

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Maja GARVAS

**PROUČEVANJE TVORBE MEMBRANSKIH DOMEN
V LIPIDNIH VEZIKLIH IZ SFINGOMIELINA IN
HOLESTEROLA Z ELEKTRONSKO
PARAMAGNETNO REZONANCO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

LJUBLJANA, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Maja Garvas

**PROUČEVANJE TVORBE MEMBRANSKIH DOMEN V LIPIDNIH
VEZIKLIH IZ SFINGOMIELINA IN HOLESTEROLA Z
ELEKTRONSKO PARAMAGNETNO REZONANCO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**STUDY ON THE FORMATION OF MEMBRANE DOMAINS IN
SPHINGOMYELIN/CHOLESTEROL VESICLES BY ELECTRON
PARAMAGNETIC RESONANCE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Raziskave so bile opravljene na Katedri za biokemijo, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani ter v laboratoriju za biofiziko, Oddelek za trdno snov, Inštitut Jožef Štefan, Ljubljana.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Kristino Sepčič, za somentorico dr. Marjeto Šentjerc, za recenzenta prof. dr. Petra Mačka.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Gregor ANDERLUH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: prof. dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: dr. Marjeta ŠENTJURC
Inštitut Jožef Štefan, Ljubljana
- Član: prof. dr. Peter MAČEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Datum zagovora:

14.12.2007

Maja Garvas

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.11:579.23:582.28(043.2)=163.6
KG bukov ostrigar/elektronska paramagnetna resonanca/holesterol/lipidni rafti /lipidni vezikli/ostreolizin/palmitoil-oleoil-fosfatidilholin/*Pleurotus ostreatus*/sfingomielin/urejena tekoča faza/
AV GARVAS, Maja
SA SEPČIČ, Kristina – mentorica/ŠENTJURC, Marjeta – somentorica
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2007
IN PROUČEVANJE TVORBE MEMBRANSKIH DOMEN V LIPIDNIH VEZIKLIH IZ SFINGOMIELINA IN HOLESTEROLA Z ELEKTRONSKO PARAMAGNETNO REZONANCO
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP X, 55 str., 25 sl. 6 pregl., 30 vir.
IJ sl.
JI sl./en.
AI Ostreolizin, 15 kDa velik citolitični protein iz užitne gobe bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*) je litičen za membrane, ki vsebujejo sfingomielin in holesterol ter specifično prepoznava s holesterolom obogatene lipidne mikrodomene oz. lipidne rafte, ki so v tekoči urejeni fazi. Njegova membranska aktivnost je močno inhibirana ob dodatku nenasičenih lipidov. Namen diplomskega dela je bil ugotoviti sovpadanje domenske struktura membran veziklov iz sfingomielina in holesterola (v različnih molskih razmerjih) z membransko aktivnostjo ostreolizina. Poslužili smo se metode elektronske paramagnetne resonance (EPR). Detektirali smo tri hkrati obstajajoče domene z različnimi karakteristikami fluidnosti. Domenska struktura membrane veziklov, na katere se ostreolizin veže, se občutno razlikuje od domenske strukture membrane veziklov, na katere se ostreolizin ne veže. Ob dodatku mononasičenega palmitoil-oleoil-fosfatidilholina se zmanjša delež najbolj urejene domene, kar se kaže v večji fluidnosti membrane. Vezikli s takšno sestavo dramatično zmanjšajo aktivnost ostreolizina.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 577.11:579.23:582.28(043.2)=163.6
CX oyster mushroom/electron paramagnetic resonance/cholesterol/lipid rafts/lipid vesicles/ostreolysin/palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine/*Pleurotus ostreatus*/sphingomyelin/liquid ordered phase/
AU GARVAS, Maja
AA SEPČIČ, Kristina-supervisor/ŠENTJURC, Marjeta- co-supervisor
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology
PY 2007
TI STUDY ON THE FORMATION OF MEMBRANE DOMAINS IN SPHINGOMYELIN/CHOLESTEROL VESICLES BY ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE
DT Graduation thesis (Univerity studies)
NO X, 55 p., 25 fig., 6 ann., 30 ref.
LA sl.
AL sl./en.
AB Ostreolysin, a 15 kDa cytolytic protein from the edible oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) is lytic to membranes containing both sphingomyelin and cholesterol. It specifically recognizes cholesterol-rich, liquid-ordered lipid domains, which are the basis for the formation of lipid rafts. Its membrane activity is inhibited by the addition of unsaturated lipids. The aim of the graduation thesis was to determine how the lipid membrane domain structure of sphingomyelin/cholesterol vesicles (with various molar proportions of both lipids) correlates with ostreolysin activity. To study this, we used electron paramagnetic resonance (EPR) method. Three different coexisting domains having different fluidity characteristics were observed. We found that the domain structure of lipid membranes to which ostreolysin binds considerably differs from those that are not susceptible to ostreolysin. Portion of most ordered domain, and the overall membrane fluidity decrease by the addition of monounsaturated palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija.....	III
Key words documentation.....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo slik.....	VII
Kazalo preglednic.....	IX
Okrajšave in simboli.....	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 LIPIDNI RAFTI.....	3
2.2 OSTREOLIZIN (OLY).....	7
2.3 ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA (SPINSKA) RESONANCA.....	8
3 MATERIAL IN METODE	11
3.1 MATERIAL	11
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema	11
3.1.2 Raztopine.....	12
3.1.3 Laboratorijska oprema	13
3.2 PRIPRAVA LIPIDNIH VEZIKLOV.....	14
3.2.1 Priprava velikih multilamelarnih veziklov (MLV).....	14
3.2.2 Priprava malih unilamelarnih veziklov (SUV)	14
3.2.2.1 Vpliv različnih metodologij priprave spinsko označenih lipidnih veziklov na meritve EPR.....	15
3.2.2.2 Priprava spinsko označenih lipidnih veziklov z ostreolizinom	15
3.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE LIPIDOV S KOLORIMETRIČNIM ENCIMSKIM TESTOM.....	16
3.3.1 Encimski test Phospholipids B	17
3.3.2 Encimski test Free Cholesterol C.....	17
3.4 ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA RESONANCA – EPR.....	18
4 REZULTATI.....	20
4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE LIPIDOV Z ENCIMSKIM TESTOM.....	20

4.2	ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA REZONANCA – EPR.....	22
4.2.1	EPR rezultati meritve veziklov, soniciranih po dodatku spinskega označevalca.....	22
4.2.2	EPR meritve veziklov pri različnih temperaturah	22
4.2.3	EPR meritve veziklov z različnimi molskimi deleži holesterola	31
4.2.4	EPR meritve lipidnih veziklov z dodatkom ostreolizina	38
4.2.5	EPR meritve veziklov iz sfingomielina, holesterola in POPC.....	38
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	46
5.1	RAZPRAVA	46
5.2	SKLEPI.....	50
6	POVZETEK.....	51
7	VIRI	52

ZAHVALA

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Membrana kot model tekočega mozaika.....	3
Slika 2: Sfingomielin.....	4
Slika 3: Holesterol.....	4
Slika 4: Lipidni dvosloj.....	5
Slika 5: Spinski označevalec MeFASL.....	9
Slika 6: Eksperimentalni EPR spektri veziklov SM : CH v molskem razmerju 50 : 50. Spektri posneti v temperaturnem razponu od 277 K do 312 K, spinski označevalec je MeFASL (10,3).....	23
Slika 7: Eksperimentalni EPR spektri veziklov SM : CH v molskem razmerju 50 : 50. Spektri posneti v temperaturnem razponu od 277 K do 312 K, spinski označevalec je MeFASL (2,11).....	23
Slika 8: Urejenost membrane podana z maksimalnim hiperfinim razcepom ($2A_{\max}$) v odvisnosti od temperature.....	25
Slika 9: Reprezentativni EPR spekter veziklov iz SM in CH.....	26
Slika 10: Grafični prikaz temperaturne odvisnosti ureditvenega parametra ter deleža domen pri veziklih iz SM in CH v molskem razmerju 50 : 50.....	27
Slika 11: GHOST diagrami pri vzorcih iz SM in CH v molskem razmerju 50 : 50, temperaturna odvisnost. Spinski označevalec MeFASL (10,3).....	28
Slika 12: GHOST diagrami pri vzorcih iz SM in CH v molskem razmerju 50 : 50, temperaturna odvisnost. Spinski označevalec MeFASL (2,11).....	29
Slika 13: GHOST diagrami pri vzorcih iz SM in CH v molskem razmerju 90 : 10, temperaturna odvisnost. Spinski označevalec MeFASL (10,3).....	30
Slika 14: Eksperimentalni EPR spektri veziklov iz SM in CH pri različnih molskih deležih holesterola, MeFASL (10, 3), 297 K.....	32
Slika 15: Eksperimentalni EPR spektri veziklov iz SM in CH pri različnih molskih deležih holesterola, MeFASL (10,3), 307 K.....	32
Slika 16: Hiperfina razcep ($2A_{\max}$) v odvisnosti od molskega deleža CH v veziklih iz SM in CH, MeFASL(10,3), 297 K.....	33
Slika 17: GHOST diagrami pri vzorcih iz SM in CH pri različnih molskih razmerjih, MeFASL (10,3), 297 K.....	34
Slika 18: GHOST diagrami pri vzorcih iz SM in CH pri različnih molskih razmerjih, MeFASL (2,11), 297 K.....	36

Slika 19	Deleži membranskih domen v veziklih iz SM in CH pri različnih molskih razmerjih.....	37
Slika 20:	EPR spektri v vzorcu veziklov iz SM, CH in POPC pri različnih molskih razmerjih.....	39
Slika 21:	Urejenost membrane veziklov podana z maksimalnim hiperfinim razcepom ($2A_{\max}$) v odvisnosti od temperature, vezikli iz SM, CH in POPC pri različnih molskih razmerjih, MeFASL (10,3).....	40
Slika 22:	Vpliv temperature na molski delež (d) membranskih domen v veziklih iz SM, CH in POPC pri različnih molskih razmerjih	42
Slika 23:	GHOST diagrami EPR spektrov, vezikli iz SM, CH in POPC pri različnih molskih razmerjih in pri 297 K.....	43
Slika 24:	Odvisnost deleža domen pri veziklih iz SM, CH in POPC pri različnih molskih razmerjih, 297 K.....	44
Slika 25:	Ureditveni parameter domen pri veziklih iz SM, CH In POPC pri različnih molskih razmerjih in pri 297 K.....	45

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Molska razmerja (deleži) lipidov v pripravljenih veziklih.....	16
Preglednica 2: Parametri meritev EPR.....	18
Preglednica 3: Izmerjeno molsko razmerje oz. deleži in izmerjena koncentracija veziklov, sestavljenih iz različnih lipidov	21
Preglednica 4: Deleži domen ter ureditveni parameter S pri različnih temperaturah, vzorci iz SM in CH v molskem razmerju 50 : 50, MeFASL (2,11) in MeFASL (10,3).	30
Preglednica 5: Deleži domen ter ureditveni parameter S pri različnih temperaturah, vzorci iz SM in CH v molskem razmerju 90 : 10, MeFASL (10,3).....	31
Preglednica 6: Deleži domen ter ureditveni parameter S pri različnih molskih deležih CH, vzorci iz SM in CH, MeFASL (2,11) in MeFASL (10,3) pri 297 K.....	38

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CH	holesterol
D1	najbolj urejena domena
D2	srednje urejena domena
D3	najmanj urejena domena
DRM	membrane, odporne na detergente (ang. Detergent Resistant Membranes)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
GPI	glikozil fosfatidilinozitol
GSL	glikosfingolipidi
l_d	tekoča neurejena faza (ang. Liquid Disordered Phase)
l_o	tekoča urejena faza (ang. Liquid Ordered Phase)
MLV	multilamelarni vezikli (ang. Multilamellar Vesicles)
Oly	ostreolizin
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
PC	fosfatidilholin
rpm	obrati na minuto (ang. Rounds Per Minute)
s_o	urejena trdna faza (ang. Solid Ordered Phase)
SM	sfingomielin
SUV	majhni unilamelarni vezikli (ang. Small Unilamellar Vesicles)
T_m	temperatura prehoda

1 UVOD

Biološke membrane sestavljajo lipidi in proteini, ki se z lateralno difuzijo gibljejo v ravnini membrane in si jih predstavljamo kot mozaik mikrodomen. Le-te se med seboj razlikujejo v fizikalnih lastnostih in sami sestavi. Domene, bogate s sfingomielinom (SM) in holesterolom (CH), imenujemo lipidni rafti. Takšna področja tesno urejenih in med seboj pakiranih lipidov, ki plavajo v bolj fluidnem matriksu, imenujemo tekoča urejena faza (l_o). Matriks predstavlja tekočo neurejeno fazo (l_d).

Lipidi v membranah se urejajo v različne faze z naraščajočo urejenostjo: tekoča neurejena faza (liquid disordered – l_d), tekoča urejena (liquid ordered – l_o) in gel faza (solid – s_o). Acilne verige v l_o fazi (v lipidnih raftih) so iztegnjene in tesno urejene, podobno kot v gel fazi s_o , le da je tu lateralna difuzija še vedno omogočena. Zanimanje za biološke membranske mikrodomene, kakršni so lipidni rafti, je zaradi njihovih funkcionalnih vlog v temeljnih celičnih bioloških procesih, kot so transdukcija signalov, razvrščanje lipidov in proteinov, membranski transport ter endo- in eksocitoza, v zadnjih desetletjih veliko. Rafti predstavljajo tudi mesta za vstop in izstop virusov, bakterij, znotrajceličnih parazitov in določenih ligandov. Zadnje čase vse bolj odkrivajo strukturne mikroheterogenosti tudi znotraj samih raftov – različno urejanje molekul SM in CH, ki se lahko združujejo v skupke.

Eden od proteinov, ki ima veliko afiniteto do lipidnih mikrodomen, bogatih s sfingomielinom (SM) in holesterolom (CH), se na njih veže in tvori pore v membrani evkariontskih celic in v lipidnih veziklih, je ostreolizin (Oly). Oly je citolitični protein iz užitne gobe bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*), ki se sintetizira v času razvoja primordijev in plodišč. Uvrščamo ga v egerolizinsko proteinsko družino, ki jo opredeljuje podobna primarna struktura, termolabilnost, molekulska masa okoli 15 kDa in nizka izoelektrična točka. Domnevajo, da imajo proteini te družine kot celični signalizatorji pomembno vlogo v začetni fazi razvoja plodišč, agregaciji hif in apoptozi.

Dosedanje raziskave kažejo, da izmed citolitičnih proteinov, ki se vežejo na lipidne rafte, le ostreolizin za vezavo in litično aktivnost potrebuje obe komponenti lipidnih raftov, CH in SM oz. drugi nasičen glicerofosfolipid, npr. dipalmitoil fosfatidilholin (DPPC). V slednjem primeru sta tako vezava kot litična aktivnost bistveno manjši (Sepčić in sod., 2004). Ostali proteini, ki se vežejo na rafte, reagirajo s posameznim lipidom (SM, CH), ali na kakšno drugo molekulo, ki se nahaja v raftih. V veziklih iz SM in CH je aktivnost Oly (vezava in permeabilizacija) opazna samo, če je delež CH večji od 30 mol % (Sepčić in sod., 2004). To sovпада s tvorbo l_o faze lipidne mešanice iz SM in CH, kar je razvidno iz faznega diagrama. Tudi ostale raziskave (Rebolj in sod., 2006) so pokazale, da membranska aktivnost Oly v veliki meri, vendar ne popolnoma, sovпада s sposobnostjo membranskih lipidov, da tvorijo l_o fazo. Zato bi Oly lahko bil uporaben kot marker za tovrstne s holesterolom bogate membranske domene. Dosedanje ugotovitve navajajo tudi, da se membranska aktivnost Oly na veziklih iz SM in CH ob dodatku mononasičenega lipida palmitoil-oleoil-fosfatidilholina (POPC) izniči. POPC je membranski lipid značilen za fluidno domeno .

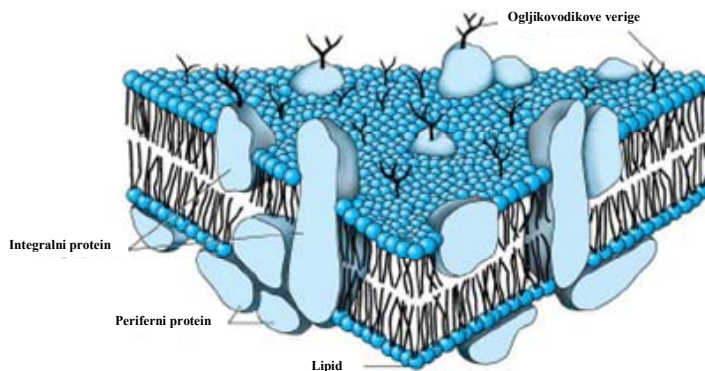
Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, kako domenska struktura membran veziklov iz SM in CH (v različnih razmerjih) sovпада z membransko aktivnostjo Oly. Poslužili smo se metode elektronske paramagnetne resonance (EPR), ki se je že predhodno izkazala kot ustrezna tehnika za proučevanje in detekcijo tudi najmanjših heterogenih domenskih struktur lipidnih membran. Za proučevanje lipidnega dvosloja smo uporabili dva različna spinsko označena metilna estra palmitinske kisline (MeFASL (10,3) in MeFASL (2,11)).

Paralelno je potekala raziskava Katje Ote, ki je na isti način analizirala vezikle iz SM in različnih naravnih in sintetskih steroidov. Diplomski deli sta tudi nadgradnja diplomskih del Katje Dolgan Rebolj in Biserke Bakrač, pri katerih je bil uporabljen le spinski označevalec MeFASL (10,3).

2 PREGLED OBJAV

2.1 LIPIDNI RAFTI

Biološka membrana je dinamična, heterogena struktura, sestavljena iz lipidov in proteinov z ali brez vezanih oligosaharidov. Lipidi so organizirani v lipidni dvosloj in se z lateralno difuzijo premikajo v ravnini membrane, kot opisuje model tekočega mozaika (slika 1) (Edidin, 2003). Membrane si danes predstavljamo po modelu mikrodomen, področij z različnimi fizikalnimi karakteristikami ter s sestavo komponent (Lichtenberg in sod., 2005). Domene, bogate s sfingomielinom (SM) (slika 2) in holesterolom (CH) (slika 3), imenujemo lipidni rafti. Poleg že navedenih komponent pa kot sestavni del raftov najdemo tudi glikosfingolipide (GSL), na glikofosfatidilinozotol (GPI) vezane proteine ter redke transmembranske proteine (Edidin, 2003).

