

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nina KODRIČ

**VPLIV MODIFIKACIJE POLARNE SKUPINE HOLESTEROLA NA
TVORBO TEKOČE UREJENE LIPIDNE FAZE IN VEZAVO
CITOLITIČNEGA PROTEINA OSTREOLIZINA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF MODIFICATION OF THE CHOLESTEROL POLAR
GROUP ON LIQUID ORDERED LIPID PHASE FORMATION AND
BINDING OF THE CYTOLYTIC PROTEIN OSTREOLYSIN**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja imenovala prof. dr. Kristino Sepčič in za recenzenta prof. dr. Petra Mačka.

Mentorica: prof. dr. Kristina Sepčič

Recenzent: prof. dr. Peter Maček

Komisija za oceno in zagovor diplomske naloge:

Predsednik: prof. dr. Ines Mandić Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Kristina Sepčič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter Maček
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 13.10.2006

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nina Kodrič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.1+577.3:547.92:547.96(043)=863
KG ostreolizin / *Pleurotus ostreatus* / holesterol / steroidi / tekoča urejena lipidna faza / protein, ki tvori pore
AV KODRIČ, Nina
SA SEPČIČ, Kristina (mentorica)/MAČEK, Peter (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2006
IN VPLIV MODIFIKACIJE POLARNE SKUPINE HOLESTEROLA NA TVORBO TEKOČE UREJENE LIPIDNE FAZE IN VEZAVO CITOLITIČNEGA PROTEINA OSTREOLIZINA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 49 str., 5 preg., 17 sl., 62 vir.
JI sl/an
IJ sl
AI Steroli naravnega izvora imajo različno sposobnost urejanja fosfolipidov in tvorbe urejenih membranskih domen (lipidnih raftov). V membrani se orientirajo tako, da je njihov polarni del (hidroksilna skupina na mestu C3) obrnjen proti vodni fazi. Ostreolizin, citolitični protein užitne gobe bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*), se specifično veže na raftom podobne domene v naravnih in umetnih bioloških membranah. V tej nalogi smo preučevali vpliv modifikacije hidroksilne (-OH) skupine na mestu C3 dveh sintetičnih steroidov (holesteril-acetatu in 5-holesten-3-onu) v primerjavi s holesterolom. S posrednimi in neposrednimi metodami vezave ostreolizina na membranske mono- in dvosloje, sestavljene iz sfingomielina in steroidov v molskem razmerju 1/1, metodami za ugotavljanje njegove litične aktivnosti ter metodo raztapljanja membran z detergentom Triton X-100 smo dokazali, da imajo steroidi z modificirano -OH skupino na mestu C3 slabšo sposobnost za tvorbo urejenih domen kot holesterol, ki ima na tem mestu nespremenjeno -OH skupino. V nasprotju z membranami, ki vsebujejo holesterol, se ostreolizin ne veže in ne lizira membran, ki vsebujejo na ta način modificirane steroide.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.1+577.3:547.92:547.96(043)=863
CX ostreolysin / *Pleurotus ostreatus* / cholesterol / steroids / liquid ordered lipid phase/
pore forming protein
AU KODRIČ, Nina
AA SEPČIČ, Kristina (supervisor)/MAČEK, Peter (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2006
TI EFFECT OF MODIFICATION OF THE CHOLESTEROL POLAR GROUP ON
LIQUID ORDERED LIPID PHASE FORMATION AND BINDING OF THE
CYTOLITIC PROTEIN OSTREOLYSIN
DT Graduation thesis (university studies)
NO IX, 49 p., 5 tab., 17 fig., 62 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Sterols of natural origin have different ability to order phospholipids in biological membranes and to promote ordered lipid domain (rafts) formation. In the phospholipid bilayer, steroids are oriented with their polar hydroxyl group facing the aqueous phase. Ostreolysin, a pore forming cytolytic protein from the edible oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*, specifically binds raft-like ordered domains of the natural or artificial membranes. In this study, we explored the effect on modification of the steroid –OH group in two synthetic steroids (cholesteryl-acetate and 5-cholesten-3-one) on liquid ordered lipid phase formation and binding of ostreolysin to lipid vesicles with different lipid composition. We used different indirect and direct methods for investigating the binding ability of ostreolysin and its lytic activity on the lipid mono- and bilayers that consisted of SM and steroid in a 1/1 molar ratio, and solubilization of membranes with detergent Triton X-100. We confirmed that modification of the cholesterol –OH group attached to the C3-position have deleterious effect on the ability of steroid to promote ordered lipid domains formation. In contrast with membranes that contain cholesterol, ostreolysin was found to be completely inactive in vesicles, containing such modified steroids.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 STRUKTURA BIOLOŠKE MEMBRANE	3
2.1.1 Pomembni lipidi v bioloških membranah	4
2.2 LIPIDNI RAFTI	7
2.3 VPLIV STRUKTURE RAZLIČNIH STEROLOV NA SPOSOBNOST TVORBE UREJENIH MEMBRANSKIH DOMEN	9
2.4 VPLIV HIDROKSILNE (-OH) SKUPINE HOLESTEROLA NA TVORBO UREJENIH MEMBRANSKIH DOMEN	10
2.5 CITOLITIČNI PROTEINI, KI SE VEŽEJO NA LIPIDNE RAFTE	12
2.5.1 Lizenin	12
2.5.2 Perfringolizin	13
2.5.3 Stiholizin	13
2.5.4 Ostreolizin	14
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema	16
3.1.2 Uporabljeni lipidi	16
3.1.3 Rastopine	17
3.1.4 Laboratorijska oprema	18
3.2 METODE	18

3.2.1	Izolacija ostreolizina	18
3.2.2	Priprava soniciranih unilamelarnih veziklov (SV)	19
3.2.3	Priprava soniciranih unilamelarnih veziklov (SV) s kalceinom	19
3.2.4	Določanje velikosti veziklov	19
3.2.5	Raztapljanje lipidnih veziklov z detergentom Triton X-100	20
3.2.6	Metode za določanje vezave ostreolizina	20
3.2.6.1	Test inhibicije hemolize	20
3.2.6.2	Določanje vezave ostreolizina na lipidne vezikle z SDS/PAGE elektroforezo	21
3.2.6.3	Površinska plazmonska resonanca (SPR)	21
3.2.7	Metode za določanje litične aktivnosti ostreolizina	24
3.2.7.1	Test tvorbe por s sproščanjem kalceina	24
4	REZULTATI	26
4.1	DOLOČANJE VELIKOSTI LIPIDNIH VEZIKLOV	26
4.2	RAZTAPLJANJE LIPIDNIH VEZIKLOV Z DETERGENTOM TRITON X-100	26
4.3	TEST INHIBICIJE HEMOLIZE	27
4.4	DOLOČANJE VEZAVE OSTREOLIZINA Z SDS-PAGE ELEKTROFOREZO	28
4.5	POVRŠINSKA PLAZMONSKA RESONANCA	29
4.6	TEST TVORBE POR S SPROŠČANJEM KALCEINA	32
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	35
5.1	RAZPRAVA	35
5.2	SKLEPI	38
6	POVZETEK	40
7	SUMMARY	41
8	VIRI	42

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljene kemikalije in oprema	16
Preglednica 2: Uporabljeni lipidi	16
Preglednica 3: Uporabljene raztopine	17
Preglednica 4: Uporabljena laboratorijska oprema	18
Preglednica 5: Velikost (premer) veziklov, sestavljenih iz mešanice sfingomielina (SM) in različnih steroidov v molskem razmerju razmerju 1/1. Podane so srednje vrednosti treh meritev in ustrezne standardne napake	26

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura biološke membrane (Boyer, 2005)	3
Slika 2: Kemijska struktura molekule holesterola (Nelson D.L in Cox M.M., 2000)	5
Slika 3: 3D struktura molekule holesterola (Sterols, 2000)	5
Slika 4: Kemijska in 3D struktura molekule sfingomielina (Nelson D.L in Cox M.M., 2000)	6
Slika 5: Kemijske in 3D struktura molekule fosfatidilholina (Nelson D.L in Cox M.M., 2000)	6
Slika 6: Shematski prikaz lipidnih raftov v plazemski membrani (Martin in sod., 2005)	7
Slika 7: Strukture holesterola in steroidov z modificirano -OH skupino, ki smo jih uporabili pri meritvah	17
Slika 8: Delovanje aparata Biacore (Tehnologija BIACORE)	22
Slika 9: Raztapljanje veziklov, sestavljenih iz mešanice sfingomielina in sterolov z različno modificirano -OH skupino, z detergentom Triton X-100	27
Slika 10: Odvisnost recipročnega časa polovične hemolize ($1/t_{50}$) od koncentracije veziklov. Vpliv modifikacije -OH skupine sterolov v lipidnih veziklih (SV) na inhibicijo hemolize.	28
Slika 11: SDS/PAGE; Vezava ostreolizina. (A) Sediment (osterolizin vezan na vezikle), (B) Supernatant (prosti ostreolizin)	29
Slika 12: SPR; Splošni prikaz različnih faz senzorgrama	30
Slika 13: SPR; Primarni senzorgrami (polna linija) in najboljša prilagajanja (črtkana linija)	30
Slika 14: SPR; Korigirani senzorgrami po odštevanju odziva, ki je nastal zaradi spremembe refrakcijskega indeksa. Vezava ostreolizina ($20 \mu\text{M}$) na lipidne monosloje, sestavljene iz mešanice sfingomielina in različnih steroidov v razmerju 1/1	31
Slika 15: Časovni potek sproščanja kalceina iz veziklov, sestavljenih iz mešanice sfingomielin/steroid v molskem razmerju 1/1, pri $6,7 \mu\text{M}$ dodanem ostreolizinu	32
Slika 16: Odstotek sproščenega kalceina iz veziklov, sestavljenih iz mešanice SM/steroid v molskem razmerju 1/1 od koncentracije dodanega ostreolizina	33

Slika 17: Vpliv koncentracije ostreolizina na konstanto hitrosti (k)

34

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
C	atom ogljika
DOPC	dioloil fosfatidilholin
DPPC	dipalmitoil fosfatidilholin
DRM	na detergent odporne membrane (ang. detergent resistant membranes)
EDTA	etilendiamin tetraacetat
GPI	glikozilfosfatidilinozitol sidriščni proteini (ang. glycosylphosphatidylinositol - anchored proteins)
HCl	klorovodikova kislina
Hol-Ac	holesteril acetat
Hol-on	5-holesten-3-on
HE	hemolitična enota
IC ₅₀	koncentracija veziklov, ki povzroči 50% inhibicijo hemolize
kDa	kilodalton
L _d	tekoča neurejena faza (ang. liquid disordered phase)
LDL	lipoproteini z nizko gostoto (ang. low-density lipoprotein)
L _o	tekoča urejena faza (ang. liquid ordered phase)
MLV	multilamelarni vezikli
-OH	hidroksilna skupina
Oly	ostreolizin
PC	fosfatidilholin
PCS	fotonska korelacijska spektroskopija (ang. photon correlation spectroscopy)
rpm	obrat na minuto (ang. rounds per minute)
RU	rezonančna enota (ang. resonance unit)
S	trdna urejena faza (ang. solid phase)
SM	sfingomielin
SPR	površinska plazmonska resonanca (ang. surface plasmon resonance)
SV	sonicirani unilamelarni vezikli
t ₅₀	čas, potreben za 50% hemolizo

T_m	temperatura faznega prehoda iz trdne v tekočo kristalično fazo (ang. melting temperature)
Tris	tris (hidroksimetil) aminometan

1 UVOD

Biološke membrane si predstavljamo kot mozaik mikrodomen, ki plavajo v fluidnem matriksu. Domene, bogate s holesterolom, sfingomielinom in nasičenimi glicerolfosfatidi imenujemo lipidni rafti. Ti vsebujejo tudi specifične proteine, predvsem GPI-sidriščne proteine, ki so kovalentno vezani na nasičene acilne verige lipidov in glikosfingolipide.

