

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Rok DEMIĆ

**PRIPRAVA ORJAŠKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV IZ ERITROCITNIH
MEMBRAN**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Rok DEMIĆ

**PRIPRAVA ORJAŠKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV IZ ERITROCITNIH
MEMBRAN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**PREPARATION OF GIANT UNILAMELLAR VESICLES FROM ERYTHROCYTE
MEMBRANES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Gregorja Anderluha.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter MAČEK, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH, Kemijski Inštitut Slovenije

Član: Kristina SEPČIĆ, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Datum zagovora: 8.3.2016

Podpisni izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Rok Demić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 577.11:576.3(043.2)=163.6
KG orjaški unilamelarni vezikli/elektroformacija/lipidni vezikli/fluorescentna mikroskopija/fazno kontrastna mikroskopija/eritrocitne membrane
AV DEMIĆ, Rok
SA ANDERLUH, Gregor (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2016
IN OPTIMIZACIJA PROTOKOLA ZA PRIPRAVO VELIKIH ENOSLOJNIH VEZIKLOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 40 str., 3 pregl., 13 sl., 38 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Orjaški unilamelarni vezikli (ang. Giant Unilamellar Vesicles; GUV) so odličen model za raziskovanje različnih fenomenov povezanih z lipidnimi membranami. Njihova velikost je v razredu nekaj deset mikrometrov, kar je primerljivo z evkariontskimi celicami in omogoča direktno opazovanje s svetlobno mikroskopijo. Priprava GUV-ov se je izboljševala od njihovega odkritja v šestdesetih letih prejšnjega stoletja in tako so se ustvarjali vezikli, ki so bili vedno boljši model za raziskovanje bioloških membran. Kljub razvoju novih tehnik, sta ostajali dve bistveni razliki med naravnimi membranami in GUV-i; vezikli so bili po sestavi enostavnejši in pripravljani v mediju z nizko ionsko jakostjo. Nedavno je bil objavljen postopek za pripravo GUV-ov iz eritrocitnih duhkov pri fizioloških pogojih, vendar le-ta omogoča tvorbo omejenega števila GUV-ov. V naši raziskavi smo razvili zanesljivo, enostavno in učinkovito metodo za elektroformacijo GUV-ov pri fiziološki ionski jakosti iz nativnih eritrocitnih membran, ki omogoča nastanek večjega števila okroglih GUV-ov. Nastali vezikli nimajo asimetrije bioloških membran, ohranila pa se je kompleksna proteinska, lipidna in oligosaharidna sestava.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC
CX	Giant unilamellar vesicles, lipid vesicles, fluorescent microscopy, phase contrast microscopy, erythrocyte membrane
AU	DEMIĆ, Rok
AA	ANDERLUH, Gregor (mentor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY	2016
TI	OPTIMIZATION OF THE PROTOCOL FOR THE PREPARATION OF GIANT UNILAMELLAR VESICLES
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	IX, 40 p., 3 tab., 13 fig., 38 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	Giant unilamellar vesicles (GUVs) are an attractive model system for studying various lipid membrane-related phenomena. Their size measures in tens of microns, which is comparable to produce GUVs from erythrocyte ghosts under physiological conditions was introduced recently; however the number of GUVs produced in this fashion is limited. We have developed a reliable, simple and effective method for electroformation of GUVs from native erythrocyte ghosts at physiologically relevant salt concentrations, which allows preparation of higher amounts of spherical GUVs. GUVs prepared according to the new procedure may not have the asymmetry found in biological membranes, however, the complex protein, lipid and oligosaccharide composition is preserved.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo slik	VII
Kazalo preglednic	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1. UVOD	1
1.1. NAMEN NALOGE.....	2
2. PREGLED OBJAV	3
2.1. BIOLOŠKE MEMBRANE.....	3
2.2. MEMBRANSKI LIPIDI.....	3
2.3. MEMBRANSKI PROTEINI.....	4
2.4. UREJENOST MEMBRANE.....	4
2.5. ORJAŠKI UNILAMELARNI VEZIKLI (GUV) IN NJHOVA PRIPRAVA.....	5
2.5.1. Nežna hidracija	5
2.5.2. Elektroformacija	5
2.6. OPAZOVANJE GUV-ov Z OPTIČNO MIKROSKOPIJO.....	8
2.6.1. Fluorescentna mikroskopija	9
3. MATERIAL	11
3.1. KEMIKALIJE:.....	11
3.2. RAZTOPINE:.....	12
3.3. LABORATORIJSKA OPREMA:.....	12
4. METODE	13
4.1. ODVZEM KRVI.....	13
4.2. PRIPRAVA MULTILAMELARNIH VEZIKLOV (MLV) IN VELIKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV (LUV).....	13
4.3. PRIPRAVA ERITROCITNIH MEMBRAN IN DUHOV.....	13
4.4. ELEKTROFORMACIJA.....	13
4.5. FLUORESCENTNA MIKROSKOPIJA.....	16
4.6. DOLOČANJE KONCENTRAIJE PROTEINOV.....	17
4.7. DOLOČANJE KONCENTRACIJE HOLESTEROLA IN FOSFOLIPIDOV.....	17
4.8. NaDS-PAGE (POLIAKRILAMIDNA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI DODECILSULFATA).....	17

5. REZULTATI	18
5.1. UGOTAVLJANJE POTREBNE KOLIČINE LIPIDOV NA ELEKTRODAH.....	18
5.2. UPORABA ERITROCITNIH DUHKOV	18
5.3. UVEDBA MEMBRAN	18
5.4. PREVERJANJE VPLIVA RAZLIČNIH DEJAVNIKOV NA USPEŠNOST ELEKTROFORMACIJE	19
5.5. KONCENTRIRANJE GUV-ov PO KONČANI ELEKTROFORMACIJI	24
5.6. RAZPOREDITEV GUV-ov PO EPRUVETKI	25
5.7. IMUNODETEKCIJA.....	25
5.8. PREPUSTNOST MEMBRANE ZA KALCEIN IN DEKSTRAN.....	26
5.9. KONCENTRAICJA PROTEINOV IN LIPIDOV	28
5.10. NaDS-PAGE.....	29
6. RAZPRAVA	30
6.1. PRIPRAVA LIPIDOV ZA NANOS NA ELEKTRODE.....	30
6.2. VELIKOST NASTALIH VEZIKLOV	30
6.3. VPLIV RAZLIČNIH DEJAVNIKOV NA PRODUKCIJO GUV-ov	31
6.3.1. Mediji, v katerem so pripravljene lipidi za nanos.....	31
6.3.2. Razlika med uporabo eritrocitnih duhkov in eritrocitnih membran	31
6.3.3. Prednosti uporabe saharoznega pufra za elektroformacijo	31
6.3.4. Vpliv količine nanešenih lipidov.....	32
6.4. PRIMERJAVA LIPIDNE SESTAVE IZVORNIH MEMBRAN IN GUV-ov	32
6.5. PRIMERJAVA PROTEINOV V ERITROCITNIH MEMBRANAH, ERITROCITNIH DUHKIH IN GUV-ih.....	32
6.6. IMUNODETEKCIJA SHARADINIH SKUPIN NA MEMBRANI.....	34
6.7. PREPUSTNOST GUV-ov ZA MOLEKULE KALCEINA IN DEKSTRANA	34
7. SKLEPI	36
8. POVZETEK	37
9. LITERATURA	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema biološke membrane	3
Slika 2: Opazovanje GUV-a z različnimi mikroskopskimi tehnikami.....	10
Slika 3: Shema platinastih elektrod in elektroformacija v vodni kopeli	16
Slika 4: Primeri GUV-ov.....	20
Slika 5: Izplen GUV-ov po protokolih.....	21
Slika 6: Delež velikostnih razredov GUV-ov po protokolih.....	22
Slika 7: Delež sferičnih GUV-ov brez vključkov (slika 4a) GUV-ov po protokolih.....	23
Slika 8: Reprezentativna slika raztopine z GUV-i, pripravljene po protokolu št. 5.....	24
Slika 9: Delež GUV-ov v različnih delih vodnega stolpca	25
Slika 10: Imunodetekcija na površini GUV-ov	26
Slika 11: Prepustnost GUV-ov za kalcein.....	27
Slika 12: Koncentracija proteinov v membranah, duhkah in GUV-ih.....	28
Slika 13: Profil eritrocitnih proteinov	29

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Izboljšave protokolov za elektroformacijo skozi čas	8
Preglednica 2: Preverjanje vpliva različnih dejavnikov na uspešnost elektroforeze	15
Preglednica 3: Koncentracija proteinov, fosfolipidov in holesterola	29

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Anti-A protitelesa	Protitelesa z vezavnim mestom za antigene krvne skupine A
Anti-B protitelesa	Protitelesa z vezavnim mestom za antigene krvne skupine B
BSA	Goveji serum albumin (ang. Bovine Serum Albumin)
DIC	Diferencialno interferenčni kontrast
DilC ₁₈	(1,1'-dioktadecil-3,3',3'-tetrametilindodikarbocianin perklorat)
DMSO	dimetil sulfoksid
DOPC	1,2-dioleoilfosfatidilholin
EDTA	Etilendiaminotetraocetna kislina
FITC	Fluorescein isotiocianat-dekstran
GUV	Orjaški unilamelarni vezikel (ang. Giant Unilamellar Vesicle)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
LUV	Velik unilamelarni vezikel (ang. Large Unilamellar Vesicle)
MLV	Večplastni vezikel (ang. Multilamellar Vesicle)
Na ₂ HPO ₄	Natrijev hidrogen fosfat
NaCl	Natrijev klorid
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilholin
RBC	Rdeča krvna celica (ang. Red Blood Cell)
rDHPE	N-(Lizamin Rhodamin B sulfonil)-1,2-diheksadekanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamin, trietilamonijeva sol
SUV	Majhen enoplastni vezikel (ang. Small Unilamellar Vesicle)
TCA	Trikloroocetna kislina (ang. Trichloroacetic acid)

1. UVOD

Biološke membrane so ovoj vseh celic in v primeru evkariontov, tudi nekaterih celičnih organelov. Opravljajo različne naloge, ki so ključne za preživetje celic. Predstavljajo mejo med celico in njenim okoljem, sistem za vnos potrebnih in izločanje nepotrebnih snovi, sodelujejo pri gibanju in pritrjevanju, s proteinskimi receptorji celici omogočajo tudi zaznavanje okolice in medcelično komunikacijo. Posebej specializirane membrane, kot na primer mitohondrijske in tilakoidne, omogočajo prenos energije, ki je potrebna za tvorbo nekaterih energetsko bogatih molekul. Razumevanje procesov, ki so povezani s celično membrano je torej izrednega pomena za znanost in tako raziskovalci razvijajo vedno nove metode, s katerimi bi lahko prišli do nekaterih nepoznanih odgovorov. Eden od načinov za raziskavo membran je tudi uporaba orjaških unilamelarnih veziklov, GUVs (ang. Giant Unilamellar Vesicles).

GUV-i so odličen model za preučevanje z membranami povezanih fenomenov. V zadnjih letih so postali izjemno koristen model za preučevanje različnih procesov, ki se odvijajo na lipidnih membranah. Uporabni so zaradi svoje velikosti (10-100 μm), kar omogoča direktno opazovanje s svetlobno mikroskopijo. Velikostni razred nekaj 10 μm je primerljiv velikosti živih celic, za membrano pa na molekularnem nivoju pomeni, da ni zelo ukrivljena (Kozlov, 2010). Priprava GUV-ov temelji na dveh osnovnih korakih: 1) nanos lipidov na nek substrat iz katerega se bodo v naslednjem koraku tvorili GUV-i; 2) tvorba GUV-ov po postopku spontanega vzhajanja ali elektroformacije. Zadnje čase je slednji bolj v uporabi zaradi hitrejše izvedbe (pomemben dejavnik kadar imamo opravka z biološkimi molekulami) in boljšega izkoristka v smislu števila, velikosti in oblike nastalih GUV-ov (Pott in sod., 2008). Pri elektroformaciji se lipide nanese na elektrode, ki so potem izpostavljene izmeničnemu toku. Nastanek GUV-ov sicer ni natančno pojasnjen (Mikelj in sod., 2013), vendar je z mikroskopom mogoče v realnem času opazovati nastajanje GUV-ov na elektrodah (Montes in sod., 2007). Tekom let se je razvilo mnogo različnih protokolov za elektroformacijo, ki se razlikujejo predvsem v uporabljeni električni napetosti in trajanju posameznih korakov, vendar načelno trajajo med 1 in 3 urami (Angelova in sod., 1992). Priprava GUV-ov poteka tako, da z uporabo različnih lipidov, vnašanjem proteinov in uporabo različnih medijev, raziskovalci popolnoma nadzorujejo sestavo membrane in njeno okolico. Uporaba GUV-ov je prinesla različna spoznanja na področju fizikalnih lastnosti, strukture membran, interakcije lipidov in proteinov oz. lipidov znotraj membrane GUV-ov (Bagatolli, 2000, Tamba in Yamazaki, 2005, Almeida, 2007, Schon, 2008, Kozlov, 2010, Praper, 2011a).

Uporabnost GUV-ov je bila široka vendar omejena z i) nezmožnostjo njihove priprave v raztopinah s fiziološko ionsko jakostjo in ii) pomanjkanjem asimetrije, ki se pojavlja v bioloških membranah. Oba problema je obšla skupina Montes in sodelavci, ki so uspeli pripraviti GUV-e iz eritrocitnih membran v mediju s fiziološko primerljivo ionsko jakostjo. Njihov protokol je temeljil na delu Tanje Pott in sodelavcev (Pott in sod., 2008), kjer so spremenili frekvenco izmeničnega toka, pri kateri je potekala elektroformacija. Postopek

omogoča pripravo GUV-ov iz nativnih membran, pri fiziološko primerljivi ionski jakosti, vendar ima slab donos v smislu števila nastalih veziklov.

1.1. NAMEN NALOGE

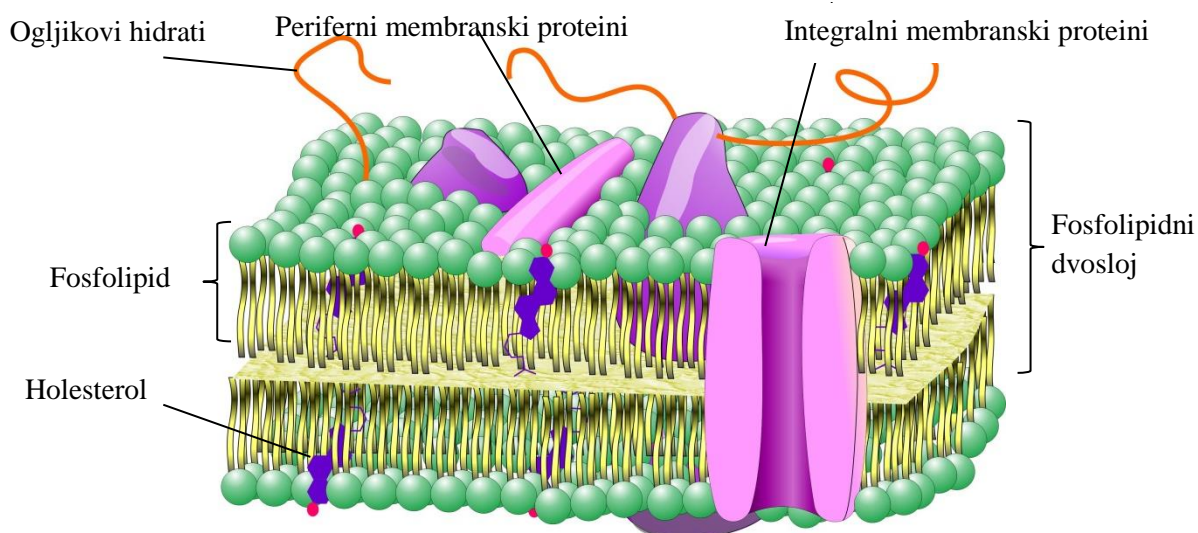
Namen diplomskega dela je bil:

- prirediti protokol za pripravo GUV-ov iz nativnih membran, pri fiziološko pomembni ionski jakosti;
- med postopkom ohraniti naravno sestavo izvornih membran in funkcionalnost membranskih proteinov;
- s pripravo GUV-ov v mediju s fiziološko ionsko jakostjo in kompleksno sestavo membrane, še povečati uporabnost GUV-ov za membranske raziskave.

