



VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Biochemijos magistro studijų programos II kurso studentas

Darius ŠULSKIS

S100A9 BALTYMO STABILUMO IR AGREGACIJOS
TYRIMAS

BAIGIAMASIS DARBAS

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas SMIRNOVAS

VILNIUS, 2017

BAIGIAMASIS DARBAS

S100A9 BALTYMO STABILUMO IR AGREGACIJOS TYRIMAS

Darbas paruoštas:

Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto
Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje

Studentas:

Darius ŠULSKIS

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas SMIRNOVAS

VILNIUS, 2017

Turinys

Santrumpos	3
Įvadas	5
1. Literatūros apžvalga	6
1.1. S100 baltymų šeima	6
1.2. S100A baltymų struktūros	7
1.3. S100A baltymų funkcijos	8
1.4. Amiloidinės fibrilės	10
1.4.1. Tioflavinas T	12
1.4.2. 1-anilinonaftaleno 8-sulfonatas	13
1.4.3. Amiloidinių fibrilių agregacijos kinetika	13
1.5. S100A baltymų agregacija	14
1.6. Ligos	15
1.6.1. Vėžiniai susirgimai	15
1.6.2. Lėtiniai uždegimai	16
1.6.3. S100A baltymų svarba Alzheimerio ligoje	17
1.6.4. S100A baltymų svarba Parkinsono ligoje	17
2. Medžiagos ir metodai	19
2.1. Medžiagos	19
2.1.1. Rinkiniai	19
2.1.2. Konstruktai	19
2.1.3. Antikūnai	19
2.1.4. Sorbentai	20
2.1.5. Laboratorinė įranga	20
2.1.6. Mitybinės terpės	21
2.1.7. Tirpalai	21
2.2. Metodai	22
2.2.1. Kompetentinių ląstelių ruošimas	22
2.2.2. Kompetentinių ląstelių transformacija	23
2.2.3. Kultūros auginimas ir tikslinio baltymo raiškos indukcija	23
2.2.4. Baltymų elektroforezė	23
2.2.5. S100A9 baltymo renatūracija ir gryninimas	24
2.2.6. α -sinukleino baltymo gryninimas	24
2.2.7. Diferencinio skenavimo fluorimetrijos metodas	25
2.2.8. Triptofano fluorescencijos matavimai	25
2.2.9. Izoterminio titravimo kalorimetrija	26

2.2.10. <i>De novo</i> fibrilių susidarymas	26
2.2.11. Mėginių paruošimas atominės jėgos mikroskopijai	26
2.2.12. Taškinis imunoblotas	26
2.2.13. Agregacijos kinetika	26
3. Rezultatai ir jų aptarimas	27
3.1. Rezultatų įvadas	27
3.2. Baltymų gryninimas	27
3.2.1. S100A9 gryninimas	27
3.2.2. α -sinukleino gryninimas	28
3.3. S100A9 stabilumo tyrimai	30
3.3.1. Divalenčių metalų jonų įtaka S100A9 stabilumui	30
3.3.2. Kalcio sąveika su S100A9	32
3.4. S100A9 agregacijos tyrimas	33
3.4.1. S100A9 agregacija	33
3.4.2. S100A9 agregacijos mechanizmo savybės	37
3.4.3. Fibrilių patikrinimas specifiniais antikūnais	37
3.5. S100A9 ir α -sinukleino ko-agregacija	38
3.6. Rezultatų diskusija ir tolimesni planai	40
4. Išvados	42
Santrauka	43
Summary	44
Priedai	45
Literatūros sąrašas	48

Santrumpos

ΔH - entalpijos pokytis

AJM – atominės jėgos mikroskopija

ANS – 1-anilinonaftaleno 8-sulfonatas

aps./min – apsisukimai per minutę

BMR – branduolių magnetinis rezonansas

CD14 – ko-receptorius liposacharidų atpažinimui

CD33 – receptorius, atpažįstantis sialo rūgštį

CD65 – glikoproteinas, kuris jungiasi su mažo tankio lipoproteinais

CD85j – dar kitaip vadinamas LILRB1 - leukocitų receptorius (angl. Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 1)

CD – apskritiminis dichroizmas

DAMP – biomolekulės, kurios inicijuoja neinfektyvų imuninį atsaką (angl.

Damage-associated molecular pattern) (pvz. citozoliniai, S100 baltymai, nukleorūgštys iš branduolių)

DSF – diferencinio skenavimo fluorimetrija

DSK – diferencinio skenavimo kalorimetrija

DTT – ditionitritolis

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

EF – kalcį rišantis motyvas (spirale-kilpa-spiralė)

EMMPRIN – užląstelinio matrikso metaloproteinazės induktorius (angl. extracellular matrix metalloproteinase inducer)

I , I_{min} , I_{max} – fluorescencijos intensyvumas (minimumas ir maksimumas)

IL-1 β – Interleukinas-1 β

IPTG – izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas

ITK – izoterminė titravimo kalorimetrija

Hsp(104/70) – šiluminio šoko baltymai molekuliniai šaperonai

HSPG – heparino sulfato proteoglikanai

GndHCl – guanidino hidrochloridas

GPCR – su G baltymais sąveikaujantys receptoriai

LPS – lipopolisacharidai

MAPK – mitogenų aktyvinamų baltymų kinazės

Milli-Q – labai švarus vanduo

MES – 2-N-morfolinoetanosulfoninė rūgštis

MDSC – mieloidinės kilmės supresinės ląstelės

NDS – natrio dodecilsulfato

NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato denatūruojanti poliakrilamidinio gelio elektroforezė (angl. sodium dodecylsulphate polyacrylamidic gel electrophoresis)

PAMP – biomolekulės, kurios inicijuoja infektyvų imuninį atsaką (angl. Pathogen-associated molecular patterns) (pvz. bakterijų lipopolisacharidai, endotoksinais)

PIPES – piperazino-N,N'-bis(2-etansulfoninė rūgštis

PK – proteinazė K

PMSF – fenil-metil-sulfonilfluoridas

PVDF – polivinilideno difluoridas

RAGE – glikozilintų galutinių produktų receptoriai

p53 – transkripcijos faktorius

OT – optinis tankis

Rho – transkripcijos terminacijos faktorius

Sp11/PU.1 – transkripcijos faktorius

SATB1 – chromatinio organizavimo faktorius

TEMED – N,N,N',N'– tetrametiletildiaminas

ThT – Tioflavinas T

TLR – (angl. toll-like receptor)

TREM2 – receptoriai, reguliuojantis imuninį atsaką makrofagų ir dendritų ląstelėse

TRIS – 2-Amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3 diolis

TNF- α – navikų nekrozės faktorius - α

ŽIV – žmogaus imunodeficitas virusas

Įvadas

S100A baltymų šeimą sudaro 25 baltymai, kurie yra svarbūs, reguliuojant uždegiminius procesus tarp ląstelių. Ši šeima priskiriama EF-rankos motyvą turinčių baltymų grupei. Prie EF-rankos gali jungtis kalcis ir inicijuoti S100A baltymų struktūrinius pokyčius. Šių baltymų koncentracija pakinta vėžio, neurodegeneratyvinių ligų metu bei esant uždegimui ar imuniniam atsakui.

Iš S100A baltymų šeimos galima išskirti du atstovus: S100A8 ir S100A9 (dar vadinami kalgranuliniais), kurie gali sudaryti heterodimerus ir kartu agreguoti į amiloidines fibriles. Yra manoma, kad dėl šių fibrilių poveikio atsiranda prostatos vėžys (Yanamandra et al., 2009). Tolimesniuose tyrimuose buvo pastebėta, kad S100A9 baltymo kiekiai yra padidėję žmonėse, kurie serga Alzheimerio liga. Detaliau išanalizavus šį ryšį su Alzheimerio liga, parodyta, kad S100A9 randamas kartu su β -amiloido peptidu, su kuriuo jis kartu gali agreguoti (Zhang et al., 2012). Be to, esant galvos pažeidimams, S100A9 gali vienas pats agreguoti, o vėliau atitinkamai inicijuoti ir β -amiloido agregaciją. (Wang et al., 2014). Taip pat S100A baltymų lokalizacija gali sutapti su α -sinukleinu (Nakamura et al., 2015), kuris yra vienas iš pagrindinių Parkinsono ligos metu agreguojančių baltymų.

Bendrai apie S100A9 agregaciją yra mažai žinoma, o ji gali būti svarbi neurodegeneratyvinių ligų metu. Todėl yra aktualu suprasti ir ištirti S100A9 virsmą į amiloidines fibriles.

Darbo tikslas - ištirti S100A9 baltymo agregaciją į amiloidines fibriles ir jo poveikį α -sinukleino agregacijai.

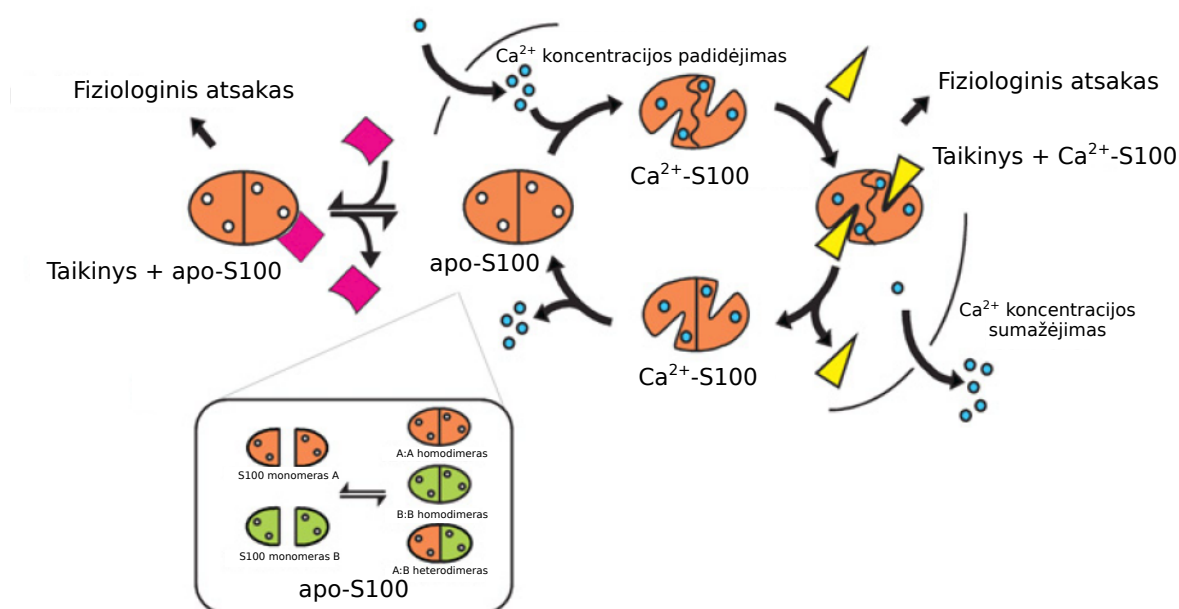
Darbo uždaviniai:

1. Išgryninti S100A9 ir α -sinukleino baltymus.
2. Ištirti metalų jonų įtaką S100A9 baltymo stabilumui.
3. Išbandyti skirtingas sąlygas S100A9 agregacijai.
4. Patikrinti S100A9 įtaką α -sinukleino agregacijai.

1. Literatūros apžvalga

1.1. S100 baltymų šeima

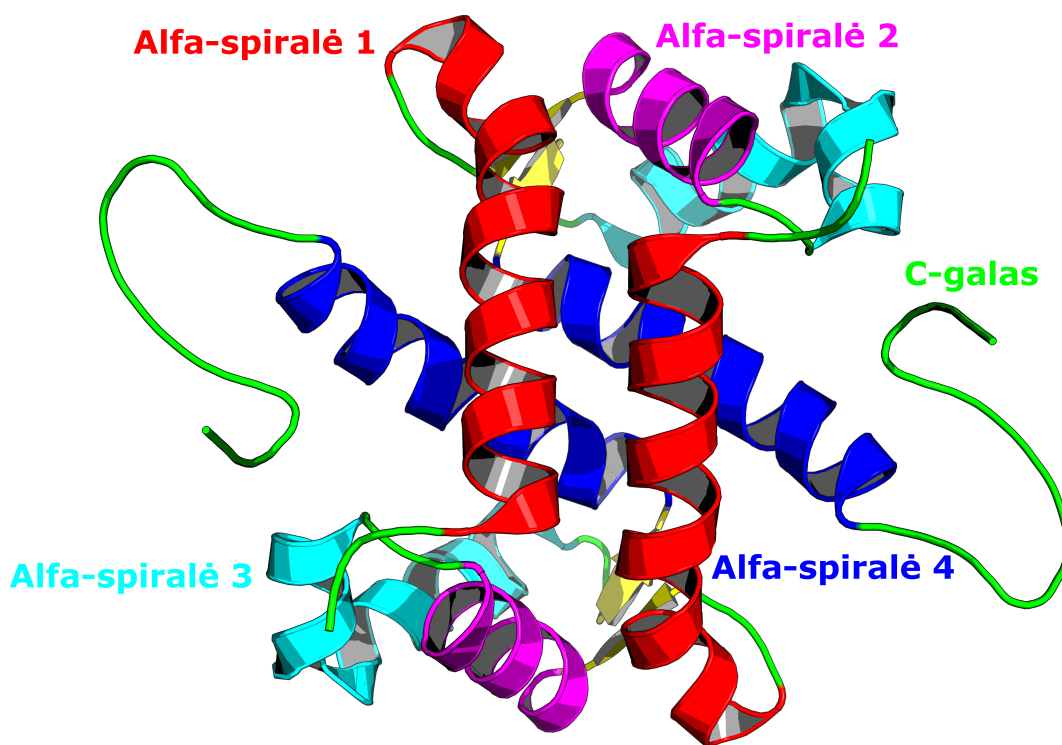
1965 m. mokslininkas Blake W. Moore atrado baltymus, kurie buvo išfrakcionuoti iš tirpaus (angl. soluble) jaučio smegenų mėginio, ištintu (100%) amonio sulfato tirpalu, ir dėl to šiuos baltymus pavadino S100 (Moore, 1965). S100 baltymų šeimą sudaro 25 homologiniai baltymai, turintys kalcį rišančius EF-rankos tipo domenų. S100 baltymai turi mažą molekulinę masę (9-13 kDa) ir linkę sudaryti homodimerus, heterodimerus bei tetramerus (Cmoch et al., 2012). Kalcis ypač svarbus šiems baltymams, nes jis padeda reguliuoti jų funkcijas ir konformacijas (1.1 pav.) (Santamaria-Kisiel et al., 2006). Žmoguje dauguma S100A baltymo genų randami 1 chromosomoje, 1q21 regione (Mischke et al., 1996). Nors S100 baltymų šeima yra gana didelė, jie yra randami tik žinduoliuose, todėl pirma buvo manoma, kad šie baltymai filogenetiškai yra nauji (Donato, 2001). Atlikus detalesnius baltymų evoliucijos tyrimus, pamatyta, kad S100 baltymų šeima paskutinius 165 milijonų metų išliko mažai pakitusi, o kai kurie šios šeimos atstovai galėjo pradėti egzistuoti ir su pirmais stuburiniiais gyvūnais, tai yra prieš 500 milijonų metų (Zimmer et al., 2013). Iš šios šeimos galima išskirti du baltymus S100A8 ir S100A9, kurių heterodimerai sudaro amiloidinius darinius prostatėje, o S100A9 gali agreguoti kartu su β -amiloidu (Wang et al., 2014).



1.1 pav. Kalcio įtaka S100A baltymams (Santamaria-Kisiel et al., 2006).

1.2. S100A baltymų struktūros

S100A9 baltymą sudaro keturios α spiralės su dviem spiralė-kilpa-spiralė motyvais. S100A9 baltymas pasižymi ilgu nestruktūrizuotu C galu (1.2 pav.). S100A9 gali turėti skirtingas oksidacines modifikacijas: oksiduotą metioniną, nitrozilintą cisteiną ir sudaryti disulfidinius tiltelius tarp atskirų baltymo molekulių (Lim et al., 2009). S100A9 su oksiduotais 63 ir 83 metioninais praranda atstumiantį efektą periferiniuose neutrofiluose (Sroussi et al., 2006). S100A9 nitrozilinimas, priklausantis nuo kalcio, nitrozilintas S100A9 praranda savo uždegiminę funkciją (Markowitz ir Carson, 2013). S100A9 sudaro heterodimerą su S100A8, nors pagal sekų panašumą jam yra artimiausias S100A12. Visi trys baltymai yra lokalizuoti panašioje ląstelės vietoje, todėl spėjama, kad yra specialus mechanizmas, kuris leidžia susijungti S100A8 ir S100A9, bet ne S100A9 ir S100A12 (Itou et al., 2002). Taip pat S100A12 yra išskirtinai sintetinas tik granulocituose ir veikia nepriklausomai nuo S100A8 ir S100A9 (Vogl et al., 1999). Remiantis baltymų evoliucija spėjama, kad S100A12 yra pakitusi S100A9 geno kopija, praradusi ilgą C-galą (Kwek et al., 2013). Tačiau sąveikai tarp S100A8 ir S100A9, S100A9 ilgas C-galas yra nereikalingas ir be jo gali susidaryti heterodimerai (Hessian ir Fisher, 2001).



1.2 pav. S100A9 homodimero struktūra (pdb id: 5I8N).

S100A9 taip pat gali sudaryti tetramerus, nors detalus mechanizmas nežinomas, bet nustatyta, kad kalcis ir cinkas padeda reguliuoti S100A8/S100A9 heterodimero persitvarkymą į tetramerą, o pats kalcis stabilizuoja baltymus (Vogl et al., 2006). Tetrameras

pasižymi atsparumu bakterinėms proteazėms (Stephan ir Nolan, 2016). Be kalcio ir cinko, nustatyta, kad S100A8/S100A9 heterodimeras prisijungia manganą, dėl esančių histidinių abiejų baltymų C-galuose (Brunjes Brophy et al., 2013). Ta pati mokslininkų grupė parodė, kad esant kalciui manganas gali jungtis tik prie C-galo, bet nesant kalcio, manganas gali užimti ir EF-rankų prisijungimo vietas (Gagnon et al., 2015).

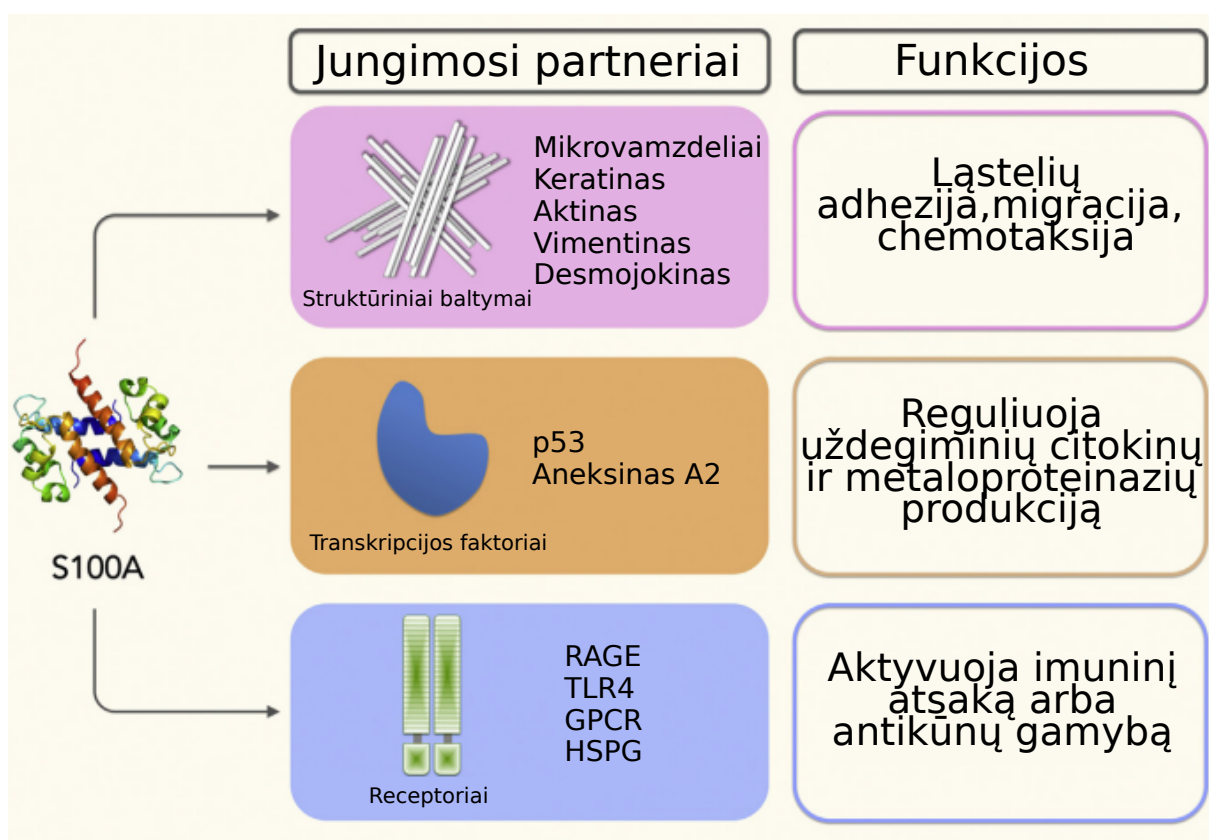
Peržvelgus kitų S100A baltymų sąveikas su metalais, galima rasti sąryšių su S100A9. Tyrimai su S100A2 parodė, kad kalcis stabilizuoja baltymą, tačiau cinkas destabilizuoja (Botelho et al., 2009; Malashkevich et al., 2009), o rezultatai su S100A12 rodo, kad cinkas padeda sudaryti heksamerus (Moroz et al., 2009). Kalciui prisijungus prie S100A4, S100A5 ir S100A6 atsidengia hidrofobiniai paviršiai, o teigiamos aminorūgštys tampa labiau prieinamos - tai padeda sudaryti baltymų prisijungimo vietą (Bertini et al., 2009). Lygiai taip pat hidrofobiniai paviršiai atsiveria ir S100A16 baltyme (Sturchler et al., 2006). Remiantis neseniai daryta S100A8 kristalinės struktūros analize, kurioje parodyta, kad cinkas ir kalcis padeda homodimerams suartėti ir sudaryti tetramerus, galima spėti, kad ir S100A9 panašiai oligomerizuoja, dėl sekų panašumų. (Lin et al., 2016). Taip pat eksperimentai su S100A16, parodė, kad kalcis turbūt jungiasi kooperatyviai - pirmas prisijungęs kalcis, keičia kitų jungimosi vietų giminingumą (Babini et al., 2011). Be to gali būti, kad kiekvienas S100A baltymas gali sudaryti kelis unikalius dimerus, panašiai, kaip ir S100A6 homodimeras, kuris prisijungęs prie RAGE receptoriaus, įgavo kitokią struktūrą negu iki tol buvo žinoma (Yatime et al., 2016).

S100A9 gali jungtis ir su S100A4 baltymu. Šis heterodimeras yra funkcionalus, jungiasi prie RAGE receptorių ir jo susidarymas priklauso nuo cinko jonų (Björk et al., 2013). Pats S100A4 kaip ir S100A6, S100A10, S100A11 sudaro kompleksus su Aneksinu A2, baltymu atsakingu už tarpląstelinę sąveiką, todėl potencialiai S100A4/S100A9 heterodimeras irgi galėtų sąveikauti su Aneksinu A2 (Liu et al., 2015). Mokslininkas Bode ir jo kolegos, parodė kad S100A8/S100A9 sąveikauja su Aneksinu A6, kuris padeda heterodimerui sąveikauti su membrana ir taip jį išlaikyti ląstelės paviršiuje (Bode et al., 2008).