Nastanek raftov inducirajo membranski steroli, ki zabrišejo fazne prehode in spremenijo fizikalno stanje membrane v tako imenovano tekočo urejeno fazo. Učinkovitost njene tvorbe je odvisna tako od strukture sterolov kot tudi od strukture sosednjih fosfolipidov. Tekoča urejena faza je fizikalno stanje, v katerem se nahajajo rafti.

Lipidni rafti sodelujejo pri celični signalizaciji, membranskem transportu, razvrščanju lipidov in proteinov, apoptozi, endocitozi, so vstopna mesta nekaterih intracelularnih parazitov in ostalih patogenov idr. Poleg tega pa so rafti pomembna prepoznavna mesta nekaterih citolitičnih proteinov, med katerimi je tudi ostreolizin iz užitne gobe bukov ostrigar.

1.1 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

V okviru diplomske naloge smo želeli preučiti, kako modifikacije hidroksilne (-OH) skupine holesterola na mestu C3 vplivajo na sposobnost tvorbe urejenih membranskih domen, oz. tekoče urejene lipidne faze. V ta namen smo pripravili vezikle iz različnih lipidnih mešanic sfingomielin/steroid v molarnem razmerju 1/1. Uporabili smo tri vrste steroidov: holesterol ter dva sintetična steroida, to je; holesteril-acetat in 5-holesten-3-on, ki imata modificirano -OH skupino na mestu C3. Želeli smo tudi podrobneje raziskati, kako prisotnost tovrstnih modificiranih steroidov vpliva na vezavo in permeabilizacijsko aktivnost ostreolizina.

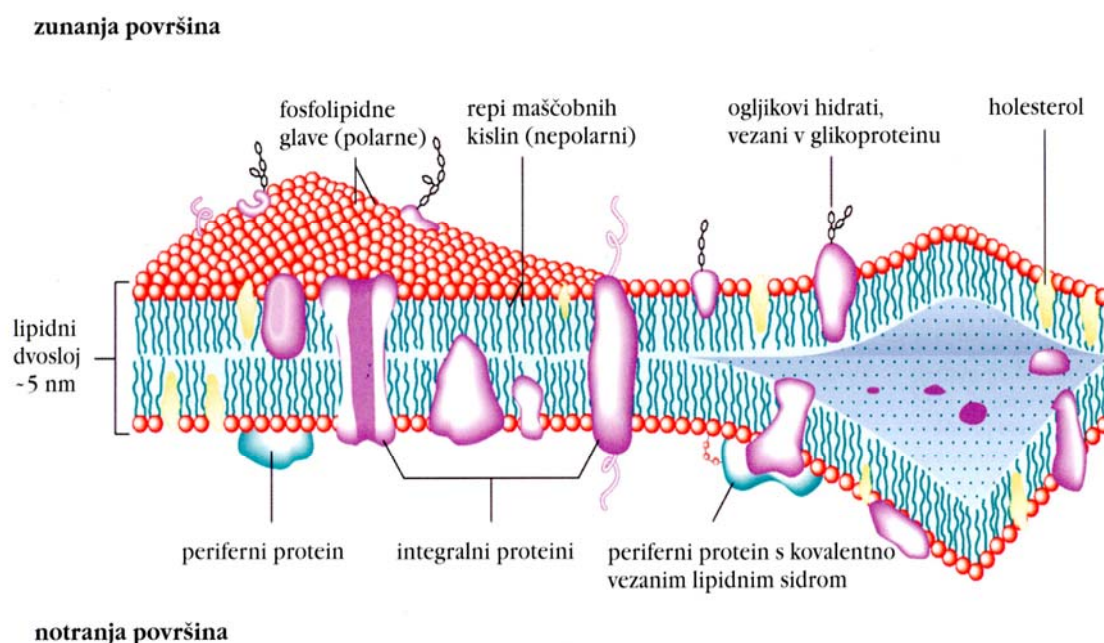
Hkrati je kolegica Anja Žiberna v okviru svoje diplomske naloge ugotavljala vpliv vezave ostreolizina na lipidne vezikle, kjer je uporabila sterole naravnega izvora z različno modificiranim ogljikovim skeletom.

Rezultati obeh nalog naj bi pojasnili strukturne determinante steroidov, ki so odgovorne za tvorbo tekoče urejene faze in posledično za membransko aktivnost ostreolizina. Izsledki bi lahko pomagali pri razumevanju mehanizma vezave ostreolizina na lipidne membrane in njegove morebitne uporabe kot označevalca za urejene membranske domene (tekočo urejeno fazo) in za lipidne rafte.

2 PREGLED OBJAV

2.1 STRUKTURA BIOLOŠKE MEMBRANE

Biološke membrane evkariontskih celic si predstavljamo kot mozaik različnih mikrodomen z različno lipidno in proteinsko sestavo ter različnimi fizikalnimi lastnostmi (Brown in London, 2000). V membranah sesalčnih celic so prisotni glicerolfosfatidi in sfingolipidi, ki se razlikujejo v strukturi polarne skupine in strukturi acilnih verig. V vsakem tipu celice je lahko prisotnih več kot tisoč različnih vrst fosfolipidov, med katerimi so najpomembnejši in večinsko najbolj zastopani sfingomielin (SM) in fosfatidilholin (PC). Slednji predstavlja več kot 50% vseh membranskih fosfolipidov (Ohvo-Rekilä in sod., 2002).



Slika 1: Struktura biološke membrane. Membrana je sestavljena iz lipidnega dvosloja z vključenimi integralnimi in perifernimi proteini (Boyer, 2005)

V membranah se istočasno nahajajo domene v tekoči neurejeni fazi (L_d), ki so bogate z lipidi z nizko temperaturo prehoda (T_m), in domene v trdni urejeni fazi (S), bogate z lipidi z visoko T_m . Pod T_m je difuzija lipidnih molekul počasna. T_m je odvisna od strukture acilnih verig in polarne skupine lipidov. T_m narašča z naraščajočo dolžino acilnih verig in stopnjo njihove nasičenosti ter se znižuje z naraščajočo nenasičenostjo lipidov. V trdni urejeni fazi so prisotni predvsem lipidi z dolgimi nasičenimi acilnimi verigami, zlasti sfingolipidi, ki imajo običajno visoke T_m , v tekoči fazi pa prevladujejo glicerofosfolipidi z mono- ali

polinenasičenimi acilnimi verigami in nižjo T_m . Prisotnost holesterola (Hol) in ostalih sterolov, ki se tesno pakirajo med fosfolipidi in jih kondenzirajo, je razlog za pojav vmesne faze, tekoče urejene faze (L_o). Lipidi v tej fazi so tesno pakirani, vendar imajo še vedno sposobnost hitrega lateralnega premikanja (London, 2002).

Steroli so prisotni v vseh evkariontskih celicah in imajo pomembno vlogo pri regulaciji fizioloških lastnosti bioloških membran (Simons in Ikonen, 2000; Ohvo-Rekila in sod., 2002). Prisotnost različnih sterolov v različnih membranah kaže na njihovo specializirano funkcijo (Li in sod., 2003). Sterol je lahko "membransko aktiven" oz. spreminja fizikalno-biološke lastnosti membrane, kadar izpolnjuje naslednje strukturne lastnosti; ima β -OH skupino na mestu C3, sklenjen steroidni skelet, holesterolu podobno alkilno verigo ter relativno majhno površino ($<40 \text{ \AA}^2/\text{molekulo}$), ki meji na vodo oz. zrak (Barenholz, 2002).

2.1.1 Pomembni lipidi v bioloških membranah

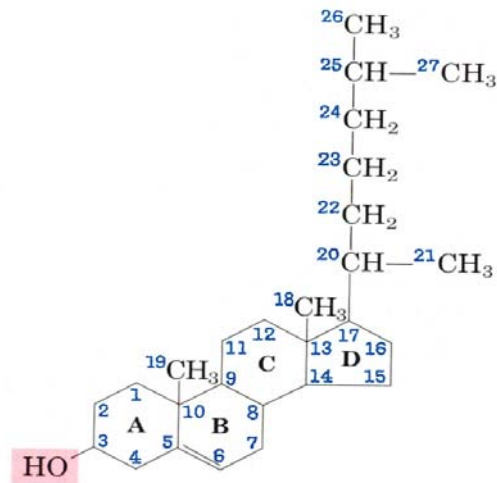
Holesterol (Hol)

Hol je v veliki količini prisoten v mikrodomenah, znanih kot lipidni rafti, kar je ena izmed njegovih najpomembnejših strukturnih funkcij (Brown in Rose, 1992; Simons in Ikonen, 1997; Brown in London, 2000).

Molekulo Hol sestavlja steroidni skelet oz. 4 sklenjeni obroči (trije šestčlenski; A, B in C in en petčlenski obroč; D) z dvojno vezjo med atomoma C5 in C6 (obroč B), -OH skupino na mestu C3 (obroč A), ter izooktilno stransko verigo na mestu C17 (obroč D) (Slika 2).

Obroči so v trans konfiguraciji, kar naredi molekulo planarno in rigidno, izjema je njena izooktilna stranska veriga, ki je fleksibilna.

Hidroksilna skupina je zelo pomembna, saj daje molekuli, ki bi bila sicer hidrofobna, amfifilni značaj, poleg tega pa omogoča njeno orientacijo v membrani in tvorbo vodikovih vezi med molekulami Hol in molekulami vode ter z drugimi lipidnimi molekulami. Hol se v fosfolipidnih dvoslojih orientira tako, da je s polarno -OH skupino obrnjen proti vodni fazi, s hidrofobnim steroidnim obročem pa je zakopan v verige membranskih fosfolipidov (Boyer, 2002). V membranah se Hol tesno povezuje s fosfolipidi in sfingolipidi, ki imajo nasičene acilne verige (Xu in London, 2000).



Slika 2: Kemijska struktura molekule holesterola. Sestavljen je iz steroidnega skeleta (obroči označeni z A, B, C in D), polarne –OH skupine ter izooktilne stranske verige. Ogljikovi atomi so oštevilčeni z modrim (Nelson in Cox, 2000)

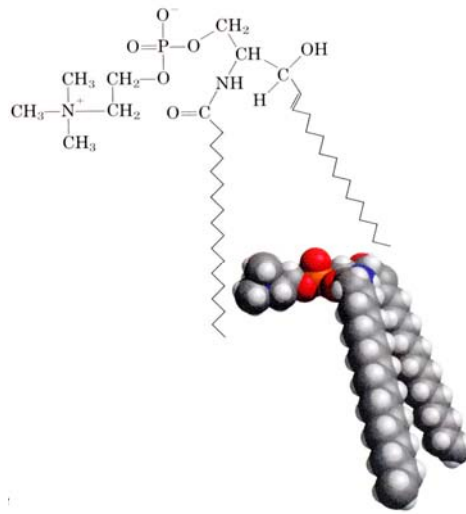


Slika 3: 3D struktura molekule holesterola (Sterols, 2000).

Sfingomielin (SM)

Sfingolipidi so esencialni za obstoj evkariontskih celic kot strukturna komponenta njihovih membran, funkcionirajo pa tudi kot sekundarni obveščevalci. Več kot polovica celičnega SM (Slika 4) je skoncentrirana v plazemski membrani, kjer je tako kot PC prisoten na njeni zunanji polovici.

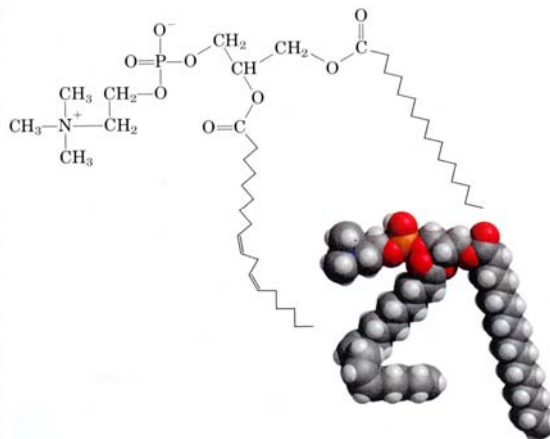
Hol preferenčno tvori interakcije s sfingolipidi, kar je osnova za nastanek lipidnih raftov v plazemski membrani (Ohvo-Rekilä in sod, 2002).



