). Paveikus paruoštas liposomas S100A8/A9 baltymų heterokompleksu, buvo stebima mažų sferinių dalelių, kurių vidutinis skersmuo siekė $26,3 \pm 5,4$ nm, formacija (**3.23 pav. B**, pažymėta geltonomis rodyklėmis). Atsižvelgiant į tai, kad S100A8/A9 šios kompozicijos membranas pažeidžia veikdamas detergento mechanizmu, tikėtina, jog šie dariniai atitinka lipidų ir baltymų koagregatus (**3.24 pav.**). Vis dėlto, svarbu paminėti, kad tiesioginė heterokomplekso sąveika su lipidų dvisluoksniu šia vizualizacijos metodika taipogi detektuota nebuvo.



3.23 pav. S100A8/A9 baltymų heterokomplekso sąveikos su anijoninėmis liposomomis vizualizacija. (A, B) Krio-transmisijos elektronų mikroskopijos vaizdai, vaizduojantys DOPC/DOPE/DOPS/CHOL sudėties liposomas prieš ir po poveikio S100A8/A9, atitinkamai. Geltonomis rodyklėmis pažymėti dariniai potencialiai atitinka baltymo ir lipido koagregatus. Mėginiai paruošti HEPES buferiniame tirpale, naudojant 2 mM lipidų ir 10 μ M S100A8/A9 koncentracijas.

Pažymėtina, kad tiriant S100A8/A9 oligomerizaciją anijoninių liposomų aplinkoje, agregatų formacija buvo skatinama tik pirmųjų 24 val. laikotarpyje. Vėliau ThT fluorescencijos intensyvumas palaipsniui mažėjo, o statistškai reikšmingų skirtumų tarp verčių, gautų agreguojant heterokompleksą su anijoninėmis liposomomis ir be jų, užfiksuota nebuvo (**žr. skyrelį 3.2.3**). Šie pokyčiai, tikėtina, susiję su baltymų ir lipidų tarpusavio sąveika: formuojantis mišrioms micelėms, baltymų aromatinės aminorūgštys, kurios yra būtinos agregacijos procesams, gali būti uždengiamos lipidų

hidrofobinėmis angliavandenilių grandinėmis [264]. Todėl galima manyti, kad pradžioje laikotarpiu, S100A8/A9 heterokompleksui sąveikaujant su liposomų paviršiumi, dėl padidėjusios lokalių baltymų koncentracijos, agregacija yra skatinama. Tačiau vėliau, susiformavus mišrioms baltymo ir lipido micelėms, agregacijos procesai yra slopinami.



3.24 pav. Siūlomas S100A8 ir S100A8/A9 sąveikos su anijoninėmis lipidinėmis membranomis mechanizmas. Nustatyta, kad šie baltymai gali ištraukti fosfolipidų molekules iš dvisluoksnio aplinkos, o tai yra būdingas vadinamojo detergento efekto požymis.

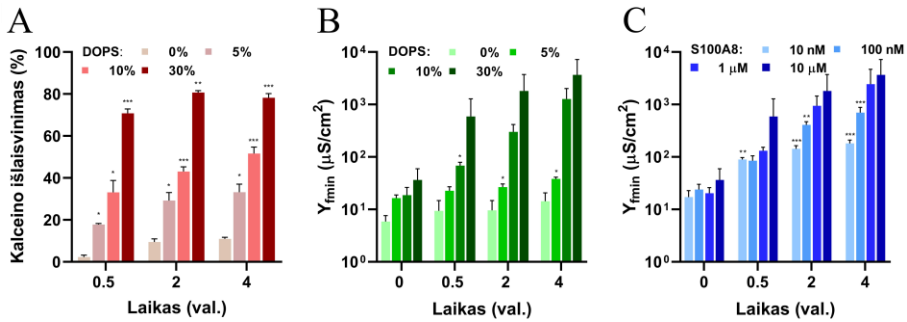
Apžvelgus S100 šeimos baltymų sąveikos su anijoninėmis membranomis rezultatus, galime teigti, jog S100A8 pažeidžia šios kompozicijos dvisluoksnio detergento mechanizmą, t.y. ištraukdamas lipidų molekules iš membranos aplinkos. Pažymėtina, jog membranos pažeidimas pirmiausia prasidėjo dvisluoksnio kraštuose, kur lipidų molekulių susipakavimas yra mažesnis, o hidrofobinės sritys labiau atidengtos. Pažeidimo detergento mechanizmas buvo stebimas ir paveikus neigiamą krūvį turinčias membranas S100A8/A9 heterokompleksu. Tai leidžia manyti, kad net ir susiformavus funkcionaliam baltymų heterokompleksui, pavieniai monomerai išlaiko savo savitumą ir lemia S100A8/A9 sąveikų su membranomis mechanizmus. Tuo tarpu, nors S100A9 baltymui sąveikaujant su anijoniniais lipidų dvisluoksniais buvo užfiksuoti ryškūs jų dielektrinių savybių pokyčiai, AJM vizualizacijos metu membranos paviršiuje defektų atsiradimas stebimas nebuvo. Vietoje to, ant membranos paviršiaus buvo užfiksuotas globulinių oligomerų susidarymas. Remiantis anksčiau aptartu

padengimo efektu (žr. skyrelį 1.4.3), galime manyti, jog stebėti membranos laidumo pokyčiai galėjo būti bent dalinai nulemti baltymo agregatų formavimosi lipidų dvisluoksnio paviršiuje.

3.3.5.1 DOPS kiekio ir baltymo koncentracijos įtaka membranos pažaidos mastui

Tyrinėjant prouždegiminių S100 šeimos narių sąveikas su anijoninėmis lipidinėmis membranomis, didžiausias pažaidos mastas buvo nustatytas S100A8 baltymo atveju. Atsižvelgiant į šį pastebėjimą, tolimesnėje tyrimo dalyje buvo siekiama įvertinti, ar S100A8 baltymo sukeliama membranos pažaida tiesiogiai koreliuoja su DOPS kiekiu sistemoje. Šiam tikslui pasiekti buvo suformuoti įvairių kompozicijų lipidiniai dvisluoksniai, kurių sudėtyje esančio DOPS kiekis svyravo nuo 0 iki 30 %. S100A8 baltymo sukeltos membranos pažaidos mastas buvo vertintas dviem būdais: analizuojant kalceino išlaisvinimo kinetiką iš liposomų bei tiriant membranų, suformuotų ant kietojo substrato, dielektrinių savybių pokyčius EIS metodu. Modelinių sistemų paruošimui naudotų lipidų moliniai santykiai pateikti **2.2 lentelėje**.

Rezultatai parodė, kad sumažinus DOPS kiekį membranoje nuo 30 iki 20 %, liposomų pralaidumas kalceinui statistiškai reikšmingai nepakito: po 4 val. inkubacijos išlaisvinto dažo kiekis buvo analogiškas ir sudarė $78,2 \pm 1,9$ bei $77,0 \pm 3,9$ %, atitinkamai (**13 priedas**). Tuo tarpu liposomos, kurių sudėtyje buvo mažesnė DOPS koncentracija (10 ir 5 %), pasižymėjo ženkliai didesniu atsparumu S100A8 poveikiui – per pirmąsias 0,5 val. išlaisvinto kalceino kiekis siekė tik $33,1 \pm 5,7$ ir $17,8 \pm 0,4$ %, atitinkamai (**3.25 pav. A**). Po 4 val. inkubacijos buvo stebėtas tolesnis membranos integralumo praradimas, tačiau pažaidos masto priklausomybė nuo DOPS kiekio išliko: liposomose, sudėtyje turinčiose 10 % DOPS, išlaisvinto dažo kiekis sudarė $51,6 \pm 3,0$ %, o su 5 % DOPS – $33,2 \pm 3,7$ %. Pažymėtina, kad S100A8 nesukėlė statistiškai reikšmingų integralumo pokyčių liposomose, kurių sudėtyje nebuvo DOPS. Šie rezultatai buvo patvirtinti ir EIS duomenimis, kurie parodė, kad membranos laidumo vertės tiesiogiai koreliuoja su DOPS kiekiu dvisluoksnyje, o didžiausias integralumo praradimas šiuo atveju taip pat stebėtas dirbtinėse sistemose, sudėtyje turinčiose 30 % DOPS (**3.25 pav. B**).



3.25 pav. S100A8 sukeltos membranos pažaidos priklausomybė nuo DOPS kiekio ir baltymo koncentracijos. (A, B) Kalceino išlaisvinimo ir EIS laidumo duomenys, atitinkamai, gauti membranas paveikus 10 μM S100A8. (C) S100A8 koncentracijos įtaka DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2) membranos pažaidos laipsniui. Kalceino išlaisvinimo tyrimai atlikti HEPES buferiniame tirpale, 37 °C. EIS matavimai atlikti HEPES buferiniame tirpale, 22 °C. Statistiškai reikšmingi skirtumai pažymėti: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) ir *** ($p \leq 0,001$). Kalceino išlaisvinimo duomenų statistinis reikšmingumas nustatytas lyginant vertes su DOPS 0% grupės vertėmis atitinkamais laiko momentais, EIS – lyginant su pradinėmis (0 val.) vertėmis.

Svarbu pažymėti, kad, nepaisant vienodo anijoninio PS kiekio abiejose sistemose, membranose, sudėtyje turinčiose 10 % DOPS (**3.25 pav. B**), buvo užfiksuoti ženkliai didesni S100A8 baltymo sukelti dielektrinių savybių pokyčiai, palyginti su BTLE pagrindu suformuotais dvisluoksniais (**3.9 pav.**). Šie rezultatai dar kartą įrodo, kad S100 šeimos baltymų sąveiką su membranomis lemia ne vien paviršiaus krūvis, bet ir kiti veiksniai, įskaitant membranos fazinę būseną bei lipidų susipakavimo laipsnį. Nors tikslus cholesterolio kiekis BTLE kompozicijoje nėra žinomas, remiantis literatūros duomenimis galime teigti, jog smegenų ląstelių plazminėje membranoje cholesterolio koncentracija yra daugiau nei du kartus didesnė (**žr. skyrelį 1.4**), palyginti su šioje eksperimentų dalyje naudotomis modelinėmis sistemomis, kuriose cholesterolis sudarė tik 20 % visų lipidų kiekio. Tikėtina, kad mažesnė cholesterolio koncentracija DOPS turinčiuose dvisluoksniuose sąlygojo jų didesnę fluidiškumą, dėl kurio šios membranos tapo mažiau mechanškai stabilios bei jautresnės S100A8 sukeliama pažaidai, palyginti su BTLE pagrindu suformuotomis sistemomis.

Gauti rezultatai atskleidė, kad S100A8 efektyviausiai pažeidžia membranas, kurių sudėtyje yra 30 % DOPS, todėl tolimesniuose tyrimuose buvo siekiama įvertinti ir baltymo koncentracijos įtaką šios kompozicijos dvisluoksnių pažaidos mastui. Tyrimams pasirinktų S100A8 koncentracijų intervalas svyravo nuo 10 nM iki 10 μM . Nustatyta, kad S100A8 sukeltos membranos pažaidos mastas tiesiogiai koreliuoja su baltymo koncentracija (**3.25 pav. C**). Pažymėtina, kad net esant žemiausiai tirtai – 10 nM – koncentracijai, per 4 val. inkubacijos laikotarpį buvo užfiksuotas statistiškai

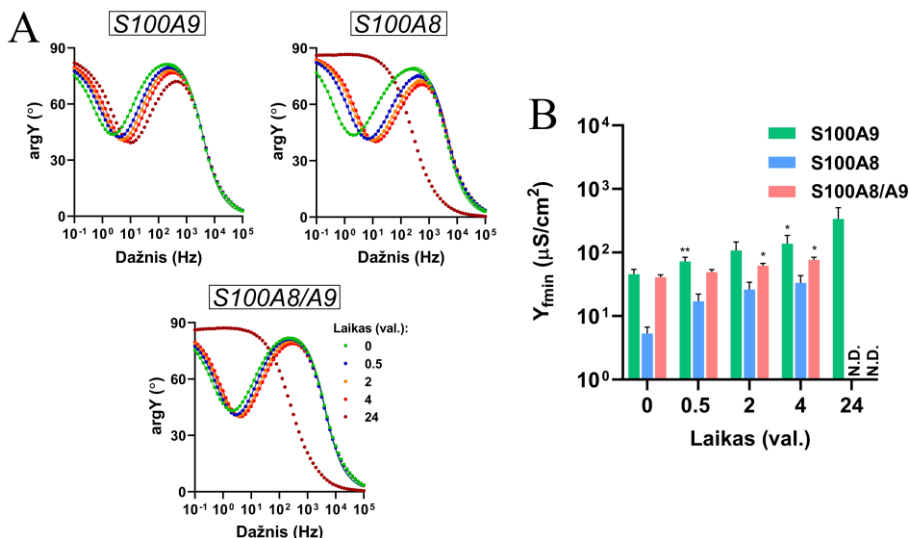
reikšmingas membranos laidumo padidėjimas, siekiantis net 11 kartų. Nors tiksliai fiziologinė S100A8 koncentracija dar nėra galutinai žinoma, literatūros duomenimis, sveikų asmenų kraujyje ji gali svyruoti nuo 47 pM [308] iki 1,9 nM [309]. Tačiau sergant Alzheimerio liga, S100A8 raiška organizme gali padidėti net iki 6 kartų [310]. Taigi, šie duomenys rodo, kad mūsų taikyta metodika pasižymi išskirtiniu jautrumu ir leidžia detektuoti S100A8 aktyvumą net ir esant pataloginėms baltymo koncentracijoms. Atsižvelgiant į tai, kad S100A8 plačiai pripažįstamas kaip potencialus biožymuo, galintis padėti detektuoti įvairias, su uždegimu susijusias, patologijas [12], mūsų siūloma metodika ateityje galėtų prisidėti prie EIS pagrindu kuriamų biojutiklių, skirtų neurouždegiminių ir neurodegeneracinių sutrikimų detekcijai, vystymo.

3.3.6. Sąveika su dviejų fazių membranomis

Eukariotinių ląstelių plazminių membranų fluidiškumas nėra vienalytis – jose gali vykti lateralinis fazių atsiskyrimas. Gyvuose organizmuose lateralinis fazių atsiskyrimas atlieka esminį vaidmenį reguliuojant įvairius ląstelinius procesus (žr. skyrelį 1.4.1), o šio reiškinio metu susiformuojantys nanodomenai yra žinomi kaip lipidų plaustai. Nustatyta, jog neurodegeneracinių ligų metu pakitęs lipidų metabolizmas bei amiloidinių baltymų sukelti plazminės membranos pertvarkymai lemia ne tik lipidų plaustų organizacijos, bet ir funkcionalumo, pokyčius [311]. Siekiant ištirti S100 šeimos baltymų sąveiką su sistema, savo sudėtimi imituojančia išorinį, lipidų plaustais praturtintą, membranos monosluoksni, buvo pasirinkta DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 lipidų kompozicija. Ši sistema leidžia kambario temperatūroje stebėti L_o ir L_d fazių atsiskyrimą, kurį lemia aukšta bSM fazinio virsmo temperatūra (35–40 °C) [312]. L_o fazė yra praturtinta lipidų plaustams būdingais komponentais – bSM, cholesteroliu ir anijoniniu glikolipidu GM1, o ją supanti L_d fazė – cviterjoniniais glicerofosfolipidais DOPE ir DOPC [281].

Tyrimo rezultatai parodė, kad, kaip ir anijoninių sistemų atveju, didžiausią pažaidos laipsnį dviejų fazių membranose sukėlė S100A8 baltymas. Per pirmąsias 4 inkubacijos valandas $f_{\min}$ vertė Bode spektruose pasislinko viena eile į didesnių dažnių sritį, o ši poslinkį lydėjo 6,3 karto padidėjusi laidumo vertė (**3.26 pav.**). Po 24 val. inkubacijos, dėl per didelio membranos pažaidos masto, dvisluoksnio dielektrinių savybių EIS metodu nustatyti nebebuvo įmanoma. Panaši tendencija buvo pastebėta ir S100A8/A9 paveiktuose šios kompozicijos lipidų dvisluoksniuose – nors per pirmąsias

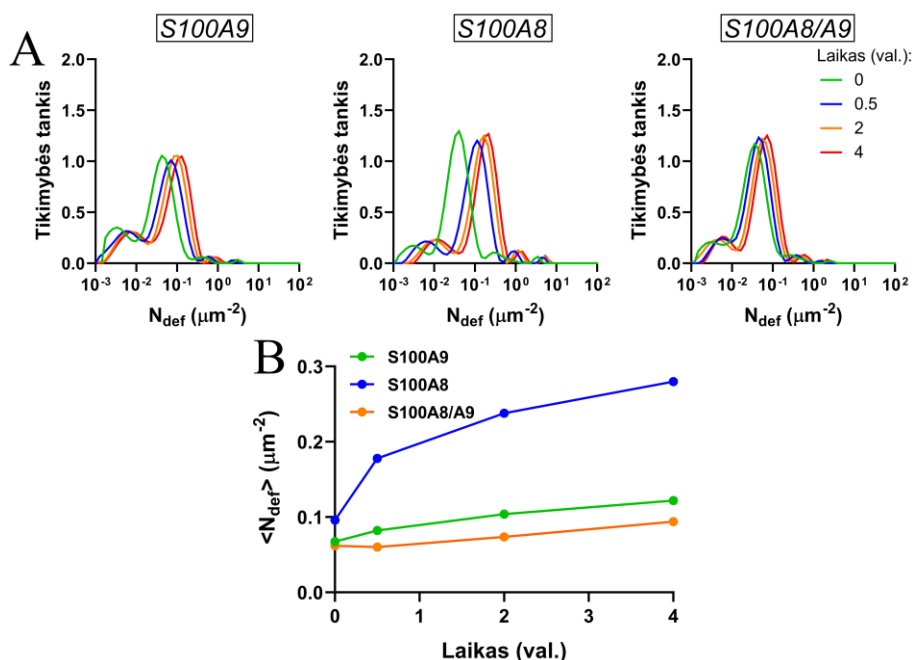
4 val. $f_{\min}$ poslinkis siekė vos 2 Hz, po 24 val. inkubacijos membranos dielektrinės savybės taip pat nebegalėjo būti patikimai įvertintos EIS metodu. Priešingai, S100A9 sukėlė tik minimalius membranos integralumo pokyčius – net po 24 val. inkubacijos Bode grafikuose vis dar buvo aptinkamas aiškiai išreikštas fazės minimumo taškas, kurio padėtis per visą inkubacijos laikotarpį pakito vos 7,5 Hz.



3.26 pav. S100 baltymų poveikis dviejų fazių membranos integralumui. (A) Fazės kampo priklausomybės nuo dažnio (Bode) grafikai, atspindintys DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 membranos dielektrinių savybių pokyčius. Taškai grafikuose žymi eksperimentų metu gautas vertes, linijos – bioinformatinės analizės metu pritaikytus spektrus. (B) Membranos laidumo verčių pokyčiai, apskaičiuoti fazės minimumo taške. Statistinis reikšmingumas žymimas: * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$). N.D. – vertė nedetekuota.

EIS spektrų bioinformatinė analizė atskleidė, kad dviejų fazių membranose natūralūs defektai pasiskirstė heterogeniškai. Be pagrindinio, aiškiai išreikšto, maksimumo defektų tankio pasiskirstymo kreivėse buvo identifikuota keletas papildomų (≤ 3), mažesnio tikimybės tankio, defektų populiacijų (**3.27 pav.** A). Šis heterogeniškumas, tikėtina, kyla dėl fazių atsiskyrimo membranoje, kur, šalia skystosios netvarkios fazės, egzistuoja ir tvarkingesnė, tankesnė lipidų susipakavimo, fazė [313]. Įdomu tai, kad paveikus šios kompozicijos membranas S100 šeimos baltymais, naujų defektų populiacijų aptikta nebuvo, tačiau buvo užfiksuotas laipsniškas N_{def} verčių augimas laike. Šis efektas buvo ypač ryškus S100A8 baltymo atveju. Prieš sąveiką su baltymu, membranos paviršiuje dominavo trys pagrindinės defektų populiacijos, kurių tankis siekė maždaug 0,003, 0,04 ir 0,3 μm^{-2} . Po 4 val. inkubacijos su S100A8, šios vertės išaugo iki 0,01, 0,2 ir 1,5 μm^{-2} , atitinkamai.

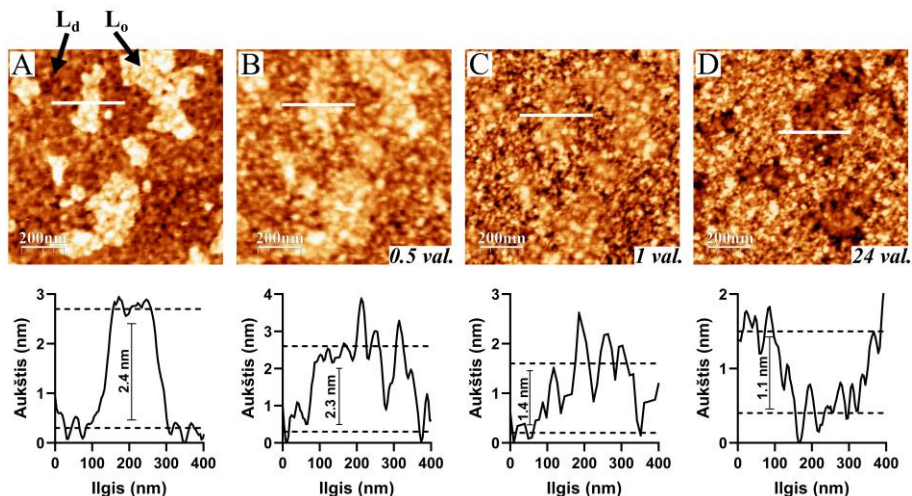
Pažymėtina, jog buvo detektuojamas ir vidutinio defektų tankio verčių augimas laike – nuo $0,1 \mu\text{m}^{-2}$ (0 val.) iki $0,3 \mu\text{m}^{-2}$ (4 val.) (**3.27 pav. B**). Vis dėlto, S100A8 baltymo afiniškumas dviejų fazių membranoms buvo mažesnis, palyginti su anijoniniais dvisluoksniais, kuriuose vidutinis defektų tankis per tą patį inkubacijos laikotarpį išaugo iki $1,1 \mu\text{m}^{-2}$. Galiausiai, S100A9 baltymas ir S100A8/A9 kompleksas sukėlė gerokai mažesnius pokyčius dviejų fazių membranose – jų poveikis lėmė tik nedidelį vidutinio defektų tankio padidėjimą, kuris per 4 val. laikotarpį neviršijo dviejų kartų.



3.27 pav. S100 baltymų sukeltų defektų pasiskirstymo dviejų fazių membranoje įvertinimas. (A) Defektų tankio pasiskirstymo kreivės, gautos kompiuteriniu būdu sumodeliavus 3.26 pav. nurodytus spektrus. Defektų tankio pasiskirstymai membranų paviršiuje buvo įvertinti prieš poveikį nurodytais baltymais (žalia kreivė), taip pat praėjus 0,5 (mėlyna), 2 (oranžinė) ir 4 (raudona) val. po baltymų injekcijos. (B) Vidutinio defektų tankio pokyčiai laike.

Suformavus ir atominės jėgos mikroskopijos metodu vizualizavus DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 kompozicijos lipidines membranas, topografijos vaizduose galėjome aiškiai išskirti L_o domenų, apsuptus L_d fazė (**3.28 pav. A**). Atlikus kiekybinę vaizdų analizę nustatyta, jog susiformavę L_o domenai yra $2,5 \pm 0,2$ nm aukštesni nei juos supanti skystoji fazė, o tai atitinka literatūroje aprašytą aukščio skirtumą tarp L_o ir L_d fazių ($2,4 \pm 0,3$ nm) analogiškose sistemose [314]. Svarbu atkreipti dėmesį, jog AJM vizualizacijos metu nustatytos vertės gali neatspindėti realaus aukščio skirtumo tarp minėtų fazių, kadangi jos gali būti dalinai nulemtos ir matavimų

artefaktų. AJM matavimų metu skystoji fazė, dėl didesnio elastingumo, gali būti labiau suspaudžiama nei L_o domenai, kurie išlaiko savo storį, todėl fiksuojamas aukščio skirtumas gali būti didesnis, lyginant su realiomis biologinėmis sistemomis [315]. Be to, aukščio skirtumo padidėjimas gali būti nulemtas ir elektrostatinės atostūmos tarp neigiamai įkrautų GM1 grupių bei silicio nitrido adatos paviršiaus [316].

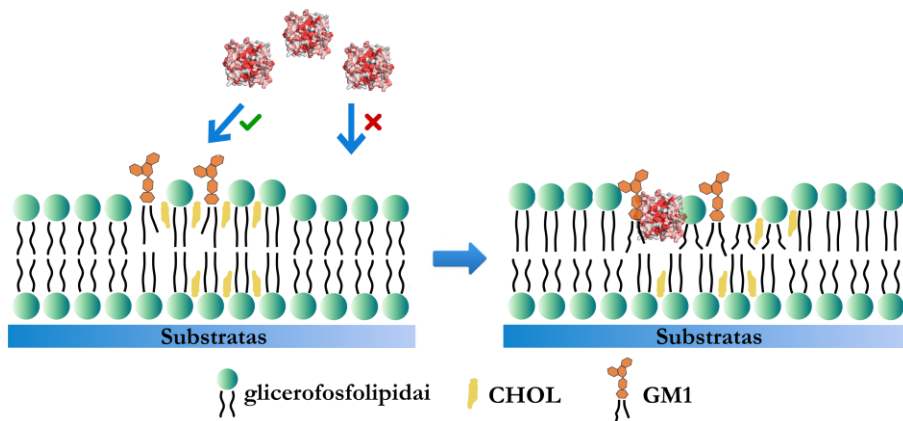


3.28 pav. S100A9 sąveika su dviejų fazių DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 membrana. AJM vizualizacija atlikta prieš S100A9 poveikį (A) ir praėjus 0,5 (B), 1 (C) bei 24 val. (D) po baltymo injekcijos. Vaizdų laukas $1 \times 1 \mu\text{m}^2$. Sritys, praturtintos DOPC ir DOPE, formuoja L_d fazę, o regionai, turtingi bSM, CHOL ir GM1, sudaro L_o fazę. Po vaizdais pateikti topografijos pjūviai, atitinkantys horizontaliomis baltomis linijomis pažymėtas sritis. Matavimai atlikti PBS buferiniame tirpale, 22 °C temperatūroje, naudojant 5 μM baltymo koncentraciją.

Paveikus lipidų plauštų struktūras imituojančias membranas S100A9 baltymu, buvo stebėtas lateralinio fazių atsiskyrimo praradimas bei laipsniškas L_o domenų plonėjimas (**3.28 pav.** B–D). Po 1 val. inkubacijos su S100A9 baltymu, aukščio skirtumas tarp L_o ir L_d fazių sumažėjo nuo $2,5 \pm 0,2$ nm iki $1,5 \pm 0,2$ nm, o praėjus 24 val., L_o fazės regionuose buvo stebimos įdubos, kurių vidutinis gylis siekė $1,5 \pm 0,4$ nm. Pirmąją inkubacijos valandą, dėl mažėjančio aukščio skirtumo tarp L_o ir L_d fazių, buvo stebėtas ir vidutinio paviršiaus šiurkštumo vertės sumažėjimas – nuo 0,91 nm (0 val.) iki 0,75 nm (po 0,5 val.) (**9 priedas**). Vis dėlto, tolimesni membranų struktūriniai pokyčiai, susiję su įdubų formavimusi L_o fazėje, lėmė R_a reikšmės padidėjimą iki 0,84 nm (po 2 val.). Be aiškiai nustatytų L_o domenų storio pokyčių, matavimų metu buvo stebėta ir L_d fazės morfologinė transformacija – prieš poveikį baltymu buvę homogeniški regionai tapo šiurkštesni, dėl potencialaus baltymo prisijungimo arba jo įsiterpimo metu sukeltos lipidų pertvarkos. Lipidų plauštų fragmentacijos reiškinys yra taip pat aprašytas ir literatūroje,

tiriant analogiškos sudėties modelinių membranų sąveiką su α -Syn. Tokie dvisluoksnio pertvarkymai buvo siejami su sutrikusiu signalų perdavimu sinapsėse, kadangi pažeidžiama lipidų plaustuose lokalizuotų baltymų erdvinė organizacija, kuri yra būtina efektyviam nervinio signalo perdavimui [317].

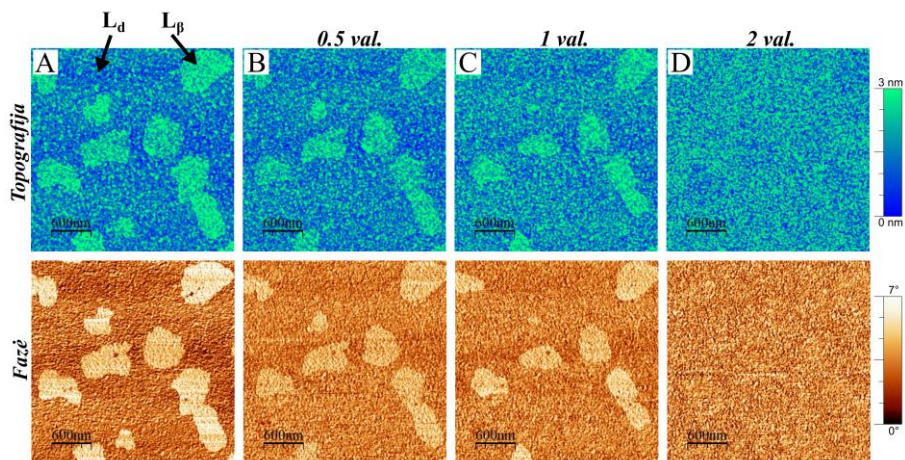
Šiame kontekste, stebėtas lipidinių membranų plonėjimas L_o fazėje gali būti paaiškinamas analogišku mechanizmu, kaip ir BTLE sistemose (**žr. 3.3.3 skyrelį**). Kaip ir BTLE atveju, mūsų tirta, lipidų plaustus imituojanti, membrana turėjo reikšmingą kiekį DOPE (20 %), kuris, kaip žinoma, mažina lipidų susipakavimo efektyvumą ir gali palengvinti baltymo įsiterpimą į dvisluoksnį. Svarbu pabrėžti, jog literatūroje yra aprašyta S100A9 baltymo sąveika su vienu iš pagrindinių lipidų plaustų komponentų – GM1, išryškinant šią sąveiką kaip vieną iš galimų S100A9 neurotoksiškumo mechanizmų [318]. Galima manyti, kad neigiamą krūvį turintis glikolipidas GM1 lėmė S100A9 preferenciją skystajai tvarkingajai dvisluoksnio fazei, o baltymo įsiterpimas į membraną sukėlė lipidų molekulių lateralinį išsiplėtimą. Šią hipotezę patvirtina ir tai, jog be L_o domenų plonėjimo, AJM topografijos vaizduose taip pat buvo fiksuotas ir laipsniškas jų užimamo paviršiaus ploto augimas laikui bėgant (**3.28 pav. A, B**). Tikėtina, kad L_o domenams plečiantis, gretimų fosfolipidinių molekulių, esančių L_d fazėje, hidrofobinės angliavandenilių grandinės yra labiau suspaudžiamos, dėl to padidėja jų tvarkos laipsnis, o aukščio skirtumai tarp L_o ir L_d fazių tampa labiau išreikšti (**3.29 pav.**). Nepaisant to, kad dauguma tyrimų rodo PE dominavimą L_d fazėje [319], manome, jog net ir nedidelė jo koncentracija L_o regionuose galėjo turėti lemiamos įtakos stebimiems membranų struktūriniais pokyčiais.



3.29 pav. Siūlomas S100A9 baltymo sąveikos su lipidų plaustus imituojančiomis membranomis mechanizmas. S100A9 įsiterpia į dvisluoksnį ir sukelia lokalius membranų storio sumažėjimus L_o fazėje. Šie pokyčiai, galimai, susiję su lipidų molekulių lateralinio išsiplėtimu L_o fazėje. Dėl L_o fazės išsiplėtimo, aplinkinėse L_d srityse esančių lipidų angliavandenilinės grandinės tampa labiau suspaustos, taip padidinant jų tvarkos laipsnį.

Lateralinį fazių atsiskyrimą *in vitro* galime imituoti ir naudodami mažiau kompleksiškas sistemas. Vienas dažniausiai naudojamų tokių sistemų pavyzdžių – DOPC/DPPC membranos. Dėl ženkliai besiskiriančių DOPC ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) ir DPPC ($41\text{ }^{\circ}\text{C}$) fazinio virsmo temperatūrų, kambario temperatūroje šiai sistemai būdingas skystosios (L_d) ir gelinės (L_{β}) fazių atsiskyrimas [320]. Dėl šios priežasties, suformuotų membranų AJM topografijos vaizduose galime išskirti gelinius DPPC domenų, apsuptus skystosios DOPC fazės (**3.30 pav. A**). Vaizdų analizė atskleidė, kad šie domenai yra $1,0 \pm 0,3\text{ nm}$ aukštesni nei juos supanti skystoji fazė, o tai atitinka literatūroje pateikiamas L_{β} ir L_d fazių aukščio skirtumo vertes ($1,4 \pm 0,3\text{ nm}$) [321]. Fazių atsiskyrimas matomas ir AJM fazės kanale, kur L_{β} domenai vaizduojami kaip šviesesnės sritys.

Paveikus šią, dviejų fazių, membraną S100A9 baltymu, per 2 val. inkubacijos laikotarpį akivaizdžių paviršiaus defektų nenustatyta, tačiau, kaip ir DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 sistemų atveju, buvo pastebėtas ženklus lateralinės lipidų organizacijos praradimas (**3.30 pav. B–D**). Vis dėlto, šioje sistemoje lipidų persitvarkymo mechanizmas skyrėsi. DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 modelyje buvo fiksuotas laipsniškas L_o domenų plonėjimas, o DOPC/DPPC sistemoje dominavo gelinės fazės erozija ir sotaus glicerofosfolipido DPPC difuzija į L_d sritį. Gelinės fazės erozija prasidėjo nuo domenų kraštų – vietų, kuriose, dėl storio neatitikimo tarp L_{β} ir L_d fazių, susidaro didžiausias ribinis įtempis. Šis ribinis įtempis yra laikomas vienu pagrindinių molekulinį veiksmų, skatinančių citolitinių peptidų lokalizaciją fazių sandūroje [322]. Panašus efektas stebėtas ir antibiotiko azitromicino [323] ir ciklinio lipopeptido surfaktino [324] atvejais, kur šių molekulių įsiterpimas fazių sandūroje taip pat sukėlė laipsnišką L_{β} fazės eroziją. Nors po 2 val. inkubacijos topografijos vaizde vis dar buvo matomi nedideli fragmentai, savo aukščiu atitinkantys L_{β} fazę (**3.30 pav. D**), dėl S100A9 sukeltos fragmentacijos ir padidėjusios aukščio variacijos buvo užfiksuotas vidutinio paviršiaus šiurkštumo padidėjimas ($R_a = 0,46\text{ nm}$ – 0 val.; $R_a = 0,54\text{ nm}$ – 2 val.) (**9 priedas**). Visgi, nors morfologiniai pokyčiai yra akivaizdūs, tikslūs molekuliniai mechanizmai, kuriais S100A9 baltymas sukelia laipsnišką gelinės fazės irimą, kol kas lieka iki galo nesuprasti. Pažymėtina, kad stebėti morfologijos pokyčiai nesukėlė reikšmingo membranos integralumo praradimo, o kalceino išlaisvinimo vertės iš S100A9 baltymo paveiktų DOPC/DPPC liposomų per 4 val. laikotarpį neviršijo 2 % (**14 priedas**).