2. PREGLED OBJAV

2.1. BIOLOŠKE MEMBRANE

Na prvi pogled membrana deluje le kot ovoj, ki obdaja celice in nekatere celične organele, vendar v resnici opravlja različne naloge, ki so bistvene za preživetje celice. Poleg meje med celico in njeno okolico, membrana omogoča lokalno porazdelitev biokemijskih procesov in predstavlja stik z okoljem, zaščito ter sistem za transport snovi v in iz celice. To ji omogoča zgradba, ki se med različnimi celicami sicer razlikuje, vendar je kljub temu možno najti neke skupne lastnosti. Biomembrane sestavljajo lipidi, proteini in ogljikovi hidrati. Razmerje med posameznimi komponentami je odvisno od izvora membrane, tako lahko večinski delež predstavljajo lipidi in proteini le manjšino, lahko pa je ravno obratno. Ogljikovi hidrati se ne nahajajo v membrani ampak so nanjo vezani s kovalentno vezjo, predvsem na zunanji strani plazmaleme (Slika 1).



Slika 1: Shema biološke membrane

2.2. MEMBRANSKI LIPIDI

Osnovna struktura membran je lipidni dvosloj, ki je sestavljen predvsem iz holesterola ter različnih vrst glicerofosfolipidov in sfingolipidov. Te amfifilne molekule imajo velik nepolaren del in polarno glavo. V naravnih membranah se pojavljajo desetine različnih lipidov, z različnimi polarnimi glavami in široko paleto maščobnih kislin, ki predstavljajo nepolarni del molekule.

Vpliv posamezne vrste lipida na lastnosti lipidnega dvosloja so že preučevali z GUV-i iz enostavnih membran (sestavljanih iz ene, dveh ali treh vrst lipidov) vendar se z vsakim novim dodanim lipidom poveča kompleksnost sistema in oteži interpretacijo rezultatov. Določiti vpliv specifičnega lipida na membrano tako postane zapleteno (Bagatolli, 2006). Zagotovo pa je model boljši, če ima kompleksno sestavo, kakršna je v naravnih sistemih, in tako omogoča

preučevanje fizikalnih lastnosti membrane (Gambin in sod., 2006) ali interakcijo membrane z neko drugo molekulo (Tamba in Yamazaki, 2005, Schön in sod., 2008, Praper in sod., 2011b).

Posamezni lipidi so prosto gibljivi v vseh smereh znotraj enega sloja, prehod v drugo plast membrane pa je težaven. Skozi lipidni dvosloj lahko prehajajo majhne, nepolarne molekule, za polarne in večje molekule pa so navadno potrebni transportni membranski proteini.

2.3. MEMBRANSKI PROTEINI

Membranski proteini imajo lahko različne vloge, vendar jih ne glede na njihovo funkcijo razdelimo v dve skupini glede na njihovo povezanost z membrano. Prva skupina so periferni proteini, ki imajo z membrano šibkejšo povezavo, druga skupina pa so integralni proteini, ki so z membrano v tesnejšem stiku. Tam pogosto delujejo kot transportni proteini za prehajanje večjih molekul skozi membrano (Slika 1).

Proteini v in na membranah opravljajo vloge citoskeleta, sidrnih proteinov, ki služijo kot povezava med integralnimi in citoskeletnimi proteini, glikozilirani zmanjšujejo interakcije med celicami ali nosijo antigene za krvne skupine. Proteinski kanalčki in transporterji skrbijo tudi za transport snovi, celično vsebino in konstanten volumen celice.

Tako kot lipidi, tudi proteini niso naključno razvrščeni po membrani. Na citosolni strani se pojavljajo drugi periferni proteini kot na zunanji. To celici omogoča drugačne biološke aktivnosti na dveh straneh membrane.

2.4. UREJENOST MEMBRANE

Model tekočega mozaika, ki sta ga 1972 predstavila Singer in Nicholson, najbolje povezuje vse, kar vemo o kemijski strukturi membran. Opisuje lipidni dvosloj z integralnimi in perifernimi proteini, ki so do neke mere prosto gibljivi in tvorijo mozaični vzorec. Zaradi neprestanega lateralnega gibanja proteinov in lipidov, so membrane fluidne in se neprenehoma spreminjajo. Lipidi v membrani niso naključno porazdeljeni, čemur pravimo membranska asimetrija. Fosfatidilserin in fosfatidiletanolamin se pojavljata pretežno v notranji plasti membrane, sfingomielin in fosfatidilholin pa v zunanji. Holesterol se vključuje v obe plasti dvosloja. Tovrstna asimetrija je prisotna pri mnogih evkariontih in igra očitno pomembno vlogo pri normalnem delovanju celice, kar pomeni, da je zaželen tudi na poskusnih modelih kot so GUV-i (Boyer, 2005).

Kasneje so raziskave pokazale, da obstajajo znotraj mozaika, v eni plasti, manjše domene z značilno zgradbo in s posebnimi lastnostmi. Opazovanje teh področij je tehnično predstavljalo nemalo težav, zaradi česar je trajalo, da je bil koncept membranskih raftov sprejet v znanstvenih krogih.

Predvsem gre tu za koncentrirana področja molekul sfingomielina in holesterola, ki se tesno prilegajo druga drugi. Biološke membrane so *in vivo* v tekoči fazi, membranski rafti pa kažejo višjo stopnjo urejenosti, ki bolj spominja na gel fazo in jo imenujemo tekoča urejena faza. Velikost in dolgoživost teh mikrodomen sta pod vplivom pritiska, temperature in kemijske sestave membrane. Celične membrane so iz mnogih različnih lipidov, kar vpliva na

pojavljanje raftov, prisotnost membranskih proteinov pa predstavlja še dodaten nivo kompleksnosti v sistemu. Raziskave na enostavnih modelih iz umetnih membran, ki so sestavljeni iz peščice, še pogosteje pa le iz dveh ali treh različnih lipidov, lahko podajo le omejene informacije. Zato je v krogih biokemikov zaželen razvoj novih membranskih modelov, s kompleksnejšo zgradbo (Simons, 2004). Enako velja tudi za druga področja raziskav, za katere bi GUV-i iz eritrocitnih membran lahko predstavljali eno od možnih rešitev.

2.5. ORJAŠKI UNILAMELARNI VEZIKLI (GUV) IN NJIHOVA PRIPRAVA

GUV-i so poznan model za preučevanje membran že od njihovega odkritja pred skoraj pol stoletja (Reeves in Dowben, 1969). Zaradi njihove velikosti, zmožnosti opazovanja s svetlobnim mikroskopom in nadzorom nad sestavo membrane in njihove okolice, so GUV-e kmalu po odkritju začeli uporabljati za ugotavljanje membranskih fizikalnih lastnosti, kot sta elastičnost in ukrivljenost membrane pri različnih pogojih (Bivas in sod., 1987, Engelhardt in sod. 1985, Faucon in sod., 1989). Za pripravo so uporabljali predvsem čiste sintetične lipide in protokol nežne hidracije.

2.5.1. Nežna hidracija

Lipide se je zamešalo v želeni koncentraciji v organskem topilu, v naslednjem koraku je topilo izhlapelo, tanek film lipidov pa se je potem previdno zalil z vodno raztopino in inkubiral čez noč. V tem času, se je lipidna plast dvignila nad podlago in tvorila belkast oblak, v katerem so bili orjaški liposomi. Celoten postopek je trajal en dan ali več. Že takrat so se zavedali, da je potrebno za biološko pomembne raziskave ustvariti model, ki bi bil podoben biološkemu sistemu, zato so tvorili GUV-e z lipidnimi ekstrakti iz jajčnega rumenjaka in iskali načine, kako pripraviti GUV-e v slanem mediju. Akashi in sodelavci so 1995 objavili protokol, ki opisuje postopek nežne hidracije v slanem mediju. Nepraktičnost postopka je v tem, da mora biti približno 10-15 odstotkov lipidov negativno nabitih, kar omeji poljubno sestavo membrane, težavno pa je bilo tudi dodajanje proteinov v membrano (Akashi, 1995). Na splošno je slaba stran nežne hidracije, da je postopek dolgotrajen, kar izključuje možnost uporabe reaktivnih lipidnih vrst, kot so na primer nenasičeni lipidi. Dodatno pa ob koncu inkubacije dobimo vezikle različnih oblik in velikosti (Angelova in sod., 1992, Dimova in sod., 2006).

2.5.2. Elektroformacija

Elektroformacijo, kot alternativno metodo priprave GUV-ov, so prvič predstavili leta 1986 (Angelova in Dimitrov, 1986). Pri tem postopku se uporablja generator električne napetosti, na katerega sta priključeni elektrodi. Na eno ali obe elektrodi se nanese tanek sloj lipidov, ki se jih potem potopi v vodni medij. V nadaljevanju se pod vplivom izmeničnega električnega polja tvorijo orjaški unilamelarni vezikli. Lipidi, ki se jih uporabi za nanos, tvorijo membrano, vodni medij pa okolico in notranjost veziklov, kar pomeni, da raziskovalec nadzira sestavo membrane in vodne faze. Elektroformacija omogoča pripravo GUV-ov v nekaj urah, kar je dovolj hitro tudi za delo z nekaterimi občutljivimi komponentami, hkrati pa je izplen v

primerjavi z nežno hidratacijo boljši, z večjim številom nastalih GUV-ov in večjim deležem sferičnih GUV-ov (Angelova in sod., 1992).

V grobem lahko tvorbo orjaških veziklov z elektroformacijo razdelimo na dva koraka, prvi je nanos lipidov na elektrode, drugi je sama elektroformacija. Kvalitetno izveden prvi korak je pogoj za uspešno elektroformacijo. V osnovnem protokolu je vir lipidov predstavljala raztopina sintetičnih lipidov v organskem topilu (Angelova in sod. 1992, Dimova in sod. 2006), elektrode pa so cilindrične oblike iz platine. Nanos lipidov je lahko točkast ali v obliki vzdolžnih pasov. Elektrodi se previdno potopi v medij, v katerem bo potekala elektroformacija, da lipidni nanos ne odstopi od podlage. Da bi bili lipidi vključeni v nastajanje GUV-ov, morajo biti v fizičnem stiku s površino elektrode. Električna napetost nima vpliva na lipide, ki so prisotni v mediju in se ne dotikajo elektrod (Dimitrov in Angelova, 1988). Z namenom, da bi se izognili spontanemu nabrekanju, se elektrode takoj po potopitvi priključi na izmenični tok. Proces elektroformacije lahko razdelimo na tri faze, pri katerih se spreminjata jakost in frekvenca električnega polja. V prvi fazi se pri konstantni frekvenci postopoma povečuje amplituda električnega polja do končne vrednosti. Tu se iz lipidnega filma na elektrodah tvorijo GUV-i. Druga faza, faza nabrekanja, je poljubna in je lahko izpuščena, če so GUV-i ob koncu prvega dela elektroformacije dovolj veliki. Kadar se končno, največjo amplitudo doseže hitro (v času 20 min), GUV-i redko dosežajo premer nad 10 μm . V tem primeru se priporoča izvajanje faze nabrekanja. V zadnji fazi se frekvenco izmeničnega toka zniža, da se vezikli dokončno zaprejo in pripravijo za odcepitev od elektrod. Tudi to, tretjo fazo, se lahko spusti, če so GUV-i na koncu druge faze sferične oblike. Po končani elektroformaciji se GUV-e lahko pusti na elektrodah ali pa se jih odlepi z rahlim stresanjem elektroformacijske celice (Méléard, 2009).

2.5.2.1. Dosedanje izboljšave protokola za elektroformacijo

GUV-e so uporabljali za raziskave membranskih lastnosti, lateralne urejenosti in interakcije membrane z drugimi snovmi, kot na primer z DNK, encimi in drugimi beljakovinami (Praper in sod., 2011a, Bouvrais in sod., 2008, Bagatolli, 2006, Ambroggio in sod., 2005). Mnoge interakcije med biomolekulami so pod vplivom ionov in bi jih bilo smotno raziskovati v slanem mediju. Potreba po GUV-ih s kompleksnejšo sestavo je bila jasna in zato so različne skupine iskale nove načine za pripravo boljših membranskih modelov.

Metoda elektroformacije je bila prilagojena tako, da so lahko tvorili GUV-e s holesterolom (Méléard in sod. 1997). Po klasični poti v membrano ni bilo moč vključiti proteinov, znano pa je, da se LUV-e (Large Unilamellar Vesicles) in SUV-e (Small Unilamellar Vesicles) lahko pripravi iz kompleksnih lipidnih mešanic, ki vsebujejo tudi proteine. Za elektroformacijo so zato na elektrode, kot vir lipidov nanесли prej pripravljene proteoliposome. Nastalo je veliko število GUV-ov, kar je metodo označilo za uspešno (Valverde, 2000). Uporaba, v biokemijskih raziskavah že poznanih, manjših veziklov za tvorbo GUV-ov, se je razširila (Pott in sod., 2008).

Še vedno je bila prisotna težava z membransko asimetrijo. Tudi GUV-i iz kompleksnih lipidnih mešanic in proteini, niso imeli membranske asimetrije, ki se pojavlja v živih sistemih.

To so skušali zaobiti s pripravo GUV-ov z inverzno emulzijo (Pautot in sod., 2003). Vezikle so pripravili v dveh korakih. V prvem se je formirala le notranja plast fosfolipidnega dvosloja iz ene vrste lipida. Naknadno so dodali drugo plast iz drugega lipida. Tako so asimetrijo dosegli, vendar metoda ni omogočala vključevanja membranskih proteinov. Baumgart in sodelavci so kemijsko inducirali vezikulacijo plazmaleme, kar je predstavlja naslednji pomemben korak pri pripravi GUV-ov podobnih naravnim membranam, vendar avtorji opozarjajo, da so na ta način pripravljene orjaški vezikli verjetno zelo različne sestave (Baumgart in sod., 2007).

Za elektroformacijo je dolgo veljalo, da je uspešna le pri nizki ionski jakosti medija, v katerem poteka (Dimova in sod., 2006). Na tem mestu je potrebno poudariti razliko med osmolarnostjo raztopine in prisotnostjo elektrolitov v raztopini. Elektroformacija je uspešna v mediju s fiziološko osmolarnostjo, če uporabimo nenabite delce, kot so sladkorji, npr. glukoza ali saharoza, nemalo težav pa se pojavi ob prisotnosti ionov (Estes in Mayer, 2005). Ena od začetnih faz pri nastajanju GUV-ov med elektroformacijo je ločitev dvoslojev v lipidnem filmu na elektrodah. Predvideva se, da k temu sili mehanski stres izmeničnega toka, prisotnost ionov pa ta proces moti, ker ti vstopajo v prostor med dvosloje in s tem preprečujejo učinkovito separacijo, tako da je bila elektroformacija uspešna samo do 50 mM raztopine ionov (Bucher in sod., 1998).