Slika 4: Kemijska in 3D struktura molekule sfingomielina (Nelson in Cox,2000)

Fosfatidilholin (PC)

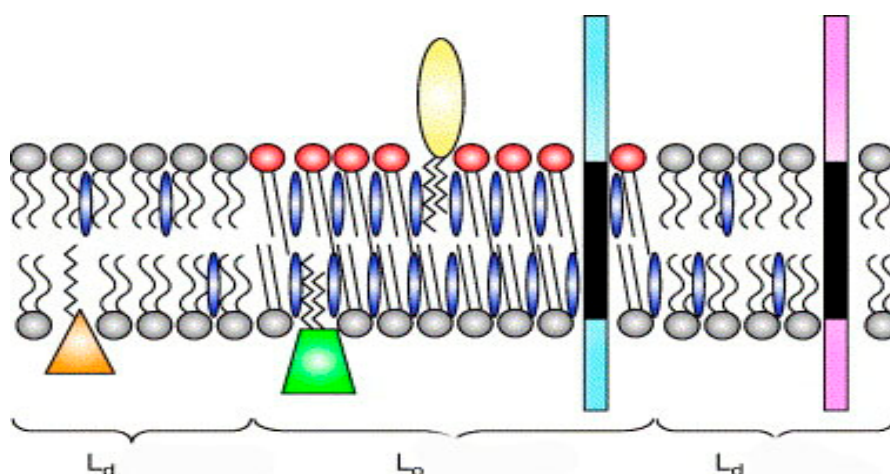
PC (Slika 5) je po svojih funkcijah zelo podoben SM. Njegova najpomembnejša vloga je vzdrževanje strukture celičnih membran, sodeluje pa tudi v celični signalizaciji in je prisoten v serumskih lipoproteinih. Skoncentriran je na zunanji polovici plazemske membrane (Ohvo-Rekilä in sod, 2002).



Slika 5: Kemijske in 3D struktura molekule fosfatidilholina (Nelson in Cox, 2000)

2.2 LIPIDNI RAFTI

Lipidni rafti so domene bogate s Hol in sfingolipidi, v katerih pa so prisotni tudi GPI-sidrišni proteini, ki so kovalentno vezani na nasičene acilne verige lipidov in glikosfingolipide v membrani, zelo malo pa je transmembranskih proteinov (Slika 6) (Xu in sod., 2001).



Slika 3: Shematski prikaz lipidnih raftov v plazemski membrani. Lateralne interakcije med sfingolipidi (rdeči krogi) in steroli (modre elipse) omogočajo nastanek tekoče urejene faze (L_0), ki se strukturno razlikuje od tekoče neurejene faze (L_d), ki jo obdaja (Martin in sod., 2005)

Lipidni rafti se nahajajo v tekoči urejeni fazi (L_0 -liquid ordered phase), v kateri je prisotna visoka stopnja tesnega pakiranja membranskih lipidov, hkrati pa je omogočena njihova lateralna difuzija, ki je sicer značilna za tekočo neurejeno fazo. Lipidni rafti v tekoči urejeni fazi so v ravnini membranskega dvosloja obdani z nenasičenimi glicerofosfolipidi v tekoči neurejeni fazi (London, 2002). Za njihov nastanek je potreben Hol v molskih frakcijah višjih od 0,25. (Edidin, 2003; Silvius, 2003). V modelnih membranah, ki vsebujejo mešanice Hol in SM ali Hol in nasičeni PC, povzroči naraščajoča vsebnost Hol (nad 0,25 molske frakcije) tesno povezovanje lipidov, kar dramatično zmanjša njihovo lateralno elastičnost (Evans in Needham, 1987; Needham in Nunn, 1990; McIntosh in sod., 1992; Li in sod., 2001; London, 2002).

Hol preferenčno tvori interakcije s sfingolipidi, zlasti z SM, saj je popolnoma nasičena veriga sfingolipida v interakciji s celotno dolžino s steroidnimi obroči (prevladujejo

privlačne van der Waalsove interakcije), poleg tega pa se verjetno tvori vodikova vez med -OH skupino molekule Hol in molekulo ceramida pri sfingolipidu (Ohvo-Rekilä in sod, 2002).

Zaradi odpornosti na raztapljanje z mrzlim detergentom Triton X-100 imenujemo rafte tudi na detergent odporne membrane (DRM-detergent resistant membranes) (London in Brown, 2000).

Visoka stopnja pakiranja molekul znotraj tekoče urejene faze v mešanici Hol/sfingolipid je ključna lastnost, ki daje raftom odpornost na raztapljanje z detergentom Triton X-100 in hkrati omogoča lateralno lokalizacijo ključnih sidriščnih membranskih proteinov (Schroeder in sod., 1994, Schroeder in sod., 1998; Ahmed in sod., 1997; Brown, 1998). Z metodami gašenja fluorescence na kratke razdalje so na primeru mešanice PC/sterol ter SM/Hol ugotovili, da obstaja pozitivna korelacija med stopnjo pakiranja lipidov in stopnjo netopnosti v detergentu (London, 2002).

Kakorkoli, rezultati novejših raziskav nakazujejo na to, da pojma na detergent odporne membrane (DRM) le ne moremo popolnoma enotiti z lipidnimi rafti in domenami v L_o -fazi (Lichtenberg in sod., 2005), saj so dokazali, da dodatek detergenta inducira tvorbo DRM. L_o -faze so v primerjavi z L_d -fazo bolj odporne na raztapljanje z detergentom, vendar pa jih ne moremo enačiti z DRM (Lichtenberg in sod., 2005).

Lipidni rafti so večinoma majhni (sestavljani iz 15-30 molekul Hol in SM) in nestabilni, vendar pa zavzamejo veliko površino membrane. Take rafte imenujemo tudi osnovni rafti. Ob stimulaciji celic z ekstracelularnimi signali se majhnim lipidnim raftom pridružijo GPI-receptorji in transmembranski proteini, ki imajo veliko afiniteto do Hol in SM, ter se med seboj povežejo in oligomerizirajo. Tako nastanejo stabilni receptorski rafti ali združeni rafti z življenjskim časom več kot 1 min. Receptorski rafti pa lahko oblikujejo še večje prehodne rafte z življenjsko dobo manj kot 1 s (Subczynski in Kusumi, 2003). Rafti v odvisnosti od funkcionalnih potreb celice hitro nastajajo, rastejo in izginjajo, njihovi regulatorji so proteini (Edidin, 2003). Po novejših teorijah so rafti naravno prisotni v celici, vendar pa natančna velikost, ki je potrebna, da lahko membranske domene obravnavamo kot lipidne rafte, zaenkrat ostaja nepoznana, prav tako ne poznamo njihovega natančnega

življenjskega časa. Obstoj raftov je za razliko od DRM popolnoma neodvisen od uporabe detergentov.

Tudi nekateri rastlinski steroli (sitosterol, stigmasterol) in steroli gliv (ergosterol) lahko tvorijo lipidne rafte v membranah rastlinskih in glivnih celic (Xu in sod., 2001; Martin in sod., 2005; Wachtler in sod., 2006).

2.3 VPLIV STRUKTURE RAZLIČNIH STEROLOV NA SPOSOBNOST TVORBE UREJENIH MEMBRANSKIH DOMEN

Iz literature je znano, da se različni steroli razlikujejo glede na sposobnost tvorbe urejenih membranskih domen (Dahl, 1981; Xu in sod., 2001; Wang in sod., 2004; Xu in London, 2000; Hallig in Slotte, 2004; Yeagle in sod., 1977; Hsuch in sod., 2004; Keller in sod., 2004; Wenz in Barrantes, 2003; Barenholz in Ben.Yashar, 1989). Ta je odvisna od strukture sterolov: zgradbe njihove alifatske verige, odsotnosti dvojne vezi oziroma prisotnosti dodatnih dvojnih vezi, od prisotnosti dodatnih alkilnih skupin ter od prisotnosti ali odsotnosti izooktilne verige. Dvojna vez med C7 in C8 (za razliko od Hol, kjer je med C5 in C6) poveča sposobnost za tvorbo urejenih domen (Wang in sod., 2004). Ergosterol in 7-dehidroholesterol tvorita urejene domene celo bolj učinkovito kot Hol zaradi dvojne vezi na mestu med C7 in C8 (Xu in sod., 2001, Wang in sod., 2004). Dvojna vez med C4 in C5 (aloholesterol) pa v primerjavi s Hol zmanjša sposobnost za njihovo tvorbo (Wang in sod., 2004). Steroli, ki vsebujejo dve dvojni vezi in sicer med C4 in C5 ter med C6 in C7 ne tvorijo urejenih domen (Wang in sod., 2004).

Steroli s krajšo alifatsko verigo imajo manjšo sposobnost za tvorbo urejenih domen. Prisotnost izooktilne stranske verige na C17 ter odsotnost dodatnih ogljikovih atomov, vezanih na C23 povečuje sposobnost za tvorbo urejenih domen (Wenz in Barrantes, 2003). Rastlinski steroli (kampesterol, β -sitosterol, stigmasterol) imajo v primerjavi s Hol slabšo sposobnost za tvorbo interakcij z membranskimi fosfolipidi in za tvorbo urejenih domen. Sitosterol je nekoliko bolj učinkovit od stigmasterola. Pri obeh je slabša sposobnost tvorbe domen verjetno posledica razvejane alifatske verige (Hallig in Slotte, 2004).

Kampesterol ima na mestu C24 dodano metilno skupino, β -sitosterol in stigmasterol pa imata na tem mestu etilno skupino. Stigmasterol vsebuje še dodatno dvojno vez na mestu med C22 in C23, na osnovi česar avtorja sklepata, da alkilna skupina na C24 in prisotnost dvojne vezi med C22 in C23 zmanjšajo sposobnost za tvorbo domen. Sposobnost tesnega pakiranja membranskih fosfolipidov pri rastlinskih sterolih pada v naslednjem vrstnem redu: Hol>kampesterol> β -sitosterol>stigmasterol (Hallig in Slotte, 2004). Dodatni metilni skupini na sterolnem obroču na C4, kot npr. pri lanosterolu, zmanjšata sposobnost tvorbe urejenih membranskih domen (Yeagle in sod., 1977; Xu in sod., 2000).

Na tvorbo raftov pa vpliva tudi struktura sfingolipidov, ki obdajajo sterolne molekule. Ceramidi imajo veliko sposobnost za tvorbo urejenih membranskih domen (Xu in sod., 2001). Že majhne količine ceramida (3 mol %) močno povečajo stabilnost lipidnih raftov (Xu in sod., 2001). Urejene lipidne domene, ki vsebujejo cerebrozide so zelo stabilne in relativno neobčutljive na spremembo strukture sterolov (London, 2002). To bi lahko pomenilo, da ceramid v določenih pogojih *in vivo* nadomesti prisotnost Hol (Xu in sod., 2001).

2.4 VPLIV HIDROKSILNE (-OH) SKUPINE HOLESTEROLA NA TVORBO UREJENIH MEMBRANSKIH DOMEN

Prvotno je veljalo, da je prosta -OH skupina na mestu C3 v molekuli holesterola kritičnega pomena pri tvorbi urejenih membranskih domen (Barenholz in sod., 1989). -OH skupina je pomembna, saj daje molekuli Hol, ki bi bila sicer hidrofobna, amfipatični značaj, poleg tega pa omogoča njeno orientacijo v membrani in tvorbo vodikovih vezi med molekulami Hol in molekulami vode ter z drugimi lipidnimi molekulami (Ohvo-Rekilä in sod, 2002).