3.30 pav. S100A9 baltymo sukeltas lateralinės lipidų organizacijos praradimas. DOPC/DPPC lipidinės membranos AJM topografijos (viršutinės zonos) ir fazės kanalo (apatinės zonos) vaizdai, gauti prieš poveikį baltymu (A), taip pat praėjus 0,5 (B), 1 (C) ir 2 val. (D) po S100A9 injekcijos. DOPC praturtintos membranos sritys pažymėtos L_d , o DPPC turtingi regionai – L_β .

Apžvelgus S100 šeimos baltymų sąveikų su dviejų fazių membranomis rezultatus, galime teigti, jog S100A9 baltymas preferentiškai sąveikauja su L_o arba L_β fazių domenais, sukeldamas lateralinės lipidų organizacijos praradimą. Pažymėtina, jog DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 sistemų atveju, stebėti morfologijos pokyčiai koreliavo su nežymiu dvisluoksnio laidumo verčių padidėjimu. Tuo tarpu, vykstant L_β fazės erozijai, membranos integralumo pokyčiai stebėti nebuvo. Vertėtų atkreipti dėmesį, kad nors EIS metodu ir buvo užfiksuoti lipidų plaustus imituojančių membranų dielektrinių savybių pokyčiai po poveikio S100A8 ir S100A8/A9, šių sistemų sąveika su minėtais baltymais AJM metodu tirta nebuvo.

3.3.7. Membranų nanomechaninių savybių įvertinimas

Siekiant nustatyti ar S100A9 baltymu paveiktos ir nepaveiktos lipidinės membranos pasižymi vienodomis nanomechaninėmis savybėmis, buvo apskaičiuojamas Jungo modulis. Kuo ši vertė yra didesnė, tuo tiriamasis mėginys yra standesnis. Nustatyta, jog baltymu nepaveiktos membranos, priklausomai nuo lipidinės kompozicijos, pasižymėjo įvairiomis Jungo modulio vertėmis, svyruojančiomis nuo $5,0 \pm 1,5$ MPa (DOPC/DOPS) iki $24,4 \pm 2,4$ MPa (DOPC/DPPC L_β fazėje) (**3.3 lentelė**). Pažymėtina, jog Jungo modulio vertės priklauso nuo įvairių eksperimentinių parametrų, įskaitant tirpalo joninę jėgą, mikrokantileverio lankstumo konstantą, adatos storį, zondo nuleidimo greitį bei jėgą, veikiančią tarp mėginio ir adatos matavimo

metu [325,326]. Todėl ne visuomet tikslu lyginti gautas vertes su literatūroje pateikiamomis vertėmis bei reikėtų vertinti tik bendrus duomenų kitimo dėsningumus.

3.3 lentelė. Membranų nanomechaninių savybių įvertinimas AJM metodu. Lentelėje pateiktos įvairių lipidinių kompozicijų membranų Jungo modulio (E) vertės prieš poveikį baltymu ir praėjus 30 min. po S100A9 injekcijos.

Kompozicija	E (MPa)	E _{S100A9} (MPa)
DOPC/CHOL	17,7 ± 3,7	11,3 ± 3,9
DOPC/DOPS	5,0 ± 1,5	3,0 ± 0,6
BTLE	11,5 ± 4,5	7,8 ± 3,0
DOPC/DPPC	12,5 ± 3,0 (L _d) 24,4 ± 2,4 (L _β)	12,5 ± 3,3 (L _d) 22,8 ± 2,7 (L _β)

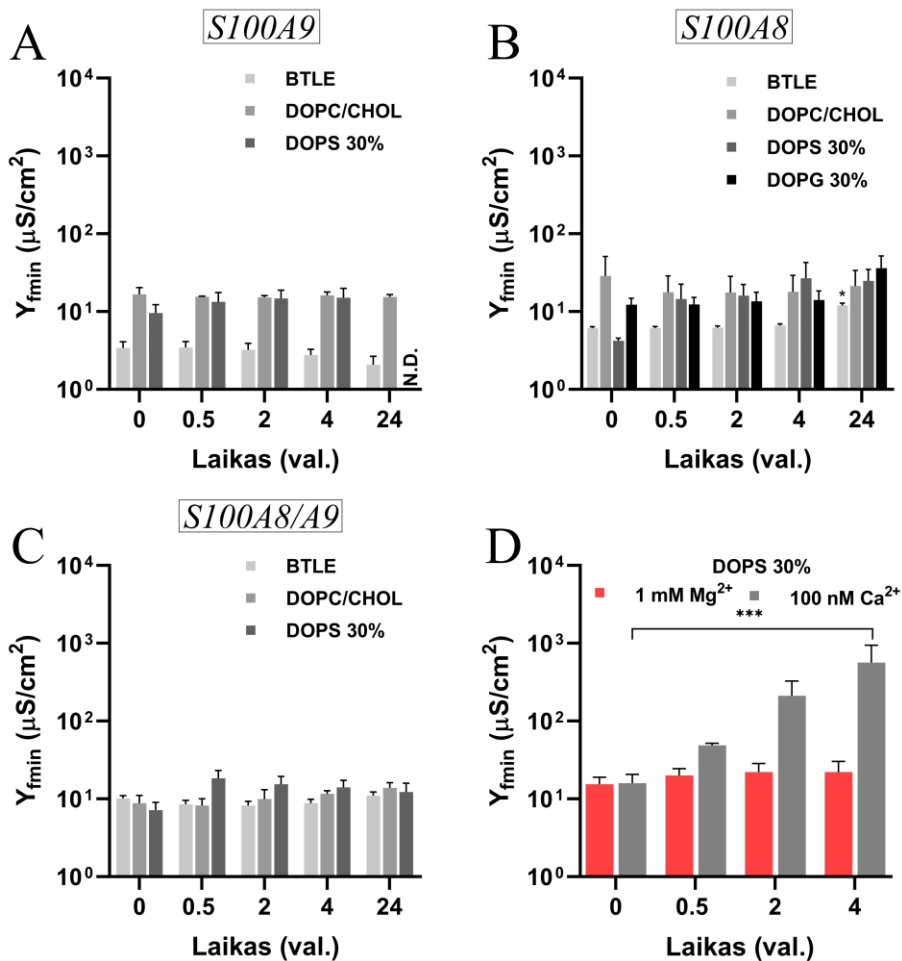
Paveikus visų tirtų lipidinių kompozicijų membranas S100A9 baltymu, po maždaug 30 min. inkubacijos, buvo stebimas Jungo modulio verčių sumažėjimas, siekiantis iki 40 %. Membranų standumo verčių pokyčiai nebuvo detektuoti tik DOPC/DPPC dvisluoksnių L_d fazėje, taip dar kartą patvirtinant baltymo preferenciją L_β būsenai. Literatūroje, Jungo modulio verčių sumažėjimas yra stebimas paveikus lipidų dvisluoksnius Aβ bei kitais, amiloidinėmis savybėmis pasižyminčiais, baltymais [327]. Šie membranų standumo pokyčiai yra aiškinami sumažėjusiu lipidų susipakavimo efektyvumu, kurį sukelia baltymų įsiterpimas į lipidų dvisluoksnį [328]. Taigi, gauti duomenys galėtų patvirtinti mūsų anksčiau iškeltą hipotezę, teigiančią, jog S100A9 baltymo sukelti dvisluoksnių morfologijos pokyčiai yra bent iš dalies sąlygoti baltymo įsiterpimo į membraną.

3.3.8. Kalcio jonų įtaka baltymo–lipido sąveikai

Ankstesni tyrimai parodė, kad kalcio jonų prisijungimas sukelia konformacinius S100 šeimos narių pokyčius – šio proceso metu atsiveria hidrofobinė kišenė, galinti skatinti baltymų sąveiką su lipidų dvisluoksniais [329]. Šių katijonų prisijungimo sukeliami baltymų struktūriniai pokyčiai buvo stebimi ir mūsų eksperimentinėmis sąlygomis. Vis dėlto, svarbu paminėti, jog mūsų tyrimų metu, vykstant Ca²⁺ jonų prisijungimui, aromatinė triptofano šoninė grupė buvo paslėpta S100A8 hidrofobinėje šerdyje (žr. 3.1.2 skyrelį), o stebėti konformacijos pokyčiai sulėtino baltymo agregacijos procesus (žr. 3.2.2 skyrelį).

Siekdami įvertinti kalcio jonų poveikį mūsų tiriamų S100 baltymų sukeltos membranos pažaidos laipsniui, eksperimentuose pasirinkome fiziologiškai aktualias Ca^{2+} koncentracijas, imituojančias tiek viduląstelinę (100 nM), tiek užląstelinę (1 mM) terpes. Rezultatai parodė, kad esant aukštesnėms Ca^{2+} jonų koncentracijoms (1 mM), S100A9, S100A8 ir S100A8/A9 sukelia lipidinių membranų pažaidą 4 val. bėgyje yra visiškai slopinama (**3.31 pav. A–C**). Per šį inkubacijos laikotarpį mūsų tirtose sistemose statistškai reikšmingų dielektrinių savybių pokyčių užfiksuota nebuvo. Tačiau po 24 val., S100A9 baltymas reikšmingai pažeidė sudėtyje DOPS turinčias membranas, o dėl itin didelio pažaidos masto, šios kompozicijos lipidų dvisluoksnio dielektrinių savybių patikimai įvertinti EIS metodu jau nebuvo įmanoma. Po 24 val. inkubacijos statistškai reikšmingi dielektrinių savybių pokyčiai buvo stebimi ir BTLE kompozicijos membranose, paveiktose S100A8 baltymu. Šiuo atveju Y_{fmin} vertė padidėjo beveik du kartus, tačiau, kai inkubacija buvo atliekama be kalcio jonų, šis pokytis siekė 3,6 karto (**žr. 3.3.3 skyrelį**). Be to, inkubuojant S100A8 su DOPS praturtintu dvisluoksniu, Y_{fmin} reikšmė per atitinkamą matavimo laikotarpį padidėjo beveik 6 kartus, nors šis skirtumas ir nebuvo statistškai reikšmingas. Galiausiai, tiriant S100A8/A9 sąveiką su skirtingų kompozicijų lipidinėmis membranomis Ca^{2+} jonų aplinkoje, net po 24 val. inkubacijos statistškai reikšmingų dvisluoksnio laidumo pokyčių nustatyta nebuvo.

Nustatyta, jog divalenčiai katijonai pasižymi stipriu afiniškumu neigiamą krūvį turinčioms lipidinėms membranoms. Šių sąveikų metu padidėja membranos standumas ir lipidų susipakavimo efektyvumas [330,331], keičiasi hidrofilinių galvūčių konformacija, didėja hidrofobinių uodegėlių tvarkos laipsnis [332], taip pat, sumažėja lipidų dvisluoksnio hidratacija bei yra neutralizuojamas paviršiaus krūvis [333]. Dėl minėtų efektų, tikėtina, jog stebimas membranos pažaidos slopinimas Ca^{2+} jonų aplinkoje yra susijęs ne su paties baltymo konformacijos, tačiau su lipidų dvisluoksnio struktūriniais, pokyčiais. Ši hipotezė buvo patvirtinta įžvalgomis, gautomis tiriant S100A8 sąveiką su anijonine membrana Mg^{2+} aplinkoje: nors Mg^{2+} katijonai nulemia tik minimalius baltymo struktūrinius pokyčius (**žr. 3.1.2 skyrelį**), jų buvimas terpėje pilnai slopino dvisluoksnio pažaidų atsiradimą (**3.31 pav. D**). Pažymėtina, kad mūsų tyrimuose naudota Mg^{2+} jonų koncentracija (1 mM) atitinka fiziologines laisvojo magnio koncentracijas, randamas tiek užląstelinėje, tiek viduląstelinėje terpėse [334].



3.31 pav. S100 baltymų sąveika su lipidinėmis membranomis divalenčių katijonų aplinkoje. Laidumo vertės, nustatytos membranas inkubuojant su S100A9 (A), S100A8 (B) ir S100A8/A9 (C) Ca²⁺ jonų (1 mM) aplinkoje. (D) S100A8 sukeliama membranos dielektrinių savybių pokyčiai aplinkoje esant 100 nM Ca²⁺ arba 1 mM Mg²⁺. Matavimai atlikti HEPES buferiniame tirpale, 22 °C, naudojant 10 μM baltymų koncentracijas. DOPS 30 % žymi DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2) lipidinę kompoziciją, DOPG 30 % – DOPC/DOPE/DOPG/CHOL (2/3/3/2). Statistinis reikšmingumas žymimas: * ($p \leq 0,05$), *** ($p \leq 0,001$). N.D. – vertė nedetektuota.

Svarbu pažymėti, kad sumažinus Ca²⁺ jonų koncentraciją iki 100 nM, S100A8 sukeliama membranos pažeida buvo tik iš dalies slopinama. Per 4 val. inkubaciją anijoninio, DOPS turinčio, lipidinio dvisluoksnio laidumo vertė padidėjo 35 kartus (**3.31 pav. D**), t. y. maždaug tris kartus mažiau nei sistemoje be kalcio jonų (**žr. 3.16 pav.**). Atsižvelgiant į tai, kad S100A8 baltymo struktūroje esančių dviejų EF-rankos motyvų afiniškumas kalcio jonams yra 10–50 μM ir 200–500 μM [335], terpėje su 100 nM Ca²⁺ koncentracija, baltymas išlieka apo formoje. Tai dar kartą patvirtina hipotezę,

jog S100 baltymų sukeltos membranos pažaidos slopinimas pirmiausia yra nulemtas kalcio jonų sukeltų lipidinio dvisluoksnio struktūrinių, o ne tiesioginių baltymo konformacijos, pokyčių. Vis dėlto galimybės, kad stebimas slopinimo efektas bent iš dalies priklauso ir nuo kalcio poveikio baltymo struktūrai, visiškai atmesti nereikėtų. Nors didžiausias S100 baltymų sukeltos membranos pažaidos mastas yra stebimas esant žemai, viduląstelinei erdvei būdingai, kalcio jonų koncentracijai, galima manyti, jog sutrikusi kalcio homeostazė neurodegeneracinių ligų metu [336] galėtų sudaryti sąlygas šių baltymų lemiamai dvisluoksnio pažaidai ir užląstelinėje aplinkoje. Svarbu pažymėti, kad tiesioginis ryšys tarp kalcio lygio ir neurodegeneracijos buvo siūlomas ir anksčiau, remiantis stebėjimais, jog padidėjusi kalcio jonų koncentracija serume gali sumažinti Alzheimerio ligos riziką [337].

3.4 Apibendrinimas

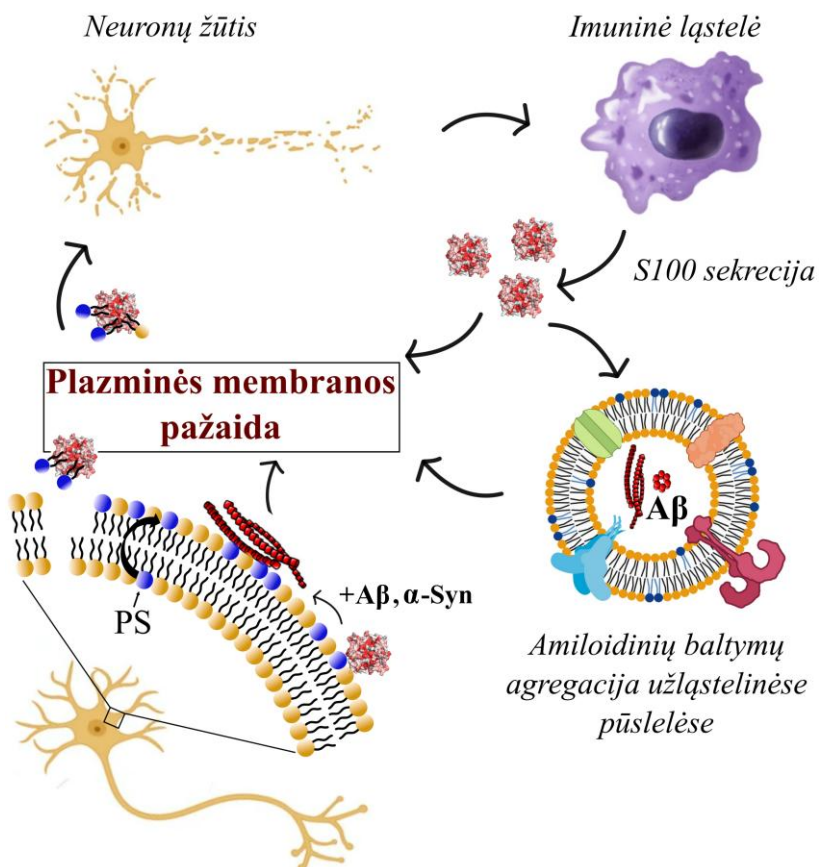
Neurouždegimas yra laikomas vienu pagrindinių veiksnių, lemiančių neurodegeneracinių sutrikimų vystymąsi [4]. Nepaisant to, jog ankstesni tyrimai pabrėžė prouždegiminių S100 šeimos baltymų svarbą neurodegeneracinių ligų progresijoje [71], plazminės membranos vaidmuo šiame procese vis dar lieka iki galo nenustatytas. Šiame darbe, įvertinę S100A8, S100A9 ir jų formuojamo heterokomplekso (S100A8/A9) sąveiką su įvairios sudėties dirbtinėmis membranomis, nustatėme, jog baltymų sukeltos dvisluoksnio pažaidos laipsnis priklauso tiek nuo lipidinės kompozicijos, tiek nuo poveikio trukmės. Pažymėtina, jog mūsų tirtų baltymų atvejais, didžiausias membranos pažaidos mastas buvo fiksuotas anijoninėse, DOPS praturtintose, membranose. Nustatyta, jog efektyviausiai minėtos kompozicijos membranas pažeidė S100A8 baltymas, o silpniausias efektas buvo stebimas vykstant dvisluoksnio sąveikai su S100A9 baltymu. Tikėtina, kad ryškus S100A8 afiniškumas anijoniniams lipidams yra susijęs su jo struktūrinėmis savybėmis: bioinformatinės analizės metu nustatyta potenciali transmembraninė šio baltymo sritis pasižymi teigiamu krūviu, priešingai nei S100A9 baltymo atveju, kur ši sritis buvo įkrauta neigiamai. Verta paminėti, kad S100A8 baltymo afiniškumas pasireiškė ne tik anijoniniams lipidų dvisluoksniams, bet ir neigiamai įkrautiems paviršiams. Tai didino lokalią baltymo koncentraciją substrato ir skysčio sąlyčio riboje bei spartino agregacijos procesus.

Tyrimų metu nustatyta itin ryški DOPS praturtintų membranų pažaida S100A8 ir S100A9 baltymais leidžia manyti, kad šis anijoninis fosfolipidas galėtų atlikti svarbų vaidmenį reguliuojant minėtų baltymų funkcionalumą

tiek fiziologinėmis, tiek patologinėmis sąlygomis. PS yra vienas pagrindinių anijoninių fosfolipidų eukariotinių ląstelių plazminėje membranoje, o smegenyse, priklausomai nuo regiono, jo kiekis gali siekti net iki 21 % visų lipidų masės [338]. PS metabolizmo pokyčiai yra siejami su įvairiomis centrinės nervų sistemos ligomis, tačiau duomenys išlieka kontraversiški: kai kurie tyrimai rodo, kad neurodegeneracinėmis ligomis sergančių pacientų smegenyse PS kiekis sumažėja, o kiti teigia, kad jis padidėja arba lieka nepakitęs [302]. Pažymėtina, kad fiziologinėmis sąlygomis PS daugiausia lokalizuojasi vidinėje, t. y. citoplazminėje, plazminės membranos pusėje. Tačiau, esant neurouždegimui ar oksidaciniam stresui, PS gali būti pernešamas į išorinę membranos sluoksnį, tokiu būdu signalizuodamas apie ląstelių apoptozę – vieną iš neurodegeneracijos požymių [339].

Atsižvelgiant į tai, kad S100A8 ir S100A9 baltymų sekrecijos mechanizmai vis dar nėra iki galo suprasti, galima manyti, jog lipidų pertvarka ir PS pernaša į išorinę membranos sluoksnį galėtų palengvinti šių baltymų išskyrimą į užląstelinę terpę. Analogiški mechanizmai yra stebimi ir kitų, PS rišančių baltymų, pavyzdžiui, aneksino V, atveju [340]. Manome, jog ši pernaša galėtų vykti tiek tiesiogiai, kai S100 baltymai jungiasi prie PS, tiek netiesiogiai, per tarpinę sąveiką su prie PS prijungtu aneksinu V. Pažymėtina, kad S100A9 baltymo sąveika su aneksinu V jau yra aprašyta literatūroje [341]. Tokiu būdu, nuo PS priklausoma baltymų pernaša galėtų prisidėti prie S100A8 ir S100A9 kaupimosi ir agregacijos užląstelinėje erdvėje – reiškinių, dažnai stebimo neurodegeneracinių procesų metu [114]. Verta paminėti, jog tik nedidelė S100A8 ir S100A9 dalis yra išskiriama neuronų, daugiausia šie baltymai yra sekretuojami imuninių ląstelių, įskaitant makrofagus, monocitus ir neutrofilus [12]. Taigi, neurouždegimo sąlygomis, padidėjusi šių baltymų sekrecija iš imuninių ląstelių [342] galėtų sukelti neuronų plazminės membranos pažeidimus, ypač kai PS yra lokalizuotas išoriniame membranos monosluoksnyje (**3.32 pav.**).

Svarbu pažymėti, kad PS taip pat gausiai randamas ir užląstelinėse pūslelių membranos išoriniame sluoksnyje. Šios pūslelės atlieka reikšmingą vaidmenį pernešant amiloidinius baltymus tarp skirtingų smegenų regionų [343]. Tyrimai rodo, kad S100A8 baltymas gali skatinti A β agregaciją būtent užląstelinėse pūslelėse [344]. Tikėtina, jog S100A8 afiniškumas PS molekulėms pūslelių paviršiuje yra svarbus šio proceso veiksnys. Susidarę A β agregatai savo ruožtu gali toliau inicijuoti plazminės membranos pažeidimus [162] ir taip prisidėti prie neurodegeneracijos progresijos.



3.32 pav. Siūlomas S100 baltymų vaidmuo neurodegeneracijoje. S100A8 ir S100A8/A9, išskiriami imuninių ląstelių, gali tiesiogiai sąveikauti su fosfatidilserino turinčiomis membranomis ir pažeisti jas detergente mechanizmu. S100A8 gali sąveikauti su užląstelinėmis pūslelėmis, skatindamas amiloidinių baltymų agregaciją jų viduje. S100A8 sąveika su anijoninėmis membranomis skatina šio baltymo agregacijos procesus. S100 šeimos baltymai gali koagreguoti ir su kitais amiloidiniais baltymais, taip prisidedami prie citotoksiškų amiloidinių darinių susidarymo. Aptarti mechanizmai lemia ląstelių žūtį, pakartotinę imuninių ląstelių aktyvaciją ir tolesnę S100 baltymų sekreciją.

Šiame darbe, įvertinę S100A8 ir S100A8/A9 sąveikos su anijoninėmis lipidinėmis membranomis mechanizmus, nustatėme, kad šie baltymai gali sukelti lipidų molekulių ištraukimą iš dvisluoksnio – procesą, būdingą vadinamajam detergente efektui [296]. Svarbu paminėti, jog remiantis ThT fluorescencijos intensyvumo duomenimis, anijoninės membranos spartino S100A8 bei S100A8/A9 agregaciją. Šiuo atveju galime spekuliuoti, jog prieš įvykstant dvisluoksnio fragmentacijai detergente mechanizmu, membrana veikia kaip katalizatorius – didindama lokalią baltymo koncentraciją savo paviršiuje, ji sudaro palankias sąlygas potencialiai neurotoksiškų agregatų susidarymui. Nustatyta, jog susiformavę S100 šeimos

baltymų agregatai gali funkcionuoti kaip platforma, skatinanti ir kitų amiloidinių baltymų, tokių kaip A β ar α -Syn, agregaciją [105,110,114]. Kaip minėta anksčiau, šios susiformavusios amiloidinių baltymų sankaupos galėtų toliau inicijuoti ląstelės plazminės membranos pažeidimą bei sukelti neuronų žūtį. Be to, nustatyta, jog neuronų žūtis gali aktyvuoti prouždegiminių baltymų, įskaitant S100 šeimos narius, raišką bei sekreciją į užląstelinę terpę [53]. Visi šie įvykiai sudaro grįžtamojo ryšio reakciją, kuri, tikėtina, palaiko lėtinį neurouždegimą ir skatina neurodegeneracinių ligų progresiją.

Nepaisant to, jog S100A9 baltymui sąveikaujant su anijoninėmis membranomis buvo užfiksuoti ryškūs jų dielektrinių savybių pokyčiai, AJM vizualizacijos metu šios kompozicijos lipidų dvisluoksniuose defektų atsiradimas stebimas nebuvo. Vietoje to, ant membranos paviršiaus buvo fiksuotas globulinių oligomerų susidarymas. Verta paminėti, jog ryškiausi morfologijos pokyčiai buvo stebimi kaulės smegenų lipidų ekstrakto membranose – paveikus jas S100A9 baltymu, buvo fiksuoti lokalūs lipidų dvisluoksniu storio sumažėjimai. Pažymėtina, jog analogiškas lipidų dvisluoksniu plonėjimo efektas buvo stebimas ir S100A9 baltymu paveikus dviejų fazių membraną, savo sudėtimi imituojančią lipidų plaustų struktūras. Priešingai, tyrinėjant geliniais domenais praturtintą lipidinę sistemą (DOPC/DPPC), dvisluoksniu plonėjimo efektas stebėtas nebuvo, tačiau buvo fiksuota laipsniška L β fazės domenų erozija laikui bėgant. Remiantis gautais duomenimis, galima teigti, kad S100A9 baltymas nesąveikauja su lipidinėmis membranomis vienodu ar universaliu mechanizmu – priešingai, jo veikimo pobūdis ir dvisluoksniu pažeidimo mastas priklauso nuo daugelio veiksnių, įskaitant membranos paviršiaus krūvį, fazinę būseną bei molekulinės tvarkos laipsnį. Šie rezultatai leido išskirti tris potencialius S100A9 baltymo neurotoksiškumo mechanizmus: *I.* kaupimasis ant neigiamą krūvį turinčių membranų paviršiaus, vykstant daliniam įsiterpimui į dvisluoksni; *II.* lateralinio fazių atsiskyrimo ir lipidų domenų architektūros sutrikdymas bei *III.* lipidinio dvisluoksniu plonėjimas. Atsižvelgiant į lipidų plaustų svarbą sinapsių formacijoje, S100A9 baltymo inicijuota lipidų nanodomenų pertvarka galėtų sutrikdyti efektyvų nervinio signalo perdavimą, taip sukeliant atminties sutrikimus ir neurodegeneracinių ligų progresiją [345].

Apibendrinant, šiame darbe, pasitelkdami elektrocheminius, mikroskopijos ir fluorescencinės spektroskopijos metodus, nustatėme galimus S100A8, S100A9 ir jų formuojamo heterokomplekso sąveiką su neuronų plazminę membraną imituojančiais lipidų dvisluoksniais mechanizmus. Įdomu tai, kad, nepaisant struktūrinio šių baltymų panašumo, jie pasižymi skirtingais sąveikų su membranomis ypatumais. Vis dėlto, S100A8 ir S100A9 nėra vieninteliai smegenyse aptinkami baltymai, galintys sąveikauti su

lipidinėmis membranomis. Lieka nenustatyta, ar šie S100 šeimos nariai konkuruoja su kitais amiloidiniais baltymais dėl prisijungimo prie membranos sričių, ar veikia sinergiškai, taip dar labiau skatinant membranos destabilizaciją ir neurodegeneracijos progresiją. Siekiant tai išsiaiškinti, būtina struktūriškai ištirti S100A8 ir S100A9 su membranomis formuojamus kompleksus bei identifikuoti specifines baltymų sritis ir lipidinius komponentus, dalyvaujančius darbe aptartose sąveikose. Be to, svarbu įvertinti, ar S100A8 bei S100A9 gali pažeisti ir viduląstelių organelių membranų integralumą ir kaip skirtingų endomembranų sudėtis reguliuoja šių baltymų agregaciją. Pažymėtina, jog nors *in vitro* tyrimai suteikia vertingą pagrindą S100 baltymų sąveikų su membranomis analizei, šiame darbe taikytos modelinės sistemos neatspindi kompleksiškos ląstelės plazminės membranos prigimties. Todėl vienu svarbiausių ateities tyrimų uždavinių išlieka išsiaiškinti šių baltymų poveikį nervinių ląstelių membranų integralumui. Tikimės, kad šiame darbe pristatyti rezultatai paskatins tolimesnius tyrimus, padės geriau suprasti uždegimo ir neurodegeneracijos sąsajas bei atvers galimybes kurti naujas diagnostikos ir terapijos strategijas.

IŠVADOS

1. S100A9 baltymas pasižymi amiloidinėmis savybėmis ir formuoja β -klostėmis praturtintas fibrilines struktūras, o S100A8 sudaro oligomerinius arba netaisyklingos struktūros darinius. Tuo tarpu S100A8/A9 išsiskiria dideliu struktūriniu stabilumu ir mažu polinkiu agreguoti. Kalcio jonų prisijungimas slopina S100A8 ir S100A9 baltymų agregaciją.
2. Artimas kontaktas su lipidinėmis membranomis daro įtaką S100A8 ir S100A9 baltymų agregacijos procesams. Kiaulės smegenų lipidų ekstrakto sudėties membranos skatina S100A9, tačiau slopina S100A8 baltymo agregaciją. Tuo tarpu anijoninės, sudėtyje 1,2-dioleoil-*sn*-glicerio-3-fosfo-L-serino turinčios, membranos slopina S100A9 ir skatina S100A8 agregatų formavimąsi.
3. S100A8 baltymo ir S100A8/A9 komplekso sąveika su dirbtinėmis lipidinėmis membranomis yra lipidų krūviui specifinė. Tikėtina, jog S100A8 ir S100A8/A9 elektrostatškai sąveikauja 1,2-dioleoil-*sn*-glicerio-3-fosfo-L-serinu ir, veikdami detergento mechanizmu, ištraukia lipidus iš membranos aplinkos.
4. S100A9 baltymo įsiterpimas į membraną lemia lipidų molekulių lateralinį išsiplėtimą ir lipidų dvisluoksnio mechaninio standumo sumažėjimą iki 40 %. Šie struktūriniai pokyčiai pasireiškia lokaliais membranos storio sumažėjimais, siekiančiais iki 2 nm.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] L. Muzio, A. Viotti, G. Martino, Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy, *Front. Neurosci.* 15 (2021) 742065. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.742065>.
- [2] I. Morales, L. Guzmán-Martínez, C. Cerda-Troncoso, G.A. Farías, R.B. Maccioni, Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches, *Front. Cell. Neurosci.* 8 (2014) 112. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00112>.
- [3] H. Okazawa, Intracellular amyloid hypothesis for ultra-early phase pathology of Alzheimer's disease, *Neuropathology* 41 (2021) 93–98. <https://doi.org/10.1111/neup.12738>.
- [4] W. Zhang, D. Xiao, Q. Mao, H. Xia, Role of neuroinflammation in neurodegeneration development, *Signal Transduct. Target. Ther.* 8 (2023) 1–32. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01486-5>.
- [5] V. Garcia, Y.R. Perera, W.J. Chazin, A Structural Perspective on Calprotectin as a Ligand of Receptors Mediating Inflammation and Potential Drug Target, *Biomolecules* 12 (2022) 519. <https://doi.org/10.3390/biom12040519>.
- [6] I. Eue, S. König, J. Pior, C. Sorg, S100A8, S100A9 and the S100A8/A9 heterodimer complex specifically bind to human endothelial cells: identification and characterization of ligands for the myeloid-related proteins S100A9 and S100A8/A9 on human dermal microvascular endothelial cell line-1 cells, *Int. Immunol.* 14 (2002) 287–297. <https://doi.org/10.1093/intimm/14.3.287>.
- [7] Q. Tian, Z. Li, Z. Yan, S. Jiang, X. Zhao, L. Wang, M. Li, Inflammatory role of S100A8/A9 in the central nervous system non-neoplastic diseases, *Brain Res. Bull.* 218 (2024) 111100. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2024.111100>.
- [8] P. Bharadwaj, T. Solomon, C.J. Malajczuk, R.L. Mancera, M. Howard, D.W.M. Arrigan, P. Newsholme, R.N. Martins, Role of the cell membrane interface in modulating production and uptake of Alzheimer's beta amyloid protein, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1860 (2018) 1639–1651. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.03.015>.
- [9] A. Malmendal, C.W. Vander Kooi, N.Chr. Nielsen, W.J. Chazin, Calcium-Modulated S100 Protein–Phospholipid Interactions. An NMR Study of Calbindin D9k and DPC, *Biochemistry* 44 (2005) 6502–6512. <https://doi.org/10.1021/bi050088z>.
- [10] A.F. Garcia, J.L.S. Lopes, A.J. Costa-Filho, B.A. Wallace, A.P.U. Araujo, Membrane Interactions of S100A12 (Calgranulin C), *PLOS ONE* 8 (2013) e82555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082555>.
- [11] X. Yan, K. Kumar, R. Miclette Lamarche, H. Youssef, G.S. Shaw, I. Marcotte, C.E. DeWolf, D.E. Warschawski, E. Boisselier, Interactions between the Cell Membrane Repair Protein S100A10 and Phospholipid Monolayers and Bilayers, *Langmuir* 37 (2021) 9652–9663. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00342>.
- [12] G. Sreejit, M.C. Flynn, M. Patil, P. Krishnamurthy, A.J. Murphy, P.R. Nagareddy, Chapter Six - S100 family proteins in inflammation and beyond, in: G.S. Makowski (Ed.), *Adv. Clin. Chem.*, Elsevier, 2020: pp. 173–231. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2020.02.006>.
- [13] J.C. Silbereis, S. Pochareddy, Y. Zhu, M. Li, N. Sestan, The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System, *Neuron* 89 (2016) 248–268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.008>.