Predstavljen je bil nov postopek elektroformacije, ki omogoča pripravo GUV-ov v mediju s fiziološko primerljivo ionsko jakostjo (100 mM in več). Glavna razlika med klasičnim in novim protokolom je v frekvenci izmeničnega toka. Do tedaj je elektroformacija potekala pri frekvenci 10 Hz, pri novem protokolu pa je zvišana na 500 Hz (Pott, 2008). Na podlagi tega protokola so Montes in sodelavci pripravili GUV-e iz eritrocitnih membran, ki so obdržali naravno asimetrijo membrane in razširili uporabnost GUV-ov (Montes in sod., 2007). Pomanjkljivost njihovega protokola je nizek izplen, zato smo se odločili poiskati prilagoditve k pripravi, da bi na koncu dobili večje število GUV-ov.

Preglednica 1: Izboljšave protokolov za elektroformacijo skozi čas

Avtor-ji in leto	Izboljšava	Medij v katerem poteka elektroformacija	Pomanjkljivosti
Angelova in Dimitrov, 1986	Prva priprava GUV-ov z elektroformacijo	Medij v katerem poteka elektroformacija je voda ali raztopina z nizko ionsko jakostjo (do 50 mM).	GUV-i so iz sintetičnih lipidov, brez holesterola ali proteinov.
Méléard in sod. 1997	V mešanico lipidov dodajo holesterol.		GUV-i iz sintetičnih lipidov in holesterola, brez proteinov.
Valverde, 2000	Vir lipidov so SUV-i ali LUV-i, ki vsebujejo proteine.		GUV-i sestavljeni iz lipidov, holesterola in proteinov, ne vzpostavi se membranska asimetrija.
Pautot in sod., 2003	Tvorijo najprej notranjo plast in naknadno zunanjo plast GUV-ov, da se vzpostavi membranska asimetrija.		GUV-i so brez proteinov.
Baumgart in sod., 2007	Vezikulacija plazmaleme.		GUV-i so zelo različne sestave.
Pott, 2008	Elektroformacija pri višji frekvenci.	Elektroformacija poteka v mediju z ionsko jakostjo višjo od 50 mM.	GUV-i brez membranske asimetrije iz sintetični lipidov.
Montes in sod., 2007	Elektroformacija pri višji frekvenci, kot vir lipidov se uporabijo eritrociti.		Nizek izplen.

2.6. OPAZOVANJE GUV-ov Z OPTIČNO MIKROSKOPIJO

Eden od razlogov za priljubljenost GUV-ov je njihova velikost, ki omogoča direktno opazovanje s svetlobno mikroskopijo in spremljanje dogajanja v realnem času na nivoju posameznega vezikla (Slika 2, A-D). Debelina membrane iz fosfolipidnega dvosloja meri 4-5 nm, kar je precej pod ločljivostjo svetlobnega mikroskopa, vendar se z nekaterimi tehnikami (fazno-kontrastna mikroskopija (Slika 2, A), diferencialni interferenčni kontrast (DIC) (Slika 2, B), fluorescentna mikroskopija (Slika 2, C in D), dvofotonska mikroskopija) vseeno da opazovati tudi tako tanke strukture.

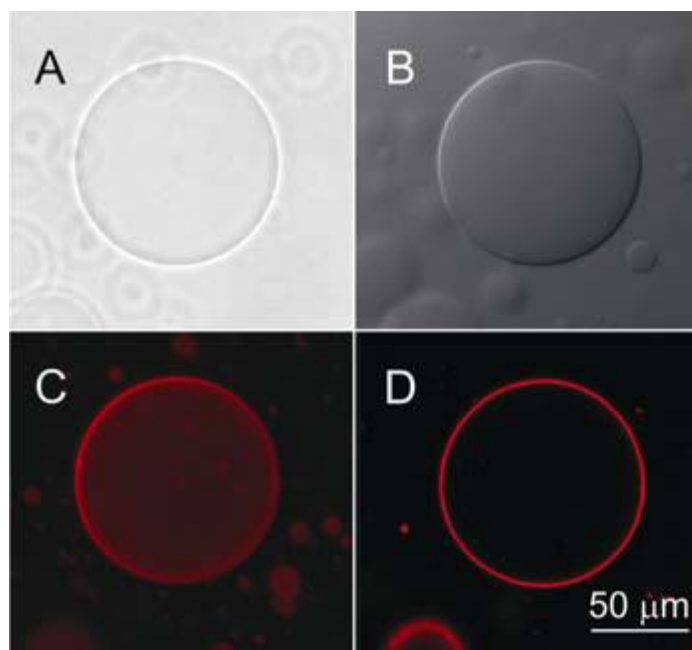
Pri uporabi GUV-ov je mogoče nadzorovati vsebino veziklov in zunanji medij. Medij, v katerem GUV-i nastajajo, ali z elektroformacijo ali drugim postopkom, bo zapolnjeval notranjost veziklov. Naknadno pa je mogoče zunanji medij previdno zamenjati z drugo, izoosmolarno tekočino. Pravilna izbira notranjega in zunanjega medija, lahko pripomore k opazovanju GUV-ov. Pri uporabi saharozne raztopine za nastanek GUV-ov, ki se po končani vezikulaciji zamenja z glukozno raztopino, se poveča kontrast med vezikli in njihovo okolico, kar omogoča lažje opazovanje s fazno kontrastno mikroskopijo. Hkrati pa zaradi razlike v gostoti, vezikli potonejo na dno opazovalne komore, zaradi česar jih je lažje najti tudi ob uporabi drugih mikroskopskih tehnik. Zaradi vpliva gravitacije se lahko zgodi, da se sferična oblika nekoliko popači, GUV-i se na spodnji strani nekoliko sploščijo (Akashi in sod., 1995, Döbereiner, 1999, Méléard, 2009).

2.6.1. Fluorescentna mikroskopija

Pogosto se za opazovanje GUV-ov uporablja različne tehnike fluorescentne mikroskopije. K vzorcu se doda manj kot 1 % barvila, ki se veže v membrano, kar omogoča opazovanje s fluorescentnim mikroskopom. Na teh slikah je pogosto mogoče videti napake GUV-ov, ki zaradi svoje majhnosti ostanejo nevidne pri fazno-kontrastni ali DIC mikroskopiji (Rodriguez in sod., 2005). Za označevanje membran obstajajo različni komercialni agensi (Bagatolli, 2006), mi smo uporabili 1,1'-dioktadecil-3,3',3'-tetrametilindodikarbocianin perklorat (DiIC₁₈), ki je široko uporabno barvilo za celične membrane. S svojima dolgima karboksilnima verigama se vstavi v lipidni dvosloj, njegova intenzivna fluorescenca in fotostabilnost pa bosta olajšala preštevanje nastalih GUV-ov, pregledovanje njihovih oblik ter razvrščanju v velikostne razrede.

Možno je tudi uporabljati označevalce, ki se raztopijo v vodni raztopini, GUV-e pa potem vidimo zaradi njihove neprepustnosti kot svetleče kroge na črni podlagi (označevalec dodamo v medij v katerem GUV-i nastajajo) ali obratno, kot črne kroge na svetleči podlagi (označevalec dodamo v medij po končani vezikulaciji). Ta sistem je uporaben predvsem za merjenje prepustnosti GUV-ov, bodisi zaradi proteinskih kanalčkov v membranah ali za preverjanje delovanja proteinov, ki tvorijo pore (Schon in sod., 2008). Naš cilj je pripraviti GUV-e iz kompleksnih membran, kakršne se pojavljajo v živih sistemih. Eritrocitne membrane imajo številne transmembranske kanalčke, skozi katere bi lahko prehajale molekule kalceina, za večje molekule kot je dekstran (70 kDa), pa bi bili premajhni. GUV-i, ki bi bili prepustni za manjše in neprepustni za večje molekule, bi nakazovali, da so se vsaj nekateri integralni proteini ohranili skozi celoten postopek elektroformacije.

V nekaterih poizkusih z GUV-i se uporablja imunodetekcija, ki omogoča označevanje specifičnih struktur na veziklih, npr. izbran protein na zunanji strani membrane (Montes in sod., 2007). Z imunodetekcijo bomo preverili prisotnost nekaterih proteinov ali saharidov na membrani in se s tem prepričali, da se te strukture ohranijo skozi ves postopek priprave GUV-ov.



Slika 2: Opazovanje GUV-a z različnimi mikroskopskimi tehnikami.

Opazovanje GUV-ov z različnimi mikroskopskimi tehnikami; (A) fazno-kontrastna mikroskopija, (B) diferencialno interferenčno kontrastna (DIC) mikroskopija, (C) in (D) fluorescentna mikroskopija-z Dil₁₈ označeni lipidi. Povzeto in prirejeno po Dimova in sod., 2006.

3. MATERIAL

3.1. KEMIKALIJE:

Aceton	Merck, Nemčija
BSA protein (Bovine Serum Albumin)	Sigma (St. Louis, MO, ZDA)
DilC ₁₈ (1,1'-dioktadecil-3,3',3'-tetrametilindodikarbocianin perklorat)	Invitrogen (Carlsbad, CA, ZDA)
DMSO (dimetil sulfoksid)	Sigma (St. Louis, MO, ZDA)
DOPC (1,2-dioleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, ZDA)
EDTA	Kemika, Hrvaška
Encimski test za določanje koncentracije fosfolipidov C in holesterola E	Wako Diagnostics, ZDA
Etanol	Merck, Nemčija
FITC označena monoklonska protitelesa, anti-glikoforin in anti-perforin	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, ZDA)
s FITC-Dekstran FD70 (Fluorescein isotiocianat-dekstran)	Sigma (St. Louis, MO, ZDA)
HEPES	Sigma (St. Louis, MO, ZDA)
Kalcein	Sigma (St. Louis, MO, ZDA)
Kloroform	Merck, Nemčija
Metanol	Merck, Nemčija
Mišja poliklonska anti-A in anti-B protitelesa so bila darilo dr. Simona Korena	Center za transfuzijo krvi Slovenije
Na ₂ PO ₄	Merck, Nemčija
Natirjev klorid (NaCl)	Merck, Nemčija
Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF)	Sigma (St. Louis, MO, ZDA)
POPC (1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, ZDA)
rDHPE (Rodamin B 1,2-diheksadecnoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamin)	Sigma (St. Louis, MO, ZDA)
Tris	Merck, Nemčija

3.2. RAZTOPINE:

Fiziološki pufer:	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4
Glukozni pufer:	1mM HEPES, 295 mM glukoze
Saharozni pufer:	1mM HEPES, 295 mM saharoze
Pufer za spiranje eritrocitov:	140 mM NaCl, 5 mM Na ₂ PO ₄ , pH 8.0
Pufer za lizo eritrocitov:	5 mM Na ₂ PO ₄ , pH 8.0
Pufer za pripravo eritrocitnih dukov:	280 mM NaCl, 40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.5

Vsi zgoraj naštetni pufri so bili uravnani na približno 300 mOsmol/kg.

Elektroforezni pufer (10 x)	30,3 g Tris, 144 g glicina, 10 g NaDS
-----------------------------	---------------------------------------

3.3. LABORATORIJSKA OPREMA:

Mikrotitrne plošče	TPP, Švica
Čitalec mikrotitrnih plošč	MRX, Dynex Technologies, Nemčija
Epruvete	Eppendorf, Nemčija
Avtomatske pipete	Gilson, ZDA
pH meter	Mettler Toledo, Nemčija
Rotavapor	R-200, Büchi, Švica
Ekstruder	Avanti Polar Lipids, (Alabaster, AL, ZDA)
Vodna kopel	B-480, Büchi, Švica
Osmometer	Knauer, Nemčija
Platinasti elektrodi	Dimenzije: Φ: 1 mm, dolžina 34 mm, razmik med elektrodama 3 mm
Funkcijski generator izmeničnega toka	GW instek, GFG-3015, ZDA
Fluorescentni in DIC mikroskop AxioImager Z1	Carl Zeiss, Nemčija

4. METODE

4.1. ODVZEM KRVI

Kri so darovali zdravi darovalci, odvzem je izvedlo usposobljeno medicinsko osebje. Kri smo hranili v EDTA epruveh (Vacuette; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) pri 4 °C.

4.2. PRIPRAVA MULTILAMELARNIH VEZIKLOV (MLV) IN VELIKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV (LUV)

1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilholin (POPC) smo raztopili v kloroformu v končni koncentraciji 100 mg/mL ter mu dodali rDHPE (1 %). S pomočjo pipete smo 200 µL te raztopine vnesli v stekleno bučko. Le to smo z rotavaporjem za štiri ure izpostavili znižanemu tlaku (50 mbar), obračanje bučke je bilo približno 20 obratov na minuto. V tem času se je mešanica popolnoma posušila, lipidi so bili nanešeni po steklu v tankem filmu, kar se je lahko videlo tudi s prostim očesom. S približno 0.5 mL destilirane vode smo dodali še približno polovico čajne žlice s kisline spranih steklenih kroglic in potem vse skupaj krožno premešali, dokler se niso lipidi resuspendirali. To mešanico smo potem prenesli v krio-vialo. Pri tej stopnji smo imeli v viali multilamelarne vezikle (ang. Multilamellar Vesicles-MLV).

MLV smo potem 6-krat zamrznili in odtalili (zamrzovali smo s tekočim dušikom, odtajevanje je potekalo v topli vodi). Zadnji korak za pripravo velikih unilamelarnih veziklov (ang. Large Unilamellar Vesicles-LUV) je bila uporaba ekstruderja. Mešanico smo 35-krat iztisnili skozi polikarbonatni filter (pore s premerom 100 nm).

4.3. PRIPRAVA ERITROCITNIH MEMBRAN IN DUHOV

Kri je bila odvzeta zdravemu darovalcu, shranjena v EDTA epruveh (Vacuette, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany). Za izolacijo eritrocitov smo kri 5 x spirali s pufrom za spiranje eritrocitov (140 mM NaCl, 5 mM Na₂HPO₄, pH 8.0). Eritrocite smo za tem lizirali s pufrom za lizo eritrocitov (5 mM Na₂HPO₄, pH 8.0) in fenilmetilsulfonil fluoridom (PMSF) (končna koncentracija 0,5 % (v/v)) potem inkubirali 5 minut na ledu in centrifugirali 20 minut na 23 600 g pri 4 °C. Membrane smo potem ločili od supernatanta in večkrat sprali z vodo na 4 °C. Za pripravo duhkov smo membrane sprali s fiziološkim pufrom (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.4)(protokol 1) ali vodo (protokol 2) in nato 10 krat zamrznili v tekočem dušiku in odmrznili v topli vodi (37 °C). Duhke smo nato inkubirali dve uri pri 37 °C. Koncentracijo duhkov in membran smo prilagodili na koncentracijo fosfolipidov okoli 0.8 mg/mL. Za fluorescentno mikroskopijo je bil v suspenzijo membran ali duhkov dodan DilC₁₈ (1 mg/mL raztopljen v DMSO) v razmerju 1:100 (v/v). Vzorce z barvilom smo ovili z aluminijasto folijo, da bi se izognili bledenju.