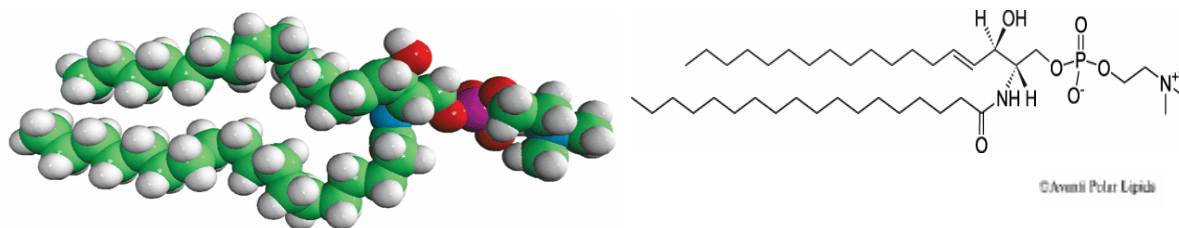


© 2003 by The McGraw-Hill Companies

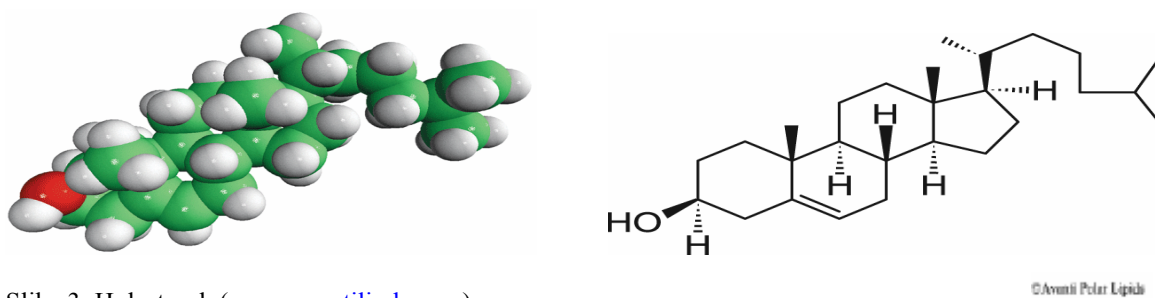
Slika 1: Membrana kot model tekočega mozaika s sestavnimi komponentami (Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition, Murray, 2003: 421)

Količini CH in SM v membrani sta soodvisni, saj se lipida prednostno vežeta. Tako sprememba koncentracije enega od njiju povzroči spremembo drugega, razlogi za takšno povezanost pa še niso pojasnjeni (Lichtenberg in sod., 2005). Z razliko od CH, ki je prisoten v obeh slojih lipidnega dvosloja, je pojavnost SM asimetrična in prevladuje v

zunanjem sloju. Za nastanek raftov na citoplazemski strani je torej potrebna sklopljenost z zunanjim slojem (Pike, 2004).

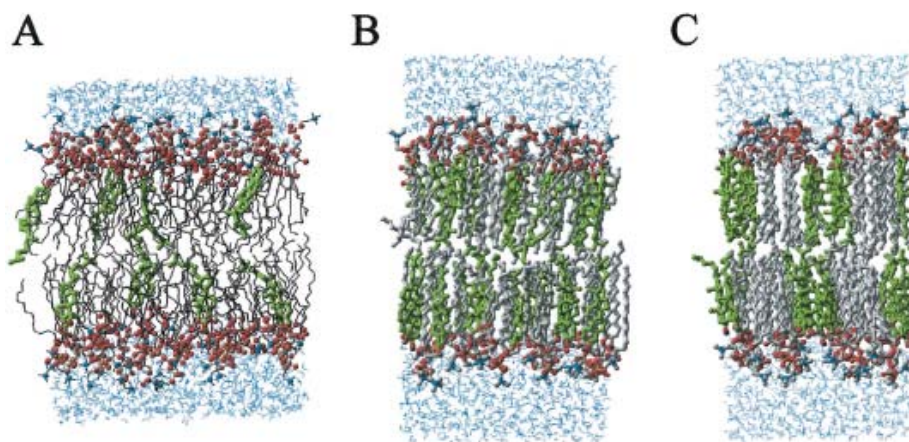


Slika 2: Sfingomielin; (2S,3R,4E)-2-acilaminooktadeka-4-ene-3-hidroksi -1-fosfoholin oz. ceramid-1-fosfoholin. (www.avantilipds.com)



Slika 3: Holesterol (www.avantilipds.com)

Sfingolipidi, pomembna komponenta lipidnih raftov, ima dolge, nasičene acilne verige ter fosfoholinsko glavo. Sterolni obroč se tako v celotni dolžini združuje s popolnoma nasičenimi verigami SM (Pike, 2004). Zelo verjetno se ta povezava še dodatno okrepi s tvorbo vodikove vezi 3-hidroksilne skupine CH in ceramidom SM (Lichtenberg in sod., 2005, Simons in Ikonen, 2000). Prav to združevanje je glavni vzrok za tvorbo lipidnih raftov, ki verjetno vodi tudi do fazne separacije v membrani (slika 4). Lastnost SM in CH je tudi kondenzirajoči učinek. Ob nanosu SM in CH na površino vode je področje lipidne mešanice manjše kot pa vsota površin, ki jih zasede vsak posamezni lipid (Lichtenberg in sod., 2005).



Slika 4: Lipidni dvosloj z 11 mol % CH (A), lipidni dvosloj s 50 % mol CH (B in C). **Smondirev A. M., Berkowitz M., L.,** (1999): Structure of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations: Molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* 77: 2075-2089.

V membrani se lipidi urejajo v različne faze z naraščajočo urejenostjo: tekoča neurejena faza (liquid disordered – l_d), tekoča urejena (liquid ordered – l_o) in trdna urejena (gel) faza (solid ordered – s_o). Zadnja je bogata s sfingolipidi z visoko temperaturo faznega prehoda (T_m). Pod temperaturo T_m je difuzija lipidnih molekul počasna. Dodatek holesterola lipidni mešanici zabriše ostre termalne prehode med s_o fazo in l_d fazo. Tako se pojavi nova, tekoča urejena faza (l_o), kjer so lipidi tesno pakirani med seboj v urejena področja (kot v s_o fazi), hkrati pa imajo hitro laterarno difuzijo, kar je značilno za tekočo neurejeno fazo (London, 2002).

Narejene so bile tudi nekatere raziskave ternarnih mešanic različnih membranskih lipidov, npr. lipida z nizko temperaturo faznega prehoda (fosfatidilholin (PC) z nenasičenimi acilnimi verigami), lipida z visoko temperaturo faznega prehoda (nasičen PC ali sfingolipid) in CH (De Almeida in sod., 2003). Palmitoiloleoilfosfatidilholin (POPC) je mononasičen lipid. V mešanici SM, CH in POPC prevladuje v fluidni domeni. Dvojna *cis* vez POPC ovira skladnost molekul, ki se ne morejo povezati v tesno urejeno strukturo (London in Brown, 2000).

Zavedati se moramo razlik med pojmi, kot so lipidni rafti, na detergent odporne membrane (DRM) in l_o faza. Imena le-teh se nanašajo na različne kemijsko-biološke entitete.

- DRM so rezultat nepopolne topnosti membrane v detergentih. Obstajajo izključno po tretiranju z detergenti in se lahko v sami membranski sestavi razlikujejo od membranskih struktur pred tretiranjem. Odpornost je verjetno posledica termodinamskih ali kinetičnih faktorjev (Lichtenberg in sod., 2005).
- Tekoča urejena domena (l_o) se tvori v lipidnih membranah kot rezultat prisotnosti večje količine sterolov v okolici, ki povečujejo urejenost membran, ne da bi pri tem vplivali na lateralno difuzijo lipidov ter nanje vezanih proteinov. Dokazano je, da so l_o domene bolj rezistentne na raztapljanje v detergentih kot pa l_d domene (Lichtenberg in sod., 2005).
- Rafti so definirani kot prehodne membranske mikrodomene *in vivo*, sestavljene iz SM in CH. Predvidevamo, da rafti predstavljajo l_o fazo. Njihov obstoj je neodvisen od prisotnosti detergentov (Lichtenberg in sod., 2005). Nekatere l_o domene so odporne na vpliv detergenta in so netopne v mrzlem neionskem detergentu Triton X-100, zato jim pravimo tudi na detergent odporne membrane (DRM). Izolacija DRM je najbolj razširjena metoda za proučevanje lipidnih raftov (Simons in Ikonen, 1997). Rafti so večinoma majhni (15 do 30 molekul SM in CH) in nestabilni – njihov življenjski čas je krajši od 1 ms, a predstavljajo veliko površino membrane. Z zunajceličnimi signali ter s pridružitvijo GPI-receptorjev dobimo stabilne receptorske rafte z življenjskim časom, ki je daljši od 1 min. Ti inducirajo tvorbo signalnih raftov z življenjsko dobo pod 1 s. Rafti so dinamična tvorba, tako kot nastajajo in rastejo tudi izginjajo. Lipidni rafti v vseh organizmih in tkivih niso primerljivi. Imajo vrsto funkcij kot celično signaliziranje, transport skozi membrano, vstopanje intracelularnih parazitov, potrebni so v procesu signalne transdukcije, ker združijo receptorje z efektorji sekundarnih sporočevalcev (Subczynski in Kusumi, 2003). Membrane intracelularnih organelov, npr. Golgijevega aparata in endoplazmatskega retikuluma, prav tako tvorijo rafte.

2.2 OSTREOLIZIN (OLY)

Ostreolizin je citolitični protein užitne gobe bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*). Sintetizira se v času razvoja primordijev in plodišč (Berne in sod., 2002). Prava biološka vloga ostreolizina še ni znana, vendar domnevajo, da sodeluje pri diferenciaciji hif, bazidijev in bazidiospor. Domneva se, da je njegova vloga v regulatornih procesih, verjetno pa nima vloge toksina (Berne in sod., 2005). Spada v družino egerolizinov, katerih skupne lastnosti so: molekulska masa okoli 15 kDa, podobna primarna struktura, nizka izoelektrična točka, termolabilnost in hemolitična aktivnost pri nanomolarnih koncentracijah (Sepčić in sod., 2003). V to družino uvrščamo tudi Asp-hemolizin patogene plesni *Aspergillus fumigatus* (Ebina in sod., 1994), izoformno obliko ostreolizina pleurolizina A (Ply A) gobe *Pleurotus ostreatus* (Sakurai in sod., 2004) in dva hemolizinu podobna proteina bakterije *Clostridium bifermentans* – Cbm 17.1 in Cbm 17.2 (Barloy, F. in sod., 1998). Pomembni lastnosti proteinov egerolizinske družine sta interakcija z lipidi in tvorba por v membranah celic in umetnih lipidnih veziklov. Ostreolizin v membranah eritrocitov tvori pore velikosti 4 nm (Sepčić in sod., 2003). V enaki meri lizira ovčje, goveje ter človeške eritrocite že v nanomolarnih koncentracijah (Žužek in sod., 2006). Ostreolizin se specifično veže na mikrodomene v membrani, obogatene s sfingolipidi in holesterolom. Najdemo ga v membranski frakciji, odporni na ekstrakcijo z mrzlim detergentom Triton X-100 (DRM-frakcija) umetnih lipidnih veziklov in sesalskih celic. Njegova hemolitična aktivnost upade ob dodatku čistih lizofosfolipidov v koncentracijah, ko le-ti sami niso hemolitični. Dosedanje raziskave permeabilizacijske aktivnosti ostreolizina s sproščanjem kalceina iz soniciranih binarnih in ternarnih veziklov, sestavljenih iz holesterola in fosfolipidov, so pokazale, da se hitrost in odstotek sproščanja kalceina povečujeta s povečevanjem razmerja CH – SM v membrani nad 30 molskih % CH (Sepčić in sod., 2003, 2004). Ostreolizin za vezavo in litično aktivnost potrebuje obe komponenti lipidnih raftov, holesterol in sfingomielin oz. drugi nasičen glicerofosfolipid, npr. dipalmitoil fosfatidilholin (DPPC), vendar sta v zadnjem primeru tako vezava kot litična aktivnost bistveno manjši, kar dodatno nakazuje na ključno vlogo SM (Sepčić in sod., 2004). Tudi raziskave vezave ostreolizina z merjenjem površinske plazmonske resonance so pokazale primerljive rezultate, kar je dodaten dokaz, da je permeabilizacijski

učinek ostreolizina posledica njegovega prepoznavanja obstoječega specifičnega lipidnega kompleksa, l_o faze (Sepčić in sod., 2004, Rebolj in sod., 2006).

2.3 ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA (SPINSKA) REZONANCA

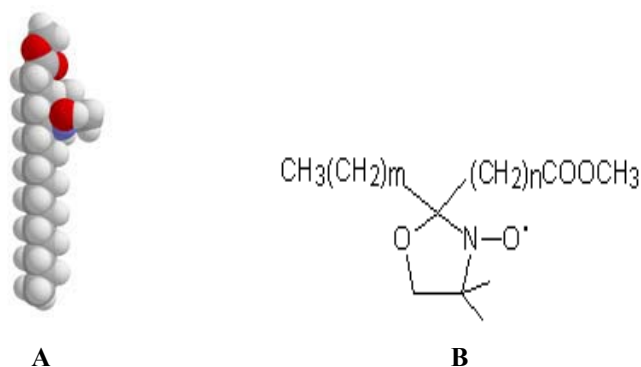
Elektronska paramagnetna resonanca (EPR) je spektroskopska metoda, s katero zaznamo in opišemo paramagnetne centre v snovi. To so snovi z nesparjenimi elektroni, npr. prosti radikali, ioni prehodnih elementov in spinski označevalci (nitroksidni radikal). Elektronsko paramagnetno resonanco imenujemo tudi elektronska spinska resonanca (ESR). Pri tej metodi je pomemben spin elektrona S , ki karakterizira vrtenje elektrona okoli svoje osi. Elektron v svoji okolici ustvarja magnetno polje in ima magnetni moment (μ), njegova smer pa je določena s smerjo vrtenja elektrona. Spin elektrona je $S = 1/2$, pri čemer ločimo projekciji spina $+1/2$ in $-1/2$. Dva elektrona, ki se med seboj razlikujeta samo po smeri vrtenja okoli svoje osi, tvorita elektronski par, magnetna momenta v takem paru sta nasprotno usmerjena in se uničita. Snovi, ki nimajo magnetnih momentov, so diamagnetne snovi.

V magnetnem polju se magnetni momenti nesparjenih elektronov usmerijo v smeri ali nasproti zunanemu magnetnemu polju (B) in imajo zato različno energijo (Zeemanov efekt). Nadalje lahko pride do hiperfinega razcepa, če obstaja interakcija magnetnega momenta elektrona z magnetnim momentom jedra paramagnetnega centra (npr. dušik v primeru nitroksidnega spinskega označevalca). Vsak energijski nivo se razcepi na $2I+1$ podskupin.

Ko na paramagnetne centre v magnetnem polju usmerimo elektromagnetno valovanje z energijo, ki je enaka energijski razliki med omenjenima razcepljenima energijskima nivojema (izpolnjen je resonančni pogoj), preidejo elektroni z enega energijskega nivoja na drugega. Posledica tega pojava je absorbcija elektromagnetnega valovanja, ki jo zaznamo z EPR spektrom (Šentjursc in Štalc, 1976). Pri meritvah je frekvenca elektromagnetnega valovanja konstantna (približno 9,6 GHz). Za dosego resonance oz. absorbcije

spreminjamo jakost magnetnega polja. Spekter, ki ga dobimo kot rezultat EPR meritve, je prvi odvod absorpcijske krivulje.

Za preučevanje lipidnih membran moramo uporabiti spinske označevalce, ki so podobni gradnikom membran in se lahko vključijo v membranski dvosloj. V meritvah smo uporabili MeFASL (10,3) in MeFASL (2,11), oba metilna estera palmitinske kisline. Prvi ima doksilni obroč z nitroksidno skupino vezan na alkilno verigo na petem C atomu od metilne skupine ter tako odraža gibanje lipidov v tem predelu membrane, torej bolj na njeni površini; drugi spinski označevalec pa na trinajstem C atomu od metilne skupine. Ta glede na mesto nitroksidne skupine odraža gibanje v notranjosti membrane (slika 5).