- [14] D. Mukhara, U. Oh, G.N. Neigh, Chapter 15 - Neuroinflammation, in: R. Lanzenberger, G.S. Kranz, I. Savic (Eds.), *Handb. Clin. Neurol.*, Elsevier, 2020: pp. 235–259. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64123-6.00017-5>.
- [15] R. Kölliker-Frers, L. Udovin, M. Otero-Losada, T. Kobiec, M.I. Herrera, J. Palacios, G. Razzitte, F. Capani, Neuroinflammation: An Integrating Overview of Reactive-Neuroimmune Cell Interactions in Health and Disease, *Mediators Inflamm.* 2021 (2021) 9999146. <https://doi.org/10.1155/2021/9999146>.
- [16] O. Le Thuc, N. Blondeau, J.L. Nahon, C. Rovère, The complex contribution of chemokines to neuroinflammation: switching from beneficial to detrimental effects, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1351 (2015) 127–140. <https://doi.org/10.1111/nyas.12855>.
- [17] J.M. Krueger, The role of cytokines in sleep regulation, *Curr. Pharm. Des.* 14 (2008) 3408–3416. <https://doi.org/10.2174/138161208786549281>.
- [18] B.E. Deverman, P.H. Patterson, Cytokines and CNS development, *Neuron* 64 (2009) 61–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.002>.
- [19] A. Yarlagadda, E. Alfson, A.H. Clayton, The blood brain barrier and the role of cytokines in neuropsychiatry, *Psychiatry (Edgmont)* 6 (2009) 18–22.
- [20] A.H. Miller, V. Maletic, C.L. Raison, Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression, *Biol. Psychiatry* 65 (2009) 732–741. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.11.029>.
- [21] C.L. Raison, L. Capuron, A.H. Miller, Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression, *Trends Immunol.* 27 (2006) 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.11.006>.
- [22] L.C. Borish, J.W. Steinke, Cytokines and chemokines, *J. Allergy Clin. Immunol.* 111 (2003) S460–S475. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.108>.
- [23] I. Shachar, N. Karin, The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications, *J. Leukoc. Biol.* 93 (2013) 51–61. <https://doi.org/10.1189/jlb.0612293>.
- [24] M. Lyman, D.G. Lloyd, X. Ji, M.P. Vizcaychipi, D. Ma, Neuroinflammation: the role and consequences, *Neurosci. Res.* 79 (2014) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.10.004>.
- [25] V. Calsolaro, P. Edison, Neuroinflammation in Alzheimer’s disease: Current evidence and future directions, *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 12 (2016) 719–732. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>.
- [26] C. Esche, C. Stellato, L.A. Beck, Chemokines: Key Players in Innate and Adaptive Immunity, *J. Invest. Dermatol.* 125 (2005) 615–628. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23841.x>.
- [27] B. Moser, P. Loetscher, Lymphocyte traffic control by chemokines, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 123–128. <https://doi.org/10.1038/84219>.
- [28] S.S. Ousman, P. Kubes, Immune surveillance in the central nervous system, *Nat. Neurosci.* 15 (2012) 1096–1101. <https://doi.org/10.1038/nn.3161>.
- [29] M.W. Salter, B. Stevens, Microglia emerge as central players in brain disease, *Nat. Med.* 23 (2017) 1018–1027. <https://doi.org/10.1038/nm.4397>.
- [30] M.M. Mariani, T. Kielian, Microglia in Infectious Diseases of the Central Nervous System, *J. Neuroimmune Pharmacol.* 4 (2009) 448–461. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9170-6>.
- [31] J. Wang, W. He, J. Zhang, A richer and more diverse future for microglia phenotypes, *Heliyon* 9 (2023) e14713. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14713>.

- [32] Y. Tang, W. Le, Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases, *Mol. Neurobiol.* 53 (2016) 1181–1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>.
- [33] F. Leng, P. Edison, Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?, *Nat. Rev. Neurol.* 17 (2021) 157–172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>.
- [34] M.O. Welcome, Neuroinflammation in CNS diseases: Molecular mechanisms and the therapeutic potential of plant derived bioactive molecules, *PharmaNutrition* 11 (2020) 100176. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2020.100176>.
- [35] C.S. von Bartheld, J. Bahney, S. Herculano-Houzel, The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting, *J. Comp. Neurol.* 524 (2016) 3865–3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>.
- [36] Y.Y. Fan, J. Huo, A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils?, *Neurochem. Int.* 148 (2021) 105080. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105080>.
- [37] S.A. Liddel, B.A. Barres, Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential, *Immunity* 46 (2017) 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>.
- [38] M. Boccazzi, S. Raffaele, M. Fumagalli, Not only myelination: the immune-inflammatory functions of oligodendrocytes, *Neural Regen. Res.* 17 (2022) 2661–2663. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.342678>.
- [39] T. Philips, J.D. Rothstein, Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons, *J. Clin. Invest.* 127 (2017) 3271–3280. <https://doi.org/10.1172/JCI90610>.
- [40] L. Peferoen, M. Kipp, P. Valk, J.M. Noort, S. Amor, Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system, *Immunology* 141 (2014) 302–313. <https://doi.org/10.1111/imm.12163>.
- [41] Y. Wu, U.L.M. Eisel, Microglia-Astrocyte Communication in Alzheimer's Disease, *J. Alzheimer's Dis.* 95 (2023) 785–803. <https://doi.org/10.3233/JAD-230199>.
- [42] R.M. McManus, M.T. Heneka, Role of neuroinflammation in neurodegeneration: new insights, *Alzheimers Res. Ther.* 9 (2017) 14. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0241-2>.
- [43] K. Mayne, J.A. White, C.E. McMurran, F.J. Rivera, A.G. de la Fuente, Aging and Neurodegenerative Disease: Is the Adaptive Immune System a Friend or Foe?, *Front. Aging Neurosci.* 12 (2020) 572090. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.572090>.
- [44] M. Saiki, S. Honda, K. Kawasaki, D. Zhou, A. Kaito, T. Konakahara, H. Morii, Higher-order Molecular Packing in Amyloid-like Fibrils Constructed with Linear Arrangements of Hydrophobic and Hydrogen-bonding Side-chains, *J. Mol. Biol.* 348 (2005) 983–998. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.022>.
- [45] L. Lannfelt, N.R. Relkin, E.R. Siemers, Amyloid- β -directed immunotherapy for Alzheimer's disease, *J. Intern. Med.* 275 (2014) 284–295. <https://doi.org/10.1111/joim.12168>.
- [46] S.A. Small, K. Duff, Linking A β and Tau in Late-Onset Alzheimer's Disease: A Dual Pathway Hypothesis, *Neuron* 60 (2008) 534–542. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.007>.
- [47] J.C. Park, S.H. Han, I. Mook-Jung, Peripheral inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease: a brief review, *BMB Rep.* 53 (2020) 10–19. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.1.309>.

- [48] A. Griiciuc, R.E. Tanzi, The role of innate immune genes in Alzheimer's disease, *Curr. Opin. Neurol.* 34 (2021) 228–236. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000911>.
- [49] T.R. Hammond, S.E. Marsh, B. Stevens, Immune Signaling in Neurodegeneration, *Immunity* 50 (2019) 955–974. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.016>.
- [50] M.T. Heneka, M.P. Kummer, E. Latz, Innate immune activation in neurodegenerative disease, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 463–477. <https://doi.org/10.1038/nri3705>.
- [51] D.M. Paresce, H. Chung, F.R. Maxfield, Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein by microglial cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 29390–29397. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.46.29390>.
- [52] X. Pan, Y. Zhu, N. Lin, J. Zhang, Q. Ye, H. Huang, X. Chen, Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid is attenuated by oligomeric β -amyloid: implications for Alzheimer's disease, *Mol. Neurodegener.* 6 (2011) 45. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-45>.
- [53] C. Venegas, M.T. Heneka, Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease, *J. Leukoc. Biol.* 101 (2017) 87–98. <https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0416-204R>.
- [54] N. Maphis, G. Xu, O.N. Kokiko-Cochran, S. Jiang, A. Cardona, R.M. Ransohoff, B.T. Lamb, K. Bhaskar, Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain, *Brain J. Neurol.* 138 (2015) 1738–1755. <https://doi.org/10.1093/brain/awv081>.
- [55] N.J. Diederich, D.J. Surmeier, T. Uchihara, S. Grillner, C.G. Goetz, Parkinson's disease: Is it a consequence of human brain evolution?, *Mov. Disord.* 34 (2019) 453–459. <https://doi.org/10.1002/mds.27628>.
- [56] I. Kawahata, D.I. Finkelstein, K. Fukunaga, Pathogenic Impact of α -Synuclein Phosphorylation and Its Kinases in α -Synucleinopathies, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 6216. <https://doi.org/10.3390/ijms23116216>.
- [57] J.M. Milber, J.V. Noorigan, J.F. Morley, H. Petrovitch, L. White, G.W. Ross, J.E. Duda, Lewy pathology is not the first sign of degeneration in vulnerable neurons in Parkinson disease, *Neurology* 79 (2012) 2307–2314. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318278fe32>.
- [58] W. Zhang, T. Wang, Z. Pei, D.S. Miller, X. Wu, M.L. Block, B. Wilson, W. Zhang, Y. Zhou, J.S. Hong, J. Zhang, Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease, *FASEB J.* 19 (2005) 533–542. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2751com>.
- [59] C. Kim, D.H. Ho, J.E. Suk, S. You, S. Michael, J. Kang, S. Joong Lee, E. Masliah, D. Hwang, H.J. Lee, S.J. Lee, Neuron-released oligomeric α -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia, *Nat. Commun.* 4 (2013) 1562. <https://doi.org/10.1038/ncomms2534>.
- [60] M. Pajares, A. I Rojo, G. Manda, L. Boscá, A. Cuadrado, Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications, *Cells* 9 (2020) 1687. <https://doi.org/10.3390/cells9071687>.
- [61] Y. Xia, G. Zhang, L. Kou, S. Yin, C. Han, J. Hu, F. Wan, Y. Sun, J. Wu, Y. Li, J. Huang, N. Xiong, Z. Zhang, T. Wang, Reactive microglia enhance the transmission of exosomal α -synuclein via toll-like receptor 2, *Brain* 144 (2021) 2024–2037. <https://doi.org/10.1093/brain/awab122>.
- [62] C.H. Yu, S. Davidson, C.R. Harapas, J.B. Hilton, M.J. Mlodzianoski, P. Laohamonthonkul, C. Louis, R.R.J. Low, J. Moecking, D. De Nardo, K.R. Balka, D.J.

- Calleja, F. Moghaddas, E. Ni, C.A. McLean, A.L. Samson, S. Tyebji, C.J. Tonkin, C.R. Bye, B.J. Turner, G. Pepin, M.P. Gantier, K.L. Rogers, K. McArthur, P.J. Crouch, S.L. Masters, TDP-43 Triggers Mitochondrial DNA Release via mPTP to Activate cGAS/STING in ALS, *Cell* 183 (2020) 636–649.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.020>.
- [63] M.L. Calió, E. Henriques, A. Siena, C.R.A. Bertoncini, J. Gil-Mohapel, T.R. Rosenstock, Mitochondrial Dysfunction, Neurogenesis, and Epigenetics: Putative Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Neurodegeneration and Treatment, *Front. Neurosci.* 14 (2020) 679. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00679>.
- [64] B.W. Moore, A soluble protein characteristic of the nervous system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19 (1965) 739–744. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(65\)90320-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(65)90320-7).
- [65] R. Donato, B.R. Cannon, G. Sorci, F. Riuzzi, K. Hsu, D.J. Weber, C.L. Geczy, Functions of S100 Proteins, *Curr. Mol. Med.* 13 (2013) 24–57. <https://doi.org/10.2174/156652413804486214>.
- [66] L.L. Gonzalez, K. Garrie, M.D. Turner, Role of S100 proteins in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1867 (2020) 118677. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118677>.
- [67] I. Marenholz, C.W. Heizmann, G. Fritz, S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (2004) 1111–1122. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.096>.
- [68] B.W. Schäfer, C.W. Heizmann, The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology, *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996) 134–140. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)80167-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)80167-8).
- [69] M. Brunjes Brophy, T.G. Nakashige, A. Gaillard, E.M. Nolan, Contributions of the S100A9 C-Terminal Tail to High-Affinity Mn(II) Chelation by the Host-Defense Protein Human Calprotectin, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 17804–17817. <https://doi.org/10.1021/ja407147d>.
- [70] Z. Sattar, A. Lora, B. Jundi, C. Railwah, P. Geraghty, The S100 Protein Family as Players and Therapeutic Targets in Pulmonary Diseases, *Pulm. Med.* 18 (2021) 5488591. <https://doi.org/10.1155/2021/5488591>.
- [71] J.S. Cristóvão, C.M. Gomes, S100 Proteins in Alzheimer's Disease, *Front. Neurosci.* 13 (2019) 463. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00463>.
- [72] S. Teigelkamp, R.S. Bhardwaj, J. Roth, G. Meinardus-Hager, M. Karas, C. Sorg, Calcium-dependent complex assembly of the myeloid differentiation proteins MRP-8 and MRP-14, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 13462–13467. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)98862-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)98862-9).
- [73] M. Garbuglia, M. Verzini, G. Sorci, R. Bianchi, I. Giambanco, A.L. Agneletti, R. Donato, The calcium-modulated proteins, S100A1 and S100B, as potential regulators of the dynamics of type III intermediate filaments, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (1999) 1177–1185. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x1999001000001>.
- [74] Q. Yang, D. O'Hanlon, C.W. Heizmann, A. Marks, Demonstration of Heterodimer Formation between S100B and S100A6 in the Yeast Two-Hybrid System and Human Melanoma, *Exp. Cell Res.* 246 (1999) 501–509. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4314>.
- [75] H.M. Botelho, G. Fritz, C.M. Gomes, Analysis of S100 Oligomers and Amyloids, in: E.M. Sigurdsson, M. Calero, M. Gasset (Eds.), *Amyloid Proteins*

- Methods Protoc., Humana Press, Totowa, NJ, 2012: pp. 373–386. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-551-0_25.
- [76] J. R. Stephan, E. M. Nolan, Calcium-induced tetramerization and zinc chelation shield human calprotectin from degradation by host and bacterial extracellular proteases, *Chem. Sci.* 7 (2016) 1962–1975. <https://doi.org/10.1039/C5SC03287C>.
- [77] F. Shabani, A. Farasat, M. Mahdavi, N. Gheibi, Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer, *Inflamm. Res.* 67 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1173-4>.
- [78] I.P. Korndörfer, F. Brueckner, A. Skerra, The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)₂ heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific association of two EF-hand proteins, *J. Mol. Biol.* 370 (2007) 887–898. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.065>.
- [79] G. Fritz, H.M. Botelho, L.A. Morozova-Roche, C.M. Gomes, Natural and amyloid self-assembly of S100 proteins: structural basis of functional diversity, *FEBS J.* 277 (2010) 4578–4590. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07887.x>.
- [80] Y. Ogoma, H. Kobayashi, T. Fujii, Y. Kondo, A. Hachimori, T. Shimizu, M. Hatano, Binding study of metal ions to S100 protein: ⁴³Ca, ²⁵Mg, ⁶⁷Zn and ³⁹K n.m.r., *Int. J. Biol. Macromol.* 14 (1992) 279–286. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(05\)80041-8](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(05)80041-8).
- [81] B.R. Cannon, D.B. Zimmer, D.J. Weber, S100A1 (S100 calcium binding protein A1), *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* 15 (2011) 873–876. <https://doi.org/10.4267/2042/46035>.
- [82] L.R. Otterbein, J. Kordowska, C. Witte-Hoffmann, C.-L.A. Wang, R. Dominguez, Crystal Structures of S100A6 in the Ca²⁺-Free and Ca²⁺-Bound States, *Structure* 10 (2002) 557–567. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00740-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00740-2).
- [83] S. Réty, J. Sopkova, M. Renouard, D. Osterloh, V. Gerke, S. Tabaries, F. Russo-Marie, A. Lewit-Bentley, The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide., *Nat. Struct. Biol.* 6 (1999) 89–95. <https://doi.org/10.1038/4965>.
- [84] N. Gheibi, M. Ghorbani, H. Shariatifar, A. Farasat, In silico assessment of human Calprotectin subunits (S100A8/A9) in presence of sodium and calcium ions using Molecular Dynamics simulation approach, *PLOS ONE* 14 (2019) e0224095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224095>.
- [85] M.R. Tardif, J.A. Chapeton-Montes, A. Posvanzic, N. Pagé, C. Gilbert, P.A. Tessier, Secretion of S100A8, S100A9, and S100A12 by Neutrophils Involves Reactive Oxygen Species and Potassium Efflux, *J. Immunol. Res.* 2015 (2015) 296149. <https://doi.org/10.1155/2015/296149>.
- [86] K. Sunahori, M. Yamamura, J. Yamana, K. Takasugi, M. Kawashima, H. Yamamoto, W.J. Chazin, Y. Nakatani, S. Yui, H. Makino, The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res. Ther.* 8 (2006) R69. <https://doi.org/10.1186/ar1939>.
- [87] T. Vogl, K. Tenbrock, S. Ludwig, N. Leukert, C. Ehrhardt, M.A.D. van Zoelen, W. Nacken, D. Foell, T. van der Poll, C. Sorg, J. Roth, Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock, *Nat. Med.* 13 (2007) 1042–1049. <https://doi.org/10.1038/nm1638>.

- [88] K. Eggers, K. Sikora, M. Lorenz, T. Taubert, M. Moobed, G. Baumann, K. Stangl, V. Stangl, RAGE-dependent regulation of calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 in human THP-1, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 119 (2011) 353–357. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1268426>.
- [89] J. Li, A.M. Schmidt, Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16498–16506. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16498>.
- [90] S.M. Damo, T.E. Kehl-Fie, N. Sugitani, M.E. Holt, S. Rath, W.J. Murphy, Y. Zhang, C. Betz, L. Hench, G. Fritz, E.P. Skaar, W.J. Chazin, Molecular basis for manganese sequestration by calprotectin and roles in the innate immune response to invading bacterial pathogens, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) 3841–3846. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220341110>.
- [91] T.E. Kehl-Fie, E.P. Skaar, Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.008>.
- [92] Z. Wu, D. Jiang, X. Huang, M. Cai, K. Yuan, P. Huang, S100A8 as a Promising Biomarker and Oncogenic Immune Protein in the Tumor Microenvironment: An Integrative Pancancer Analysis, *J. Oncol.* 2022 (2022) 6947652. <https://doi.org/10.1155/2022/6947652>.
- [93] G. Bouma, W.K. Lam-Tse, A.F. Wierenga-Wolf, H.A. Drexhage, M.A. Versnel, Increased serum levels of MRP-8/14 in type 1 diabetes induce an increased expression of CD11b and an enhanced adhesion of circulating monocytes to fibronectin, *Diabetes* 53 (2004) 1979–1986. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.8.1979>.
- [94] M. Frosch, A. Strey, T. Vogl, N.M. Wulffraat, W. Kuis, C. Sunderkötter, E. Harms, C. Sorg, J. Roth, Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 628–637. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200003\)43:3<628::AID-ANR20>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200003)43:3<628::AID-ANR20>3.0.CO;2-X).
- [95] J.C. Cohen, J.E. Larson, Pathophysiologic consequences following inhibition of a CFTR-dependent developmental cascade in the lung, *BMC Dev. Biol.* 5 (2005) 2. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-5-2>.
- [96] A. Schwarz, E. Bölke, M. Peiper, J. Schulte am Esch, G. Steinbach, M. van Griensven, K. Orth, Inflammatory peritoneal reaction after perforated appendicitis: continuous peritoneal lavage versus non lavage, *Eur. J. Med. Res.* 12 (2007) 200–205.
- [97] A.M. Healy, M.D. Pickard, A.D. Pradhan, Y. Wang, Z. Chen, K. Croce, M. Sakuma, C. Shi, A.C. Zago, J. Garasic, A.I. Damokosh, T.L. Dowie, L. Poisson, J. Lillie, P. Libby, P.M. Ridker, D.I. Simon, Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events, *Circulation* 113 (2006) 2278–2284. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.607333>.
- [98] M.A.D. van Zoelen, T. Vogl, D. Foell, S.Q. Van Veen, J.W.O. van Till, S. Florquin, M.W. Tanck, X. Wittebole, P.-F. Laterre, M.A. Boermeester, J. Roth, T. van der Poll, Expression and role of myeloid-related protein-14 in clinical and experimental sepsis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (2009) 1098–1106. <https://doi.org/10.1164/rccm.200810-1552OC>.
- [99] K. Nistala, H. Varsani, H. Wittkowski, T. Vogl, P. Krol, V. Shah, K. Mamchaoui, P.A. Brogan, J. Roth, L.R. Wedderburn, Myeloid related protein induces

- muscle derived inflammatory mediators in juvenile dermatomyositis, *Arthritis Res. Ther.* 15 (2013) R131. <https://doi.org/10.1186/ar4311>.
- [100] I. Horvath, X. Jia, P. Johansson, C. Wang, R. Moskalenko, A. Steinau, L. Forsgren, T. Wågberg, J. Svensson, H. Zetterberg, L.A. Morozova-Roche, Pro-inflammatory S100A9 Protein as a Robust Biomarker Differentiating Early Stages of Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease, *ACS Chem. Neurosci.* 7 (2016) 34–39. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00265>.
- [101] H. Zhou, C. Zhao, R. Shao, Y. Xu, W. Zhao, The functions and regulatory pathways of S100A8/A9 and its receptors in cancers, *Front. Pharmacol.* 14 (2023) 1187741. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1187741>.
- [102] M.A. Gruden, T.V. Davydova, C. Wang, V.B. Narkevich, V.G. Fomina, V.S. Kudrin, L.A. Morozova-Roche, R.D.E. Sewell, The misfolded pro-inflammatory protein S100A9 disrupts memory via neurochemical remodelling instigating an Alzheimer's disease-like cognitive deficit, *Behav. Brain Res.* 306 (2016) 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.016>.
- [103] M.P. Kummer, T. Vogl, D. Axt, A. Griep, A. Vieira-Saecker, F. Jessen, E. Gelpi, J. Roth, M.T. Heneka, Mrp14 deficiency ameliorates amyloid β burden by increasing microglial phagocytosis and modulation of amyloid precursor protein processing, *J. Neurosci.* 32 (2012) 17824–17829. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1504-12.2012>.
- [104] I.A. Iashchishyn, M.A. Gruden, R.A. Moskalenko, T.V. Davydova, C. Wang, R.D.E. Sewell, L.A. Morozova-Roche, Intranasally Administered S100A9 Amyloids Induced Cellular Stress, Amyloid Seeding, and Behavioral Impairment in Aged Mice, *ACS Chem. Neurosci.* 9 (2018) 1338–1348. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00512>.
- [105] C. Wang, A.G. Klechikov, A.L. Gharibyan, S.K.T.S. Wärmländer, J. Jarvet, L. Zhao, X. Jia, S.K. Shankar, A. Olofsson, T. Brännström, Y. Mu, A. Gräslund, L.A. Morozova-Roche, The role of pro-inflammatory S100A9 in Alzheimer's disease amyloid-neuroinflammatory cascade, *Acta Neuropathol.* 127 (2014) 507–522. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1208-4>.
- [106] T.Y. Ha, K.A. Chang, J. a Kim, H.S. Kim, S. Kim, Y.H. Chong, Y.H. Suh, S100a9 Knockdown Decreases the Memory Impairment and the Neuropathology in Tg2576 Mice, AD Animal Model, *PLOS ONE* 5 (2010) e8840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008840>.
- [107] C. Prinzen, D. Trümbach, W. Wurst, K. Endres, R. Postina, F. Fahrenholz, Differential gene expression in ADAM10 and mutant ADAM10 transgenic mice, *BMC Genomics* 10 (2009) 66. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-66>.
- [108] C. Wang, I.A. Iashchishyn, J. Pansieri, S. Nyström, O. Klementieva, J. Kara, I. Horvath, R. Moskalenko, R. Rofougaran, G. Gouras, G.G. Kovacs, S.K. Shankar, L.A. Morozova-Roche, S100A9-Driven Amyloid-Neuroinflammatory Cascade in Traumatic Brain Injury as a Precursor State for Alzheimer's Disease, *Sci. Rep.* 8 (2018) 12836. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31141-x>.
- [109] C.M. Qiao, L.L. Tan, X.Y. Ma, Y.M. Xia, T. Li, M.A. Li, J. Wu, X. Nie, C. Cui, W.J. Zhao, Y.Q. Shen, Mechanism of S100A9-mediated astrocyte activation via TLR4/NF- κ B in Parkinson's disease, *Int. Immunopharmacol.* 146 (2025) 113938. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.113938>.
- [110] I. Horvath, I.A. Iashchishyn, R.A. Moskalenko, C. Wang, S.K.T.S. Wärmländer, C. Wallin, A. Gräslund, G.G. Kovacs, L.A. Morozova-Roche, Co-aggregation of pro-inflammatory S100A9 with α -synuclein in Parkinson's disease: ex

- vivo and in vitro studies, *J. Neuroinflammation* 15 (2018) 172. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1210-9>.
- [111] A. Lillian, W. Zuo, L. Laham, S. Hilfiker, J.H. Ye, Pathophysiology and Neuroimmune Interactions Underlying Parkinson's Disease and Traumatic Brain Injury, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 7186. <https://doi.org/10.3390/ijms24087186>.
- [112] M. Ribon, C. Leone, A. Chiot, F. Berriat, M. Rampanana, J. Cottin, D. Bohl, S. Millecamps, C.S. Lobsiger, M.T. Heneka, S. Boillée, Deletion of the inflammatory S100-A9/MRP14 protein does not influence survival in hSOD1G93A ALS mice, *Neurobiol. Aging* 101 (2021) 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.01.015>.
- [113] L. Shen, L. Liao, C. Chen, Y. Guo, D. Song, Y. Wang, Y. Chen, K. Zhang, M. Ying, S. Li, Q. Liu, J. Ni, Proteomics Analysis of Blood Serums from Alzheimer's Disease Patients Using iTRAQ Labeling Technology, *J. Alzheimers Dis.* 56 (2017) 361–378. <https://doi.org/10.3233/JAD-160913>.
- [114] M. Lodeiro, E. Puerta, M.A.M. Ismail, P. Rodriguez-Rodriguez, A. Rönnbäck, A. Codita, C. Parrado-Fernandez, S. Maioli, F. Gil-Bea, P. Merino-Serrais, A. Cedazo-Minguez, Aggregation of the Inflammatory S100A8 Precedes A β Plaque Formation in Transgenic APP Mice: Positive Feedback for S100A8 and A β Productions, *J. Gerontol. Ser. A* 72 (2017) 319–328. <https://doi.org/10.1093/gerona/glw073>.
- [115] Y. Tao, Y. Han, L. Yu, Q. Wang, S.X. Leng, H. Zhang, The Predicted Key Molecules, Functions, and Pathways That Bridge Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer's Disease (AD), *Front. Neurol.* 11 (2020) 233. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00233>.
- [116] I. Baronaitė, D. Šulskis, A. Kopūstas, M. Tutkus, V. Smirnovas, Formation of Calprotectin Inhibits Amyloid Aggregation of S100A8 and S100A9 Proteins, *ACS Chem. Neurosci.* 15 (2024) 1915–1925. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.4c00093>.
- [117] D.G. Walker, J. Link, L.F. Lue, J.E. Dalsing-Hernandez, B.E. Boyes, Gene expression changes by amyloid β peptide-stimulated human postmortem brain microglia identify activation of multiple inflammatory processes, *J. Leukoc. Biol.* 79 (2006) 596–610. <https://doi.org/10.1189/jlb.0705377>.
- [118] G.M. Cooper, Cell Membranes, in: *Cell Mol. Approach* 2nd Ed., Sinauer Associates, 2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9928/>
- [119] A. Barba-Bon, M. Nilam, A. Hennig, Supramolecular Chemistry in the Biomembrane, *Chembiochem* 21 (2020) 886–910. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900646>.
- [120] J.B. Startek, B. Boonen, K. Talavera, V. Meseguer, TRP Channels as Sensors of Chemically-Induced Changes in Cell Membrane Mechanical Properties, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 371. <https://doi.org/10.3390/ijms20020371>.
- [121] M. Romero, M. Keyel, G. Shi, P. Bhattacharjee, R. Roth, J.E. Heuser, P.A. Keyel, Intrinsic repair protects cells from pore-forming toxins by microvesicle shedding, *Cell Death Differ.* 24 (2017) 798–808. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.11>.
- [122] E.H.L. Chen, C.H. Wang, Y.T. Liao, F.Y. Chan, Y. Kanaoka, T. Uchihashi, K. Kato, L. Lai, Y.W. Chang, M.C. Ho, R.P.Y. Chen, Visualizing the membrane disruption action of antimicrobial peptides by cryo-electron tomography, *Nat. Commun.* 14 (2023) 5464. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41156-2>.
- [123] M. Ewald, S. Henry, E. Lambert, C. Feuillie, C. Bobo, C. Cullin, S. Lecomte, M. Molinari, High speed atomic force microscopy to investigate the interactions between toxic A β 1-42 peptides and model membranes in real time: impact of the

- p>membrane composition,
- Nanoscale*
- 11 (2019) 7229–7238.
- <https://doi.org/10.1039/C8NR08714H>
- .
- [124] F. Furt, P. Moreau, Importance of lipid metabolism for intracellular and mitochondrial membrane fusion/fission processes, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1828–1836. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.02.005>.
- [125] B. Ramstedt, J.P. Slotte, Membrane properties of sphingomyelins, *FEBS Lett.* 531 (2002) 33–37. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03406-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03406-3).
- [126] A.M. Whited, A. Johs, The interactions of peripheral membrane proteins with biological membranes, *Chem. Phys. Lipids* 192 (2015) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.07.015>.
- [127] S.J. Singer, G.L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175 (1972) 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>.
- [128] R.J. Clarke, K.R. Hossain, K. Cao, Physiological roles of transverse lipid asymmetry of animal membranes, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1862 (2020) 183382. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183382>.
- [129] D.L. Daleke, Phospholipid Flippases, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 821–825. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600035200>.
- [130] J.M. Gardner, C.F. Abrams, Lipid flip-flop vs. lateral diffusion in the relaxation of hemifusion diaphragms, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1860 (2018) 1452–1459. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.04.007>.
- [131] G. van Meer, Cellular lipidomics, *EMBO J.* 24 (2005) 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600798>.
- [132] H.I. Ingólfsson, T.S. Carpenter, H. Bhatia, P.T. Bremer, S.J. Marrink, F.C. Lightstone, Computational Lipidomics of the Neuronal Plasma Membrane, *Biophys. J.* 113 (2017) 2271–2280. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.10.017>.
- [133] A. Mulgrew-Nesbitt, K. Diraviyam, J. Wang, S. Singh, P. Murray, Z. Li, L. Rogers, N. Mirkovic, D. Murray, The role of electrostatics in protein–membrane interactions, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761 (2006) 812–826. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.002>.
- [134] D. Murray, A. Arbuzova, B. Honig, S. McLaughlin, The role of electrostatic and nonpolar interactions in the association of peripheral proteins with membranes, *Curr. Top. Membr.* 52 (2002) 277–307. [https://doi.org/10.1016/S1063-5823\(02\)52012-3](https://doi.org/10.1016/S1063-5823(02)52012-3).
- [135] T.J. Maures, H.W. Su, L.S. Argetsinger, S. Grinstein, C. Carter-Su, Phosphorylation controls a dual-function polybasic nuclear localization sequence in the adapter protein SH2B1 β to regulate its cellular function and distribution, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 1542–1552. <https://doi.org/10.1242/jcs.078949>.
- [136] T. Yeung, G.E. Gilbert, J. Shi, J. Silvius, A. Kapus, S. Grinstein, Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization, *Science* 319 (2008) 210–213. <https://doi.org/10.1126/science.1152066>.
- [137] D. Lombardo, M.A. Kiselev, S. Magazù, P. Calandra, Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches, *Adv. Condens. Matter Phys.* 2015 (2015) 1–22. <https://doi.org/10.1155/2015/151683>.
- [138] N. Ilias, R.V. Richmond, G.T. Selvarajah, I.D.M. Azmi, M. Ajat, Structural complexity and physical mechanism of self-assembled lipid as nanocarriers: A review, *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.* 31 (2023) 26–35. <https://doi.org/10.35118/apjmbb.2023.031.2.02>.
- [139] K. Corin, J.U. Bowie, How bilayer properties influence membrane protein folding, *Protein Sci.* 29 (2020) 2348–2362. <https://doi.org/10.1002/pro.3973>.

- [140] C. Peetla, S. Vijayaraghavalu, V. Labhasetwar, Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1686–1698. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.004>.
- [141] K. Stiasny, F.X. Heinz, Effect of Membrane Curvature-Modifying Lipids on Membrane Fusion by Tick-Borne Encephalitis Virus, *J. Virol.* 78 (2004) 8536–8542. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.16.8536-8542.2004>.
- [142] T. Jones, A. Liu, B. Cui, Light-inducible generation of membrane curvature in live cells with engineered BAR domain proteins, *ACS Synth. Biol.* 9 (2020) 893–901. <https://doi.org/10.1101/2020.02.20.958611>.
- [143] C.V. Kulkarni, Lipid crystallization: from self-assembly to hierarchical and biological ordering, *Nanoscale* 4 (2012) 5779–5791. <https://doi.org/10.1039/C2NR31465G>.
- [144] K. Sato, Crystallization behaviour of fats and lipids — a review, *Chem. Eng. Sci.* 56 (2001) 2255–2265. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(00\)00458-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(00)00458-9).
- [145] A. Tardieu, V. Luzzati, F.C. Reman, Structure and polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids: A study of lecithin-water phases, *J. Mol. Biol.* 75 (1973) 711–733. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90303-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90303-3).
- [146] M.E. Linder, Chapter 53 - Lipid-Mediated Localization of Signaling Proteins, in: R.A. Bradshaw, E.A. Dennis (Eds.), *Handb. Cell Signal. Second Ed.*, Academic Press, San Diego, 2010: pp. 365–371. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00053-X>.
- [147] A.J. Laude, I.A. Prior, Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking, *Mol. Membr. Biol.* 21 (2004) 193–205. <https://doi.org/10.1080/09687680410001700517>.
- [148] M. Edidin, The State of Lipid Rafts: From Model Membranes to Cells, *Annu. Rev. Biophys.* 32 (2003) 257–283. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142439>.
- [149] D.A. Brown, J.K. Rose, Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell* 68 (1992) 533–544. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90189-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90189-J).
- [150] M. Zuidschewoude, C.M. de Winde, A. Cambi, A.B. van Sriel, Microdomains in the membrane landscape shape antigen-presenting cell function, *J. Leukoc. Biol.* 95 (2014) 251–263. <https://doi.org/10.1189/jlb.0813440>.
- [151] D.A. Brown, E. London, FUNCTIONS OF LIPID RAFTS IN BIOLOGICAL MEMBRANES, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14 (1998) 111–136. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.111>.
- [152] T. Sych, K.R. Levental, E. Sezgin, Lipid-Protein Interactions in Plasma Membrane Organization and Function, *Annu. Rev. Biophys.* 51 (2022) 135–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-090721-072718>.
- [153] G.A. Holdgate, 2.07 - Kinetics, Thermodynamics, and Ligand Efficiency Metrics in Drug Discovery, in: S. Chackalamannil, D. Rotella, S.E. Ward (Eds.), *Compr. Med. Chem. III*, Elsevier, Oxford, 2017: pp. 180–211. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12318-2>.
- [154] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Membrane Proteins*, in: *Mol. Biol. Cell* 4th Ed., Garland Science, 2002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26878/> (accessed May 3, 2025).
- [155] R.B. Gennis, Protein-lipid interactions, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6 (1977) 195–238. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.06.060177.001211>.