1.3. S100A baltymų funkcijos

S100A baltymų šeimos funkcijos yra plačios ir apima įvairias sritis (1.3 pav.). S100A8 baltymas dalyvauja uždegiminiuose procesuose, oksidaciniame strese, mieloidinių ląstelių diferenciacijoje, slopina telomerazių aktyvumą, o S100A9 atvirkščiai geba panaikinti S100A8 indukuotą telomerazių slopinimą ir pakeisti mieloidinių ląstelių fenotipus kartu slopinant šių ląstelių vystymąsi (Donato et al., 2013). S100A9 homodimeras yra greitai degraduojamas ląstelėje. S100A8 sustabdo degradaciją, kadangi jis sudaro heterodimerus su S100A9. Tačiau pastebėta, kad ląstelėse paveiktose įvairiomis uždegimus stimuliuojančiomis molekulėmis (LPS, $Il-1\beta$, $TNF\alpha$), S100A9 homodimeras buvo stabilus bei jo sintezė buvo skatinama (Riva et al., 2013). Genome S100A9 geno raiška aktyvinama Sp11/PU.1

traskripcijos faktorių, o slopinama SATB1 chromatino organizavimo faktoriaus, kuris paslepija S100A9 geną, kompaktiškiau organizuojant chromatiną. SATB1 atpažįsta AT bazių turtingas sritis, todėl jas pašalinus, S100A9 raiška nebeslopinama (Swindell et al., 2013). S100A9/S100A8 heterodimeras turi antibakterinių savybių. Bakterijos paveiktos baltymu mirdavo, nes S100A8/S100A9 suriša geležį, kuris yra būtinas bakterijų gyvybingumui (Nakashige et al., 2015). Tyrinėjant bakterijų infekcijas karvėse, pastebėta, kad jų piene randama S100A baltymų, kurie nulemia karvių atsparumą infekcijoms (Regenhard et al., 2010). Taip pat S100A8, S100A9 ir S100A12 buvo rasti skrandžio gleivinėje pas vaikus, kurie buvo užsikrėtę *Helicobacter pylori* bakterijomis (Leach et al., 2008).



1.3 pav. S100A baltymų funkcijos (Ong et al., 2014).

Bendrai S100A8, S100A9, S100A8/S100A9 yra stiprūs neutrofilų induktoriai ir yra susiję su neutrofilų adhezija bei chemotaksija link uždegimo vietų (Ryckman et al., 2003). Pastebėta, kad S100A8/S100A9 skirtingai aktyvuoja ląsteles: neutrofiluose jis sukelia uždegiminį efektą, makrofagams neturi jokios įtakos, o dendritų ląstelėms turi priešuždegiminį poveikį (Averill et al., 2011). Paskutiniaisiais metais bandoma surasti skirtingas funkcijas tarp S100A8, S100A9, S100A8/S100A9 baltymų. Tiriant plaučių uždegiminiuosius procesus pastebėta, kad S100A8/S100A9 ir S100A9 neturėjo įtakos S100A8/IL-10 sąveikos keliams, tačiau S100A9 tiesiogiai indukavo CXCL-10 limfokino geną (Hiroshima et al., 2017). Remiantis branduolių magnetinio rezonanso spektroskopijos rezultatais, S100A9 labai stip-

riai sąveikauja su RAGE V receptoriumi ($K_d = 5 - 6\mu\text{M}$). Su receptoriumi sąveikauja per kilpą, esančią tarp trečios ir ketvirtos α -spiralės, o jungimasi lemia hidrofobinės aminorūgštys (Chang et al., 2016). Be RAGE receptoriaus S100A8/S100A9 jungiasi ir prie TLR 4 receptoriaus, bet 3 kartus silpniau, tačiau tai gali priklausyti nuo daug įvairių fiziologinių sąlygų (Ibrahim et al., 2013). Papildomai yra įrodymų, kad S100A9 gali jungtis su CD14 membraniniu baltymu, kuris padeda atpažinti lipopolisacharidus ir aktyvinti TLR4 receptorių, kartu įjungiant imuninį atsaką (He et al., 2016). Tais pačiais metais parodyta, kad S100A8 ir S100A9 daug stipriau gali jungtis prie CD68 receptoriaus negu prie CD14 ir taip pat prisidėti prie imuninio atsako reguliavimo (Okada et al., 2016). Rezultatai su žmogaus endotelinėmis ląstelėmis parodė, kad S100A8/S100A9 aktyvinant RAGE arba TLR 4 receptorių, aktyvuojamas ir MAPK signalinis kelias, dėl kurio padidėja membranų pralaidumas, taip pažeidžiant endotelinį barjerą (Wang et al., 2014). Be TLR4, RAGE, CD14 receptorių yra įrodymų, kad S100A9 sąveikauja su CD85J receptoriumi ir taip padeda sukelti prieš ŽIV virusą nutaikytą atsaką (Arnold et al., 2013). S100A8/S100A9 skatina tubulino polimerizaciją, tokią pat funkciją turi S100A8, bet ne S100A9 homodimerai (Leukert et al., 2006). Taip yra, nes S100A8 sugeba išlaikyti panašią struktūrą ar būtų homodimere ar heterodimere, bet S100A9 sudaro skirtingas struktūras (Korndörfer et al., 2007). S100A8/S100A9 išskirtas iš neutrofilų gali indukuoti apoptozę, bet esant cinko ar vario metalams ši funkcija slopinama (Yui et al., 2003). Yra įrodymų, kad S100A8/S100A9 kompleksas gali sąveikauti su membranomis, nors baltymas ir neturi domeno, tokiam ryšiui (Valenzuela et al., 2005).

1.4. Amiloidinės fibrilės

Amiloidinės fibrilės - tai baltymų agregatai, pasižymintys labai tvarkinga agregatų struktūra ir stabilumu. Susiformavusios fibrilės gali gyvuoti ilgą laiką bei kauptis audiniuose (Dobson, 2003). Šiuo metu yra žinoma apie 50 ligų, kurios yra siejamos su baltymų agregacija į amiloidines fibriles (1 lentelė). Didžioji dalis šių ligų yra neišgydomos, mirtinos ir neturi vaistinių preparatų joms gydyti. Tačiau neskaitant amiloidinių fibrilių svarbos ligose, pati amiloidinė būseną ypatinga tuo, kad kadangi ji yra labai stabili ir gali būti alternatyva natyviai struktūrai. Todėl egzistuoja hipotezių, kad visi baltymai gali sudaryti amiloidines struktūras esant palankiomis sąlygomis (Knowles et al., 2014). Tokie teoriniai spėjimai po truputį pildosi, kadangi per paskutinius dešimt metų nustatyta, kad net tokie baltymai kaip vėžio supresorius p53 ar bakterijos *Clostridium botulinum* transkripcijos faktorius Rho gali formuoti amiloidines fibriles (Ano Bom et al., 2012; Yuan ir Hochschild, 2017). Taip pat rasta amiloidinių baltymų augaluose, pvz. iš genetiškai modifikuoto tabako chloroplastų išskirta kukurūzų transgliutaminazė (Villar-Piqué et al., 2010) arba baltymas monelinas išskirtas iš tropinių uogų *Dioscorea phyllanthifolia* (Konno et al., 1999). Kai kurios amiloidinės fibrilės turi ir funkcijas, kaip mielėse, kuriose Ure2p ir

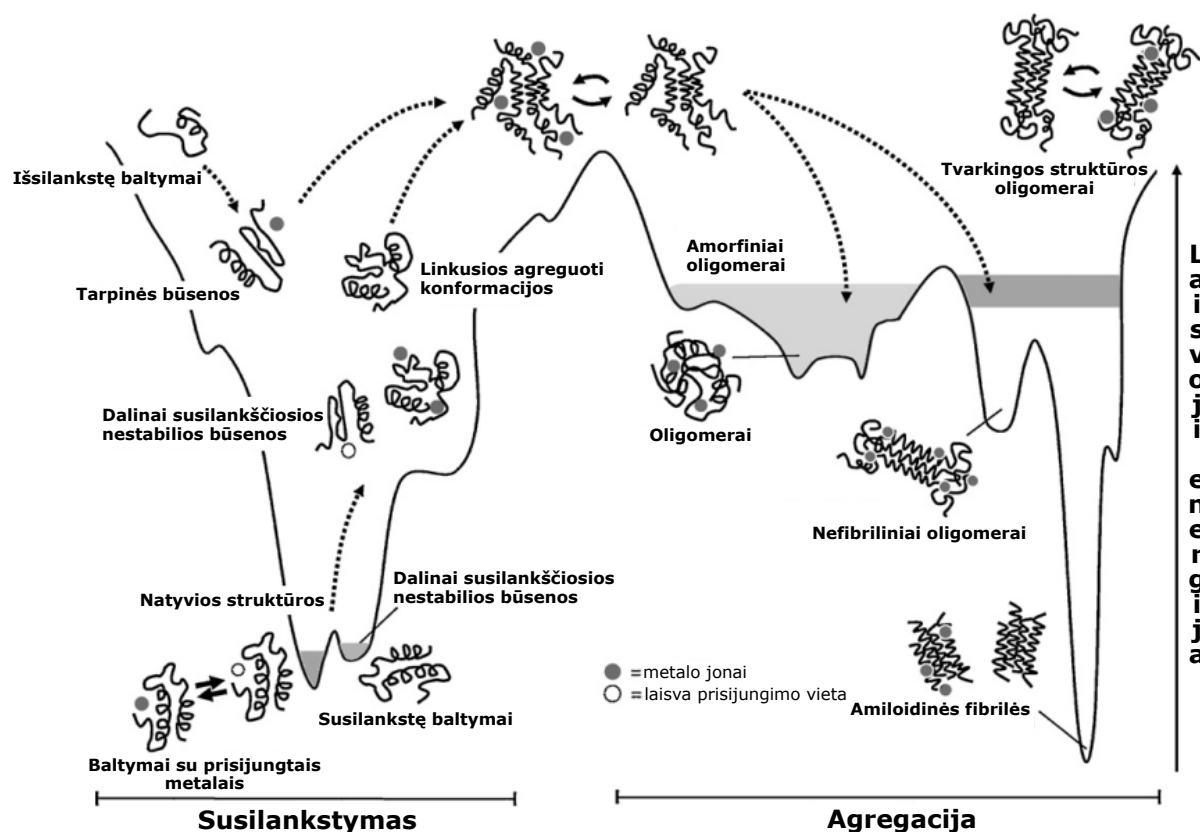
Sup35p baltymų agregatai padeda reguliuoti mielių fenotipus (Dobson, 2003).

1 lentelė. Ligos susijusios su baltymų agregacija (Knowles et al., 2014).

Liga	Agreguojantis baltymas
Neurodegeneratyvinės ligos	
Alzheimerio liga	β -amiloidas
Spongiforminė encefalopatija	Prioninis baltymas
Parkinsono liga	α -sinukleinas
Amiotrofinė lateralinė sklerozė	Superoksido dismutazė 1
Hantingtono liga	Hantingtono baltymo fragmentai
Šeimyninė amiloidinė polineuropatija	Transtiretino mutantai
Sisteminės ligos	
Amiloidinės lengvosios grandinės (AL) amiloidozė	Imunoglobulino lengvosios grandinės fragmentai
Amiloido A (AA) amiloidozė	Serumo amiloido A1 baltymo fragmentai
Senatvinė amiloidozė	Laukinio tipo transtiretinas
Su hemodialize susijusi amiloidozė	β_2 -mikroglobulinas
Lizocimo amiloidozė	Lizocimo mutantai
Lokalizautos ligos	
Apolipoproteino A1 (Apo-A-1) amiloidozė	Apo A-1 fragmentai
Antro tipo diabetas	Amilinas
Lokaliizuota amiloidozė	Insulinas

Pagrindinis amiloidinių fibrilių struktūrinis motyvas yra persidengiančios β -klostės. Pirmą kartą šios struktūros fibrilėse buvo pamatytos 1968 m., atliekant rentgeno spindulių difrakcinę analizę (Eanes ir Glenner, 1968). Šios analizės metu gauti vaizdai parodė, kad fibrilėse β -klostės išsidėsto stačiai fibrilių ašiai (Härd, 2014). Taip pat yra žinoma, kad identiškos sekos baltymai gali formuoti skirtingas fibrilių struktūras ir tai priklauso nuo įvairių aplinkos sąlygų (Tycko, 2014). Be to visai neseniai atrasta, kad *Staphylococcus aureus* bakterijose PSM α 3 peptidas sudaro persidengiančias α -spirales struktūras, todėl tikrai nėra atrastos visos galimos amiloidinių fibrilių struktūros (Tayeb-Fligelman et al., 2017).

Amiloidiškumui ypač svarbūs yra cinko, vario, kalcio, geležies jonai (1.4 pav.). Vienais atvejais metalai gali paskatinti amiloidinių darinių susidarymą, kitais stabilizuoti baltymą ir jį apsaugoti. Yra parodyta, kad priklausantys nuo metalo jono baltymai, kurie linke sudaryti amiloidinius darinius kaip α -sinukleinas, Tau, Superoksido dismutazė, prionai ir β -amiloidas gali sudaryti skirtingos struktūros agregatus. (Leal et al., 2012).



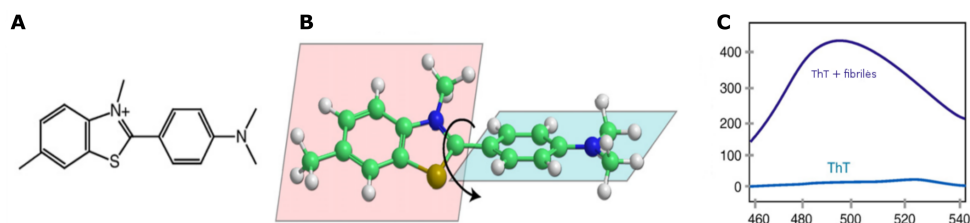
1.4 pav. Baltymų susilankstymo ir agregacijos virsmai (Leal et al., 2012).

1.4.1. Tioflavinas T

Pirmą kartą amiloidinių fibrilių identifikavimo metodas buvo aprašytas 1853 m. Fibrilės buvo atpažintos nudažant audinių pavyzdžius su jodo rūgštimi (Aterman, 1976). 20 a. pradžioje ir viduryje dažniausiai amiloidines fibriles atpažinti buvo naudojamas audinių pramonės dažas Kongo raudonasis. Tačiau dirbant su šiuo dažu reikėjo įdėti daug pastangų gauti gerus mėginus, o stebėti pavyzdžius galima tik su poliarizuotos šviesos mikroskopu, taip pat jo jungimasis su kitomis molekulėmis buvo dažnas ir tai duodavo klaidingus rezultatus (Elghetany ir Saleem, 1988). 1959 m. Mokslininkai Vassar ir Culling pristatė tioflaviną T (ThT) - dažą, kurio fluorescencija padidėja prisijungus prie amiloidinių fibrilių.

Prisijungus prie fibrilių, ThT molekulės sužadavimo maksimumas pasislenka nuo 385 iki 450 nm, o emisijos maksimumas nuo 445 nm iki 482 nm. Pačią molekulę sudaro hidrofobinė dietilamino grupė, prijungta prie fenilo žiedo, ir labiau polinė benziltiazolio grupė. Tirpale benzilamino ir benziltiazolio žiedai gali laisvai suktis vienas kito atžvilgiu (1.5 pav.). Rotacijos metu sužadintos būsenos yra greitai nugesinamos ir tai duoda silpną fluorescenciją. Kai ThT yra sustabdytas sužadintoje būsenoje - fluorescencija daug kartų išauga. Būtent prisijungus prie amiloidinių fibrilių yra užfiksuojama ThT konformacija ir todėl labiau padidėja fluorescencija (Biancalana ir Koide, 2010).

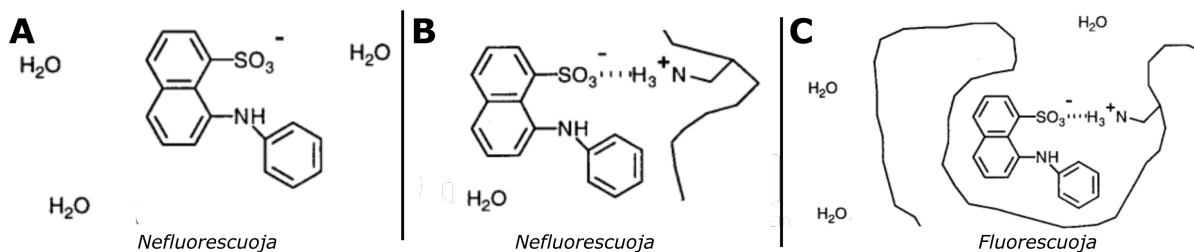
Esant neutraliam pH, ThT yra geltonos-šviesiai žalios spalvos. ThT blunka bei praranda savo fluorescenciją aukštoje temperatūroje (35-50 °C) ir šarminiame pH (Foderà et al., 2008). Ilgai laikomas kambario temperatūroje ThT gal netekti savo fluorescencinių savybių, kadangi jis gali oksiduotis arba demetilintis (Hsu et al., 2013)



1.5 pav. Tioflavinas T. (A) ThT molekulės struktūra. (B) ThT žiedų rotacija. (C) ThT fluorescencijos spektras (Biancalana ir Koide, 2010).

1.4.2. 1-anilinonaftaleno 8-sulfonatas

1-anilinonaftaleno 8-sulfonatas (ANS) yra solvatochrominis dažas, kurio fluorescencijos intensyvumas labai išauga hidrofobinėje aplinkoje. Dėl šios savybės ANS yra labai tinkama molekulė tirti baltymų išsivyniojimą. Baltymui išsivyniojant, atsidengia jo hidrofobinės sritys, prie kurių ANS gali prisijungti ir pradėti fluorescuoti (Matulis ir Lovrien, 1998). ANS buvo pritaikytas identifikuoti potencialias molekulių jungimosi vietas prie baltymo ir nagrinėjant galimas „molten globules“ struktūras (Gasymov ir Glasgow, 2007).



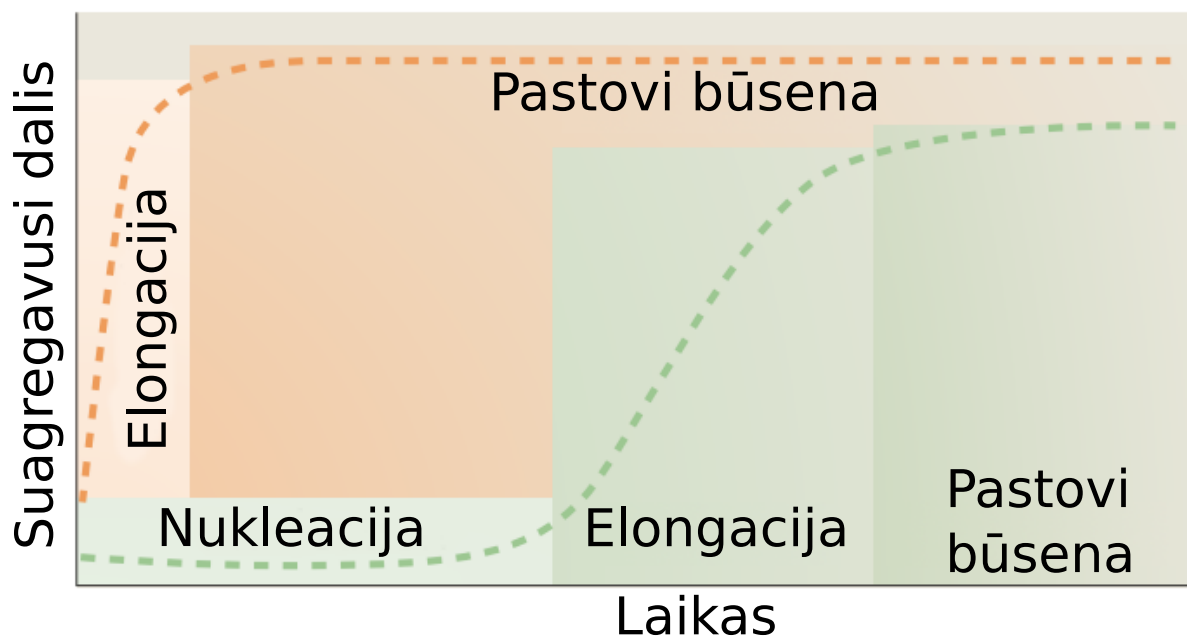
1.6 pav. (A) Neprisijungęs ANS. (B) Prisijungęs ANS tik prie teigiamai įkrautos grupės. (C) ANS hidrofobinėje kišenėje ir prisijungęs prie teigiamai įkrautos grupės

ANS galima panašiai naudoti kaip ir ThT - matuoti amiloidinių fibrilių susidarymo kinetiką. Agregacijos metu, fibrilėse atsiveria daugiau hidrofobinių regionų, prie kurių ANS gali prisijungti. Naudojant kombinacijose su kitais fluorescenciniais dažais galima atskirti skirtingas fibrilių rūšis, bet nereikia atmesti galimybės, kad patys dažai gali turėti įtakos fibrilių formavimuisi (Bolognesi et al., 2010).

1.4.3. Amiloidinių fibrilių agregacijos kinetika

Amiloidinių fibrilių agregacijos kinetiką galima tirti specifiniu fluorescenciniu dažu ThT (1.7 pav.). Nesant „sėklos“, natyvus baltymas, turi pereiti „lag“ arba kitaip vadina-

mą nukleacijos fazę, kuriuos metu nefiksuojami agregatai, bet susidaro nauji branduoliai. Pasiekus kritinę branduolių koncentraciją, prasideda staigi elongacija - fibrilių augimas iki tol, kol nebelieka natyvaus baltymo. Pridėjus į pradinį tirpalą jau suformuotų branduolių (dar vadinamų "sėkla"), nebelieka „lag“ fazės ir baltymas eksponentiškai agreguoja. (Chuang et al., 2013).



1.7 pav. Amiloidinių baltymų agregacijos kreivė (Brundin et al., 2010).

1.5. S100A baltymų agregacija

Kol kas apie S100A baltymų agregaciją yra mažai žinoma, o apie jų poveikį ląstelėms dar mažiau, bet pora mokslininkų grupių yra pradėję tirti S100A baltymų amiloidiškumą. Mielų ląstelėse ekspresuojami S100A8 ir S100A9 baltymai formavo agregatus, kurie nebuvo toksiški, bet atsparūs NDS. Sumažinus šaperonų Hsp104 ir Hsp70 kiekį mielėse, agregatai tapo toksiški, kas parodo, kad baltymų sulankstymo sistemos gali sąveikauti su S100A8/A9 amiloidiniais agregatais (Eremenko et al., 2013). Mokslininkas Caludio M. Gomes ir jo kolegos parodė, kad S100A6 agreguoja į amiloidines fibriles ir skatina superoksido dismutazės agregaciją (Botelho et al., 2012). Ta pati grupė nusprendė patikrinti kitus S100A baltymus ir pastebėjo, kad S100A2, A3, A4, A6, A8/A9, 12 ir B formavo amiloidines fibriles (Carvalho et al., 2013). Be to pastebėta, kad S100A8/S100A9 heterodimeras formuoja amiloidinius darinius prostatėje, kurie gali būti atsakingi už vėliau išsivystantį prostatos vėžį (Yanamandra et al., 2009). Įvertinus bioinformatiškai S100 baltymų amiloidiškumą, pastebėta, kad šie baltymai pasižymi didele tikimybe agreguoti ir net kai kurie atstovai, kaip S100A9 turi didesnę įvertį negu β -amiloido peptidas (Fritz et al., 2010).

1.6. Ligos

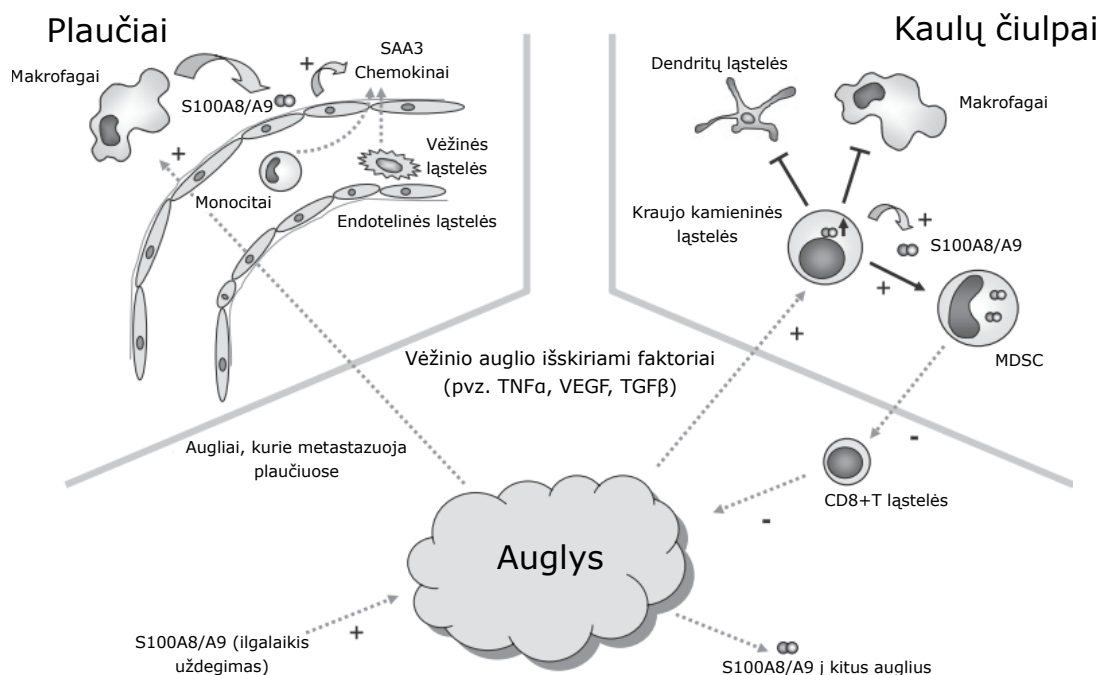
S100A baltymai siejami su vėžiu, žarnyno ir sąnarių uždegimais, pogleivinės fibrozės, širdies ligomis ir neurodegeneratyvinėmis ligomis (Ong et al., 2014). Kadangi S100A baltymai svarbūs daugelyje ligų, nenuostabu, kad mokslininkai ieško naujų būdų kaip aptikti ligas ir sekti ląstelinius procesus pasitelkiant S100A baltymus. Vienas iš pasiūlymų, kad S100A8/S100A9 yra tinkamas naudoti kaip biologinis žymeklis sekti uždegiminius procesus, kadangi uždegimų metu jų ekspresija yra stipriai padidėjusi ir jie gali sudaryti apie 40 % visų citozolinių baltymų granuliocituose (Vogl et al., 2014). Be to, gripo viruso infekcijos metu S100A9 buvo pagrindinis baltymas reguliuojantis imuninį atsaką ir uždegiminę kaskadą (Tsai et al., 2014).