Slika 5: Spinski označevalec MeFASL (Prirejeno po Štrancar, 2000: 27)

A: Tridimenzionalna struktura označevalca. Barve pomenijo naslednje atome: bela – vodik, siva – ogljik, rdeča – kisik, modra – dušik)

B: Strukturna formula označevalca: $m = 10$, $n = 3$ v primeru MeFASL (10,3) ter $m = 2$, $n = 11$ v primeru MeFASL (2,11)

Oblika EPR spektra odraža fizikalne značilnosti okolice spinskega označevalca, posreduje nam informacije o številu in različnih tipih membranskih domen, njihovi fluidnosti in deležu v membranah. Membranske domene predstavljajo skupino molekul s podobno urejenostjo in dinamiko ne glede na lokacijo v membrani. Delež posamezne domene (d), ki ga določimo z EPR, je odvisen od razporejenosti spinskega označevalca in ustreza dejanskemu deležu domen, če predpostavimo, da se spinski označevalec enakomerno porazdeli na vse domene. V EPR spektrometriji termin fluidnost opisuje svobodo gibanja

spinskega označevalca znotraj membranskih domen, ki jo karakterizira ureditveni parameter (S), rotacijski korelacijski čas (τ_c) in kot ϕ . Ureditveni parameter pomeni povprečni odklon acilne verige spinskega označevalca od pravokotnice na ravnino membrane (Šentjerc in sod., 2002). Za popolnoma urejene kristale je parameter urejenosti 1, za izotropne (hitro gibljive tekočine) pa 0. Rotacijski korelacijski čas opisuje rotacijsko gibanje nitroksidne skupine spinskega označevalca v domeni (Curtain in Gordon, 1984). Parameter ϕ je komponenta ureditvenega parametra, ki ponazarja oviranost vrtenja okoli normale na ravnino membrane. Njegova nizka vrednost pomeni močno ovirano rotacijo, visoka vrednost pa izotropno gibanje okoli normale na ravnino. Omenjeni parametri (S , τ_c , ϕ , delež in drugi) se določijo z računalniško simulacijo eksperimentalnega EPR spektra, pri čemer izberemo najboljši približek (fit) eksperimentalnemu spektru. Druga parametra sta še: širina črte (W) in polarizacijski korekcijski faktor (p_A). Širina črte vključuje nehomogenost zunanjega magnetnega polja, interakcije med posameznimi spinskimi označevalci in prispevek ostalih paramagnetnih nečistoč. Polarizacijski korekcijski faktor upošteva vpliv polarnosti okolja, v katerem je spinski označevalec. Večji p_A pomeni, da se spinski označevalec nahaja v bolj polarnem okolju, v katerem je malce spremenjena njegova elektronska struktura. Računalniška simulacija nam posreduje več informacij o membranskih domenah kot ocena spektralnih parametrov neposredno iz EPR spektra. To nam omogoča natančnejšo analizo membranske heterogenosti.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

Kemikalija/oprema:	Proizvajalec:
Aceton	Merck, Nemčija
EDTA	Kemika, Hrvaška
Etanol	Merck, Nemčija
Goveji serumski albumin (BSA)	Sigma, ZDA
Sfingomielin iz svinjskih možganov	Avanti Polar Lipids, ZDA
Holesterol	Avanti Polar Lipids, ZDA
POPC (1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3- fosfoholin)	Avanti Polar Lipids, ZDA
Kloroform	Merck, Nemčija
Metanol	Merck, Nemčija

NaCl	Merck, Nemčija
Ocetna kislina	Merck, Nemčija
NaOH	Merck, Nemčija
HCl	Merck, Nemčija
Tris	Merck, Nemčija
Steklene kapilare	Euroglass, Slovenija
MeFASL (10,3)	Sintetiziran na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani
MeFASL (2,11)	Sintetiziran na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Encimski testi za določanje holesterola in fosfolipidov	Wako Chemicals, Nemčija
Mikrotitrne plošče	TPP, Švica
Epruvete	Eppendorf, Nemčija

3.1.2 Rastopine

	140 mM NaCl
Pufer za vezikle	20 mM Tris
	1 mM EDTA

pH 8,0

3.1.3 Laboratorijska oprema

Centrifuge	Biofuge 13, Heraeus Sepatech, Nemčija Centric 322A, Tehtnica, Slovenija
Čitalec mikrotitrnih plošč	MRX, Dynex Technologies, Nemčija
EPR-spektrometer	Spectrometer ELEXSYS E500, Bruker, Nemčija
Magnetno mešalo	Tehtnica MM540, Slovenija
pH meter	Mettler Toledo, Nemčija
Rotavapor	R-134 ter R-200, Büchi, Švica
Vodna kopel	B-480, Büchi, Švica
Sonikator	Vibracell Ultrasonic Disintegartor, Sonics and Materials, ZDA, Branson 2510, ZDA
Vibracijski stresalnik	Vibromix 114 EV, Tehtnica, Slovenija
Avtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija

3.2 PRIPRAVA LIPIDNIH VEZIKLOV

Lipidne vezikle smo pripravili iz lipidov z znanimi molskimi masami. Podatki so navedeni v preglednici 1.

3.2.1 Priprava velikih multilamelarnih veziklov (MLV)

Ustrezno količino lipidov, shranjenih pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo raztopili v mešanici kloroform: metanol = 2 : 1 in posušili pod znižanim tlakom v majhni bučki na rotacijski vodni vakuumski črpalki (3 ure). Dobljenemu lipidnemu filmu v bučki smo dodali 10–15 steklenih kroglic in ustrezno količino Tris pufra za vezikle (pH 8,0). Z intenzivnim stresanjem na vibracijskem stresalniku pri sobni temperaturi smo pripravili suspenzijo multilamelarnih veziklov (MLV).

3.2.2 Priprava malih unilamelarnih veziklov (SUV)

Suspenzijo multilamelarnih veziklov (MLV) smo 30 min sonicirali na ledu z 10-sekundnimi pulzi, da so nastali sonicirani unilamelarni vezikli (SUV). Tako pripravljene vezikle v Tris puftru smo dali v vodno kopel ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$) za 45 min. Po centrifugiranju (5 min, 6000 rpm, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) smo supernatant prenesli v čiste Eppendorfove epruvetke, jih prepihali s tekočim dušikom in shranili pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Količino lipidov v veziklih ter koncentracijo veziklov smo dodatno preverili s kolorimetričnim encimskim testom (točka 3.3).

Za meritve EPR smo pripravili lipidne vezikle s koncentracijo 20 mg/ml, in sicer v dveh paralelkah, da bi lažje ocenili napako meritve.

Lipidne vezikle smo na dan meritve 6–10 min sonicirali na ledu z 10-sekundnimi pulzi. Temu je sledila vodna kopel ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$) za 30 min, nato smo jih centrifugirali (5 min, 6000 rpm, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Na vodni vakuumski črpalki smo pri znižanem tlaku (13 mbar) posušili 14 μl 1 mM spinskega označevalca MeFASL (10,3) ali MeFASL (2,11), pripravljenega v etanolu (10 min). Filmu spinskega označevalca smo dodali 100 μl supernatanta veziklov, tako da je

bilo molsko razmerje med lipidi v veziklih in MeFASL približno 250 : 1. Na vibracijskem stresalniku smo mešanico krožno mešali še 10 min. Te vzorce smo dali v kapilare s premerom 1 mm in opravili meritev z EPR.

3.2.2.1 Vpliv različnih metodologij priprave spinsko označenih lipidnih veziklov na meritve EPR

Na rezultate EPR meritev lahko vplivajo različni dejavniki. Mi smo preizkusili vpliv razmerja med spinskim označevalcem in lipidi ter vpliv načina priprave veziklov (dodatek spinskega označevalca pred ali po soniciranju). Na vodni vakuumski črpalki smo pri znižanem tlaku (13 mbar) posušili 3 μ l 1 mM spinskega označevalca (molsko razmerje med dodanim lipidi in proteinom je bilo 1200 : 1) oziroma 9 μ l 1 mM spinskega označevalca MeFASL (2,11) (molsko razmerje med dodanim lipidi in proteinom je bilo 400 : 1), pripravljenega v etanolu (10 min). Filmu spinskega označevalca smo dodali 100 μ l supernatanta veziklov (20 mg/ml), ki ga predhodno nismo sonicirali. Vse skupaj smo 15 min sonicirali na vodni kopeli pri sobni temperaturi. Vzorec smo dali v kapilaro s premerom 1 mm in opravili meritev pri 277 K in pri 312 K.

3.2.2.2 Priprava spinsko označenih lipidnih veziklov z ostreolizinom

Postopek priprave vzorca je enak kot v točki 3.2.2, le da smo tu k 7 μ l 1 mM spinskega označevalca MeFASL (10,3), ki smo ga predhodno posušili na rotavaporju, dodali polovično količino (50 μ l) supernatanta veziklov (mešanica lipidov v molskem razmerju SM : CH = 50 : 50) ter 50 μ l raztopine izoliranega ostreolizina (1 mg/ml; molsko razmerje med dodanimi lipidi in proteinom je bilo 500 : 1). Za primerjavo smo prav tako naredili vzorec s 50 μ l supernatanta enakih veziklov (molsko razmerje SM : CH = 50 : 50) ter 50 μ l pufra za vezikle s polovično količino filmskega spinskega označevalca MeFASL (10,3) (koncentracija lipidov je bila 10 mg/ml).

Preglednica 1: Molski deleži lipidov v pripravljenih veziklih. Uporabljeni lipidi so bili: sfingomielin (SM) ($M = 731,03\text{g/mol}$), holesterol (CH) ($M = 386,09\text{g/mol}$) in palmitoil-oleoil-fosfatidilholin (POPC) ($M = 760,09\text{g/mol}$)

Vezikli	Razmerje lipidov [mol : mol]
SM : CH	1 : 0
SM : CH	9 : 1
SM : CH	8 : 2
SM : CH	7 : 3
SM : CH	6 : 4
SM : CH	5 : 5 (1 : 1)
SM : CH	4 : 6
SM : CH : POPC	1 : 1 : 0.5
SM : CH : POPC	1 : 1 : 1

3.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE LIPIDOV S KOLORIMETRIČNIM ENCIMSKIM TESTOM

Koncentracijo lipidov v veziklih smo določali z encimskima testoma Phospholipids B (prisotnost holinskih lipidov) in Free Cholesterol C (prisotnost holesterola) v skladu z navodili proizvajalca (Wako Chemicals GmbH, Nemčija).

Suspenzijo veziklov smo 5–10 min sonicirali na ledu z 10-sekundnimi pulzi, jih dali na vodno kopel (30 min, 45 °C) in jih nato centrifugirali (5 min, 6000 rpm, 25 °C).

3.3.1 Encimski test Phospholipids B

V primeru encimskega testa Phospholipids B smo zmešali 10 μ l našega vzorca ali pufra za vezikle (slepi poskus) ali standarda (3 mg/ml holin klorid) in 300 μ l pripravljene encimske raztopine (ki vsebuje fosfolipazo D, holin oksidazo, peroksidazo v Tris puftru, fenol in 4-aminoantipirin) s koncentracijo 1 mg/ml in inkubirali 30 min pri 37 °C. V času inkubacije fosfolipaza D hidrolizira fosfolipide do prostega holina. Sproščeni holin se s pomočjo holin oksidaze oksidira v betain, pri tem nastane vodikov peroksid. Le-ta združi 4-aminoantipirin in fenol, rezultat se kaže v razvoju rdeče barve. Po inkubaciji smo izmerili absorbcijo (A) rdeče barve pri valovni dolžini 550 nm in izračunali koncentracijo lipidov po formuli:

$$\text{Koncentracija holinskih lipidov} = (3 \text{ mg/ml} \times (A_{\text{vzorec}} - A_{\text{slepa}})) / (A_{\text{standard}} - A_{\text{slepa}}) \quad \dots(1)$$

A_{vzorec} pomeni absorbcijo vzorca, A_{standard} absorbcijo standarda in A_{slepa} absorbcijo pufra za vezikle (slepi poskus).

3.3.2 Encimski test Free Cholesterol C

Princip izvedbe testa Free Cholesterol C je enak kot v točki 3.3.1. Razlika je le v standardu (1 mg/ml holesterol) ter v sestavi pripravljene encimske raztopine (holesterol-oksidaža, peroksidaža v Tris puftru, fenol in 4-aminoantipirin). V času inkubacije se prosti holesterol s holesterol oksidazo oksidira do holestenona, pri tem se sprosti vodikov peroksid, ki povzroči kondenzacijo fenola in 4-aminopirina ob prisotnosti peroksidaže. Tudi tu se razvije rdeča barva. Po inkubaciji smo izmerili absorbcijo (A) le-te pri 550 nm in izračunali koncentracijo lipidov po formuli:

$$\text{Koncentracija holesterolnih lipidov} = (1 \text{ mg/ml} \times (A_{\text{vzorec}} - A_{\text{slepa}})) / (A_{\text{standard}} - A_{\text{slepa}}) \quad \dots(2)$$

Iz koncentracije holina in holesterola v vzorcu veziklov smo izračunali molsko razmerje lipidov v veziklih, ter končno koncentracijo lipidnih veziklov.

3.4 ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA REZONANCA – EPR

Meritve smo opravili na EPR-spektrometru ELEXSYS E500 (Bruker, Nemčija) na Inštitutu Jožef Štefan, v laboratoriju za biofiziko. Meritve smo opravili v temperaturnem razponu od 277 K do 312 K (4 °C do 39 °C), v intervalih 5 K in za vsak posamezen vzorec. Po posamezni meritvi smo iz spektrov neposredno odčitali maksimalni hiperfinski razcep ($2A_{\max}$). Za interpretacijo rezultatov smo uporabili le prvo serijo vzorcev. Pri tem smo upoštevali, da sta seriji med seboj primerljivi. To smo potrdili s primerjavo dobljenih spektrov.

Preglednica 2: Parametri meritev EPR

Ojačanje (receiver gain)	MeFASL (10,3) 55 dB, MeFASL (2,11) 57 dB
Konverzijski čas (conversion time)	20,48 ms
Čas snemanja (sweep time)	20,97
Časovna konstanta (time constant)	5,12 ms
Centralno magnetno polje (center field)	3320 Gauss
Območje meritve (sweep width)	100 Gauss
Mikrovalovna moč	10 mW
Število snemanj za 1 spekter	MeFASL (10,3) = 7 x, MeFASL (2,11) = 5 x

Za natančnejšo analizo eksperimentalnih spektrov smo le-te simulirali z računalniškim programom EPRSIM WIZ 6.2.2 (© Janez Štrancar), programskim paketom za simulacijo EPR spektrov nitroksidnih radikalov.

Simulacija poteka tako, da EPRSIM uporabi 5 spektralnih parametrov: ureditveni parameter (S), parameter ϕ , rotacijski korelacijski čas (τ_c), širino črte (W) in korekcijski

faktor polarnosti (p_A), ki določajo obliko EPR spektra in izračuna obliko spektra, ki se najbolje prilega eksperimentalnemu spektru. Pri tem upošteva, da je spekter sestavljen iz več spektralnih komponent, ki so posledica različnih načinov gibanja spinskega označevalca v različnem okolju membrane. Vsaka spektralna komponenta predstavlja vrsto domen z določeno ureditvijo in dinamiko ter je opisana z različnim nizom petih spektralnih parametrov. S tem programom se za vsak EPR spekter naredi 200 simulacij, ki določajo najboljši približek eksperimentalnemu EPR spektru. Tako dobimo 200 rešitev (200 teoretičnih EPR spektrov). Z GHOST kondenzacijsko metodo (program GHOSTmaker 3.5.1) parametre najboljših približkov računalnik predstavi v štirih 2-dimenzionalnih diagramih ($S-\varphi$, $S-w$, $S-p_A$, $S-\tau_c$), pri čemer so ostali trije parametri v vsakem diagramu določeni z značilno barvo in intenziteto barv. V GHOST diagramih so različni rezultati računalniške simulacije združeni v skupino rešitev, kjer vsaka predstavlja obliko gibanja spinskega označevalca v membrani (Koklič in sod., 2005). Ti diagrami nam dajo informacije o številu domen, tipu domene, dinamiki gibanja in urejenosti znotraj domene ter polarnosti okolice spinskega označevalca. Rezultate smo obdelali tako v celotnem temperaturnem območju meritve kot tudi v odvisnosti od koncentracije holesterola.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE LIPIDOV Z ENCIMSKIM TESTOM

Čeprav smo nameravali pripraviti lipidne vezikle s koncentracijo 20 mg/ml, smo z encimskim testom prišli do dejstva, da so bile koncentracije veziklov po končani pripravi manjše kot na začetku. Pred samim testom smo vzorce tudi centrifugirali, da so se kovinski delci titana, ki se v vzorcu naberejo med soniciranjem, usedli. A po centrifugiranju je bila prisotna tudi bela oborina lipidov, kar je verjeten vzrok tako nizkih končnih koncentracij. Po drugi strani so z encimskim testom izmerjena molska razmerja med lipidi v veziklih dokaj dobro ustrezala razmerjem lipidov, ki smo jih zatehtali (preglednica 3).

Preglednica 3: Izmerjena molska razmerja lipidov in izmerjena koncentracija veziklov, uporabljenih pri EPR meritvah in sestavljenih iz različnih lipidov. Molsko razmerje in koncentracijo celokupnih lipidov smo izračunali iz koncentracij holinskih in holesterolnih lipidov, izračunanih iz podatkov absorpcije.

Vezikli	Zatehtano razmerje lipidov [mol : mol]	Izmerjeno razmerje lipidov [mol : mol] 1.serija	Izmerjeno razmerje lipidov [mol : mol] 2.serija	Izmerjena koncentracija celokupnih lipidov [mg/ml] 1.serija	Izmerjena koncentracija celokupnih lipidov [mg/ml] 2.serija
SM : CH	100 : 0	100 : 0	100 : 0	3,35	3,06
SM : CH	90 : 10	88 : 12	89 : 11	1,35	1,2
SM : CH	80 : 20	78 : 22	76 : 24	1,24	1,49
SM : CH	70 : 30	70 : 30	70 : 30	2,81	2,25
SM : CH	60 : 40	54 : 46	54 : 46	3,48	3,47
SM : CH	50 : 50	45 : 55	42 : 58	3,07	3,09
SM : CH	40 : 60	33 : 67	32 : 68	2,58	3,15
SM : CH : POPC	1 : 1 : 0.5 oz. (40 : 40 : 20)	1,5 : 1 (holinski lipidi : holesterol)	1,3 : 1 (holinski lipidi : holesterol)	4,19	4,55
SM : CH : POPC	1 : 1 : 1 oz. (33 : 33 : 33)	1,8 : 1 (holinski lipidi : holesterol)	1,7 : 1 (holinski lipidi : holesterol)	4,58	4,37

4.2 ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA REZONANCA – EPR

4.2.1 EPR rezultati meritve veziklov, soniciranih po dodatku spinskega označevalca

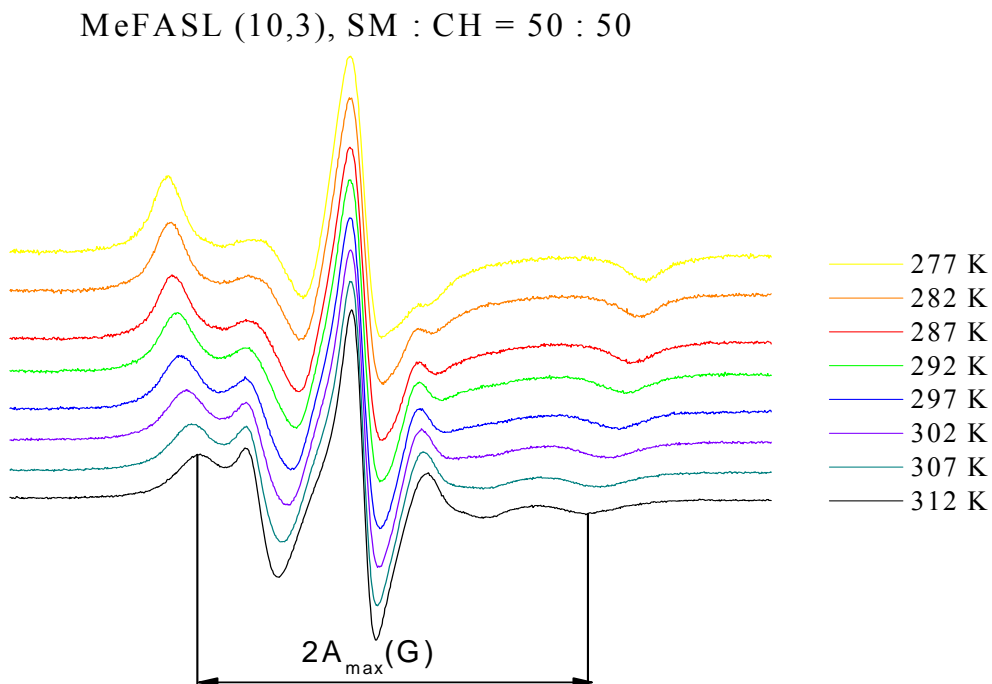
S pomočjo X-pasovnega EPR-spektrometra smo posneli eksperimentalni spekter za lipidno mešanico iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 60 : 40, ki smo ji dodali različno količino spinskega označevalca MeFASL (2,11). Lipidno mešanico smo sonicirali skupaj s spinskim označevalcem. V prvem primeru smo lipidni mešanici dodali 3 μ l 1 mM spinskega označevalca. Dobljeni eksperimentalni spekter smo kasneje primerjali z eksperimentalnim spektrom, posnetim pri enakih pogojih, le da smo vezikle sonicirali pred dodanim spinskim označevalcem. To primerjavo omogoča računalniški program EPR-spektrometer ELEXSYS E500 (Bruker, Nemčija). Oblika krivulje je identična, intenziteta spektra z dodanim 3 μ l 1 mM spinskega označevalca pa je manjša, kar je posledica tega, da smo veziklom dodali mnogo manj spinskega označevalca kot v opisanih meritvah (opisano v točkah 4.2.2 in 4.2.3), kjer smo enaki količini veziklov dodali 14 μ l spinskega označevalca.