- [156] F. Fernandes, A. Coutinho, M. Prieto, L.M.S. Loura, Electrostatically driven lipid–protein interaction: Answers from FRET, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1848 (2015) 1837–1848. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.02.023>.
- [157] A.N. Bondar, S.H. White, Hydrogen bond dynamics in membrane protein function, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1818 (2012) 942–950. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.11.035>.
- [158] A.M. Reilly, A. Tkatchenko, van der Waals dispersion interactions in molecular materials: beyond pairwise additivity, *Chem. Sci.* 6 (2015) 3289–3301. <https://doi.org/10.1039/C5SC00410A>.
- [159] M.A. Lemmon, Membrane recognition by phospholipid-binding domains, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 99–111. <https://doi.org/10.1038/nrm2328>.
- [160] Q.Y. Zhang, Z.B. Yan, Y.M. Meng, X.Y. Hong, G. Shao, J.J. Ma, X.R. Cheng, J. Liu, J. Kang, C.Y. Fu, Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential, *Mil. Med. Res.* 8 (2021) 48. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>.
- [161] M. Zhang, J. Zhao, J. Zheng, Molecular Understanding of a Potential Functional Link between Amyloid and Antimicrobial Peptides, *Soft Matter* 10 (2014) 7425–7451. <https://doi.org/10.1039/C4SM00907J>.
- [162] A. Demuro, E. Mina, R. Kaye, S.C. Milton, I. Parker, C.G. Glabe, Calcium Dysregulation and Membrane Disruption as a Ubiquitous Neurotoxic Mechanism of Soluble Amyloid Oligomers, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 17294–17300. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500997200>.
- [163] Y. Hirakura, B.L. Kagan, Pore formation by beta-2-microglobulin: a mechanism for the pathogenesis of dialysis associated amyloidosis, *Amyloid* 8 (2001) 94–100. <https://doi.org/10.3109/13506120109007350>.
- [164] T.A. Mirzabekov, M. Lin, B.L. Kagan, Pore Formation by the Cytotoxic Islet Amyloid Peptide Amylin, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 1988–1992. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.4.1988>.
- [165] A. Quist, I. Doudevski, H. Lin, R. Azimova, D. Ng, B. Frangione, B. Kagan, J. Ghiso, R. Lal, Amyloid ion channels: A common structural link for protein-misfolding disease, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 10427–10432. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502066102>.
- [166] J.A. Hebda, A.D. Miranker, The Interplay of Catalysis and Toxicity by Amyloid Intermediates on Lipid Bilayers: Insights from Type II Diabetes, *Annu. Rev. Biophys.* 38 (2009) 125–152. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.050708.133622>.
- [167] D.J. Rinauro, F. Chiti, M. Vendruscolo, R. Limbocker, Misfolded protein oligomers: mechanisms of formation, cytotoxic effects, and pharmacological approaches against protein misfolding diseases, *Mol. Neurodegener.* 19 (2024) 20. <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00651-2>.
- [168] Y. Shai, Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1462 (1999) 55–70. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00200-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00200-X).
- [169] E. Sparr, M.F.M. Engel, D.V. Sakharov, M. Sprong, J. Jacobs, B. de Kruijff, J.W.M. Höppener, J. Antoinette Killian, Islet amyloid polypeptide-induced membrane leakage involves uptake of lipids by forming amyloid fibers, *FEBS Lett.* 577 (2004) 117–120. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.09.075>.
- [170] M. Michikawa, J.S. Gong, Q.W. Fan, N. Sawamura, K. Yanagisawa, A Novel Action of Alzheimer's Amyloid β -Protein ($A\beta$): Oligomeric $A\beta$ Promotes

- Lipid Release, *J. Neurosci.* 21 (2001) 7226–7235. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07226.2001>.
- [171] M.F.M. Engel, H. Yigittop, R.C. Elgersma, D.T.S. Rijkers, R.M.J. Liskamp, B. de Kruijff, J.W.M. Höppener, J. Antoinette Killian, Islet amyloid polypeptide inserts into phospholipid monolayers as monomer, *J. Mol. Biol.* 356 (2006) 783–789. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.020>.
- [172] E.M. Jones, M. Dubey, P.J. Camp, B.C. Vernon, J. Biernat, E. Mandelkow, J. Majewski, E.Y. Chi, Interaction of tau protein with model lipid membranes induces tau structural compaction and membrane disruption, *Biochemistry* 51 (2012) 2539–2550. <https://doi.org/10.1021/bi201857v>.
- [173] C. Kerkhoff, M. Klempt, V. Kaefer, C. Sorg, The Two Calcium-binding Proteins, S100A8 and S100A9, Are Involved in the Metabolism of Arachidonic acid in Human Neutrophils, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 32672–32679. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32672>.
- [174] S.M. Valenzuela, M. Berkahn, D.K. Martin, T. Huynh, Z. Yang, C.L. Geczy, In Proceedings of BioMEMS and Nanotechnology II Conference, SPIE, December 12–14, 2005; Nicolau D. V. (Ed.); Brisbane, Australia, 2006, pp. 603619.
- [175] T. Yang, O.K. Baryshnikova, H. Mao, M.A. Holden, P.S. Cremer, Investigations of Bivalent Antibody Binding on Fluid-Supported Phospholipid Membranes: The Effect of Hapten Density, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4779–4784. <https://doi.org/10.1021/ja029469f>.
- [176] A. Luchini, S. Micciulla, G. Corucci, K.C. Batchu, A. Santamaria, V. Laux, T. Darwish, R.A. Russell, M. Thepaut, I. Bally, F. Fieschi, G. Fragneto, Lipid bilayer degradation induced by SARS-CoV-2 spike protein as revealed by neutron reflectometry, *Sci. Rep.* 11 (2021) 14867. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93996-x>.
- [177] J. Andersson, P. Bilotto, L.L.E. Mears, S. Fossati, U. Ramach, I. Köper, M. Valtiner, W. Knoll, Solid-supported lipid bilayers – A versatile tool for the structural and functional characterization of membrane proteins, *Methods* 180 (2020) 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.09.005>.
- [178] X. Su, J.A. Ditlev, M.K. Rosen, R.D. Vale, Reconstitution of TCR signaling using supported lipid bilayers, *Methods Mol. Biol.* 1584 (2017) 65–76. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6881-7_5.
- [179] E.J. Fernandez-Perez, C. Peters, L.G. Aguayo, Membrane Damage Induced by Amyloid Beta and a Potential Link with Neuroinflammation, *Curr. Pharm. Des.* 22 (2016) 1295–1304. <https://doi.org/10.2174/138161282210160304111702>.
- [180] T. Penkauskas, Poras formuojančių toksinų fosfolipidinei membranai sukeltos pažeistos tyrimai (daktaro disertacija), Vilniaus Universiteto Leidykla (2022).
- [181] S.N. Chatterjee, S. Agarwal, Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation, *Free Radic. Biol. Med.* 4 (1988) 51–72. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90011-1](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90011-1).
- [182] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki, Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.
- [183] K.S. Ahmed, S.A. Hussein, A.H. Ali, S.A. Korma, Q. Lipeng, C. Jinghua, Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications, *J. Drug Target.* 27 (2019) 742–761. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337>.

- [184] N. Düzgüneş, H. Faneca, M.C. Lima, Methods to monitor liposome fusion, permeability, and interaction with cells, *Methods Mol. Biol.* 606 (2010) 209–232. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-447-0_16.
- [185] M. Alavi, N. Karimi, M. Safaei, Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems, *Adv. Pharm. Bull.* 7 (2017) 3–9. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.002>.
- [186] K. Gupta, H. Jang, K. Harlen, A. Puri, R. Nussinov, J.P. Schneider, R. Blumenthal, Mechanism of Membrane Permeation Induced by Synthetic β -Hairpin Peptides, *Biophys. J.* 105 (2013) 2093–2103. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.09.040>.
- [187] P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien, W.C. Wescott, Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system, *Nature* 194 (1962) 979–980. <https://doi.org/10.1038/194979a0>.
- [188] E.T. Castellana, P.S. Cremer, Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design, *Surf. Sci. Rep.* 61 (2006) 429–444. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2006.06.001>.
- [189] E. Bamberg, H. Alpes, H.J. Apell, R. Bradley, B. Härter, M.J. Quelle, D.W. Urry, Formation of ionic channels in black lipid membranes by succinic derivatives of gramicidin A, *J. Membr. Biol.* 50 (1979) 257–270. <https://doi.org/10.1007/BF01868892>.
- [190] P. Van Gelder, F. Dumas, M. Winterhalter, Understanding the function of bacterial outer membrane channels by reconstitution into black lipid membranes, *Biophys. Chem.* 85 (2000) 153–167. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(99\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(99)00153-2).
- [191] S.M. Bezrukov, I. Vodyanoy, Probing alamethicin channels with water-soluble polymers. Effect on conductance of channel states, *Biophys. J.* 64 (1993) 16–25. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81336-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81336-5).
- [192] M.S. Khan, N.S. Dosoky, J.D. Williams, Engineering Lipid Bilayer Membranes for Protein Studies, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 21561–21597. <https://doi.org/10.3390/ijms141121561>.
- [193] R.S. Ries, H. Choi, R. Blunck, F. Bezanilla, J.R. Heath, Black Lipid Membranes: Visualizing the Structure, Dynamics, and Substrate Dependence of Membranes, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 16040–16049. <https://doi.org/10.1021/jp048098h>.
- [194] J. El-Beyrouthy, E. Freeman, Characterizing the Structure and Interactions of Model Lipid Membranes Using Electrophysiology, *Membranes* 11 (2021) 319. <https://doi.org/10.3390/membranes11050319>.
- [195] J.A. Jackman, N.J. Cho, Supported Lipid Bilayer Formation: Beyond Vesicle Fusion, *Langmuir* 36 (2020) 1387–1400. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03706>.
- [196] G.J. Hardy, R. Nayak, S. Zauscher, Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 18 (2013) 448–458. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.06.004>.
- [197] A. Berquand, D. Lévy, F. Gubellini, C. Le Grimmellec, P.E. Milhiet, Influence of calcium on direct incorporation of membrane proteins into in-plane lipid bilayer, *Ultramicroscopy* 107 (2007) 928–33. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2007.04.008>.
- [198] P.S. Cremer, S.G. Boxer, Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 2554–2559. <https://doi.org/10.1021/jp983996x>.

- [199] R. Budvytyte, G. Valincius, G. Niaura, V. Voiciuk, M. Mickevicius, H. Stauffer, H.Z. Goh, P. Shekhar, F. Heinrich, S. Shenoy, M. Lösche, D.J. Vanderah, Structure and Properties of Tethered Bilayer Lipid Membranes with Unsaturated Anchor Molecules, *Langmuir* 29 (2013) 8645–8656. <https://doi.org/10.1021/la401132c>.
- [200] A.O. Hohner, M.P.C. David, J.O. Rädler, Controlled solvent-exchange deposition of phospholipid membranes onto solid surfaces, *Biointerphases* 5 (2010) 1–8. <https://doi.org/10.1116/1.3319326>.
- [201] T. Ragaliauskas, M. Mickevicius, B. Rakovska, T. Penkauskas, D.J. Vanderah, F. Heinrich, G. Valincius, Fast formation of low-defect-density tethered bilayers by fusion of multilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1859 (2017) 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.015>.
- [202] F. Vigneron, V. Caps, Evolution in the chemical making of gold oxidation catalysts, *Comptes Rendus Chim.* 19 (2016) 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2015.11.015>.
- [203] V. Atanasov, N. Knorr, R.S. Duran, S. Ingebrandt, A. Offenhäusser, W. Knoll, I. Köper, Membrane on a Chip: A Functional Tethered Lipid Bilayer Membrane on Silicon Oxide Surfaces, *Biophys. J.* 89 (2005) 1780–1788. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.061374>.
- [204] R.F. Roskamp, I.K. Vockenroth, N. Eisenmenger, J. Braunagel, I. Köper, Functional tethered bilayer lipid membranes on aluminum oxide, *ChemPhysChem* 9 (2008) 1920–1924. <https://doi.org/10.1002/cphc.200800248>.
- [205] L. Becucci, R. Guidelli, Mercury-supported biomimetic membranes for the investigation of antimicrobial peptides, *Pharmaceuticals*. 7 (2014) 136–168. <https://doi.org/10.3390/ph7020136>.
- [206] C.G. Cranfield, B.A. Cornell, S.L. Grage, P. Duckworth, S. Carne, A.S. Ulrich, B. Martinac, Transient Potential Gradients and Impedance Measures of Tethered Bilayer Lipid Membranes: Pore-Forming Peptide Insertion and the Effect of Electroporation, *Biophys. J.* 106 (2014) 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.1121>.
- [207] S. Rebaud, O. Maniti, A.P. Girard-Egrot, Tethered bilayer lipid membranes (tBLMs): Interest and applications for biological membrane investigations, *Biochimie* 107 (2014) 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.06.021>.
- [208] T. Penkauskas, F. Ambrulevičius, G. Valinčius, Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Convenient Tool to Characterize Tethered Bilayer Membranes, *Methods Mol. Biol.* 2402 (2022) 31–59. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1843-1_4.
- [209] A. Valiūnienė, G. Valinčius, Tethered bilayer membranes as impedimetric biosensors for detection of pore-forming biological agents, *Curr. Opin. Electrochem.* 40 (2023) 101344. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2023.101344>.
- [210] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3784–3788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>.
- [211] D.J. McGillivray, G. Valincius, D.J. Vanderah, W. Febo-Ayala, J.T. Woodward, F. Heinrich, J.J. Kasianowicz, M. Lösche, Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes, *Biointerphases* 2 (2007) 21–33. <https://doi.org/10.1116/1.2709308>.
- [212] A. J. Miles, B. A. Wallace, Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins, *Chem. Soc. Rev.* 45 (2016) 4859–4872. <https://doi.org/10.1039/C5CS00084J>.

- [213] Menges, F., Spectragryph—Optical Spectroscopy Software—Version 1.2.16.1. Prieiga per: <https://www.ffmpeg2.de/spectragryph/> [žiūrėta 2025-01-21].
- [214] S. Damodaran, In situ measurement of conformational changes in proteins at liquid interfaces by circular dichroism spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 182–188. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1873-6>.
- [215] N. Hellmann, D. Schneider, Hands On: Using Tryptophan Fluorescence Spectroscopy to Study Protein Structure, *Methods Mol. Biol.* 1958 (2019) 379–401. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9161-7_20.
- [216] E. Arad, H. Green, R. Jelinek, H. Rapaport, Revisiting thioflavin T (ThT) fluorescence as a marker of protein fibrillation – The prominent role of electrostatic interactions, *J. Colloid Interface Sci.* 573 (2020) 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.03.075>.
- [217] S.A. Sánchez, M.A. Tricerri, G. Ossato, E. Gratton, Lipid packing determines protein-membrane interactions: challenges for apolipoprotein A-I and High Density Lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 1399–1408. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.03.019>.
- [218] H. Orlikowska-Rzeznik, E. Krok, M. Chattopadhyay, A. Lester, L. Piatkowski, Laurdan Discerns Lipid Membrane Hydration and Cholesterol Content, *J. Phys. Chem. B* 127 (2023) 3382–3391. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.3c00654>.
- [219] S. Dutta, B. Watson, S. Mattoo, J.C. Rochet, Calcein Release Assay to Measure Membrane Permeabilization by Recombinant Alpha-Synuclein, *Bio Protoc.* 10 (2020) e3690. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3690>.
- [220] A.L. Schachner-Nedherer, O. Werzer, A. Zimmer, A Protocol To Characterize Peptide-Based Drug Delivery Systems for miRNAs, *ACS Omega* 4 (2019) 7014–7022. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03562>.
- [221] A.Ch. Lazanas, M.I. Prodromidis, Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial, *ACS Meas. Sci. Au* 3 (2023) 162–193. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00070>.
- [222] D.K. Kampouris, X. Ji, E.P. Randviir, C.E. Banks, A new approach for the improved interpretation of capacitance measurements for materials utilised in energy storage, *RSC Adv.* 5 (2015) 12782–12791. <https://doi.org/10.1039/C4RA17132B>.
- [223] R. Budvytyte, M. Pleckaityte, A. Zvirbliene, D.J. Vanderah, G. Valincius, Reconstitution of Cholesterol-Dependent Vaginolysin into Tethered Phospholipid Bilayers: Implications for Bioanalysis, *PLOS ONE* 8 (2013) e82536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082536>.
- [224] G. Valincius, T. Meškauskas, F. Ivanauskas, Electrochemical Impedance Spectroscopy of Tethered Bilayer Membranes, *Langmuir* 28 (2012) 977–990. <https://doi.org/10.1021/la204054g>.
- [225] G. Valincius, M. Mickevicius, Chapter Two - Tethered Phospholipid Bilayer Membranes: An Interpretation of the Electrochemical Impedance Response, in: A. Iglič, C.V. Kulkarni, M. Rappolt (Eds.), *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes*, Academic Press, 2015: pp. 27–61. <https://doi.org/10.1016/bs.adplan.2015.01.003>.
- [226] T. Penkauskas, G. Preta, Biological applications of tethered bilayer lipid membranes, *Biochimie* 157 (2019) 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.011>.
- [227] F. Ambrulevičius, tblm-dash. Prieiga per: <https://github.com/filambr/tblm-dash>. Žiūrėta [2025-07-23].
- [228] F. Ambrulevičius, G. Valinčius, Electrochemical impedance spectrum reveals structural details of distribution of pores and defects in supported phospholipid

- p bilayers,
- Bioelectrochemistry*
- 146 (2022) 108092.
-
- <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108092>
- .
-
- [229] D.J. McGillivray, G. Valincius, F. Heinrich, J.W.F. Robertson, D.J. Vanderah, W. Febo-Ayala, I. Ignatjev, M. Lösche, J.J. Kasianowicz, Structure of Functional
- Staphylococcus aureus*
- α
- Hemolysin Channels in Tethered Bilayer Lipid Membranes,
- Biophys. J.*
- 96 (2009) 1547–1553.
-
- <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.020>
- .
-
- [230] D. Kirmizis, S. Logothetidis, Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics,
- Int. J. Nanomedicine*
- 5 (2010) 137–145.
-
- <https://doi.org/10.2147/IJN.S5787>
- .
-
- [231] M. Offroy, A. Razafitianamaharavo, A. Beaussart, C. Pagnout, J.F. L. Duval, Fast automated processing of AFM PeakForce curves to evaluate spatially resolved Young modulus and stiffness of turgescient cells,
- RSC Adv.*
- 10 (2020) 19258–19275.
-
- <https://doi.org/10.1039/D0RA00669F>
- .
-
- [232] W. Liang, H. Shi, X. Yang, J. Wang, W. Yang, H. Zhang, L. Liu, Recent advances in AFM-based biological characterization and applications at multiple levels,
- Soft Matter*
- 16 (2020) 8962–8984.
- <https://doi.org/10.1039/D0SM01106A>
- .
-
- [233] S. Morandat, S. Azouzi, E. Beauvais, A. Mastouri, K. El Kirat, Atomic force microscopy of model lipid membranes,
- Anal. Bioanal. Chem.*
- 405 (2013) 1445–1461.
-
- <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6383-y>
- .
-
- [234] F. Xia, K. Youcef-Toumi, Review: Advanced Atomic Force Microscopy Modes for Biomedical Research,
- Biosensors*
- 12 (2022) 1116.
-
- <https://doi.org/10.3390/bios12121116>
- .
-
- [235] M.S. Rana, H.R. Pota, I.R. Petersen, Improvement in the Imaging Performance of Atomic Force Microscopy: A Survey,
- IEEE Trans. Autom. Sci. Eng.*
- 14 (2017) 1265–1285.
- <https://doi.org/10.1109/TASE.2016.2538319>
- .
-
- [236] E. Nagao, J.A. Dvorak, Phase Imaging by Atomic Force Microscopy: Analysis of Living Homoiothermic Vertebrate Cells,
- Biophys. J.*
- 76 (1999) 3289–3297.
- [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77481-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77481-3)
- .
-
- [237] A.M. Joshua, G. Cheng, E.V. Lau, Soft matter analysis via atomic force microscopy (AFM): A review,
- Appl. Surf. Sci. Adv.*
- 17 (2023) 100448.
-
- <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2023.100448>
- .
-
- [238] R. Hiesgen, S. Helmly, I. Galm, T. Morawietz, M. Handl, K.A. Friedrich, Microscopic analysis of current and mechanical properties of nafion® studied by atomic force microscopy,
- Membranes*
- 2 (2012) 783–803.
-
- <https://doi.org/10.3390/membranes2040783>
- .
-
- [239] M. Krieg, G. Fläschner, D. Alsteens, B.M. Gaub, W.H. Roos, G.J.L. Wuite, H.E. Gaub, C. Gerber, Y.F. Dufrêne, D.J. Müller, Atomic force microscopy-based mechanobiology,
- Nat. Rev. Phys.*
- 1 (2018) 41–57.
- <https://doi.org/10.1038/s42254-018-0001-7>
- .
-
- [240] I. Horcas, R. Fernández, J.M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, A.M. Baro, WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology,
- Rev. Sci. Instrum.*
- 78 (2007) 013705.
-
- <https://doi.org/10.1063/1.2432410>
- .
-
- [241] G.R. Heath, E. Mickelthwaite, T.M. Storer, NanoLocz: Image Analysis Platform for AFM, High-Speed AFM, and Localization AFM,
- Small Methods*
- 8 (2024) e2301766.
- <https://doi.org/10.1002/smt.202301766>
- .
-
- [242] R. Gautier, D. Douguet, B. Antonny, G. Drin, HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific
- α
- helical properties,
- Bioinformatics*
- 24 (2008) 2101–2102.
- <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>
- .

- [243] D. Eisenberg, E. Schwarz, M. Komaromy, R. Wall, Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot, *J. Mol. Biol.* 179 (1984) 125–142. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90309-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90309-7).
- [244] J. Abramson, J. Adler, J. Dunger, R. Evans, T. Green, A. Pritzel, O. Ronneberger, L. Willmore, A.J. Ballard, J. Bambrick, S.W. Bodenstein, D.A. Evans, C.-C. Hung, M. O'Neill, D. Reiman, K. Tunyasuvunakool, Z. Wu, A. Žemgulytė, E. Arvaniti, C. Beattie, O. Bertolli, A. Bridgland, A. Cherepanov, M. Congreve, A.I. Cowen-Rivers, A. Cowie, M. Figurnov, F.B. Fuchs, H. Gladman, R. Jain, Y.A. Khan, C.M.R. Low, K. Perlin, A. Potapenko, P. Savy, S. Singh, A. Stecula, A. Thillaisundaram, C. Tong, S. Yakneen, E.D. Zhong, M. Zielinski, A. Židek, V. Bapst, P. Kohli, M. Jaderberg, D. Hassabis, J.M. Jumper, Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3, *Nature* 630 (2024) 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>.
- [245] P.J. Fleming, K.G. Fleming, HullRad: Fast Calculations of Folded and Disordered Protein and Nucleic Acid Hydrodynamic Properties, *Biophys. J.* 114 (2018) 856–869. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.01.002>.
- [246] N.V. Penkov, Peculiarities of the Dynamical Hydration Shell of Native Conformation Protein Using a Bovine Serum Albumin Example, *Appl. Spectrosc.* 78 (2024) 1051–1061. <https://doi.org/10.1177/00037028241261097>.
- [247] A.M.A. Rokstad, I. Lacík, P. de Vos, B.L. Strand, Advances in biocompatibility and physico-chemical characterization of microspheres for cell encapsulation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 67–68 (2014) 111–130. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.010>.
- [248] T.C. Williams, D.C. Corson, K. Oikawa, W.D. McCubbin, C.M. Kay, B.D. Sykes, Proton NMR spectroscopic studies of calcium-binding proteins. 3. Solution conformations of rat apo- α -parvalbumin and metal-bound rat α -parvalbumin, *Biochemistry* 25 (1986) 1835–1846. <https://doi.org/10.1021/bi00355a057>.
- [249] P. Rouleau, K. Vandal, C. Ryckman, P.E. Poubelle, A. Boivin, M. Talbot, P.A. Tessier, the calcium-binding protein S100A12 induces neutrophil adhesion, migration, and release from bone marrow in mouse at concentrations similar to those found in human inflammatory arthritis, *Clin. Immunol.* 107 (2003) 46–54. [https://doi.org/10.1016/S1521-6616\(02\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S1521-6616(02)00043-8).
- [250] M.C. Kilhoffer, J.G. Demaille, D. Gerard, Tyrosine fluorescence of ram testis and octopus calmodulins. Effects of calcium, magnesium, and ionic strength, *Biochemistry* 20 (1981) 4407–4414. <https://doi.org/10.1021/bi00518a027>.
- [251] Y. Yang, B. Zeng, Z. Sun, A.M. Esfahani, J. Hou, N.-D. Jiao, L. Liu, L. Chen, M.D. Basson, L. Dong, R. Yang, N. Xi, Optimization of Protein-Protein Interaction Measurements for Drug Discovery Using AFM Force Spectroscopy, *IEEE Trans. Nanotechnol.* 18 (2019) 509–517. <https://doi.org/10.1109/tnano.2019.2915507>.
- [252] Park Systems (2023). Single molecule interactions analysis using force-distance spectroscopy with functionalized tips. Prieiga per: <https://www.parksystems.com/en/learning-center/lc-detail.learning123> [žiūrėta 2025-05-11].
- [253] C. McAllister, M.A. Karymov, Y. Kawano, A.Y. Lushnikov, A. Mikheikin, V.N. Uversky, Y.L. Lyubchenko, Protein Interactions and Misfolding Analyzed by AFM Force Spectroscopy, *J. Mol. Biol.* 354 (2005) 1028–1042. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.012>.

- [254] J.W. Weisel, H. Shuman, R.I. Litvinov, Protein–protein unbinding induced by force: single-molecule studies, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13 (2003) 227–235. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(03\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(03)00039-3).
- [255] D.L. Sedin, K.L. Rowlen, Adhesion Forces Measured by Atomic Force Microscopy in Humid Air, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2183–2189. <https://doi.org/10.1021/ac991198c>.
- [256] K.M. Batzli, B.J. Love, Agitation of amyloid proteins to speed aggregation measured by ThT fluorescence: A call for standardization, *Mater. Sci. Eng. C* 48 (2015) 359–364. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.09.015>.
- [257] S. Kumar, J. Walter, Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides – A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer’s disease, *Aging* 3 (2011) 803–812. <https://doi.org/10.18632/aging.100362>.
- [258] A.J. Modler, K. Gast, G. Lutsch, G. Damaschun, Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers--a novel pathway of amyloid formation, *J. Mol. Biol.* 325 (2003) 135–148. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01175-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01175-0).
- [259] X. Qi, Y. Wang, H. Yu, R. Liu, A. Leppert, Z. Zheng, X. Zhong, Z. Jin, H. Wang, X. Li, X. Wang, M. Landreh, L. A. Morozova-Roche, J. Johansson, S. Xiong, I. Iashchishyn, G. Chen, Spider Silk Protein Forms Amyloid-Like Nanofibrils through a Non-Nucleation-Dependent Polymerization Mechanism, *Small* 19 (2023) 2304031. <https://doi.org/10.1002/smll.202304031>.
- [260] A.R. Hurshman, J.T. White, E.T. Powers, J.W. Kelly, Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization, *Biochemistry* 43 (2004) 7365–7381. <https://doi.org/10.1021/bi049621i>.
- [261] R. Crespo, E. Villar-Alvarez, P. Taboada, F.A. Rocha, A.M. Damas, P.M. Martins, What Can the Kinetics of Amyloid Fibril Formation Tell about Off-pathway Aggregation?, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 2018–2032. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.699348>.
- [262] K. Yanamandra, O. Alexeyev, V. Zamotin, V. Srivastava, A. Shchukarev, A.-C. Brorsson, G.G. Tartaglia, T. Vogl, R. Kaye, G. Wingsle, J. Olsson, C.M. Dobson, A. Bergh, F. Elgh, L.A. Morozova-Roche, Amyloid formation by the pro-inflammatory S100A8/A9 proteins in the ageing prostate, *PloS One* 4 (2009) e5562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005562>.
- [263] N.M. Marlatt, B.L. Boys, L. Konermann, G.S. Shaw, Formation of Monomeric S100B and S100A11 Proteins at Low Ionic Strength, *Biochemistry* 48 (2009) 1954–1963. <https://doi.org/10.1021/bi802086a>.
- [264] A. Hung, I. Yarovsky, Inhibition of peptide aggregation by lipids: Insights from coarse-grained molecular simulations, *J. Mol. Graph. Model.* 29 (2011) 597–607. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2010.11.001>.
- [265] E. Sanders, R. Csondor, D. Šulskis, I. Baronaitė, V. Smirnovas, L. Maheswaran, J. Horrocks, R. Munro, C. Georgiadou, I. Horvath, L.A. Morozova-Roche, P.T.F. Williamson, The Stabilization of S100A9 Structure by Calcium Inhibits the Formation of Amyloid Fibrils, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 13200. <https://doi.org/10.3390/ijms241713200>.
- [266] G. Bastioli, S. Piccirillo, L. Graciotti, M. Carone, G. Sprega, O. Taoussi, A. Preziuso, P. Castaldo, Calcium Deregulation in Neurodegeneration and Neuroinflammation in Parkinson’s Disease: Role of Calcium-Storing Organelles and Sodium–Calcium Exchanger, *Cells* 13 (2024) 1301. <https://doi.org/10.3390/cells13151301>.
- [267] Z. L. Almeida, R. M. M. Brito, Structure and Aggregation Mechanisms in Amyloids, *Molecules* 25 (2020) 1195. <https://doi.org/10.3390/molecules25051195>.

- [268] M. Fändrich, M. Schmidt, N. Grigorieff, Recent progress in understanding Alzheimer's β -amyloid structures, *Trends Biochem. Sci.* 36 (2011) 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.02.002>.
- [269] A.P. Carapeto, C. Marcuello, P.F.N. Faisca, M.S. Rodrigues, Morphological and Biophysical Study of S100A9 Protein Fibrils by Atomic Force Microscopy Imaging and Nanomechanical Analysis, *Biomolecules* 14 (2024) 1091. <https://doi.org/10.3390/biom14091091>.
- [270] S. Lee, M.C. Choi, K. Al Adem, S. Lukman, T.-Y. Kim, Aggregation and Cellular Toxicity of Pathogenic or Non-pathogenic Proteins, *Sci. Rep.* 10 (2020) 5120. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62062-3>.
- [271] D. Regmi, F. Shen, A. Stanic, M. Islam, D. Du, Effect of phospholipid liposomes on prion fragment (106–128) amyloid formation, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1865 (2023) 184199. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2023.184199>.
- [272] M.S. Terakawa, H. Yagi, M. Adachi, Y.-H. Lee, Y. Goto, Small Liposomes Accelerate the Fibrillation of Amyloid β (1–40), *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 815–826. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.592527>.
- [273] K. Kamburova, I.L. Dimitrov, F. Hodzhaoglu, V. Milkova, Investigation of the Aggregation of A β Peptide (1–40) in the Presence of κ -Carrageenan-Stabilised Liposomes Loaded with Homotaurine, *Molecules* 29 (2024) 3460. <https://doi.org/10.3390/molecules29153460>.
- [274] R.C.A. Keller, New user-friendly approach to obtain an Eisenberg plot and its use as a practical tool in protein sequence analysis, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 5577–5591. <https://doi.org/10.3390/ijms12095577>.
- [275] D. Kligman, D.C. Hilt, The S100 protein family, *Trends Biochem. Sci.* 13 (1988) 437–443. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(88\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90218-6).
- [276] D.E. Warschawski, P.F. Devaux, Order parameters of unsaturated phospholipids in membranes and the effect of cholesterol: a ^1H – ^{13}C solid-state NMR study at natural abundance, *Eur. Biophys. J.* 34 (2005) 987–996. <https://doi.org/10.1007/s00249-005-0482-z>.
- [277] R.F.M. de Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, Sphingomyelin/Phosphatidylcholine/Cholesterol Phase Diagram: Boundaries and Composition of Lipid Rafts, *Biophys. J.* 85 (2003) 2406–2416. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74664-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74664-5).
- [278] S. Chakraborty, M. Doktorova, T.R. Molugu, F.A. Heberle, H.L. Scott, B. Dzikovski, M. Nagao, L.-R. Stingaciu, R.F. Standaert, F.N. Barrera, J. Katsaras, G. Khelashvili, M.F. Brown, R. Ashkar, How cholesterol stiffens unsaturated lipid membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117 (2020) 21896–21905. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004807117>.
- [279] N. Anton, P. Pierrat, L. Lebeau, T. F. Vandamme, P. Bouriat, A study of insoluble monolayers by deposition at a bubble interface, *Soft Matter* 9 (2013) 10081–10091. <https://doi.org/10.1039/C3SM51688A>.
- [280] C.S. Atwood, R.N. Martins, M.A. Smith, G. Perry, Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-beta peptide and associated proteins, *Peptides* 23 (2002) 1343–1350. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(02\)00070-0](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(02)00070-0).
- [281] C. Yuan, J. Furlong, P. Burgos, L.J. Johnston, The Size of Lipid Rafts: An Atomic Force Microscopy Study of Ganglioside GM1 Domains in Sphingomyelin/DOPC/Cholesterol Membranes, *Biophys. J.* 82 (2002) 2526–2535. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75596-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75596-3).