Tiriant genų transkripciją pacientuose su didele širdies infarkto rizika, pastebėta, kad S100A9 gali būti vienas iš reguliatorinių baltymų. Tolimesni tyrimai parodė, kad S100A9 ir S100A8 sintezės lygis buvo padidėjęs aterosklerozės metu bei pelių makrofagai be S100A9 geno mažiau sintetino citokinų (Croce et al., 2009). Šie rezultatai gerai koreliuoja su ankstesniais tyrimais, kur buvo iškelta hipotezė, kad S100A8 ir S100A9 svarbūs valdant oksidacines pažeidas bei kalcio metabolizmą aterosklerozės metu (McCormick et al., 2005)

1.6.1. Vėžiniai susirgimai

S100A9 ekspresija yra padidėjusi krūties, storosios, tiesiosios žarnos, kepenų, skrandžio, plaučių, gimdos kaklelio, nosiaryklės ir šlapimo pūslės vėžiuose. (Markowitz ir Carson, 2013). Kai kuriuose vėžiuose, kaip storosios žarnos, S100A8/S100A9 indukavo ląstelių apoptozę (Ghavami et al., 2004). Skrandžio vėžyje, S100A9 buvo svarbus vėžinių ląstelių migracijai ir invazijai (Kwon et al., 2013). Buvo patvirtinta, kad S100A9 sąveikauja su p53 baltymo genu ir gali indukuoti apoptozę (Li et al., 2009). Odos vėžyje S100A4 ir S100A9 aktyvuoja RAGE ir EMMPRIN receptorius, kurie atitinkamai incijuoja transkripcijos faktorių NF- κ B veikimą. NF- κ B padeda sintetinti citokinus ir metaloproteinazes, kurios skatina vėžinių ląstelių metastazę ir invaziją. Sekančiame etape vėžinės ląstelės gali išskirti egzosomas, kurios skatintų S100A8/S100A9 baltymų sintezę priešmetastazinėse nišose (Bresnick et al., 2015). Taip pat, pelėse pašalinus S100A9 arba TLR 4 receptoriaus genus, sulėtėja prostatos vėžio plitimas. Toks pat poveikis pastebimas naudojant junginius, kurie slopina sąveiką tarp S100A9 ir TLR4 receptoriaus (Källberg et al., 2012).

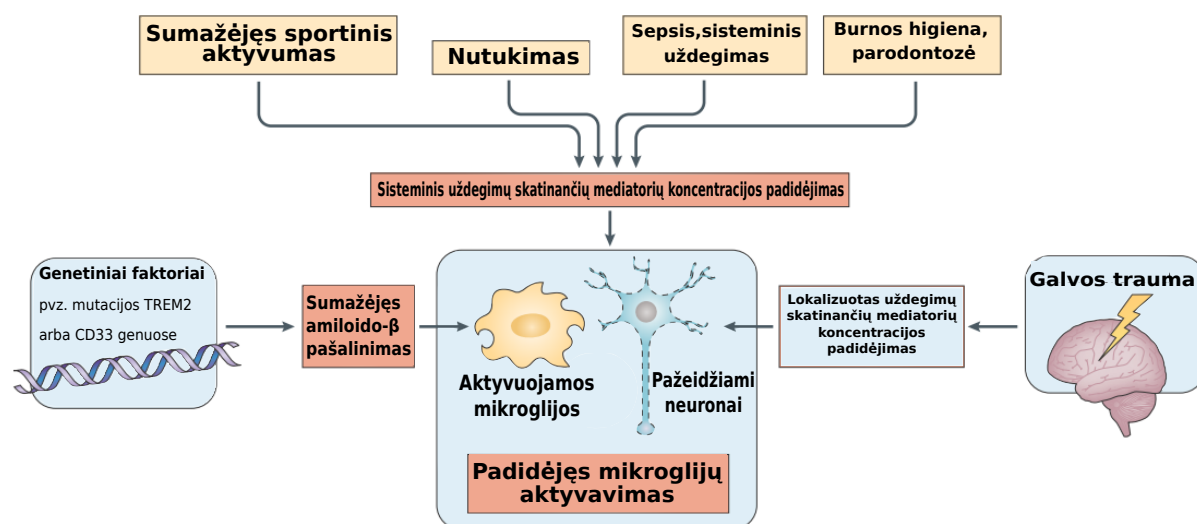
Apibendrinant, S100A8/S100A9 gali tiesiogiai ir netiesiogiai veikti vėžinio auglio progresiją: iš auglio išskiriami įvairūs faktoriai aktyvina mieloidinės kilmės supresines ląsteles (angl. MDSC), kurios slopina T-ląsteles, taip padedant augliui augti. Patys augliai gali perduoti S100A8/S100A9 baltymus arba skatinti jų ekspresiją (pvz. plaučiuose), kad išlaikytų ilgalaikį uždegimą (1.8 pav.) (Ehrchen et al., 2009).



1.8 pav. S100A baltymų įtaka vėžio vystymuisi (Ehrchen et al., 2009).

1.6.2. Lėtiniai uždegimai

Lėtiniai uždegimai yra artimai susieti su neurodegeneratyvinėmis ligomis. Esant lėtiniam uždegimams, aktyvuojamos mikroglijos - ląstelės, kurios atsakingos už imuninę atsaką, audinių homeostazę, neuronų stabilumą ir jų tinklo funkcionavimą smegenyse. Mikroglijos yra aktyvuojamos DAMP/PAMP molekulių, kurios sąveikauja su TLR2, TLR4, TLR6 receptoriais (Heneka et al., 2014). Organizmui senstant, ląstelėse daugiau kaupiasi suagregavusių baltymų ir paraleliai daugėja uždegiminių procesų. Kadangi neuronai negali dalintis, tai agregatų koncentracija išlieka pastovesnė (nesiskiedžia) negu besidalinančiose ląstelėse. Agregatai sukelia lėtinį uždegimą, o uždegimo metu padidėja DAMP biomolekulių, kurių tarpe yra baltymai, kurie ir taip yra linkę agreguoti. Susidaro ciklas, kuris ir skatina neurodegeneratyvinių ligų pagreitėjimą (Currais et al., 2017). Lėtinių uždegimų svarba parodyta Alzheimerio ir Parkinsono ligose (1.9 pav.) bei yra pranešimų, kad S100A baltymai buvo žymiai stipriau sintetinami pelėse, sergančioms kempinlige (Xiang et al., 2004). Tyrimai su beždžionėmis parodė, kad suleidus β -amiloido fibrilių kartu su LPS į smegenis, Alzheimerio liga išsivystė per 3,5 mėnesio, o suleidus tik fibrilių - per 5 metus. LPS sukelia imuninę atsaką - lėtinį uždegimą, kuris ir nulėmė greitesnius ligos požymius (Philippens et al., 2016).



1.9 pav. Veiksniai nulemiantys neuronų pažeidimus (Heneka et al., 2014).

1.6.3. S100A baltymų svarba Alzheimerio ligoje

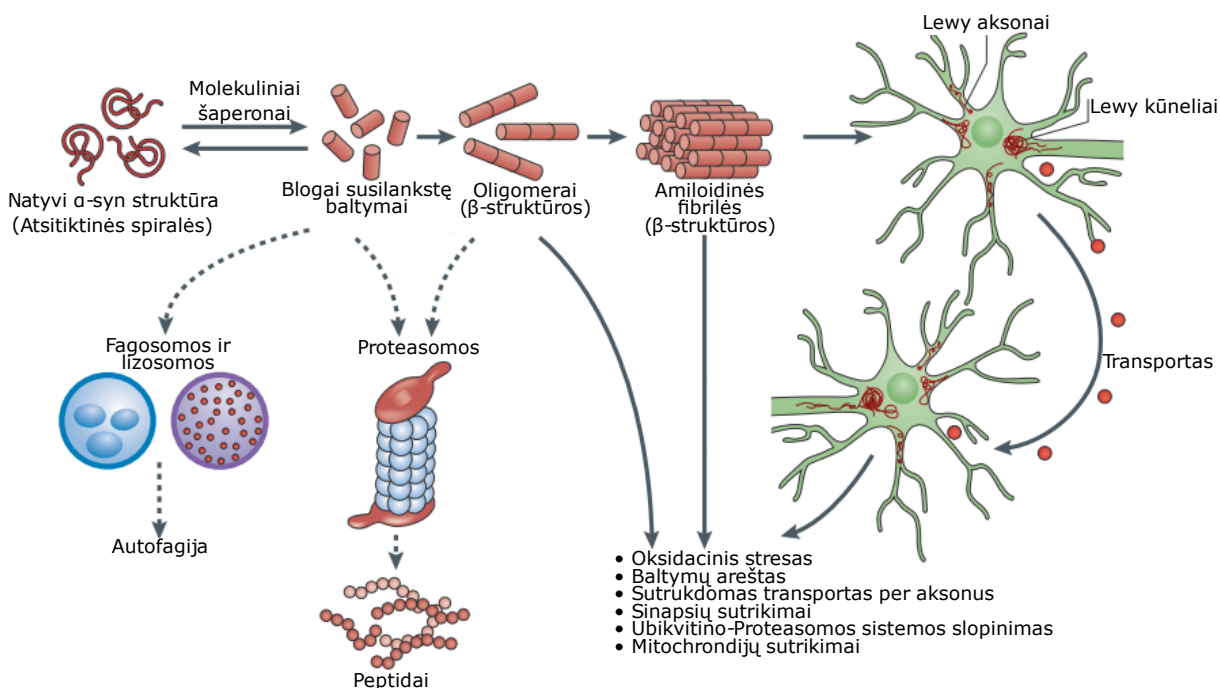
Pirmą kartą užsiminta apie S100A baltymų įtaką Alzheimerio ligai, buvo 1989 m., kai buvo parodyta, kad S100A baltymų koncentracijos buvo aukštos smegenų audiniuose, kurie buvo paimti iš žmonių, sergančių Dauno sindromu arba Alzheimerio liga (Griffin et al., 1989). Pastaraisiais dešimt metų S100A baltymus pradėta aktyviau sieti su neurodegeneratyvinėmis ligomis. 2006 m. buvo nustatyta, kad S100B, S100A9 ir S100A12 baltymų koncentracijos yra padidėjusios žmonių, sergančių Alzheimerio liga, smegenyse (Shepherd et al., 2006). Neseniai aptikta, kad iš 5 giminaičių, kuriems buvo nustatyta ankstyva demencija, 3 turėjo S100A9 E99K mutaciją (Van Giau et al., 2016). Pelės su išjungtu S100A9 genu pasižymėjo geresne atmintimi ir gebėjimu mokytis, taip pat rasta mažiau amiloidinių agregatų smegenyse (Kim et al., 2014). Lygiai tokie patys rezultatai gauti ir kitos mokslininkų grupės, kuri ir ištyrė, kad išjungus S100A9 geną pelėse, sumažėjo amiloidinių agregatų, pelės turėjo geresnę atmintį ir lengviau mokėsi lyginant su kontrolinėmis pelėmis (Chang et al., 2012). Yra žinoma, kad slopinant S100B arba S100A1 baltymų sintezę galima sulėtinti Alzheimerio ligą (Afanador et al., 2014; Roltsch et al., 2010). Demencija sergančių žmonių smegenų skystyje randamas S100A7, kuris geba mažinti β -amiloido agregatų susidarymą, aktyvinant metaloproteinazes (Qin et al., 2009). S100A6 aktyvumas Alzheimerio ligoje fokusuotas astrocituose, kurie smegenų pilkoje masėje buvo išsidėstę aplink senatvines plokšteles (β -amiloido agregatų sankaupos) (Boom et al., 2004).

1.6.4. S100A baltymų svarba Parkinsono ligoje

α -sinukleino agregacija siejama su Parkinsono liga, kurios metu nyksta neuronai juodojoje smegenų medžiagoje (smegenų dalyje, kuri atsakinga už judesių kontrolę) (1.10

pav.). Neuronų nykimo metu susidaro „Lewis” kūneliai, kurie sudaryti iš α -sinukleino amiloidinių agregatų (Spillantini et al., 1997). Pas pacientus, sergančius Parkinsono liga, taip pat susidaro β -amiloido ir Tau baltymo agregatai, kurie rodo Alzheimerio/demencijos ligos požymius (Irwin et al., 2013).

Uždegiminiai procesai yra svarbūs Parkinsono ligoje ir yra žinoma, kad α -sinukleinas turi įtakos uždegimo iniciacijai ir palaikymui (Alvarez-Erviti et al., 2011). Mokslininkai K. Sathe ir W. Meatzler ištyrė, kad S100B baltymo koncentracija yra padidėjusi Parkinsono ligos metu ir gali padėti ligos vystymuisi dėl sukeliama uždegiminio atsako (Sathe et al., 2012). S100 baltymų ir α -sinukleino agregatų lokalizacija Švano ląstelėse gali sutapti (Nakamura et al., 2015). Be to esant periferinių nervų pažeidai, S100A8/S100A9 aktyvina Švano ląstelių imuninį atsaką, spėjama per TLR4 ir RAGE receptorius, nes abu jie yra sintetinami Švano ląstelėse (Chernov et al., 2015). Taip pat rasta S100A9 metionino modifikacija su sulfoksidu, kas yra retas atvejis ir dažnai tokios modifikacijos pasitaiko Parkinsono bei Alzheimerio ligose (Lim et al., 2011). Iš pacientų, sergančių demencija, išskyrus tirpius ir suagregavusius baltymus, tarp daugiausiai suagregavusių baltymų buvo S100A9 (Adav et al., 2016).



1.10 pav. α -sinukleino agregacijos kelias (Irwin et al., 2013).

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos

- *AB Vilniaus degtinė*: 96 % etanolis;
- *Acros organic*: $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 , glicerolis;
- *Roth*: KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, KCl, Na_2SO_4 , ampicilino natrio druska, $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$, laktozė, MgCl_2 ;
- *Fisher scientific*: TRIS, glicinas, NDS, acto rūgštis, TEMED, EZ-run baltymų dažymo tirpalas, EZ-run baltymų molekulinės masės markeris, K_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Gnd-HCl, NaOH, HCl, H_3PO_4 , DTT, IPTG, amonio persulfatas, akrilamido/bis-akrilamido 30 % tirpalas, triptonas, MgSO_4 , gliukozė;
- *General Chemical Division, Baker and Adamson*: $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$;
- *Oxoid*: Mielų ekstraktas;
- *Sigma-Aldrich*: PIPES, ANS;

2.1.1. Rinkiniai

- *Fisher scientific* Plazmidės išskyrimo rinkinys „Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit“;
- *Fisher scientific* Western bloto substrato rinkinys „Pierce™ ECL Western Blotting Substrate“ ;

2.1.2. Konstruktai

Plazmidės su α -Sinukleino ir S100A9 genais buvo dovanotos Dr. Rolando Meškio (*Biochemijos institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus Universitetas*) ir Prof. Ludmilla Morozova-Roche grupių (*Medicininės Biochemijos ir Biofizikos skyrius, Umėjos Universitetas, Umėja, Švedija*).

2.1.3. Antikūnai

Antikūnai buvo naudoti „Erasmus“ praktikos metu, Umėjos Universitete, Švedijoje

- Triušio A11 : prieš įvairių baltymų oligomerus nutaikytas pirminis antikūnas
- Triušio OC : prieš amiloidinių fibrilių struktūrinius motyvus nutaikytas pirminis antikūnas
- Triušio antrinis antikūnas (sujungtas su peroksidaze)

2.1.4. Sorbentai

GE Healthcare:

- „DEAE SepharoseTM Fast Flow“;
- „Q SepharoseTM Fast Flow“;
- „SuperdexTM 75 prep grade“;

2.1.5. Laboratorinė įranga

- Autoklavas „AHS-75N“ (Raypa);
- Centrifugos „Eppendorf 5424“ (F-45-18-11-Kit rotorius), HiCen SR (AF 6.500, AF 8.50.2 rotoriai)(HeroLab), „EBA 12R“ (1116 rotorius);
- Chromatografijos sistema „ÄKTApurifier“ (GE Healthcare);
- Chromatografijos sistema „ÄKTAEplorer“ (GE Healthcare)
- Chromatografinės kolonėlės „XK 26/20“, „Tricorn 10/300“ (GE Healthcare);
- Dializės žarnos: 28,7 mm ir 49,5 mm diametro „Zella Trans Roth“ (pralaidumas -6-8 kDa);
- Elektroforezės aparatas „Biometra Minigel-Twin“ su „Biometra PS 300T“ srovės šaltiniu;
- Atominės jėgos mikroskopas „Bruker: Dimension Icon“;
- Atominės jėgos mikroskopas „Bruker: Bioscope Catalyst“;
- Filtravimo indeliai „Millipore Stericup“ (filtracinio popierėlio porų dydis-0,22 μm^2)
- Kalorimetras „MicroCal iTC 200“;
- Koncentratoriai „Amicon® Ultra-15“ (pralaidumas-10 kDa);
- Laboratorinės svarstyklės: „KERN ABJ“, „KERN PCB 400-2“, „Kern PLJ 6000-1GM“;
- Liofilizatorius: „The FreeZone Triad Freeze Dry Systems“;
- Magnetinės maišyklės: „VARIOMAG Maxi Direct“, „BIOSAN MSH-300“, „Velp Scientifica ARE“, „C-MAG HS7 (IKA)“, „LABORTECHNIK RCT basic“ (IKA);
- Maišyklė „CLASSIC vortex mixer“ (VELP Scientifica);

- pH-metras „Orion DUAL STAR meter“ (Thermo Scientific);
- Purtyklė „KS 4000i“ (IKA);
- Realaus laiko PGR analizatorius „Rotor-Gene Q real-time analyzer“ (GE Healthcare),
- Spektrofotometrai: „UV-1800“ (Schimadzu), „Varian Cary Eclipse“, „Biotek Synergy H4 Multi-Mode Reader“, „Tecan P-200“;
- Švirkštinis filtras (diametras-30 mm, porų dydis 0,22 μm);
- Termostatas „Eppendorf Thermostat plus“;
- Ultragarso šaltinis „Bandelin Sonopuls 3100“ (antgaliai: VS70/T, MS72);
- Vakuuminė filtravimo įranga „Sigma-Aldrich“;
- Vandens valymo sistema „Simplicity UV system“

2.1.6. Mitybinės terpės

- Agarizuota LB terpė: 25 g LB-Medium terpės ir 15 g agaro ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens, pH 7. Terpė autoklavuojama 20 min. 121°C.
- LB(Luria-Bertani) terpė: 25 g LB-Medium terpės ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens, pH 7. Terpė autoklavuojama 20 min. 121°C.
- S.O.C. mitybinė terpė: 2 g triptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 3,5 mM KCl, 10 mM MgSO_4 , 10 mM MgCl_2 , ir 20 mM gliukozės. Peptonas, mielių ekstraktas, KCl ir NaCl tirpinami 97 ml dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 20 min. 121°C temperatūroje.
- Auto-induktyvi terpė: 24 g triptono, 12 g mielių ekstrakto, 8,52 g Na_2HPO_4 , 8,16 g KH_2PO_4 , 6,4 g NH_4Cl , 1,68 g Na_2SO_4 , 1,18 g MgSO_4 ištirpinama 2,3 l dejonizuoto vandens. 12 g glicerolio, 1,2 g gliukozės, 4,8 laktozės atskirai ištirpinami 100 ml dejonizuoto vandens. Tirpalai autoklavuojami 20 min ir steriliai sumaišomi tarpusavyje.

2.1.7. Tirpalai

- **A1 buferinis tirpalas:** 20 mM Tris–HCl, 0,5 mM DTT pH 8. Ištirpinama, skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 800 ml, tirpalo pH koreguojamas su HCl tirpalu ir skiedžiama iki 1000 ml. Filtruojamas per 0,45 μm porų dydžio filtrą.
- **B1 buferinis tirpalas:** 20 mM Tris–HCl, 0,5 M NaCl 0,5 mM DTT pH 8. Ištirpinama, skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 800 ml, tirpalo pH koreguojamas su HCl tirpalu ir skiedžiama iki 1000 ml. Filtruojamas per 0,45 μm porų dydžio filtrą.

- **B2 buferinis tirpalas:** 20 mM Tris–HCl, 1 M NaCl, 1 mM EDTA. 0,5 mM DTT pH 8. Ištirpinama, skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 800 ml, tirpalo pH koreguojamas su HCl tirpalu ir skiedžiama iki 1000 ml. Filtruojamas per 0,45 µm porų dydžio filtrą.
- **B3 buferinis tirpalas:** 20 mM Tris–HCl, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA. 1 mM PMSF pH 8. Ištirpinama, skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 800 ml, tirpalo pH koreguojamas su HCl tirpalu ir skiedžiama iki 1000 ml. Filtruojamas per 0,45 µm porų dydžio filtrą.
- **D buferinis tirpalas:** 20 mM Tris–HCl 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, pH 8. Ištirpinama, skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 800 ml, tirpalo pH koreguojamas su HCl tirpalu ir skiedžiama iki 1000 ml. Filtruojamas per 0,45 µm porų dydžio filtrą.
- **PBS buferinis tirpalas:** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 7,4 pH. 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ ištirpinama 800 ml dejonizuoto vandens. pH koreguojamas su HCl, NaOH ir skiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 1000 ml. Filtruojamas per 0,45 µm porų dydžio filtrą.
- **0,5 M PIPES tirpalas:** 15,1 g PIPES ištirpinama 80 ml dejonizuoto vandens, pridedama pH iki 6,7 su NaOH, pripilama dejonizuoto vandens iki 100 ml, filtruojama per 0,45 µm porų dydžio filtrą.
- **Transformacijos buferis:** 10,88 g MnCl × 4H₂O, 2,2 g CaCl₂ × 2H₂O, 18,65 KCl, ištirpinama 900 ml dejonizuoto vandens, pridedama 20 ml 0,5 M PIPES, pripilama dejonizuoto vandens iki 1 l, filtruojama per 0,45 µm porų dydžio filtrą.
- **10x baltymų elektroforezės buferis:** 30,2 g TRIS, 144 g glicino, 10 g NDS tirpinami 850 ml dejonizuoto vandens. Skiedžiama iki 1 l. Leidžiant elektroforezę, buferis praskiedžiamas 10 kartų.

2.2. Metodai

2.2.1. Kompetentinių ląstelių ruošimas

1 µl atšildytų ląstelių praskiedžiama su LB terpe iki 1000 µl. 20 µl praskiestų ląstelių užsėjama ant agarizuotos LB terpės ir auginama 37°C termostate per naktį. Iš užaugusių kolonijų paimama viena kolonija ir užsėjama į 10 ml LB terpės, auginama purtyklėje (37°C, 220 aps/min). Ryte 2,5 ml naktinės kultūros persėjama į 250 ml LB terpės ir auginama iki 0,53 OT₆₀₀. Pasiekus 0,53 optinį tankį, ląstelės centrifuguojamos 2500 x g, 10 min +4°C. Supernatantas nupilamas, o ląstelės resuspenduojamos 80 ml šalto transformacijos buferinio tirpalo ir vėl centrifuguojama 2500 x g, 10 min +4°C. Supernatantas nupilamas,

ląstelės resuspenduojamos 20 ml šalto transformacijos buferinio tirpalo ir įpilama 1,5 ml DMSO. Suspensija pamaišoma ir inkubuojama 10 min ant ledo. Po 10 min ląstelės greitai išpilstomos į atšaldytus sterilius mėgintuvėlius ir užšaldomos -80°C .