Tudi iz novejših raziskav je razvidno, da je prosta -OH skupina na mestu C3 sicer zelo pomembna za tvorbo urejenih domen. Že majhne spremembe v njeni strukturi (npr. dodatek metilne, formilne ali sulfonatne skupine, sprememba -OH v keto skupino) močno zmanjšajo sposobnost tovrstnih modificiranih sterolov oz. steroidov za tvorbo urejenih domen. To naj bi bila posledica slabše sposobnosti modificiranih sterolov za tvorbo vodikovih vezi, poleg tega pa so ti bolj naključno orientirani v membrani v primerjavi s Hol (Wang in sod., 2004; Scheitd in sod., 2003; Slotte, 1995).

Podoben učinek ima tudi dodatna -OH skupina na C5 (Wang in sod., 2004).

Znani so številni steroli z različno modificirano -OH skupino in njihov vpliv na tvorbo urejenih domen.

Holest-4-en-3-on je pogosto prisoten membransko neaktivni sterol v bioloških membranah, kjer je v primerjavi s Hol zelo naključno razporejen in ne tvori urejenih domen. Vzrok naj bi bil zamenjava -OH skupine na mestu C3 s keto skupino, ki je manjša in ne omogoča tvorbe vodikovih vezi. Poleg tega pa ima dvojno vez na mestu C4 (in ne na C5 kot je to značilno za Hol), kar povzroči povečanje minimalne površine na meji med vodo oz. zrakom iz 33 Å na 52 Å (Barenholz in Ben-Yashar, 1989).

Epiholesterol ima -OH skupino na mestu C3 v α -konfiguraciji za razliko od molekule Hol, kjer je ta v β -konfiguraciji, kar pa nima bistvenega vpliva na sposobnost tvorbe urejenih domen. Po drugi strani pa nabita sulfatna skupina v molekuli holesteril-sulfata destabilizira rafte (Xu in London, 2000).

Več posameznih modifikacij znotraj molekule steroida ima lahko aditivni učinek na sposobnost tvorbe urejenih domen. Tako npr. sprememba -OH skupine na mestu C3 v keto skupino in dvojna vez med C4 in C5 vsaka zase povzročita zmanjšanje sposobnosti za njihovo tvorbo. 4-holesten-3-on, ki vsebuje obe zgoraj omenjeni modifikaciji, sploh ne tvori urejenih domen (Wang in sod., 2004).

Holesteril-metil-eter lahko v povezavi z dipalmitoil fosfatidilholin (DPPC) tvori domene skoraj tako učinkovito kot Hol, čeprav je stopnja pakiranja in odpornost na raztapljanje z detergentom nižja kot pri domenah, ki jih tvori Hol z DPPC. Podobno lahko 7-ketoholesterol v povezavi z DPPC oz. dioleoil fosfatidilholinom (DOPC) tvori urejene domene skoraj tako učinkovito kot Hol, čeprav mešanice DPPC (oz. DOPC) in 7-ketoholesterola ne izkazujejo tako visoke stopnje odpornosti na raztapljanje z detergentom in njihova struktura ni tako tesno pakirana kot v primeru Hol z DPPC oz. DOPC. Na podoben način lahko ergosteril-metil-eter omogoča rast kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* skoraj tako učinkovito kot ergosterol (Wang in sod., 2004).

Tudi nekateri drugi steroidi (holestenon, holestan, holesterol-sulfat, koprostanol in androsterol) lahko delujejo celo kot »antiholesteroli«, to je preprečijo tvorbo urejenih membranskih domen (Xu in London., 2000).

2.5 CITOLITIČNI PROTEINI, KI SE VEŽEJO NA LIPIDNE RAFTE

Številni toksini, ki povzročajo nastanek por, se vežejo z lipidnimi rafti v membrani tarčnih celic. Primeri teh proteinov so: Cry 1A bakterije *Bacillus thuringiensis*, aerolizin bakterije *Aeromonas hydrophila*, perfringolizin bakterije *Clostridium perfringens* (Waheed in sod., 2001), lizenin iz deževnika *Eisenia foetida* (Ishitsuka in sod., 2005), ostreolizin gobe *Pleurotus ostreatus* (Sepčić in sod., 2004) ter stiholizin iz morske vetrnice *Stichodactyla helianthus* (Alegre-Cebollada in sod., 2005).

Rafti služijo kot "platforme", kjer pride do vezave in oligomerizacije teh toksinov. Pomembno skupino proteinov, ki tvorijo pore in ki se vežejo na področja med različno urejenimi membranskimi domenami predstavljajo aktinoporini morskih vetrnic (Alegre-Cebollada in sod., 2005; Barlič in sod., 2004).

2.5.1 Lizenin

Lizenin je citolitični protein deževnika *Eisenia foetida* z molekulsko maso 41 kDa. Znano je, da ta protein specifično prepozna sfingomielin v celičnih membranah, vezava pa je posledica nastanka kompleksa med SM in lizeninom. Vezava lizenina je odvisna tako od organizacije lipidov kot tudi njihove lokalne gostote. Koncentracija membranskih kompleksov med SM in lizeninom znotraj mikrodomen lahko povzroči lokalne poškodbe membrane in posledično lizo celice. Molekularni mehanizem poškodbe pa še ni pojasnjen. Znano je, da lizenin ne prepozna ostalih membranskih sterolov, fosfolipidov in glikosfingolipidov. V poskusu, v katerem so lizenin dodali na bazolateralno domeno membrane so ugotovili, da ta povzroča poškodbe celične membrane, kar pa ne velja v primeru, ko so toksin dodali na apikalno domeno. Sklepajo, da prisotnih glikosfingolipidov v apikalni domeni povzroči zmanjšanje lokalne gostote SM, kar vodi v razvoj rezistence celic na lizenin (Ishitsuka in sod., 2005).

Zaradi specifične vezave na SM se lizenin uporablja kot edinstveno orodje za preučevanje porazdelitve SM v celičnih membranah (Ishitsuka in sod., 2005).

2.5.2 Perfringolizin

Perfringolizin O (imenovan tudi θ -toksin) je citolitični protein bakterije *Clostridium perfringens*. Znano je, da se ta toksin specifično veže na Hol v lipidnih raftih in inducira nastanek transmembranskih por. S proteolizo in tretiranjem toksina z biotinom so uspeli sintetizirati derivat toksina θ , imenovan BC θ . Z enako afiniteto kot toksin θ , se BC θ specifično veže na Hol v lipidnih raftih, vendar pri tem ne tvori por in ne poškoduje membran celic. Zaradi teh lastnosti se BC θ uporablja kot orodje za preučevanje funkcije Hol v lipidnih raftih. Rafti sodelujejo pri mnogih celičnih procesih, pri večini teh pa njihova natančna vloga še ni popolnoma pojasnjena. S tega vidika bi lahko fluorescentno označeni BC θ uporabljali pri preučevanju njihove natančne funkcionalne vloge v celičnih procesih oz. pri spremljanju dinamike v živih celicah in pri nekaterih boleznih (Waheed in sod., 2001).

2.5.3 Stiholizin

Stiholizin je citolitični protein, ki ga proizvaja morska vetrnica *Stichodactyla helianthus*. Uvrščamo ga v družino aktinoporinov, monomernih citolitičnih proteinov, ki so brez cisteinskih ostankov. Skupne lastnosti, ki združujejo te proteine so: molekulska masa okoli 20kDa, izoelektrična točka okoli 9, dobra topnost v vodi ter sposobnost oligomerizacije in tvorbe por velikosti okoli 2 nm v membranah in lipidnih veziklih. Najbolje preučena predstavnika te družine sta stiholizin II (Stn II), ki ga producira *S. helianthus* in ekvinatoksin II (EqT II) iz morske vetrnice *Actinia equina* (Anderluh in Maček, 2002).

Stn II se specifično veže na mikrodomene v membrani, ki so bogate bodisi s Hol ali s SM. Ugotovili so, da toksin prepozna specifično fiziološko stanje lipidnih domen in da v procesu prepoznavanja niso vpleteni proteinski receptorji (Alegre-Cebollada in sod., 2005).

2.5.4 Ostreolizin

Ostreolizin je citolitični protein užitne gobe bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*). Uvrščamo ga v egerolizinsko proteinsko družino skupaj z naslednjimi proteini: egerolizinom užitne gobe topolove njivnice (*Agrocybe aegerita*), Asp hemolizinom patogene plesni *Aspergillus fumigatus* (Ebina in sod., 1994), dvema hemolizinu podobnima proteinoma (Cbm 17.1 in Cbm 17.2) bakterije *Clostridium bifermentans* (Barloy in sod., 1998) ter izoformno obliko ostreolizina pleurotolizinom A (Ply A) gobe *Pleurotus ostreatus* (Tomita in sod., 2004; Sakurai in sod., 2004).

Skupne značilnosti proteinov te družine so podobna primarna struktura, molekulska masa okoli 15 kDa, nizka izoelektrična točka, hemolitična aktivnost v nanomolarnih koncentracijah in termolabilnost (Berne in sod., 2005).

Biološka funkcija ostreolizina še ni znana. V raziskavah so ugotovili, da se sintetizira v začetnih fazah tvorbe primordijev in plodišč. V poznejših razvojnih fazah gobe se sinteza ostreolizina znižuje. V fazah nastajanja micelija niso zasledili njegove sinteze ter hemolitične aktivnosti. Domnevajo, da ostreolizin sodeluje kot celični signalizator v začetnih fazah tvorbe primordijev in plodišč, agregaciji hif in apoptozi (Berne in sod., 2002; Vidic in sod., 2005) in nima vloge toksina, saj je bukov ostrigar povsem užitne goba. Najnovejši rezultati so vendarle pokazali, da intravenozna injekcija ostreolizina povzroči smrt poskusnih glodavcev s polovično letalno dozo LD₅₀ pri 1170 µg/mg (Žužek in sod., 2006).

Ostreolizin tvori pore v membranah in umetnih veziklih, pripravljenih iz totalnega lipidnega ekstrakta eritrocitov, vendar to ne velja za vezikle, pripravljene iz lipidnega ekstrakta gobe *Pleurotus ostreatus*. Tip hemolize je koloidno osmotski s funkcionalnim premerom por okoli 4 nm (Sepčić in sod., 2003). Hemolitična aktivnost se izgubi, če protein segrevamo (Berne in sod., 2002) ali izpostavimo ekstremnim pH vrednostim (Berne in sod., 2005).

Ostreolizin povzroča hemolizo eritrocitov pri človeku in različnih vrstah živali. Njegov citotoksični vpliv so potrdili tudi pri nekaterih celičnih linijah (Sepčič in sod., 2003; Sepčič in sod., 2004).

Nekatere vrste maščobnih kislin in lizofosfolipidi inhibirajo njegovo aktivnost (Sepčič in sod., 2003). Lipidi kot so LDL in SM nimajo vpliva na njegovo aktivnost, nasprotno pa LDL močno inhibira aktivnost Asp-hemolizina, SM pa inhibira aktivnost pleurotolizina A (Tomita in sod., 2004).

Ostreolizin najdemo v membranski frakciji, odporni na ekstrakcijo z mrzlim detergentom Triton-X 100. Na osnovi teh rezultatov domnevajo, da se protein veže na lipidne rafte (Sepčič in sod., 2004).

Vezava ostreolizina na lipidne vezikle je odvisna od specifične sestave Hol/fosfolipid. V raziskavah o vplivu sestave lipidnih veziklov na vezavo ostreolizina z metodo površinske plazmonske resonance (SPR) so ugotovili, da se ostreolizin najbolj učinkovito veže na vezikle, pripravljene iz mešanice Hol/SM. Učinkovitost vezave se zmanjšuje če SM zamenjamo z glicerofosfolipidi z naraščajočo stopnjo nenasičenosti, ki jih dodajamo Hol v molarnem razmerju 1/1 (Sepčič in sod., 2004).