- [282] I.I. Veretenenko, Y.A. Trofimov, N.A. Krylov, R.G. Efremov, Nanoscale lipid domains determine the dynamic molecular portraits of mixed DOPC/DOPS bilayers in a fluid phase: A computational insight, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1866 (2024) 184376. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2024.184376>.
- [283] S.Y. Bhide, M.L. Berkowitz, Structure and dynamics of water at the interface with phospholipid bilayers, *J. Chem. Phys.* 123 (2005) 224702. <https://doi.org/10.1063/1.2132277>.
- [284] D. Lombardo, M.A. Kiselev, Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application, *Pharmaceutics* 14 (2022) 543. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543>.
- [285] E. Tambutté, S. Tambutté, N. Segonds, D. Zoccola, A. Venn, J. Erez, D. Allemand, Calcein labelling and electrophysiology: insights on coral tissue permeability and calcification, *Proc. R. Soc. B* 279 (2012) 19–27. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0733>.
- [286] M.R. Mozafari, E. Mazaheri, K. Dormiani, Simple Equations Pertaining to the Particle Number and Surface Area of Metallic, Polymeric, Lipidic and Vesicular Nanocarriers, *Sci. Pharm.* 89 (2021) 15. <https://doi.org/10.3390/scipharm89020015>.
- [287] Q. Zhang, H. Chen, T. Wu, T. Jin, Z. Pan, J. Zheng, Y. Gao, W. Zhuang, The opposite effects of sodium and potassium cations on water dynamics, *Chem. Sci.* 8 (2017) 1429–1435. <https://doi.org/10.1039/c6sc03320b>.
- [288] X. Li, Y. Cheng, C. Yi, Y. Hua, C. Yang, S. Cui, Effect of ionic strength on the heat-induced soy protein aggregation and the phase separation of soy protein aggregate/dextran mixtures, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 1015–1023. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.024>.
- [289] P. Xie, H. Zhang, Y. Qin, H. Xiong, C. Shi, Z. Zhou, Membrane Proteins and Membrane Curvature: Mutual Interactions and a Perspective on Disease Treatments, *Biomolecules* 13 (2023) 1772. <https://doi.org/10.3390/biom13121772>.
- [290] S. Coronado, J. Herrera, M.G. Pino, S. Martín, L. Ballesteros-Rueda, P. Cea, Advancements in Engineering Planar Model Cell Membranes: Current Techniques, Applications, and Future Perspectives, *Nanomaterials* 14 (2024) 1489. <https://doi.org/10.3390/nano14181489>.
- [291] M.M. Ouberaï, J. Wang, M.J. Swann, C. Galvagnion, T. Guillems, C.M. Dobson, M.E. Welland, α -Synuclein Senses Lipid Packing Defects and Induces Lateral Expansion of Lipids Leading to Membrane Remodeling, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 20883–20895. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.478297>.
- [292] L. Vamparys, R. Gautier, S. Vanni, W.F.D. Bennett, D.P. Tieleman, B. Antonny, C. Etchebest, P.F.J. Fuchs, Conical Lipids in Flat Bilayers Induce Packing Defects Similar to that Induced by Positive Curvature, *Biophys. J.* 104 (2013) 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3836>.
- [293] Y.G. Pan, S. Banerjee, K. Zagorski, S. Luda, A.B. Kolomeisky, Y.L. Lyubchenko, Molecular Model for the Surface-Catalyzed Protein Self-Assembly, *J. Phys. Chem. B.* 16 (2019) 366–372. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b10052>.
- [294] V.E. Bychkova, A.E. Dujsekina, S.I. Klenin, E.I. Tiktopulo, V.N. Uversky, O.B. Ptitsyn, Molten Globule-Like State of Cytochrome c under Conditions Simulating Those Near the Membrane Surface, *Biochemistry* 35 (1996) 6058–6063. <https://doi.org/10.1021/bi9522460>.
- [295] Y. Su, P.T. Chang, Acidic pH promotes the formation of toxic fibrils from beta-amyloid peptide, *Brain Res.* 893 (2001) 287–291. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)03322-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)03322-9).

- [296] S. Morandat, K. El Kirat, Membrane Resistance to Triton X-100 Explored by Real-Time Atomic Force Microscopy, *Langmuir* 22 (2006) 5786–5791. <https://doi.org/10.1021/la0604228>.
- [297] J. Pan, N.K. Khadka, Kinetic Defects Induced by Melittin in Model Lipid Membranes: A Solution Atomic Force Microscopy Study, *J. Phys. Chem. B* 120 (2016) 4625–4634. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b02332>.
- [298] M. Grandbois, H. Clausen-Schaumann, H. Gaub, Atomic force microscope imaging of phospholipid bilayer degradation by phospholipase A2, *Biophys. J.* 74 (1998) 2398–2404. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77948-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77948-2).
- [299] K. El Kirat, V. Duprès, Y.F. Dufrêne, Blistering of supported lipid membranes induced by Phospholipase D, as observed by real-time atomic force microscopy, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778 (2008) 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.09.029>.
- [300] J. Pan, P.K. Sahoo, A. Dalzini, Z. Hayati, C.M. Aryal, P. Teng, J. Cai, H. Rodriguez Gutierrez, L. Song, Membrane Disruption Mechanism of a Prion Peptide (106–126) Investigated by Atomic Force Microscopy, Raman and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 121 (2017) 5058–5071. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b02772>.
- [301] S. Budhu, R. Giese, A. Gupta, K. Fitzgerald, R. Zappasodi, S. Schad, D. Hirschhorn, L.F. Campesato, O. De Henau, M. Gigoux, C. Liu, G. Mazo, L. Deng, C.A. Barker, J.D. Wolchok, T. Merghoub, Targeting Phosphatidylserine Enhances the Anti-tumor Response to Tumor-Directed Radiation Therapy in a Preclinical Model of Melanoma, *Cell Rep.* 34 (2021) 108620. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108620>.
- [302] X. Ma, X. Li, W. Wang, M. Zhang, B. Yang, Z. Miao, Phosphatidylserine, inflammation, and central nervous system diseases, *Front. Aging Neurosci.* 14 (2022). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.975176>.
- [303] K. Zagorski, M. Hashemi, Z. Iv, S. Banerjee, J.C. Rochet, Y. Lyubchenko, Phospholipid membranes promote the early stage assembly of α -synuclein aggregates, *A&D* 15 (2019) P293. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.06.701>.
- [304] R. Budvytyte, F. Ambrulevičius, E. Jankaityte, G. Valincius, Electrochemical assessment of dielectric damage to phospholipid bilayers by amyloid β -Oligomers, *Bioelectrochemistry* 145 (2022) 108091. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108091>.
- [305] M. Pavlin, T. Kotnik, D. Miklavčič, P. Kramar, A. Maček Lebar, Chapter Seven Electroporation of Planar Lipid Bilayers and Membranes, in: A. Leitmannova Liu (Ed.), *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes*, Academic Press, 2008: pp. 165–226. [https://doi.org/10.1016/S1554-4516\(07\)06007-3](https://doi.org/10.1016/S1554-4516(07)06007-3).
- [306] Abhinav, P. Jurkiewicz, M. Hof, C. Allolio, J. Sýkora, Modulation of Anionic Lipid Bilayers by Specific Interplay of Protons and Calcium Ions, *Biomolecules* 12 (2022) 1894. <https://doi.org/10.3390/biom12121894>.
- [307] G. Lindblom, G. Orädd, Lipid lateral diffusion and membrane heterogeneity, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2008) 234–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.016>.
- [308] D.L. Pham, M.G. Yoon, G.Y. Ban, S.H. Kim, M.A. Kim, Y.M. Ye, Y.S. Shin, H.S. Park, Serum S100A8 and S100A9 Enhance Innate Immune Responses in the Pathogenesis of Baker’s Asthma, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 168 (2015) 138–146. <https://doi.org/10.1159/000441678>.

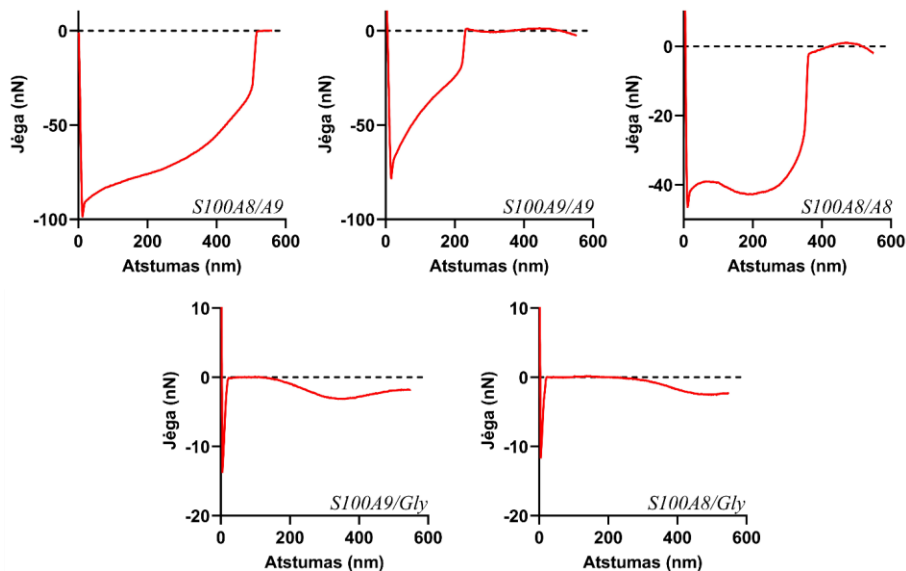
- [309] O. Yasar, T. Akcay, C. Obek, F.A. Turegun, Significance of S100A8, S100A9 and calprotectin levels in bladder cancer, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 77 (2017) 437–441. <https://doi.org/10.1080/00365513.2017.1336567>.
- [310] T. Maes, C. Mascaró, D. Rotllant, M. Lufino, A. Estiarte, N. Guibourt, F. Cavalcanti, C. Ferre, M. Pallàs, R. Nadal, A. Armario, I. Ferrer, A. Ortega, N. Valls, M. Fyfe, M. Martinell, J. Palomino, C. Arjol, Modulation of KDM1A with vafidemstat rescues memory deficit and behavioral alterations, *PLOS ONE* 15 (2020) e0233468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233468>.
- [311] S. Grassi, P. Giussani, L. Mauri, S. Prioni, S. Sonnino, A. Prinetti, Lipid rafts and neurodegeneration: structural and functional roles in physiologic aging and neurodegenerative diseases, *J. Lipid Res.* 61 (2020) 636–654. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000427>.
- [312] K.P. Shaw, N.J. Brooks, J.A. Clarke, O. Ces, J.M. Seddon, R.V. Law, Pressure–temperature phase behaviour of natural sphingomyelin extracts, *Soft Matter* 8 (2012) 1070–1078. <https://doi.org/10.1039/C1SM06703F>.
- [313] A. Zhukov, M. Vereshchagin, Polar Glycerolipids and Membrane Lipid Rafts, *Int. J. Mol. Sci.* 25 (2024) 8325. <https://doi.org/10.3390/ijms25158325>.
- [314] E. Canepa, S. Salassi, A.L. de Marco, C. Lambruschini, D. Odino, D. Bochicchio, F. Canepa, C. Canale, S. Dante, R. Brescia, F. Stellacci, G. Rossi, A. Relini, Amphiphilic gold nanoparticles perturb phase separation in multidomain lipid membranes, *Nanoscale* 12 (2020) 19746–19759. <https://doi.org/10.1039/D0NR05366J>.
- [315] Y.F. Dufrène, W.R. Barger, J.B.D. Green, G.U. Lee, Nanometer-Scale Surface Properties of Mixed Phospholipid Monolayers and Bilayers, *Langmuir* 13 (1997) 4779–4784. <https://doi.org/10.1021/la970221r>.
- [316] D.J. Müller, A. Engel, The height of biomolecules measured with the atomic force microscope depends on electrostatic interactions, *Biophys. J.* 73 (1997) 1633–1644. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78195-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78195-5).
- [317] M. Emanuele, A. Esposito, S. Camerini, F. Antonucci, S. Ferrara, S. Seghezze, T. Catelani, M. Crescenzi, R. Marotta, C. Canale, M. Matteoli, E. Menna, E. Chieragatti, Exogenous Alpha-Synuclein Alters Pre- and Post-Synaptic Activity by Fragmenting Lipid Rafts, *EBioMedicine* 7 (2016) 191–204. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.038>.
- [318] M. Leri, H. Chaudhary, I.A. Iashchishyn, J. Pansieri, Ž.M. Svedružić, S. Gómez Alcalde, G. Musteikyte, V. Smirnovas, M. Stefani, M. Bucciattini, L.A. Morozova-Roche, Natural Compound from Olive Oil Inhibits S100A9 Amyloid Formation and Cytotoxicity: Implications for Preventing Alzheimer’s Disease, *ACS Chem. Neurosci.* 12 (2021) 1905–1918. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00828>.
- [319] M. Ferraro, M. Masetti, M. Recanatini, A. Cavalli, G. Bottegoni, Modeling lipid raft domains containing a mono-unsaturated phosphatidylethanolamine species, *RSC Adv.* 5 (2015) 37102–37111. <https://doi.org/10.1039/C5RA02196K>.
- [320] L. Picas, F. Rico, S. Scheuring, Direct Measurement of the Mechanical Properties of Lipid Phases in Supported Bilayers, *Biophys. J.* 102 (2012) L01–L03. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.4001>.
- [321] A. Choucair, M. Chakrapani, B. Chakravarthy, J. Katsaras, L.J. Johnston, Preferential accumulation of A β (1–42) on gel phase domains of lipid bilayers: An AFM and fluorescence study, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1768 (2007) 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.09.005>.

- [322] A. Lewis, T. Pham, N. Nguyen, A. Graf, K.H. Cheng, Lipid domain boundary triggers membrane damage and protein folding of human islet amyloid polypeptide in the early pathogenesis of amyloid diseases, *Biophys. Chem.* 296 (2023) 106993. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2023.106993>.
- [323] A. Berquand, M.-P. Mingeot-Leclercq, Y.F. Dufrène, Real-time imaging of drug-membrane interactions by atomic force microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1664 (2004) 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.05.010>.
- [324] M. Deleu, J. Lorent, L. Lins, R. Brasseur, N. Braun, K. El Kirat, T. Nylander, Y.F. Dufrène, M.P. Mingeot-Leclercq, Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 801–815. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.007>.
- [325] J.D. Unsay, K. Cosentino, A.J. García-Sáez, Atomic Force Microscopy Imaging and Force Spectroscopy of Supported Lipid Bilayers, *J. Vis. Exp. JoVE* 101 (2015) e52867. <https://doi.org/10.3791/52867>.
- [326] H. An, M.R. Nussio, M.G. Huson, N.H. Voelcker, J.G. Shapter, Material properties of lipid microdomains: force-volume imaging study of the effect of cholesterol on lipid microdomain rigidity, *Biophys. J.* 99 (2010) 834–844. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.072>.
- [327] D. Mrdenovic, M. Majewska, I.S. Pieta, P. Bernatowicz, R. Nowakowski, W. Kutner, J. Lipkowski, P. Pieta, Size-Dependent Interaction of Amyloid β Oligomers with Brain Total Lipid Extract Bilayer—Fibrillation Versus Membrane Destruction, *Langmuir* 35 (2019) 11940–11949. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01645>.
- [328] K.A. Burke, E.A. Yates, J. Legleiter, Amyloid-Forming Proteins Alter the Local Mechanical Properties of Lipid Membranes, *Biochemistry* 52 (2013) 808–817. <https://doi.org/10.1021/bi301070v>.
- [329] P. Calissano, S. Alemà, P. Fasella, Interaction of S-100 protein with cations and liposomes, *Biochemistry* 13 (1974) 4553–4560. <https://doi.org/10.1021/bi00719a013>.
- [330] H. Binder, O. Zschörnig, The effect of metal cations on the phase behavior and hydration characteristics of phospholipid membranes, *Chem. Phys. Lipids* 115 (2002) 39–61. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(02\)00005-1](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(02)00005-1).
- [331] U.R. Pedersen, C. Leidy, P. Westh, G.H. Peters, The effect of calcium on the properties of charged phospholipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 573–582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.035>.
- [332] J.M. Boettcher, R.L. Davis-Harrison, M.C. Clay, A.J. Nieuwkoop, Y.Z. Ohkubo, E. Tajkhorshid, J.H. Morrissey, C.M. Rienstra, Atomic View of Calcium-Induced Clustering of Phosphatidylserine in Mixed Lipid Bilayers, *Biochemistry* 50 (2011) 2264–2273. <https://doi.org/10.1021/bi1013694>.
- [333] M. Mirza, Y. Guo, K. Arnold, C.J. van Oss, S. Ohki, Hydrophobizing Effect of Cations on Acidic Phospholipid Membranes, *J. Dispers. Sci. Technol.* 19 (1998) 951–962. <https://doi.org/10.1080/01932699808913225>.
- [334] E. Murphy, Mysteries of magnesium homeostasis, *Circ. Res.* 86 (2000) 245–248. <https://doi.org/10.1161/01.res.86.3.245>.
- [335] L. Santamaria-Kisiel, A.C. Rintala-Dempsey, G.S. Shaw, Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family, *Biochem. J.* 396 (2006) 201–214. <https://doi.org/10.1042/BJ20060195>.
- [336] C. Peterson, R.R. Ratan, M.L. Shelanski, J.E. Goldman, Cytosolic free calcium and cell spreading decrease in fibroblasts from aged and Alzheimer donors., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 (1986) 7999–8001. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.20.7999>.

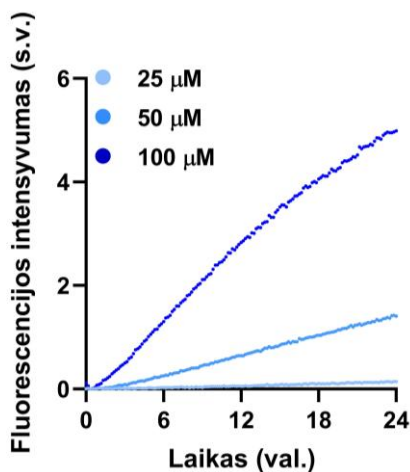
- [337] Y. He, H. Zhang, T. Wang, Z. Han, Q.B. Ni, K. Wang, L. Wang, Y. Zhang, Y. Hu, S. Jin, B.L. Sun, G. Liu, Impact of Serum Calcium Levels on Alzheimer's Disease: A Mendelian Randomization Study. *J Alzheimers Dis.* 76 (2020) 713-724. <https://doi.org/10.3233/JAD-191249>.
- [338] A. Scholey, D. Camfield, L. Owen, A. Pipingas, C. Stough, 12 - Functional foods and cognition, in: M. Saarela (Ed.), *Funct. Foods Second Ed.*, Woodhead Publishing, 2011: pp. 277–308. <https://doi.org/10.1533/9780857092557.2.277>.
- [339] H.Y. Kim, B.X. Huang, A.A. Spector, Phosphatidylserine in the Brain: Metabolism and Function, *Prog. Lipid Res.* 56 (2014) 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.06.002>.
- [340] S.E. Stewart, A. Ashkenazi, A. Williamson, D.C. Rubinsztein, K. Moreau, Transbilayer phospholipid movement facilitates the translocation of annexin across membranes, *J. Cell Sci.* 131 (2018) jcs217034. <https://doi.org/10.1242/jcs.217034>.
- [341] S.E.P. New, C. Goettsch, M. Aikawa, J.F. Marchini, M. Shibasaki, K. Yabusaki, P. Libby, C.M. Shanahan, K. Croce, E. Aikawa, Macrophage-Derived Matrix Vesicles, *Circ. Res.* 113 (2013) 72–77. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301036>.
- [342] S. Wang, R. Song, Z. Wang, Z. Jing, S. Wang, J. Ma, S100A8/A9 in Inflammation, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1298. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01298>.
- [343] A.F. Hill, Extracellular Vesicles and Neurodegenerative Diseases, *J. Neurosci.* 39 (2019) 9269–9273. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0147-18.2019>.
- [344] Y. Zhang, Y. Zhao, J. Zhang, Y. Gao, X. Gao, S. Li, C. Chang, G. Yang, Proteomics of plasma-derived extracellular vesicles reveals S100A8 as a novel biomarker for Alzheimer's disease: A preliminary study, *J. Proteomics* 308 (2024) 105279. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2024.105279>.
- [345] M. Warda, S. Tekin, M. Gamal, N. Khafaga, F. Çelebi, G. Tarantino, Lipid rafts: novel therapeutic targets for metabolic, neurodegenerative, oncological, and cardiovascular diseases, *Lipids Health Dis.* 24 (2025) 147. <https://doi.org/10.1186/s12944-025-02563-0>.

PRIEDAI

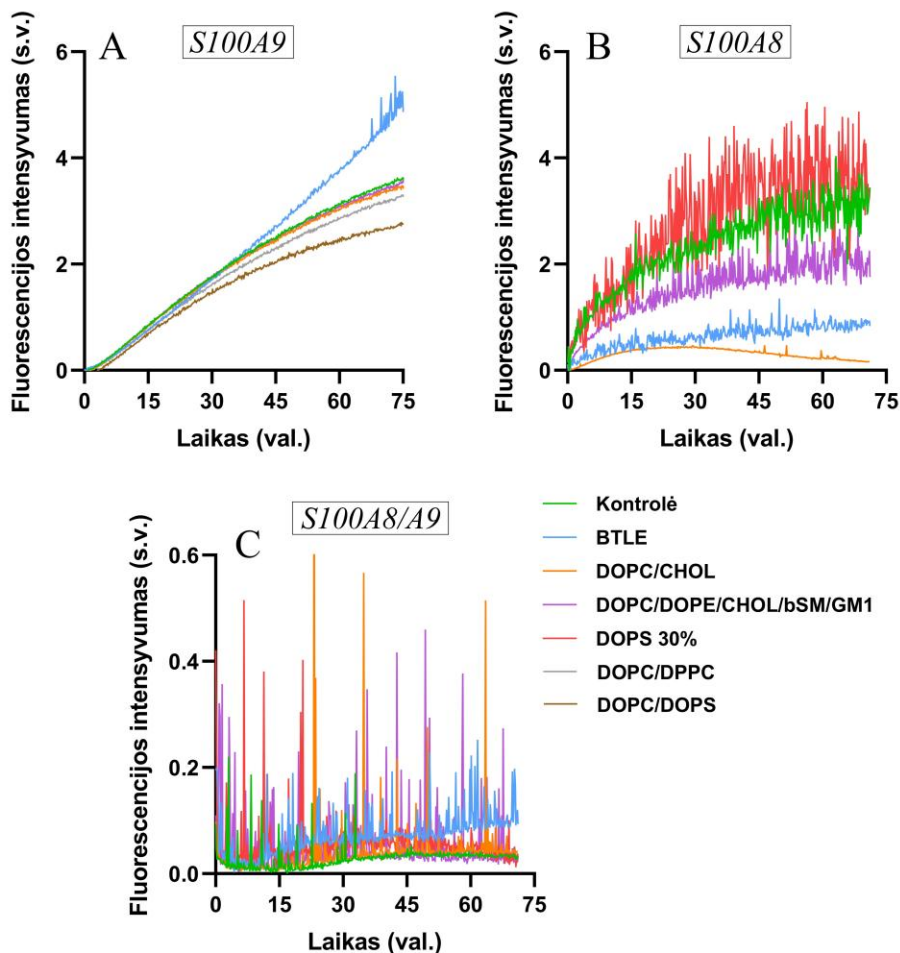
1 priedas. Paveiksle pateiktos reprezentatyvios jėgos kreivės, naudotos tarpmolekulinių sąveikų tarp S100A8 ir S100A9 baltymų įvertinimui. AJM zondų funkcionalizavimui naudota plačiai taikoma glutaraldehido strategija. Tarpmolekulinių sąveikų stiprumas buvo įvertintas pagal adhezijos jėgą, reikalingą jungčiai, susidariusiai adatos nuleidimo ciklo metu, nutraukti. Nustatyta, jog stipriausiomis tarpmolekulinėmis sąveikomis pasižymėjo S100A8/A9 baltymų heterokompleksas.



2 priedas. S100A9 agregacijos priklausomybė nuo baltymo koncentracijos. S100A9 agregacijos kinetika buvo tiriama matuojant Tioflavino T fluorescencijos intensyvumą. Inkubacija vyko PBS buferiniame tirpale (pH = 7,2) 24 val. 37 °C, naudojant 25, 50 arba 100 μ M S100A9 koncentracijas.



3 priedas. Lipidų įtakos S100 baltymų agregacijai tyrimas. Paveiksle pateikiamos S100A9 (A), S100A8 (B) ir S100A8/A9 (C) agregacijos kinetikos kreivės, gautos matuojant Tioflavino T fluorescencijos intensyvumą laike. Baltymų agregacijos kinetika buvo tiriama tirpale be liposomų (žalia kreivė) ir esant įvairių lipidinių kompozicijų liposomoms: DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 (purpurinė), DOPC/CHOL (oranžinė), DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (DOPS 30 %, raudona), BTLE (mėlyna), DOPC/DPPC (pilka), DOPC/DOPS (ruda). Agregacijos tyrimai buvo atlikti HEPES buferiniame tirpale (pH = 7,4) (S100A9 atveju – PBS buferiniame tirpale (pH = 7,2)), 37 °C temperatūroje, naudojant 50 μM baltymų ir 500 μM lipidų koncentracijas.



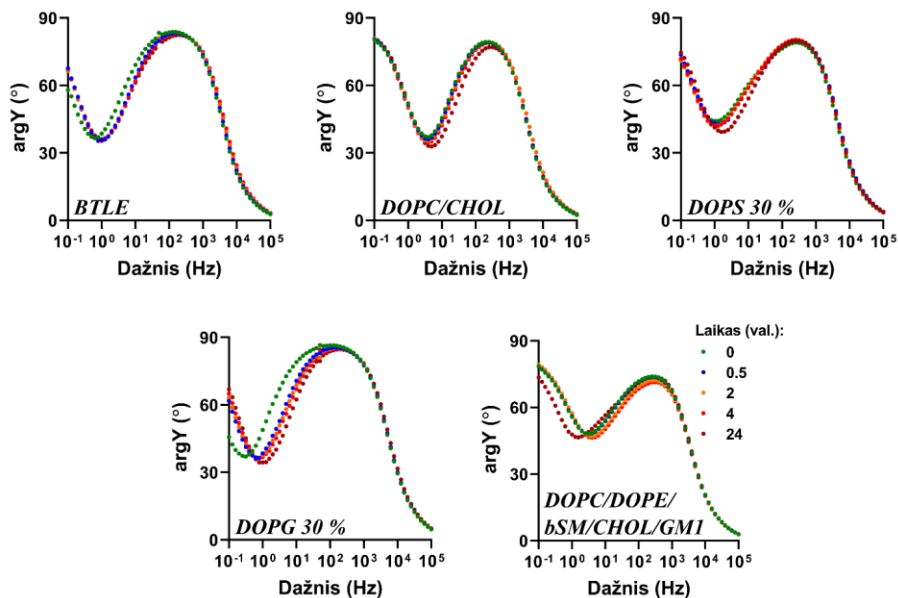
4 priedas. Liposomų stabilumo laike įvertinimas. Liposomų inkubacija buvo atlikta 37 °C temperatūroje, 72 val. Kas 24 val. laikotarpi, liposomų hidrodinaminis skersmuo buvo įvertinamas dinaminės šviesos sklaidos metu.

Kompozicija	Skersmuo (nm)			
	0 val.	24 val.	48 val.	72 val.
BTLE	127,4 ± 30,2	133,2 ± 22,0	134,2 ± 17,0	131,6 ± 31,0
DOPC/CHOL	133,8 ± 21,0	139,0 ± 26,4	139,6 ± 29,8	139,2 ± 3,6
DOPC/DOPS	123,4 ± 17,4	127,6 ± 18,6	128,6 ± 9,2	127,8 ± 28,4
DOPC/DPPC	139,2 ± 12,2	175,2 ± 36,4	171,8 ± 40,2	179,6 ± 40,2
DOPC/DOPE/ bSM/CHOL/GM1	127,0 ± 12,2	127,2 ± 17,0	129,6 ± 20,0	127,0 ± 14,8

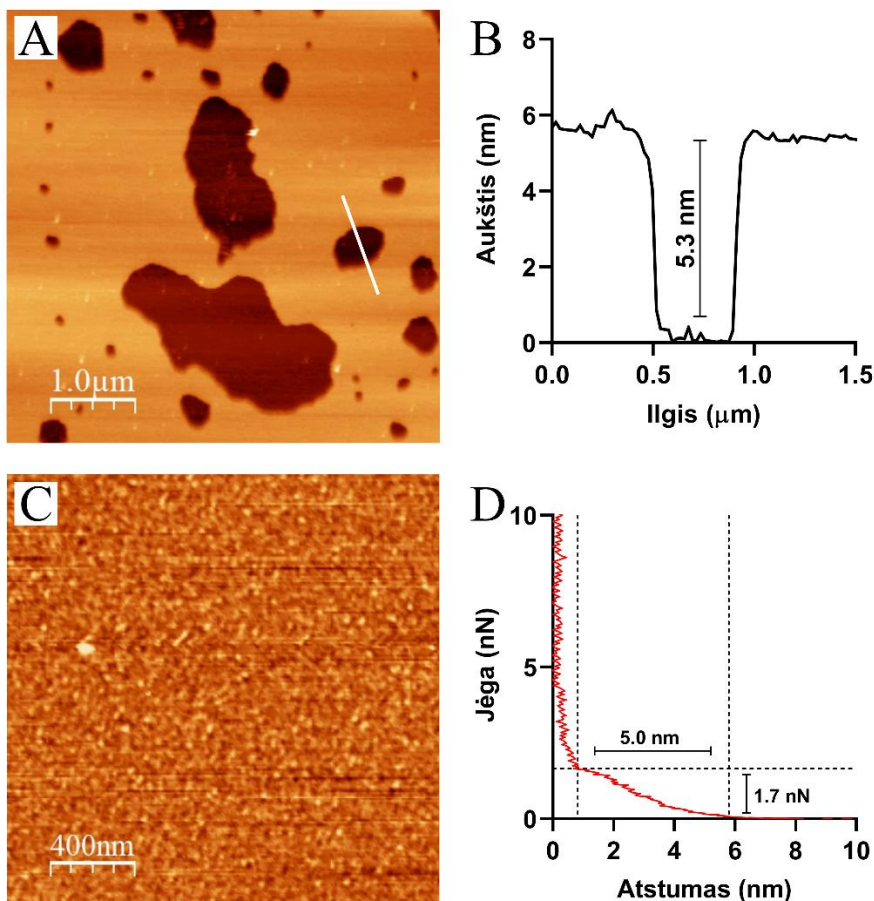
5 priedas. Savaiminis kalceino išlaisvinimas (%) iš kontrolinių liposomų. Lygiagrečiai kalceino išlaisvinimo iš S100 baltymais paveiktų liposomų matavimų, buvo registruojama ir savaiminio dažo išlaisvinimo iš kontrolinių LUV kinetika. Paveiksle pateiktos suvidurkintos (n = 4) dažo išlaisvinimo iš kontrolinių LUV vertės, įvertintos 0,5, 2 ir 4 inkubacijos valandas. Liposomų inkubacija buvo atlikta 22 °C (S100A9 tyrimai) arba 37 °C (S100A8 tyrimai) temperatūroje, tarp matavimų mėginius maišant 400 aps./min. greičiu.

	Kompozicija	Kalceino išlaisvinimas (%)		
		0,5 val.	2 val.	4 val.
S100A9 tyrimai (22 °C)	BTLE	3,5 ± 0,5	8,9 ± 0,7	11,7 ± 0,5
	DOPC/CHOL (6/4)	14,1 ± 3,0	19,1 ± 3,6	19,8 ± 3,5
	DOPC/DOPS (6/4)	12,2 ± 1,2	32,0 ± 0,4	48,8 ± 1,8
	DOPC/DPPC (6/4)	14,7 ± 1,3	30,0 ± 0,9	37,5 ± 1,5
S100A8 tyrimai (37 °C)	BTLE	7,8 ± 2,4	12,4 ± 0,1	12,9 ± 1,5
	DOPC/CHOL (6/4)	5,1 ± 0,4	8,4 ± 1,3	8,5 ± 1,3
	DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2) – DOPS 30 %	10,9 ± 1,4	9,9 ± 1,6	11,2 ± 1,7
	DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (3/3/2/2) – DOPS 20 %	7,9 ± 3,8	11,1 ± 3,2	13,4 ± 1,4
	DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (4/3/1/2) – DOPS 10 %	16,1 ± 6,5	17,1 ± 4,7	16,7 ± 4,5
	DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (4,5/3/0,5/2) – DOPS 5 %	3,0 ± 2,4	4,7 ± 2,1	9,2 ± 1,3
	DOPC/DOPE/CHOL (5/3/2)	1,0 ± 0,7	8,1 ± 1,4	9,6 ± 2,9
	DOPC/DOPE/DOPG/CHOL (2/3/3/2) – DOPG 30 %	6,0 ± 0,7	13,9 ± 4,8	12,3 ± 4,4

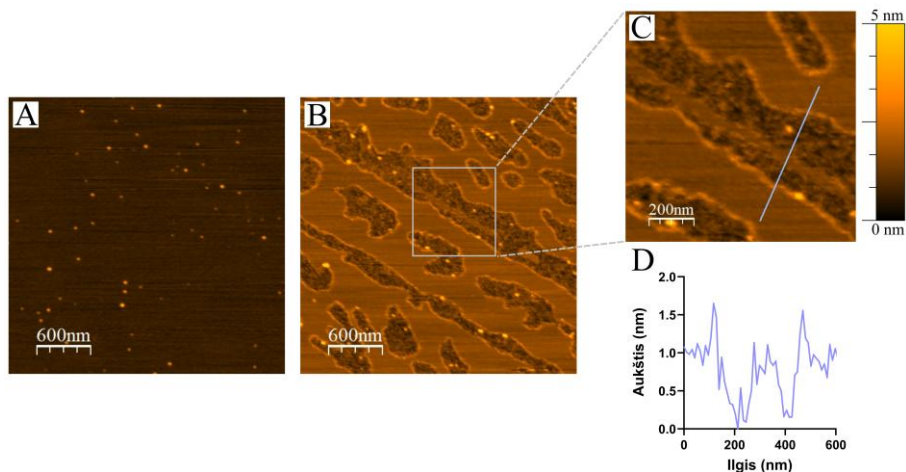
6 priedas. Prikabintų dvisluoksnių lipidinių membranų stabilumas laike, įvertintas naudojant elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodą. Paveiksle pavaizduoti fazės kampo priklausomybės nuo dažnio (Bode) grafikai, atspindintys skirtingų kompozicijų lipidinių membranų dielektrinių savybių pokyčius. Membranų dielektrinės savybės buvo įvertintos 0 (žalia kreivė), 0,5 (mėlyna), 2 (oranžinė), 4 (raudona) ir 24 (tamsiai raudona) inkubacijos valandas.