V drugem primeru smo lipidni mešanici dodali 9 μ l 1 mM spinskega označevalca. S primerjanjem z eksperimentalnim spektrom, posnetim pri enakih pogojih, smo dobili enak rezultat kot zgoraj, le da je v tem primeru bila identična tudi velikost krivulj.

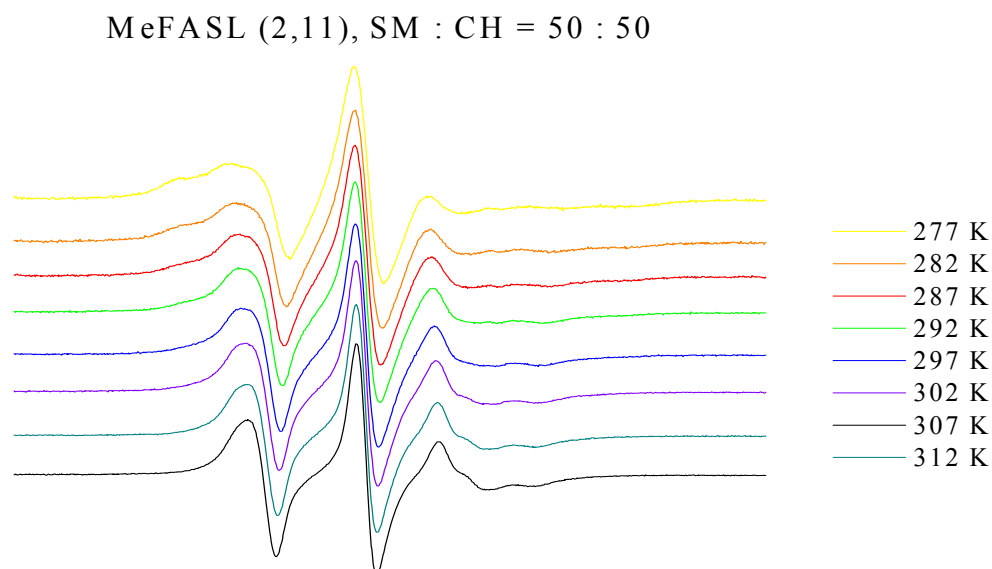
S tem poskusom smo pokazali, da sama metoda priprave spinsko označenih lipidnih veziklov (oz. dodajanje spinskega označevalca pred ali po soniciranju) na meritve EPR ne vpliva.

4.2.2 EPR meritve veziklov pri različnih temperaturah

Z X-pasovnim EPR-spektrometrom smo pri 8 temperaturah (od 277 K do 312 K, intervali 5 K) posneli EPR spektre za določeno lipidno mešanico. To je veljalo tako za vzorce z dodanim spinskim označevalcem MeFASL (10,3) kot za vzorce označene z MeFASL (2,11). Meritve smo izvajali v dveh paralelkah in dobljene rezultate primerjali. Ker so bili spektri popolnoma primerljivi, so spodaj prikazani le rezultati ene paralelke.



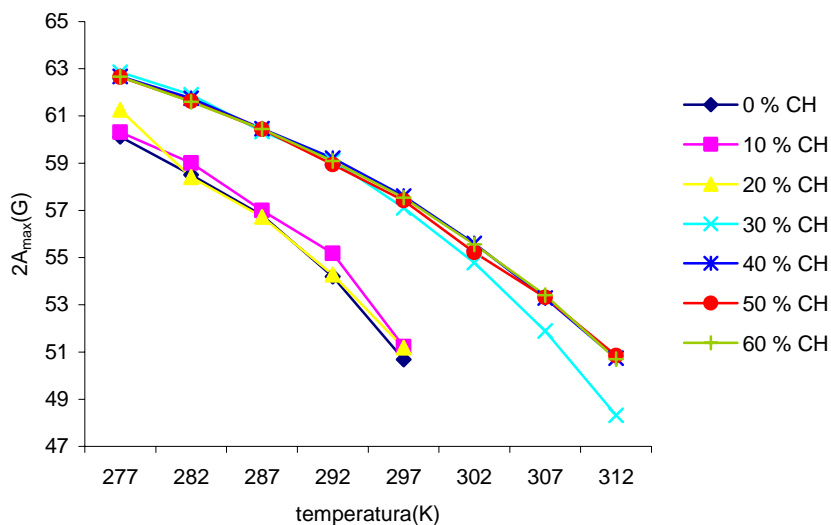
Slika 6: Eksperimentalni EPR spektri veziklov, pripravljenih iz sfingomielina (SM) in holesterola (CH) v molskem razmerju 50 : 50. Spektri so posneti v temperaturnem razponu od 277 K do 312 K. Razdalja med puščicama predstavlja maksimalni hiperfinski razcep ($2A_{\max}$). Spinski označevalec je MeFASL (10,3).



Slika 7: Eksperimentalni EPR spektri veziklov, pripravljenih iz sfingomielina (SM) in holesterola (CH) v molskem razmerju 50 : 50. Spektri so posneti v temperaturnem razponu od 277 K do 312 K. Spinski označevalec je MeFASL (2,11).

EPR spektri lipidnih veziklov označenih z MeFASL(10,3) so tipični za urejeno gibanje nitroksidne skupine spinskega označevalca, kar kaže na to, da je membrana veziklov v zgornjem delu urejena ter da se s povečevanjem temperature njena urejenost manjša (slika 6). Iz spektra smo zato lahko izmerili maksimalni hiperfinski razcep, ki poda podatke o urejenosti in dinamiki fosfolipidov v membrani. Spektri lipidnih veziklov, označenih s spinskim označevalcem MeFASL (2,11) (slika 7), pa kažejo manj urejeno gibanje spinskih označevalcev, kar nakazuje na slabše urejeno gibanje acilnih verig v sredini dvojne plasti membrane kot na površini. V tem primeru maksimalnega hiperfinega razcepa ni bilo mogoče odčitati. Zato smo v obeh primerih uporabili računalniško simulacijo EPR spektrov v celotnem temperaturnem območju, da smo lahko določili ureditveni parameter in ostale parametre.

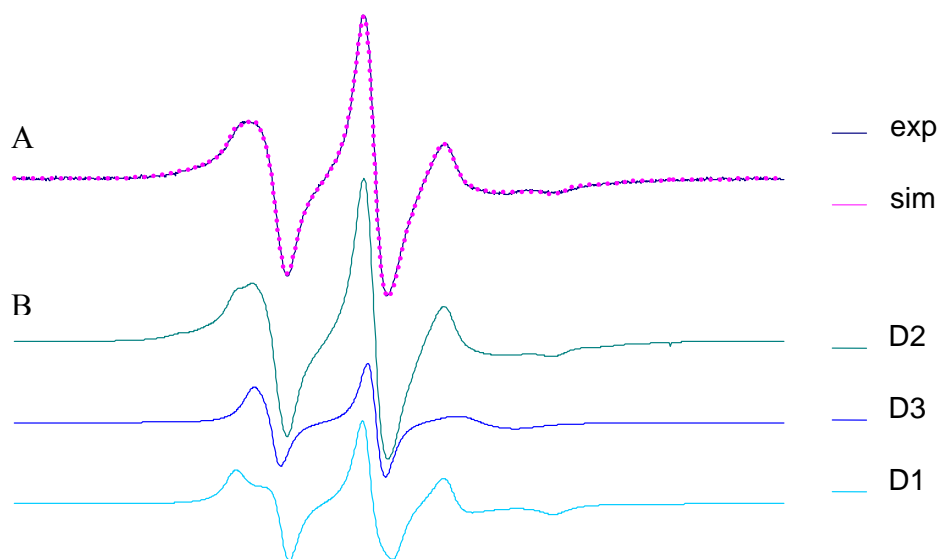
S slike 6 je razvidno, da se z naraščanjem temperature celotna oblika krivulj spreminja in da se manjša maksimalni hiperfinski razcep ($2A_{\max}$), ki je parameter za oceno urejenosti membrane. Maksimalni hiperfinski razcep ($2A_{\max}$) smo odčitali neposredno iz spektrov veziklov, ki so bili označeni z MeFASL (10,3). S temperaturo torej prihaja do sprememb, povezanih s fluidnostjo membran. Pri nižjih temperaturah so membrane manj fluidne (večji $2A_{\max}$) oz. je urejenost lipidov večja, obratno pa je pri višjih temperaturah, kjer je urejenost lipidov manjša (manjši $2A_{\max}$) (slika 8).



Slika 8: Urejenost membrane, podana z maksimalnim hiperfinim razcepom ($2A_{\max}$) v odvisnosti od temperature. Vezikli so pripravljene iz sfingomielina (SM) in holesterola (CH) v podanih molskih deležih in označeni s spinskim označevalcem MeFASL (10,3). Vsaka točka je povprečje treh meritev, kjer standardna napaka ne presega 5 %. $2A_{\max}$ = maksimalni hiperfini razcep, CH = holesterol.

Z računalniško simulacijo spektrov EPR smo ugotovili, da so EPR spektri večinoma sestavljeni iz 3 vrst domen – najbolj urejene domene D1, srednje fluidne domene D2 in najbolj fluidne domene D3 (slika 9).

Temperaturna odvisnost spremembe ureditvenega parametra in deležev domen pa je predstavljena na sliki 10.

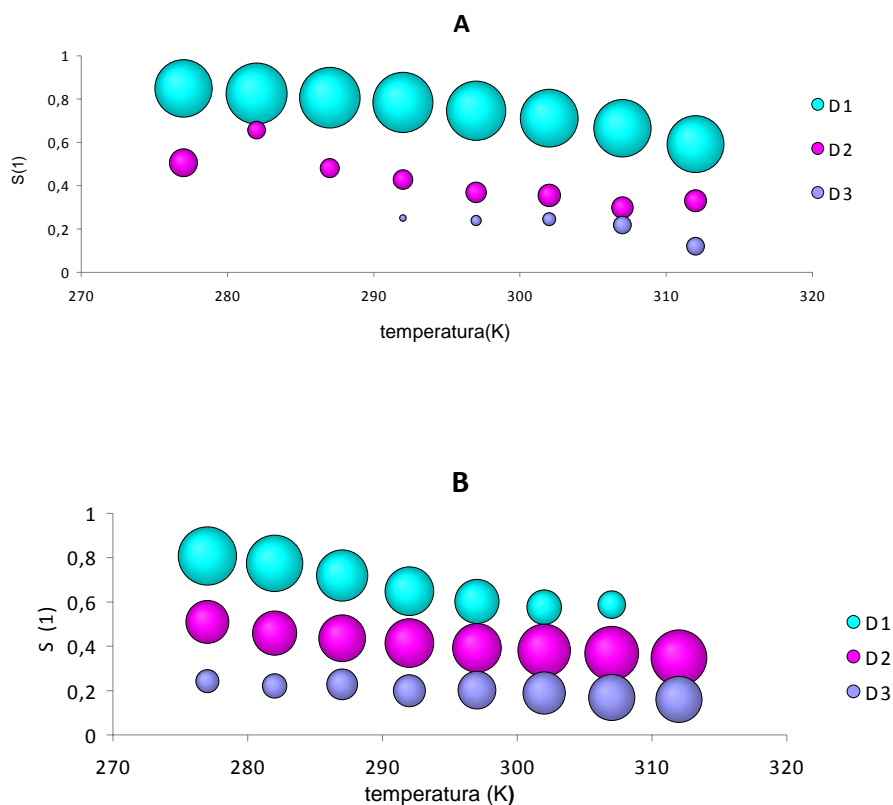


Slika 9: Reprezentativni EPR spekter veziklov iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 50 : 50 in označenih s spinskim označevalcem MeFASL (2,11). Spektri so izmerjeni pri temperaturi 297 K.

A: Eksperimentalni (exp) in izračunani spekter (sim), ki je najboljši približek eksperimentalnemu spektru EPR.

B: Izračunani spekter je seštevek treh spektralnih komponent, ki predstavljajo membranske domene z različno urejenostjo: **D1** – najbolj urejena domena, **D2** – srednje urejena domena, **D3** – najmanj urejena domena.

V primeru spinskega označevalca MeFASL (10,3) so deleži domen v celotnem temperaturnem območju bolj ali manj konstantni (slika 10a, slika 11), manjša pa se ureditveni parameter in način gibanja (φ) (slika 11). Pri veziklih označenih z MeFASL (2,11) pa se delež srednje urejene domene (D2) in najmanj urejene domene (D3) večja na račun najbolj urejene domene. Vrednosti ureditvenega parametra S pa se za vse tri domene z naraščanjem temperature manjšajo (slika 10b, slika 12). Vrednosti so primerjane v preglednici 4.

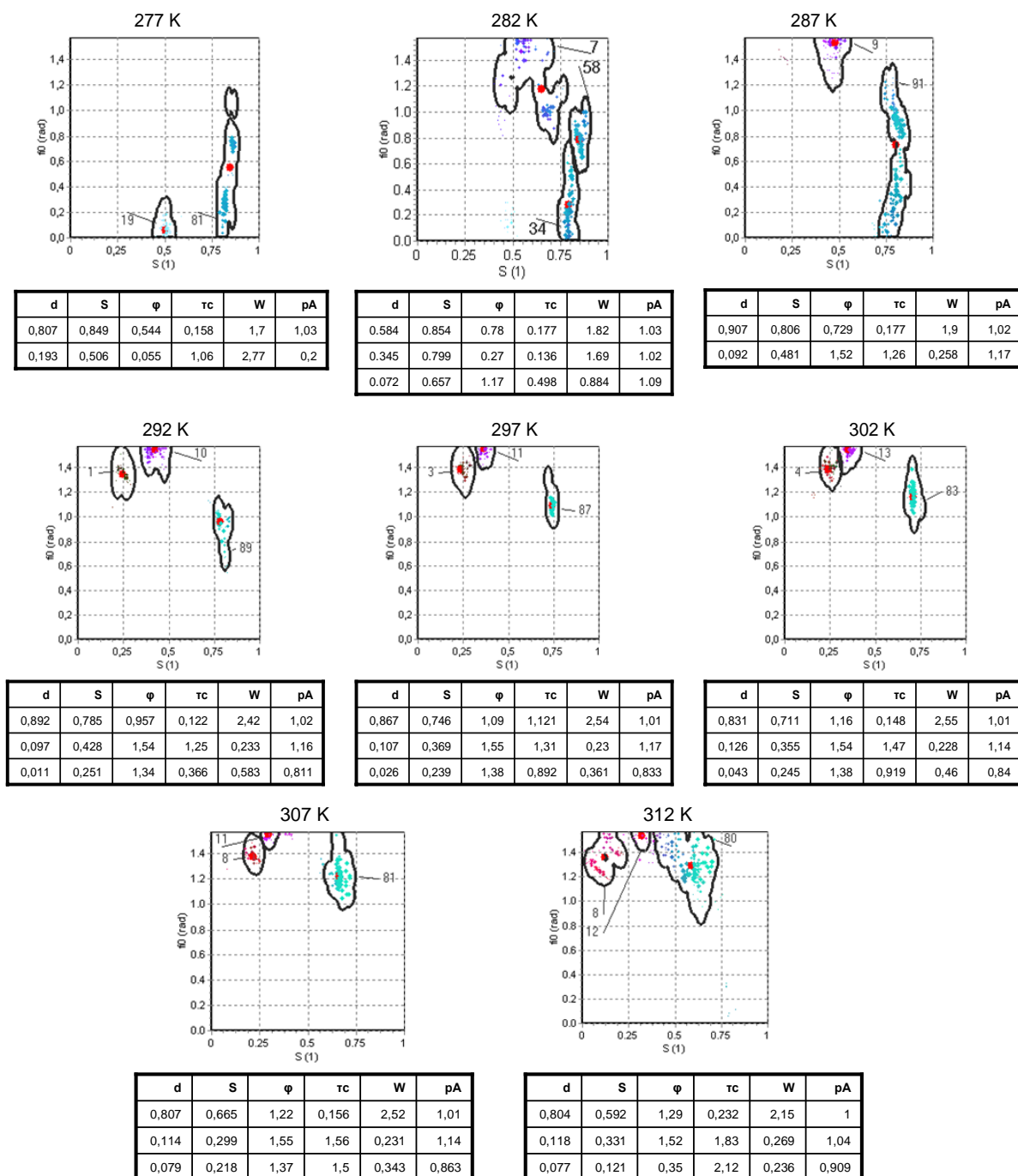


Slika 10: Grafični prikaz temperaturne odvisnosti ureditvenega parametra (S) ter deleža domen (prikazan kot velikost mehurčka) pri veziklih iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 50 : 50.