Membranska aktivnost ostreolizina se pojavi, ko imamo v veziklih, sestavljenih iz SM in Hol, več kot 30 molskih % Hol, in se povečuje s povečevanjem razmerja Hol/SM v lipidnih veziklih (Sepčič in sod., 2004).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

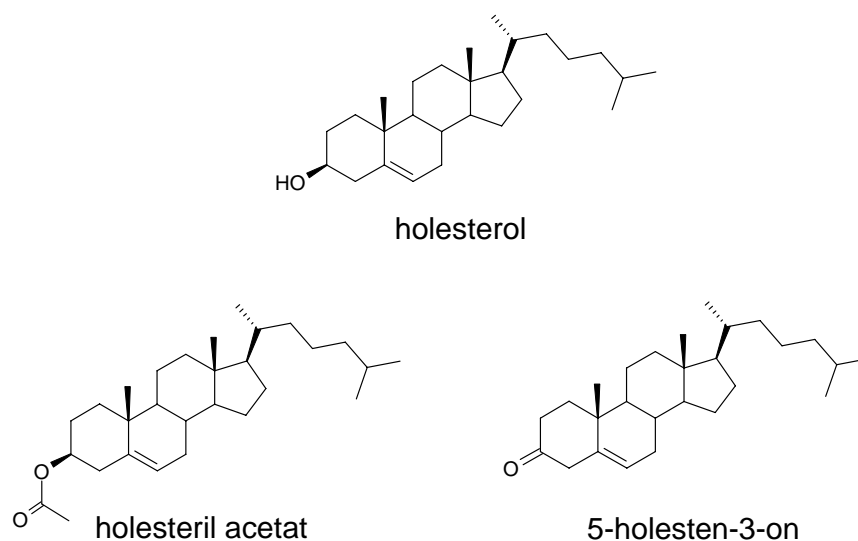
Preglednica 1: Uporabljene kemikalije in oprema

Kemikalija/oprema	Proizvajalec
EDTA	Kemika, Hrvaška
etanol, 96%	Merck, Nemčija
goveji serumski albumin (BSA)	Sigma, ZDA
HCl	Merck, Nemčija
HPA čip	Biacore AB, Švedska
kalcein	Sigma, ZDA
kloroform	Merck, Nemčija
metanol	Merck, Nemčija
mikrotitrne plošče	Biacore AB, Švedska
NaCl	Merck, Nemčija
oktilglukozid	Merck, Nemčija
Sephadex G-50 medium	Merck, Nemčija
SPE kolone	Waters, ZDA
TLC plošče	Merck, Nemčija
Tris	Merck, Nemčija
Triton X-100	Sigma, ZDA

3.1.2 Uporabljeni lipidi

Preglednica 2: Uporabljeni lipidi

Lipid	Proizvajalec
5-holesten-3-on	Aldrich Chemical Company, ZDA
holesteril-acetat	Fluka, Nemčija
holesterol	Avanti Polar Lipids, ZDA
sfgingomielin iz svinjskih možgan	Avanti Polar lipids, ZDA



Slika 4: Strukture holesterola in steroidov z modificirano –OH skupino, ki smo jih uporabili pri meritvah

3.1.3 Raztopine

Preglednica 3: Uporabljene raztopine

Pufer za eritrocite	130 mM NaCl 20 mM Tris pH 7,4
Pufer za vezikle	140 mM NaCl 20 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0
Raztopina kalceina	80 mM pH 8,0

3.1.4 Laboratorijska oprema

Preglednica 4: Uporabljena laboratorijska oprema

centrifuge	Centric 322A, Tehtnica, Slovenija Centrifuge 5415D, Eppendorf
čitalec mikrotitrnih plošč	MRX, Dynex Technologies, Nemčija
fluorimetrični čitalec mikrotitrnih plošč	Zenyth 3100, Antos labtech instruments, Avstrija
hladilnik, 4 °C	Gorenje, Slovenija
magnetno mešalo	Tehtnica MM 540, Slovenija
PHAST Sistem za gelsko elektroforezo	AMERSMAM PHARMACIA BIOTECH, Uppsala, Švedska
pH meter	Mettler Toledo, Nemčija
refraktometer Biacore-X SPR	Biacore AB, Švedska
rotavapor in vodna kopel	R-134, Buchi, Švica B-480, Buchi, Švica
sonikator	MSE 150 W Ultrasonic Disintegrator MK2 MSE Scientific instrument, Anglija
spektrofluorimeter	Jasco FP-750, Jasco Corporation, ZDA
tehtnica	Sartorius, Švedska
vibracijski stresalnik	Vibromix 114 EV, Tehtnica, Slovenija
zamrzovalnik, -20 °C	Gorenje, Slovenija

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija ostreolizina

Ostreolizin je bil izoliran iz plodišč svežih gob *Pleurotus ostreatus* (bukov ostrigar), kot so opisali Berne in sod. (2002) in do uporabe zamrznjen pri -20 °C. Pred uporabo smo protein raztopili v pufru za vezikle.

3.2.2 Priprava soniciranih unilamelarnih veziklov (SV)

Ustrezno količino lipidov, ki so bili raztopljeni v kloroformu (SM in ustrezen steroid v molskem razmerju 1/1), smo posušili pod znižanim tlakom v bučki na rotacijski vodni vakuumski črpalki. Pri tem je na steni bučke nastal lipidni film, ki smo mu dodali 10-20 steklenih kroglic in ustrezno količino pufra za vezikle. Z intenzivnim stresanjem na vibracijskem stresalniku pri sobni temperaturi smo pripravili suspenzijo multilamelarnih veziklov (MLV), ki smo jih 30 min sonicirali na ledu z 10 s trajajočimi pulzi, da smo na ta način pridobili sonicirane unilamelarne vezikle (SV). Te smo dali za 45 min na vodno kopal (45 °C) in jih po inkubaciji 20 min centrifugirali pri 13200 rpm ter nato prepihali z dušikom ter shranili pri 4 °C.

Za teste smo pripravili lipidne vezikle s celokupno koncentracijo 10 mg/ml in jih po potrebi redčili.

V okviru diplomske naloge nismo izvedli encimskega testa, ki se uporablja za določanje koncentracije lipidov v veziklih. Test je specifičen za -OH skupino in bi bil v primeru sintetičnih steroidov 5-holesten-3-ona in holesteril-acetata neučinkovit, saj le ti vsebujejo modificirano -OH skupino.

3.2.3 Priprava soniciranih unilamelarnih veziklov (SV) s kalceinom

Vezikle smo pripravili kot pri točki 3.2.1, le da smo posušenim lipidom namesto pufra za vezikle dodali raztopino kalceina (80 mM). Z gelsko filtracijo na gelu Sephadex G-50 (medium) smo odstranili prosti kalcein, ki se je nahajal v okolici soniciranih unilamelarnih veziklov s kalceinom. Tako pripravljene vezikle smo uporabili za test tvorbe por s sproščanjem kalceina.

Za teste smo pripravili lipidne vezikle s celokupno koncentracijo 4 mg/ml in jih po potrebi redčili.

3.2.4 Določanje velikosti veziklov

Velikost veziklov smo določili z metodo fotonske korelacijske spektroskopije (PCS) na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Ta metoda izrablja različno sipanje svetlobe na delcih (veziklih) različnih velikosti

3.2.5 Raztapljanje lipidnih veziklov z detergentom Triton X-100

Z metodo raztapljanja lipidnih veziklov z detergentom Triton X-100 smo želeli kvantitativno ovrednotiti prisotnost DRM v naših veziklih. Meritve smo izvedli s spektrofluorimetrom Jasco FP-750. V kvarčno kiveto širine 1 cm smo dali 1,5 ml suspenzije soniciranih unilamelarnih veziklov (SV) v filtriranem pufru za vezikle s končno koncentracijo 0,5 mM lipidov. Raztopini veziklov smo postopoma dodajali po 5 μ l 10 mM raztopine detergenta Triton X-100 v pufru za vezikle, po vsakem dodatku počakali 1 min in nato odčitali intenziteto sipane svetlobe. Ko je intenziteta sipane svetlobe začela upadati, smo začeli dodajati po 20 μ l detergenta in postopek nadaljevali. Ko se je upadanje intenzitete sipanja svetlobe zelo upočasnilo, smo postopek nadaljevali z dodajanjem po 100 μ l detergenta in nato po 300 μ l dokler ni bil celoten volumen v kiveti zapolnjen.

Paralelno z vsakim vzorcem smo naredili tudi kontrolo, kjer smo veziklom namesto raztopine Tx-100 dodajali enake volumne filtriranega pufra za vezikle.

Vse meritve so bile opravljene ob stalnem mešanju raztopine z magnetnim mešalom (830 rpm) pri temperaturi 25 °C. Ekscitacijska in emisijska valovna dolžina sta bili enaki (400 nm). Širini rež za ekscitacijo in emisijo sta bili 5 nm.

3.2.6 Metode za določanje vezave ostreolizina

3.2.6.1 Test inhibicije hemolize

S testom inhibicije hemolize smo posredno ugotavljali ali se ostreolizin veže na lipidne vezikle. Če se protein veže na vezikle, potem le ta ni na razpolago za hemolizo pozneje dodanih eritrocitov, zaradi česar pride do inhibicije hemolize.

Hemolizo smo merili s turbidimetrično metodo (Maček in Lebez, 1981) na mikrotitrnih ploščah z mikročitalcem MRX, Dynex Technologies (ZDA).

Da bi preprečili vezavo ostreolizina na stene jamic mikrotitrne ploščice, smo le-te predhodno 30 min tretirali z govejim serumskim albuminom (BSA) s koncentracijo 0,1 mg/ml. Zatem smo ploščico odcedili in v mikrotitrne jamice dali 50 μ l veziklov v pufru za vezikle z različnimi lipidnimi koncentracijami ter jim dodali 50 μ l ostreolizina s koncentracijo 4 μ g/ml in ploščo 30 min inkubirali pri 25 °C. V vse jamice smo nato dodali

100 µl suspenzije govejih eritrocitov v eritrocitnem pufru (pH 7,4) in 30 min spremljali potek hemolize pri 630 nm. Suspenzija govejih eritrocitov v eritrocitnem pufru je imela začetno navidezno absorbcijo 0,5.

Po končanih meritvah smo odčitali čas, ki je bil potreben za 50% hemolizo (t_{50}).

3.2.6.2 Določanje vezave ostreolizina na lipidne vezikle z SDS/PAGE elektroforezo

Vpliv različnih steroidov na vezavo ostreolizina na multilamelarne lipidne vezikle (MLV) smo določali semikvantitativno z SDS/PAGE metodo.

Pripravili smo mešanico multilamelarnih lipidnih veziklov (MLV) z dodanim ostreolizinom. K MLV s koncentracijo 10 mg/ml v pufru za vezikle smo dodali ustrezno količino ostreolizina s koncentracijo 1,2 mg/ml v vodi, da je bilo končno molsko razmerje med lipidom in proteinom (lipid/protein) 450. Mešanico smo preko noči inkubirali pri 25 °C in jo nato 30 min centrifugirali (29 000 µg) pri sobni temperaturi. Dobljeni supernatant, ki je vseboval nevezani ostreolizin smo odstranili, MLV pa resuspendirali v enakem volumnu pufra za vezikle, kot ga je imel supernatant. Frakcije, ki so vsebovale prosti ali vezani ostreolizin smo raztopili v enakem volumnu SDS pufra, 5 min segrevali pri 100 °C in jih nato nanесли na gelčke. Uporabili smo 8-25 PhastGel gradient. Elektroforezo smo izvedli z aparaturo PHAST System pri 25 °C. Gelčke smo barvali z barvilom Comassie Brilliant blue in nato z metodo barvanja po srebru.