7 priedas. Kiaulės smegenų lipidų ekstrakto pagrindu suformuotos membranos storio ir pralaužimo jėgos įvertinimas. Membranos storis buvo vertinamas dviem alternatyviais metodais: *I.* suformavus nepilnai išlietą dvisluoksnį ir matuojant aukščio skirtumą tarp membranos ir substrato paviršių (A, B); *II.* esant homogeniškam lipidų dvisluoksniui, storis buvo nustatomas pagal jėgos kreives (C, D). Remiantis aukščio skirtumu, nustatytas BTLE dvisluoksniu storis siekė $5,3 \pm 0,1$ nm, o pagal jėgos kreivių duomenis – $5,2 \pm 0,9$ nm. Nustatyta BTLE membranos pralaužimo jėga siekė 1,7 nN.



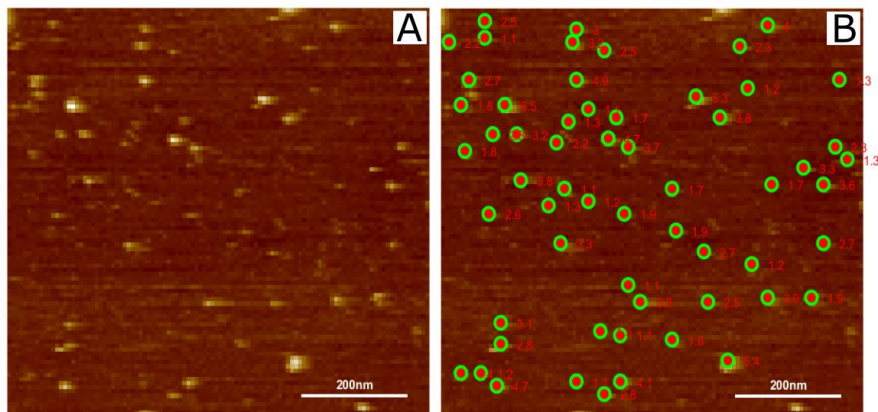
8 priedas. S100A9 sąveika su ant kieto paviršiaus suformuotu BTLE kompozicijos lipidų dvisluoksniu. (A) Ant žėručio paviršiaus suformuotos BTLE dvisluoksnės membranos vaizdas (plotas $3 \times 3 \mu\text{m}^2$). Paveiksluose matomi iškylimai atitinka nepilnai ant žėručio paviršiaus išsiliejusias liposomas; (B) – membrana po sąlyčio su $5 \mu\text{M}$ S100A9 baltymu; (C) – išdidintas (B) dalyje kvadratu pažymėto ploto vaizdas (plotas $1 \times 1 \mu\text{m}^2$); (D) – aukščio profilis, išmatuotas išilgai (C) dalyje pažymėtos atkarpos.



9 priedas. Vidutinio paviršiaus šiurkštumo (R_a) vertės, apskaičiuotos iš AJM topografijos vaizdų, gautų prieš (0 val.) ir po poveikio S100A9 baltymu (0,5 ir 2 val. po baltymo injekcijos). Skaičiavimai atlikti NanoScope Analysis (*Bruker*) programine įranga (versija 1.4), naudojant funkciją „Roughness“.

Kompozicija	Laikas (val.)	R_a (nm)
DOPC/CHOL	0	0,35
	0,5	–
	2	0,35
DOPC/DOPS	0	0,38
	0,5	–
	2	0,40
DOPC/DPPC	0	0,46
	0,5	0,47
	2	0,54
DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1	0	0,91
	0,5	0,75
	2	0,84
BTLE	0	0,33
	0,5	0,34
	2	0,62

10 priedas. S100A8 baltymo sankaupos ant žėručio paviršiaus, vizualizuotos greitaeigės atominės jėgos mikroskopijos metodu. (A) dalyje pateikiama ant substrato paviršiaus adsorbuotų darinių morfologija, (B) dalyje pateikiamos šių darinių aukščio vertės. Eksperimentas atliktas HEPES buferiniame tirpale (pH = 7,4), 22 °C temperatūroje, naudojant 10 μM S100A8 baltymo koncentraciją.



11 priedas. S100A8 baltymo sukeltų defektų anijoninėje membranoje charakterizacija. Lentelėje pateikti DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2) dvisluoksnyje esančių defektų spinduliai prieš baltymo poveikį (r_0) ir S100A8 sukeltų defektų dydžių pokyčiai laike. Nustatyta, kad pradinis S100A8 sukeltų defektų spindulys siekė $25,9 \pm 3,9$ nm ($n = 9$). Dydžio įvertinimui naudotos tik vertės, nustatytos pradinio defektų susidarymo momentu (pažymėtos paryškintu šriftu).

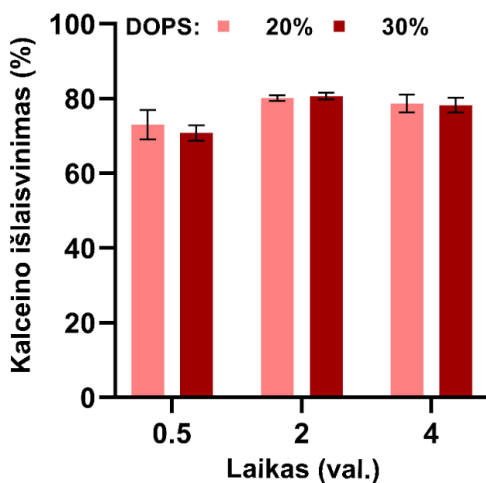
Defekto Nr.	$r_{0 \text{ min}} / \text{nm}$	$\Delta r_{3 \text{ min} - 0 \text{ min}} / \text{nm}$	$\Delta r_{12 \text{ min} - 3 \text{ min}} / \text{nm}$
1	27,5	11,2	25,7
2	24,3	5,2	10,4
3	24,2	9,1	15,2
4	24,1	9,1	9,9
5	-	25,7	14,2
6	-	24,2	15,0
7	-	24,4	35,3
8	-	21,0	19,3
9	-	-	32,7
10	-	-	23,5
11	-	-	24,9
12	-	-	32,1
13	-	-	24,8

12 priedas. S100A8 baltymo sukeltų defektų membranoje charakterizacija. Lentelėje pateikti DOPC/DOPE/DOPS/CHOL dvisluoksnyje esančių defektų gyliai prieš baltymo poveikį (h_0) ir S100A8 sukeltų defektų gylio pokyčiai laikui bėgant. Nustatyta, kad pradinis S100A8 sukeltų defektų gylis siekė $0,9 \pm 0,3$ nm ($n = 9$). Gylio įvertinimui naudotos tik vertės, nustatytos pradiniu defektų susidarymo momentu (pažymėtos paryškintu šriftu).

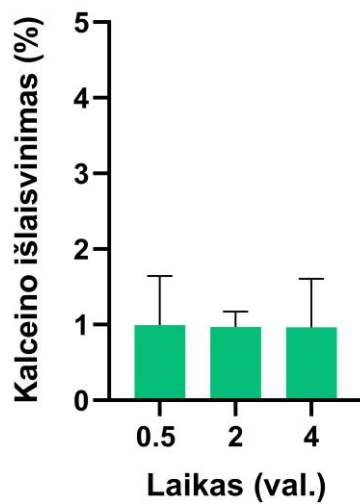
Defekto Nr.	$h_{0 \text{ min}} / \text{nm}$	$\Delta h_{3 \text{ min} - 0 \text{ min}} / \text{nm}$	$\Delta h_{12 \text{ min} - 3 \text{ min}} / \text{nm}$
1	0,9	1,2	0
2	0,8	0,7	0,2
3	0,8	0,5	0,8
4	1,4	0,8	0
5	-	0,8	1,0
6	-	0,7	0,9
7	-	1,0	0,8
8	-	0,6	1,5
9	-	-	1,6
10	-	-	0,7
11	-	-	0,9
12	-	-	1,2
13	-	-	0,8

Svarbu pažymėti, kad matavimų metu naudoto AJM zondo spindulys siekė 24 nm, todėl defektai, mažesni už šią vertę, charakterizuoti nebuvo.

13 priedas. S100A8 poveikis anijoninių liposomų integralumui. Liposomų, kurių sudėtyje buvo 20 % arba 30 % DOPS, integralumo pokyčiai po sąveikos su S100A8 buvo vertinti kalceino išlaisvinimo metodu. Eksperimentas buvo atliktas 10 mM HEPES buferiniame tirpale ($\text{pH} = 7,4$), 37 °C temperatūroje, naudojant 10 μM baltymo ir 100 μM lipidų koncentracijas. DOPS 30 % žymi DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2) lipidų kompoziciją, o DOPS 20 % – DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (3/3/2/2).



14 priedas. S100A9 baltymo poveikis DOPC/DPPC (6/4) membranos integralumui. S100A9 baltymo sukelta lipidų dv sluoksnio pažeida buvo vertinama stebint kalceino išlaisvinimą iš liposomų.



SUMMARY

INTRODUCTION

Inflammation is a natural defense response of the body that helps protect against various harmful internal or external factors and maintain homeostasis. In the central nervous system, glial cells and inflammatory mediators – such as cytokines, chemokines, and other signaling proteins – play a key role in initiating and regulating neuroinflammation [1]. Failure to eliminate the causes of inflammation or impairment of self-regulatory mechanisms may lead to the transition of acute inflammation into a chronic state, thereby promoting tissue damage and contributing to the development of various diseases, including central nervous system disorders [2]. Although amyloid protein aggregates have long been regarded as the primary cause of neurodegenerative diseases, with neuroinflammation seen as a secondary effect, emerging evidence suggests that neuronal death may actually precede aggregate formation [3]. There is growing recognition that inflammation not only plays a significant role in the progression of neurodegenerative diseases but may also act as a primary factor that promotes the formation of pathological amyloid deposits and neuronal death in the early stages of disease development [4].

Calcium-binding proteins of the S100 family, secreted by neutrophils and monocytes, are increasingly recognized as key initiators of the inflammatory response. These proteins act as danger-associated molecular patterns and, by interacting with cell surface receptors, trigger pro-inflammatory signaling cascades and promote the migration of immune cells to sites of tissue damage [5]. Among the best-characterized members of the S100 family are S100A8 and S100A9, which, due to the instability of their homodimers, are most commonly found in the form of heterodimers (S100A8/A9) [6]. Given that the expression of these proteins is elevated in many inflammatory conditions, S100A8/A9 is frequently recognized as a potential biomarker for various neurodegenerative disorders and as a promising therapeutic target [7].

In addition to amyloid protein accumulation and chronic neuroinflammation, damage to the neuronal plasma membrane is a hallmark of the pathophysiology of neurodegenerative diseases [8]. Studies show that S100 proteins not only play a crucial role in regulating inflammatory processes but also directly interact with key structural components of the plasma membrane – lipids [9–11]. Despite considerable interest, the link

between proteins released during neuroinflammation and the loss of membrane integrity remains unresolved. Therefore, this study primarily focused on the pro-inflammatory proteins S100A8, S100A9, and their heterocomplex S100A8/A9, to assess their potential interactions with the cell plasma membrane.

The aim of this study was to investigate the interactions between S100A8, S100A9, and their complex, S100A8/A9, with an artificial lipid bilayer designed to mimic the neuronal plasma membrane.

To achieve this aim, the following **objectives** were defined:

1. To evaluate the structural properties and stability of S100A8 and S100A9 proteins, as well as their S100A8/A9 complex.
2. To investigate the effects of calcium ions and the lipid bilayer on the aggregation of S100 proteins.
3. To determine the impact of S100 proteins on lipid membrane integrity and to assess potential mechanisms of bilayer damage.

SCIENTIFIC NOVELTY

The expression of pro-inflammatory S100 family proteins increases in response to trauma and various inflammatory diseases [12], underscoring their significance not only in fundamental scientific research but also as promising targets for developing new diagnostic and therapeutic tools for neurodegenerative diseases. This study, for the first time, demonstrates that S100A8, S100A9, and their S100A8/A9 complex directly interact with an anionic lipid bilayer, resulting in compromised membrane integrity. Using high-speed atomic force microscopy, real-time changes in membrane morphology induced by S100A8 and the S100A8/A9 complex were observed, enabling precise identification of the damage mechanism. Meanwhile, the use of conventional AFM techniques to visualize S100A9 interactions with the lipid bilayer provided insights that led to the proposal of potential mechanisms underlying membrane remodeling. Notably, the methodology applied in this study enabled observation of S100A8 membrane-disruptive activity at pathological protein concentrations, which may significantly contribute to the development of biosensors for neurodegenerative diseases. Furthermore, analysis of protein aggregation processes revealed that alterations in lipid membrane composition markedly influence S100 protein aggregation and the formation of potentially neurotoxic assemblies. Collectively, these findings

highlight the pivotal role of the plasma membrane in the initiation and progression of neurodegeneration.

DEFENDING STATEMENTS

1. The S100A8 protein interacts with anionic membranes containing 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine and compromises their integrity via a detergent-like mechanism.
2. The interaction of S100A8 with membranes containing 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine promotes the aggregation processes of this protein.
3. The S100A9 protein is capable of integrating into the lipid bilayer, thereby inducing lateral expansion of lipid molecules within the membrane.
4. The remodeling of artificial lipid membranes by the S100A8/A9 complex is primarily driven by the activity of the S100A8 protein.

MATERIALS AND METHODS

Materials and Solutions

The S100A8, S100A9, and S100A8/A9 proteins were purified at the Amyloid Research Sector of the Life Sciences Center, Vilnius University, following a previously described protocol [116]. Purification was carried out in PBS or HEPES buffer solutions, and protein concentrations were determined using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (*Thermo Fisher*) by measuring absorbance at 280 nm. Extinction coefficients calculated with ProtParam (*ExPASy*) software were used for concentration determination: 6,990 M⁻¹ cm⁻¹ (S100A9), 11,460 M⁻¹ cm⁻¹ (S100A8), and 18,450 M⁻¹ cm⁻¹ (S100A8/A9) [210]. Proteins were stored at -80 °C until further use.

Compounds used for the preparation of self-assembled monolayers:

Z 20-(Z-octadec-9-enyloxy)-3,6,9,12,15,18,22-heptaooxatetracont-31-ene-1-thiol (HC-18), 20-tetradecyloxy-3,6,9,12,15,18,22-heptaooxahexatricontane-1-thiol (WC-14), and β -mercaptoethanol (β ME; *Sigma-Aldrich*). The anchor compounds were synthesized by the research group of David J. Vanderah according to a previously described methodology [199,211].

Lipids used for artificial phospholipid membrane preparation:

Cholesterol (CHOL), porcine brain total lipid extract (BTLE), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DOPG), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), brain sphingomyelin (bSM), and ganglioside (GM1). Lipids were purchased from *Avanti Polar Lipids*. All lipids were dissolved or diluted in chloroform to a final concentration of 10 mM (12 mg/mL for BTLE). Solutions were aliquoted into 4 mL glass vials and stored at -20°C until further use.

Salts and other chemicals: Potassium chloride (KCl), sodium chloride (NaCl), calcium chloride (CaCl_2), magnesium chloride (MgCl_2), disodium phosphate (Na_2HPO_4), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), sodium hydroxide (NaOH), chloroform (CHCl_3), ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), calcein, Sephadex G-50, Thioflavin T (ThT). All listed chemicals were obtained from *Sigma-Aldrich*. Nitrogen (N_2) was supplied by *Elme Messer Lit*, and Triton X-100 by *Loba Chemie*.

Composition of Prepared Solutions:

- I. Salt solution (pH = 4.5): NaCl (0.1 M), NaHPO_4 (0.01 M);
- II. Phosphate-buffered saline (PBS) (pH = 7.2): NaCl (0.137 M), KCl (0.0027 M), Na_2HPO_4 (0.01 M), KH_2PO_4 (0.0018 M);
- III. 10 mM HEPES buffer, supplemented with 100 mM NaCl (pH = 7.4; adjusted with NaOH);
- IV. 60 mM calcein solution in PBS or HEPES buffer (pH = 7.4; adjusted with NaOH);
- V. 10 mM CaCl_2 or MgCl_2 solutions in water;
- VI. 7.9 mM Thioflavin T solution in water;
- VII. 10 % Triton X-100 solution in water;
- VIII. Solutions for SAM preparation: HC-18 and βME (molar ratio 5.5:4.5) in ethanol (thiol concentration: 0.1 mM); WC-14 and βME (molar ratio 3:7) in ethanol (thiol concentration: 0.1 mM).

All aqueous solutions were prepared using deionized water (Milli-Q Plus system, resistivity $18.2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$).

Preparation of Artificial Lipid Membranes

Preparation of **multilamellar liposomes** (MLV) consists of several main steps: *I.* Lipids are mixed in the required proportions; *II.* The solvent is evaporated under a stream of N₂ for 40 min until a uniform lipid film forms; *III.* The resulting lipid film is hydrated with a salt solution and thoroughly resuspended. Note: For ThT experiments, the lipids were resuspended in PBS or HEPES buffer. Additional steps are required to form **large unilamellar liposomes** (LUV): *IV.* The prepared MLV suspension is sonicated for 1 h in an ultrasonic bath; *V.* A mini-extruder is assembled, containing two 100 μ m thick polyester filters and a polycarbonate membrane with 100 nm pores; *VI.* The liposome suspension is passed through the extruder 21 times.

For the preparation of calcein-loaded LUV, the lipid film obtained after solvent evaporation under a N₂ stream was hydrated with a concentrated calcein dye solution (60 mM) prepared in 10 mM HEPES buffer or PBS buffer. Free calcein was separated from the encapsulated liposomes by size-exclusion chromatography, passing the suspension through a chromatography column (*Lenz Laborglas GmbH & Co. KG*) packed with Sephadex G-50 resin. Elution was performed with HEPES or PBS buffer.

Supported lipid bilayers (SLB) were formed on a hydrophilic mica substrate (Class IV, *SPI Supplies*) using the LUV fusion method. For the preparation of SLB intended for conventional atomic force microscopy measurements, a 2 mL cell was used, with the mica substrate attached to the bottom using double-sided adhesive tape. The cell was filled with a 1 mM LUV suspension in a salt solution. The substrate with the liposome suspension was incubated for 1 h, after which excess lipids were rinsed off with PBS buffer.

For high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) measurements, the mica substrate was affixed to a 1.5 mm-diameter glass support using nail polish. A 2 μ L drop of 1 mM LUV suspension was applied onto the clean mica surface and incubated in a humid chamber for 10 – 20 min. After incubation, the excess lipids were carefully rinsed off with HEPES buffer.

Preparation procedure of tethered bilayer lipid membranes (tBLM): Substrates for electrochemical impedance spectroscopy measurements were prepared on glass slides using a PVD75 magnetron sputtering system (*Kurt J. Lesker Co.*). The substrates consisted of a 10 nm thick chromium underlayer and a 100 nm thick gold overlayer. To form self-assembled monolayers (SAM), the sputtered slides were immersed in a 0.1 mM thiol solution composed of the tethering molecule WC-14 and the

spacer β ME mixed in a 3:7 molar ratio in ethanol. After 12 h of incubation, the samples were rinsed with ethanol and dried under a nitrogen stream. The gold surfaces with the formed SAM were then placed into an electrochemical cell. Tethered bilayer lipid membranes were subsequently formed using the MLV fusion method [201].

For conventional atomic force microscopy measurements, freshly sputtered mica substrates were immersed in a 0.1 mM thiol solution in ethanol, composed of HC-18 and β ME at a molar ratio of 5.5:4.5. The SAM-functionalized mica surfaces were attached to the bottom of the measurement cell as described previously. The cell was filled with a 1 mM MLV suspension in salt solution and incubated for 1 h. After incubation, excess liposomes were rinsed off with 50 mL of PBS buffer.

Structural Studies of Proteins

All **far-UV circular dichroism** (CD) spectroscopy measurements were performed using a J-815 spectrometer (*Jasco*) purged with N_2 and operated at room temperature (22 °C). To investigate the effects of divalent cations on protein conformation, 20 μ M solutions of freshly purified S100A8 were prepared in 10 mM HEPES buffer, supplemented with either 2 mM $CaCl_2$ or $MgCl_2$, or without either cation. Samples were analyzed immediately after preparation or following a 4-h incubation at room temperature. Measurements were taken in a quartz cuvette with a 0.1 cm path length. CD spectra were collected from 190 to 260 nm at 0.5 nm intervals, using a 1 nm bandwidth and a scanning speed of 50 nm/min. Each spectrum was averaged from three scans with buffer background subtraction. Spectral processing and visualization were performed using Spectragryph v1.2.16.1 software [213].

Tryptophan (Trp) fluorescence spectroscopy was carried out on a CARY Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (*Varian Inc.*) using a quartz cuvette with a 0.3 cm path length at room temperature (22 °C). To reduce interference from S100A8 tyrosine fluorescence, the excitation wavelength was set to 290 nm. Emission spectra were recorded between 300 and 400 nm with a 5 nm slit width and a dwell time of 0.5 s.

Protein Aggregation Kinetics

Thioflavin T (ThT) used in the experiments was dissolved in deionized water, and the resulting solution was filtered through a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane with a pore size of 0.22 μ m. The

absorbance of the resulting solution was measured using a UV-1800 spectrophotometer (*Shimadzu*) at a wavelength of 412 nm, and the concentration was calculated according to the Beer-Lambert law (1):

$$A = \epsilon cl \quad (1)$$

where A is the absorbance, ϵ is the molar extinction coefficient (ThT – 31,600 M⁻¹ cm⁻¹), c is the molar concentration, and l is the optical path length.

The kinetics of ThT fluorescence intensity increase were recorded at 37 °C using a ClarioStar Plus fluorescence spectrophotometer (*BMG Labtech*). Before measurement, samples were dispensed into a 96-well microplate (*Corning Inc.*). Protein concentration in the wells ranged from 50 to 100 µM, ThT concentration ranged from 100 to 200 µM (protein to ThT ratio 1:2), and the final sample volume was 100 µL. During experiments on liposome-induced aggregation of S100 proteins, the lipid concentration in the samples was maintained at 500 µM. ThT fluorescence intensity was recorded every 5 min using 440 nm excitation and 490 nm emission filters, with a spectral bandwidth of 10 nm. Between measurements, samples were continuously shaken at 400 rpm.

Calcein Leakage Assay

LUV separated from free calcein by chromatography were dispensed in 50 µL aliquots into a 96-well microplate. The plate was placed into a microplate reader (ClarioStar Plus), and baseline fluorescence was recorded for 20 min. After stopping the measurement, pre-prepared protein solutions were added to the wells. The final lipid concentration in each well was 100 µM (BTLE – 120 µg/mL), and the protein concentration was 5 or 10 µM (protein-to-lipid ratios of 1:20 or 1:10), with a total volume of 100 µL. Fluorescence intensity was recorded every 10 min using 490 nm excitation and 540 nm emission filters, with a spectral bandwidth of 8 nm. Samples were continuously shaken at 400 rpm between measurements. All measurements were performed at room temperature (22 °C) or 37 °C. At the end of each measurement, maximal fluorescence intensity was determined following liposome disruption with Triton X-100 (final detergent concentration: 1 % v/v). Calcein release from liposomes was calculated according to formula (2):

$$\% \text{ Dye Release} = \frac{(I - I_0)}{(I_{\max} - I_0)} \times 100 \quad (2)$$

where I_0 is the initial fluorescence intensity before protein addition, I is the fluorescence intensity at the given time point, and $I_{\max}$ is the fluorescence intensity after LUV disruption with Triton X-100.

Since liposomes are metastable structures, to accurately assess the protein effect, fluorescence intensity values averaged from control samples were subtracted from the data over time.

Electrochemical Impedance Spectroscopy

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements were conducted using the PalmSens4 electrochemical workstation, accompanied by PSTrace 5.9 software (*PalmSens BV*). The frequency range spanned from 0.1 Hz to 100 kHz, with 10 logarithmically distributed measurement points per decade and a perturbation amplitude of 10 mV. All measurements were performed at room temperature (22 °C) in HEPES buffer, containing 100 mM NaCl. A Au-coated glass slide served as the working electrode, and a silver wire with a diameter of 1.5 mm, purchased from *Sigma-Aldrich*, was used as the reference electrode. The admittance of the tBLMs was calculated from the electrochemical impedance spectra using the relation $Y_{\min} = 1/Z_{f_{\min}}$, where $Z_{f_{\min}}$ represents the impedance modulus measured at $f_{\min}$.

Conventional Atomic Force Microscopy

I. Characterization of protein morphology in air. The sample was deposited onto a mica surface, incubated for 2 – 3 min, rinsed with deionized water, and dried under a nitrogen stream. Rectangular TESP-V2 and FESP-V2 probes (*Bruker*) were used for measurements in air. Measurements were performed at room temperature in tapping mode. The scan area was either $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ or $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, with a scan rate of 0.6 – 0.8 Hz and a resolution of 512×512 pixels.

II. Studies of protein interactions with lipid membranes were conducted in a 2 mL cell filled with PBS buffer. Triangular SNL-C probes (*Bruker*) were used for measurements in liquid. Tapping mode or PeakForce QNM mode was selected for acquiring topographical images. The scan area was either $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ or $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, with a scan rate of 0.3 – 0.5 Hz and a resolution of 512×512 pixels. The images obtained were processed using WSxM 4.0 Beta 9.3 [240] software. Height distribution analysis was performed using NanoScope Analysis v1.4 (*Bruker*) software.

High-Speed Atomic Force Microscopy

High-speed atomic force microscopy (HS-AFM) images were captured using an SS-NEX microscope (*RIBM*) operating in tapping mode. Measurements were performed with rectangular Si₃N₄ probes (BL-AC10DS-A2, Olympus), featuring a tip radius of 24 nm, a spring constant of 0.1 N/m, and a resonance frequency in liquid of approximately 0.5 MHz. S100A8 or S100A8/A9 were introduced into the fluid cell filled with HEPES buffer during imaging, to reach a final protein concentration of 10 µM. All measurements were conducted at room temperature (22 °C). The scanning speed was set at one frame per 5 s with a resolution of 200 × 200 pixels. Data analysis was performed using NanoLocz 1.20 software [241].

Dynamic Light Scattering

Dynamic light scattering (DLS) measurements were conducted using a Malvern Zetasizer µV (*Malvern Panalytical*) equipped with an 830 nm laser source. Experiments were performed in 2.5 mL polystyrene cuvettes, with a protein concentration of 100 µM in a total volume of 1 mL. Measurements were carried out at 22 °C by detecting scattered light at a 90° angle. Data were analyzed using Zetasizer software (version 6.30, *Malvern Panalytical*).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 8.4.3 for Windows (*GraphPad Software*). A significance level (α) of 0.05 was applied throughout the study. Data normality was assessed using the Shapiro–Wilk test. For comparisons between groups with normally distributed data, either a t-test or ANOVA followed by Bonferroni post hoc test was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological Analysis of S100 Proteins

Since the majority of results in this study were obtained using atomic force microscopy, an initial objective was to characterize the physical properties of the S100A8 and S100A9 proteins, as well as their complex S100A8/A9. To estimate the theoretical sizes of these S100 family proteins,

we used the HullRad online server [245]. Given the well-documented propensity of S100 proteins to form dimers [71], three-dimensional apo-state dimeric structures predicted by the AlphaFold 3 server [244] were selected for computational analysis. Based on this analysis, the theoretical hydrodynamic diameters of the S100A8 and S100A9 homodimers, and the S100A8/A9 heterodimer, were determined to be 4.7 nm, 5.3 nm, and 5.1 nm, respectively. To assess whether the proteins employed in our experiments predominantly exist in a dimeric state, we further analyzed the size of S100A8, S100A9, and the S100A8/A9 complex using dynamic light scattering. DLS measurements showed that the average hydrodynamic diameter of S100A8 was 4.6 ± 0.3 nm, while S100A9 and the S100A8/A9 complex exhibited larger values of 4.9 ± 1.1 nm and 5.1 ± 0.2 nm, respectively. Collectively, these findings confirm that the protein solutions employed in this study predominantly comprise low-molecular-weight species, primarily adopting a dimeric state.

Since DLS provides an average size of all particles present in solution, we employed AFM to gain more detailed insights into the morphology of individual proteins. Using AFM, we visualized fractions of freshly purified proteins and observed that they predominantly formed globular structures of varying sizes. The Gaussian mean height values for S100A8, S100A9, and the S100A8/A9 complex were 0.6 ± 0.2 nm, 0.9 ± 0.2 nm, and 1.5 ± 0.3 nm, respectively. Notably, these values were up to eight times smaller than those obtained via DLS. It is important to note that our measurement approach has certain limitations, and the observed height values may not accurately reflect the native dimensions of the protein complexes. During nitrogen stream drying, proteins typically lose their hydration shell [246]. Additionally, adsorption onto the mica surface may lead to partial protein denaturation [247], both of which can contribute to the reduced apparent size observed in AFM measurements.

Divalent Cations-Induced Structural Changes

To assess the impact of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the secondary structure of the S100A8 protein, circular dichroism spectroscopy and tryptophan fluorescence intensity measurements were performed. The results indicate that freshly purified S100A8 adopts an α -helical conformation, as demonstrated by characteristic absorption minima observed in the CD spectrum at 209 and 220 nm (**Fig. 1A**). Additionally, the protein remained structurally stable during a 4-hour incubation at room temperature, with no significant changes observed in its CD profile throughout this period. Binding

of Ca^{2+} resulted in slight changes in the spectrum, with the absorption minima shifting to 208 and 218 nm, respectively (**Fig. 1B**). Additionally, the molar CD values ($\Delta\epsilon$) at 208 and 218 nm increased, as demonstrated by a change in the $\Delta\epsilon_{218\text{nm}}$ value from $-4.2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 0 h to $-4.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ after 4 h. The observed increase suggests a reorientation of α -helices [248], a structural transition potentially related to the protein's physiological functions, including recognition of molecular targets [249,250]. A similar, though slightly less pronounced, effect was observed upon protein incubation with Mg^{2+} . Over the 4-hour period, the $\Delta\epsilon_{220\text{nm}}$ increased from -4.3 to $-4.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (**Fig. 1C**).

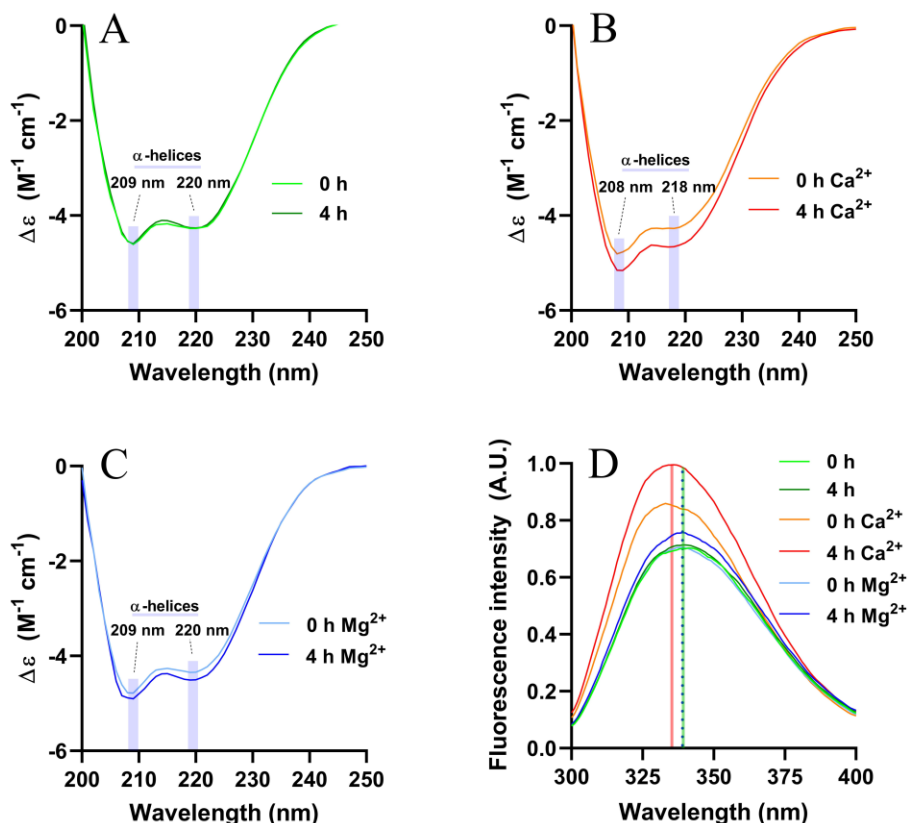


Fig. 1. Conformational changes of S100A8 induced by divalent cations. CD spectra of S100A8 following 4 h of incubation without additional cations (A), with 2 mM Ca^{2+} (B), and with 2 mM Mg^{2+} (C). Wavelengths corresponding to α -helical signals are highlighted in shaded blue. (D) Intrinsic tryptophan fluorescence emission spectra of S100A8. All experiments were conducted in HEPES buffer with a protein concentration of 20 μM .

The results were confirmed by intrinsic Trp fluorescence data, which showed a significant increase of up to 29 % in intensity when the protein was incubated with Ca^{2+} (**Fig. 1D**). This increase in fluorescence intensity was

accompanied by a blue shift in the emission maximum from 339 to 335 nm, suggesting conformational changes in the protein structure as the Trp₅₄ residue becomes more buried within a hydrophobic core. In contrast, the addition of Mg²⁺ ions to the medium did not cause a significant shift in the Trp emission maximum. Considering the structural similarity within the S100 protein family [68], it can be assumed that similar changes may occur in the secondary structure of the S100A9 protein upon exposure to the aforementioned divalent cations.

Aggregation Propensity

To assess the aggregation propensity of the S100 family of proteins, we employed a Thioflavin T (ThT) fluorescence assay. The aggregation curves shown in **Fig. 2A-B** indicate that both S100A9 and S100A8 display amyloid-like behavior, as demonstrated by a marked increase in ThT fluorescence intensity over time. Amyloid protein aggregation typically follows sigmoidal kinetics, characterized by three main phases: nucleation (lag), exponential growth (elongation), and saturation (plateau) [257]. However, in this case, aggregation exhibited hyperbolic kinetics, with no observable lag phase. The absence of a lag phase may be attributed either to the rapid formation of aggregation nuclei or to aggregation proceeding via a nucleation-independent pathway. In contrast, the S100A8/A9 heterocomplex showed no significant change in ThT fluorescence (**Fig. 2C**). These results suggest that the heterocomplex is structurally more stable over time compared to the individual S100A8 or S100A9 proteins.

Since S100A8 and S100A9 are calcium-binding proteins, the subsequent step was to evaluate the effect of this cation on their aggregation behavior. The results demonstrated that the addition of calcium ions significantly inhibited the aggregation of both S100A8 and S100A9, as evidenced by a marked decrease in ThT fluorescence intensity (**Fig. 2D**). Our findings suggest that upon Ca²⁺ binding, aromatic amino acid residues become buried within the hydrophobic core of the S100 proteins, limiting their accessibility and thereby preventing aggregate formation.