4.4. ELEKTROFORMACIJA

16 µL suspenzije membran ali duhkov smo nanegli na par platinastih elektrod (Slika 3 *levo*) in sušili 5 min pri sobnih pogojih ali vsaj 2 uri v rotavaporju pri znižanem tlaku (80 mbar). Elektrode smo potem potopili v plastično epruvehko z 1.4 mL fiziološkega pufra (150 mM

NaCl, 20 mL HEPES) (protokol 1-3) ali destilirane vode (protokol 4) ali saharoznega pufra (295 mM saharoze, 1 mM HEPES) (protokola 5 in 6). S funkcijskim generatorjem smo elektrode izpostavili izmeničnemu toku (Slika 3 *desno*). Za protokole 1-3 je elektroformacija potekala po protokolu za visoko ionsko jakost, s frekvenco 500 Hz, za protokole 4-6 pa po standardnem protokolu z nižjo frekvenco (10 Hz) (Peterlin in Arrigler, 2008).

Protokol z visoko frekvenco: 15 minut 140 mV /500 Hz, 20 minut 1.25 V/ 500 Hz, 90 minut 3.5 V/500Hz.

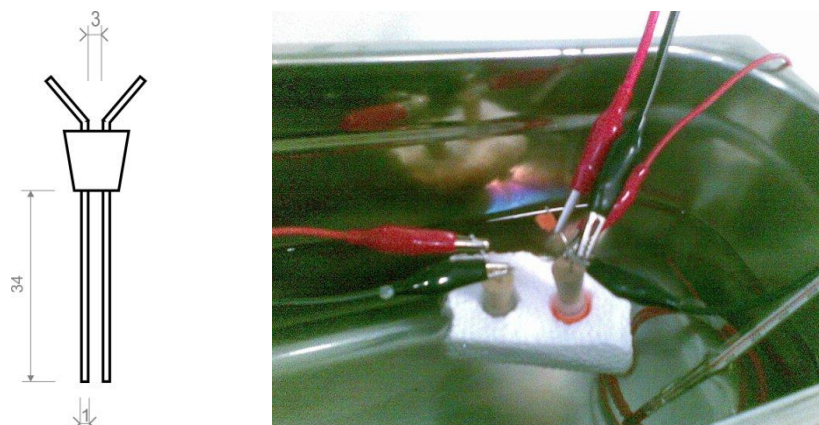
Protokol z nizko frekvenco: 2 uri 4 V/10 Hz, 15 minut 2 V/5 Hz, 15 minut 1 V/2.5 Hz, 30 minut 1 V/1Hz.

Elektroformacija je vedno potekala v vodni kopeli pri 37 °C.

Preglednica 2: Preverjanje vpliva različnih dejavnikov na uspešnost elektroforeze

Korak	Protokol					
	1	2	3	4	5	6
<i>Nanos lipidov</i>						
Material	duhki	duhki	membrane	membrane	membrane	membrane
Volumen	8 x 2 µL	8 x 2 µL	8 x 2 µL	8 x 2 µL	8 x 2 µL	2 µL
Medij	fiziološki pufer	voda	voda	voda	voda	voda
<i>Sušenje</i>						
Čas	5 min	5 min	>2 h	>2 h	>2 h	>2 h
Tlak	sobni	sobni	znižan	znižan	znižan	znižan
<i>Elektroformacija</i>						
Tip elektroformacije	visoko-frekvenčni	visoko-frekvenčni	visoko-frekvenčni	nizko-frekvenčni	nizko-frekvenčni	nizko-frekvenčni
Medij	fiziološki pufer	fiziološki pufer	fiziološki pufer	voda	saharozni pufer	saharozni pufer

Preverjanje vpliva različnih dejavnikov na uspešnost elektroforeze; fiziološki pufer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4), znižan tlak = 80 mbar, visoko-frekvenčni (5 min 140 mV/500 Hz, 20 min 1,25 V/500 Hz, 90 min 3,5 V/500 Hz), nizko-frekvenčni (2h 4 V/10 Hz, 15 min 2 V/5 Hz, 15 min 1 V/2.5 Hz, 30 min 1 V/1 Hz), saharozni pufer (1mM HEPES, 295 mM saharoza).



Slika 3: Shema platinastih elektrod in elektroformacija v vodni kopeli
 Shema platinastih elektrod z dimenzijami v mm (levo); elektroformacija v vodni kopeli (desno).

4.5. FLUORESCENTNA MIKROSKOPIJA

Fluorescentna mikroskopija in diferencialna kontrastna mikroskopija (DIC) je bila izvedena na fluorescenčnem mikroskopu Axiolmager Z1 (Carl Zeiss, Germany) opremljenim z modulom ApoTome za snemanje optičnih rezin (mrežna konfokalna mikroskopija) in 100 W HBO živosrebrno žarnico. Kalcein, FITC-označene dekstrane in protitelesa smo osvetlili s svetlobo z valovno dolžino med 450 in 490 nm in opazovali skozi 515 nm visoko-prepustni filter. Membrane RBC-GUV, ki so vsebovale DiIC₁₈, smo osvetljevali s svetlobo z valovno dolžino 546/12 nm in opazovali skozi 590 nm visoko-prepustni filter.

Za testiranje prepustnosti smo v 6 μL raztopine z GUV-i, ki smo jih pripravili po protokolu št. 5, dodali še 0.5 μL raztopine fluorescentnega dekstrana FD70 ali kalceina (končna koncentracija dekstrana je bila 0.01 mM, končna koncentracija kalceina je bila 0.1 mM). Prepustnost smo merili takoj po dodatku kalceina, 45 minut po dodatku kalceina in 4 ure po dodatku kalceina. Prepustnost GUV-ov v raztopini z dekstranom smo preverili po 24 urni inkubaciji.

Za imunodetekcijske poskuse smo 0.5 μL s FITC-označenih anti-glikoforin in anti-perforin protiteles (oboje izotop IgG2b, $c=0.2\text{mg/mL}$) ali 1 μL anti-A in anti-B primarnih protiteles ($c=0.1\text{mg/mL}$) dodali v 9 μL raztopine z GUV-i iz eritrocitnih membran (RBC GUV-i). Vso mešanico smo rahlo premešali s pipeto in inkubirali 20-40 min pri sobni temperaturi. Antigeni za krvno skupino so bili vidni po dodatku 0.5 μL FITC-označenih sekundarnih protiteles ($c=1.4\text{ mg/mL}$), ko smo jih rahlo premešali in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi.

Vzorci s fluorescentnim barvilom smo ovili z aluminijasto folijo, da bi se izognili bledenju. Vzorci z GUV-i smo pipetirali z obrezanimi pipetnimi nastavki, da bi jih obvarovali pred strižnimi silami.

4.6. DOLOČANJE KONCENTRAIJE PROTEINOV

500 μL suspenzije z RBC-GUV-ov po 2. in 5. protokolu smo uporabili za prenos western z uporabo nitroceluloznih membran z Minifold Dot Blot System (Gentaur, Belgium). Proteine, vezane na membrano, smo obarvali z amido črnim, kot je opisano v Goldring in Ravaioli (1996). Povzetek postopka je naslednji: na nitrocelulozno membrano vezani proteini so bili barvani 6-10 minut z raztopino amido črnega, ki je vsebovala 0.1 % (m/v) amido črno, 25% (v/v) izoptopanol in 10 % (v/v) očetne kisline. Sledilo je 5 minutno spiranje v vodni raztopini 25% izopropanola (v/v) in 10 % očetne kisline. Koncentracijo proteinov smo izračunali s pomočjo kalibracijske krivulje narejene s 6 koncentracijami BSA, ki so segale od 0 do 20 $\mu\text{g/mL}$. Kvantifikacijo proteinske pike na nitrocelulozni membrani smo izvedli z denzitometrom s programom ImageJ 1.43 (na Java-temelječa programska oprema odprtega tipa za procesiranje slik).

4.7. DOLOČANJE KONCENTRACIJE HOLESTEROLA IN FOSFOLIPIDOV

Za analizo koncentracije holesterola in fosfolipidov je bilo potrebno 500 μL suspenzije RBC-GUV-ov izsušiti čez noč pri sobni temperaturi z vakuumskim koncentradorjem. Koncentracijo fosfolipidov in holesterola smo določili s Phospholipids C in Free Cholesterol E kiti (Wako Diagnostics, USA) po navodilih proizvajalca.

4.8. NaDS-PAGE (POLIAKRILAMIDNA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI DODECILSULFATA)

Na gel smo direktno nanašali duhke in membrane, proteine iz GUV-ov smo obarjali s trikloroocetno kislino (TCA) in jih nato nanесли na gel. Povzetek postopka obarjanja proteinov je bil naslednji: 1 mL suspenzije z RBC-GUV-ov smo zmešali z 0.25 mL 50 % (v/v) TCA, inkubirali 10 minut in centrifugirali pri 14000 g. Supernatant smo zavrgli, sediment z mešanjem raztopili v 300 μL dodanega acetona, sledila je centrifugiranje pri 14000 g. Supernatant smo ponovno zavrgli, sediment pa posušili pri 37 °C. Proteine v sedimentu smo ponovno raztopili, tokrat v NaDS elektroforeznem pufu in nanесли na 4-15 % gel za NaDS-PAGE. Proteini na gelu smo obarvali s srebrom in nato skenirani. Sliko smo normalizirali in jo uporabili za denzitometrijo z ImageJ programom.

5. REZULTATI

5.1. UGOTAVLJANJE POTREBNE KOLIČINE LIPIDOV NA ELEKTRODAH

Pri prvih, uvajalnih poskusih smo želeli najti najprimernejšo koncentracijo lipidov za tvorbo GUV-ov. Uporabljali smo sintetične LUV-e iz 1,2-dioleoilfosfatidilholina (DOPC) v slanem pufru (140mM NaCl, 20 mM Tris H-Cl, 1mM EDTA, pH = 8.5) in protokol za elektroformacijo v mediju z visoko ionsko jakostjo po Montes et al. (2007). Za nanos lipidov na platinaste elektrode smo uporabljali pripravljene raztopini, ki sta se razlikovali v koncentraciji DOPC LUV-ov (0,25 $\mu\text{g/mL}$ in 1 $\mu\text{g/mL}$). Najprej smo lipide v danih koncentracijah nanašali le enkrat po 2 μL na elektrodo. Za dodatno povečanje količine lipidov smo v naslednjem poskusu elektrode sušili 10 min na zraku in potem še 6,5 min pri zmanjšanem tlaku. Izkazalo se je, da je višja koncentracija lipidov na elektrodah pripomogla k večjemu številu nastalih GUV-ov (rezultati niso prikazani).

5.2. UPORABA ERITROCITNIH DUHKOV

Naslednji korak v naši raziskavi je bila uporaba eritrocitnih duhkov kot vira lipidov za GUV-e. Kri za produkcijo eritrocitnih duhkov je bila odvzeta največ 3 ure pred začetkom priprave. Z uporabo nativnih membran smo naleteli na težavo, ki se ni pojavljala pri uporabi sintetičnih lipidov. Duhke smo nanесли na elektrode (2 μL /elektrodo), sušili 8 minut na zraku pri sobni temperaturi ter celoten cikel še dvakrat ponovili. Po končanem nanašanju in sušenju smo imeli na vsaki elektrodi 3 x 2 μL eritrocitnih duhkov. Takoj ob potopitvi elektrod v pufer za elektroformacijo, se je okoli elektrod pojavila rdečkasta tančica, ki je počasi tonila proti dnu vial. Po končani elektroformaciji smo v 6 μL vzorca našli le en GUV. Glede na opaženo smo sklepali, da so membrane v vodnem mediju odstopile od elektrod in potonile na dno. Posledično je bila elektroformacija neuspešna. Čas sušenja smo podaljšali na 15 min, uporabili smo samo 2 x nanos in poskusili ponovno, vendar brez uspeha. Z namenom, da bi na membranah kljub odpadanju lipidnega filma ostalo dovolj duhkov za učinkovito produkcijo GUV-ov, smo na elektrodi z vmesnim 20 minutnim sušenjem 6 x nanесли po 2 μL duhkov. Med mikroskopiranjem smo v 6 μL vzorca našli le 5 GUV-ov. Zaključili smo, da z eritrocitnimi duhki, s tako kratkotrajnim sušenjem, ni mogoče pripraviti GUV-ov v zadostni količini za nadaljnjo uporabo.

5.3. UVEDBA MEMBRAN

Namesto uporabe eritrocitnih duhkov smo GUV-e želeli ustvariti z ne-zatesnjenimi eritrocitnimi membranami. Te so vmesni produkt med nativnimi eritrociti in eritrocitnimi duhki. Na tej stopnji predelave je hemoglobin že odstranjen iz celične notranjosti, v raztopini ostaja le lizirana membrana. Za pripravo eritrocitnih duhkov, so te membrane podvržene 10 ciklom zamrzovanja v tekočem dušiku in odtajanja na 37 °C. Medtem se membrane ponovno zatesnijo in tvorijo eritrocitne duhke. Za tvorbo GUV-ov ni bilo potrebe po ponovno zatesnjenih membranah, za protokol pa izključitev večkratnega zamrzovanja pomeni časovni in materialni prihranek. V nadaljevanju uporabljam izraz »membrane« za lizirane in sprane

eritrocitne membrane, ki niso ponovno zatesnjene (ang. resealed), kot je to v primeru eritrocitnih dukhov.

Z namenom, da bi zaobšli težave z odpadanjem lipidov z elektrod, smo elektrode med nanosi 5 minut preprihali z uporabo dušika, kar je tudi preprečevalo oksidacijo lipidov. Po štirih nanosih, smo elektrode čez noč sušili pri znižanem tlaku (80 mbar). Naslednje jutro smo elektrode potopili v medij za elektroformacijo in za razliko od dosedanjih izkušenj, tokrat nismo opazili rdečkaste tančice, ki bi nakazovala na odstopanje lipidov z elektrod.

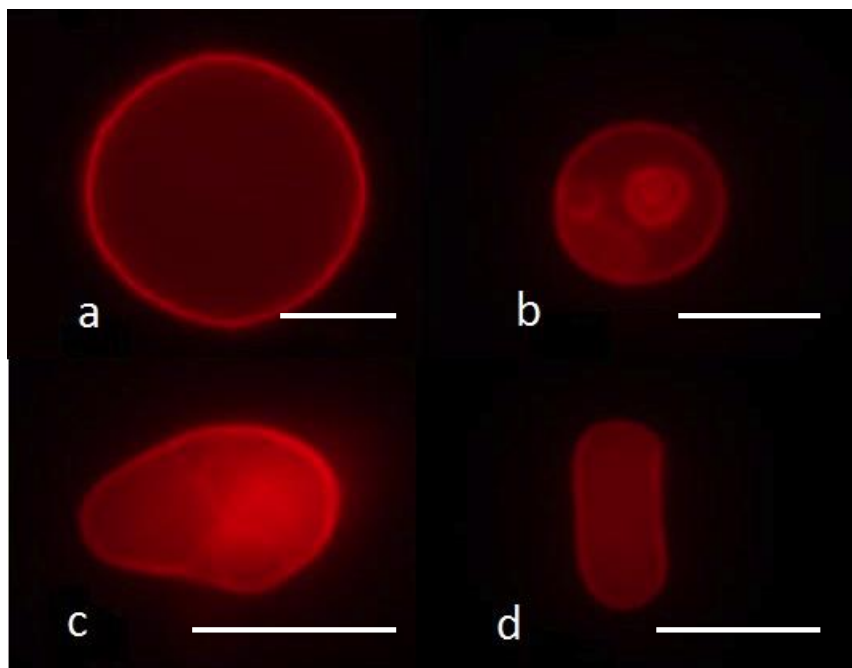
Membrane označene z Dil barvilom (1:200, v/v) smo pripravili v koncentraciji 0,65 mg fosfolipidov/mL vzorca. Na elektrode smo nanašali $2 \times 2 \mu\text{L}$ /elektrodo. Z isto raztopino kot vir membran in enakim nanosom, smo izvedli elektroformacijo po protokolu Montes in sodelavcev (Montes in sod., 2007) v treh različnih pufrih-voda, perforinski pufer in saharozni pufer. Po končani elektroformaciji smo vzorce z volumnom $2 \mu\text{L}$ pogledali pod mikroskopom in prešteli nastale GUV-e. Med štetjem smo upoštevali le sferične GUV-e s premerom nad $10 \mu\text{m}$. V vodi je bil izplen daleč največji s 107 GUV-i, v $2 \mu\text{L}$ vzorca iz perforinskega pufru smo našli 22 GUV-ov, ki pa so bili nesferičnih oblik in velikosti približno $10 \mu\text{m}$. V saharoznem pufru smo prešteli 9 GUV-ov. Uporaba saharoznega pufru omogoča koncentriranje GUV-ov s počasnim dodajanjem glukoznega pufru z enako osmolarnostjo. Postopek koncentriranja smo izvedli in v $2 \mu\text{L}$ vzorca prešteli GUV-e s premerom večjim od $10 \mu\text{m}$; našli smo 28 GUV-ov. Sodeč po dobljenih rezultatih je za tvorbo sferičnih GUV-ov pri fiziološki osmolarnosti najprimernejši saharozni pufer, ki dovoljuje tudi naknadno koncentriranje veziklov.