2.2.2. Kompetentinių ląstelių transformacija

Į 100 μl atšildytų kompetentinių ląstelių įdedama 1 μl plazmidinės DNR ir inkubuojama 30 min ant ledo. Po inkubacijos vykdomas karščio šokas: ląstelės laikomos 1,5 min 42°C termostate ir 2 min ledo vonelėje. Įpilama 400 μl S.O.C. terpės ir 45 min inkubuojama kratytis purtyklėje (37°C , 220 aps/min). Centrifuguojama 2 min 6000 x g. 200 μl supernatanto nupilama, o likusiame tūryje resuspenduojamos ląstelės ir išsėjamos Petri lėkštelėje ant agarizuotos LB terpės. Inkubuojama termostate 37°C 16h.

2.2.3. Kultūros auginimas ir tikslinio baltymo raiškos indukcija

Naktinė kultūra ruošama į 100 ml autaklavuotos LB terpės įpilant 100 μl ampicilino (100 $\mu\text{g/l}$) bei užsėjant atsitiktinę transformuotą *E.coli* bakterijų koloniją. Bakterijos auginamos per naktį purtyklėje (16h, 37°C , 220 aps/min). Ryte į 4 paruoštas kolbas su 400 ml autoklavuotos LB terpės ir ampicilino (100 $\mu\text{g/l}$) įpilama po 20 ml naktinės kultūros. Ląstelės auginamos 37°C , 220 aps/min, stebint optinį tankį (matuojama spektrofotometru $\lambda = 600 \text{ nm}$). Kas 30 min tikrinamas optinis tankis ir imami mėginiai po 300 μl elektroforezei. Pasiėkus 0,6 - 0,8 OT_{600} indukuojama tikslinio baltymo raiška: į kiekvieną kolbą įdedama 400 μl 1 M IPTG ir paliekama ląstelės augti. Ryte surenkama biomasė centrifuguojant 40 min 4700 x g.

Auginant auto-induktyvioje terpėje, indukuoti nereikia, tiesiog ryte surenkama biomasė centrifuguojant 40 min 4700 xg

2.2.4. Baltymų elektroforezė

Elektroforezės geliai ruošiami pagal žemiau pateiktą lentelę (Lentelė 2). Pirmiausia ruošiamas 16 % skiriamasis gelis. Mišinys pilamas tarp dviejų stiklinių elektroforezės plokštelių, ant viršaus užpilama dejonizuoto vandens. Po 40 min., kai gelis pilnai polimerizavosi, ruošiamas 4 % gelis. Nusiurbus vandenį nuo skiriamojo gelio, pilamas koncentruojamojo gelio mišinys ant viršaus ir įstatomos „šukos“. Geliui sustingus, po 30 min. elektroforezės plokštelės įstatomos į elektroforezės aparatą. Aparato talpyklos užpildomos elektroforezės buferiu. Elektroforezės metu palaikoma 150 V galia su 40 mA srovės riba. Dažui „išėjus“ iš gelio, aparatas išjungiama, o gelis išimamas iš stiklinių plokštelių ir skalaujamas 15 min. dejonizuotu vandeniu. Praplovus gelį, jis dažomas Ez-run baltymų dažu 45 min. ir paliekamas dejonizuotame vandenyje išryškėti

2 lentelė. Elektroforezės skiriamo ir koncentruoto gelio sudėtis

Apatinis skiriamasis 16% gelis		Viršutinis koncentruojamasis 4% gelis	
H_2O	1,94 ml	H_2O	1,27 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,53 ml	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	500 μ l
40% AA/AB	2,44 ml	40% AA/AB	201 μ l
10% SDS	61 μ l	10% SDS	20 μ l
10% APS	30,5 μ l	10% APS	10 μ l
TEMED	3,65 μ l	TEMED	2 μ l

2.2.5. S100A9 baltymo renatūracija ir gryninimas

Biomasė resuspenduojama PBS buferiniam tirpale ir homogenizuojama. Laikant ledo vonelėje, homogenatas ardomas ultragarsu (20 min., 70 % amplitudė, 60 s veikimo / 60 s poilsio režimu). Suardyta biomasė centrifuguojama (4 °C, 25 min. 30000 x g). Supernatantas nupilamas, nuosėdos resuspenduojamos 1 M karbamido ir vėl centrifuguojama. Supernatantas nupilamas, nuosėdos ištirpinamos 6 M Gnd-HCl tirpale ir paliekama dializuotis D buferiniame tirpale (15 h, 3 kartus pakeičiant buferinį tirpalą). Po dializės tirpalas centrifuguojamas ir supernatantas maišomas su pusiausvyrintu DEAE sefarozės sorbentu. Sorbentas užkraunamas į koloną, kuri prijungiama prie chromatografijos sistemos. Kolona praplaunama 100 ml A1 buferinio tirpalo. Tikslinis baltymas atplaunamas, leidžiant laiptinį B1 buferinio tirpalo gradientą. Baltymo absorbcija matuojama spektrofotometru ($\lambda = 280$ nm, $\epsilon = 6990$ M⁻¹ cm⁻¹), o koncentracija nustatoma pagal Bero ir Lamberto dėsnį. Baltymas koncentruojamas iki 6 mg/ml naudojant „Amicon® Ultra-15“ koncentratorius.

Sukoncentruotas baltymas leidžiamas per gilfiltracinę kolonėlę, pakrautą SuperDex75 sorbentu. Gel-filtracijos metu atsiskiria skirtingo dydžio baltymai bei pakeičiamas buferinis tirpalas į mūsų norimą. Baltymo koncentracija pamatuojama ir koncentruojama kaip aprašyta prieš tai.

2.2.6. α -sinukleino baltymo gryninimas

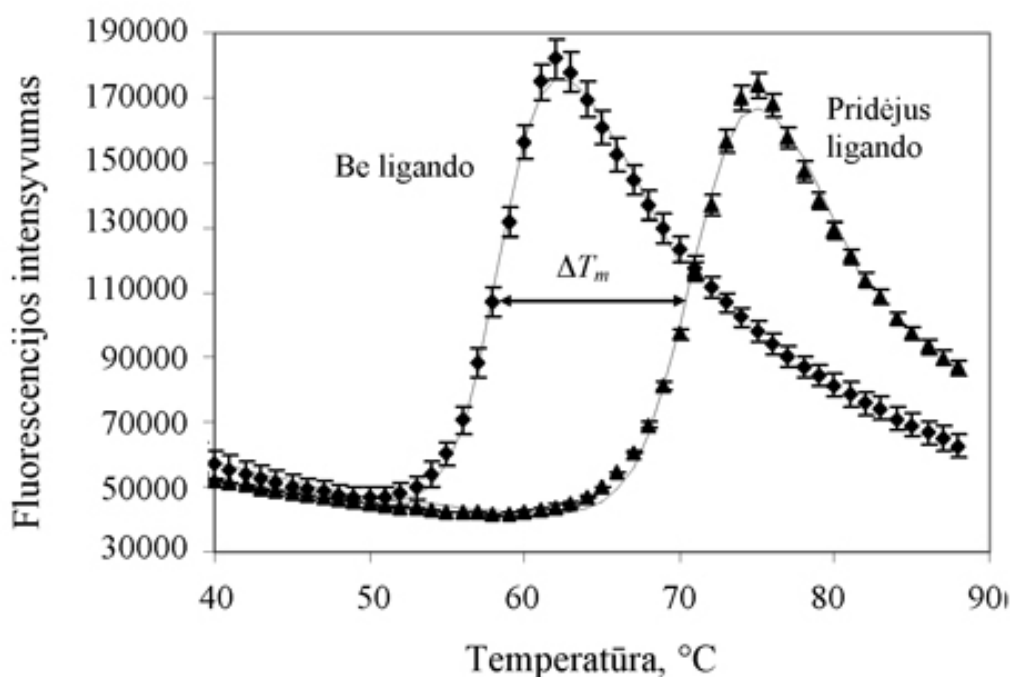
Biomasė resuspenduojama B3 buferiniame tirpale ir homogenizuojama. Laikant ledo vonelėje, homogenatas ardomas ultragarsu (20 min., 70 % amplitudė, 60 s veikimo / 60 s poilsio režimu). Suardyta biomasė centrifuguojama (4 °C, 25 min. 30000 x g). Supernatantas pasilieamas ir kaitinama 20 min 100 °C vandens vonelėje. Iškaitintas tirpalas centrifuguojamas (4 °C, 25 min. 30000 x g). Supernatantas pasilieamas ir dializuojamas D buferiniame tirpale. Po dializės tirpalas maišomas su pusiausvyrintu DEAE sefarozės sorbentu. Sorbentas užkraunamas į koloną, kuri prijungiama prie chromatografijos sistemos. Kolona praplaunama 100 ml A1 buferiniu tirpalu. Tikslinis baltymas atplaunamas, leidžiant B2 buferinio tirpalo gradientą. Surinktos frakcijos dializuojamos D buferiniame tirpale, po dializės tirpalas maišomas su pusiausvyrintu Q sefarozės sorbentu. Sorbentas

užkraunamas į koloną, kuri prijungiama prie chromatografijos sistemos. Kolona praplaunama 100 ml A1 buferiniu tirpalu. Tikslinis Baltymas atplaunamas, leidžiant B2 buferinio tirpalo gradientą. Baltymo absorbcija matuojama spektrofotometru ($\lambda = 280$ nm, $\epsilon = 5960$ M⁻¹ cm⁻¹), o koncentracija nustatoma pagal Bero ir Lamberto dėsnį. Baltymas liofilizuojamas

Ištirpinamas baltymas 3 M NaCl tirpale ir leidžiamas per gilfiltracinę kolonėlę, pakrautą SuperDex75 sorbentu. Tikslinis baltymas surenkamas. Baltymo koncentracija nustatoma ir koncentruojama kaip aprašyta prieš tai.

2.2.7. Diferencinio skenavimo fluorimetrijos metodas

Nustatyti baltymo išsivyniojimo temperatūrą naudojamas diferencinio skenavimo fluorimetrijos metodas. Šio metodo metu naudojamas ANS dažas, kurio fluorescencija padidėja, kai išsivynioja baltymas (dėl atsiradusių hidrofobinių regionų). Baltymo T_m , tai yra tokia temperatūra, kai pusė visų baltymo molekulių yra išsivynioję, pusė dar turi struktūrinius motyvus. Eksperimentuose buvo naudojama 100 mM MES pH 6, 0,5 mM DTT buferinis tirpalas su 100 μ M ANS dažo ir 100 μ M baltymo koncentracija.



2.1 pav. Diferencinio skenavimo fluorescencijos kreivės (Matulis, 2008).

2.2.8. Triptofano fluorescencijos matavimai

Tirpalas su baltymu inkubuojamas fluorimetre 5 min, esant skirtingomis temperatūromis (25 °C, 50 °C, 90 °C) ir pamatuojama triptofano fluorescencija. (sužadinimas 295 nm, emisija matuojama 310-400 nm bangų srityje)

2.2.9. Izoterminio titravimo kalorimetrija

Titravimui naudojamas „MicroCal iTC 200“ kalorimetras. Baltymo-kalcio sąveikos tyrimams matavimo kiuvetė užpildoma baltymo tirpalu, o švirkštas - kalcio tirpalu. Iš švirkšto yra titruojama su pasirinktu intervalu ir kiekiu. Titravimo metu matuojama išsiskyrusi šiluma. Mėginiai buvo paruošti 100 mM MES pH 6, 0,5 mM DTT buferiniame tirpale. Celės tūris - 200 μ l, švirkšto 40 μ l.

2.2.10. *De novo* fibrilių susidarymas

Mėginiai su skirtinga S100A9 baltymo koncentracija (0,5 mg/ml -5 mg/ml) paruošiami skirtinguose buferiniuose tirpaluose ir inkubuojami termostate 42°C. Mėginiai laikomi 4 dienas.

2.2.11. Mėginių paruošimas atominės jėgos mikroskopijai

S100A9 ir α -sinukleino baltymų fibrilės buvo patikrintos atominės jėgos mikroskopu. 20 μ l S100A9 mėginio arba 20 μ l α -sinukleino kartu su 10 μ l 1 M HCl buvo užnešami ant lygaus žėručio dengtų diskų ir 5 min laikomi kambario temperatūroje. Toliau mėginiai ant žėručio praplaunami 1 ml Mili-Q vandens ir nudžiovinami.

2.2.12. Taškinis imunoblotas

PVDF membrana sudrėkinama metanoliu ir plaunama PBS tirpalu vieną kartą. 2 μ l mėginio uždedama ant membranos ir palaukiama kol nudžius lašelis. Nespecifinės membranos vietos užblokuojamos pieno miltelių tirpalu. Sekančiame etape membrana praplaunama PBS tirpalu ir inkubuojama su pirminiu antikūnu 1h. Membrana vėl praplaunama su PBS tirpalu ir inkubuojama su antriniu antikūnu per naktį. Po nakties dar kartą praplaunama su PBS tirpalu.

Tamsiame kambaryje membrana sudrėkinama su peroksidazės ir substrato tirpalu. Membrana perkeliama ant rentgeno spindulių filtro, kuris vėliau apšviečiamas rentgeno spinduliais. Išryškinimui filtras palaikomas apšviestoje patalpoje.

2.2.13. Agregacijos kinetika

Baltymai ištirpinami atitinkamuose buferiniuose tirpaluose ir prafiltruojami pro 0,45 μ m porų dydžio filtrą. Baltymų tirpalų absorbcija patikrinama ties 280 nm banga ir išskaičiuojama jų koncentracija pagal Lamberto-Bugerio-Bero dėsnį ($A = \epsilon cl$). Baltymo tirpalas išpilstomas į 96 šulinėlių lėkštelę. Fibrilių ilgėjimas matuojamas „Synergy H4 Multi-Mode Reader“ („Tecan P-200“, Švedijoje) spektrometru (sužadinimas 450 nm, emisija 482 nm). S100A9 agregacijai palaikomos 37 °C ir 42 °C temperatūros. Eksperimentuose su α -sinukleinu palaikoma 60 °C temperatūra.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

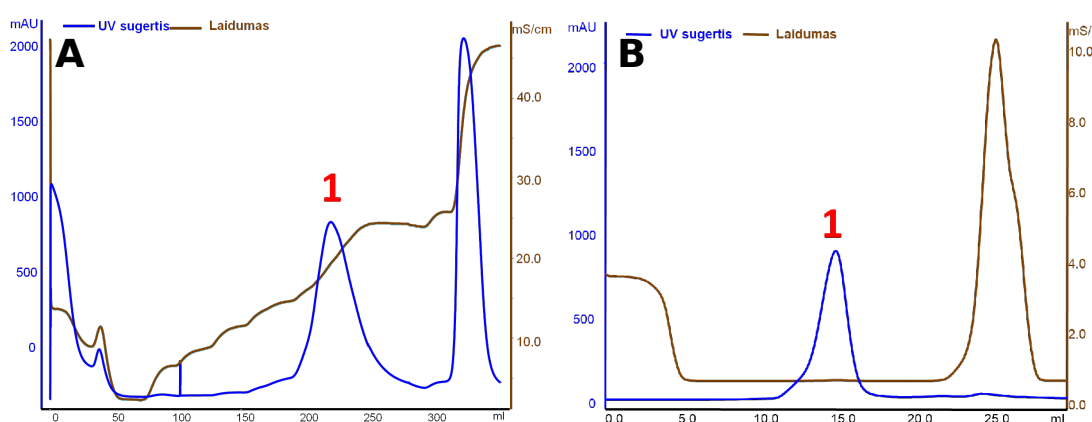
3.1. Rezultatų įvadas

Darbo projektas buvo išskirstytas į 3 dalis. Pirmojoje dalyje reikėjo išsiginčinti baltymus. S100A9 baltymas buvo grynintas pirmą kartą laboratorijoje, todėl reikėjo įsitikinti ar turima baltymo gryninimo metodika veiks. α -sinukleino gamyba buvo paprastesnė kadangi prieš tai buvo jau su juo dirbta, tačiau vis tiek atsirado tam tikrų netikėtumų. Taip pat šioje dalyje reikėjo įvertinti S100A9 baltymo stabilumą, jo sąveiką su kalciumu ir su kitais divalenciais metalais. Antrojoje dalyje reikėjo nustatyti baltymo agregacijos sąlygas ir amiloidinių fibrilių struktūras. Didelė šio darbo dalis buvo atlikta „Erasmus“ praktikos metu Švedijoje. Paskutinėje dalyje buvo bandyta įvertinti ar S100A9 baltymas turės įtakos α -sinukleino agregacijai, kadangi yra straipsnių, rašančių apie galimą S100A baltymo ryšį su α -sinukleinu. Taip pat mūsų kolegos (Dr. Ludmilla Morozova-Roche grupė) iš Švedijos turi rezultatų teigiančių apie galimą S100A9 ir α -sinukleino sąveiką.

3.2. Baltymų gryninimas

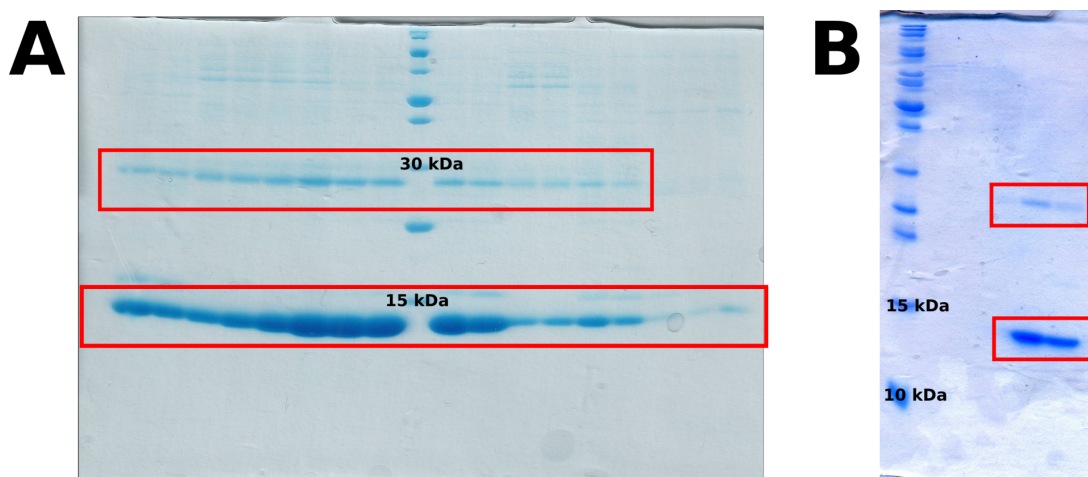
3.2.1. S100A9 gryninimas

E. coli bakterijose sintetinamas S100A9 baltymas buvo netirpus, todėl gryninimo pradžioje buvo pakankamai lengva atsikratyti tirpių baltymų (kaip aprašyta metodinėje dalyje). Jonų mainų chromatografijos stadijoje buvo išbandytas linijinis ir laiptinis gradientas. Geriausią rezultatą pavyko pasiekti taikant laiptinį gradientą. Tikslinis baltymas atsiplovė nuo kolonos nuo kolonos esant 0,125 M NaCl koncentracijai. Gelfiltracijos metu tikslinis baltymas iš kolonos pradeda ištekti ties 12 ml tūriu. Vidutiniškai iš vieno gryninimo buvo gauta apie 200 mg baltymo. S100A9 baltymo masė patikrinta masių spektrometrinės analizės metodu (atliko Dr. Vytautas Smirnovas).



3.1 pav. (A) S100A9 baltymo jonų mainų chromatograma. (B) S100A9 gelfiltracijos chromatograma.

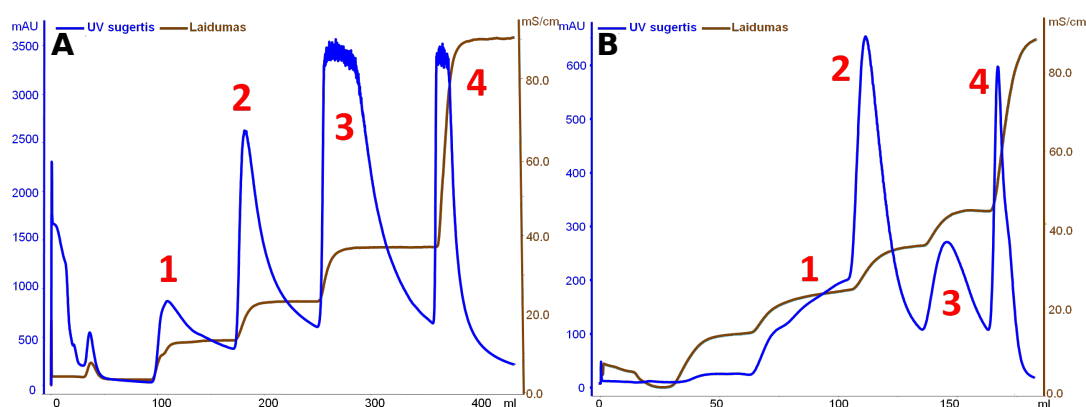
Kadangi baltymas buvo renatūruojamas, tai po gryninimo nebuvo aišku ar jis įgavo gerą struktūrą, todėl baltymo struktūra buvo įvertinta CD spektroskopija, kur buvo gautas spektras, tipiškas α -spiraliniams baltymams (2 priedas). Tikrinant baltymo grynumą NDS-PAGE metodu buvo pastebėta, kad gelyje matosi dvi juostelės, kurios pagal dydį atitinka - monomera ir dimerą (3.2 pav.). Bendrai buvo atlikti 7 gryninimai ir iš viso išgryninta 1,5 g baltymo.



3.2 pav. S100A9 elektroforezės geliai. (A) Gelis po jonų mainų chromatografijos. (B) Gelis po gelfiltracijos chromatografijos.

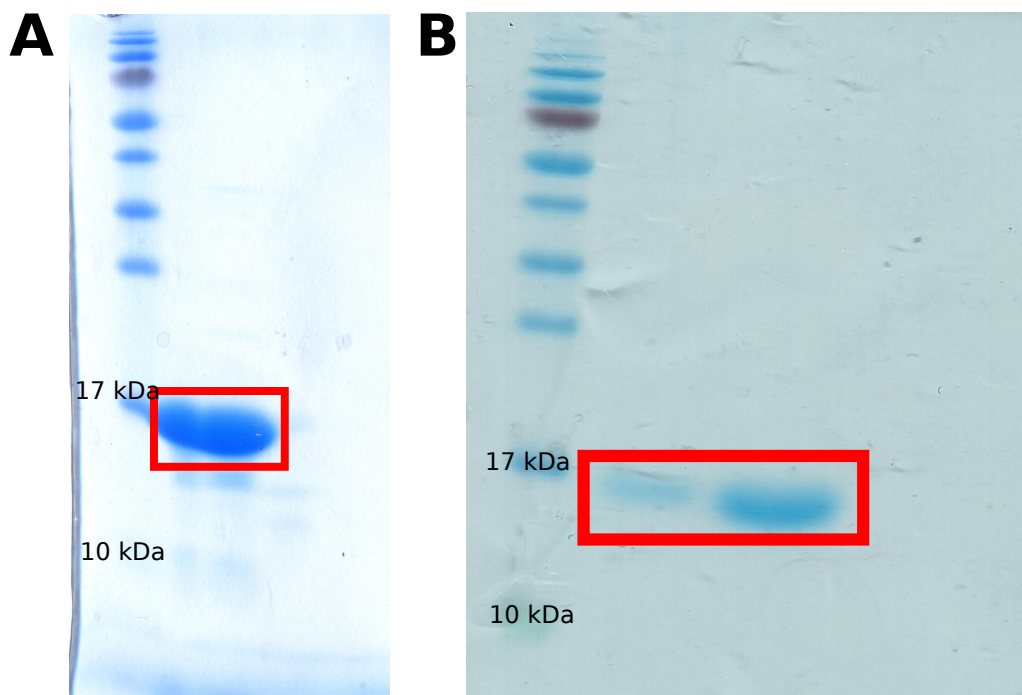
3.2.2. α -sinukleino gryninimas

E. coli bakterijose sintetinamas α -sinukleinas buvo tirpus. Kadangi jis neturi struktūros ir yra termostabilus, todėl daug kitų baltymų priemaišų pavyksta atsikratyti kaitinant baltymo tirpalą. Abiejose jonų mainų gryninimo stadijose baltymas buvo grynintas laiptiniu gradientu. Tikslinis baltymas atsiplaudavo nuo kolonos, esant 0,1 - 0,2 M NaCl koncentracijai.