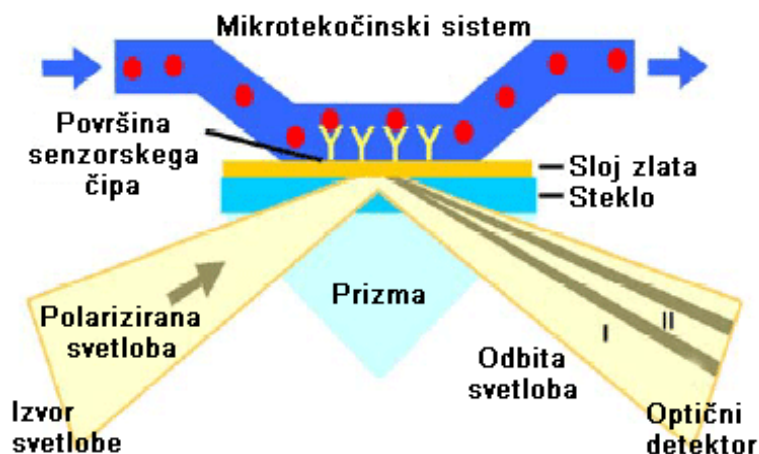
Količino vezanega in prostega proteina smo določili semikvantitativno s pomočjo denzitometrije.

3.2.6.3 Površinska plazmonska resonanca (SPR)

Vezavo ostreolizina na lipidne monosloje smo določali tudi neposredno z metodo površinske plazmonske resonance z refraktometrom Biacore-X.

Refraktometer BIACORE-X meri hitrost asociacije in disociacije in s tem afiniteto interakcij med biološkimi makromolekulami na osnovi površinske plazmonske resonance (SPR). To je fizikalni pojav, ki nastane, ko polarizirana svetloba zadane kovinsko površino pri pogojih, ki omogočajo popoln odboj svetlobe. Poglavitne prednosti SPR pred ostalimi

metodami so te, da molekul, ki jih preučujemo ni potrebno kemijsko spreminjati, vezavo med molekulami lahko spremljamo v realnem času, interakcije je mogoče zasledovati tudi v kompleksnih mešanich brez predhodnega čiščenja ter da za merjenje interakcij zadostujejo že majhne količine ligandov in analitov.



Slika 5: Delovanje aparata Biacore. Aparaturo sestavljajo senzorski čip, detektor in mikrotekočinski sistem. Vezava molekul na površino čipa povzroči spremembo lomnega količnika tik ob površini steklene ploščice, zaradi česar se spremeni kot, pri katerem del energije laserskega žarka privzame tanek sloj zlata. Nastalo spremembo kota odbite svetlobe, ki jo povzroči vezava analita, meri optični detektor in ga prevede v spremembo odziva. Krivuljo, ki prikazuje spremembo odziva (spremembo intenzitete svetlobe) v času, imenujemo senzorgram (Tehnologija BIACORE).

Molekulo, katere vezavo opazujemo, imenujemo analit, njeno tarčo na čipu pa ligand. S pomočjo SPR lahko preučujemo tudi vezavo proteinov na lipidne membrane, kar smo izkoristili v tej nalogi.

V fazi asociacije se analit veže na ligand, kar povzroči porast signala na senzorgramu. Ko so vsa vezavna mesta zasedena, pride do nasičenja (ravnotežja) in odziv se ustali pri neki vrednosti. Po končanem injiciranju vzorca pride do faze disociacije in analit se začne izplavljati z liganda. Na koncu ostane na senzorskem čipu vezan le še ligand, odziv pa je enak kot na začetku. Iz faze asociacije in disociacije lahko določimo hitrost vezave, iz faze ravnotežja pa lahko sklepamo na to, koliko analita se je vezalo na senzorski čip.

Potek eksperimenta

V aparaturu smo vstavili HPA čip in najprej injicirali detergent oktilglukozid (pretok 20 $\mu\text{l}/\text{min}$), s katerim smo zagotovili hidrofobnost površine čipa. Nato smo injicirali suspenzijo lipidnih veziklov (SV) s koncentracijo 0,5 mM v predhodno odzračenim in filtriranim (0,22 μM) pufrom za vezikle (pretok 2 $\mu\text{l}/\text{min}$) in s tem ustvarili lipidni monosloj. HPA čip je namreč prekrit z dolgimi alkiltioestrskimi verigami, ki ustvarjajo ravno, kvazikristalično hidrofobno plast ter imobilizirajo liposome preko površinskih interakcij. Na ta način dobimo hibridno lipidno membrano, ki predstavlja dober model za preučevanje začetnih faz vezave membransko aktivnih proteinov (Beseničar in sod., 2006). Zatem smo dodali NaOH (pretok 100 $\mu\text{l}/\text{min}$), s katerim smo iz površine čipa sprali vse šibko vezane snovi. Da bi preprečili nespecifično vezavo snovi na čip, smo dodali raztopino govejega serumskega albumina (BSA)(pretok 20 $\mu\text{l}/\text{min}$), ki se je vezal na vsa prosta mesta na čipu, ki niso bila zasedena z lipidi. Nato smo injicirali ostreolizin (pretok 10 $\mu\text{l}/\text{min}$) s koncentracijo 2 μM , ki je bil raztopljen v pufru za vezikle. Sensorgram smo beležili pri temperaturi 25 $^{\circ}\text{C}$. Za vsak vzorec smo naredili tudi kontrolo, ki je vsebovala samo pufer za vezikle (brez proteina). Sensorgrame smo obdelali s programom BIA evaluation, verzija 3.2.(Biacore AB, Švedska). Primarne sensorgrame, ki predstavljajo vsoto odziva vezanega ostreolizina in odziva na račun razlike v lomnih količnikih različnih topil, smo uporabili za prilagajanje teoretičnim krivuljam. Kontrola z vbrizgavanjem samega pufru za vezikle je namreč nakazala, da hitre razlike v samem začetku faze asociacije in disociacije izhajajo iz sprememb v refrakcijskem indeksu zaradi spremembe lomnega količnika topila. Primarne sensorgrame smo fitali z dvostopenjskim reakcijskim modelom, pri katerem druga stopnja predstavlja konformacijsko spremembo proteina brez posledičnega zvišanja SPR signala. Predpostavljamo torej, da v našem primeru SPR signal odraža adsorbcijo proteina in njegovo morebitno insercijo v monosloj. Model lahko prikažemo s shemo:



kjer je Oly ostreolizin, L lipid, *Oly označuje ostreolizin s spremenjeno konformacijo, $k_{a,1}$, $k_{d,1}$, $k_{a,2}$, $k_{d,2}$ pa so konstante disociacije in asociacije.

Ker so bile χ^2 vrednosti prileganja eksperimentalnih krivulj teoretičnim višje od 10, nismo računali kinetičnih konstant (χ^2 vrednosti bi se morale gibati med 0,2 in 3).

3.2.7 Metode za določanje litične aktivnosti ostreolizina

Test tvorbe por s sproščanjem kalceina

Koncentracija kalceina v intaktnih veziklih je tako velika (80 mM), da prihaja do pojava samogašenja fluorescence kalceina. Če se ostreolizin veže na membrano veziklov in povzroči nastanek por, se kalcein iz veziklov sprosti in razredči. Posledično ni več pojava samogašenja fluorescence in poveča se fluorescenčna emisija kalceina. Permeabilizacijo veziklov z ostreolizinom smo določali s spektrofluorimetričnim čitalcem mikrotitrnih plošč pri ekscitacijski valovni dolžini 485 nm in emisijski valovni dolžini 535 nm ter pri temperaturi 25 °C. Da bi preprečili vezavo ostreolizina na stene jamic mikrotitrne ploščice, smo le-te najprej 30 min izpostavili govejemu serumskemu albuminu (BSA) s koncentracijo 0,1 mg/ml in jih potem odcedili. V jamice mikrotitrne ploščice smo dali pufer za vezikle in nato še ostreolizin v različnih koncentracijah. Tik pred meritvijo smo povesod dodali suspenzijo lipidnih veziklov s kalceinom v pufru za vezikle (100 μ l). Potek fluorescence smo spremljali 60 min. Zatem smo v vse jamice na mikrotitrni ploščici dodali detergent Triton X-100 (100 mM), da smo odčitali maksimalno fluorescenco. Po meritvah smo odčitali izmerjeno vrednost fluorescence pred dodatkom ostreolizina (F_{min}), najvišjo izmerjeno vrednost fluorescence po dodatku ostreolizina (F_{izm}) in najvišjo izmerjeno vrednost fluorescence po dodatku detergenta Triton X-100 (F_{max}).

Iz krivulje časovnega poteka sproščanja kalceina smo določili konstanto hitrosti k in odstotek sproščenega kalceina pri različnih končnih koncentracijah ostreolizina. Odstotek sproščenega kalceina smo izračunali po naslednji enačbi (Alvarez in sod., 2001):

$$\% \text{ sproščene kalceina} = (F_{izm} - F_{min}) / (F_{max} - F_{min}) \times 100 \quad \dots(2)$$

Časovni potek naraščajoče intenzitete fluorescence smo priredili z razširjeno eksponentno enačbo in iz nje izračunali konstanto hitrosti (Sepčić in sod., 2004):

$$F_t = F_{min} + F_{max} \cdot (1 - \exp(-k \cdot t)^b) \quad \dots(3)$$

kjer je k konstanta hitrosti, b pa eksponentni faktor.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE VELIKOSTI LIPIDNIH VEZIKLOV

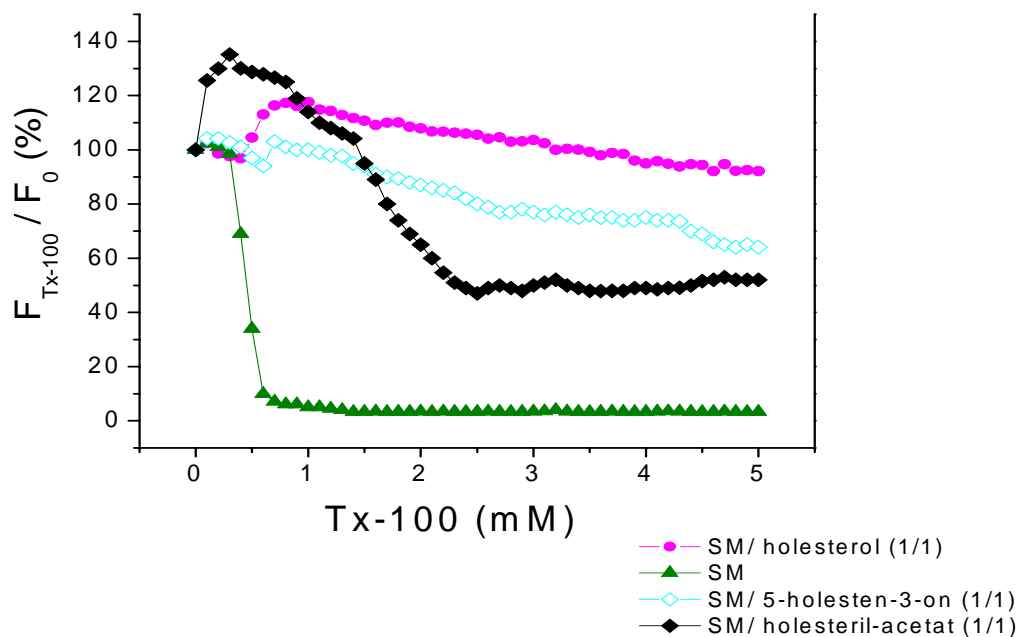
Preglednica 5: Velikost (premer) veziklov, sestavljenih iz mešanice sfingomielina (SM) in različnih steroidov v molskem razmerju razmerju 1/1. Podane so srednje vrednosti treh meritev in ustrezne standardne napake

Vezikli	Molsko razmerje (mol/mol)	Velikost (nm)
SM/holesterol	1/1	91 ± 1
SM/holesteril-acetat	1/1	110 ± 3
SM/5-holesten-3-on	1/1	141

Največji premer so imeli vezikli iz sfingomielina in 5-holesten-3-ona, medtem ko so bili vezikli iz sfingomielina in holesteril-acetata nekoliko manjši. Vezikli, ki so vsebovali steroide z modificiranimi –OH skupinami, so bili nekoliko večji od tistih, ki so vsebovali holesterol (Preglednica 5) ali ostale naravne sterole (Žiberna, rezultati diplomske naloge).