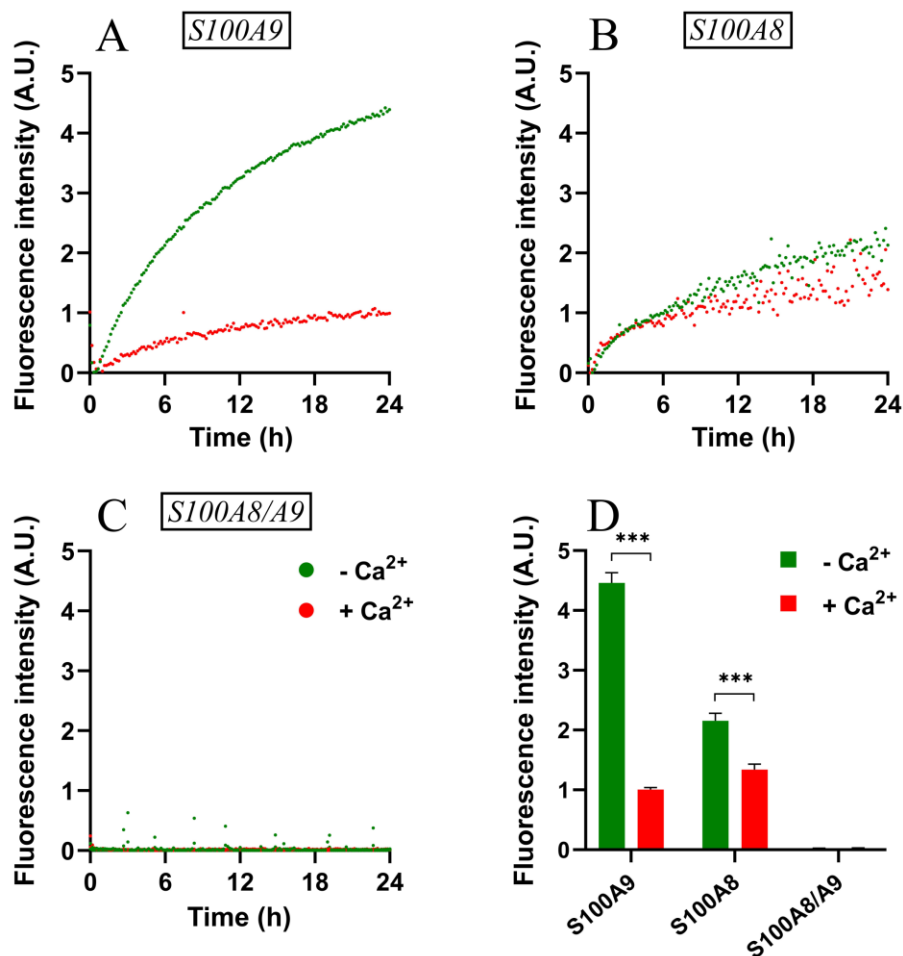


Fig. 2. Aggregation kinetics of S100 proteins. The aggregation kinetics of S100A9 (A), S100A8 (B), and the S100A8/A9 (C) were assessed by monitoring Thioflavin T fluorescence intensity. Measurements were performed in the absence (green curve) or presence (red curve) of Ca^{2+} ions (1 mM). (D) Fluorescence intensity values after 24 h incubation. Samples were incubated in HEPES buffer at 37 °C for 24 h, with periodic mixing at 400 rpm between measurements. Protein concentrations were 100 μM for S100A9 and 50 μM for both S100A8 and the S100A8/A9 heterocomplex. Statistical significance is denoted by *** ($p \leq 0.001$).

To examine the morphology of structures formed during protein aggregation, samples were incubated for 24 h at 37 °C, then adsorbed onto mica surfaces and visualized using AFM. Analysis revealed that S100A9 assembled into fibrillar networks during aggregation (**Fig. 3**). Upon the addition of Ca^{2+} ions, both the number and height of fibrils were noticeably reduced compared to samples aggregated in the absence of calcium. In contrast, S100A8 did not form fibrillar structures; after 24 h, only oligomeric aggregates and irregularly shaped structures were observed. Interestingly, the

addition of Ca^{2+} had no significant effect on either the morphology or the average height of these aggregates. For the S100A8/A9 heterocomplex, small spherical oligomeric structures (up to 3.5 nm in height) were observed regardless of the presence of Ca^{2+} . This finding further supports the structural stability of the heterocomplex over time.

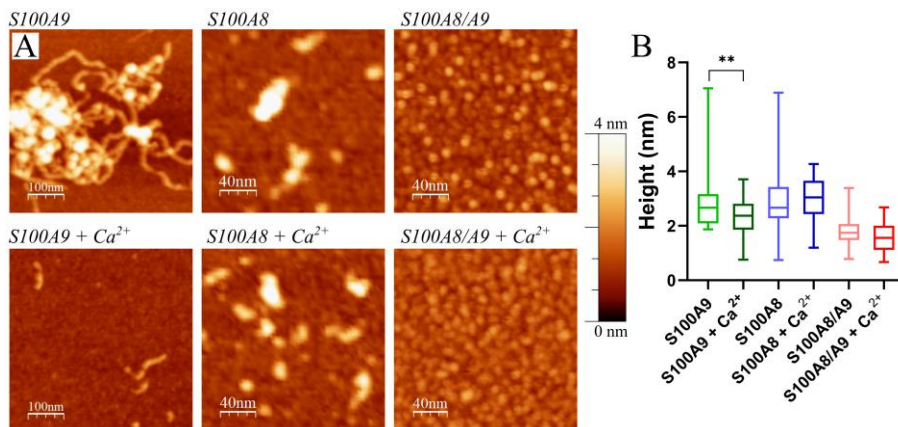


Fig. 3. Morphological characterization of S100 protein aggregates. (A) Atomic force microscopy images of fibrillar structures formed by S100A9, alongside oligomeric assemblies formed by S100A8 and the S100A8/A9 heterocomplex. The field of view is $0.2 \times 0.2 \mu\text{m}^2$ for S100A8 and the heterocomplex, and $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}^2$ for S100A9. (B) Height distribution of assemblies ($n > 100$). Statistical significance is denoted by ** ($p \leq 0.01$).

Effect of Lipids on Protein Aggregation

In the previous sections, we discussed the aggregation propensity of individual S100 proteins. However, the influence of lipids on S100 protein aggregation remains unaddressed. To investigate how lipid environments affect the aggregation of S100A8, S100A9, and the S100A8/A9 heterocomplex, we examined several lipid bilayer compositions with distinct biophysical properties. The membrane compositions tested included: *I.* natural porcine brain total lipid extract (BTLE); *II.* neutral (zwitterionic) membranes composed of DOPC/CHOL; *III.* anionic membranes consisting of DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (DOPS 30 %) or DOPC/DOPS; and *IV.* membranes containing phase-separated domains representative of either the liquid-ordered (L_o) phase (DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1) or the gel-like (L_β) phase (DOPC/DPPC). The following section describes how each lipid environment modulates S100 protein aggregation.

I. Aggregation of S100 proteins in a BTLE membrane environment.

Assessment of S100A9 aggregation in the presence of BTLE liposomes

showed no significant differences relative to the control during the initial hours of incubation (**Fig. 4A**). However, after 72 h, ThT fluorescence intensity in liposome-containing samples was significantly elevated relative to the control, indicating that this lipid composition facilitates S100A9 aggregate formation in solution. Among all lipid compositions tested, BTLE membranes exhibited the highest degree of order and rigidity. These structural properties may have hindered the insertion of S100A9 into the hydrophobic core of the lipid bilayer, resulting in an increased local concentration of S100A9 on the liposome surface. Such conditions could facilitate the formation of aggregation nuclei and potentially promote a neurotoxic fibrillization process [271]. A similar effect was observed for the S100A8/A9 heterocomplex, whose aggregation was also promoted by BTLE liposomes (**Fig. 4C**). In contrast, BTLE membranes markedly inhibited the aggregation of S100A8 (**Fig. 4B**).

II. Aggregation of S100 proteins in a zwitterionic membrane environment (DOPC/CHOL). This membrane composition did not exert a statistically significant effect on the aggregation behavior of S100A9 and S100A8/A9 proteins. However, S100A8 aggregation was significantly inhibited.

III. Aggregation of S100 proteins in an anionic membrane environment. Anionic membranes enriched with DOPS inhibited the fibril formation of S100A9. Conversely, negatively charged liposomes promoted the aggregation of S100A8 and the S100A8/A9 complex. Notably, the aggregation-promoting effect observed for the S100A8/A9 complex was limited to the initial 24 h. Although the S100A9 aggregation experiments demonstrated the opposite effect, it is important to note that the lipid compositions used in the two studies differed. The S100A9 aggregation assay utilized liposomes composed solely of DOPC and DOPS, whereas the S100A8 and S100A8/A9 experiments employed liposomes containing a significant cholesterol content (20 %). The presence of cholesterol increased the rigidity of the anionic membrane, which may have hindered the insertion of S100A8 and S100A8/A9 into the hydrophobic core of the lipid bilayer.

IV. Aggregation of S100 proteins in a two-phase membrane environment. Notable differences in S100 protein aggregation were observed using a five-component DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 membrane. This bilayer composition had no significant effect on S100A9 fibrillogenesis. In contrast, S100A8 aggregation was substantially suppressed. For the S100A8/A9 heterocomplex, liposomes of this composition promoted aggregation during the first 24 h of incubation, whereas no significant effects were detected at later time points. A DOPC/DPPC membrane, enriched with

L β phase domains, caused a statistically significant inhibition of S100A9 fibril formation. It is important to note that the impact of this lipid composition on the aggregation behavior of other S100 family members was not evaluated.

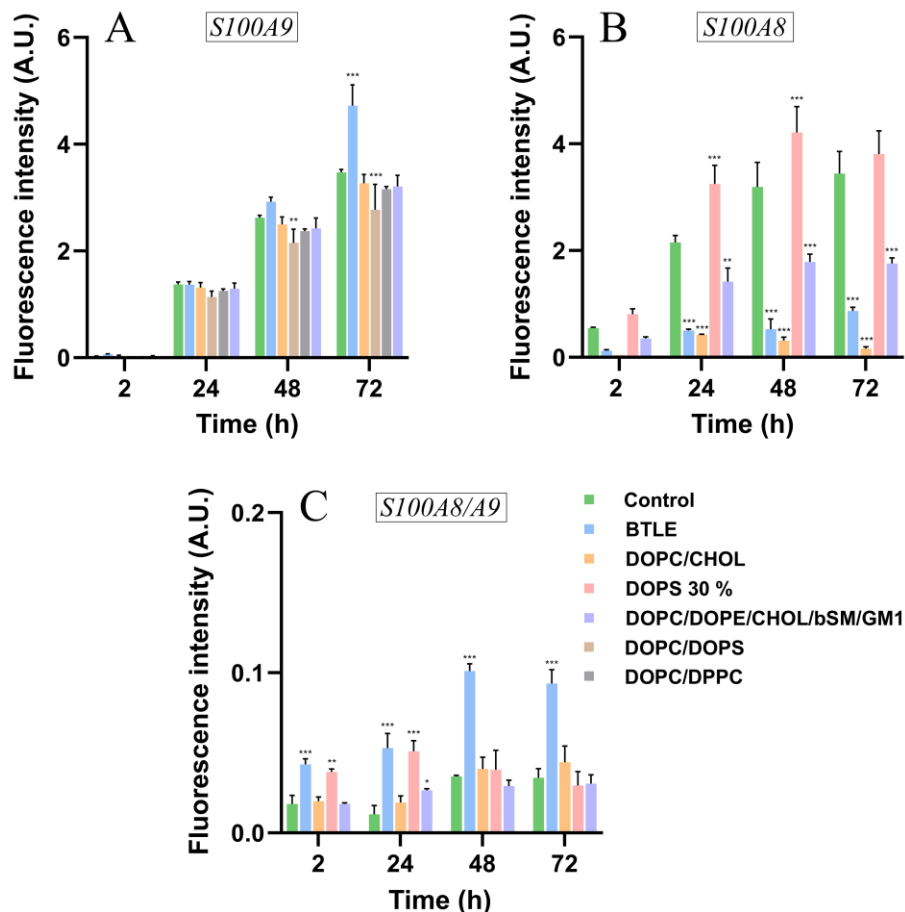


Fig. 4. Effect of lipids on S100 proteins aggregation. Aggregation kinetics of S100A9 (A), S100A8 (B), and S100A8/A9 (C) in the absence of liposomes (control) or in the presence of liposomes with different compositions. Aggregation assays were performed in HEPES buffer (PBS for S100A9) at 37 °C. Protein concentration was 50 μ M, and lipid concentration was 500 μ M. Statistical significance is indicated as: * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$).

In summary, our study demonstrated that the aggregation of S100 proteins is significantly modulated by the properties of the lipid membrane. Variations in membrane physical and structural characteristics, such as bilayer rigidity and surface charge, can affect protein adsorption onto the membrane surface as well as their insertion into the lipid bilayer. Notably, despite the previously established structural stability of the S100A8/A9 heterocomplex, both BTLE and anionic liposomes promoted its aggregation. However, due to

the very low ThT fluorescence intensity observed, additional studies are required to assess the biological significance of these findings.

Determination of Lipid Binding Potential

To identify potential interactions with lipid membranes encoded within the amino acid sequences, the S100A8 and S100A9 protein sequences were analyzed using the Heliquest server [242]. Using Eisenberg's method, protein segments were categorized according to their hydrophobicity, identifying them as hydrophilic, membrane-surface interacting, or transmembrane regions [243]. The Eisenberg plot of S100A8 indicated that the majority of its segments are hydrophilic and face the aqueous environment. However, the region spanning amino acids 64–83, with a hydrophobicity value above 0.75, may serve as a potential transmembrane domain. In contrast, the amino acid region 1–20, characterized by a high hydrophobic moment and moderate hydrophobicity, likely functions as a membrane-surface interacting segment. To further evaluate the potential of α -helices to interact with lipid bilayers, an analysis based on the discrimination factor (D) was conducted (**Table 1**). Of the four known α -helices in S100A8, only helix IV exhibited a D value greater than 0.68, suggesting its ability to interact with membranes or membrane-mimicking surfaces.

Table 1. Calculated discrimination factor (D), average hydrophobicity ($\langle H \rangle$), hydrophobic moment ($\langle \mu H \rangle$), and net charge (z) of the α -helical regions in S100A8 and S100A9 proteins.

	Sequence	$\langle H \rangle$	$\langle \mu H \rangle$	z	D
S100A8	4ELEKALNSIIDVYHKYS ₂₀	0.345	0.597	-1	0.234 (NO)
	31RDDLKKLLETE ₄₁	-0.041	0.489	-1	0.132 (NO)
	51ADVWFKELD ₅₉	0.456	0.612	-2	-0.082 (NO)
	68FQEFLLIVIKMGVAAHKK ₈₆	0.586	0.296	2	0.939 (YES)
S100A9	6SQLERNIETIINTFHQYSV ₂₄	0.406	0.455	-1	0.099 (NO)
	34QGEFKELVRKD ₄₄	-0.050	0.448	0	0.423 (NO)
	49LKKENKNEKVIEHIMEDLD ₆₇	0.017	0.404	-2	-0.279 (NO)
	76FEEFIMLMARLTWASHEKM ₉₄	0.619	0.339	-1	-0.010 (NO)

Examination of the S100A9 amino acid sequence revealed a segment (AA4–23) with the potential to interact with membrane surfaces. Additionally, the Eisenberg plot identified a possible transmembrane segment spanning AA74–91. This region corresponds to helix IV and contains the C-terminal calcium-binding EF-hand motif. However, based on discrimination factor analysis, this helix appears to exhibit a low propensity for association with lipid bilayers.

Overall, bioinformatic analysis indicated that both S100A8 and S100A9 proteins possess amino acid segments with the potential to interact with lipid membrane surfaces. However, only the S100A8 protein structure featured an α -helical segment whose ability to penetrate the hydrophobic core of the lipid membrane was supported by both applied bioinformatic methods. In contrast, the results for S100A9 were inconsistent: although the Eisenberg plot identified a potential transmembrane segment located within helix IV, this was not confirmed by the discrimination factor analysis.

Interactions with Porcine Brain Total Lipid Extract Membrane

In the following sections of this study, various plasma membrane models and experimental approaches were employed to investigate whether protein–lipid interactions affect membrane integrity and structural properties. To more accurately replicate the structural and biophysical characteristics of neuronal membranes, the initial experiments utilized a system based on a natural porcine brain lipid extract. This lipid mixture closely mirrors the physiological balance of neutral and anionic phospholipids found in neuronal membranes, although its exact composition remains only partially defined. According to the supplier's specifications, BTLE contains approximately 9.6 % phosphatidylcholine, 16.7 % phosphatidylethanolamine, and 10.6 % phosphatidylserine, with the remaining 58.7 % consisting of unidentified components.

A widely used approach for evaluating a protein's capacity to disrupt lipid membranes involves monitoring the release of a fluorescent dye, such as calcein, from liposomes. Treatment of BTLE-derived liposomes with S100A9 did not induce significant membrane perturbation, as evidenced by minimal calcein release (2.0 ± 0.9 %) after 4 h (**Fig. 5A**). In contrast, exposure to S100A8 caused substantial disruption of liposomes of the same composition. This protein-induced membrane perturbation was time-dependent: 24.6 ± 3.8 % of calcein was released within the first 30 min, increasing to 42.1 ± 2.0 % after 4 h.

It is important to note that calcein release can only be detected when membrane defects exceed approximately 1.3 nm in size [285]. However, ion transport across lipid bilayers can occur through much smaller disruptions – for example, the hydrodynamic radius of a sodium ion is only 0.19 nm [287]. Consequently, this method may fail to detect smaller, localized defects, and the potentially toxic effects of the protein may remain unrecognized. To address this limitation, the dielectric properties of tethered bilayer lipid membranes were analyzed using electrochemical impedance spectroscopy, a technique sensitive enough to detect the movement of individual ions across the membrane. The insulating capacity of the membrane was evaluated by identifying the minimum point of the negative impedance phase ($f_{\min}$) in Bode plots, which depict the phase angle as a function of frequency (Fig. 5B).

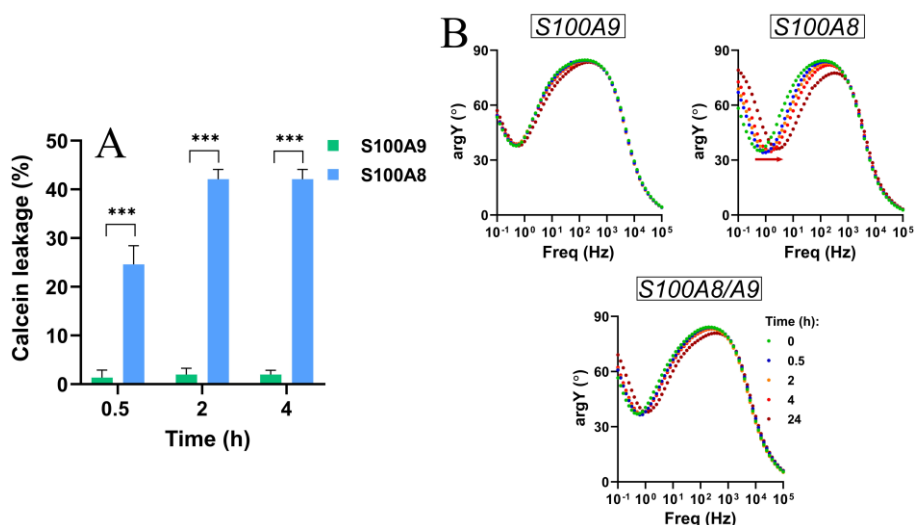


Fig. 5. Effect of S100 proteins on the integrity of porcine brain total lipid extract membranes. Membrane disruption was evaluated by calcein release from liposomes (A) and by monitoring alterations in bilayer dielectric properties (B). Calcein release assays for S100A9 were conducted in PBS at 22 °C with a protein concentration of 5 μ M, whereas assays for S100A8 were performed in HEPES at 37 °C with a protein concentration of 10 μ M. All EIS measurements were carried out at 22 °C in HEPES buffer with a protein concentration of 10 μ M. Statistical significance is indicated by *** ($p \leq 0.001$).

It was found that, in the case of the S100A9 protein, the EIS results correlated with the calcein release data, as no membrane damage was detected by either method. Similarly, no changes in the dielectric properties of BTLE membranes were observed after treatment with the protein heterocomplex. Interestingly, although the calcein leakage assay revealed significant liposome disruption caused by S100A8, only minimal changes in membrane dielectric properties were observed; over a 24-hour incubation, the shift in $f_{\min}$ did not

exceed 2 Hz. The discrepancies between the results obtained using these two measurement techniques likely arise from variations in experimental conditions and structural differences between the model systems. Specifically, EIS measurements were performed at room temperature (22 °C), while calcein release experiments were conducted at 37 °C, a temperature that may increase membrane fluidity. Additionally, unlike planar bilayers, liposomes have curvature that results in more lipid packing defects [289], which can facilitate protein incorporation into the membrane.

To elucidate the molecular mechanisms underlying S100A9–lipid interactions, AFM was employed, enabling localized, high-resolution imaging of membrane surface. AFM analysis revealed that the pristine membrane had a homogeneous surface morphology, with a bilayer thickness of 5.3 nm, consistent with prior reports on the thickness of BTLE membranes [291]. Upon exposure of BTLE membranes to the S100A9, spontaneous defect formation was observed (**Fig. 6**). After 30 min of incubation, initial defects appeared, characterized by narrow widths (< 100 nm) and depths of 1.3 ± 0.2 nm. After 2 h, a second population of wider defects emerged, exhibiting increased depths of 2.2 ± 0.3 nm. Because the depths of both defect types were less than the thickness of a lipid bilayer or even a single monolayer, this suggests that the protein does not disrupt the membrane via pore formation or detergent-like mechanisms. Based on the morphological observations, we propose that S100A9 incorporates into the hydrophilic region of the bilayer, inducing lateral expansion of lipid molecules. This expansion may lead to membrane thinning through two possible mechanisms: *I.* conformational changes in lipid hydrocarbon chains from the *trans* to the *gauche* form; and *II.* interdigitation, where hydrocarbon chains from opposing monolayers overlap [291]. Importantly, BTLE contains a relatively high proportion of phosphatidylethanolamine (PE), a conical-shaped lipid that can destabilize membrane structure and generate local mechanical stress. In PE-enriched regions, where lipid headgroup packing is less compact, small structural defects can arise [292]. These defects likely facilitate the insertion of S100A9 into the bilayer, thereby initiating the observed structural changes in the membrane.

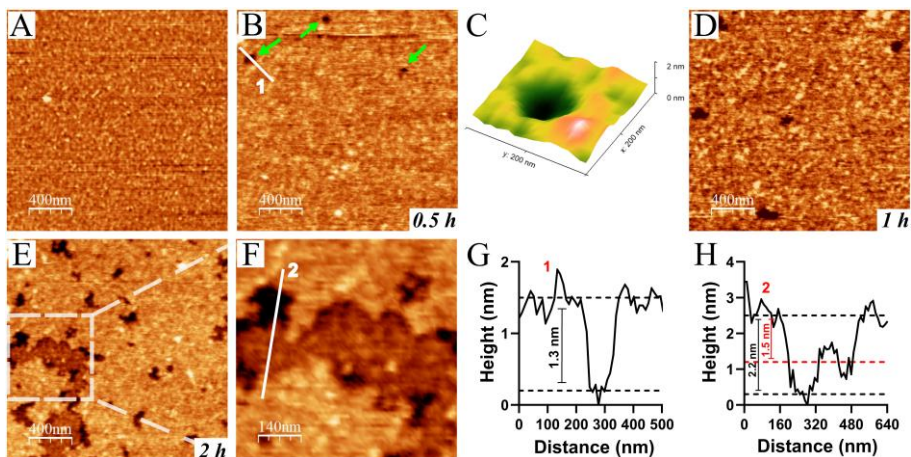


Fig. 6. Visualization of S100A9 interactions with the porcine brain total lipid extract membrane. Topographical analysis of the membrane was performed before protein exposure (A) and at 0.5 h (B, C), 1 h (D), and 2 h (E, F) after treatment with S100A9. The scanned area measures $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ($0.2 \times 0.2 \mu\text{m}^2$ for panel C and $0.7 \times 0.7 \mu\text{m}^2$ for panel F). (G, H) Surface topography cross-sections corresponding to the regions highlighted in panels B and F, respectively. All measurements were performed in PBS buffer at 22 °C using an S100A9 concentration of 5 μM .

Notably, the observed morphological changes were accompanied by a decrease in membrane stiffness, from $11.5 \pm 4.5 \text{ MPa}$ prior to exposure to $7.8 \pm 3.0 \text{ MPa}$ after 30 minutes of treatment with S100A9. Consistently, the literature reports a decrease in stiffness values upon exposure of lipid bilayers to A β and other amyloidogenic proteins [327]. These changes in membrane stiffness are attributed to reduced lipid packing efficiency caused by protein insertion into the bilayer [328]. Thus, these findings support our previously proposed hypothesis that the morphological changes induced by S100A9 in the lipid bilayer are at least partially driven by protein insertion into the membrane.

To evaluate the morphological changes in the membrane induced by the S100A8 protein, high-speed atomic force microscopy was employed. Upon exposure to S100A8, protein accumulation was observed around the lipid bilayer, specifically in areas corresponding to the negatively charged mica surface. Notably, no interactions between the protein and the membrane were detected throughout the ~13-minute measurement period. In this case, the affinity between S100A8 and the planar BTLE bilayer was insufficient to induce membrane disruption.

Interactions with Zwitterionic Membrane

In the previous part of this study, we demonstrated that S100 family proteins interact with membranes derived from porcine brain total lipid extract. To identify the specific lipid components responsible for these interactions, subsequent investigations utilized simplified model membrane systems with well-defined lipid compositions. Among these, zwitterionic bilayers composed of DOPC and cholesterol were employed. Given that cholesterol and phosphatidylcholine together account for approximately 70 % of the lipid mass in mammalian plasma membranes [132], DOPC/CHOL bilayers are widely used models for replicating the biophysical properties of eukaryotic plasma membranes.

Analysis of the interactions between S100 family proteins and zwitterionic lipid bilayers revealed that S100A9 does not compromise the integrity of membranes of this composition. This conclusion was supported by AFM imaging, which revealed no morphological alterations of the membrane surface over a 24-hour period. Similarly, treatment with the S100A8/A9 heterodimer did not induce significant membrane disruption. In contrast, S100A8 caused damage to the zwitterionic membrane via a detergent-like mechanism, as revealed by HS-AFM studies. Notably, EIS measurements showed no statistically significant alterations in the bilayer's dielectric properties, even 24 h after exposure to S100A8. This discrepancy may be attributed to structural differences between the model systems used in the two methods. The membranes used in EIS experiments are highly insulating and characterized by a low defect density, whereas the lipid bilayers analyzed by HS-AFM exhibit more exposed hydrophobic regions. These regions likely facilitate S100A8–lipid interactions, initiating the membrane disruptions observed in HS-AFM measurements.

Interactions with Anionic Membrane

Phosphatidylserine (PS) is the primary anionic phospholipid in mammalian plasma membrane and, under physiological conditions, is predominantly localized in the inner leaflet. However, under pathological conditions such as cancer or neurodegenerative diseases, PS translocates to the outer leaflet, where it serves as an “eat-me” signal for immune cells [301,302]. These changes in lipid composition can increase the affinity of amyloidogenic proteins for membranes, thereby promoting membrane damage and contributing to the progression of neurodegenerative disorders

[303]. To investigate the role of negatively charged phospholipids in S100 protein–membrane interactions, model bilayers enriched with DOPS were utilized. Specifically, calcein release assays for S100A9 were conducted using DOPC/DOPS (6/4) bilayers, whereas all other experiments described in this section employed DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2) membranes. Despite pronounced differences in membrane fluidity, the DOPS content varied by only 10 % among the compositions.

S100A8 exhibited the most pronounced disruptive effect on anionic membranes among the S100 family proteins studied. Over a 4-hour incubation period, calcein release from liposomes treated with S100A8 reached 78.2 ± 1.9 %, indicating substantial membrane disruption (**Fig. 7A**). These results were supported by EIS data: over the 4-hour period, the $f_{\min}$ value shifted by nearly two orders of magnitude toward higher frequencies, indicating impaired insulation properties of the lipid membrane and alterations in ion movement across it (**Fig. 7B**). The observed spectral changes were accompanied by a 100-fold increase in the admittance value at the $f_{\min}$ point ($Y_{f_{\min}}$) during the same incubation period (**Fig. 7C**). A similar outcome was observed upon exposure of anionic lipid bilayers to S100A8/A9. Although the membrane damage was less extensive than in the case of S100A8, within the initial 4 h, the $f_{\min}$ value shifted by 7 Hz, followed by a 15-fold increase in $Y_{f_{\min}}$. In contrast, the interaction of S100A9 with anionic membranes caused only minimal changes in the bilayer's dielectric properties over the corresponding 4-hour period. Notably, following 24 h of incubation with S100 proteins, the Bode spectra no longer displayed the characteristic phase minimum, indicative of membranes possessing strong insulating properties. This indicates that membrane damage had progressed to such an extent that EIS could no longer reliably assess the dielectric properties of the bilayers.

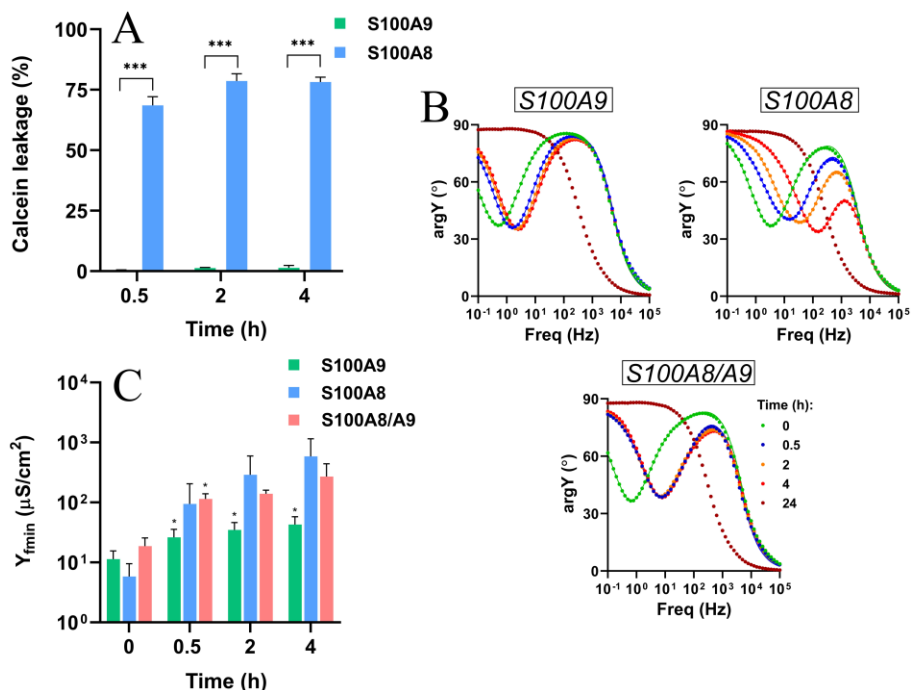


Fig. 7. Effect of S100 proteins on the integrity of anionic membranes. Membrane disruption was evaluated by calcein release from liposomes (A) and by monitoring alterations in bilayer dielectric properties (B, C). Calcein release assays for S100A9 employed DOPC/DOPS liposomes, whereas all other measurements utilized lipid bilayers composed of DOPC/DOPE/DOPS/CHOL. Statistical significance is indicated as: * ($p \leq 0.05$), *** ($p \leq 0.001$).

Given the extensive disruption of anionic lipid membranes induced by S100 family proteins, the subsequent step was to investigate the mechanisms underlying these interactions. Accordingly, the morphology of negatively charged lipid membranes was examined before and after protein exposure. When lipid bilayers were treated with S100A9, no detectable changes in surface morphology were observed during the initial 2 h of incubation. However, after 24 h, oligomeric structures up to 10 nm in height were detected on the membrane surface. According to the carpet model [8], it is plausible that the observed alterations in membrane permeability were at least partially driven by the formation of protein aggregates on the lipid bilayer surface.

A particularly pronounced membrane-disruptive effect was observed upon exposure of anionic lipid bilayers containing 30 % DOPS to S100A8. Membrane disruption occurred almost immediately following protein injection, with a lipid patch approximately 460 nm in diameter undergoing complete disintegration in under 3 min (**Fig. 8**). HS-AFM topography images revealed that membrane disruption began at the edges of the lipid bilayer,

suggesting that local irregularities in lipid packing may serve as nucleation sites for protein-induced damage. This mode of disruption, in which lipid molecules are extracted from the membrane, is characteristic of a detergent-like mechanism. This assumption is supported by literature reports demonstrating analogous processes when lipid bilayers are exposed to the nonionic detergent Triton X-100 at concentrations exceeding its critical micelle concentration [296].

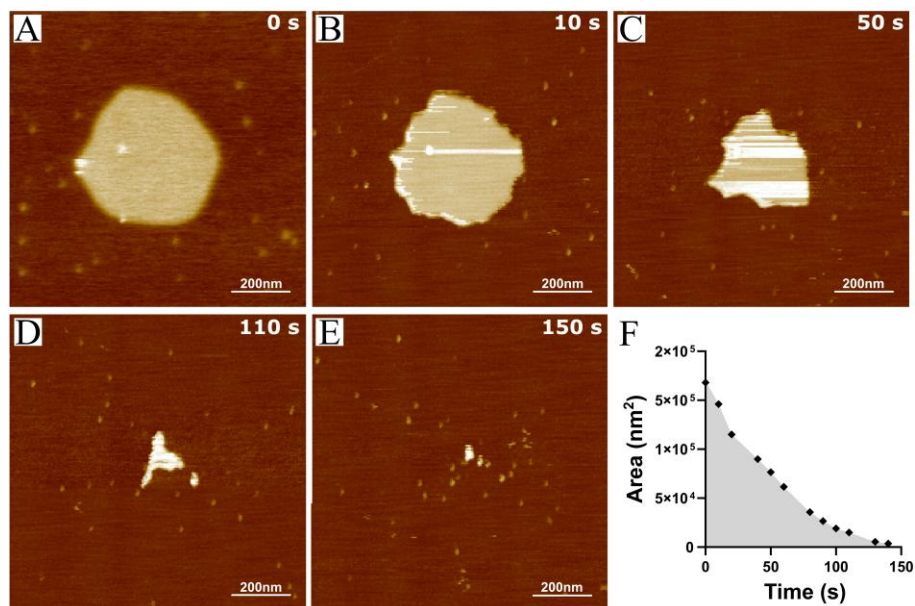


Fig. 8. Analysis of S100A8 interactions with an anionic membrane. Morphology of a DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2) lipid bilayer before protein treatment (A) and at various time points following exposure to S100A8 (B–E). The scanned area measures $1 \times 1 \mu\text{m}^2$. (F) Changes in membrane surface area over time. The experiment was conducted in HEPES buffer at 22 °C, using a 10 μM concentration of S100A8.