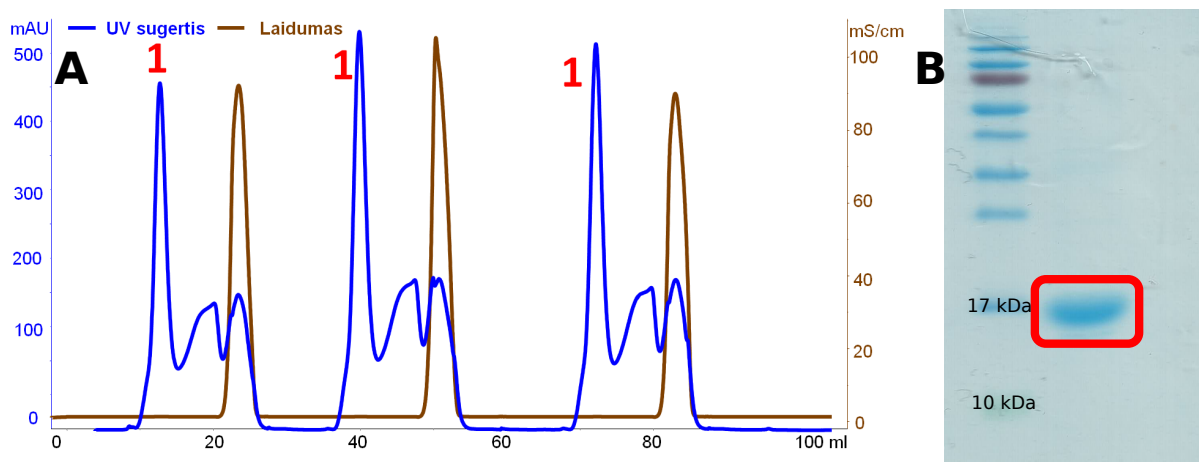
3.3 pav. (A) α -sinukleino pirma jonų mainų chromatograma (tikslinis baltymas 1 ir 2 smaileje). (B) α -sinukleino antra jonų mainų chromatograma (tikslinis baltymas 1 ir 2 smaileje).

Bendrai α -sinukleino iš dviejų gryninimų buvo išgryninta apie 600 mg.



3.4 pav. α -sinukleino elektroforezės geliai (A) Gelis po pirmos jonų mainų chromatografijos. (B) Gelis po antros jonų mainų chromatografijos.

Išgryninus baltymą ir pamatavus jo koncentraciją bei įvertinus 260/280 UV absorbcijos santykį, pastebėta, kad jis yra užterštas DNR, kadangi santykis buvo apie 1,5. Norint atsikratyti DNR, baltymas buvo tirpinamas 3M NaCl. Didelė druskos koncentracija susilpnina sąveiką tarp baltymo ir DNR. Kadangi jų masės skirtumas yra didelis, jie lengvai atsiskiria gelfiltracinėje kolonėlėje (3.5 pav.). α -sinukleino baltymo masė patikrinta masių spektrometrinės analizės metodu (atliko Dr. Vytautas Smirnovas).

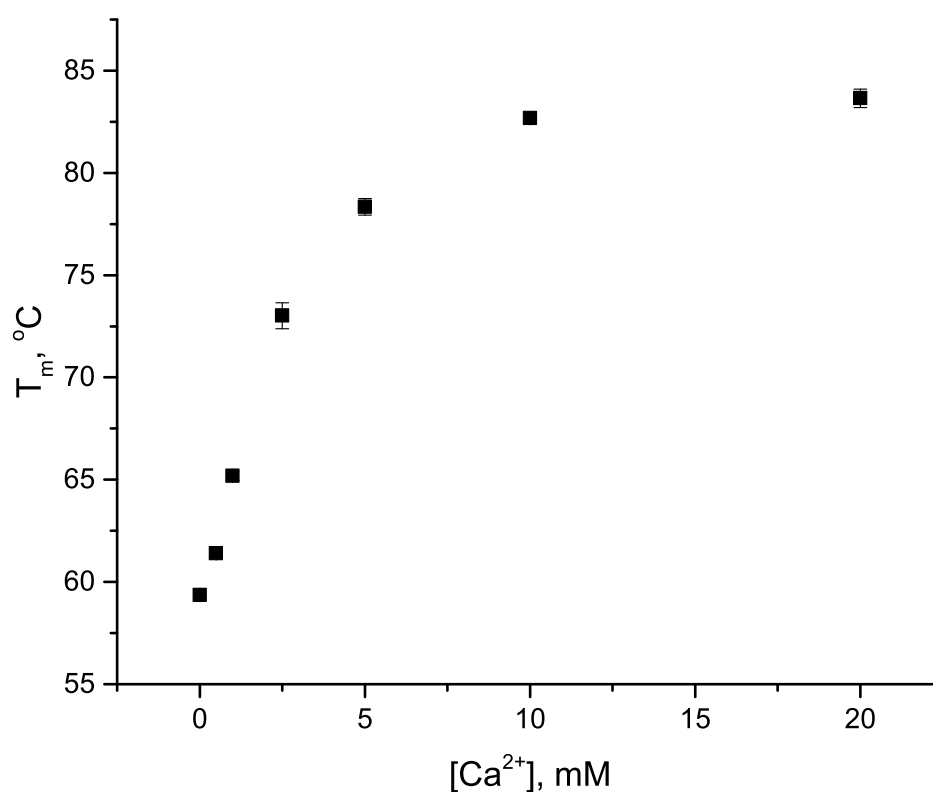


3.5 pav. (A) α -sinukleino gelfiltracijos chromatograma. (B) α -sinukleino elektroforezės gelis po gelfiltracijos.

3.3. S100A9 stabilumo tyrimai

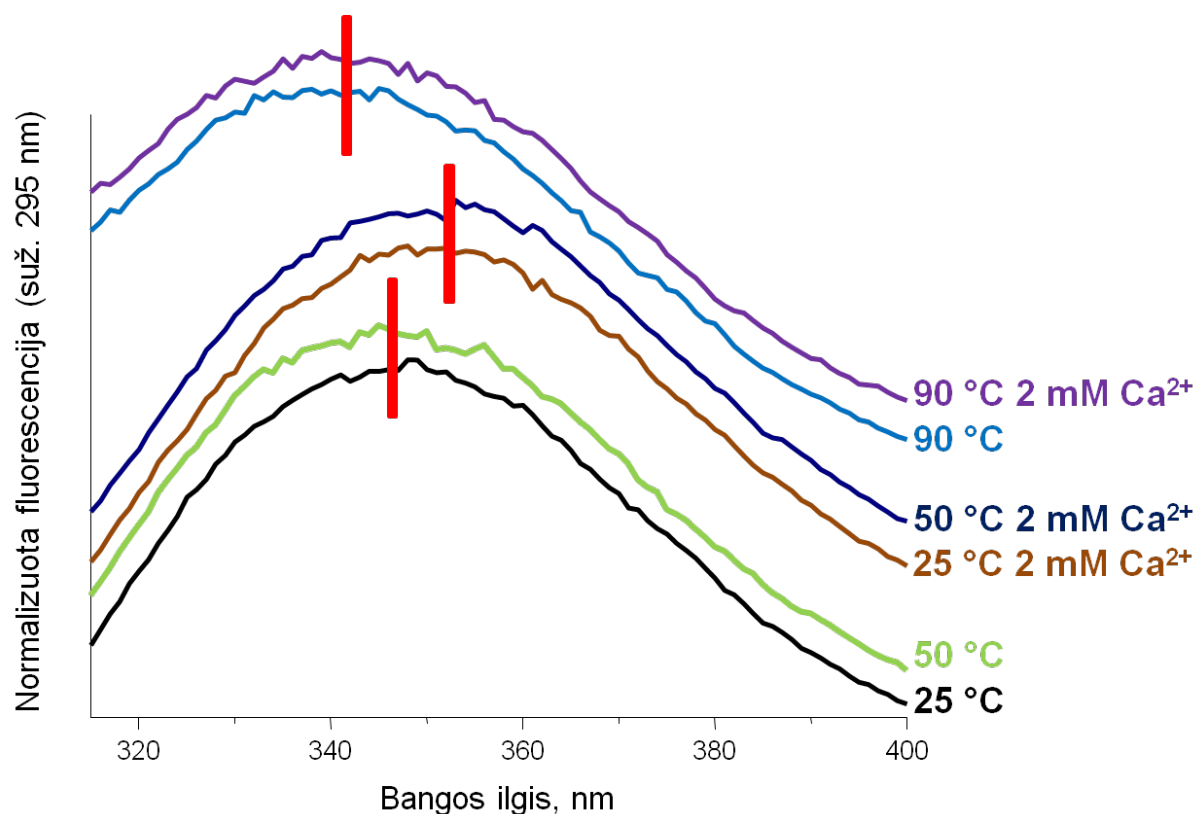
3.3.1. Dvivalenčių metalų jonų įtaka S100A9 stabilumui

Žinant, kad baltymas suriša kalcį, buvo nuspręsta įvertinti, ar kalcis turės įtakos baltymo stabilumui. Pasitelkiant diferencinio skenavimo fluorimetrijos metodą, pastebėta, kad baltymo stabilumas nuo kalcio priklauso eksponentiškai. Baltymo išsivyniojimo temperatūra pakyla nuo 59 °C be kalcio iki 85 °C su didžiausia kalcio koncentracija (3.6 pav.).



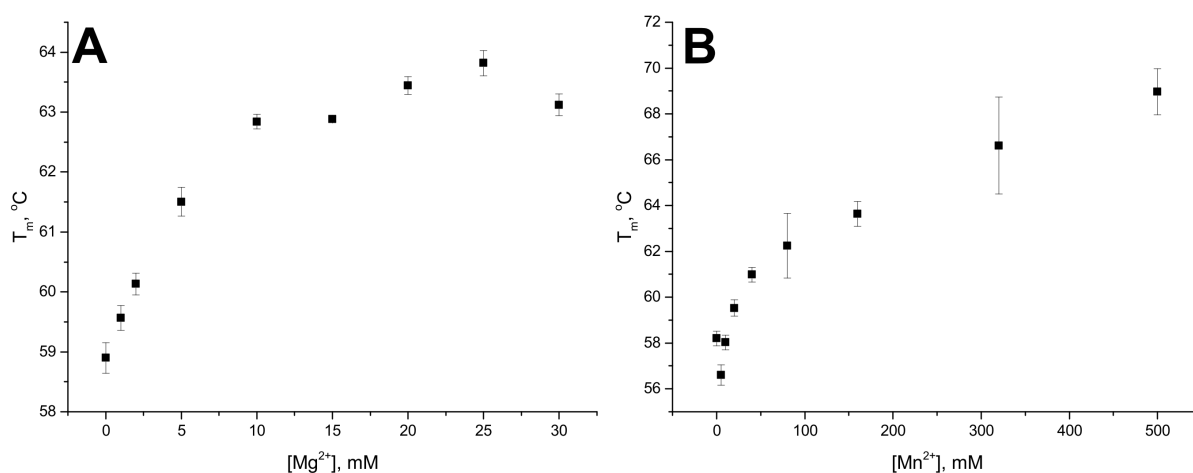
3.6 pav. Kalcio įtaka S100A9 baltymo stabilumui.

Siekiant įvertinti kaip kalcis veikia S100A9 baltymą, buvo pamatuoti triptofano fluorescencijos spektrai. Pastebėta, kad esant kalcio baltymo tirpale, spektras slenkasi į dešinę, t.y. triptofanas tampa labiau prieinamas tirpikliui. Šie rezultatai koreliuoja su aprašytais literatūroje kitais S100A baltymais, nes kalcis padeda atverti šių baltymų hidrofobines sritis.



3.7 pav. S100A9 triptofano fluorescencijos spektrai.

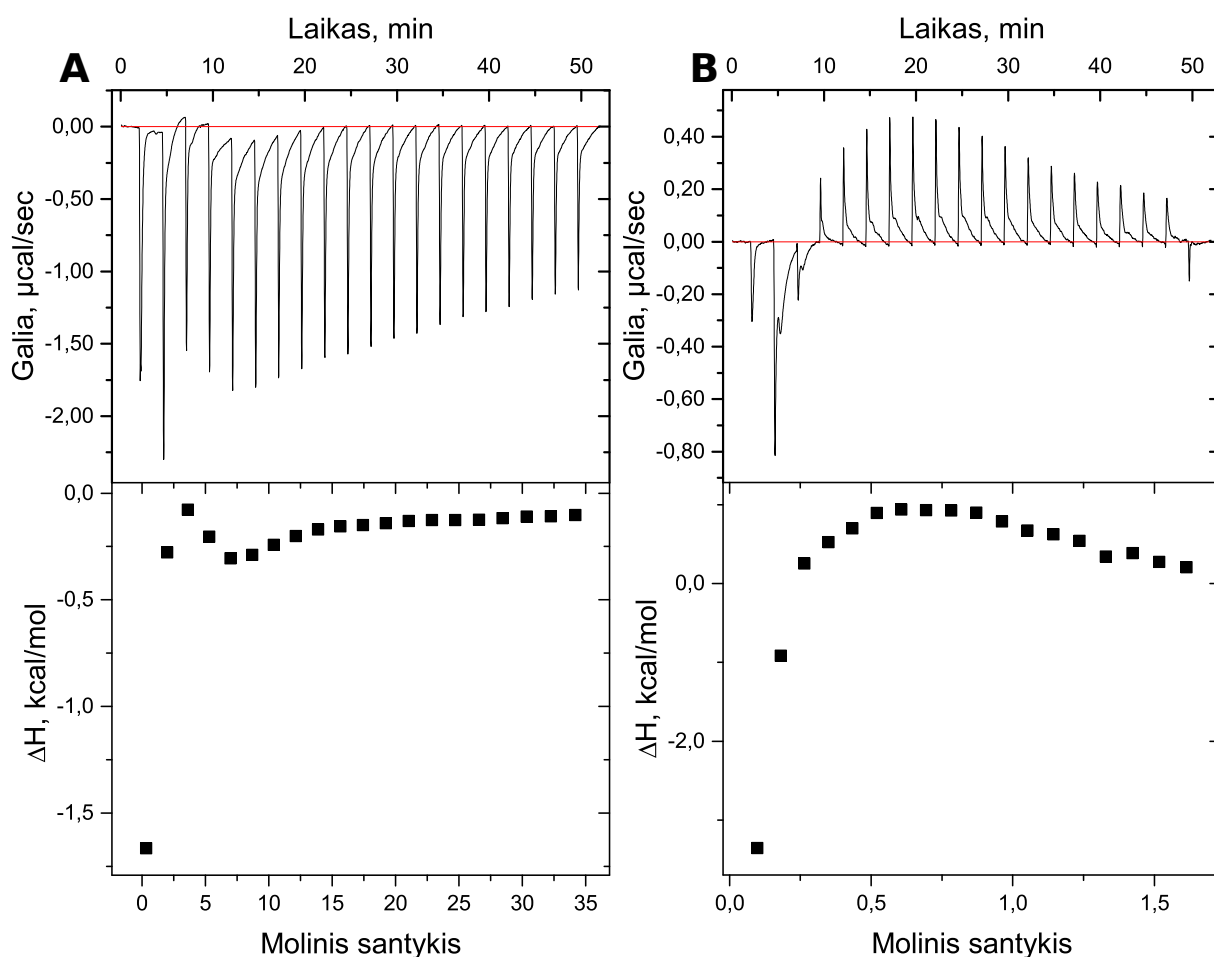
Pastebėjus, kad kalcis taip stipriai gali paveikti baltymą, buvo pasvarstyta ar kiti divi- valenčiai metalai galėtų panašiai veikti. Buvo išbandyta, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , tačiau iš jų pavyko pamatuoti tik Mg^{2+} , Mn^{2+} įtaką, kadangi kiti jonai išsodindavo baltymą. Mg^{2+} labai silpnai stabilizavo baltymą, o Mn^{2+} mažomis koncentracijomis (iki 5 mM) destabilizavo baltymą ir palaikius ilgesnį laiko išsodindavo baltymą, o didesnėmis koncentracijomis stabilizavo (3.8 pav.).



3.8 pav. Magnio ir mangano įtaka S100A9 baltymo stabilumui.

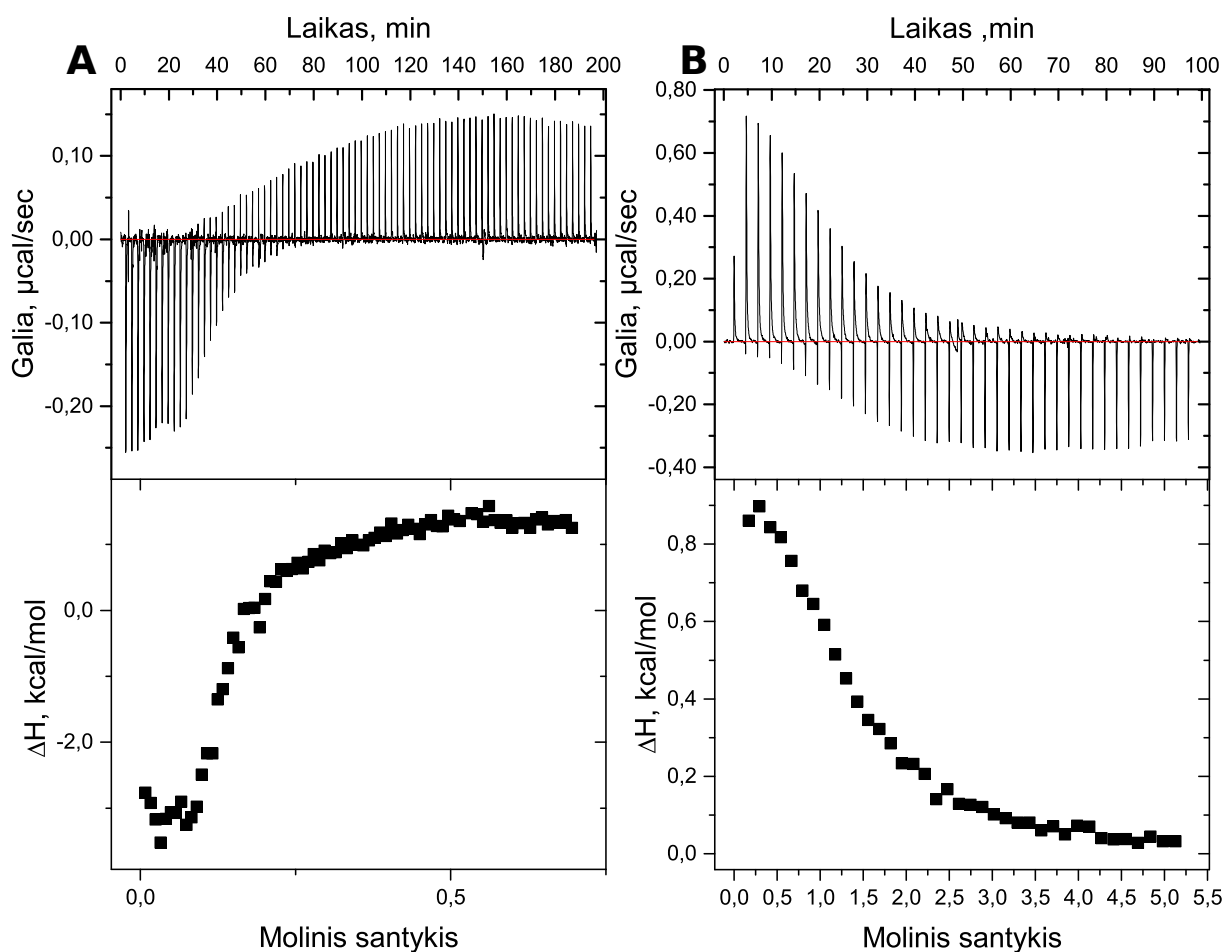
3.3.2. Kalcio sąveika su S100A9

Kad geriau suprasti, kaip kalcis jungiasi prie baltymo buvo pasitelkta izoterminė titravimo kalorimetrija, kurios metu kalcis buvo titruojamas į baltymo tirpalą. Pirmi rezultatai parodė, kad vyksta skirtingi persitvarkymai baltymo molekulėje, prisijungus kalcį. (3.9 pav.), todėl pabandyta sumažinti kalcio jonų koncentraciją, kad galima būtų pamatyti atskirus virsmus.



3.9 pav. Izoterminės titravimo kalorimetrijos rezultatai. (A) Baltymo koncentracija celėje 0,3 mM, švirkšte 50 mM CaCl₂. (B) Baltymo koncentracija celėje 0,6 mM, švirkšte 5 mM CaCl₂.

Pavyko nutitruoti pirmą reakciją, kuri yra egzoterminė ir antrą, kuri jau atvirkščiai endoterminė (3.10 pav.). Deja tikslų jungimosi konstantų nebuvo galima apskaičiuoti ir pritaikyti tikslaus jungimosi modelio, nes buvo matytas dviejų procesų suminis efektas: jungimosi ir baltymo persitvarkymo. Spėjama, kad tokie neįprasti virsmai atsirinka dėl kooperatyvumo: pirmi prisijungę kalcio jonai keičia kitų jungimosi vietų giminingumą/baltymo konformaciją, tokia išvada buvo pateikta iš darbų su S100A16, kur buvo ir atlikta ITC (Babini et al., 2011).

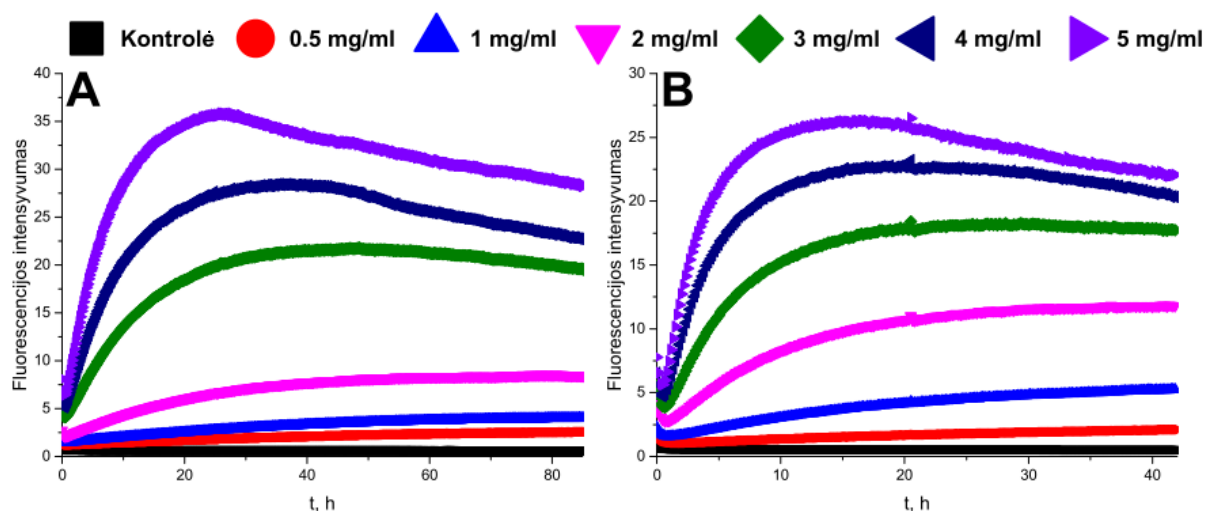


3.10 pav. Izoterminės titravimo kalorimetrijos rezultatai. **(A)** Baltymo koncentracija celėje 0,6 mM, švirkšte 2 mM CaCl_2 . **(B)** Baltymo koncentracija celėje 0,6 mM + 0,5 mM CaCl_2 , švirkšte 15 mM CaCl_2 .