5.4. PREVERJANJE VPLIVA RAZLIČNIH DEJAVNIKOV NA USPEŠNOST

ELEKTROFORMACIJE

V iskanju najboljšega protokola smo pripravili razpredelnico (Preglednica 1), s katero smo sistematično preverjali vpliv posameznih faktorjev na tvorbo GUV-ov. Pripravili smo šest različnih protokolov, s katerimi smo preverili i) kako na tvorbo GUV-ov vpliva medij, v katerem so pripravljene eritrocitni dukki, ii) razliko med uporabo eritrocitnih dukkov in eritrocitnih membran, iii) učinek medija, v katerem poteka elektroformacija ter iv) pomen količine lipidov na elektrodah. GUV-e smo štirikrat pripravili po vsakem od protokolov in primerjali dobljene rezultate. GUV-e smo razdelili v dva razreda; prvi razred je predstavljal sferične GUV-e brez vključkov (Slika 4a), v drugi razred pa smo uvrstili vse drugačne GUV-e (Slika 4b, 4c in 4d). Hkrati smo bili pozorni tudi na njihovo velikost in jih tako razvrščali v velikostne razrede; $10\text{-}20 \mu\text{m}$, $20\text{-}30 \mu\text{m}$ in večji od $30 \mu\text{m}$. Manjših od $10 \mu\text{m}$ nismo upoštevali, ker so eritrociti in eritrocitni dukki podobnih velikosti ($5\text{-}10 \mu\text{m}$) in je težko ločiti med temi membranami, ki so se morda odlepili od elektrod in manjšimi GUV-i. Poleg tega so tako majhni GUV-i manj primerni za opazovanje s svetlobno mikroskopijo in zato niso del ciljev naše raziskave. Po elektroformaciji smo vzeli 5 vzorcev po $1 \mu\text{L}$ in pod mikroskopom prešteli ter razvrstili GUV-e. Dobljeni rezultati glede števila GUV-ov so zbrani v grafu »Izplen GUV-ov po protokolih« (Slika 5), razdelitev GUV-ov po velikostnih razredih je predstavljena v odstotkih v grafu »Velikosti GUV-ov« (Slika 6), delež sferičnih GUV-ov brez vključkov je po protokolih predstavljen v grafu »Delež sferičnih GUV-ov brez vključkov

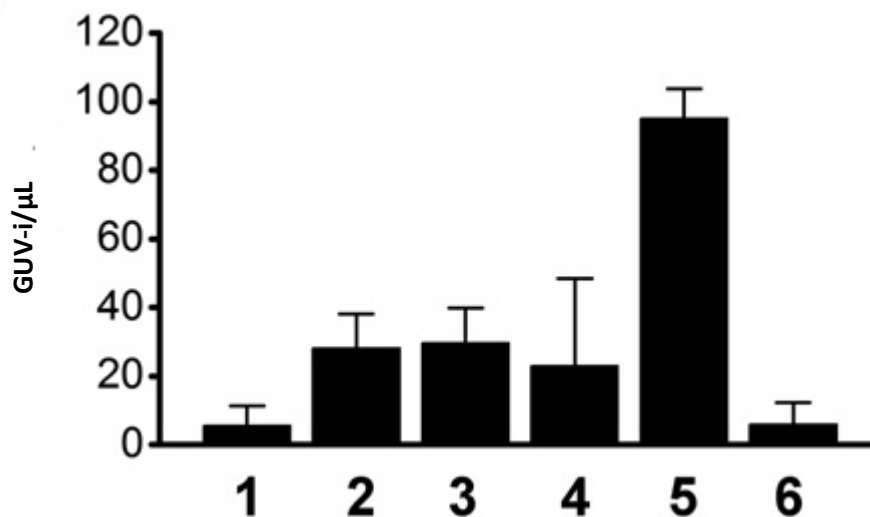
GUV-ov po protokolih» (Slika 7). Na sliki 8a in 8b je prikazana uspešnost koncentriranja GUV-ov, pripravljenih po protokolu št. 5. Slika 8a je bila posneta po elektroformaciji, slika 8b pa po zamenjavi saharoznega pufra z glukoznim. Zaradi razlike v gostoti pufrov, so se s saharozo napolnjeni GUV-i posedli na dno plastične epruvetke, od koder smo jih potem prenesli na objektno steklo.



Slika 4: Primeri GUV-ov

Primeri štirih tipov GUV-ov v; a) sferični GUV brez vključkov, b) sferični GUV z vključki, c) GUV nesferične oblike z vključki in d) GUV nesferične oblike. Zaradi praktičnosti smo GUV-e delili v samo dva razreda-sferični GUV-i brez vključkov (a) in vsi ostali (b, c in d). Velikostno merilce na vsaki sliki predstavlja 10 μm .

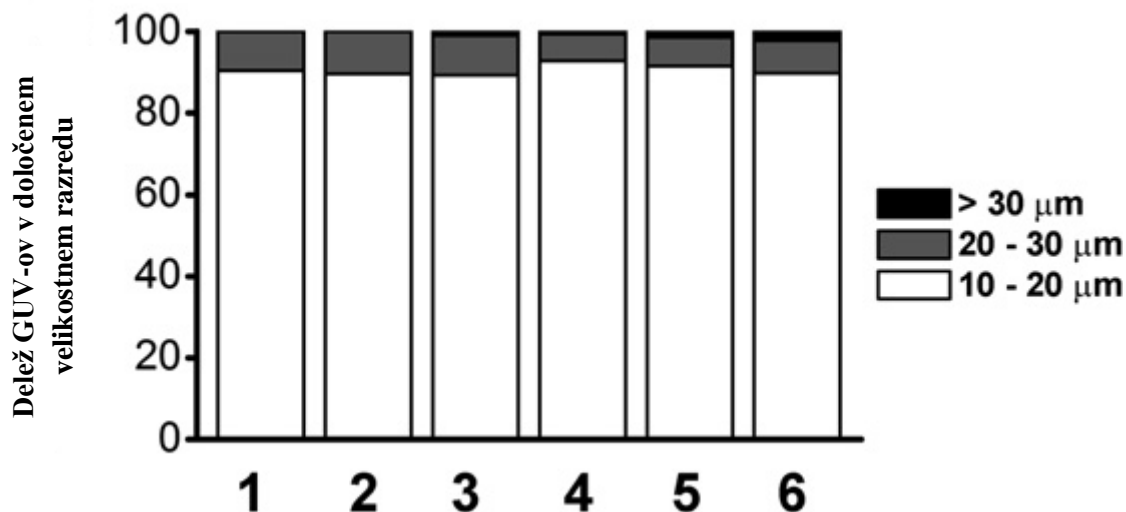
Največje število GUV-ov (96 GUV-ov/ μ L) je bilo pridobljeno po protokolu št. 5. Sledi protokol št 3 (29,7 GUV-ov/ μ L), .protokol št. 2 (27,7 GUV-ov/ μ L), protkol št. 4 (22,7 GUV-ov/ μ L), ter protokola št. 6 (5,9 GUV-ov/ μ L) in 1 (5,5 GUV-ov/ μ L) (Slika 5).



Slika 5: Izplen GUV-ov po protokolih

Vsak stolpec predstavlja povprečno število GUV-ov iz treh do petih neodvisnih elektroformacij, \pm standardna deviacija. Skupno je bilo za vsak protokol prešteti 84-2379 GUV-ov v 5 μ L raztopine.

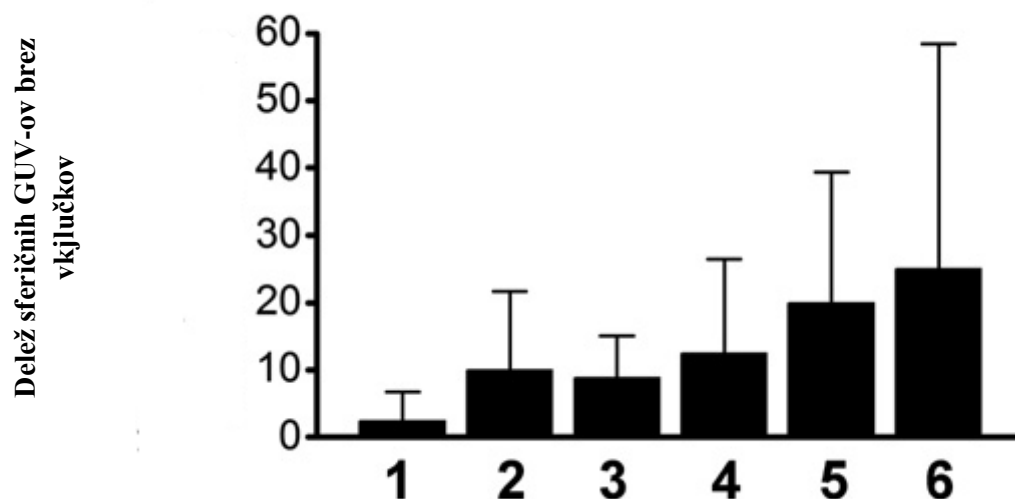
GUV-e smo razdelili v tri velikostne razrede (s premerom med 10 in 20 μm , 20 in 30 μm ter tiste, ki so merili več kot 30 μm) in preverjali, kolikšen delež predstavlja posamezen razred pri različno pripravljene raztopinah GUV-ov. Najmanjši razred predstavlja največji delež pri GUV-ih, pripravljene po protokolu št. 4, kjer predstavlja 91 %, najmanjši pri protokolu št.3, kjer predstavlja 87 %. Drugi velikostni razred predstavlja največji delež GUV-ov pripravljene po protokolu št. 3 (10 %), pri protokolu št. 6 pa je bil največji delež GUV-ov s premerom večjim od 30 μm (2 %). Rezultati so vidni na sliki 6.



Slika 6: Delež velikostnih razredov GUV-ov po protokolih

Velikostna porazdelitev GUV-ov po treh neodvisnih elektroformacijah. Skupno je bilo za vsak protokol prešteti 84-1346 GUV-ov v 5 μL raztopine. Mere v μm predstavljajo premer GUV-ov.

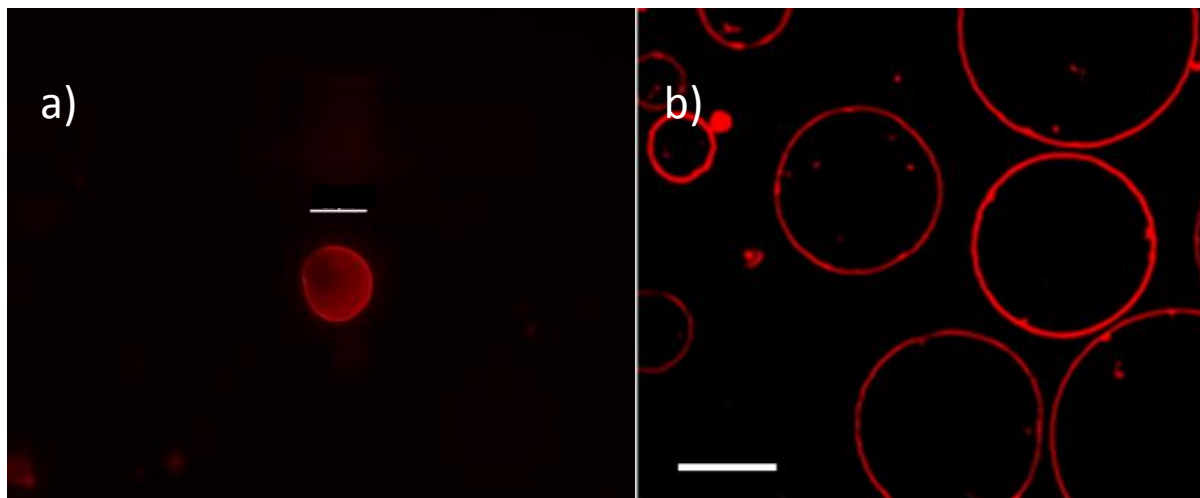
Delež sferičnih GUV-ov je bil največji pri protokolu št. 6 (25 %), sledi priprava po protokolu št. 5 (22 %), protokolu št. 4 (12,7 %), protokolu št. 2 (12 %), protokolu št. 3 (11 %). Najmanjši delež sferičnih GUV-ov brez vključkov se je pojavljal pri protokolu št. 1 (9 %). Rezultati so prikazani na sliki 7.



Slika 7: Delež sferičnih GUV-ov brez vključkov (slika 4a) GUV-ov po protokolih

Delež sferičnih GUV-ov brez vključkov. Vsak stolpec predstavlja povprečni delež GUV-ov s treh neodvisnih elektroformacij \pm standardno deviacijo. Skupno je bilo za vsak protokol prešteti 84-446 GUV-ov v 5 μ L raztopine.

5.5. KONCENTRIRANJE GUV-ov PO KONČANI ELEKTROFORMACIJI

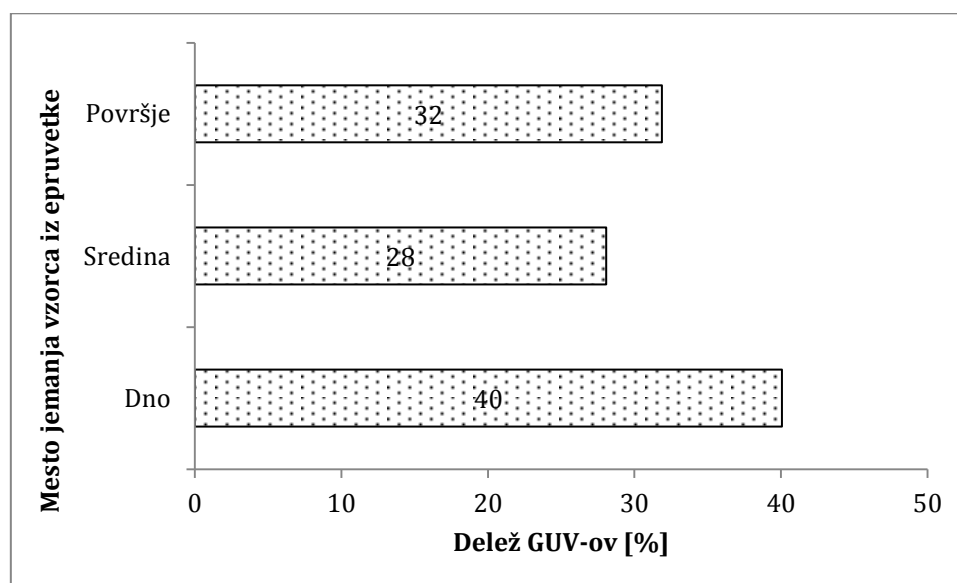


Slika 8: Reprezentativna slika raztopine z GUV-i, pripravljene po protokolu št. 5

Reprezentativna slika raztopine z GUV-i, pripravljena po protokolu št. 5; a) po elektroformaciji in b) po koncentriranju GUV-ov. Koncentriranje smo izvedli z zamenjavo saharoznega pufra z glukoznim in posneli fotografijo po 20 minutni inkubaciji. Zaradi razlike v gostoti so se GUV-i posedli na dno epruvice. Merilo predstavlja 20 μm .