4.2 RAZTAPLJANJE LIPIDNIH VEZIKLOV Z DETERGENTOM TRITON X-100

Z metodo raztapljanja lipidnih veziklov z detergentom smo ugotavljali kako modifikacija -OH skupine sterolov vpliva na sposobnost tvorbe DRM in s tem na raztapljanje z detergentom Triton X-100. Pri nekaterih veziklih je prišlo ob začetnem dodajanju detergenta do napihovanja veziklov, kar je imelo za posledico porast vrednosti $F_{\text{Tx-100}}/F_0$.

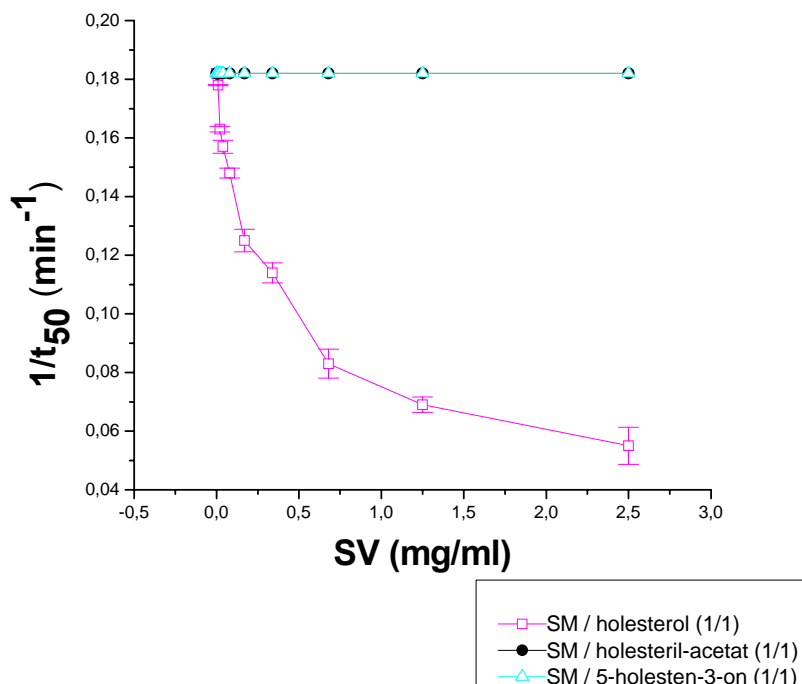


Slika 6: Raztapljanje veziklov, sestavljenih iz mešanice sfingomielina in sterolov z različno modificirano -OH skupino, z detergentom Triton X-100. Suspenziji veziklov smo postopoma dodajali detergent Triton X-100 in pri tem vsakič izmerili intenziteto sipane svetlobe. F_{Tx-100} je intenziteta sipane svetlobe ob dodatku detergenta, F_0 pa je intenziteta sipane svetlobe ob dodatku filtriranega pufru za vezikle.

Kot je razvidno iz slike 9, je do izrazitega in hitrega raztapljanja prišlo le pri veziklih iz čistega sfingomielina, pri katerih je že dodatek 0,5 mM Tritona popolnoma raztopil vezikle. Vezikli iz mešanice sfingomielina in holesterola so ostali skoraj popolnoma neraztopljeni tudi pri dodanih zelo visokih koncentracijah detergenta (višjih od 4,5 mM). Ti vezikli so tvorili največ lipidnih raftov. Določena nizka stopnja raztapljanja je bila opazna pri veziklih, sestavljenih iz mešanice sfingomielina in 5-holesten-3-ona, pri katerih je intenziteta sipane svetlobe padla za 40%, nekoliko višja pa je bila v primeru veziklov iz sfingomielina in holesteril-acetata, kjer je intenziteta sipane svetlobe padla kar za 50%.

4.3 TEST INHIBICIJE HEMOLIZE

S testom inhibicije hemolize smo ugotavljali, kako lipidna sestava oz. modifikacija -OH skupine sterolov vpliva na vezavo ostreolizina na lipidne vezikle in posledično na inhibicijo hemolize (Slika 10).



Slika 7: Odvisnost recipročnega časa polovične hemolize ($1/t_{50}$) od koncentracije veziklov. Vpliv modifikacije -OH skupine sterolov v lipidnih veziklih (SV) na inhibicijo hemolize. Vsota točk prikazuje povprečje treh meritev in ustrezno standardno napako.

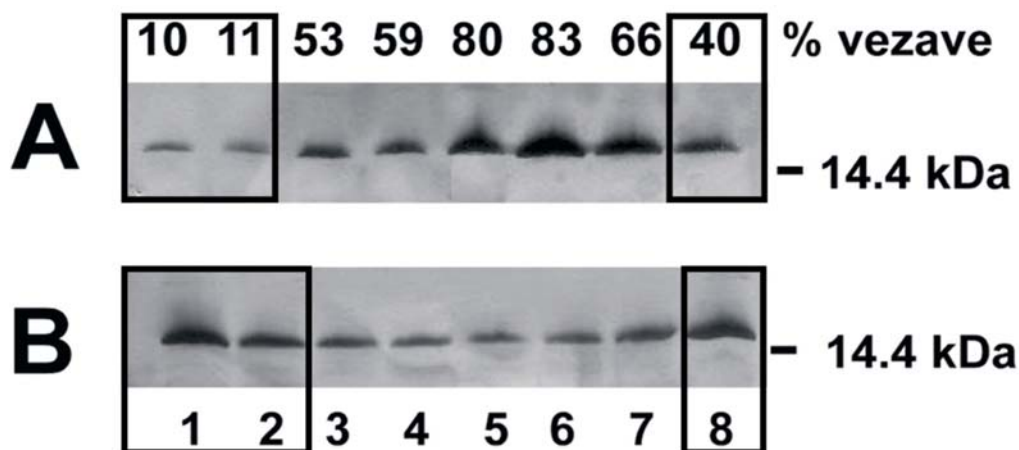
Do inhibicije hemolize je prišlo le pri veziklih, sestavljenih iz mešanice sfingomielina in holesterola. Koncentracija veziklov, ki je povzročila 50% inhibicijo hemolize (IC_{50}), je bila 0,5 mg/ml. Pri veziklih iz mešanice sfingomielina in holesteril-acetata ter sfingomielina in 5-holesten-3-ona pa ni prišlo do opazne inhibicije hemolize niti pri zelo visokih koncentracijah lipidnih veziklov (višjih od 2 mg/ml).

4.4 DOLOČANJE VEZAVE OSTREOLIZINA Z SDS-PAGE ELEKTROFOREZO

Z metodo SDS-PAGE smo ugotavljali, kako steroli z različno modificirano -OH skupino vplivajo na vezavo ostreolizina na lipidne membrane (Slika 11).

Pri lipidnih veziklih iz mešanice SM in 5-holesten-3-ona ter iz mešanice SM in holesteril-acetata je praktično ves (90%) ostreolizin prisoten v prosti obliki (Slika 11B). V primeru veziklov iz SM in holesterola pa je nanje bilo vezanega 40% ostreolizina. Istočasno smo testirali vezavo Oly tudi na druge vezikle, sestavljene iz mešanice SM in sterolov naravnega izvora (razmerje 1/1), ki so imeli modificirane alkilne verige ali steroidni skelet,

imeli so pa vselej nespremenjeno –OH skupino na mestu 3 (ergosterol, stigmasterol, lanosterol, 7-dehidroholesterol in β -sitosterol). Vezava na te sterole je bila vedno višja od vezave na vezikle, ki so vsebovali vezikle z modificirano –OH skupino.

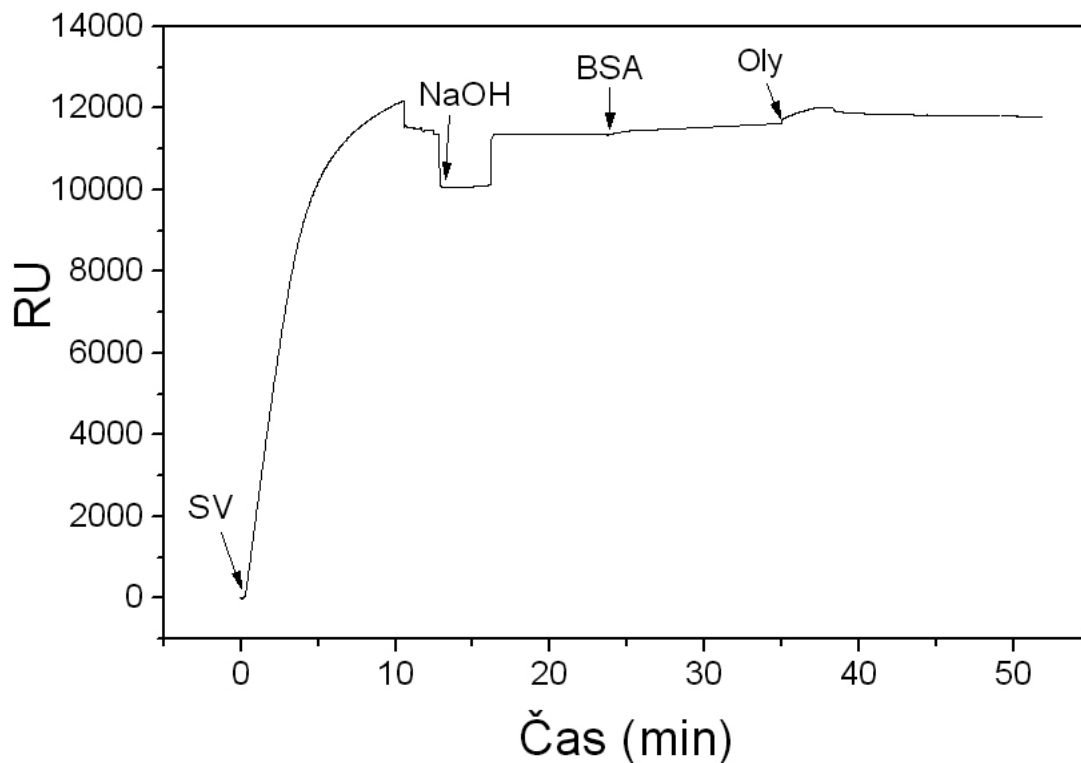


Slika 8: SDS/PAGE; Vezava ostreolizina. (A) Sediment (ostreolizin vezan na vezikle), (B) Supernatant (prosti ostreolizin). (1)SM/5-holesten-3-on, (2) SM/holesteril-acetat, (3) SM/lanosterol, (4) SM/stigmasterol, (5) SM/ergosterol, (6) SM/sitosterol, (7) SM/7-dehidrosterol, (8) SM/holesterol. Vezikli, ki so pomembni v naši nalogi, so dodatno obrobjeni.

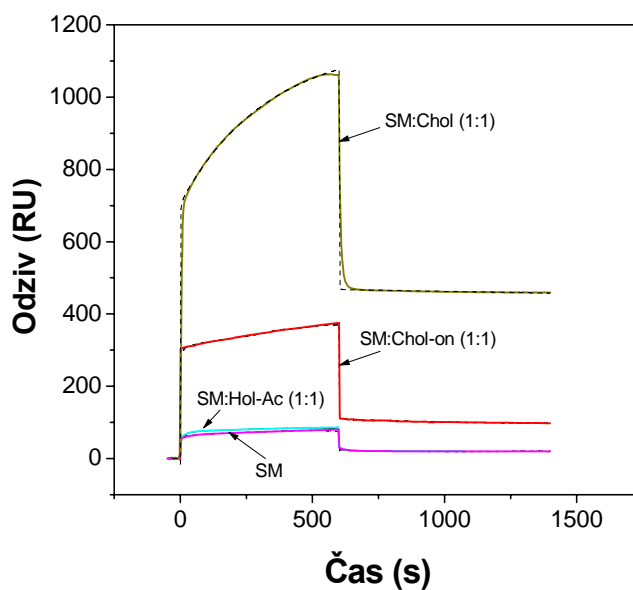
Pri mešanicah SM/Hol-on (1A,1B) in SM/Hol-Ac (2A,2B) se ostreolizin skorajda ni vezal na vezikle, prisoten je bil v prosti frakciji. Pri ostalih mešanicah (3A-8B, 3A-8B), ki so vsebovale SM in naravne sterole, pa se je ostreolizin vezal na vezikle v različnih deležih (40-83%).