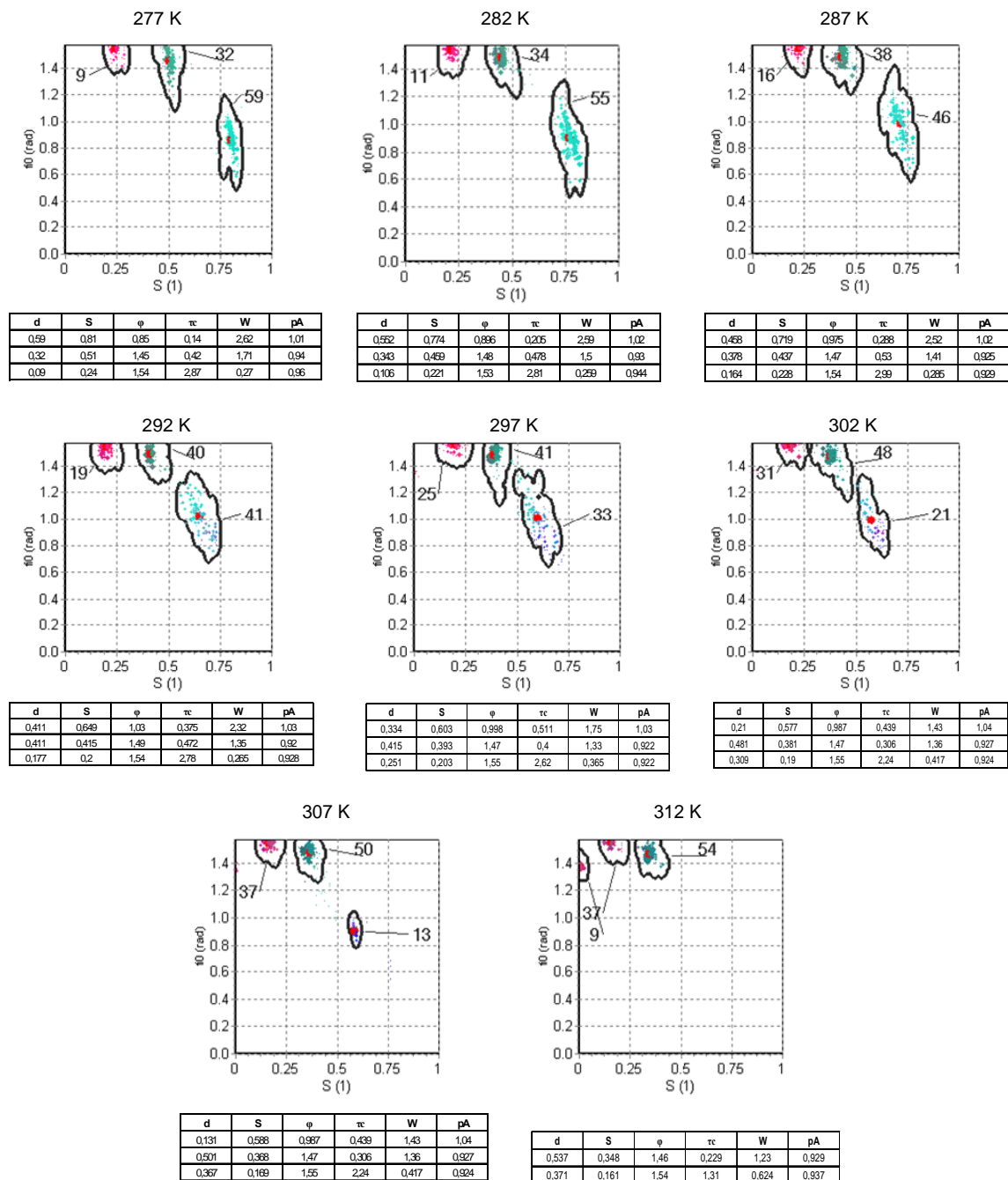
A: Spinski označevalec MeFASL (10,3). **D1** – najbolj urejena domena, **D2** – srednje urejene domene, **D3** – najmanj urejena domena. Rezultati so pridobljeni s kondenzacijsko metodo GHOST.

B: Spinski označevalec MeFASL (2,11). **D1** – najbolj urejena domena, **D2** – srednje urejena domena, **D3** – najmanj urejena domena. Rezultati so pridobljeni s kondenzacijsko metodo GHOST.

Določanju maksimalnega hiperfinega razcepa in deležev posameznih domen je sledila uporaba diagramov GHOST, kateri še dodatno omogočijo boljši vpogled v strukturo membranskih domen (slika 11, slika 12, slika 13).



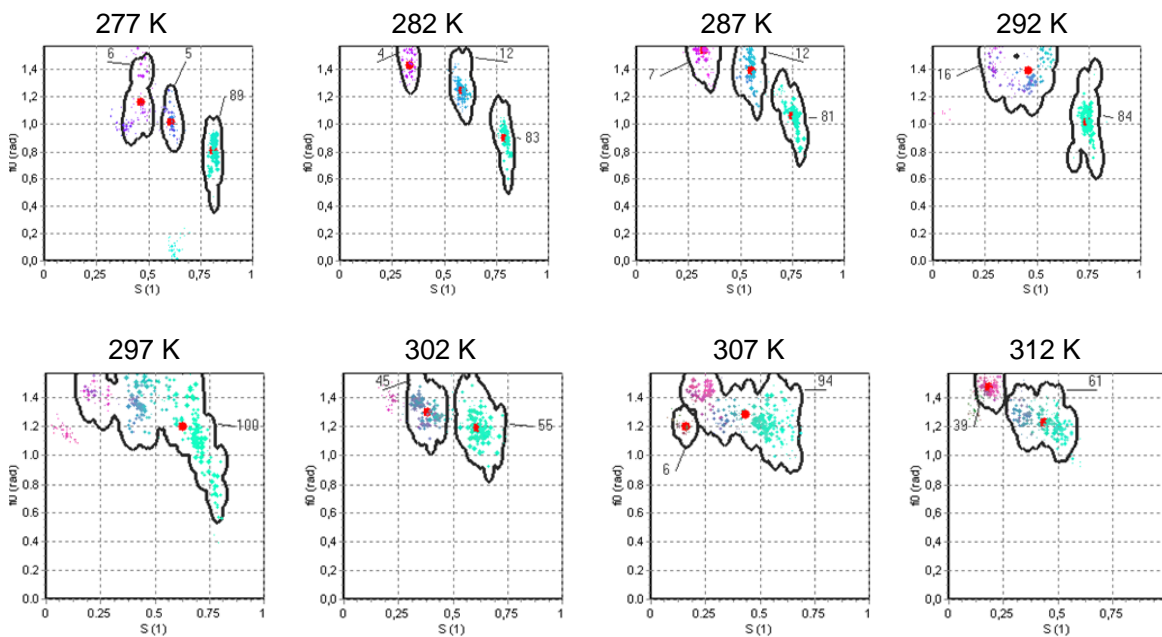
Slika 11: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (S) in kota φ ter deleža domen (vrednosti, označene na diagramih) pri veziklih iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 50 : 50. Spinski označevalec MeFASL (10,3). Ostali parametri so navedeni v tabelah pod GHOST diagrami, kjer pomeni d = delež, S = ureditveni parameter, τ_c = rotacijski korelacijski čas, W = širino črte, p_A = korekcijski faktor polarnosti in φ = komponenta ureditvenega parametra. Rezultati GHOST so pridobljeni s pomočjo kondenzacijske metode.



Slika 12: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (S) in kota φ ter deleža domen (vrednosti, označene na diagramih) pri veziklih iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 50 : 50. Spinski označevalec MeFASL (2,11). Ostali parametri so navedeni v tabelah pod GHOST diagrami, kjer pomeni d = delež, S = ureditveni parameter, τ_c = rotacijski korelacijski čas, W = širino črte, pA = korekcijski faktor polarnosti in φ = komponenta ureditvenega parametra. Rezultati so prikazani z GHOST diagrami. Rezultati GHOST so pridobljeni s pomočjo kondenzacijske metode.

Preglednica 4: Deleži domen v veziklih iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 50 : 50, označenih s spinskimi označevalci MeFASL (2,11) in MeFASL (10,3), ter ureditveni parameter S v odvisnosti od temperature. D1 predstavlja najbolj urejeno domeno, D2 vmesno fazo (srednje fluidno domeno) in D3 najbolj fluidno domeno. Poudarjeno so prikazane vrednosti, izmerjene pri sobni (297 K) ter pri fiziološki temperaturi (307 K). Rezultati so pridobljeni s GHOST kondenzacijsko metodo.

T (K)	Delež domene d (%)						Ureditveni parameter (S)					
	MeFASL (10,3)			MeFASL (2,11)			MeFASL (10,3)			MeFASL (2,11)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
277	0,807	0,193	/	0,591	0,317	0,092	0,849	0,506	/	0,808	0,51	0,243
282	0,924	0,077	/	0,552	0,343	0,106	0,826	0,657	/	0,774	0,459	0,221
287	0,907	0,092	/	0,458	0,378	0,164	0,806	0,481	/	0,719	0,437	0,228
292	0,892	0,097	0,011	0,411	0,411	0,177	0,785	0,428	0,251	0,649	0,415	0,2
297	0,867	0,107	0,026	0,334	0,415	0,251	0,746	0,369	0,239	0,603	0,393	0,203
302	0,831	0,126	0,043	0,21	0,481	0,309	0,711	0,355	0,245	0,577	0,381	0,19
307	0,807	0,114	0,079	0,131	0,501	0,367	0,665	0,299	0,218	0,588	0,368	0,169
312	0,804	0,118	0,077	/	0,537	0,371	0,592	0,331	0,121	/	0,348	0,161



Slika 13: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra (S) in kota ϕ ter deleža domen (vrednosti, označene na diagramih) pri veziklih iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 90 : 10. Spinski označevalec MeFASL (10,3). Rezultati so prikazani z GHOST diagrami. Rezultati GHOST so pridobljeni s pomočjo kondenzacijske metode.

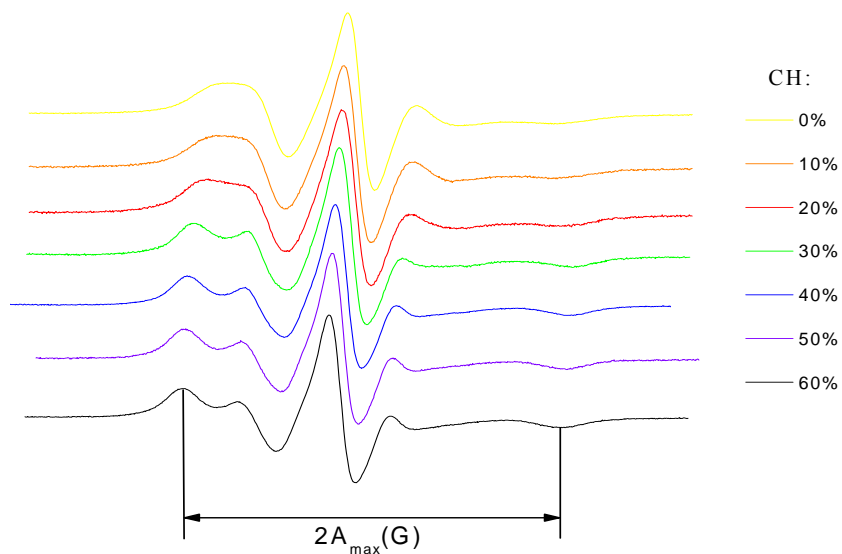
GHOST diagrami na sliki 13 prikazujejo vezikle iz SM in CH v molskem razmerju 90 : 10, označene s spinskim označevalcem MeFASL (10,3). Če te diagrame primerjamo z diagrami na sliki 11, kjer je molsko razmerje SM : CH = 50 : 50 vidimo, da je tu pri nizkih temperaturah gibanje manj ovirano. Pri temperaturi 297 K pa se domene začnejo združevati, kar pri večji koncentraciji CH ni opaziti (slika 11). To bi lahko razlagali s tem, da je pri manjši koncentraciji CH lateralna difuzija po membrani manj ovirana, oz. da je hitrejša, kot pri večji koncentraciji CH. V preglednici 5 so navedeni deleži ter ureditveni parametri posameznih domen.

Preglednica 5: Deleži domen v veziklih iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 90 : 10, označenih s spinskim označevalcem MeFASL (10,3), ter ureditveni parameter S v odvisnosti od temperature. D1 predstavlja najbolj urejeno domeno, D2 vmesno fazo (srednje fluidno domeno) in D3 najbolj fluidno domeno. Rezultati so pridobljeni s GHOST kondenzacijsko metodo.

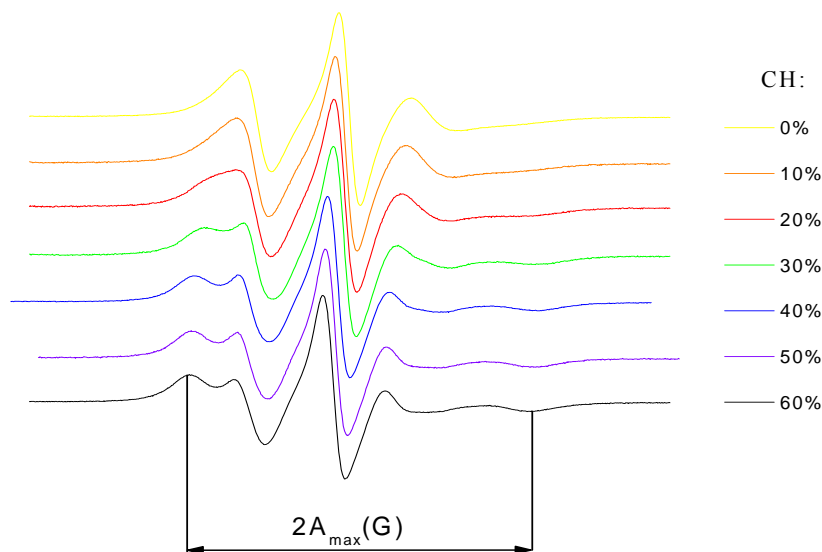
T (K)	SM : CH = 90 : 10; MeFASL (10,3)					
	Delež domene d (%)			Ureditveni parameter (S)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
277	0,89	0,053	0,056	0,816	0,612	0,468
282	0,833	0,123	0,044	0,798	0,59	0,338
287	0,812	0,117	0,072	0,758	0,558	0,327
292	0,844	0,157	/	0,744	0,464	/
297	1	/	/	0,625	/	/
302	0,554	0,446	/	0,618	0,388	/
307	0,942	0,059	/	0,436	0,163	/
312	0,606	0,394	/	0,44	0,191	/

4.2.3 EPR meritve veziklov z različnimi molskimi deleži holesterola

Z X-pasovnim EPR-spektrometrom smo pri 8 temperaturah (od 277 K do 312 K, intervali 5 K) posneli spektre za določeno lipidno mešanico. To je veljalo tako za vzorce z dodanim spinskim označevalcem MeFASL (10,3) kot za vzorce označene z MeFASL (2,11) (opisano v točki 4.2.2). Kot primer so prikazani eksperimentalni spektri, izmerjeni pri sobni temperaturi (297 K) (slika 14) ter fiziološki temperaturi (307 K) (slika 15).



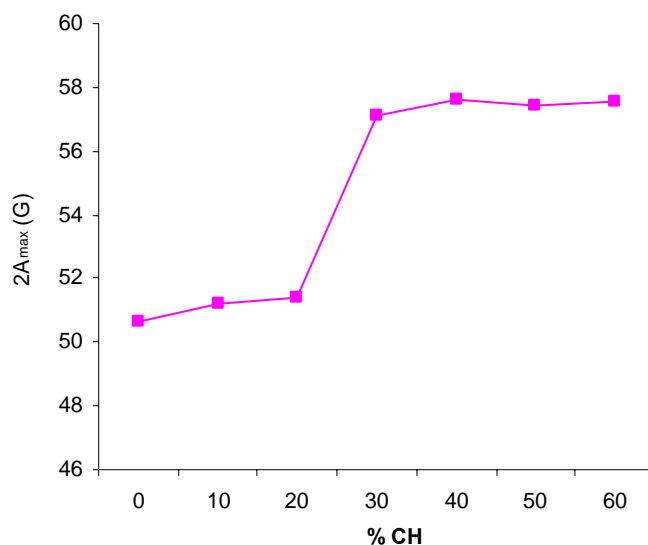
Slika 14: Eksperimentalni EPR spektri veziklov, pripravljenih iz sfingomielina (SM) in holesterola (CH) pri različnih molskih deležih holesterola. Razdalja med puščicama predstavlja maksimalni hiperfinski razcep ($2A_{\max}$). Spinski označevalec je MeFASL (10, 3). Spektri so posneti pri 297 K.



Slika 15: Eksperimentalni EPR spektri veziklov, pripravljenih iz sfingomielina (SM) in holesterola (CH) pri različnih molskih deležih holesterola. Razdalja med puščicama predstavlja maksimalni hiperfinski razcep ($2A_{\max}$). Spinski označevalec je MeFASL (10, 3). Spektri so posneti pri 307 K.