5.6. RAZPOREDITEV GUV-ov PO EPRUVETKI

Imeli smo težave z odstopanjem membran in duhkov iz platinastih elektrod, ko smo jih potopili v pufer za elektroformacijo; okoli elektrod se je pojavila rdečkasta meglica, ki je potem počasi tonila proti dnu epruvetke. Vprašali smo se, če se GUV-i morda tudi po elektroformaciji v večjem številu nahajajo v določenem delu vodnega stolpca. Po elektroformaciji (protokol 1 in 2) smo zato jemali vzorce (1 μL) za štetje nastalih GUV-ov iz površine, sredine in dna epruvetke. Rezultati so predstavljeni na sliki 8.

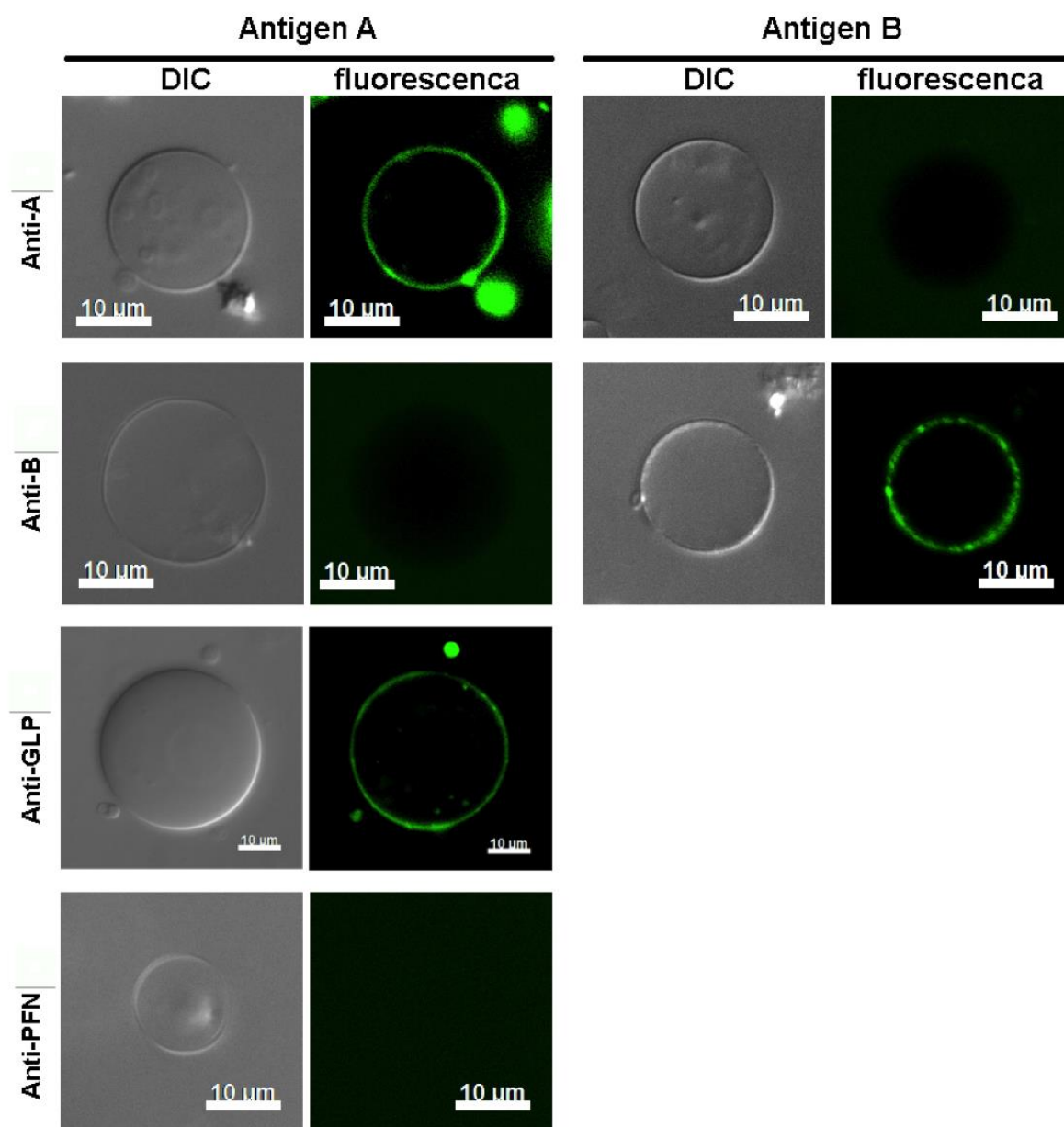


Slika 9: Delež GUV-ov v različnih delih vodnega stolpca

Površje, GUV-i so bili zajeti takoj pod gladino v epruvetke; Sredina, GUV-i so bili zajeti iz sredine epruvetke; Dno, GUV-i so bili zajeti na samem dnu epruvetke. Za pipetiranje GUV-ov smo vedno uporabljali obrezane pipetne nastavke. Število vseh prešteti GUV-ov: 443

5.7. IMUNODETEKCIJA

Z imunodetekcijo smo pokazali, da se molekule oligosaharidov in nekaterih glikoproteinov ohranijo skozi ves postopek (Slika 10). Dejstvo, da so predeli, ki jih prepoznajo protitelesa dovolj nespremenjeni, da pride do vezave, kaže na možnost, da tekom nastanka GUV-ov te molekule ohranijo svojo nativno obliko. Izvedli smo tudi kontrolno imunodetekcijo, kjer smo GUV-e pripravljene iz eritrocitov iz krvne skupine A, izpostavili mišjim anti-B protitelesom in potem sekundarnim anti-mišjim protitelesom označenim s FITC; do vezave ni prišlo. Enako kontrolno imunodetekcijo smo izvedli tudi za GUV-e pripravljene iz krvne skupine B in tudi tu ni prišlo do vezave. Kontrolno smo izvedli tudi z uporabo anti-perforinskih protiteles in dobili negativne rezultate.



Slika 10: Imunodetekcija na površini GUV-ov

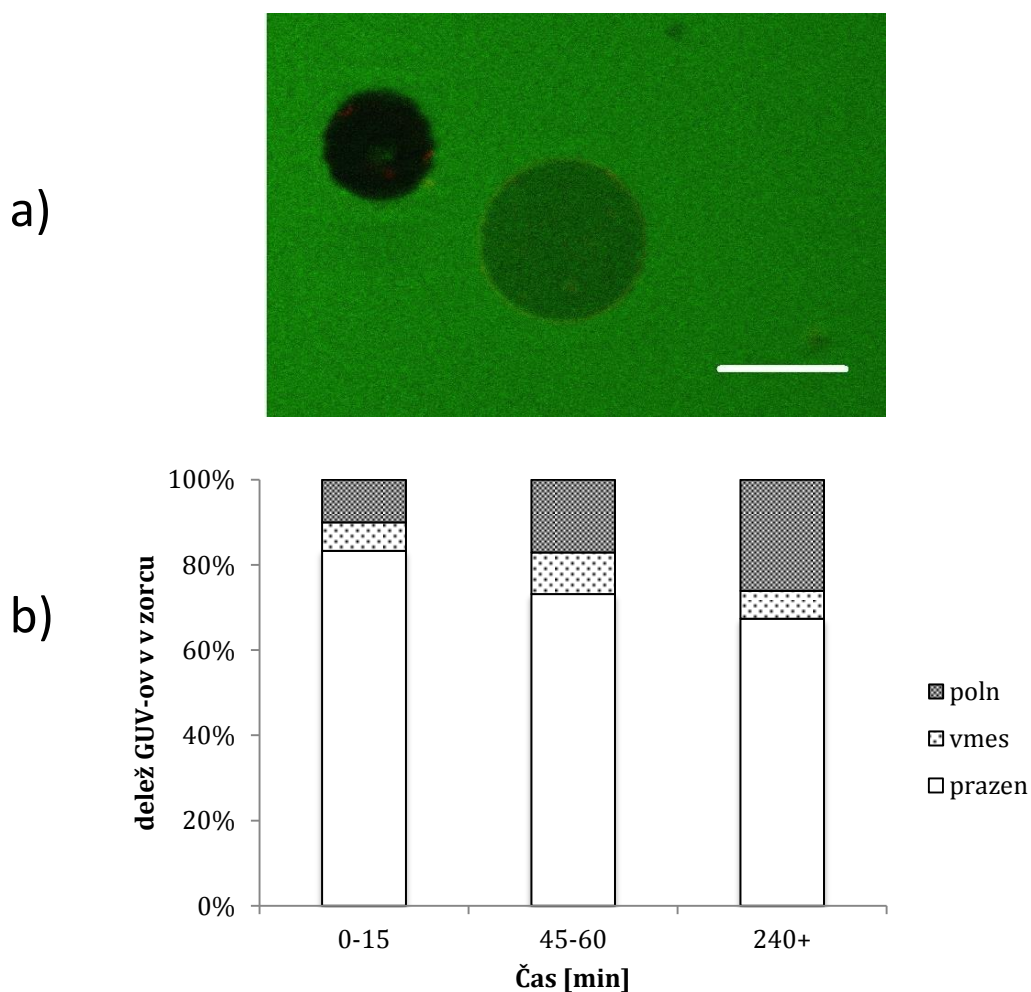
Slike so urejene po parih; leva je posnetek GUV-a z DIC mikroskopijo, desna pa slika istega GUV-a zajetega s fluorescentno mikroskopijo. Levi pari slik so GUV-i iz eritrocitov krvne skupine A, desni pari so slike GUV-ov iz krvne skupine B. Imunodetekcija od zgornje vrstice navzdol: anti-A protitelesa, anti-B protitelesa, anti-glikoforinska protitelesa, anti-perforinska protitelesa.

5.8. PREPUSTNOST MEMBRANE ZA KALCEIN IN DEKSTRAN

GUV-e, katerih membrane smo pobarvali z barvilom Dil, smo pripravili v saharoznem pufri, jih koncentrirali z glukoznim pufrom in nato inkubirali s kalceinom. Ker so bili GUV-i pripravljene v pufri brez kalceina, so bili pod mikroskopom videti črni na zelenem ozadju.

Nekatere membrane GUV-ov so se izkazale kot prepustne za kalcein. Na sliki so GUV-i v katere lahko vstopajo molekule kalceina videti manj intenzivno zeleno obarvani in te smo šteli v kategorijo »vmes«. Notranjost takega GUV-a pridobiva na intenzivnosti barve (Slika 11 a) vse dokler se koncentraciji kalceina znotraj vezikla in zunaj ne izenačita. V primerih, ko so bili GUV-i polni kalceina in se praktično ni več videlo razlike med GUV-om in njegovo okolico, smo lahko na sliki videli rdeč obris (membrano) na zeleni sliki. Rezultati so zbrani na sliki 11 b).

V namen preverjanja prepustnosti membrane smo uporabili tudi 70 kDa dekstran. GUV-e smo pustili izpostavljene mediju z dekstranom 24 ur ter mikroskopirali 3 x 2 μ L vzorca. V vzorcih praktično ni bilo GUV-a, ki bi bil prepusten za to molekulo.



Slika 11: Prepustnost GUV-ov za kalcein

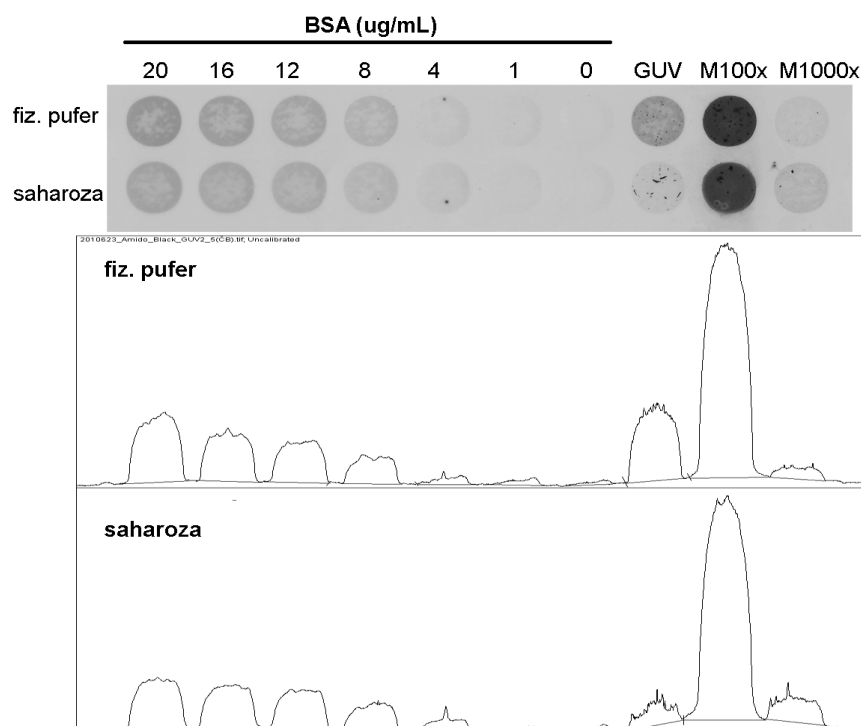
a) reprezentativna mikrografija GUV-a iz eritrocitne membrane, ki je neprepusten za kalcein (v notranjosti črn) in GUV-a, ki je delno napolnjen s kalceinom (manj intenzivno zeleno obarvan kot okolica); črta predstavlja 20 μ m. b) prepustnost GUV-ov za kalcein v odvisnosti od časa. Število prešteti GUV-ov je 119.

5.9. KONCENTRAICJA PROTEINOV IN LIPIDOV

Vsebnost lipidov smo preverjali z merjenjem koncentracije fosfolipidov in holesterola pri eritrocitnih membranah, duhkih in GUV-ih, ki smo jih pripravili po protokolu številka 2 in 5 (Preglednica 3).

Koncentracijo proteinov smo izmerili v izvornih membranah, duhkih in GUV-ih pripravljenih po protokolu 2 in 5. Nitrocelulozna membrana s proteini je bila barvana z amido črnim reagentom. Za določitev končne koncentracije smo naredili umeritveno krivuljo z BSA proteinom v perforinskem in saharoznem pufru. Dobljene vrednosti so podane skupaj z meritvami holesterola in fosfolipidov v preglednici 2.