Meanwhile, exposure of the anionic membrane to the S100A8/A9 heterocomplex resulted in the appearance of the first defects on the lipid bilayer surface after 12.3 min of incubation (**Fig. 9**). These defects exceeded 50 nm in diameter and continued to expand over time. These observations indicate that the heterocomplex interacts with the lipid bilayer via a mechanism distinct from conventional pore formation, as typical pore sizes rarely exceed 10 nm [168]. Instead, we propose that the heterocomplex, similar to its component S100A8, disrupts the bilayer by extracting lipid molecules from the membrane environment. To further investigate S100A8/A9 interaction with anionic lipid membranes, cryo-transmission electron microscopy was employed. Treatment of liposomes with the S100A8/A9 heterocomplex resulted in the formation of small spherical

particles averaging 26.3 ± 5.4 nm in diameter. Given that S100A8/A9 disrupts membranes of this composition via a detergent-like mechanism, these particles likely represent lipid–protein coaggregates.

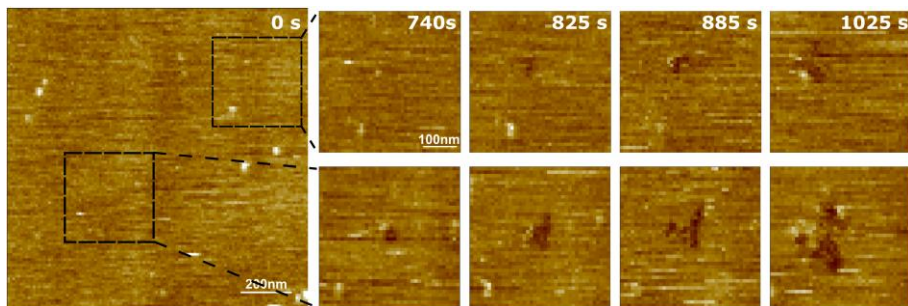


Fig. 9. Analysis of S100A8/A9 interactions with an anionic membrane. Morphology of a DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2) lipid bilayer before protein treatment and at various time points following exposure to S100A8/A9. The image displays a $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ field of view, with selected zoomed-in areas measuring $0.4 \times 0.4 \mu\text{m}^2$. The experiment was conducted in HEPES buffer at 22 °C, using a 10 μM concentration of S100A8/A9.

Effects of DOPS Levels and Protein Concentration

Among the pro-inflammatory S100 proteins tested, S100A8 exhibited the highest affinity for anionic lipid membranes. Based on this finding, the next objective was to determine whether the extent of membrane disruption induced by S100A8 correlates with the DOPS content in the bilayer. To investigate this, lipid membranes with varying DOPS concentrations (ranging from 0 to 30 %) were prepared. The results showed that decreasing the DOPS content from 30 to 20 % had no statistically significant effect on calcein leakage: after 4 h of incubation, the amount of dye released was 78.2 ± 1.9 and 77.0 ± 3.9 %, respectively. In contrast, liposomes with lower DOPS concentrations (10 or 5 %) were significantly less affected by S100A8, resulting in dye releases of 33 ± 5 and 18 ± 1 %, respectively, during the initial 0.5 h (**Fig. 10A**). An increase in calcein leakage was observed over the following 4 h, reaching 52 ± 3 and 34 ± 4 % for liposomes containing 10 % and 5 % DOPS, respectively. Notably, liposomes lacking DOPS exhibited no statistically significant changes in integrity upon S100A8 exposure. These results were further supported by EIS data, which revealed that the increase in admittance magnitude was directly correlated with anionic lipid content, with the greatest loss of membrane integrity observed in bilayers containing 30 % DOPS (**Fig. 10B**).

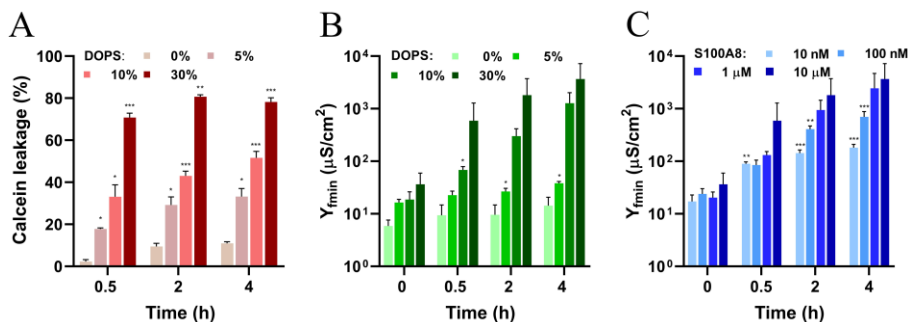


Fig. 10. S100A8 disrupts membranes in a DOPS level- and concentration-dependent manner. (A, B) Calcein leakage and EIS data, respectively, for anionic membranes treated with 10 μM S100A8. (C) Effect of S100A8 concentration on the admittance of DOPC/DOPE/DOPS/CHOL (2/3/3/2) membranes. Calcein leakage was measured in 10 mM HEPES buffer at 37 $^{\circ}C$, while EIS experiments were conducted at 22 $^{\circ}C$. Statistical significance is indicated as * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), and *** ($p \leq 0.001$).

Examining the correlation between S100A8 concentration and its disruptive potential on membranes containing 30 % DOPS, we tested protein concentrations ranging from 10 nM to 10 μM . A clear concentration-dependent effect was observed: the extent of membrane disruption increased proportionally with S100A8 concentration (**Fig. 10C**). Remarkably, even at the lowest tested concentration of 10 nM, S100A8 induced a statistically significant 11-fold increase in membrane admittance during the 4 h incubation period. Although the exact concentration of S100A8 is not yet fully established, typical levels in the bloodstream range from 47 pM [308] to 1.9 nM [309] under physiological conditions. In contrast, S100A8 expression can increase up to 6-fold in patients with Alzheimer's disease [310]. These findings highlight the exceptional sensitivity of the applied methodology, enabling detection of S100A8 activity even at pathologically relevant concentrations. Given that S100A8 is widely recognized as a potential biomarker for various inflammation-related disorders [12], this approach holds promise for advancing the development of EIS-based biosensors for diagnosing neuroinflammatory and neurodegenerative diseases.

Interactions with Lipid-Raft Mimicking Membrane

Eukaryotic plasma membranes exhibit heterogeneous fluidity, which facilitates the formation of specialized nanodomains known as lipid rafts. In neurodegenerative diseases, disruptions in lipid metabolism and amyloid protein-induced membrane remodeling have been shown to affect both the structural organization and functional properties of lipid rafts [311]. To investigate the interaction of S100 family proteins with a model system

mimicking the outer leaflet of a plasma membrane enriched in lipid rafts, a lipid mixture composed of DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 was used. Due to the elevated phase transition temperature of bSM (35–40 °C), this lipid composition enables the coexistence of liquid-ordered (L_o) and liquid-disordered (L_d) phases at room temperature [312]. The L_o phase is enriched in components characteristic of lipid rafts – bSM, cholesterol, and the anionic glycolipid GM1 – while the surrounding L_d phase primarily contains the zwitterionic glycerophospholipids DOPE and DOPC [281].

Consistent with observations in anionic systems, S100A8 produced the greatest disruption among the S100 proteins in two-phase lipid membranes. Within the initial 4 h of incubation, the position of the $f_{\min}$ in the Bode spectra shifted by one order of magnitude toward higher frequencies, accompanied by a 6.3-fold increase in admittance (**Fig. 11**). After 24 h of incubation, due to extensive membrane damage, it was no longer possible to reliably determine the bilayer’s dielectric properties using EIS. A similar outcome was observed in S100A8/A9-treated lipid bilayers – although the $f_{\min}$ position changed by only 2 Hz during the first 4 h, the membrane’s dielectric properties could not be accurately assessed by EIS after 24 h. Conversely, S100A9 induced only minor alterations in bilayer integrity; even after 24 h of incubation, the Bode plots still displayed a distinct phase minimum, with its position changing by only 7.5 Hz over the entire incubation period.

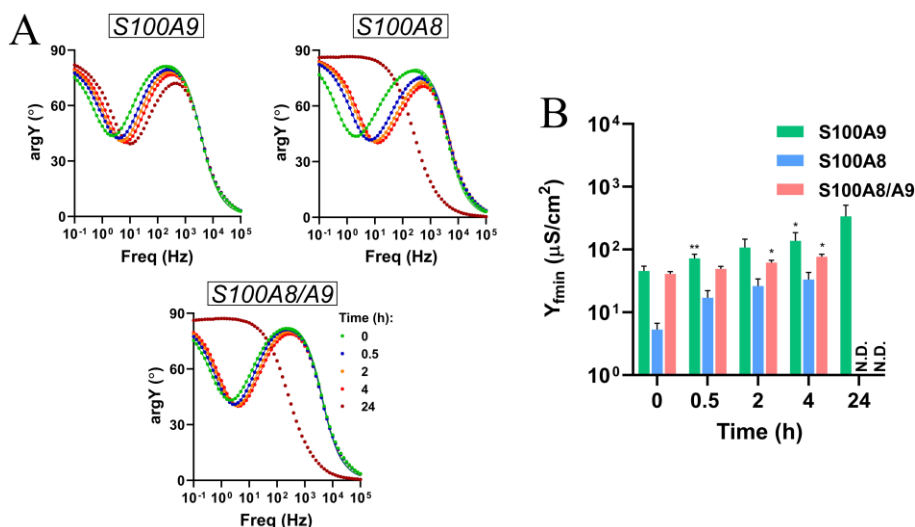


Fig. 11. Effect of S100 proteins on the integrity of two-phase membranes. (A) Bode plots showing the admittance phase ($\arg Y$) as a function of frequency (Freq). (B) Protein-induced changes in membrane admittance calculated at the frequency corresponding to the minimum phase angle ($Y_{\min}$). Measurements were performed at 22 °C in HEPES buffer using a protein concentration of 10 μM. Statistical significance is indicated as * ($p \leq 0.05$) and ** ($p \leq 0.01$). N.D. – not detected.

AFM imaging of artificial lipid membranes composed of DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 revealed well-defined liquid-ordered domains surrounded by liquid-disordered regions (**Fig. 12A**). Quantitative topographical analysis showed that the L_o domains protruded by 2.5 ± 0.2 nm above the surrounding L_d phase, in agreement with previously reported height differences in comparable membrane systems (2.4 ± 0.3 nm) [314]. Upon exposure to the S100A9 protein, the bilayers exhibited a gradual loss of lateral phase separation accompanied by progressive thinning of the L_o domains (**Fig. 12B–D**). After 1 h of incubation, the height difference between the L_o and L_d phases was reduced to 1.5 ± 0.2 nm. Following 24 h of treatment, pronounced depressions with an average depth of 1.5 ± 0.4 nm were observed within the L_o regions.

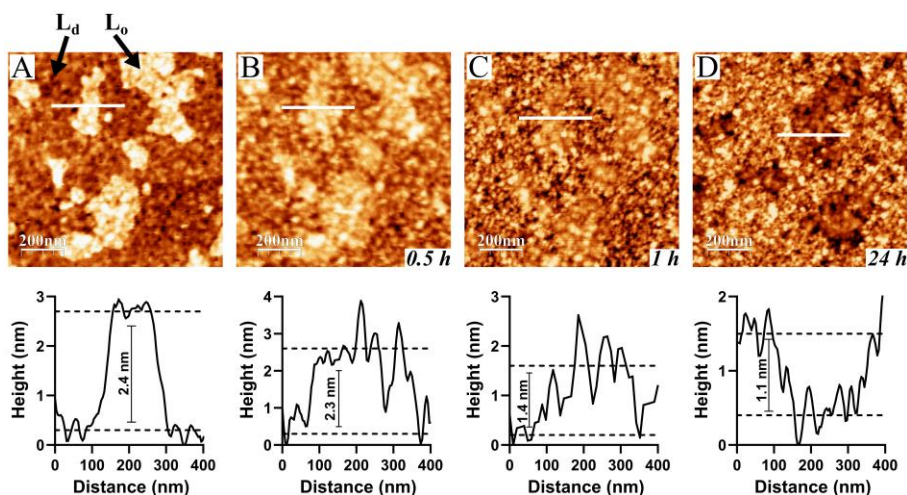


Fig. 12. S100A9-induced disruption of lateral lipid organization. The surface morphology of the DOPC/DOPE/bSM/CHOL/GM1 lipid membrane before exposure to S100A9 (A) and at 0.5 (B), 1 (C), and 24 h (D) following protein injection. Each image covers a $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ area. Regions enriched in DOPC and DOPE correspond to the liquid-disordered (L_d) phase, whereas areas rich in bSM, cholesterol, and GM1 form the liquid-ordered (L_o) phase. The topographic cross-sections below each panel correspond to the marked horizontal lines.

In this context, the observed thinning of the lipid bilayer within the L_o phase can be explained by a mechanism analogous to that described for BTLE membranes. Like the BTLE model, the lipid raft-mimicking membrane contained a significant amount of phosphatidylethanolamine (20 %), a lipid known to reduce packing efficiency and thereby facilitate protein insertion into the bilayer. Importantly, previous studies have documented an interaction between S100A9 and GM1 – a key lipid raft component – suggesting this interaction may underlie the neurotoxic effects of S100A9 [318]. It is likely that the negatively charged glycolipid GM1 drives S100A9's preferential

association with the liquid-ordered phase, and that protein insertion leads to lateral expansion of lipid molecules. As the L_o domains expand, the hydrocarbon chains of neighboring phospholipids in the surrounding liquid-disordered phase become compressed, increasing their order and thereby enhancing the height difference between L_o and L_d phases. Although PE is generally reported to be enriched in the L_d phase [319], we propose that even a small concentration of DOPE in the L_o regions may significantly contribute to the structural changes observed in the bilayer.

Effect of Calcium Ions on Protein-Lipid Interactions

We previously demonstrated that calcium ion binding induces conformational changes in S100 family proteins. To assess how calcium ions affect the membrane-disrupting activity of the S100 proteins studied, we conducted experiments using physiologically relevant Ca^{2+} concentrations, simulating both intracellular (100 nM) and extracellular (1 mM) environments. Our results showed that at the higher Ca^{2+} concentration (1 mM), membrane damage caused by S100A9, S100A8, and S100A8/A9 was completely inhibited over a 4 h incubation period. Throughout this time, no statistically significant changes in the dielectric properties of the lipid membranes were observed.

Divalent cations are known to exhibit a strong affinity for negatively charged lipid bilayers. These interactions increase membrane rigidity and lipid packing efficiency [330,331], alter the conformation of hydrophilic headgroups, enhance the order of hydrophobic tails [332], reduce bilayer hydration, and neutralize surface charge [333]. Given these effects, the observed inhibition of membrane-disruptive activity in the presence of Ca^{2+} is likely attributable not to conformational changes in the protein, but rather to structural modifications within the lipid bilayer itself. This hypothesis is further supported by our findings from experiments investigating S100A8 interactions with an anionic lipid membrane in the presence of Mg^{2+} : although Mg^{2+} induces only minimal structural alterations in the protein, its presence completely prevented bilayer disruption. Notably, the Mg^{2+} concentration used in our experiments (1 mM) corresponds to physiological levels of free magnesium found in both extracellular and intracellular environments [334].

Notably, when the Ca^{2+} concentration was reduced to 100 nM, the membrane-disruptive activity of S100A8 was only partially inhibited. After 4 h of incubation, the admittance of the anionic DOPS-containing lipid membrane increased 35-fold – approximately three times less than in the

system without calcium. Given that the two EF-hand motifs in the S100A8 protein have calcium-binding affinities of 10–50 μM and 200–500 μM [335], the protein remains predominantly in its apo-form at 100 nM Ca^{2+} . These results further support the hypothesis that the suppression of S100 protein-induced membrane damage is primarily driven by calcium-induced structural changes in the lipid bilayer, rather than by direct conformational changes in the protein itself. Nevertheless, the possibility that the observed inhibitory effect is at least partially influenced by calcium-induced modifications to the protein structure cannot be entirely excluded.

Highlights and Biological Implications

Neuroinflammation is widely recognized as a key contributor to the development of neurodegenerative disorders [4]. While previous research has emphasized the role of pro-inflammatory S100 family proteins in the progression of neurodegenerative diseases [71], the specific involvement of the plasma membrane in this context remains not fully elucidated. In this study, we investigated the interactions of S100A8, S100A9, and their heterocomplex with artificial membranes of varying lipid compositions. Our results demonstrated that the extent of protein-induced bilayer disruption depends both on the membrane's lipid composition and the duration of protein exposure. Importantly, the most significant membrane damage occurred in anionic membranes enriched with DOPS. Among the proteins evaluated, S100A8 induced the most pronounced disruption of membrane integrity, while S100A9 caused the least extensive perturbation. The pronounced affinity of S100A8 for anionic lipids is likely attributable to its structural features: bioinformatic analysis revealed that a potential transmembrane region of S100A8 carries a net positive charge, in contrast to the negatively charged transmembrane region of S100A9.

The pronounced disruption of DOPS-enriched membranes by S100A8 and S100A9 indicates that this anionic phospholipid may play a critical role in modulating the functionality of these proteins under both physiological and pathological conditions. PS is a predominant anionic phospholipid found in the plasma membranes of eukaryotic cells, constituting up to 21 % of the total lipid content in certain regions of the brain [338]. Changes in PS metabolism have been associated with various central nervous system disorders, although the evidence remains inconsistent: some studies report decreased PS levels in the brains of patients with neurodegenerative diseases, whereas others report increased or unchanged levels [302]. Under

normal conditions, PS is mainly localized in the inner (cytoplasmic) leaflet of the plasma membrane. However, during neuroinflammation or oxidative stress, PS can be translocated to the outer leaflet, acting as a signal for apoptosis – one of the hallmarks of neurodegeneration [339].

Notably, the secretion mechanisms of S100A8 and S100A9 proteins are not yet fully understood. However, it is plausible that lipid remodeling and the translocation of PS to the outer leaflet of the plasma membrane could facilitate the release of these proteins into the extracellular space. Comparable processes have been reported for other PS-binding proteins, including annexin V [340]. We suggest that this translocation may occur both directly, through S100 proteins binding to PS, and indirectly, via interaction with annexin V, which itself binds PS. Importantly, the interaction between S100A9 and annexin V has already been documented [341]. Therefore, PS-dependent protein translocation could promote the accumulation and aggregation of S100A8 and S100A9 in the extracellular space – a phenomenon commonly observed in neurodegenerative processes [114]. It should be noted that only small amounts of S100A8 and S100A9 are secreted by neurons; these proteins are mainly secreted by immune cells such as macrophages, monocytes, and neutrophils [12]. Consequently, during neuroinflammation, increased secretion of these proteins by immune cells [342] could lead to damage to neuronal plasma membranes, especially when PS is exposed on the outer membrane leaflet. Additionally, PS is abundant in the outer leaflet of extracellular vesicle (EVs) membranes, which facilitate the transfer of amyloid-like proteins throughout the brain [343]. Studies indicate that S100A8 promotes A β aggregation within EVs, [344] with its preferential binding to PS on the EVs surface likely enhancing this effect. The A β aggregates formed can subsequently cause damage to the plasma membrane [162], thereby contributing to the progression of neurodegenerative processes.

In this study, we demonstrated for the first time that S100A8 and the S100A8/A9 complex can extract lipid molecules from anionic lipid bilayers – a process characteristic of a detergent-like effect [296]. Notably, ThT fluorescence data showed that anionic lipid bilayers accelerate the aggregation of both S100A8 and S100A8/A9. This implies that prior to membrane fragmentation via the detergent mechanism, the membrane serves as a catalyst by increasing the local concentration of proteins on its surface, thereby facilitating the formation of potentially neurotoxic aggregates. Furthermore, previous studies have shown that S100 protein aggregates can serve as scaffolds, facilitating the aggregation of other amyloidogenic proteins such as A β and α -synuclein [105,110,114]. As noted earlier, the accumulation of these

amyloid deposits contributes to plasma membrane damage and neuronal death. Neuronal death, in turn, can trigger the expression and secretion of proinflammatory proteins, including S100 family members, into the extracellular space [53]. Together, these processes establish a feedback loop that likely sustains chronic neuroinflammation and accelerates the progression of neurodegenerative diseases (**Fig. 13**).

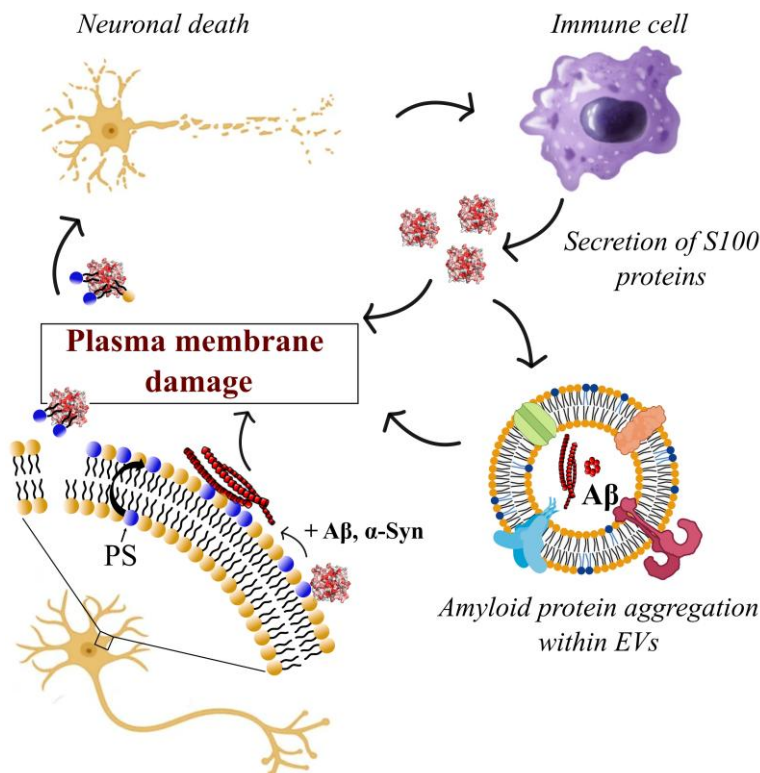


Fig. 13. Proposed role of S100 proteins in neurodegeneration. S100A8 and the S100A8/A9, secreted by immune cells, can directly interact with phosphatidylserine-containing membranes and disrupt them via a detergent-like mechanism. S100A8 may also associate with extracellular vesicles (EVs), promoting the aggregation of amyloidogenic proteins within their lumen. Moreover, S100A8 interaction with anionic membranes promotes its own aggregation. S100 family proteins can co-aggregate with other amyloidogenic proteins, thereby contributing to the formation of cytotoxic amyloid assemblies. Collectively, these mechanisms drive cell death, repeated immune cell activation, and sustained S100 protein secretion.

Based on the data obtained, it can be concluded that S100A9 does not interact with lipid membranes through a single, uniform mechanism. Instead, both its mode of action and the extent of membrane damage depend on several factors, including the bilayer's surface charge, phase state, and degree of molecular ordering. From these findings, three potential neurotoxic mechanisms of S100A9 have been identified: *I.* accumulation on negatively

charged membrane surfaces with partial bilayer insertion; *II.* disruption of lateral phase separation and lipid domain architecture; and *III.* thinning of the lipid bilayer. Given the crucial role of lipid rafts in synapse formation, the S100A9-induced remodeling of lipid nanodomains could impair efficient neural signal transmission, thereby contributing to memory deficits and the progression of neurodegenerative diseases [345].

In summary, this study employed electrochemical techniques, microscopy, and fluorescence spectroscopy to explore the potential mechanisms through which S100A8, S100A9, and their heterocomplex interact with lipid bilayers that mimic the neuronal plasma membrane. Despite their structural similarities, these proteins exhibit distinct modes of lipid membrane remodeling. We anticipate that these findings will not only enhance understanding of the interplay between inflammation and neurodegeneration but may also contribute to the development of novel diagnostic and therapeutic tools.

CONCLUSIONS

1. S100A9 exhibits amyloid-like properties and forms fibrillar structures enriched with β -sheets, whereas S100A8 forms oligomeric or irregularly shaped aggregates. In contrast, S100A8/A9 displays high structural stability and a low tendency to aggregate. Binding of calcium ions inhibits the aggregation of both S100A8 and S100A9.
2. Interaction with lipid membranes significantly modulates S100 protein aggregation. Membranes composed of porcine brain total lipid extract promote S100A9 aggregation but inhibit S100A8 aggregation. Conversely, anionic membranes containing 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine suppress S100A9 aggregation while promoting S100A8 aggregate formation.
3. The interaction of S100A8 and the S100A8/A9 complex with artificial lipid membranes is dependent on lipid charge. Both S100A8 and S100A8/A9 likely interact electrostatically with 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine and extract lipids from the membrane via a detergent-like mechanism.
4. The incorporation of S100A9 into the lipid bilayer causes lateral expansion of the lipid molecules and reduces the membrane's mechanical stiffness by up to 40 %. These structural changes result in localized thinning of the membrane, with its thickness decreasing by up to 2 nm.

PADĖKA

Visų pirma, už nuolatinį palaikymą, konsultacijas, visokeriopą pagalbą sprendžiant iškilusias mokslines problemas bei rengiant disertaciją norėčiau padėkoti savo doktorantūros vadovei, *dr. Marijai Jankunec*. Taip pat, už konsultacijas bei vertingus patarimus, susijusius su elektrocheminio impedanso spektroskopijos duomenų analize, esu dėkinga Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriaus vadovei, *dr. Rimai Budvytytei*. Už išgrynintus S100 šeimos baltymus ir krio-transmisijos elektronų mikroskopijos vaizdus dėkoju *dr. Dariui Šulskiui*. Taip pat, už galimybę pasinaudoti Amiloidų tyrimų sektoriuje esančia infrastruktūra, norėčiau padėkoti *dr. Vytautui Smirnovui*. Už suteiktą finansavimą moksliniams tyrimams bei išvykoms, dėkoju Lietuvos mokslo tarybai, Kompiuterinės, struktūrinės ir sistemų biologijos centrui – „CossyBio“ bei Medžiagų ir elektroninių/molekulinių vyksmų spektroskopinio charakterizavimo centrui – „SPECTROVERSUM“. Galiausiai, už palaikymą, kavos pertraukėles ir įdomias diskusijas dėkoju Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriaus doktorantams *Evelinai, Artūrai, Modestui ir Rūtai*.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. **Tamulytė R**, Jankaitytė E, Toleikis Z, Smirnovas V, Jankunec M. Pro-inflammatory protein S100A9 alters membrane organization by dispersing ordered domains. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*. 2023, 1865, 3, 184113.
DOI: [10.1016/j.bbamem.2022.184113](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184113)

Disertantės indėlis: disertantė dalyvavo planuojant tyrimų eigą, atliko atominės jėgos mikroskopijos, Laurdano ir Tioflavino T fluorescencinės spektroskopijos, dinaminės šviesos sklaidos bei kalceino išlaisvinimo eksperimentus. Taip pat analizavo bei grafiškai atvaizdavo gautus rezultatus, prisidėjo prie publikacijos rankraščio rengimo.

2. **Tamulytė R**, Baronaitė I, Šulskis D, Smirnovas V, Jankunec M. Pro-inflammatory S100A8 Protein Exhibits a Detergent-like Effect on Anionic Lipid Bilayers, as Imaged by High-Speed AFM. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2025, 17, 1, 2635-2647.
DOI: [10.1021/acsami.4c18749](https://doi.org/10.1021/acsami.4c18749)

Disertantės indėlis: reikšmingai prisidėta planuojant tyrimų eigą, savarankiškai atlikti klasikinės ir greitaieigės atominės jėgos mikroskopijos, elektrocheminio impedanso spektroskopijos, kalceino išlaisvinimo bei baltymų struktūros įvertinimo eksperimentai. Disertantė taip pat analizavo bei grafiškai atvaizdavo gautus rezultatus, parengė ir žurnalo redakcijai išsiuntė publikacijos rankraštį.

KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

Doktorantūros studijų metu disertantė sudalyvavo trylikoje mokslo konferencijų, kuriose pristatė dvylika stendinių bei vieną žodinį pranešimą. Keturios iš pateiktų konferencijų vyko užsienio mokslo institucijose.

1. **Tamulytė R.**, Jankaitytė E., Toleikis Z., Jankunec M. S100A9 Protein Interaction with Biomimetic Lipid Membranes. Mokslo konferencija „The COINS“, 2022/02/28 – 2022/03/03 (Gyvybės mokslų centras, Vilnius, Lietuva). **Stendinis pranešimas.**
2. **Tamulytė R.**, Jankaitytė E., Toleikis Z., Jankunec M. S100A9 Protein Interaction with Biomimetic Lipid Membranes. Mokslo konferencija „Open Readings“, 2022/03/15 – 2022/03/18 (Fizinių ir technologijos mokslų centras, Vilnius, Lietuva). **Stendinis pranešimas.**
3. **Tamulytė R.**, Jankaitytė E., Toleikis Z., Jankunec M. S100A9 Protein Interaction with Biomimetic Brain Membranes. Tarptautinė mokslo konferencija „Biophysics of the Brain Conference“, 2022/03/01 – 2022/03/02 (Konferencija vyko nuotoliniu būdu). **Stendinis pranešimas.**
4. **Tamulytė R.**, Jankaitytė E., Toleikis Z., Jankunec M. S100A9 Protein Interaction with Biomimetic Lipid Membranes. Tarptautinė biofizikinių metodų konferencija „MOSBRI“, 2022/07/20 – 2022/07/22 (Pastero institutas, Paryžius, Prancūzija). **Stendinis pranešimas.**
5. **Tamulytė R.**, Jankaitytė E., Toleikis Z., Jankunec M. AFM Characterization of Tethered Bilayer Lipid Membranes: Design and Biological Applications. Tarptautinė mokslo konferencija „Biomembrane Days“, 2022/09/19 – 2022/09/21 (Harnack House, Berlynas, Vokietija). **Stendinis pranešimas.**
6. **Tamulytė R.**, Jankaitytė E., Šulskis D., Jankunec M. The Effects of Calcium on Lipid-S100 Proteins Interactions. Tarptautinė mokslo konferencija „14th EBSA Congress“, 2023/07/31 – 2023/08/04, (Stokholmo Universitetas, Stokholmas, Švedija). **Stendinis pranešimas.**
7. **Tamulytė R.**, Jankaitytė E., Šulskis D., Jankunec M. Pro-inflammatory Protein S100A9 Alters Membrane Organization by Dispersing Ordered Domains. Mokslo konferencija „Open Readings“, 2023/04/18 – 2023/04/21 (Fizinių ir technologijos mokslų centras, Vilnius, Lietuva). **Stendinis pranešimas.**
8. **Tamulytė R.**, Šulskis D., Jankunec M. S100A8 PROTEIN INTERACTION WITH LIPID MEMBRANES. Mokslo konferencija „Open Readings“, 2024/04/23 – 2024/04/26 (Fizinių ir technologijos mokslų centras, Vilnius, Lietuva). **Stendinis pranešimas.**

9. **Tamulytė R., Šulskis D., Jankunec M.** S100A8 PROTEIN INTERACTION WITH LIPID MEMBRANES. Mokslo konferencija „The COINS“, 2024/04/15 – 2024/04/18 (Gyvybės mokslų centras, Vilnius, Lietuva). **Stendinis pranešimas.**
10. **Tamulytė R., Šulskis D., Jankunec M.** Detergent-Like Membrane Solubilization Induced by the Pro-Inflammatory S100A8 Protein. Baltijos šalių biofizikos konferencija „4th Baltic Biophysics Conference“, 2024/10/03 – 2024/10/04 (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Kaunas, Lietuva). **Stendinis pranešimas.**
11. **Tamulytė R., Šulskis D., Jankunec M.** Prouždegiminių S100 šeimos baltymų sąveikos su lipidų dvisluoksniu tyrimas. Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“, 2024/11/21 (Gamtos tyrimų centras, Vilnius, Lietuva). **Žodinis pranešimas.**
12. **Tamulytė R., Šulskis D., Jankunec M.** Biophysical Insights into the Interactions of S100 Family Proteins with Artificial Lipid Bilayers. Gyvybės mokslų centro mokslinė konferencija, 2025/05/22 – 2025/05/23 (Medicinos mokslo centras, Vilnius, Lietuva). **Stendinis pranešimas.**
13. **Tamulytė R., Šulskis D., Jankunec M.** Biophysical Insights into the Interactions of S100 Family Proteins with Artificial Lipid Bilayers. Tarptautinė mokslo konferencija „15th EBSA Congress“, 2025/06/30 – 2025/07/04, (Palazzo dei congressi, Roma, Italija). **Stendinis pranešimas.**

APIE AUTORIŲ

Rimgailė Tamulytė (gimė 1996 m.) Vilniaus universitete baigė biochemijos bakalauro (studijų metai 2015 – 2019) bei biochemijos magistrantūros (2019 – 2021 m.) studijas. Bakalauro studijų metais Rimgailė atliko praktiką Nacionaliniame vėžio institute, molekulinės onkologijos laboratorijoje, kur tyrinėjo miRNR raiškos pokyčius žmogaus skyd liaukės karcinomos audinio ląstelių linijose. Pirmaisiais magistrantūros studijų metais ji prisijungė prie Bioelektrochemijos ir biospektroskopijos skyriaus, kur pradėjo taikyti atominės jėgos mikroskopijos bei elektrocheminius metodus plazminės membranos modelinių sistemų ir baltymų–lipidų tarpusavio sąveikų tyrimams. Siekdama gilinti šios srities žinias, Rimgailė dalyvavo atominės jėgos mikroskopijos metodo vasaros mokykloje, surengtoje Marselio universitete (Prancūzija). Vėliau disertantė stažavosi sinchrotroninės spinduliuotės laboratorijoje MAX IV (Švedija), kur įgijo patirties dirbant su kombinuota atominės jėgos mikroskopijos ir infraraudonųjų spindulių spektroskopijos įranga. Doktorantūros studijų metu Rimgailė aktyviai įsitraukė į mokslinę veiklą – savo tyrimų rezultatus pristatė 13-oje mokslinių konferencijų ir tapo keturių publikacijų, paskelbtų tarptautiniuose mokslo leidiniuose, bendraautore. Disertantė aktyviai prisidėjo ir prie edukacinių veiklų, skirtų moksleiviams ir studentams – 2023 m. Neakivaizdinės jaunųjų biochemikų mokyklos mokiniams ji vedė užsiėmimus „Mokslininkas vienai dienai“, o 2024 m. laimėjo Lietuvos mokslo tarybos finansavimą studentų vasaros praktikai atlikti ir vadovavo bakalauro pakopos studentei. Už akademinį pasiekimą 2025 m. Rimgailė buvo apdovanota Gyvybės mokslų centro vardine stipendija.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.