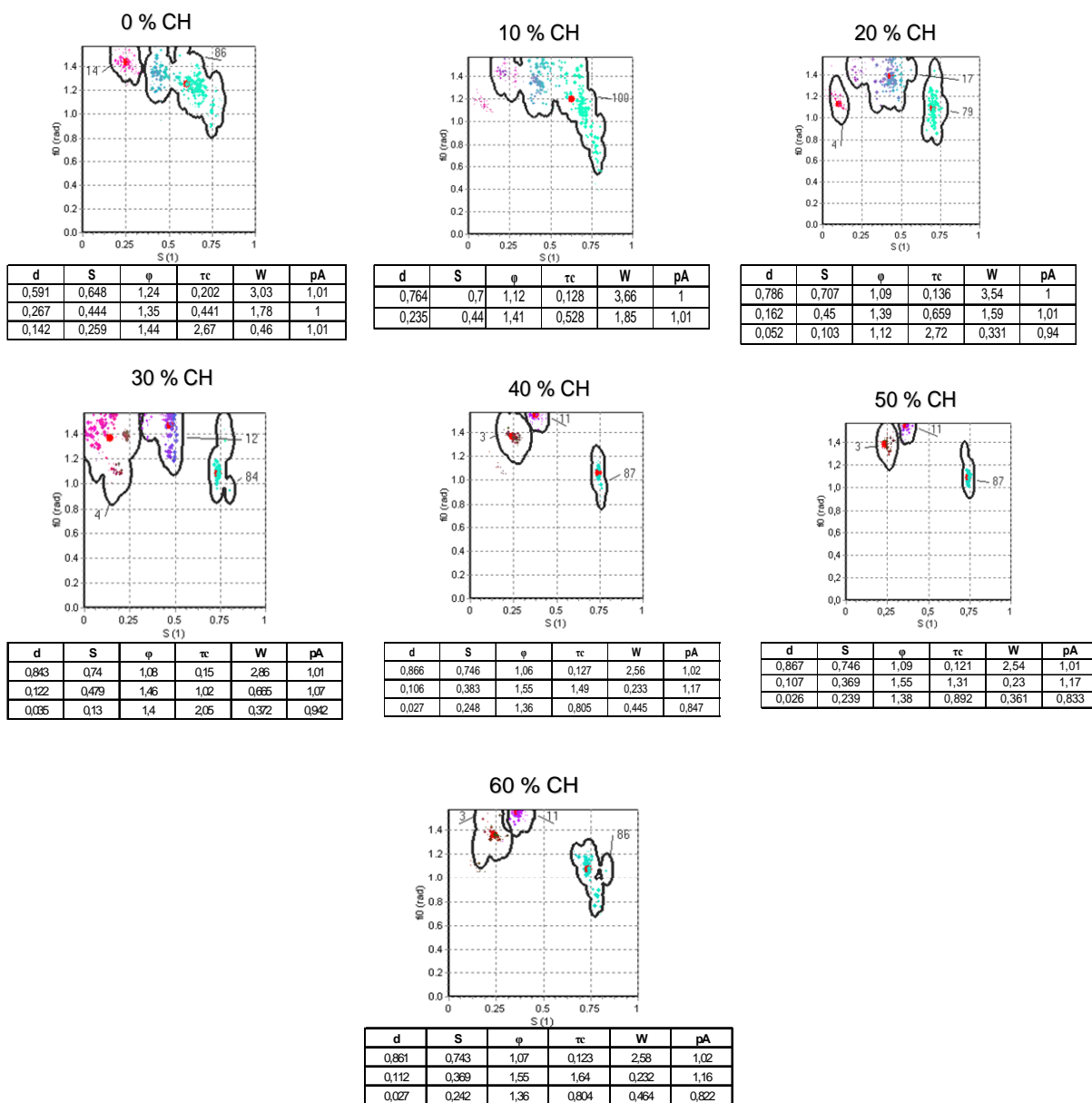
Iz spektrov veziklov, označenih s spinskim označevalcem MeFASL (10,3) (slika 14, slika 15), je razvidno, da se z naraščanjem molskega deleža holesterola v veziklih iz SM in CH spreminja oblika krivulj. Prihaja torej do sprememb, povezanih s fluidnostjo membran.

Neposredno smo iz eksperimentalnih spektrov odčitali maksimalni hiperfini razcep ($2A_{\max}$), ki se veča z naraščajočim molskim deležem holesterola v lipidni mešanici. Pri nižjih molarnih deležih holesterola so membrane manj urejene (manjši $2A_{\max}$) (slika 16). S slike je razvidno, da pri 30 mol % CH pride do izrazitega povečanja $2A_{\max}$.



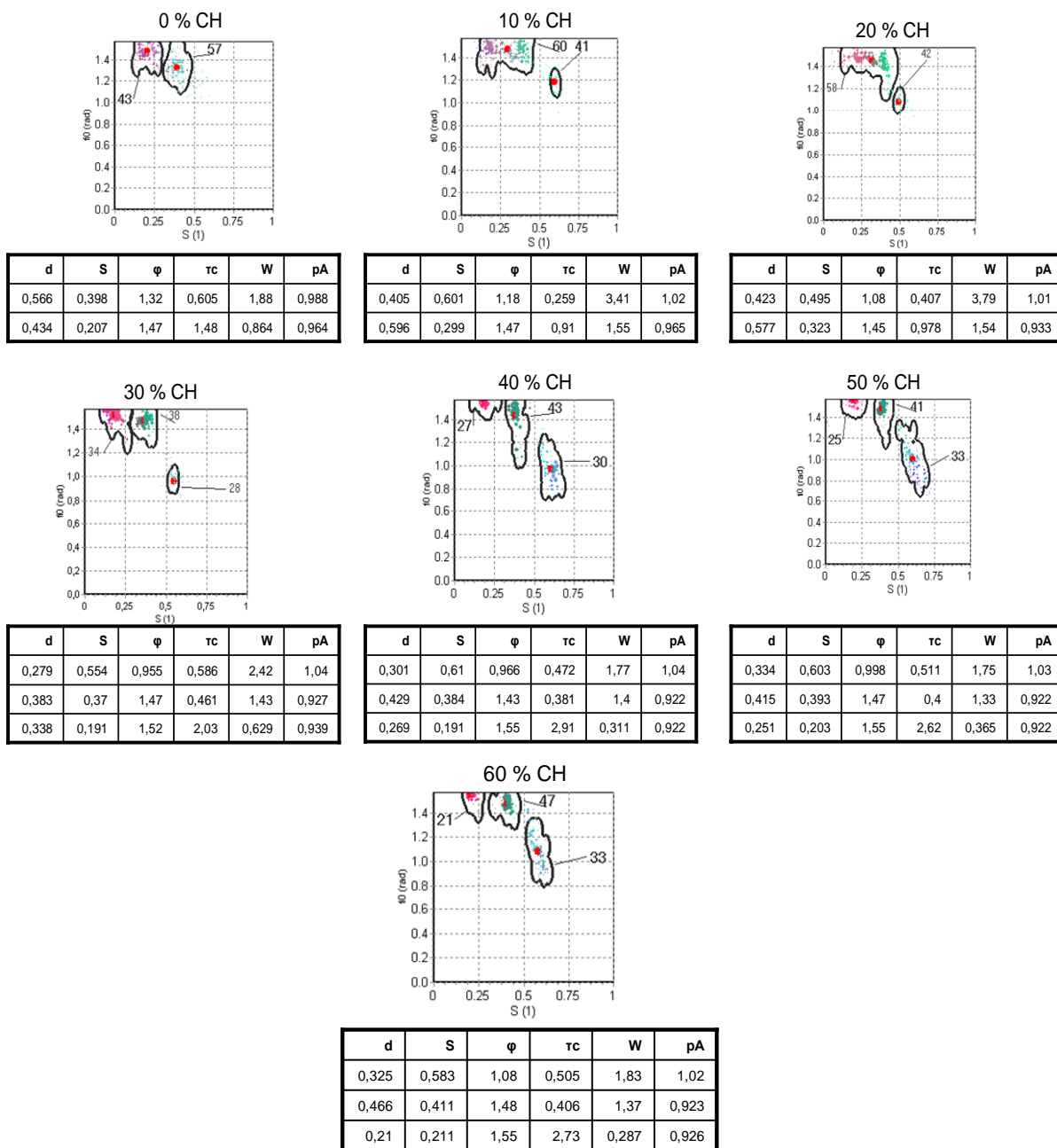
Slika 16: Urejenost membrane, podana z maksimalnim hiperfinim razcepom ($2A_{\max}$) v odvisnosti od molskega deleža holesterola v veziklih iz SM in CH. Vezikli so označeni s spinskim označevalcem MeFASL (10,3), spektri pa so izmerjeni pri 297 K (sobna temperatura). Vsaka točka je povprečje treh meritev, kjer standardna napaka ne presega 5 %. CH = holesterol.

Za natančnejšo sliko o urejenosti membran smo uporabili računalniško simulacijo EPR spektrov, merjenih pri sobni (slika 14) in fiziološki temperaturi (slika 15). Temu je sledila se uporaba GHOST diagramov, ki omogočijo boljši vpogled v strukturo membranskih domen (glej 4.2.2). Diagrami so prikazani na slikah 18 in 19.



Slika 17: Odvisnost ureditvenega parametra (S), kota ϕ ter deleža domen d (vrednosti, označene na diagramih) v veziklih iz sfingomielina (SM) in holesterola (CH) od različnih molskih deležev holesterola. Ostali parametri so navedeni v tabelah pod GHOST diagrami, kjer je d = delež, S = ureditveni parameter, τ_c = rotacijski korelacijski čas, W = širina črte, p_A = korekcijski faktor polarnosti in ϕ = komponenta ureditvenega parametra. Spinski označevalec je bil MeFASL (10,3), merjeno pri 297 K (sobna temperatura). Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

S slike 17 je razvidno, da so pri nižji koncentraciji holesterola domene med seboj bolj ali manj povezane, pri 20 % koncentraciji holesterola se prične najbolj urejena domena ločevati od ostalih, pri 30 % CH in več pa se delež te domene poveča nad 80 % in tudi njen ureditveni parameter se poveča.

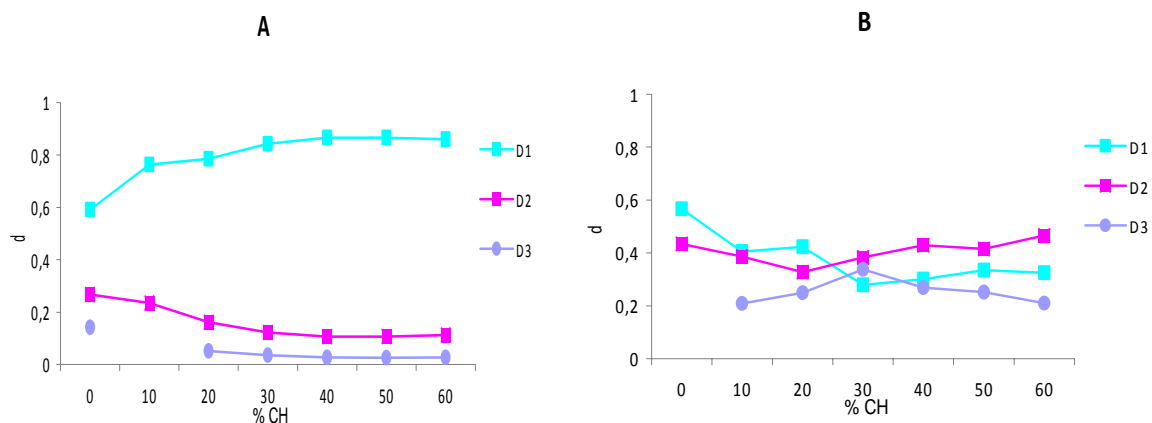


Slika 18: Odvisnost ureditvenega parametra (S), kota φ ter deleža domen d (vrednosti, označene na diagramih) v veziklih iz sfingomielina (SM) in holesterola (CH) od različnih molskih deležev holesterola. Ostali parametri so navedeni v tabelah pod GHOST diagrami, kjer je d = delež, S = ureditveni parameter, τ_c = rotacijski korelacijski čas, W = širina črte, pA = korekcijski faktor polarnosti in φ = komponenta ureditvenega parametra. Spinski označevalec je bil MeFASL (2,11), merjeno pri 297 K (sobna temperatura). Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

Pri veziklih, označenih z MeFASL (2,11), so razlike s koncentracijo holesterola manj izrazite in se kažejo v ločevanju srednje domene (Slika 18).

Pri veziklih, označenih z MeFASL (10,3), ki odraža gibanje lipidov v zgornjem delu membrane, je večanje urejenosti membrane z naraščanjem molskega deleža holesterola posledica večanja deleža najbolj urejene domene D1 (sliki 17 in 19a, preglednica 6) in večanja ureditvenega parametra S (preglednica 6).

Delež srednje (D2) in najmanj urejene domene (D3) se na račun najbolj urejene domene rahlo zmanjša. Obratno sliko pa dobimo v primeru spinskega označevalca MeFASL (2,11), ki odraža gibanje globlje v membrani in zato prihaja do razlik. Delež najbolj urejene domene (D1) se manjša, deleža srednje (D2) in najmanj urejene domene (D3) pa se na račun najbolj urejene domene rahlo povečata (slika 18, slika 19b, preglednica 6). Tudi vrednost ureditvenega parametra S v tem primeru pada (preglednica 6).



Slika 19: Deleži membranskih domen v veziklih iz sfingomielina in holesterola v odvisnosti od različnih molskih deležev holesterola. **D1** predstavlja najbolj urejeno domeno, **D2** vmesno fazo s srednje fluidno domeno in **D3** najbolj fluidno domeno. Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo. d = molski delež domene. CH = holesterol

A: MeFASL (10,3), posneto pri 297 K

B: MeFASL (2,11), posneto pri 297 K

Preglednica 6: Deleži membranskih domen ter ureditveni parameter S v veziklih iz sfingomielina in holesterola v odvisnosti od različnih molskih deležev holesterola. Spinski označevalci so MeFASL (2,11) in MeFASL (10,3), meritve pa so bile opravljene pri 297 K. D1 predstavlja najbolj urejeno domeno, komponenta D2 vmesno fazo (srednje fluidno domeno) in komponenta D3 najbolj fluidno domeno. Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

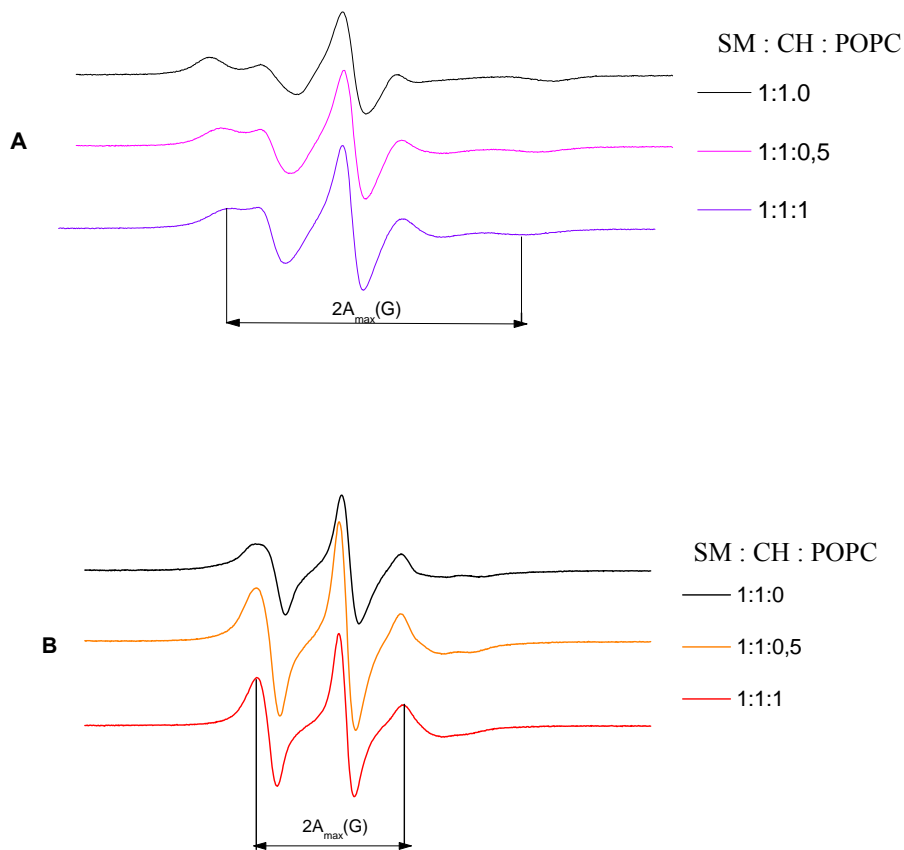
% CH	Delež domene d (%)						Ureditveni parameter (S)					
	MeFASL (10,3)			MeFASL (2,11)			MeFASL (10,3)			MeFASL (2,11)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
0	0,591	0,267	0,142	0,566	0,434	/	0,648	0,444	0,259	/	0,398	0,207
10	0,764	0,235	/	0,405	0,386	0,209	0,7	0,44	/	0,601	0,387	0,194
20	0,786	0,162	0,052	0,423	0,328	0,249	0,707	0,45	0,103	0,495	0,4	0,277
30	0,843	0,122	0,035	0,279	0,383	0,338	0,74	0,479	0,13	0,554	0,37	0,191
40	0,866	0,106	0,027	0,301	0,429	0,269	0,746	0,383	0,248	0,61	0,384	0,191
50	0,867	0,107	0,026	0,334	0,415	0,251	0,746	0,369	0,239	0,603	0,393	0,203
60	0,861	0,112	0,027	0,325	0,466	0,21	0,743	0,369	0,242	0,583	0,411	0,211

4.2.4 EPR meritve lipidnih veziklov z dodatkom ostreolizina

Oblika EPR spektra se v prisotnosti ostreolizina ne spremeni, kar pomeni, da ostreolizin v molskem razmerju 1: 500 v prid lipidom ne povzroča opaznih sprememb v urejenosti membrane. Meritve pri višji koncentraciji ostreolizina niso bile mogoče, ker je prišlo do obarjanja proteina.

4.2.5 EPR meritve veziklov iz sfingomielina, holesterola in POPC

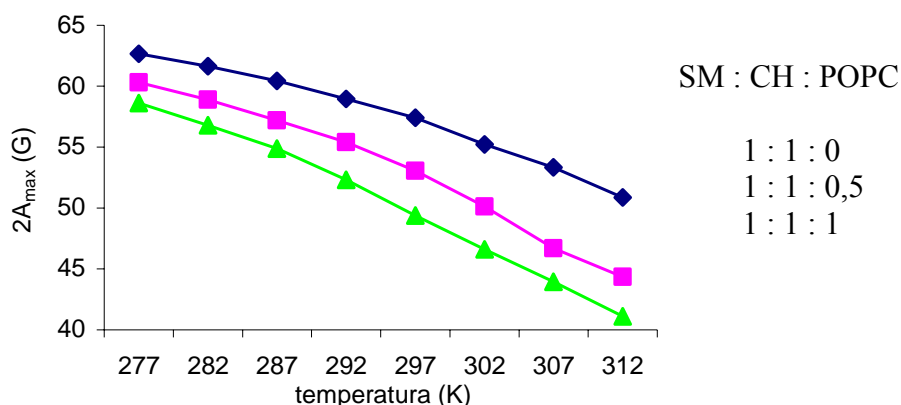
Z X-pasovnim EPR-spektrometrom smo pri 8 temperaturah (od 277 K do 312 K, intervali 5 K) posneli spektre za določeno lipidno mešanico v različnih molarnih razmerjih. To je veljalo tako za vzorce z dodanim spinskim označevalcem MeFASL (10,3) kot za vzorce označene s spinskim označevalcem MeFASL (2,11). Kot primer so prikazani eksperimentalni spektri, merjeni pri sobni ter pri fiziološki temperaturi (slika 20).