Slika 12 prikazuje umeritveno lestvico z BSA proteinom, ki ima najtemnejšo liso pri najvišji koncentraciji BSA proteina in komaj opazno liso pri koncentraciji 0 $\mu\text{g/mL}$. Spodaj je temnost lise oz. koncentracija proteinov prikazana tudi grafično, z denzitogramom. Temnost lise pri merjenju proteinov v GUV-ih, pripravljenih po protokolu št. 2 je približno enaka kot pri umeritveni lestvici s koncentracijo 20 $\mu\text{g/mL}$. Pri GUV-ih, pripravljenih po protokolu št. 5, sta lisi GUV-ov in 1000x redčenih membran približno enaki lisi iz umeritvene lestvice pri koncentraciji 8 $\mu\text{g/mL}$.



Slika 12: Koncentracija proteinov v membranah, duhkih in GUV-ih

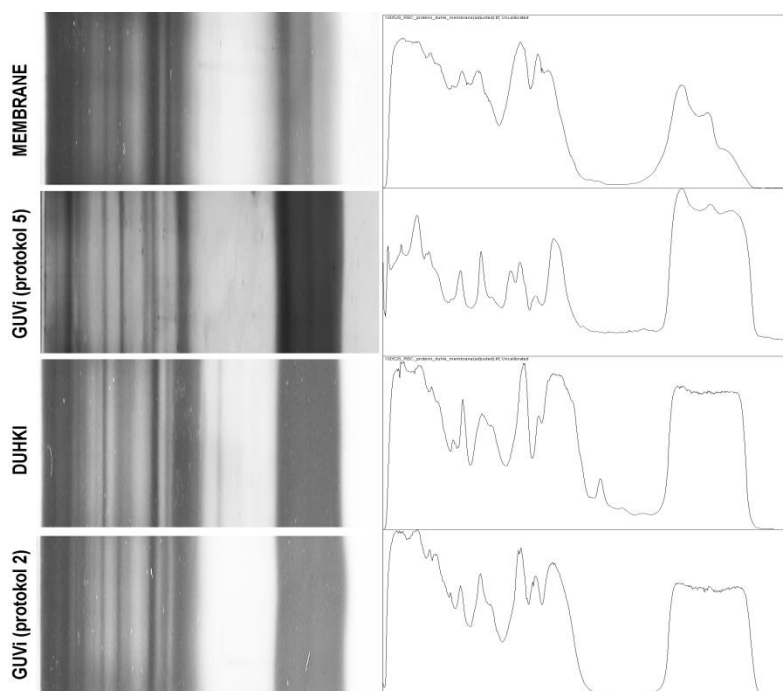
Koncentracija proteinov v membranah ("M" v vrstici označeni s "saharoza"), duhkih ("M" v vrstici označeni s "fiz.pufer") pri 100 x in 1000 x redčenju ter GUV-ih pripravljenih po protokolu št. 2 (označeno s "fiz. pufer") in 5 (označeno s "saharoza").

Preglednica 3: Koncentracija proteinov, fosfolipidov in holesterola.

	PROTEINI	FOSFOLIPI DI	HOLESTER OL
duhki [mg/mL]	4,5	0,65	0,14
membrane [mg/mL]	6,1	1,6	1,375
GUV 2 [μ g/mL]	26,45	3,5	1
GUV 5 [μ g/mL]	5,8	3,33	1,25

5.10. NaDS-PAGE

Z elektroforezo smo želeli preveriti proteinski profil GUV-ov in ga primerjati s profilom izhodiščnega materiala - eritrocitnih duhkov in eritrocitnih membran. Dobljeni gel smo skenirali in normalizirali intenziteto slike. Tako obdelano sliko smo potem uporabili za denzitometrijo z imageJ programom. Rezultat so zbrani na sliki 13.



Slika 13: Profil eritrocitnih proteinov

Na levi je prirejena slika poskeniranega gela (za GUV-e pripravljene po protokolu št. 2, duhke, GUV-e pripravljene po protokolu št. 5 in membrane). Na desni so denzitogrami slik iz leve strani.

6. RAZPRAVA

6.1. PRIPRAVA LIPIDOV ZA NANOS NA ELEKTRODE

Ob pričetku uporabljanja eritrocitnih membran, kot surovine za produkcijo GUV-ov, smo naleteli na prej nepoznano težavo. Na elektrode smo nanесли raztopino z eritrocitnimi membranami in potem sušili 8 minut pri sobni temperaturi, kot smo to počeli pri protokolu s sintetičnimi lipidi. Nanos eritrocitnih membran je začel odstopati od elektrod takoj, ko smo jih potopili v pufer za elektroformacijo. Posledično je nastalo le malo GUV-ov, v vzorcu pa se je pod mikroskopom videlo veliko z barvilom označenih kosmov, ki so bili najverjetneje membrane, ki so odstopile od elektrod in se niso formirale v GUV-e. To se sklada z zgodnjimi raziskavami o elektroformaciji, da električno polje nima vpliva na lipide, ki niso v stiku z elektrodami (Dimitrov in Angelova, 1988). Poskušali smo z daljšimi časi sušenja in uporabo preprihavanja z dušikom. Za uspešno elektroformacijo, pri kateri nastane večje število GUV-ov, smo elektrode med posameznimi nanosi 5 minut preprihávali z dušikom in potem v rotavaporju sušili čez noč pri znižanem tlaku. Méléard in sodelavci opišejo postopek priprave tako, da elektrode z lipidi ne potopijo v pufer za elektroformacijo, temveč elektrode postavijo v posodo za elektroformacijo, v katero naknadno dolijejo pufer. Pri tem opozarjajo, da je to treba izvesti počasi, da se lipidi ne bi sprali z elektrod (Méléard in sod., 2009, Pott in sod., 2008). Montes in sodelavci pri v svoji objavi niso omenili tovrstnih težav, čeprav smo na njih naleteli tudi, ko smo sledili njihovem protokolu. Razlika v nanašanju je v količini nanesenih duhkov; mi smo nanašali 16 x več lipidov (nanašali smo 4 x po 2 μL na elektrodo, Montesova s kolegi pa približno 1 μL na elektrodi), ker pri manjših količinah izplen GUV-ov ni bil zadovoljiv.

Zadnja faza priprave eritrocitnih duhkov vključuje uporabo tekočega dušika in tople kopeli, da se membrane 10 x zamrzne in odmrzne. Tekom tega ponavljajočega cikla naj bi se membrane spet zatesnile (ang. reseal) in se tako pretvorile v eritrocitne duhke. Za naš namen, ko smo membrane v plasteh nanašali na elektrode in jih pustili, da se posušijo, da bi se potem združevale v večje GUV-e, ni bilo potrebe po pravih eritrocitnih duhkkih, zadostovale so že eritrocitne membrane s sprano notranjostjo. Tako smo iz postopka izključili uporabo tekočega dušika in skrajšali čas protokola.

6.2. VELIKOST NASTALIH VEZIKLOV

Zaradi težavnosti pri ločevanju med eritrocitnimi membranami ali duhki in GUV-i smo se odločili, da kot GUV-e štejemo le vezikle s premerom nad 10 μm . Brez uporabe imerzijskih olj, s svetlobnim mikroskopom sliko povečamo 400 x, kar pomeni, da je težje opazovati pojave, ki se odvijajo v velikostnem razredu nekaj μm , medtem ko se različne spremembe v obliki veziklov, njihovo prepustnost ipd. dokaj enostavno spremlja, če imajo premer 10 μm in več. GUV-e z dovolj velikimi premeri smo potem dodatno razdelili v različne velikostne razrede.

6.3. VPLIV RAZLIČNIH DEJAVNIKOV NA PRODUKCIJO GUV-ov

6.3.1. Mediji v katerem so pripravljani lipidi za nanos

Šest različnih protokolov smo zastavili tako, da smo lahko spremljali vpliv različnih dejavnikov na produkcijo GUV-ov. Protokol številka 1 je sledil Montes in sodelavci (z razliko v količini nanešenih lipidov). Izplen je bil slab in naše predvidevanje je bilo, da je za to lahko odgovorna sol, ki se koncentrira v lipidnih nanosih med sušenjem. Ta verjetno potem privede do močnih razlik v osmolarnosti med nastajanjem GUV-ov in posledično do majhnega števila nastalih veziklov. Protokol številka 2 je bil enak prvemu, le da smo eritrocitne dukke pripravili v vodi in ne v fiziološkem pufru. Produkcija GUV-ov v drugem protokolu je bila očitno boljša kot pri protokolu številka 1. Negativni vpliv soli v fiziološkem pufru so opazili tudi avtorji prvega protokola in v naslednji objavi GUV-e pripravili v vodi (Bouvrais in sod., 2008).

6.3.2. Razlika med uporabo eritrocitnih dukkov in eritrocitnih membran

Preverili smo tudi razliko med uporabo eritrocitnih dukkov in eritrocitnih membran (protokol številki 2 in 3). Rezultati so pokazali, da večjih razlik ni, niti po številu nastalih GUV-ov, niti po njihovi velikosti ali kvaliteti (brez vključkov, sferični). V nadaljevanju smo uporabljali samo membrane, ker to predstavlja prihranek časa in materiala za pripravo.

Za tem smo preverili vpliv pufra na elektroformacijo (protokol št. 3, 4 in 5). Protokol št. 3 vključuje fiziološki pufer in elektroformacijo pri frekvenci 500 Hz z najvišjo napetostjo 3,5 V. Protokol št. 4 je za naš namen (priprava GUV-ov iz nativnih membran v fiziološko primerljivem mediju) neuporaben, vredno pa je omeniti, da je bilo število nastalih GUV-ov presenetljivo malo. V primerjavi z ostalimi protokoli jih je nastalo malo, čeprav GUV-e v vodi uspešno pripravljajo že desetletja (Angelova in Dimitrov, 1986).

6.3.3. Prednosti uporabe saharoznega pufra za elektroformacijo

S protokolom št. 5, kjer smo uporabljali saharozni pufer in program elektroformacije s frekvenco 10 Hz/ 4 V, smo dobili največ GUV-ov. Na prvi pogled saharozni pufer ni najboljša primerjava fiziološkim raztopinam, vendar njegova uporaba predstavlja nekaj prednosti. Saharozni pufer se s počasnim pipetiranjem lahko zamenja z drugim pufrom, ki ima bolj fiziološkim raztopinam podobno sestavo (Estes, 2005). Druga pomembna prednost saharoznega pufra je tudi enostavno koncentriranje ustvarjenih GUV-ov. S počasnim dodajanjem izo-osmolarnega glukoznega pufra se zmanjša gostota zunanega pufra. GUV-i so za glukozo in saharozo slabo prepustni, zato se njihova vsebina ne spremeni. Z znižanjem gostote zunanega medija, sami postanejo negativno plovni in posledično potonejo na dno. Od te točke naprej, jih lahko z obrezanim pipetnim nastavkom, v koncentrirani obliki, prestavimo drugam in uporabimo za nadaljne poskuse. Vredno je omeniti, da večji GUV-i tonejo hitreje. Upoštevajoč to dejstvo, lahko raziskovalec izbere velikost GUV-ov, ki jih potrebuje z odpipetiranjem GUV-ov iz določenega pasu v vodnem stolpcu-največji so najnižje, manjši višje v vodnem stolpcu (Slika 8).

6.3.4. Vpliv količine nanešenih lipidov

Zaradi tako velikih odstopanj v količini lipidov, ki so jih na elektrode nanašali pri Montes in sodelavci ter količino, ki smo jo uporabljali mi, smo pripravili še protokol št. 6. Protokol se od protokola št. 5 razlikuje samo po količini lipidov na elektrodah. Tako smo preverili vpliv količine lipidov na število nastalih GUV-ov. Rezultati so pokazali, da količina lipidov igra pomembno vlogo za uspešno elektroformacijo; z 8 x večjo količino lipidov smo dosegli 20 x večji izplen.

Po številu nastalih GUV-ov je bil najuspešnejši protokol št. 5, s katerim smo dobili skoraj 70.000 GUV-ov/ mLr (slika 6). Tudi če želimo pogledati delež sferičnih GUV-ov brez vključkov (slika 8), smo jih največ uspeli pripraviti s protokolom št. 6, ki je enak protokolu št. 5, razlikujeta se le v količini lipidov na elektrodah pred elektroformacijo. Čeprav je delež zaželenih GUV-ov večji pri protokolu št. 6, jih je številčno bistveno več pri protokolu št. 5. Zanimivo pa je, da je delež sferičnih GUV-ov brez vključkov in s premerom večjim od 20 μm , večji pri protokolu, pri katerem se na elektrode nanaša manjša količina lipidov. Iz tega bi morda lahko predlagali še dodatno optimizacijo protokola v koraku nanašanja lipidov. Manj lipidnega nanosa, pomeni manj GUV-ov vendar z večjim premerom in večjim deležem GUV-ov, ki so sferične oblike in nimajo vključkov, več lipidnega nanosa pa predstavlja način za pridobivanje večjih količin GUV-ov, vendar so ti v manjšem odstotku okrogli, pogosteje imajo vključke in manjši delež GUV-ov ima premer nad 20 μm . Z dodatnim eksperimentiranjem bi lahko našli optimalno potrebno količino lipidov na elektrodah, ki zagotavlja najboljše razmerje med številom GUV-ov in njihovo kvaliteto-obliko, velikostjo in odsotnostjo vključkov.

6.4. PRIMERJAVA LIPIDNE SESTAVE IZVORNIH MEMBRAN IN GUV-ov

Za začetek smo želeli preveriti razlike med izvornim materialom, torej med eritrocitnimi duhki in membranami. Proteinski delež je nekoliko nižji pri duhkih kot pri membranah, vendar se prava razlika kaže v količini fosfolipidov in holesterola. Kljub temu, da se membrane podvrže še desetim ciklom zamrzovanja in odtajevanja, kar morda povzroči izpad sestavljenih lipidov ali holesterola iz membran, da dobimo duhke, to ne more razložiti nižje koncentracije teh molekul v vzorcu. Verjetno je problem v merjenju, saj je med posameznimi meritvami istega vzorca prihajalo do velikih odstopanj; masno razmerje med fosfolipidi in holesterolom je pri membranah in duhkih zanihalo od 6:1 do 2:1 (podatki niso prikazani).

Nastali GUV-i imajo zaradi izvora lipidov kompleksno sestavo, vendar se zaradi faze sušenja verjetno poruši membranska asimetrija.

6.5. PRIMERJAVA PROTEINOV V ERITROCITNIH MEMBRANAH, ERITROCITNIH DUHKIH IN GUV-ih

Po originalnem protokolu Montes in sodelavcev, nismo uspeli pripraviti dovolj GUV-ov, da bi lahko preverili vsebnost proteinov in lipidov v njihovih membranah. S protokolom št. 2, ki se od objavljenega (Montes in sod., 2007) razlikuje samo v tem, da so eritrocitni duhki pripravljani v vodi namesto v fiziološkem pufu, pa je bila produkcija GUV-ov uspešnejša.

Tako smo primerjali protokol št. 2 in protokol št. 5. Velike razlike v koncentraciji fosfolipidov in holesterola, ki so se pojavljale pri merjenju duhkov in membran, nismo opazili. Pojavi pa se velika razlika med koncentracijo proteinov pri GUV-ih. Razliko lahko razložimo na dva načina; prvi je eksperimentalna napaka, koncentracijo proteinov v GUV-ih, pripravljenih po protokolu št. 2 smo opravili le enkrat; druga možnost pa je, da se v protokolu št. 2 v GUV-e dejansko vgradi skoraj 5 x več proteinov. To bi lahko razložili z upoštevanjem, da se v protokolu št. 2 uporablja zaprte duhke, ki se potem združijo v večje GUV-e. Ti vsebujejo membranske in citoskeletne proteine eritrocitov. Ti proteini med pripravo ne izpadejo iz membranskega ovoja in se ohranijo vse do nastanka GUV-ov. Pri protokolu št. 5 se uporablja nezatesnjene eritrocitne membrane. Obstaja možnost, da zaradi lukenj v membranskem ovoju citoskeletni proteini izpadejo nekje med nastankom membran in formacijo GUV-ov.