3.4. S100A9 agregacijos tyrimas

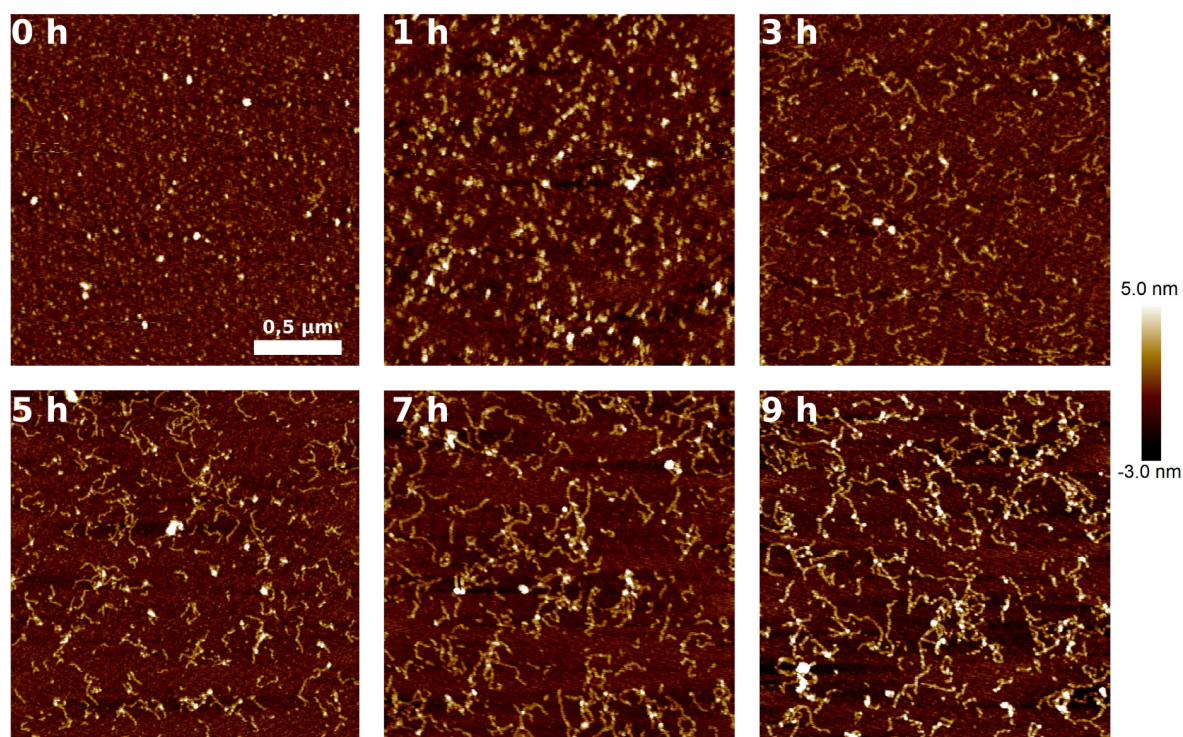
3.4.1. S100A9 agregacija

Dauguma agregacijos tyrimų buvo atlikta „Erasmus“ praktikos metu, Umėjos Universitete, Švedijoje. Tyrimo metu buvo patikrinta kaip S100A9 agregacija priklauso nuo koncentracijos, pH ir temperatūros. Buvo nustatyta, kad agregacija stipriai priklauso nuo S100A9 baltymo koncentracijos ir temperatūros (3.11 pav.). Didinant baltymo koncentraciją, keliant temperatūrą agregacija vyksta greičiau. Geriausia aplinka agreguoti buvo fiziologinis fosfatinis buferinis tirpalas.



3.11 pav. S100A9 agregacijos kinetika (PBS buferiniame tirpale) esant skirtingoms temperatūroms. (A) 37 °C. (B) 42 °C.

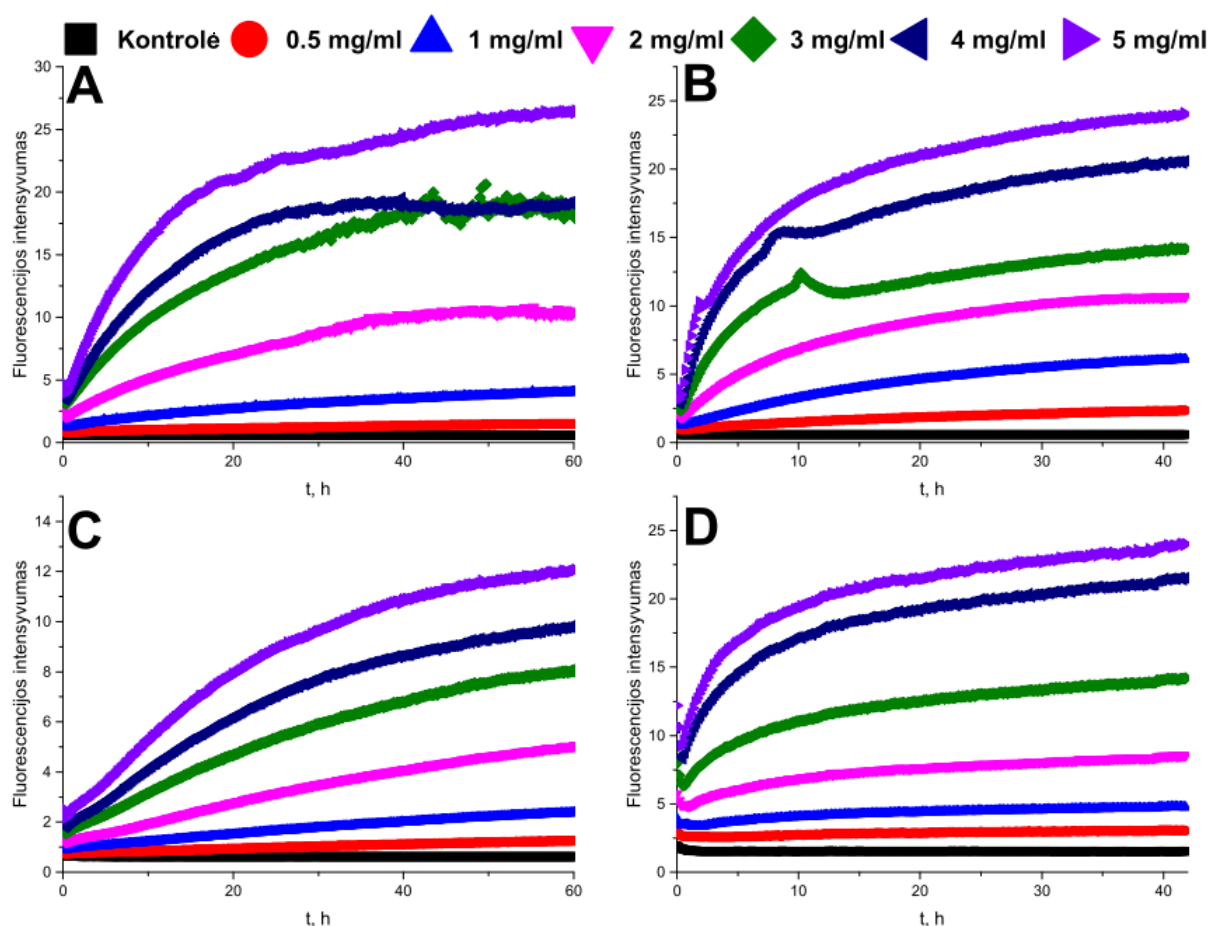
Atominės jėgos mikroskopija buvo naudojama norint įvertinti ar tikrai susidaro amiloidinės fibrilės. Rezultatai parodė, kad S100A9 baltymo fibrilės skiriasi nuo daugelio kitų amiloidinių fibrilių: jos yra labai trumpos, susiraizgiusios, kurių aukštis svyruoja apie 2-3 nm (3.12 pav.).



3.12 pav. S100A9 mėginių AJM nuotraukos skirtingu agregacijos laiku (PBS buferiniame tirpale).

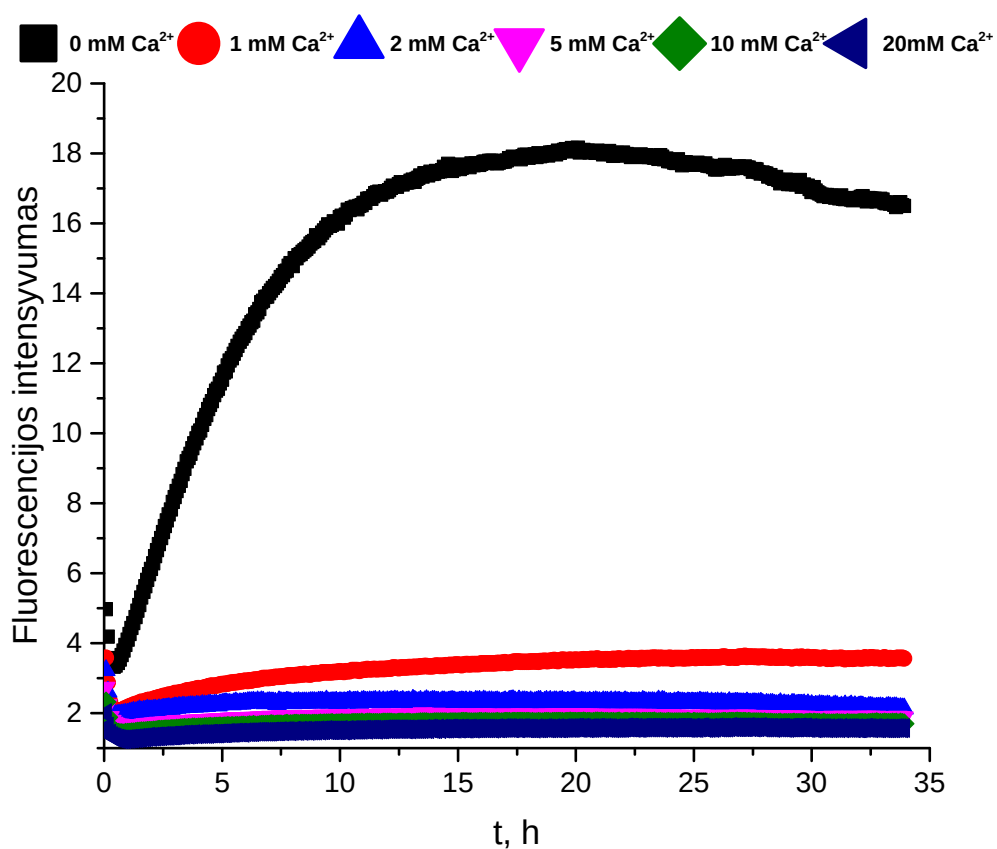
Kituose buferiniuose tirpaluose baltymas taip pat gerai agreguodavo (3.13 pav.), tačiau esant pH 6, kai kurios agregacijos kreivės išsikraipydavo. Tokie šokinėjimai galėjo

atsirasti, nes baltymo izoelektrinis taškas yra 5,7 ir paraleliai vyksta du procesai: agregacija į amiloidines fibriles ir amorfinė agregacija. Tačiau ir pH 4,5, ir pH 6 buvo panaši priklausomybė, kad didesnėje baltymo koncentracijoje ir aukštesnėje temperatūroje agregacija vyksta greičiau. Taip pat buvo atlikta agregacija esant pH 8 ir pH 8,5, bet kinetikos negalima buvo pamatuoti dėl ThT blukimo, bet AJM nuotraukose matėsi fibrilės (4 priedas).



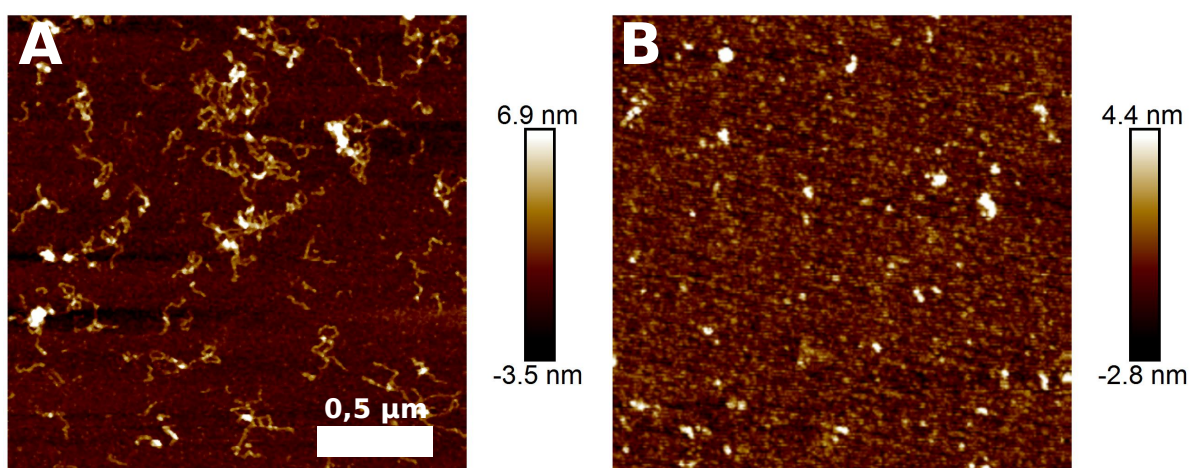
3.13 pav. S100A9 agregacijos kinetika esant skirtingomis temperatūromis. (A) pH 6, 37°C. (B) pH 6 42°C. (C) pH 4,5 37°C. (D) pH 4,5 42°C.

Kalcis slopino S100A9 agregaciją (3.14 pav.). Tokį efektą lengva paaiškinti, nes kalcis stabilizuoja baltymą ir neleidžia jam agreguoti. Esant 1 mM kalcio koncentracijai buvo stebiamas nedidelis ThT fluorescencijos kilimas, kuris turbūt atsiranda dėl baltymų molekulių, kurios yra nesurišusios kalcio. Buvo išbandyta ir kitų metalų (Mg^{2+} , Mn^{2+}) įtaka agregacijai. Mg^{2+} mažomis koncentracijomis mažai turėjo įtakos agregacijai, didesnėmis koncentracijomis buvo stebima amorfinė agregacija. Esant Mn^{2+} jonams, buvo matoma amorfinė agregacija arba agregacijos slopinimas (3 ir 5 priedai).



3.14 pav. Kalcio įtaka S100A9 baltymo agregacijai.

Esant 1 mM kalcio jonų amiloidinių fibrilių susidaro daug mažiau, o esant didesnėms koncentracijoms fibrilių nebesimato (3.15 pav.).

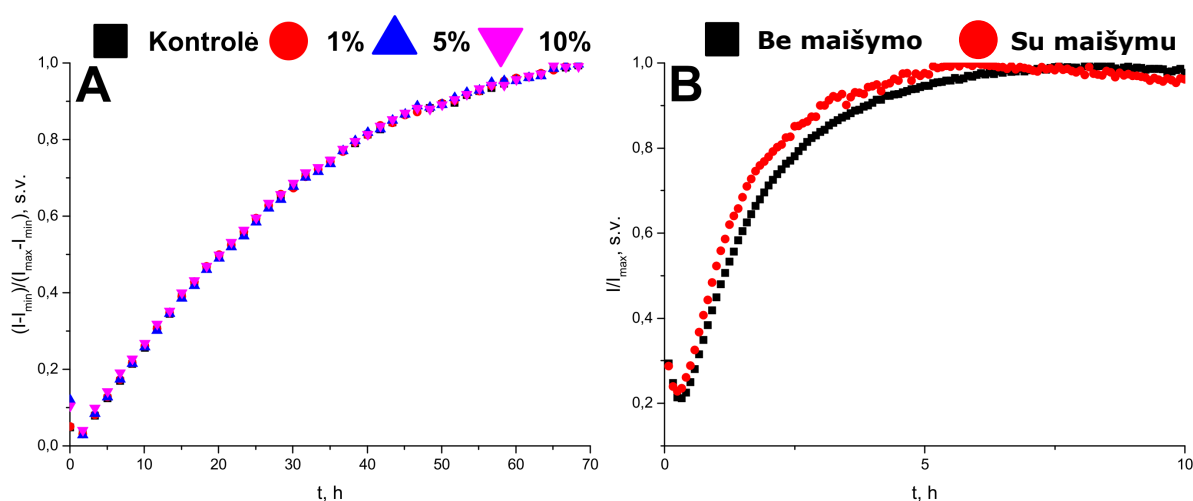


3.15 pav. S100A9 fibrilių AFM nuotraukos esant skirtingoms kalcio koncentracijoms (A) 1 mM CaCl₂. (B) 2 mM CaCl₂.

3.4.2. S100A9 agregacijos mechanizmo savybės

Tyrimuose buvo pastebėta, kad S100A9 agregacija pasižymi neįprastomis savybėmis palyginus su kitų amiloidinių baltymų agregacija (3.16 pav.). Visų pirma, dažniausiai baltymų amiloidiniai agregatai skatina natyvaus baltymo agregaciją, tačiau nesvarbu kiek buvo įdėta 1, 5, 10 % S100A9 agregatų į pradinį baltymo tirpalą, jie neskaitino agregacijos. Taip pat S100A9 agregacijai maišymas neturi įtakos.

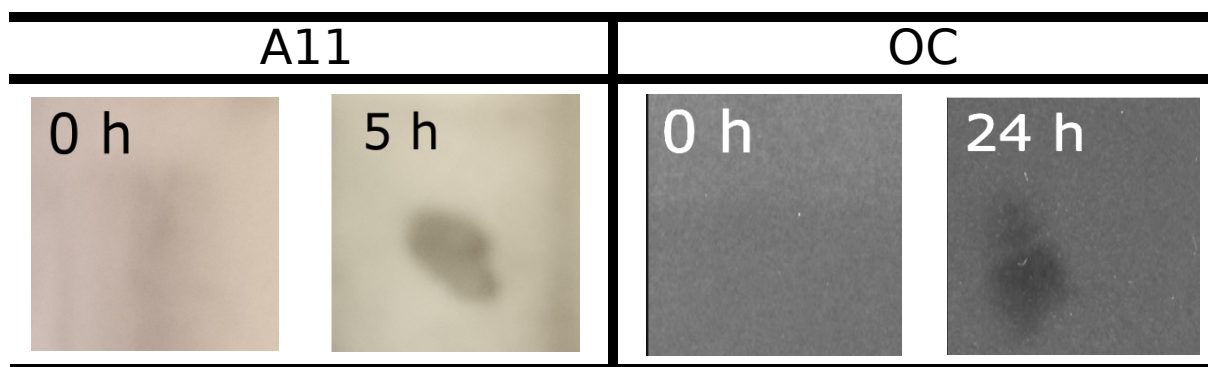
Abu šiuos reiškinius galima paaiškinti, remiantis agregacijos branduolių teorija. Agregacijos branduoliai - tai tam tikras susijungusių baltymo molekulių skaičius. Kai pasiekiamą kritinę branduolių koncentraciją, prasideda amiloidinių fibrilių ilgėjimas/susidarymas. Galima spėti, kad S100A9 agregacijos branduoliai yra labai maži ir labai greitai susidarantys. Tad dedant sėklą, yra didinamas branduolių skaičius, bet jei branduoliai susidaro labai greitai, tai sėkla tampa nesvarbi. Lygiai taip pat maišymas neturi įtakos, nes maišymas paskatina agregacijos pradinį branduolių susidarymą, tačiau S100A9 atveju gali būti, kad tirpale jau būna pakankamas branduolių įsisotinimas.



3.16 pav. (A) Sėklos įtaka S100A9 agregacijai. (B) Maišymo įtaka S100A9 agregacijai.

3.4.3. Fibrilių patikrinimas specifiniais antikūnais

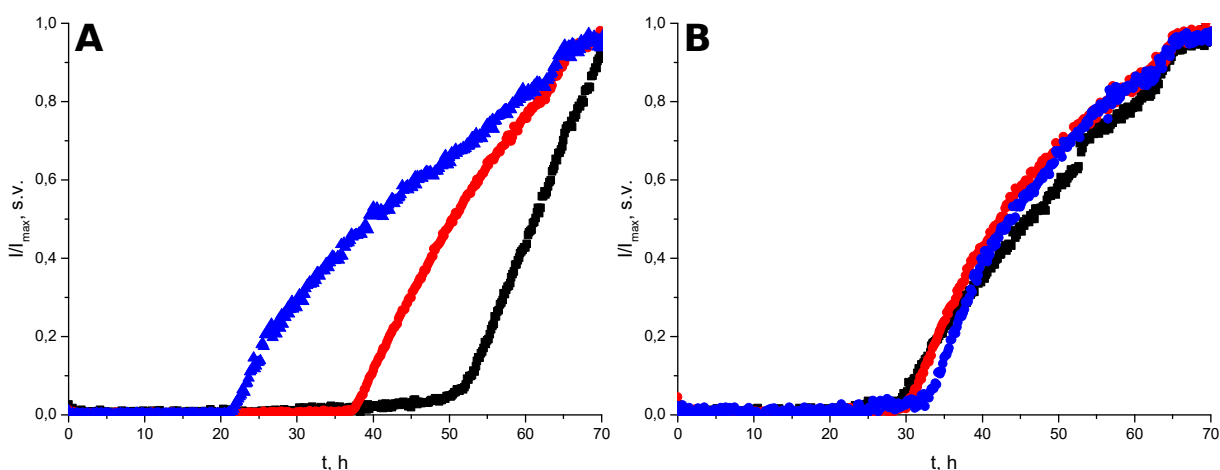
Be atominės jėgos mikroskopijos rezultatų, fibrilės taip pat buvo patikrintos su A11 ir OC antikūnais (3.17 pav.). A11 atpažįsta įvairių baltymų oligomeras, o OC įvairių amiloidinių fibrilių struktūrinius motyvus. Abu antikūnai reagavo su S100A9 baltymu skirtingais agregacijos laiko momentais. Tai patvirtino, kad S100A9 tikrai formuoja amiloidines fibriles.



3.17 pav. Taškinio imunobloto rezultatai.

3.5. S100A9 ir α -sinukleino ko-agregacija

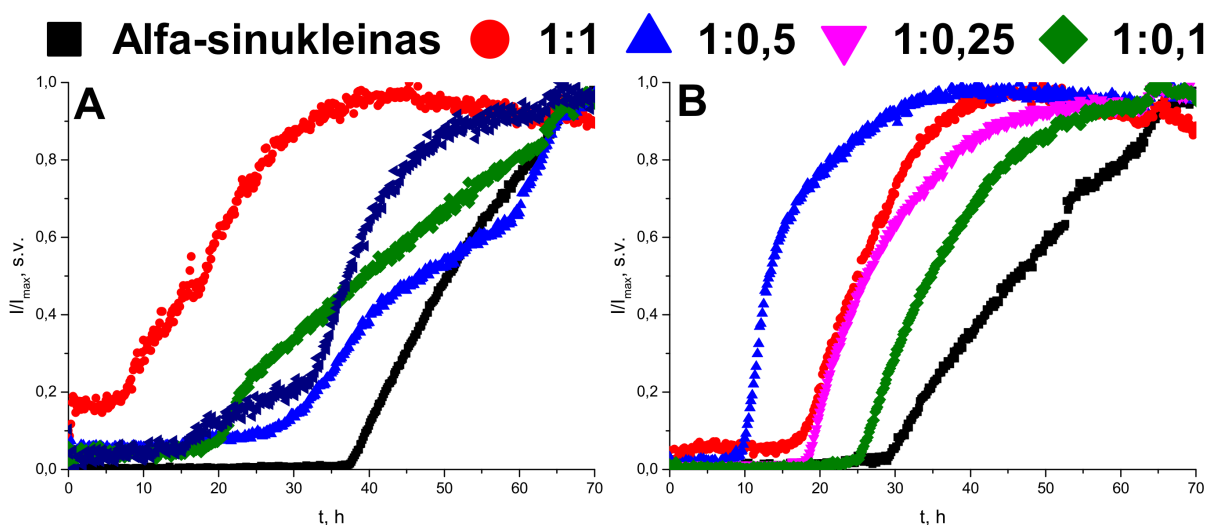
Kaip ir minėta įvade, potencialiai yra žinoma, kad yra galima S100A9 ir α -sinukleino sąveika. Todėl, mano tyrimuose buvo nuspręsta įvertinti ar jie turi įtakos vienas kito agregacijai. Pirma buvo patikrinta kaip α -sinukleinas agreguoja. Buvo pasirinkta aukštesnė temperatūra (60°C), nes iš praeitų laboratorijos darbų žinoma, kad α -sinukleinas agreguoja labai lėtai. Taip pat buvo patikrinta kaip α -sinukleinas agreguoja su ir be kalcio (3.18 pav.). Rezultatai, parodė, kad α -sinukleino agregacija daug geriau atsikartoja esant kalcio buferiniame tirpale, be kalcio duomenų išsibarstymas buvo labai didelis.

3.18 pav. α -sinukleino agregacijos kreivės. (A) Be kalcio (B) Esant 1 mM CaCl_2 .

Ko-agregacijos eksperimentai atskleidė, kad S100A9 gali pagreitinti α -sinukleino agregaciją kelis kartus. Sprendžiant iš agregacijos kinetikos, pirma, labai greitai, suagreguoja S100A9, o vėliau α -sinukleinas. Esant kalcio jonų buferiniame tirpale, agregacijos kinetika panaši, bet S100A9 agreguoja lėčiau.