Slika 20: EPR spektri veziklov, sestavljenih iz sfingomielina (SM), holesterola (CH) in palmitoil-oleoil-
fosfatidilholina (POPC) pri različnih molskih razmerjih.

A: MeFASL (10,3), posneto pri 297 K

B: MeFASL (2,11), posneto pri 297 K



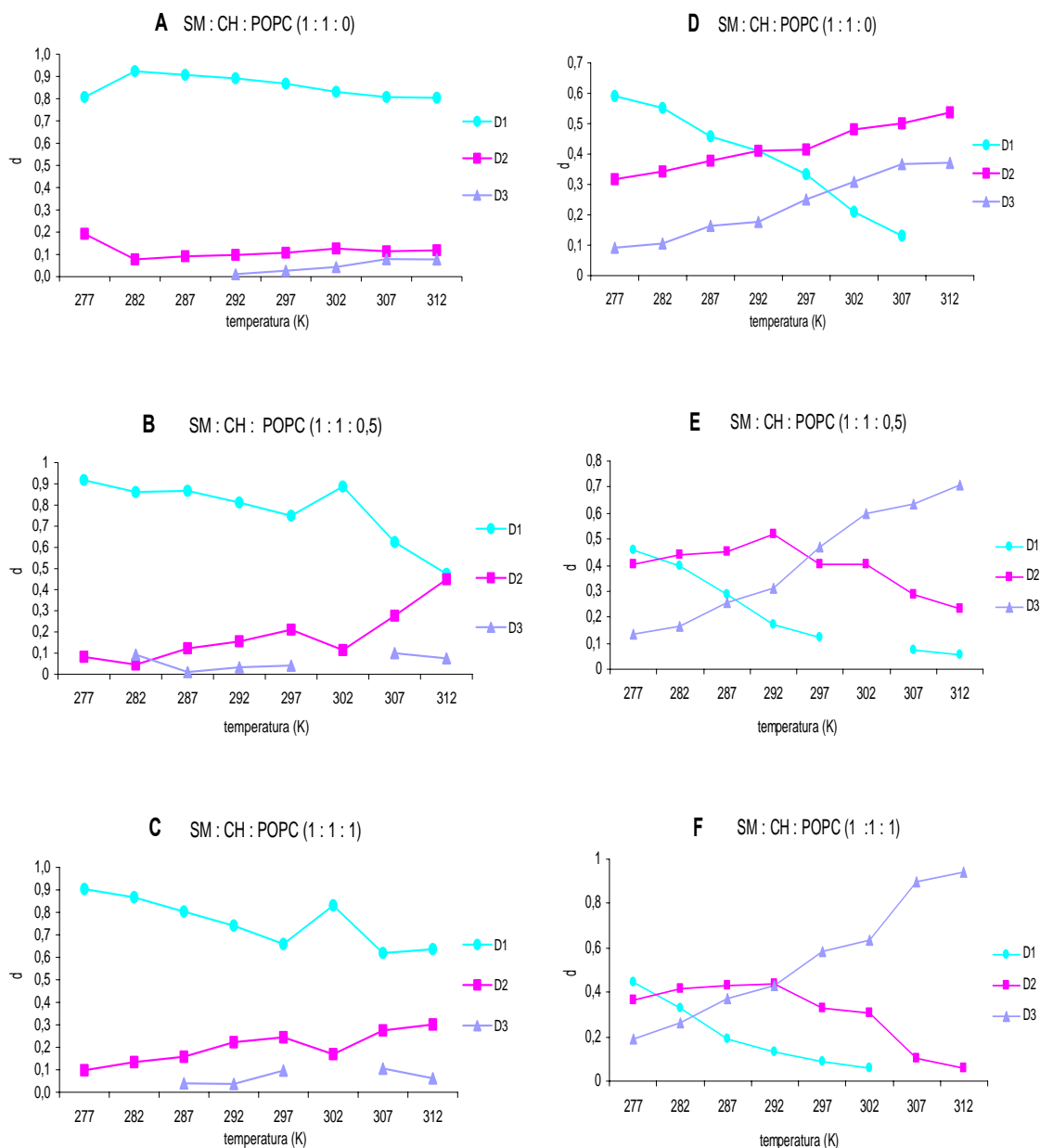
Slika 21: Urejenost membrane veziklov, podana z maksimalnim hiperfinim razcepom ($2A_{\max}$) v odvisnosti od temperature. Vezikli so pripravljene iz sfingomielina (SM), holesterola (CH) in palmitoil-oleoil-fosfatidilholina (POPC) v molskih razmerjih 1 : 1 : 0 (modra), 1 : 1 : 0,5 (vijolična) ter 1 : 1 : 1 (zelena). Vezikli so bili označeni s spinskim označevalcem MeFASL (10,3). Vsaka točka je povprečje treh meritev, kjer standardna napaka ne presega 4 %.

Pri posameznih spektrih različnih molskih deležev palmitoil-oleoil-fosfatidilholina (POPC) (1 : 1 : 0, 1 : 1 : 0,5 ter 1 : 1 : 1), merjenih pri isti temperaturi opazamo, da je maksimalni hiperfini razcep ($2A_{\max}$) pri veziklih z dodanim POPC značilno manjši (manjša urejenost membran) kot pri veziklih brez dodanega POPC (slika 20, slika 21). Z naraščanjem deleža POPC v membrani veziklov narašča neurejenost membrane. Enako se dogaja z naraščanjem temperature (slika 21).

Za natančnejšo sliko o urejenosti membran z dodanim POPC smo uporabili računalniško simulacijo EPR spektrov, merjenih pri sobni in fiziološki temperaturi. Temu je sledila še uporaba GHOST diagramov, ki omogočijo boljši vpogled v strukturo membranskih domen.

V membrani veziklov smo zasledili prisotnost 3 vrst različnih domen hkrati (slika 23). Opazno je zmanjšanje deleža najbolj urejene domene (D1) po dodatku POPC, ki sovпада z večjim molskim deležem POPC v lipidni mešanici (slika 22, slika 23 in slika 24). Takšne rezultate smo dobili z obema spinskima označevalcema. Delež najbolj urejene domene (D1), ki jo dobimo z označevalcem MeFASL (2,11), je vseskozi nižja od deleža najbolj urejene domene (D1) v primeru spinskega označevalca MeFASL (10,3) (slika 22, slika

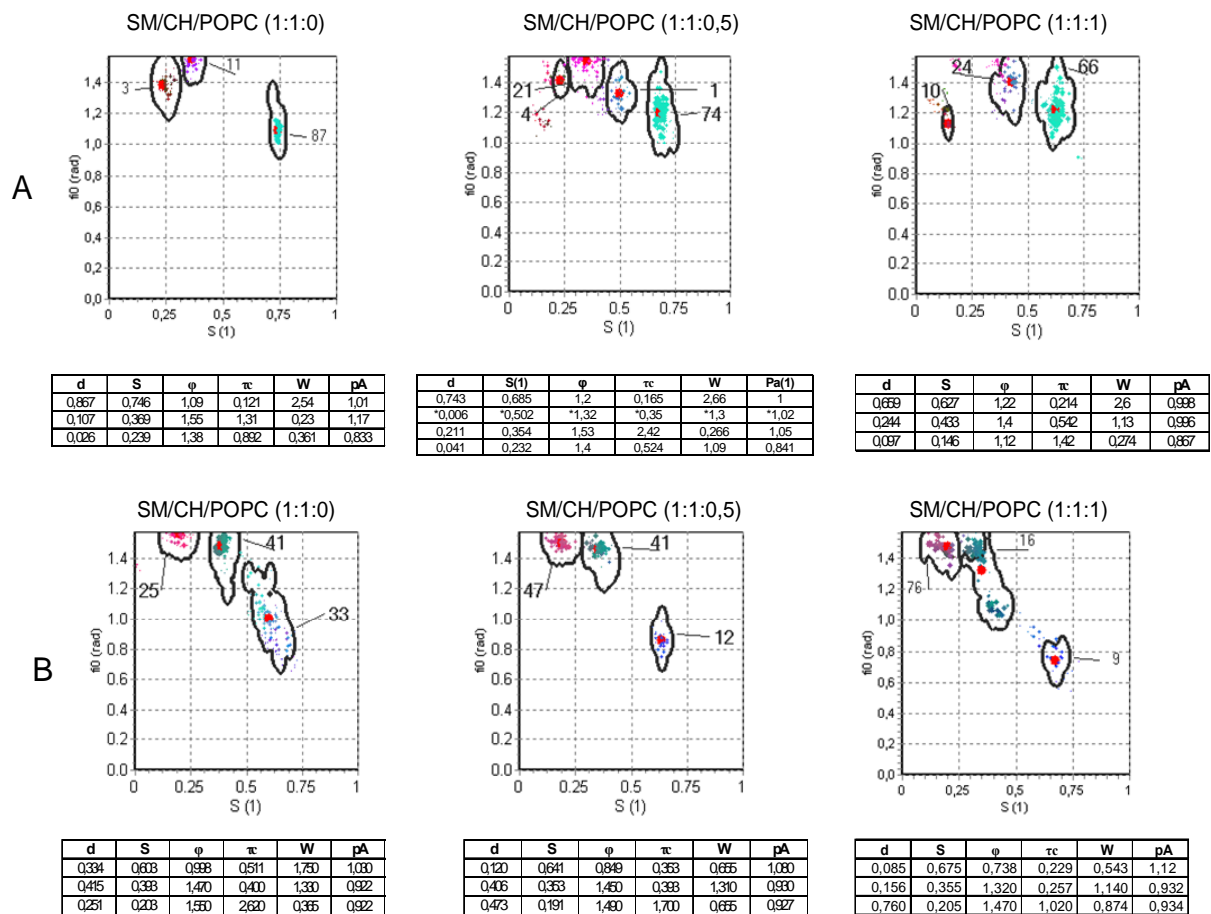
24). Pri veziklih, označenih s spinskim označevalcem MeFASL (10,3), je delež najbolj urejene domene (D1) v vseh treh lipidnih mešanicah višji in hkrati največji v celotnem temperaturnem območju v primerjavi z ostalima manj urejenima domenama (slika 22a, 22b, 22c, slika 23a in slika 24a). Pri veziklih označenih z MeFASL (2,11) pa je delež manj urejenih domen (D2, D3) večji od deleža najbolj urejene domene (D1) (slika 22d, 22e, 22f, slika 23b, 24b). Ureditveni parameter v veziklih, označenih z označevalcem MeFASL (10,3), z naraščanjem deleža POPC v lipidni mešanici pada, nasprotno pa pri veziklih, označenih z MeFASL (2,11), rahlo narašča (slika 25).



Slika 22: Vpliv temperature na molski delež (d) membranskih domen v veziklih iz sfingomielina (SM), holesterola (SM) in palmitoil-oleoil-fosfatidilholina (POPC) pri različnih molških razmerjih. **D1** – najbolj urejena domena, **D2** – srednje urejena domena, **D3** – najmanj urejena domena.

A, B, C: Spinski označevalec MeFASL (10,3)

D, E, F: Spinski označevalec MeFASL (2,11)

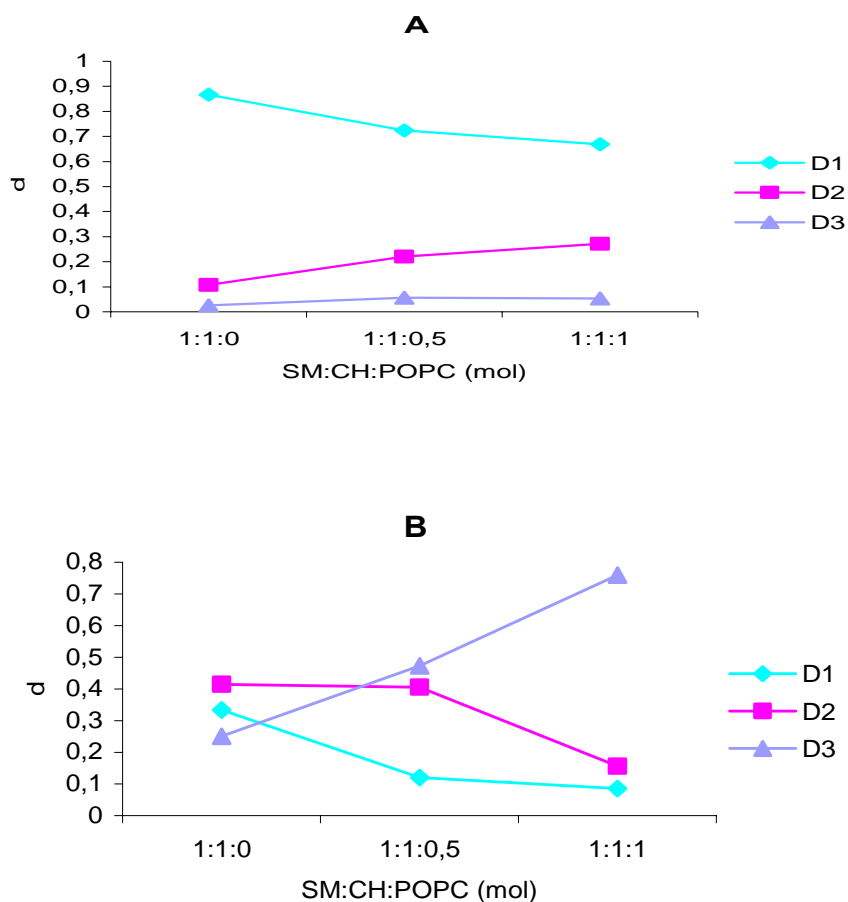


Slika 23: Primerjava strukture membranskih domen veziklov iz SM, CH in POPC v različnih molskih razmerjih. GHOST diagrami EPR spektralnih parametrov. S- ϕ je del ureditvenega parametra, ki nam pove, kakšna je omejenost rotacije spinskega označevalca okoli normale na ravnino membrane, deleži pa so vrednosti, označene na diagramih. Ostali parametri so navedeni v tabelah pod GHOST diagrami, kjer je d = delež, S = ureditveni parameter, τ_c = rotacijski korelacijski čas, W = širina črte, p_A = korekcijski faktor polarnosti in ϕ = del ureditvenega parametra. * artefakt.

A: Spinski označevalec MeFASL (10,3), posneto pri 297 K

B: Spinski označevalec MeFASL (2,11), posneto pri 297 K

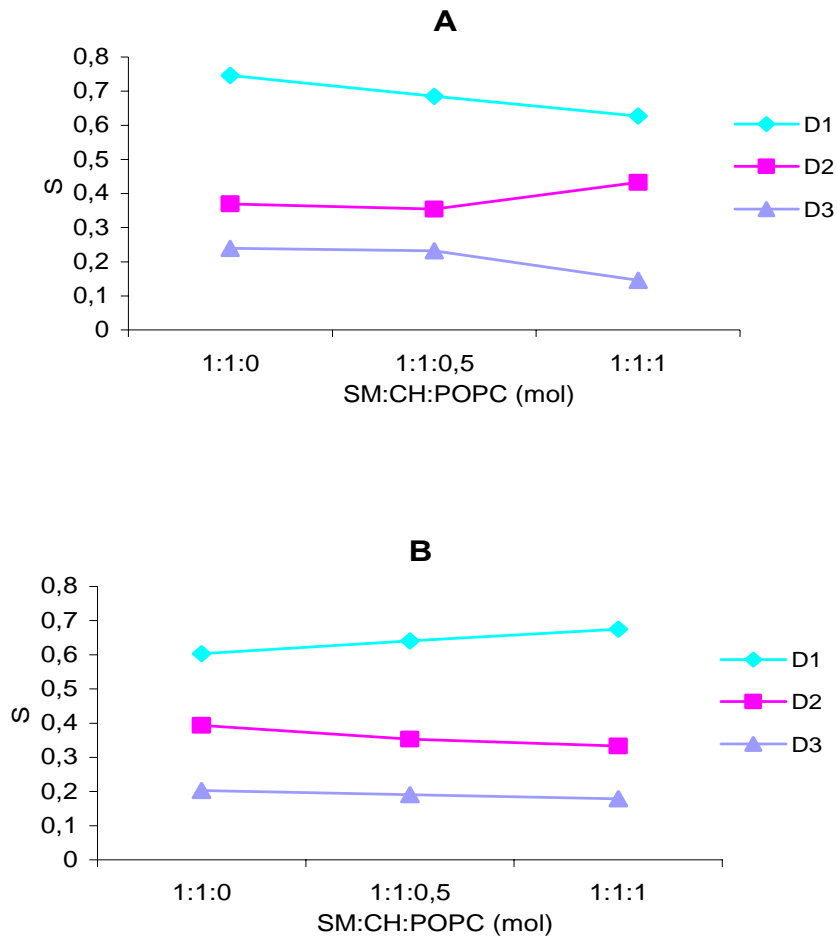
Po dodatku POPC se ureditveni parameter najbolj urejene komponente zmanjša z 0,75 na 0,63 in tudi njen delež se zmanjša z 87 % na 66 % pri razmerju SM : CH: POPC 1 : 1 : 1.



Slika 24: Odvisnost deleža (d) membranskih domen pri veziklih iz sfingomielina (SM), holesterola (CH) in palmitoil-oleoil-fosfatidilholina (POPC) od različnih molskih razmerij lipidov. **D1** – najbolj urejena domena, **D2** – srednje urejena domena, **D3** – najmanj urejena domena.

A: Spinski označevalec MeFASL (10,3), posneto pri 297 K

B: Spinski označevalec MeFASL (2,11), posneto pri 297 K



Slika 25: Ureditveni parameter (S) membranskih domen veziklov iz sfingomielina (SM), holesterola (CH) in palmitoil-oleoil-fosfatidilholina (POPC) v odvisnosti od različnih molskih razmerij lipidov. **D1** – najbolj urejena domena, **D2** – srednje urejena domena, **D3** – najmanj urejena domena.