Z elektroforezo smo želeli preveriti proteinski profil GUV-ov in ga primerjati z izhodiščnim materialom. V grobem je proteinska slika dokaj enaka, pojavljajo se manjše razlike. Eritrocite smo spirali in lizirali v prisotnosti proteaznih inhibitorjev, zaradi česar lahko izključimo morebitni vpliv prisotnih proteaz. Bolj verjetno na proteine vpliva obdelava materiala od liziranja do nanosa na gel za elektroforezo. Že v letu 1974 sta Kirkpatrick in LaCelle (Kirkpatrick in LaCelle, 1974) ugotovila, da na proteinski profil precej vpliva priprava duhkov. V našem primeru smo membrane nanесли na elektrode in jih sušili vsaj dve uri, pogosteje čez noč pri sobni temperaturi, kar bi lahko vplivalo na sestavo proteinov. Vredno pa je omeniti, da smo imeli nemalo težav z izvedbo elektroforeze, da se pasovi niso razločili, se razlivali v sosednje kolone, prepotovali le kratko razdaljo od izhodišča ipd. Morda bi bilo smiselno nekaj pozornosti usmeriti tudi v optimiziranje protokola za elektroforezo vzorcev GUV-ov v mediju s sladkorjem ali s fiziološkimi vrednostmi elektrolitov.

Z encimskim testom in z metodo površinske plazmonske resonance je bila preverjena tudi funkcionalnost nekaterih membranskih proteinov. Acetilholinesteraza in od kalija odvisna fosfataza, sta bila dva proteina, ki sta bila posušena pod podobnimi pogoji, kot so bili prisotni med pripravo GUV-ov in potem previdno resuspendirana. Njuna encimska funkcionalnost je bila podobna tisti iz izvornega materiala. Tudi rezultati testa za encimsko aktivnost acetilholinesteraze pri GUV-ih, pripravljenih po protokolu št. 1 in 5, so pokazali, da se funkcionalnost proteina ohrani skozi ves postopek priprave GUV-ov (Mikelj in sod. 2013).

Sodeč po količini fosfolipidov, holesterola in proteinov, bi pričakovali približno enako število GUV-ov v suspenziji, ne glede na protokol. Vseeno smo našli skoraj trikrat več GUV-ov v vzorcu iz protokola št. 5, kot v vzorcu iz protokola št. 2. V raztopini z GUV-i so pogosto vidni še ostanki lipidov iz elektrod, ki se niso vgradili v GUV-e (Dimitrov in Angelova, 1988). Med pregledovanjem vzorca raztopine, pripravljene po protokolu št. 2, je bilo v raztopini veliko tovrstnih kosov membran ali duhkov in GUV-ov, ki so bili premajhni (premer manjši od 10 μm), da bi jih šteli.

6.6. IMUNODETEKCIJA SAHARADINIH SKUPIN NA MEMBRANI

Z imunodetekcijo smo želeli preveriti, če se med pripravo GUVov na membranah obdržijo tudi nekatere saharidne molekule. GUV-e smo pripravili po protokolu št. 5; v tem poskusu smo uporabili tudi kri od donorja s krvno skupino B. Tako smo lahko enostavno opravili tudi kontrolo imunodetekcije. Med GUV-i, pripravljenimi z eritrociti skupine A in protitelesi za ta antigen, je prišlo do vezave, medtem ko se ta protitelesa niso vezala na GUV-e, ki so bili pripravljene iz eritrocitov iz skupine B. Poskusili smo tudi s protitelesi Anti-B in dobili pričakovane rezultate. Do vezave je prišlo pri GUV-ih, ki so bili narejeni iz eritrocitov z antigeni za krvno skupino B, pri GUV-ih z antigenom A pa ni bilo vezave. S tem smo pokazali, da se saharidi očitno precej nespremenjeni obdržijo na membranah skozi ves proces in potem predstavljajo sestavni del površine GUV-ov.

Glikoforini so skupina glikoproteinov, ki so prisotni v eritrocitni membrani in precej pripomorejo k negativnemu naboju, ki preprečuje interakcije med samimi rdečimi krvničkami, kot tudi interakcijo med eritrociti in drugimi celicami. S protitelesi anti-A oz. anti-B smo potrdili, da tudi ti saharidi prenesajo postopek priprave GUV-ov in se tudi po tem nahajajo v membrani. Zelo verjetno se nek delež teh molekul med pripravo ni orientiral pravilno in štrli v notranjost GUV-ov. Težko bi trdil, da so te molekule odgovorne za odsotnost interakcij med GUV-i, saj smo GUV-e pripravljali tudi iz sintetičnih lipidov (POPC GUV-i) in se tudi ti niso privlačili med seboj.

Kontrolo smo izvedli tudi s protitelesi z aktivnim mestom za perforin. To je citolitični protein, ki se pod normalnimi pogoji ne pojavlja v eritrocitnih membranah. Po pričakovanjih ni prišlo do vezave.

6.7. PREPUSTNOST GUV-ov ZA MOLEKULE KALCEINA IN DEKSTRANA

GUV-e smo pripravili v saharoznem puftru in jih naknadno koncentrirali z glukoznim pufrom. Tako koncentrirano suspenzijo smo obarvali s kalceinom. Kalcein je počasi prehajal skozi membrano nekaterih GUV-ov. Delež GUV-ov, v katere je vstopil kalcein, se je s časom povečeval, po 24 urah je neprepustnih ostalo le ~40% GUV-ov, ostali pa so bili vsaj delno napolnjeni s kalceinom. Rezultati so smiselni, kalcein je majhna molekula, ki verjetno lahko prehaja skozi nekatere kanalčke v eritrocitni membrani. Pretok v GUV-e ostaja dokler se koncentracija kalceina v veziklih ne izenači s koncentracijo v okolici. S časom se povečuje delež GUV-ov v katerih je možno videti kalcein. Število delujočih kanalčkov v posameznih GUV-ih variira in zato se nekateri hitreje obarvajo zeleno kot drugi. Dodatno to hipotezo podpira dejstvo, da GUV-i ostanejo praktično neprepustni za večje molekule, kar smo pokazali s poskusom z dekstranom. GUV-i iz POPC so ostali neprepustni za kalcein tudi po enem dnevu inkubacije. To je razumljivo, saj naj bi bili popolnoma zatesnjeni, brez kanalčkov, ki bi povezovali njihovo notranjost z okolico. Razlaga z membranskimi kanalčki je smiselna, vendar ne razloži, zakaj nekateri GUV-i tudi po daljši inkubaciji (24 h) ne vsebujejo dovolj kalceina, da bi prepustnost zaznali pod mikroskopom. Tu obstaja možnost, da skoraj polovica GUV-ov nima dovolj delujočih kanalčkov. V tem primeru se lahko sklepa,

da enak delež GUV-ov nima funkcionalnih tudi drugih proteinov, kar je lahko motiv za nadaljnje izboljšave priprave orjaških unilamelarnih veziklov.

7. SKLEPI

- Protokol za elektroformacijo smo priredili tako, da smo GUV-e lahko pripravili v pufri s fiziološko primerljivo ionsko jakostjo;
- Med postopkom se ohrani kompleksna sestava izvornih membran, vendar je kljub delujočim nekaterim preverjenim proteinom vprašljiva funkcionalnost membranskih proteinov;
- Uporabnost GUV-ov smo razširili z uvedbo protokola, ki omogoča pripravo številnih GUV-ov iz kompleksnih membran, z raznoliko lipidno sestavo in prisotnimi proteini.

8. POVZETEK

Cilj diplomske naloge je bil dosežen, z našim protokolom smo uspeli v saharoznem pufru pripraviti veliko število sferičnih GUV-ov iz eritrocitnih membran, ki imajo dobro ohranjeno lipidno, proteinsko in saharidno heterogenost naravne membrane. Saharozni pufer je možno enostavno zamenjati za raztopino, ki po svoji sestavi bolj spominja na fiziološke raztopine, po drugi strani pa omogoča še dodatno koncentriranje GUV-ov. Kljub omenjenim prednostim, ima protokol tudi slabosti; predvsem je problem faza sušenja, ki traja vsaj dve uri. Pri tem se membrane tako posušijo, da se poruši naravna asimetrija, verjetno pa dehidracija negativno vpliva tudi na proteine. Protokol torej omogoča produkcijo velikega števila GUV-ov iz nativnih membran, kar je bilo še do nedavnega nemogoče, vendar so možne nadaljnje izboljšave, da bi bili GUV-i še bolj podobni celicam in tako še boljše orodje za raziskovanje membranskih pojavov.

9. LITERATURA

- Akashi K., Miyata H., Itoh H., Kinoshita K. Jr., 1995. Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophys. J.*, 71: 3242-3250
- Almeida R. F. M., Borst J., Fedorov A., Prieto M., Visser A. J. W. G., 2007. Complexity of lipid domains and rafts in giant unilamellar vesicles revealed by combining imaging and microscopic and macroscopic time-resolved fluorescence. *Biophys. J.*, 93, 2: 539-553
- Ambrogio E. E., Separovic F., Bowie J. H., Fidelio G. D., Bagatolli L. A., 2005. Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein. *Biophys. J.*, 89: 1874-1881
- Angelova M. I., Dimitrov D. S., 1986. Liposome electroformation. *Farraday discuss. Chem. Soc.*, 81: 303-311
- Angelova M. I., Soleau S., Méléard P., Faucon J. F., Bothorel F., 1992. Preparation of giant vesicles by external AC electric fields, Kinetics and applications. *Progr. Colloid. Polymer. Sci.*, 89: 127-131
- Bagatolli L. A., 2006. To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochimica et biophysica acta*, 1758: 1541-1556
- Bagatolli L. A., T. Parasassi, E. Gratton, 2000. Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods; A two photon fluorescence microscopy study. *Chemistry and Physics of Lipids*, 105: 135-147
- Baugmart T., Hammond A. T., Sengupta P., Hess S. T., Holowka D. A., Baird B. A., Webb W. W., 2007. Large scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 9: 3165-3170
- Bivas I., Hanusse P., Bothorel P., Lalanne, O. Aguerre-Chariol J., 1987. An application of the optical microscopy to the determination of the curvature elastic modulus of biological and model membranes. *J. Phys. France*, 48: 855-867
- Bouvrais H., Méléard P., Pott T., Jensen K. J., Brask J., Ipsen J. H., 2008. Softening of POPC membranes by maganin. *Biophys. Chem.* 137, 1: 7-12
- Boyer R., 2005. Temelji biokemije, Študentska založba, str. 225-229
- Bucher P. Fischer A., Luisi L. P., Oberholzer T., Walde P., 1998. Giant Vesicles as biochemical compartments: the use of microinjection techniques. *Langmuir*, 14: 2712-2721
- Dimitrov D. S., Angelova M. I., 1988. Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields. *Bioelectrochem. and bioenergetics*, 19: 323-336
- Dimova R., Aranda S., Bezlyepkina N., Nikolov V., Riske K. A., Lipowsky R., 2006.

- A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *J. Phys.: Condensed Matter*, 18: S1151-S1176
- Döbereiner H. G., Selchow O., Lipowsky R., 1999. Spontaneous curvature of fluid vesicles induced by trans-bilayer sugar asymmetry. *European. Biophys. J.*, 28, 2: 174-178
- Engelhardt H., Duwe, Sackmann H. P., 1985. Bilayer bending elasticity measured by Fourier analysis of thermally excited surface undulations of flaccid vesicles. *J. Physique Lett.* 46: 395-400
- Estes D., Mayer M., 2005. Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber. *Biochimica et biophysica acta*, 1712: 152-160
- Faucon J. F., Mitov M. D., Méléard P., Bivas I., Bothorel P., 1989. Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. Theoretical and experimental requirements. *J. Phys. France*, 50: 2389-2414
- Gambin Y., Lopez-Esparza R., Reffay M., Sierrecki E., Gov N. S., Genest M., Hodges R. S., Urbach W., 2006. Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 2098-2102
- Goldring J. P., Ravaioli L., 1996. Solubilization of protein-dye complexes on nitrocellulose to quantify proteins spectrophotometrically. *Anal. Biochem.*, 242: 197-201
- Kirkpatrick, F. H. & LaCelle, P. L., 1974. Comparison of preparations of erythrocyte membranes and membrane proteins by SDS-gel electrophoresis. *Experientia* 30: 140-142
- Kozlov M. M., 2010. Biophysics: Joint effort bends membrane. *Nature*, 463: 439-440
- Méléard P., Bagatolli A. L., Pott T., 2009. Giant unilamellar vesicle electroformation: from lipid mixtures to native membranes under physiological conditions. *Elsevier Methods in Enzymology*, 465: 161-176
- Méléard P., Gerbeaud C., Pott T., Fernandez-Puente L., Bivas I., Mitov M. D., Dufourcq J., Bothorel P., 1997. Bending elasticities of model membranes: influences of temperature and sterol content. *Biophys. J.*, 72: 2616-2629
- Mikelj M., Praper T., Demić R., Hodnik V., Turk T., Anderluh G., 2013. Electroformation of giant unilamellar vesicles from erythrocyte membranes under low-salt conditions. *Anal. Biochem.*, 435: 174-180
- Montes L. R., Alonso A., Goñi, Bagatolli A. L., 2007. Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions. *Biophys. J.*, 93: 3548-3554
- Pautot S., Frisken B. J., Weitz D. A., 2003. Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion. *Langmuir*, 19: 2870-2879

- Peterlin P., Arrigler V., 2008. Electroformation in a flow chamber with solution exchange as a means of preparation of flaccid giant vesicles. *Colloids Surf B* 64: 77-87
- Pott T., Bouvrais H., Méléard P., 2008. Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 154: 115-119
- Praper T., Sonnen A. F.-P., Kladnik A., Andrighetti A. O., Viero G., Morris K. J., Volpi E., Lunelli L., Dalla Serra M., Froelich C., J., Glibert R. J. C., Anderluh G., 2011. Perforin activity at membranes leads to invaginations and vesicle formation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 108: 21016-21021
- Praper T., Sonnen A. F.-P., Kladnik A., Viero G., Dalla Serra M., Froelich C., J., Glibert R. J. C., Anderluh G., 2011. Human perforin employs different avenues to damage membranes. *J. Biol. chem.* 286: 2946-2955
- Reeves J. P., Dowben R. M., 1969. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *Journal of Cellular Physiology*, 73: 49-60
- Rodriguez N., Pincet F., Cribier S., 2005. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: A comparison by fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 42, 2: 125-130
- Schön P., Garcia-Sáez A. J., Malovrh P., Bacia K., Anderluh G., Schwille P., 2008. Equinatoxin II permeabilizing activity depends on the presence of sphingomyelin and lipid phase coexistence. *Biophys. J.*, 2: 691-698
- Simons K., 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33: 269-295
- Singer S. J., Nicolson G. L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720-731
- Tamba. Y., Yamazaki M., 2005. Single giant unilamellar vesicle method reveals effect of antimicrobial peptide magainin 2 on membrane permeability. *Biochemistry*, 44: 15823-15833
- Valverde A., 2000. Correlation entre les fluctuations thermiques des membranes de vesicules geantes et la presence de bacteriorhodopsine au sein de ces bicouches (Master thesis). Talence, Universite Bordeaux I: 51 str.