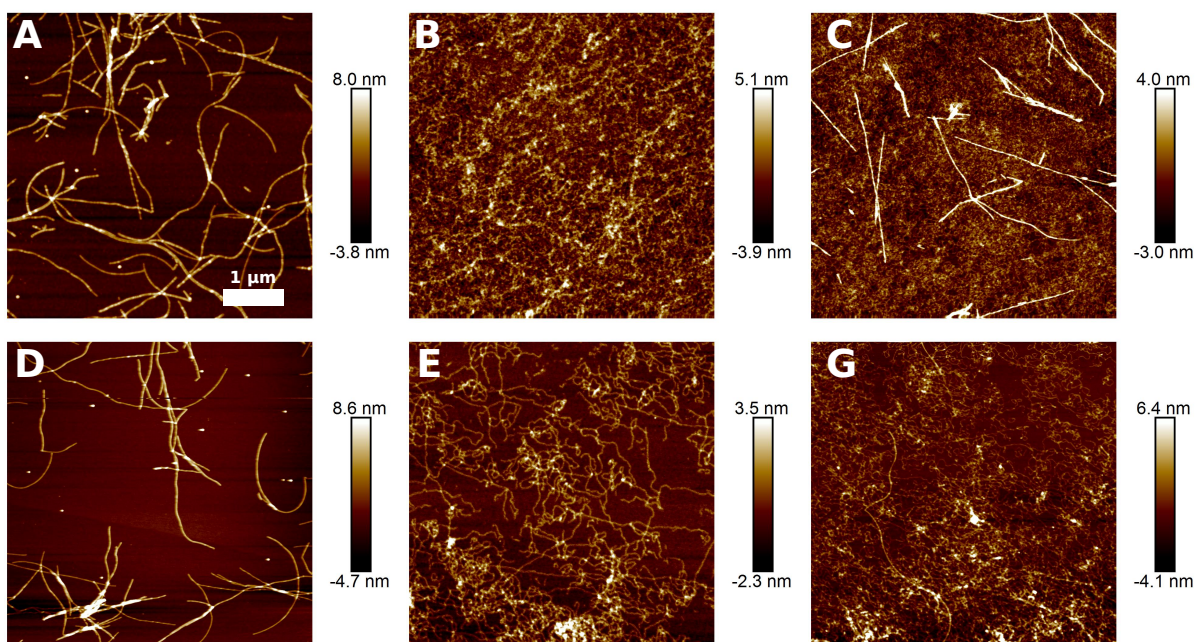
Pabandžius keisti α -sinukleino ir S100A9 molinį santykį, pamatyta, kad nesant kalcio, kinetikos duomenų išsibarstymas yra didelis, tačiau su kalciumu galima išvelgti priklausomybę (3.19 pav.), greičiausiai agregavo esant 1:0,5 santykiui ir lėčiausiai 1:0,1 (panašiai

kaip ir kontrolė). Visose eksperimentuose S100A9 trumpindavo „lag“ fazę, o tai leidžia suprasti, kad S100A9 agregatai skatina α -sinukleino agregacijos branduolių susidarymą.



3.19 pav. α -sinukleino ir S100A9 ko-agregacijos kreivės. (A) Be kalcio (B) Esant 1 mM CaCl_2 .

AJM nuotraukos patvirtino (3.20 pav.), kad S100A9 ir α -sinukleinas agreguoja atskirai, nes nuotraukose matosi abiejų rūšių fibrilių. Yra žinoma, kad amiloidinėse fibrilėse hidrofobiniai paviršiai dažnai yra fibrilių paviršiuje (Auer, 2014), todėl galima manyti, kad S100A9 fibrilės sukuria hidrofobinius paviršius, kurie skatina α -sinukleino agregaciją.



3.20 pav. S100A9 ir α -sinukleino fibrilių AJM nuotraukos. (A) α -sinukleinas. (B) S100A9. (C) α -sinukleinas ir S100A9 kartu. (D) α -sinukleinas su 1 mM CaCl_2 . (E) S100A9 1 mM CaCl_2 . (F) α -sinukleinas ir S100A9 su 1 mM CaCl_2 .

3.6. Rezultatų diskusija ir tolimesni planai

Iš senesnių tyrimų su DSK yra žinoma, kad kalcis gali stabilizuoti S100A9 baltymą (Vogl et al., 2006), bet aiški priklausomybė nuo kalcio koncentracijos mano tyrimuose parodyta pirmą kartą. Kad magnis arba manganas gali stabilizuoti baltymą ištirta pirmą kartą. Magnio silpnesnį poveikį galima paaiškinti dėl magnio atomo dydžio, kuris yra mažesnis negu kalcio, tačiau hidratacijos metu padidėja 400 kartų, o kalcio tik 25 kartus. Magnio atomo dehidratacija vyksta 4 kartus lėčiau negu nuo kalcio atomo. Mažesnis atomo dydis ir lėtesnė dehidratacija nulemia silpnesnį jungimąsi prie EF-rankų (Grabarek, 2011). Ypač įdomu dėl mangano rezultatų, nes yra manoma, kad S100A8/S100A9 surišdamas manganą padeda ląstelėms kovoti su bakterijų infekcija (Brunjes Brophy et al., 2013). Pagal jų rezultatus manganas pirma jungiasi prie histidinių, esančių S100A9 baltymo C-gale, o po to gali prisijungti ir prie EF-rankų. Mano darbe atlikti S100A9 stabilumo tyrimų rezultatai pritaria jų idėjai, nes mažomis koncentracijomis manganas destabilizuoja baltymą - jungiasi ne prie EF-rankų, o didesnėmis stabilizuoja, tai yra elgiasi panašiai kaip ir kalcis, kuris jungiasi prie EF-rankų. Titravimo rezultatai atskleidė, kad baltymo sąveikoje su kalciu egzistuoja bent kelios skirtingos baltymo konformacijos su skirtingu kalcio jonų jungimusi. Norint ištirti šiuos procesus reikėtų pasitelkti detalesnius metodus kaip BMR spektroskopiją.

Apie S100A9 baltymo agregaciją į amiloidines fibriles yra mažai žinoma ir nėra informacijos apie jo agregacijos kinetiką. Mano rezultatai parodė, kad S100A9 pakankamai lengvai agreguoja įvairiomis sąlygomis ir kinetikos profilis skiriasi nuo daugumos kitų baltymų. S100A9 neturi (arba ji labai trumpa) „lag“ fazės ir sėkla neskatina baltymo agregacijos, taip galėtų būti, jei agregacijos branduolių susidarymas yra labai greitas (arba branduoliai yra labai maži), o fibrilių ilgėjimas yra daug lėtesnis. Daugelis gautų kinetikos rezultatų buvo panaudoti skaičiuojant agregacijos modelį. Skaičiavimai buvo atlikti Dr. Igor A. Iashchishyn (Umėjos Universitetas). Jo skaičiavimo rezultatai sutampo su mūsų hipoteze, kad S100A9 branduolių centrai yra labai maži. Kalcis slopina agregaciją, nes stabilizuoja baltymą ir turbūt neleidžia susidaryti agregacijos branduoliams. Gyvuose organizmuose kalcio visad yra ląstelės aplinkoje, todėl S100A9 turėtų būti prisijungęs kalcį, bet galima pamąstyti apie situaciją, kai sutrikus homeostazei arba esant infekcijai, kalcio gali sumažėti ir baltymas taptų labiau linkęs agreguoti. Kadangi S100A9 baltymo ląstelėse galima rasti daug (pvz. 40 % visų citoplazminių baltymų granulocituose (Yui et al., 2003)), tai irgi didina tikimybę, kad dalis baltymo gali pradėti agreguoti.

α -sinukleino ir S100A9 lokalizacija gali sutapti ląstelėse (Nakamura et al., 2015), todėl buvo patikrinta ar jie gali turėti įtakos vienas kito agregacijai. Rezultatai parodė, kad S100A9 greitina α -sinukleino agregaciją. Šį reiškinį galima paaiškinti, dėl S100A9 agregacijos, S100A9 fibrilės yra hidrofobiškos, o α -sinukleinas lengviau agreguoja hidrofobinėje aplinkoje (Ruipérez et al., 2010), todėl gali būti, kad S100A9 fibrilės tiesiog sukuria pa-

lankesnę aplinką α -sinukleino agregacijai. Esant kalciui pilnai situaciją sunku įvertinti, nes remiantis literatūra, pats kalcis turi įtakos α -sinukleino agregacijai (Leal et al., 2012). Tolimesniuose tyrimuose būtų įdomu pasižiūrėti S100B baltymo įtaką α -sinukleino agregacijai, nes S100B baltymo sintezė yra stipriai padidėjusi Parkinsono ligos metu (Sathe et al., 2012) ir jis gali būti panašiai agreguoja kaip S100A9 (Carvalho et al., 2013).

Šiuo projekto metu pavyko ne tik įvykdyti išsikeltus uždavinius, bet ir sustiprinti ryšius su Dr. Ludmilla Morozova-Roche grupe (Umejos Universitetas, Švedija) - yra rašomas straipsnis, kuriame bus panaudota dalis mano rezultatų. Taip pat S100A9 baltymas buvo nusiųstas Dr. Øyvind Halskau grupei (Bergeno Universitetas, Norvegija), kuri atliks BMR analizę, o Lietuvoje kelios mokslininkų grupės susidomėjo galimybe įvertinti S100A9 fibrilių gebėjimą pažeisti membranas ir toksiškumą ląstelėms. Mūsų laboratorijoje toliau bus siekiama nustatyti S100A9 fibrilių struktūrą pasitelkiant infraraudonųjų spindulių spektroskopiją bei rasti S100A9 fibrilių dalį, kuri turėtų būti atspari proteinazei K. Be S100A9 yra bandoma dirbti ir su S100A8 baltymu, apie kurio agregaciją į amiloidines fibriles dar nėra niekur skelbta.

Mano tyrimai turėtų padėti susipažinti su S100A baltymų agregacijos savybėmis ir atverti naują puslapį amiloidų tyrimų srityje.

4. Išvados

1. Sėkmingai pritaikytos S100A9 ir α -sinukleino gryninimo metodikos: išgryninta 1,5 g S100A9 ir 0,6 g α -sinukleino baltymų.
2. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} stabilizuoja S100A9 baltymą, tačiau Mg^{2+} ir Mn^{2+} daug silpniau palyginus su Ca^{2+} .
3. S100A9 agregacija yra greitinama aukštesne temperatūra ir didesne baltymo koncentracija, o slopinama kalcio jonais.
4. S100A9 greitina α -sinukleino agregaciją.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Biochemijos magistro studijų programos II kurso studentas

Darius Šulskis

BAIGIAMASIS MAGISTRO DARBAS

S100A9 AGREGACIJOS IR STABILUMO TYRIMAS

SANTRAUKA

S100A baltymų šeima dalyvauja įvairiuose ląstelės procesuose: proliferacijos, išgyvenimo, judėjimo ir uždegiminių signalų perdavimo. Dėl įvairių šių baltymų funkcijų, jie dažnai siejami su įvairiomis ligomis, įskaitant vėžinius susirgimus ir neurodegeneratyvinius sutrikimus. Neseniai buvo atrasta, kad S100A9 baltymas agreguoja į amiloidines fibriles ir potencialiai gali būti svarbus Alzheimerio ir Parkinsono ligose. Panašiai kaip ir kitų S100A baltymų šeimos atstovų, S100A9 baltymo stabilumas yra reguliuojamas kalcio jonų. Tačiau, kol kas yra mažai žinoma kaip tiksliai kalcis stabilizuoja S100A9 baltymą ir kaip vyksta S100A9 virsmas į amiloidines fibriles.

S100A9 terminis stabilumas buvo matuojamas diferencinio skenavimo fluorimetrijos metodu. Kalcio jonų sąveika su S100A9 nustatyta izoterminio titravimo kalorimetru. Agregacijos kinetika matuota pagal Tioflavino T (ThT) dažo fluorescenciją. Susidariusios fibrilės stebėtos atominės jėgos mikroskopu ir jų amiloidinė prigimtis patikrinta specifiniais A11 ir OC antikūnais.

Tyrimo metu buvo nustatyta, kad kalcis eksponentiškai didina S100A9 baltymo terminį stabilumą. Titravimo rezultatai parodė, kad kalcis inicijuoja baltymo termodinaminius pokyčius keliomis stadijomis, bet reikėtų detalesnių tyrimų, norint ištirti įvairias baltymo būsenas. Agregacijos tyrimai atskleidė, kad S100A9 lengvai agreguoja į amiloidines fibriles įvairiomis sąlygomis, kalcis slopina agregaciją ir, kad S100A9 gali skatinti α -sinukleino amiloidinių fibrilių susidarymą.

VILNIUS, 2017

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES
LIFE SCIENCES CENTER
2nd year student of Biochemistry Msc
Darius Šulskis
MASTER THESIS

AGGREGATION AND STABILITY OF S100A9 PROTEIN

SUMMARY

S100 family proteins are involved in different cell activities: proliferation, survival, movement, inflammatory signalling and reproduction. Because of the wide range of functions, these proteins can be associated with many diseases, including cancer and neurodegenerative disorders. There are reports showing that S100A9 protein can aggregate into amyloid fibrils and is possibly involved in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Similar to other members in S100 family, S100A9 stability can be regulated by calcium, however there is too little information on how calcium ions affect S100A9 protein stability and even less how S100A9 aggregates into amyloid-like structures. Therefore we decided to investigate these properties.

Thermal unfolding of the protein was monitored using ANS fluorescence assay. Calcium-protein binding events were studied using isothermal titration calorimetry (ITC). Aggregation kinetics of S100A9 were observed using Thioflavin-T (ThT) fluorescence assay. Formed amyloid-like fibrils were observed using atomic force microscopy and the nature of fibrils was confirmed using specific A11 and OC antibodies.

Results show, that calcium exponentially increases protein thermal stability and inhibits the rate of aggregation. ITC data suggests, that calcium binds to multiple sites and induces conformational changes of the protein structure, however more detailed research is needed to identify different protein states. Overall aggregation experiments revealed that S100A9 easily forms amyloid fibrils and can influence Alpha-synuclein aggregation, which is related to Parkinson disease.

VILNIUS, 2017

Priedai

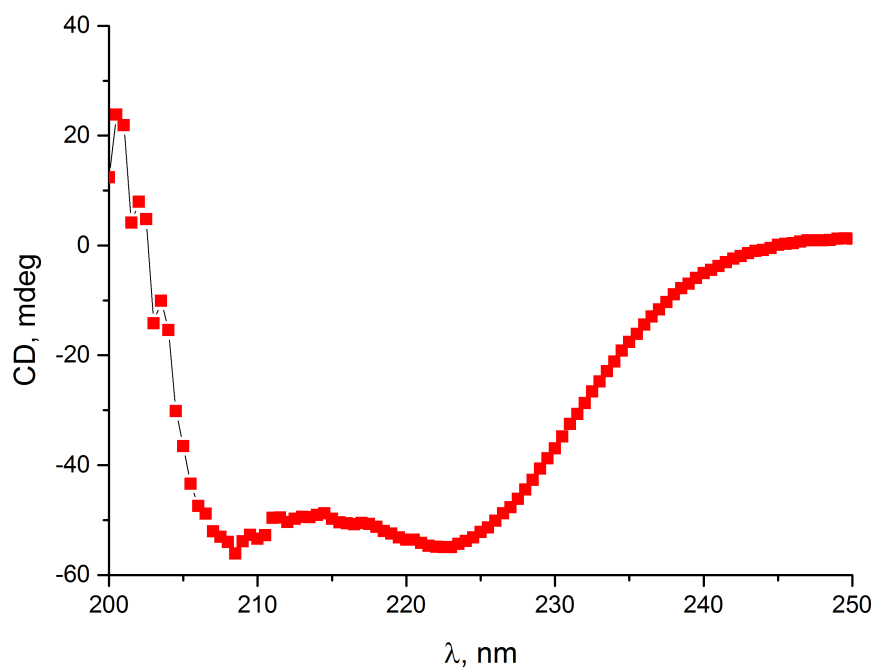
S100A9 seka, ilgis 113 a., masė 13093 Da

TCKMSQLERNIETIINTFHQYSVKLGHPDTLNQGEFKELVRKDLQNFLKKENKNEKVIE
HIMEDLDTNADKQLSFEEFIMLMARLTWASHEKMHEGDEGPGHHHKPGLGEGTP

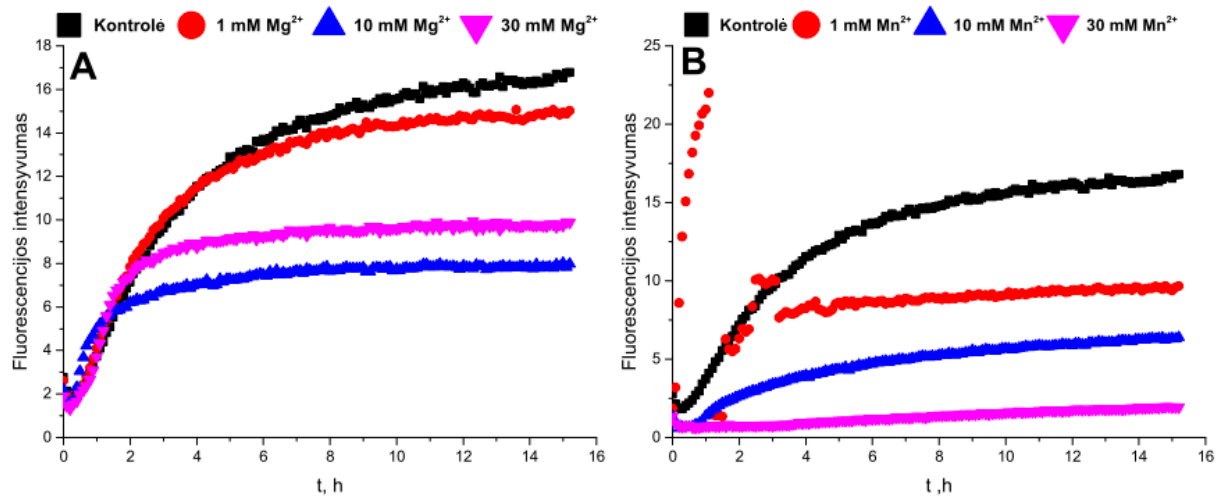
α -sinukleino seka, ilgis 140 a., masė 14460 Da

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAEAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKT
EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDP
DNEAYEMPSEEGYQDYEP

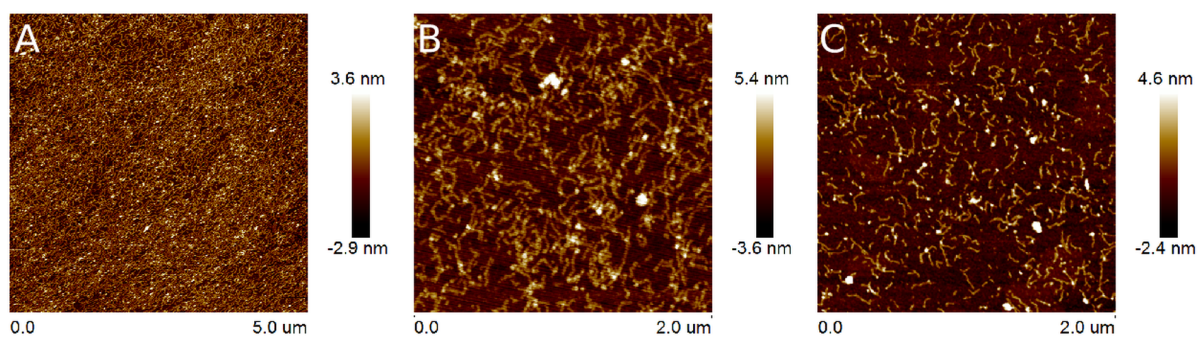
1 priedas S100A9 ir α -sinukleino aminorūgščių sekos.



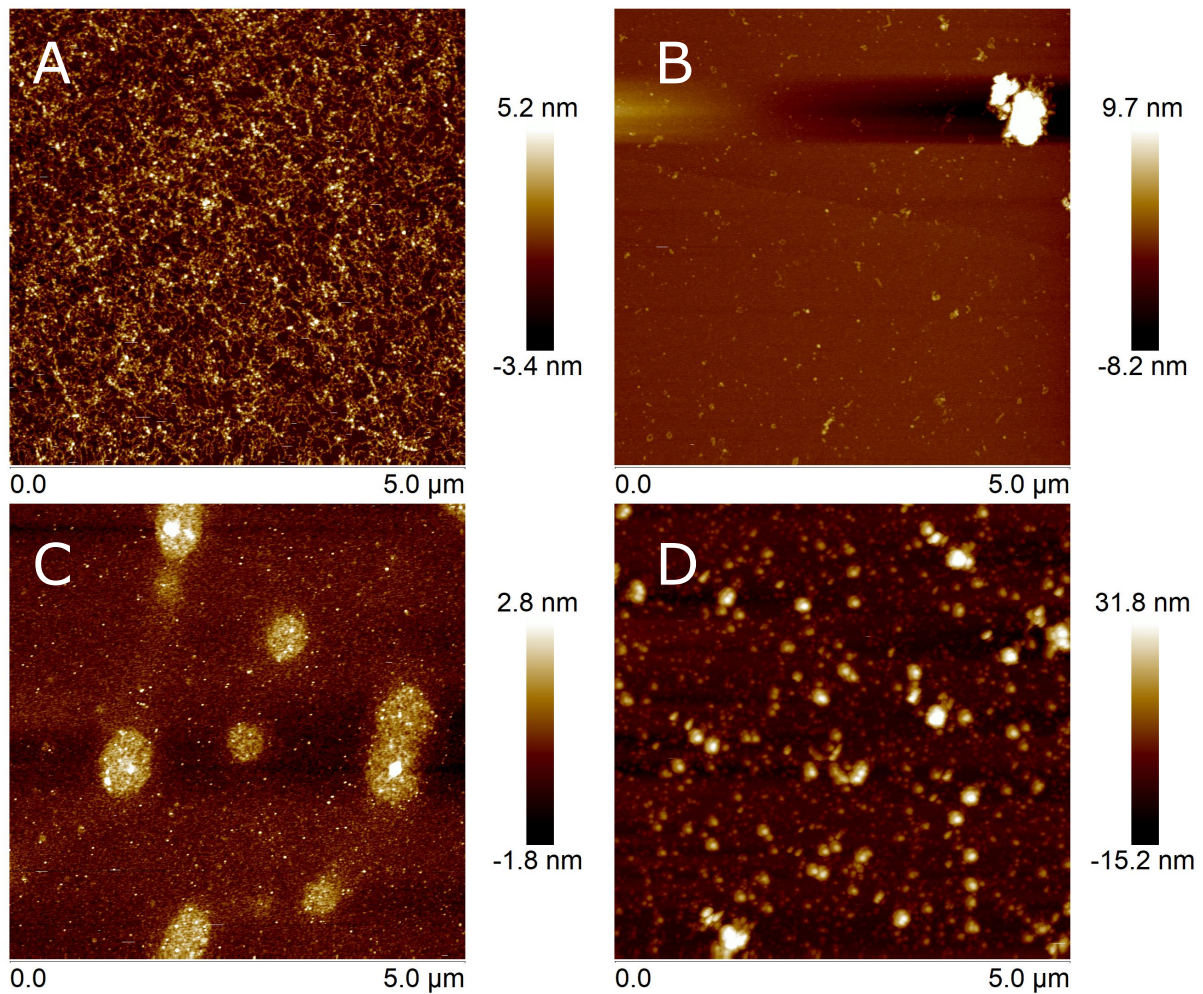
2 priedas S100A9 CD spektas.



3 priedas Mg²⁺ ir Mn²⁺ Poveikis S100A9 agregacijai.



4 priedas S100A9 fibrilių AJM nuotraukos esant skirtingiems pH. (A) pH 4,5. (B) pH 8. (C) pH 8,5.



5 priedas S100A9 fibrilių AJM nuotraukos. **(A)** Esant 1 mM Mg^{2+} . **(B)** Esant 30 mM Mg^{2+} . **(C)** Esant 1 mM Mn^{2+} . **(D)** Esant 30 mM Mn^{2+} .

Literatūros sąrašas

- Adav, S. S., Gallart-Palau, X., Tan, K. H., Lim, S. K., Tam, J. P., ir Sze, S. K. (2016). Dementia-linked amyloidosis is associated with brain protein deamidation as revealed by proteomic profiling of human brain tissues. *Molecular brain*, 9(1):20.
- Afanador, L., Roltsch, E. A., Holcomb, L., Campbell, K. S., Keeling, D. A., Zhang, Y., ir Zimmer, D. B. (2014). The Ca²⁺ sensor S100A1 modulates neuroinflammation, histopathology and Akt activity in the PSAPP Alzheimer's disease mouse model. *Cell Calcium*, 56(2):68–80.
- Alvarez-Erviti, L., Couch, Y., Richardson, J., Cooper, J. M., ir Wood, M. J. A. (2011). Alpha-synuclein release by neurons activates the inflammatory response in a microglial cell line. *Neuroscience Research*, 69(4):337–342.
- Ano Bom, A. P. D., Rangel, L. P., Costa, D. C. F., De Oliveira, G. A. P., Sanches, D., Braga, C. A., Gava, L. M., Ramos, C. H. I., Cepeda, A. O. T., Stumbo, A. C., De Moura Gallo, C. V., Cordeiros, Y., ir Silva, J. L. (2012). Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: Implications for cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33):28152–28162.
- Arnold, V., Cummings, J.-S., Moreno-Nieves, U. Y., Didier, C., Gilbert, A., Barré-Sinoussi, F., ir Scott-Algara, D. (2013). S100A9 protein is a novel ligand for the CD85j receptor and its interaction is implicated in the control of HIV-1 replication by NK cells. *Retrovirology*, 10:122.
- Aterman, K. (1976). A historical note on the iodine-sulphuric acid reaction of amyloid. *Histochemistry*, 49:131–143.
- Auer, S. (2014). Amyloid fibril nucleation: Effect of amino acid hydrophobicity. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(20):5289–5299.
- Averill, M. M., Barnhart, S., Becker, L., Li, X., Heinecke, J. W., Leboeuf, R. C., Hammerman, J. A., Sorg, C., Kerkhoff, C., ir Bornfeldt, K. E. (2011). S100A9 differentially modifies phenotypic states of neutrophils, macrophages, and dendritic cells: Implications for atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circulation*, 123(11):1216–1226.
- Babini, E., Bertini, I., Borsi, V., Calderone, V., Hu, X., Luchinat, C., ir Parigi, G. (2011). Structural characterization of human S100A16, a low-affinity calcium binder. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(2):243–256.
- Bertini, I., Das Gupta, S., Hu, X., Karavelas, T., Luchinat, C., Parigi, G., ir Yuan, J. (2009). Solution structure and dynamics of S100A5 in the apo and Ca²⁺-bound states. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 14(7):1097–1107.