A: Spinski označevalec MeFASL (10,3), posneto pri 297 K

B: Spinski označevalec MeFASL (2,11), posneto pri 297 K

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen raziskave v okviru diplomskega dela je bil ugotoviti, kako domenska struktura membran veziklov iz SM in CH (v različnih razmerjih) sovпада z membransko aktivnostjo citolitičnega proteina ostreolizina (Oly). Da bi prišli do teh ugotovitev, smo se poslužili metode elektronske paramagnetne resonance, ki je ustrezna za proučevanje in detekcijo tudi heterogenih domenskih struktur lipidnih membran. Za natančnejšo analizo rezultatov smo se poslužili računalniške simulacije eksperimentalnih spektrov ter GHOST kondenzacijske metode, s katero smo detektirali 3 vrste različnih, hkrati prisotnih domen v posameznih tipih veziklov, in sicer najbolj urejeno domeno z visokim ureditvenim parametrom, srednje urejeno domeno in najmanj urejeno domeno z nizkim ureditvenim parametrom.

Meritve so bile narejene v širokem temperaturnem razponu (277 K–312 K). Glede na to, da je bila večina poskusov membranske aktivnosti Oly na teh veziklih opravljena pri sobni temperaturi, pa smo se zaradi lažje primerjave rezultatov osredotočili predvsem na te rezultate (297 K).

Citolitični proteini, ki se v sublitičnih koncentracijah vežejo na domene, ki ustrezajo lipidnim raftom, so potencialno zelo zanimivi s stališča biomedicinskih raziskav – kot označevalci lipidnih raftov. Zato je poznavanje strukturnih lastnosti membranskih domen, ki jih ti proteini prepoznavajo, izrednega pomena. Rezultati, pridobljeni v predhodnih raziskavah (Sepčić in sod., 2004, Rebolj in sod., 2006), nakazujejo na to, da Oly prepozna s holesterolom bogate membranske mikrodomene, katerih integriteto je mogoče razbiti z dodatkom nenasičenih glicerofosfolipidov (Sepčić in sod., 2004) in lizofosfolipidov (Sepčić in sod., 2003). Permeabilizacijska aktivnost ostreolizina, merjena s sproščanjem kalceina iz soniciranih veziklov, sestavljenih iz binarnih in ternarnih

mešanic holesterola in fosfolipidov, se povečuje s povečevanjem razmerja CH : SM v membrani. Vezava in permeabilizacija ostreolizina pri CH : SM veziklih opazno nastopi šele nad 30 molskih % CH (Sepčić in sod. 2004, Rebolj in sod., 2006). Ugotovili so tudi, da je vezava ostreolizina specifična za zmes SM – CH, in nakazali, da Oly prepozna s CH inducirano lipidno mikrodomeno, ki obstaja v l_o fazi. Vendar pri veziklih, pripravljenih iz ekvimolarnih mešanic SM in različnih sterolov, membranska aktivnost Oly ne korelira popolnoma s sposobnostjo tvorbe l_o faze posameznega sterola. Vedno je največja v prisotnosti veziklov, ki vsebujejo CH, čeprav nekateri drugi testirani steroli (ergosterol, 7-dehidroholesterol) imajo bistveno večjo sposobnost tvorbe l_o faze (Rebolj in sod., 2006). To nakazuje na vpletenost drugih faktorjev, kot je npr. površinska struktura membranskih domen ali specifična razporeditev lipidov v njih, pri vezavi in litični aktivnosti ostreolizina.

Namen diplomskega dela je zato bil ugotoviti vpliv deleža CH na domensko strukturo in fluidnost membrane. Naši rezultati, pridobljeni z EPR meritvami, kažejo, da se urejenost celotne membrane močno poveča, ko povečamo koncentracijo holesterola nad 20 % CH v celotnem temperaturnem območju (slika 8, slika 16). Več informacij o domenski strukturi pa dobimo iz GHOST diagramov. Slika GHOST diagramov veziklov z vsebnostjo CH manjšo od 30 % kaže zvezno povezanost vseh treh različnih tipov domen. Za razliko od tega pa slika GHOST diagramov veziklov z vsebnostjo CH nad 30 % molskega deleža kaže na jasno ločitev najbolj urejene domene od ostalih dveh manj urejenih domen (slika 15). Glede na dosedanje ugotovitve lahko sklepamo, da najbolj urejena domena ustreza l_o domeni. De Almeida in sod. (2003) so v veziklih iz SM in CH ravno pri 30 % molskega deleža CH zasledili prehod iz trdne urejene faze v tekočo urejeno fazo. Rezultate, primerljive z našimi, so objavili tudi Collado in sod. (2005), ki so dokazali obstoj l_o faze v veziklih iz SM in CH z molskim deležem CH nad 20 %. Glede na to, da tik nad 30 % CH tudi Oly postane membransko aktiven, lahko sklepamo, da struktura membrane, pri kateri se najbolj urejena l_o faza loči od ostalih in katere delež presega 80 % celotne membrane v celem temperaturnem intervalu, omogoča vezavo Oly na membrano.

Opravili smo tudi meritve na veziklih iz SM, CH ter POPC v različnih molskih razmerjih (1 : 1 : 0, 1 : 1 : 0,5, 1 : 1 : 1). Opazne so bile razlike v urejenosti membranskih domen. Membrane veziklov z dodajanjem POPC postajajo bolj fluidne, njihova urejenost se manjša (slika 14). To sovпада s kemijsko zgradbo POPC, saj je manjša nasičenost acilnih verig vzrok, ki onemogoča tesno medsebojno pakiranje lipidov in ustreza l_d fazi. Povečevanje fluidnosti membrane sovпада z naraščanjem deleža POPC v lipidni mešanici (slika 18, slika 19). Dodatek POPC zmanjša delež najbolj urejene domene, saj povzroči disociacijo s CH bogatih domen in s tem zmožnost tvorbe l_o faze. Glede na naše rezultate lahko sklepamo, da je za uspešno vezavo Oly potrebna vrednost deleža najbolj urejene domene nad 80 %, ta vrednost pa se ob dodatku POPC zmanjša za približno 20 % (velja pri istih pogojih, sobna temperatura). Naši rezultati so primerljivi z rezultati Sepčić in sod. (2004), Bakrač (2005) in Dolgan (2003), katerih raziskave so tudi bile povezane s proučevanjem aktivnosti ostreolizina (inhibicija hemolize, sproščanje kalceina) v odvisnosti od membranske sestave veziklov. Te raziskave so pokazale drastično zmanjšanje aktivnosti Oly, če je veziklov iz SM in CH bil dodan POPC.

Pri sami interpretaciji rezultatov je treba omeniti tudi to, da so informacije, ki jih dobimo z dvema različnima spinskima označevalcema, različne. MeFASL (10,3) z doksilno skupino, ki je na alkilno verigo vezana na petem C atomu od metilne skupine, odraža gibanje lipidov v zgornjem predelu membrane. Pri spinskem označevalcu MeFASL (2,11) pa je na alkilno verigo doksilna skupina vezana na trinajstem C atomu od metilne skupine in tako odraža gibanje v notranjosti lipidnega dvosloja. Tako zaradi različne okolice spinskega označevalca prihaja do razlik v sami obliki spektrov, v deležu posameznih domen ter med različnimi izračunanimi parametri. Slika 17, slika 18 in slika 19 kažejo, da je površina membrane v primerjavi z membrano v notranjosti dosti bolj urejena (večji delež najbolj urejene domene) in ima večji ureditveni parameter, iz česar lahko sklepamo, da je za samo vezavo ostreolizina pomembna ustrezna razporeditev domen na površini membrane. Iz primerjave GHOST diagramov MeFASL (10,3) in MeFASL (2,11) pa lahko sklepamo, da so razlike večje v zgornjem delu membrane, medtem ko so v sredini manjše.

Znano je, da različni citolizini za vezavo na rafte potrebujejo različno stopnjo membranske urejenosti ali različne akceptorske molekule, ki se nahajajo v raftih. Lahko zaznavajo tudi različne koncentracije teh molekul, oz. njihovo lateralno distribucijo, kot so pokazali v primeru lizenina (Ishitsuka in sod., 2005) in perfringolizina (Ohno-Iwashita in sod., 2004).Majhni skupki SM ali CH, ki obstajajo v raftih, lahko igrajo vlogo pritrjevanih mest za določene toksine, vključno z ostreolizinom.

Na podlagi dosedanjih in naših ugotovitev skoraj z zagotovostjo lahko trdimo, da je ta značilni vzorec jasno ločene najbolj urejene domene s pripadajočimi karakteristikami skupek oz. platforma na površini membrane, ki jo ostreolizin prepozna in se nanjo uspešno veže.

5.2 SKLEPI

- Iz razlik v domenski strukturi veziklov iz SM in CH, označenih s spinskim označevalcem, ki odraža gibanje v zgornjem delu membrane, in spinskim označevalcem, ki odraža gibanje v notranjem delu membrane, sklepamo, da je specifična organizacija lipidov na površini membrane bistvena za vezavo ostreolizina.
- Vezikli, sestavljeni iz SM : CH z več kot 30 molskih % CH, kažejo podobno domensko strukturo. Najbolj urejena domena je ostro ločena od manj urejenih in zavzema več kot 80 % površine membrane ob predpostavki, da se spinski označevalec enakomerno porazdeli med membranske domene. Tu se domnevno formira l_o faza. Opažena ločitev faz sovпада z membransko aktivnostjo ostreolizina.
- Vezikli, sestavljeni iz SM : CH z manj kot 30 % molskega CH, kažejo podobno domensko strukturo, ki je hkrati opazno drugačna od domenske strukture veziklov z vsebnostjo CH nad 30 molskih %. Domene različnih tipov so med seboj zvezno povezane.
- Sama metoda priprave spinsko označenih lipidnih veziklov (dodajanje spinskega označevalca pred ali po soniciranju) ne vpliva na fluidnost membran.

6 POVZETEK

Ostreolizin, citolitični protein iz užitne gobe bukov ostrigar (*P. ostreatus*), spada v egerolizinsko družino citolitičnih proteinov. Njegova biološka vloga je verjetno v regulaciji razvoja in v naravi verjetno nima vloge toksina. V nanomolarnih koncentracijah deluje hemolitično, njegova aktivnost pa je močno inhibirana ob dodatku nenasičenih lipidov. Veže se na membrane, ki vsebujejo sfingomielin in holesterol, ter specifično prepoznava s holesterolom obogatene lipidne mikrodomene oz. lipidne rafte, ki so v tekoči urejeni fazi. Namen diplomskega dela je bil ugotoviti povezavo med domensko strukturo membran veziklov iz SM in CH (v različnih razmerjih) z membransko aktivnostjo Oly. Poslužili smo se metode elektronske paramagnetne resonance (EPR). Raziskave so pokazale, da v veziklih hkrati obstajajo trije tipi različnih membranskih domen: najbolj urejena domena, srednje urejena domena ter najmanj urejena domena, ki je najbolj fluidna. Slika GHOST diagramov veziklov z vsebnostjo CH manjšo od 30 % molskega deleža kaže zvezno povezanost vseh treh različnih tipov domen. Za razliko od nje slika GHOST diagramov veziklov z vsebnostjo CH nad 30 % molskega deleža kaže na jasno ločitev najbolj urejene domene od ostalih dveh manj urejenih domen. Ta domena domnevno ustreza l_o fazi. Glede na predhodne raziskave, povezane s proučevanjem membranske aktivnosti ostreolizina, sklepamo, da je ta značilni vzorec jasno ločene najbolj urejene domene s pripadajočimi karakteristikami skupek oz. platforma, na katero se ostreolizin uspešno veže. Z metodo EPR smo dokazali tudi vpliv POPC v ternarni lipidni mešanici SM : CH : POPC. Le-ta vliva na zmanjšanje deleža najbolj urejene domene. Spremljali smo tudi temperaturno odvisnost in ugotovili, da se urejenost membran manjša z naraščanjem temperature.

7 VIRI

<http://www.bf.uni-lj.si/bi/biokemija>

<http://www.avantilipids.com>

Bakrač B. (2005): Proučevanje strukture membranskih domen lipidnih veziklov z elektronsko paramagnetno resonanco. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.

Barloy F., Lecadet M. M., Delecluse A. (1998): Cloning and Sequencing of Three New Putative Toxin Genes from *Clostridium bifermentans*. *Gene* 211: 293–299.

Berne S., Križaj I., Pohleven F., Turk T., Maček P. in Sepčič K. (2002): *Pleurotus* and *Agrocybe* Hemolysins, New Proteins Hypothetically Involved in Fungal Fruiting. *Biochim. Biophys. Acta*, 1570: 153–159.

Berne S., Sepčič K., Anderluh G., Turk T., Maček P., Poklar Ulrich N. (2005): Effect of pH on the Pore Forming Activity and Conformational Stability of Ostreolizin, a Lipid Raft-binding Protein From the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*, *Biochemistry* 44 11137–11147.

Brown D. A. in London E. (2000): Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.*, 275, 23: 17221–17224.

Curtain C. C. in Gordon L. M. (1984): ESR Spectroscopy of Membranes. *Membranes, Detergents and Receptor Solubilization*: 177–213.

De Almeida R. F., Loura L. M., Fedorov A., Prieto M. (2005): Lipid Rafts have Different Sizes Depending on Membrane Composition: A time-resolved Florescence Resonance Energy Transfer Study. *J. Mol. Biol.* 346:1109–1120.

Dolgan K. (2003): Raziskave interakcij hemolitičnega proteina iz bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*) z lipidnimi membranami. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.

Ebina K., Sakagami H., Yokota K., Kondo H. (1994): Cloning and Nucleotide Sequence of cDNA Encoding Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1219, 148–150.

Edidin M. (2003): The State of Lipid Rafts: From Model Membranes to Cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 32: 257–283.

Ishitsuka, R., Sato, S.B., Kobayashi, T., 2005. Imaging lipid rafts. *J. Biochem.* 137, 249-254.

Lichtenberg D., Goni M. F. in Heerklotz H. (2005): Detergent-resistant Membranes Should not be Identified with Membrane Rafts. *Trends Biochem Sci.*, 30: 430–436.

London E. (2002): Insight into Lipid Raft Structure and Formation From Experiments in Model Membranes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12: 480–486.

Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. (2003): Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition. McGraw-Hill Companies, 421: ISBN-0-07-121766-5

Pike L. J. (2004): Lipid rafts: Heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* 378: 281–292.

Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Waheed, A.A. Hayashi, M., Inomata, M., Nakamura, M., Maruya, M., Iwashita, S., 2004. Perfringolysin O, a cholesterol-binding cytolysin, as a probe for lipid rafts. *Anaerobe* 10, 125-134.

Rebolj K., Poklar Ulrih N., Maček P., Sepčič K. (2006): Steroid structural requirements for interaction of ostreolysin, a lipid-raft binding cytolysin, with lipid monolayers and bilayers, *Biochem. Biophys. Acta.* 1758: 1662–1670.

Sakurai N., Kanako J., Kamio Y., Tomita T. (2004): Cloning, expression, and pore-forming properties of mature and precursor forms of pleurotolysin, a sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1679, 1: 65–73.

Sepčič K., Berne S., Potrich C., Turk T., Maček P. in Menestrina G. (2003): Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. *Eur. J. Biochem.*, 270: 1199–1210.

Sepčič K., Berne S., Rebolj K., Batista U., Plemenitaš A., Šentjurc M., Maček P. (2004): Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interacts specifically with membrane cholesterol-rich domains, *FEBS Lett.* 575: 81–85.

Simons K., Ikonen E. (1997): Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387: 569–572.

Simons K., Ehehalt R. (2002): Cholesterol, lipid rafts, and diseases, *J. Clin. Invest.* 110: 597–603.

Smondyrev A. M., Berkowitz M., L., (1999): Structure of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations: Molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* 77: 2075-2089.

Subczynski W. K., Kusumi A. (2003): Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: Approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1610: 231–243.

Šentjerc M. in Štalc A. (1976): Uporaba elektronske paramagnetne resonance v biologiji in medicini. *Med. razgl.* 15: 259–279.

Šentjerc M., Štrancar J., Koklič T. (2002): Membrane domain alteration under the action of biologically active substances: an EPR study. *Curr. Top. Biophys.* 26, 1: 65–73.

Štrancar J., Šentjerc M., Schara M. (2000): Fast and accurate characterization of biological membranes by EPR spectral simulation of nitroxides. *J. Magn. Res.* 142: 254–265.

Žužek M. C., Maček P., Sepčič K., Cestnik V., Frangež R. (2006): Toxic and lethal effects of ostreolysin, a cytolytic protein from edible oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), in rodents, *Toxicon*, 48: 264–271.

ZAHVALA

Kristina, če bi človek imel priložnost spoznati osebo, ki v sebi skriva vsaj delček tvoje dobrote, plemenitosti, nasmehov, ki jim ni konca, energije in upanja, bi bil srečnejši in zaradi tega svet lepši. Hvala, da sem ob tebi lahko spoznala, da še obstajajo takšni ljudje in da svet le ni sestavljena tekmovalnosti in prevzetnosti.

Za ves trud, pomoč in skrbnost pri izdelavi moje diplomske naloge se iskreno zahvaljujem svoji mentorici, prof. dr. Kristini Sepčič ter somentorici, dr. Marjeti Šentjunc. Hvala za vse pojasnjene nerazumljivosti in neštete odgovore.

Zahvala tudi Katji Rebolj ter ostalim članom Katedre za biokemijo. Hvala Sandri Kure za nesebično pomoč, te je bilo veliko. Predvsem hvala za prijetne pogovore in voljo, da sem se vračala znova in znova. Hvala tudi vsem ostalim z oddelka IJŠ, ki so mi pomagali pri samem delu in me navdihovali z novimi idejami. Zdaj vem kakšno je življenje mladega znanstvenika.

Iskrena hvala vsem članom komisije, ki so mi v tako kratkem času omogočili pot do uresničitve.

Iskrena hvala mojim staršem za vzpodbudo, podporo in razumevanje skozi celoten študij. Zahvala mojim prijateljem, sošolcem, kljub črnim trenutkom nam je končno uspelo.

In na koncu, hvala tebi Miha. Tu ostajam brez besed in puščam prazne strani. Teh je premalo.