- Biancalana, M. ir Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et biophysica acta*, 1804(7):1405–12.
- Björk, P., Källberg, E., Wellmar, U., Riva, M., Olsson, A., He, Z., Törngren, M., Liberg, D., Ivars, F., ir Leanderson, T. (2013). Common Interactions between S100A4 and S100A9 Defined by a Novel Chemical Probe. *PLoS ONE*, 8(5).
- Bode, G., Luken, A., Kerkhoff, C., Roth, J., Ludwig, S., ir Nacken, W. (2008). Interaction between S100A8/A9 and Annexin A6 Is Involved in the Calcium-induced Cell Surface Exposition of S100A8/A9. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46):31776–31784.
- Bolognesi, B., Kumita, J. R., Barros, T. P., Esbjorner, E. K., Luheshi, L. M., Crowther, D. C., Wilson, M. R., Dobson, C. M., Favrin, G., ir Yerbury, J. J. (2010). ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species. *ACS chemical biology*, 5(8):735–40.
- Boom, A., Pochet, R., Authelet, M., Pradier, L., Borghgraef, P., Van Leuven, F., Heizmann, C. W., ir Brion, J. P. (2004). Astrocytic calcium/zinc binding protein S100A6 over expression in Alzheimer's disease and in PS1/APP transgenic mice models. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1742(1-3):161–168.
- Botelho, H. M., Koch, M., Fritz, G., ir Gomes, C. M. (2009). Metal ions modulate the folding and stability of the tumor suppressor protein S100A2. *FEBS Journal*, 276(6):1776–1786.
- Botelho, H. M., Leal, S. S., Cardoso, I., Yanamandra, K., Morozova-Roche, L. A., Fritz, G., ir Gomes, C. M. (2012). S100A6 Amyloid Fibril Formation Is Calcium-modulated and Enhances Superoxide Dismutase-1 (SOD1) Aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(50):42233–42242.
- Bresnick, A. R., Weber, D. J., ir Zimmer, D. B. (2015). S100 proteins in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 15(2):96–109.
- Brundin, P., Melki, R., ir Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(4):301–7.
- Brunjes Brophy, M., Nakashige, T. G., Gaillard, A., ir Nolan, E. M. (2013). Contributions of the S100A9 C-terminal tail to high-affinity Mn(II) chelation by the host-defense protein human calprotectin. *Journal of the American Chemical Society*, 135(47):17804–17817.
- Carvalho, S. B., Botelho, H. M., Leal, S. S., Cardoso, I., Fritz, G., ir Gomes, C. M. (2013). Intrinsically Disordered and Aggregation Prone Regions Underlie β -Aggregation in S100 Proteins. *PLoS ONE*, 8(10):1–11.

- Chang, C.-C., Khan, I., Tsai, K.-L., Li, H., Yang, L.-W., Chou, R.-H., ir Yu, C. (2016). Blocking the interaction between S100A9 and RAGE V domain using CHAPS molecule: A novel route to drug development against cell proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1864(11):1558–1569.
- Chang, K. A., Kim, H. J., ir Suh, Y. H. (2012). The role of S100a9 in the pathogenesis of Alzheimer's disease: The therapeutic effects of S100a9 knockdown or knockout. *Neurodegenerative Diseases*, 10(1-4):27–29.
- Chernov, A. V., Dolkas, J., Hoang, K., Angert, M., Srikrishna, G., Vogl, T., Baranovskaya, S., Strongin, A. Y., ir Shubayev, V. I. (2015). The calcium-binding proteins S100a8 and S100a9 initiate the early inflammatory program in injured peripheral nerves. *Journal of Biological Chemistry*, 290(18):11771–11784.
- Chuang, C. C., Liao, T. Y., Chen, E. H. L., ir Chen, R. P. Y. (2013). How do amino acid substitutions affect the amyloidogenic properties and seeding efficiency of prion peptides. *Amino Acids*, 45(4):785–796.
- Cmoch, A., Groves, P., Palczewska, M., ir Piśkuła, S. (2012). S100A proteins in propagation of a calcium signal in norm and pathology. *Postepy biochemii*, 58(4):429–36.
- Croce, K., Gao, H., Wang, Y., Mooroka, T., Sakuma, M., Shi, C., Sukhova, G. K., Packard, R. R. S., Hogg, N., Libby, P., ir Simon, D. I. (2009). Myeloid-related protein-8/14 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation*, 120(5):427–436.
- Currais, A., Fischer, W., Maher, P., ir Schubert, D. (2017). Intraneuronal protein aggregation as a trigger for inflammation and neurodegeneration in the aging brain. *The FASEB Journal*, 31(1):5–10.
- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(6968):884–890.
- Donato, R. (2001). S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33(7):637–668.
- Donato, R., Cannon, B. R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D. J., ir Geczy, C. L. (2013). Functions of S100 proteins. *Current molecular medicine*, 13(1):24–57.
- Eanes, E. D. ir Glenner, G. G. (1968). X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 16(11):673–677.
- Ehrchen, J. M., Sunderkötter, C., Foell, D., Vogl, T., ir Roth, J. (2009). The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *Journal of leukocyte biology*, 86(3):557–566.

- Elghetany, M. T. ir Saleem, a. (1988). Methods for staining amyloid in tissues: a review. *Stain technology*, 63:201–212.
- Eremenko, E., Ben-Zvi, A., Morozova-Roche, L. A., ir Raveh, D. (2013). Aggregation of Human S100A8 and S100A9 Amyloidogenic Proteins Perturbs Proteostasis in a Yeast Model. *PLoS ONE*, 8(3):1–14.
- Foderà, V., Groenning, M., Vetri, V., Librizzi, F., Spagnolo, S., Cornett, C., Olsen, L., van de Weert, M., ir Leone, M. (2008). Thioflavin T hydroxylation at basic pH and its effect on amyloid fibril detection. *The journal of physical chemistry. B*, 112(47):15174–81.
- Fritz, G., Botelho, H. M., Morozova-Roche, L. A., ir Gomes, C. M. (2010). Natural and amyloid self-assembly of S100 proteins: structural basis of functional diversity. *FEBS Journal*, 277(22):4578–4590.
- Gagnon, D. M., Brophy, M. B., Bowman, S. E. J., Stich, T. A., Drennan, C. L., Britt, R. D., ir Nolan, E. M. (2015). Manganese binding properties of human calprotectin under conditions of high and low calcium: X-ray crystallographic and advanced electron paramagnetic resonance spectroscopic analysis. *Journal of the American Chemical Society*, 137(8):3004–3016.
- Gasymov, O. K. ir Glasgow, B. J. (2007). ANS fluorescence: Potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1774(3):403–411.
- Ghavami, S., Kerkhoff, C., Los, M., Hashemi, M., Sorg, C., ir Karami-tehrani, F. (2004). Mechanism of apoptosis induced by S100A8 / A9 in colon cancer cell lines : the role of ROS and the effect of metal ions from the cells upon cellular activation and induces in a zinc-reversible manner . In the present study ,. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(July):169–175.
- Grabarek, Z. (2011). Insights into modulation of calcium signaling by magnesium in calmodulin, troponin C and related EF-hand proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(5):913–921.
- Griffin, W., Stanley, L., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L., White, C., ir Araoz, C. (1989). Brain interleukin 1 and s-100 immunoreactivity are elevated in down syndrome and alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(19):7611–7615.
- Härd, T. (2014). Amyloid fibrils: Formation, polymorphism, and inhibition. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 5(3):607–614.

- He, Z., Riva, M., Björk, P., Swärd, K., Mörgelin, M., Leanderson, T., ir Ivars, F. (2016). CD14 is a co-receptor for TLR4 in the S100A9-induced pro-inflammatory response in monocytes. *PLoS ONE*, 11(5):1–15.
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., ir Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(7):463–477.
- Hessian, P. A. ir Fisher, L. (2001). The heterodimeric complex of MRP-8 (S100A8) and MRP-14 (S100A9) antibody recognition, epitope definition and the implications for structure. *European Journal of Biochemistry*, 268(2):353–363.
- Hiroshima, Y., Hsu, K., Tedla, N., Wong, S. W., Chow, S., Kawaguchi, N., ir Geczy, C. L. (2017). S100A8/A9 and S100A9 reduce acute lung injury. *Immunology and cell biology*, (February 2016):1–12.
- Hsu, J. C. C., Chen, E. H. L., Snoeberger, R. C., Luh, F. Y., Lim, T. S., Hsu, C. P., ir Chen, R. P. Y. (2013). Thioflavin T and its photoirradiative derivatives: Exploring their spectroscopic properties in the absence and presence of amyloid fibrils. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(13):3459–3468.
- Ibrahim, Z. A., Armour, C. L., Phipps, S., ir Sukkar, M. B. (2013). RAGE and TLRs: Relatives, friends or neighbours? *Molecular Immunology*, 56(4):739–744.
- Irwin, D. J., Lee, V. M.-Y. M.-Y., ir Trojanowski, J. Q. (2013). Parkinson's disease dementia: convergence of α -synuclein, tau and amyloid- β pathologies. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(9):626–36.
- Itou, H., Yao, M., Fujita, I., Watanabe, N., Suzuki, M., Nishihira, J., ir Tanaka, I. (2002). The crystal structure of human MRP14 (S100A9), a Ca(2+)-dependent regulator protein in inflammatory process. *Journal of molecular biology*, 316(2):265–276.
- Källberg, E., Vogl, T., Liberg, D., Olsson, A., Björk, P., Wikström, P., Bergh, A., Roth, J., Ivars, F., ir Leanderson, T. (2012). S100A9 Interaction with TLR4 Promotes Tumor Growth. *PLoS ONE*, 7(3):e34207.
- Kim, H. J., Chang, K. A., Ha, T. Y., Kim, J., Ha, S., Shin, K. Y., Moon, C., Nacken, W., Kim, H. S., ir Suh, Y. H. (2014). S100A9 knockout decreases the memory impairment and neuropathology in crossbreed mice of Tg2576 and S100A9 knockout mice model. *PLoS ONE*, 9(2):1–9.
- Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M., ir Dobson, C. M. (2014). The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(6):384–96.

- Konno, T., Murata, K., ir Nagayama, K. (1999). Amyloid-like aggregates of a plant protein: A case of a sweet-tasting protein, monellin. *FEBS Letters*, 454(1-2):122–126.
- Korndörfer, I. P., Brueckner, F., ir Skerra, A. (2007). The Crystal Structure of the Human (S100A8/S100A9)₂ Heterotetramer, Calprotectin, Illustrates how Conformational Changes of Interacting α -Helices Can Determine Specific Association of Two EF-hand Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 370(5):887–898.
- Kwek, J. H., Wynne, A., Lefèvre, C., Familiar, M., Nicholas, K. R., ir Sharp, J. A. (2013). Molecular evolution of a novel marsupial S100 protein (S100A19) which is expressed at specific stages of mammary gland and gut development. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(1):4–16.
- Kwon, C. H., Moon, H. J., Park, H. J., Choi, J. H., ir Park, D. Y. (2013). S100A8 and S100A9 promotes invasion and migration through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent NF- κ B activation in gastric cancer cells. *Molecules and Cells*, 35(3):226–234.
- Leach, S. T., Mitchell, H. M., Geczy, C. L., Sherman, P. M., Day, A. S., Leach, S. T., Mitchell, H. M., Geczy, C. L., Sherman, P. M., Day, a. S., ir Sa, L. (2008). S100A12 are expressed in the inflamed gastric mucosa of Helicobacter pylori -infected children. *The Canadian Journal of Gastroenterology*, 22(5):461–464.
- Leal, S. S., Botelho, H. M., ir Gomes, C. M. (2012). Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(19-20):2253–2270.
- Leukert, N., Vogl, T., Strupat, K., Reichelt, R., Sorg, C., ir Roth, J. (2006). Calcium-dependent tetramer formation of S100A8 and S100A9 is essential for biological activity. *Journal of molecular biology*, 359(4):961–72.
- Li, C., Chen, H., Ding, F., Zhang, Y., Luo, A., Wang, M., ir Liu, Z. (2009). A novel p53 target gene, S100A9, induces p53-dependent cellular apoptosis and mediates the p53 apoptosis pathway. *The Biochemical journal*, 422(2):363–372.
- Lim, S. Y., Raftery, M. J., ir Geczy, C. L. (2011). Oxidative Modifications of DAMPs Suppress Inflammation: The Case for S100A8 and S100A9. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(8):2235–2248.
- Lim, S. Y., Raftery, M. J., Goyette, J., Hsu, K., ir Geczy, C. L. (2009). Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. *Journal of leukocyte biology*, 86(3):577–587.
- Lin, H., Andersen, G. R., ir Yatime, L. (2016). Crystal structure of human S100A8 in complex with zinc and calcium. *BMC Structural Biology*, pages 1–10.

- Liu, Y., Myrvang, H. K., ir Dekker, L. V. (2015). Annexin A2 complexes with S100 proteins: Structure, function and pharmacological manipulation. *British Journal of Pharmacology*, 172(7):1664–1676.
- Malashkevich, V. N., Varney, K. M., Garrett, S. C., Wilder, P. T., Knight, D., Charpentier, T. H., Ramagopal, U. A., Almo, S. C., Weber, J., ir Bresnick, A. R. (2009). NIH Public Access. *Peptides*, 47(18):5111–5126.
- Markowitz, J. ir Carson, W. E. (2013). Review of S100A9 biology and its role in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1835(1):100–109.
- Matulis, D. (2008). *Baltymų fizikinė chemija*.
- Matulis, D. ir Lovrien, R. (1998). 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. *Biophysical journal*, 74(1):422–429.
- McCormick, M. M., Rahimi, F., Bobryshev, Y. V., Gaus, K., Zreiqat, H., Cai, H., Lord, R. S. A., ir Geczy, C. L. (2005). S100A8 and S100A9 in Human Arterial Wall. *Journal of Biological Chemistry*, 280(50):41521–41529.
- Mischke, D., Korge, B. P., Marenholz, I., Volz, a., ir Ziegler, a. (1996). Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *The Journal of investigative dermatology*, 106(5):989–992.
- Moore, B. W. (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochemical and biophysical research communications*, 19(6):739–744.
- Moroz, O. V., Burkitt, W., Wittkowski, H., He, W., Ianoul, A., Novitskaya, V., Xie, J., Polyakova, O., Lednev, I. K., Shekhtman, A., Derrick, P. J., Bjoerk, P., Foell, D., ir Bronstein, I. B. (2009). Both Ca²⁺ and Zn²⁺ are essential for S100A12 protein oligomerization and function. *BMC biochemistry*, 10:11.
- Nakamura, K., Mori, F., Kon, T., Tanji, K., Miki, Y., Tomiyama, M., Kurotaki, H., Toyoshima, Y., Kakita, A., Takahashi, H., Yamada, M., ir Wakabayashi, K. (2015). Filamentous aggregations of phosphorylated α -synuclein in Schwann cells (Schwann cell cytoplasmic inclusions) in multiple system atrophy. *Acta neuropathologica communications*, 3:29.
- Nakashige, T. G., Zhang, B., Krebs, C., ir Nolan, E. M. (2015). Human calprotectin is an iron-sequestering host-defense protein. *Nature Chemical Biology*, 11(10):765–771.
- Okada, K., Arai, S., Itoh, H., Adachi, S., Hayashida, M., Nakase, H., ir Ikemoto, M. (2016). CD68 on rat macrophages binds tightly to S100A8 and S100A9 and helps to regulate the cells' immune functions. *Journal of leukocyte biology*, 100(5):1093–1104.

- Ong, L. O. T., Ph, F. O., An, D. W. A. L., Bs, C., Im, R. A. R. L., Haurasia, S. H. S. C., ir Ms, C. (2014). S100A Proteins as Molecular Targets in the Ocular Surface Inflammatory Diseases. *The ocular surface*, 12(1):23–31.
- Philippens, I. H., Ormel, P. R., Baarends, G., Johansson, M., Remarque, E. J., ir Doverskog, M. (2016). Acceleration of amyloidosis by inflammation in the amyloid-beta marmoset monkey model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 55(1):101–113.
- Qin, W., Ho, L., Wang, J., Peskind, E., ir Pasinetti, G. M. (2009). S100A7, a Novel Alzheimer's disease biomarker with non-amyloidogenic alpha-secretase activity acts via selective promotion of ADAM-10. *PLoS ONE*, 4(1).
- Regenhard, P., Petzl, W., Zerbe, H., ir Sauerwein, H. (2010). The antibacterial psoriasin is induced by E. coli infection in the bovine udder. *Veterinary Microbiology*, 143(2-4):293–298.
- Riva, M., He, Z., Källberg, E., Ivars, F., ir Leanderson, T. (2013). Human S100A9 Protein Is Stabilized by Inflammatory Stimuli via the Formation of Proteolytically-Resistant Homodimers. *PLoS ONE*, 8(4).
- Roltsch, E., Holcomb, L., Young, K. A., Marks, A., ir Zimmer, D. B. (2010). PSAPP mice exhibit regionally selective reductions in gliosis and plaque deposition in response to S100B ablation. *Journal of neuroinflammation*, 7(1):78.
- Ruipérez, V., Darios, F., ir Davletov, B. (2010). Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Progress in Lipid Research*, 49(4):420–428.
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M., ir Tessier, P. a. (2003). Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(6):3233–3242.
- Santamaria-Kisiel, L., Rintala-Dempsey, A. C., ir Shaw, G. S. (2006). Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *The Biochemical journal*, 396(2):201–214.
- Sathe, K., Maetzler, W., Lang, J. D., Mounsey, R. B., Fleckenstein, C., Martin, H. L., Schulte, C., Mustafa, S., Synofzik, M., Vukovic, Z., Itohara, S., Berg, D., ir Teismann, P. (2012). S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF- pathway. *Brain*, 135(11):3336–3347.

- Shepherd, C. E., Goyette, J., Utter, V., Rahimi, F., Yang, Z., Geczy, C. L., ir Halliday, G. M. (2006). Inflammatory S100A9 and S100A12 proteins in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 27(11):1554–1563.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., ir Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645):839–840.
- Sroussi, H. Y., Berline, J., ir Palefsky, J. M. (2006). Oxidation of methionine 63 and 83 regulates the effect of S100A9 on the migration of neutrophils in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(3):818–824.
- Stephan, J. R. ir Nolan, E. M. (2016). Calcium-induced Tetramerization and Zinc Chelation Shield Human Calprotectin from Degradation by Host and Bacterial Extracellular Proteases. *Chem Scie*, 7(3):37–54.
- Sturchler, E., Cox, J. A., Durussel, I., Weibel, M., ir Heizmann, C. W. (2006). S100A16, a novel calcium-binding protein of the EF-hand superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50):38905–38917.
- Swindell, W. R., Johnston, A., Xing, X., Little, A., Robichaud, P., Voorhees, J. J., Fisher, G., ir Gudjonsson, J. E. (2013). Robust shifts in S100a9 expression with aging: a novel mechanism for chronic inflammation. *Scientific reports*, 3:1215.
- Tayeb-Fligelman, E., Tabachnikov, O., Moshe, A., Goldshmidt-Tran, O., Sawaya, M. R., Coquelle, N., Colletier, J.-p., ir Landau, M. (2017). The cytotoxic *Staphylococcus aureus* PSM α 3 reveals a cross- α amyloid-like fibril. *Science*, 355(6327):831–833.
- Tsai, S. Y., Segovia, J. A., Chang, T. H., Morris, I. R., Berton, M. T., Tessier, P. A., Tardif, M. R., Cesaro, A., ir Bose, S. (2014). DAMP Molecule S100A9 Acts as a Molecular Pattern to Enhance Inflammation during Influenza A Virus Infection: Role of DDX21-TRIF-TLR4-MyD88 Pathway. *PLoS Pathogens*, 10(1).
- Tycko, R. (2014). Physical and structural basis for polymorphism in amyloid fibrils. *Protein Science*, 23(11):1528–1539.
- Valenzuela, S. M., Berkahn, M., Martin, D. K., Huynh, T., Yang, Z., ir Geczy, C. L. (2005). Elucidating the structure and function of S100 proteins in membranes. volume 6036, page 603619.
- Van Giau, V., An, S. S., ir Kim, S. (2016). a Novel Mutation in the S100a9 Gene Associated With Alzheimer'S Disease in a Malaysian Family: Five Cases Report. *Alzheimer's & Dementia*, 12(7):P485.

- Villar-Piqué, A., Sabaté, R., Lopera, O., Gibert, J., Torne, J. M., Santos, M., ir Ventura, S. (2010). Amyloid-like protein inclusions in tobacco transgenic plants. *PLoS ONE*, 5(10).
- Vogl, T., Eisenblätter, M., Völler, T., Zenker, S., Hermann, S., van Lent, P., Faust, A., Geyer, C., Petersen, B., Roebrock, K., Schäfers, M., Bremer, C., ir Roth, J. (2014). Alarmin S100A8/S100A9 as a biomarker for molecular imaging of local inflammatory activity. *Nature communications*, 5(May):4593.
- Vogl, T., Leukert, N., Barczyk, K., Strupat, K., ir Roth, J. (2006). Biophysical characterization of S100A8 and S100A9 in the absence and presence of bivalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(11):1298–1306.
- Vogl, T., Pröpper, C., Hartmann, M., Strey, A., Strupat, K., Van Den Bos, C., Sorg, C., ir Roth, J. (1999). S100A12 is expressed exclusively by granulocytes and acts independently from MRP8 and MRP14. *Journal of Biological Chemistry*, 274(36):25291–25296.
- Wang, C., Klechikov, A. G., Gharibyan, A. L., Wärmländer, S. K. T. S., Jarvet, J., Zhao, L., Jia, X., Shankar, S. K., Olofsson, A., Brännström, T., Mu, Y., Gräslund, A., ir Morozova-Roche, L. A. (2014). The role of pro-inflammatory S100A9 in Alzheimer's disease amyloid-neuroinflammatory cascade. *Acta Neuropathologica*, 127(4):507–522.
- Xiang, W., Windl, O., Wu, G., Dugas, M., Kohlmann, A., Dierkes, N., Westner, I. M., Kretzschmar, H. A., ir Irol, J. V. (2004). Identification of Differentially Expressed Genes in Scrapie-Infected Mouse Brains by Using Global Gene Expression Technology. *Society*, 78(20):11051–11060.
- Yanamandra, K., Alexeyev, O., Zamotin, V., Srivastava, V., Shchukarev, A., Brorsson, A.-C., Tartaglia, G. G., Vogl, T., Kaye, R., Wingsle, G., Olsson, J., Dobson, C. M., Bergh, A., Elgh, F., ir Morozova-Roche, L. A. (2009). Amyloid Formation by the Pro-Inflammatory S100A8/A9 Proteins in the Ageing Prostate. *PLoS ONE*, 4(5):e5562.
- Yatime, L., Betzer, C., Jensen, R. K., Mortensen, S., Jensen, P. H., ir Andersen, G. R. (2016). The Structure of the RAGE:S100A6 Complex Reveals a Unique Mode of Homodimerization for S100 Proteins. *Structure*, pages 1–10.
- Yuan, A. H. ir Hochschild, A. (2017). A bacterial global regulator forms a prion. *Science*, 355(6321):198–201.
- Yui, S., Nakatani, Y., ir Mikami, M. (2003). Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 26(6):753–760.

- Zhang, C., Liu, Y., Gilthorpe, J., ir van der Maarel, J. R. C. (2012). MRP14 (S100A9) protein interacts with Alzheimer beta-amyloid peptide and induces its fibrillization. *PLoS ONE*, 7(3):2–8.
- Zimmer, D. B., Eubanks, J. O., Ramakrishnan, D., ir Criscitiello, M. F. (2013). Evolution of the S100 family of calcium sensor proteins. *Cell Calcium*, 53(3):170–179.