4.5 POVRŠINSKA PLAZMONSKA REZONANCA

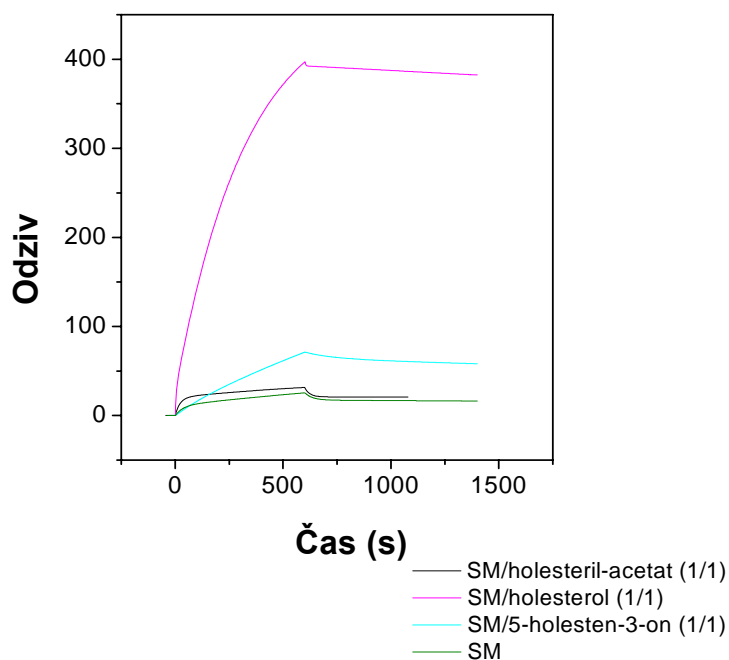
Z metodo površinske plazmonske resonance smo ugotavljali, kako prisotnost sterolov z različno modificirano -OH skupino vpliva na vezavo ostreolizina na lipidne monosloje. Meritev smo izvedli, kot je prikazano na sliki 12.



Slika 12: Splošni prikaz različnih faz senzograma. V aparaturo smo najprej injicirali detergent oktilglukozid, nato smo dodali suspenzijo lipidnih veziklov (SV) v pufru za vezikle, zatem dodali NaOH, goveji serumski albumin (BSA) in nazadnje ostreolizin (Oly) v pufru za vezikle. Senzorgram smo beležili pri 25 °C (glej točko 3.2.6.3). Prikazan je senzogram za vezavo Oly na lipidne vezikle, sestavljene iz SM in Hol v razmerju 1/1.



Slika 13: SPR; Primarni senzogrami (polna linija) in najboljša prilagajanja (črtkana linija). Celoten signal (RU) je seštevek signala vezanega ostreolizina in navideznega signala, ki nastane zaradi različnih lomnih količnikov topil pri injiciranju. Vezava ostreolizina ($20 \mu\text{M}$) na lipidne monosloje, sestavljene iz mešanice sfingomieline in različnih steroidov v razmerju 1/1. Lipidne monosloje ($0,5 \text{ mM}$ vezikli v pufru za vezikle) smo nanegli na HPA čip in dodali ostreolizin, raztopljen v istem pufru ter spremljali odziv na senzogramu. Vse postopke smo izvedli, kot je opisano v poglavju 3.2.6.3.



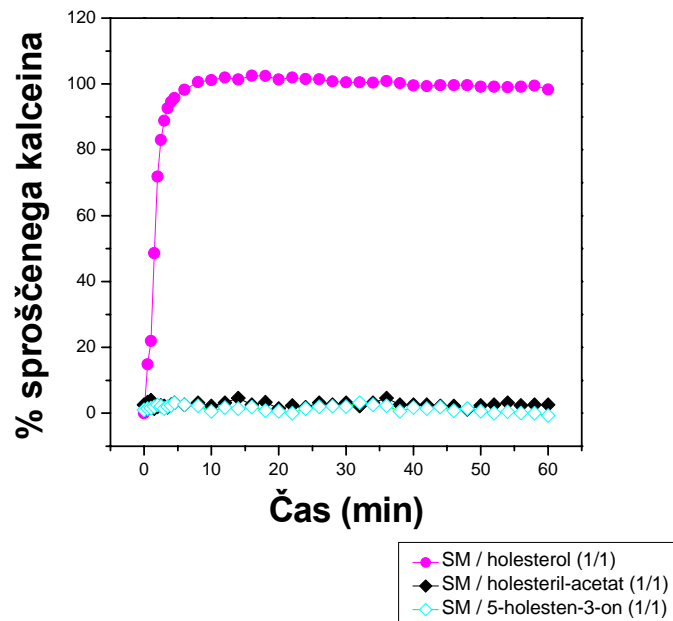
Slika 9: SPR; Korigirani senzogrami po odštevanju odziva, ki je nastal zaradi spremembe refrakcijskega indeksa.

Najvišji odziv je bil prisoten pri veziklih iz mešanice sfingomieline in holesterola (razmerje 1/1), iz česar sklepamo, da je bila pri teh vezava ostreolizina največja. Opazili smo tudi, da se ostreolizin ni izpral z veziklov v fazi disociacije, kar kaže na močno interakcijo z vezikli iz mešanice SM in Hol. Pri veziklih iz mešanice sfingomieline in 5-holesten-3-ona je prišlo do šibke vezave, ki je 1400 s po injiciranju znašala približno 18 % signala, dobljenega z vezikli iz SM in Hol. Pri veziklih iz mešanice sfingomieline in holesteril-acetata ter pri veziklih iz samega sfingomieline pa praktično nismo zaznali vezave.

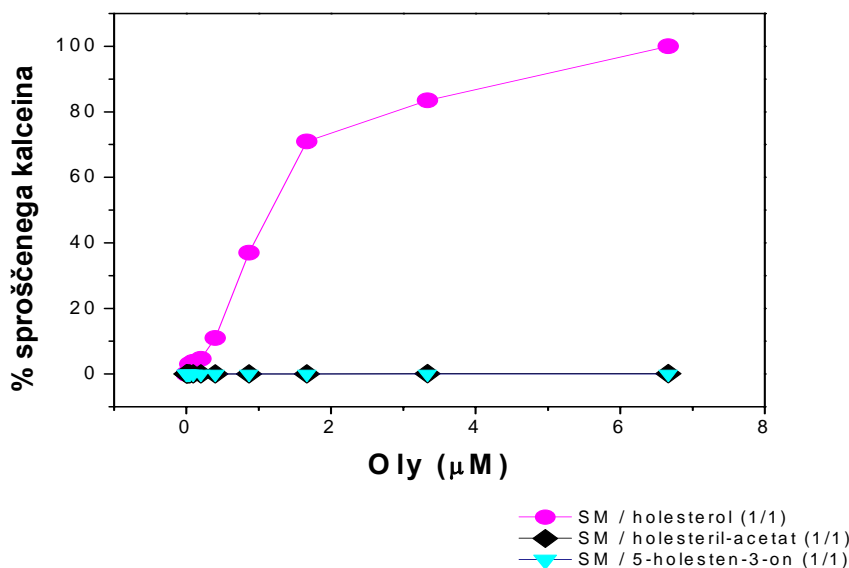
4.6 TEST TVORBE POR S SPROŠČANJEM KALCEINA

S testom sproščanja kalceina smo določali litično aktivnost ostreolizina (Slika 15).

Iz krivulj časovnega poteka reakcije smo izračunali % sproščenega kalceina (Slika 16) in konstanto hitrosti (Slika 17).



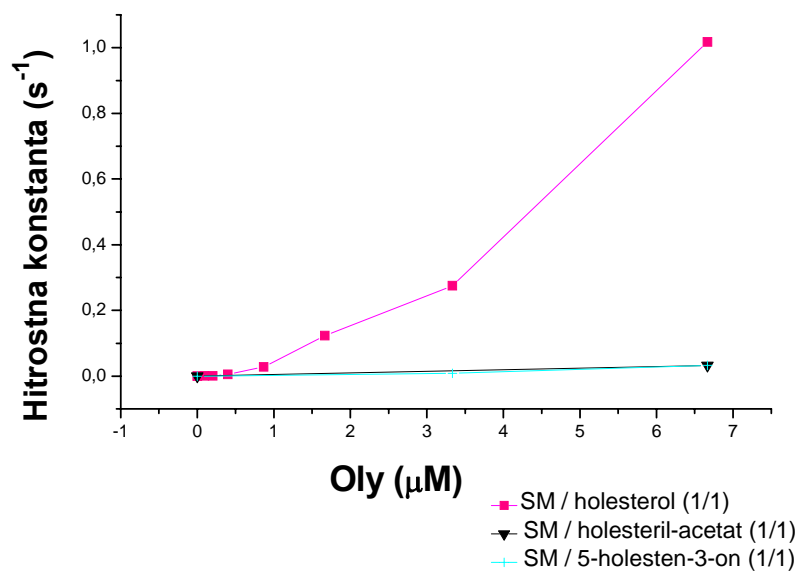
Slika 10: Časovni potek sproščanja kalceina iz veziklov, sestavljenih iz mešanice sfingomielin/steroid v molskem razmerju 1/1, pri $6,7 \mu\text{M}$ dodanem ostreolizinu. Potek fluorescence smo spremljali 60 min pri eksitacijski in emisijski valovni dolžini 485 nm in 535 nm in temperaturi 25°C



Slika 16: Odstotek sproščenega kalceina iz veziklov, sestavljenih iz mešanice SM/steroid v molskem razmerju 1/1 v odvisnosti od koncentracije dodanega ostreolizina.

Do sproščanja kalceina je prišlo le pri veziklih, sestavljenih iz mešanice sfingomielina in holesterola, pri katerih se je ostreolizin vezal na lipidno membrano in s tem povzročil nastanek por. Pri veziklih, sestavljenih iz mešanice sfingomielina in holesteril-acetata ter pri veziklih, sestavljenih iz mešanice sfingomielina in 5-holesten-3-ona pa se kalcein ni sproščal (Slika 15).

Isti rezultati so razvidni tudi iz slik 16 in 17. Odstotek sproščenega kalceina je bil največji pri veziklih, sestavljenih iz mešanice sfingomielina (SM) in holesterola. Do 100% sproščanja kalceina je prišlo po dodatku ostreolizina s koncentracijo 6,7 μM . Pri vseh ostalih veziklih (iz mešanice SM in holesteril acetata ter iz mešanice SM in 5-holesten-3-ona) pa ni prišlo do sproščanja niti pri visokih koncentracijah ostreolizina.



Slika 17: Vpliv koncentracije ostreolizina na konstanto hitrosti (k).

Pri veziklih, sestavljenih iz mešanice sfingomielina in holesterola, se konstanta hitrosti povečuje z naraščanjem koncentracije ostreolizina (Slika 17).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Različni steroidi imajo glede na svojo strukturo različno sposobnost za tvorbo urejenih membranskih domen. Ta je odvisna od zgradbe njihove alifatske verige, modifikacij –OH skupine na nestu C3, odsotnosti dvojne vezi oz. prisotnosti dodatnih dvojnih vezi, prisotnosti dodatnih alkilnih skupin, ter od prisotnosti ali odsotnosti izooktilne verige. V okviru diplomske naloge smo preučevali vpliv modifikacije -OH skupine na sposobnost tvorbe urejenih membranskih domen. Že zelo majhne spremembe v njeni strukturi (dodatek metilne, formilne ali sulfonatne skupine, sprememba –OH v keto skupino) močno spremenijo sposobnost sterolov za kondenziranje membranskih fosfolipidov. Tako modificirani steroidi imajo v določenem obsegu zmanjšano sposobnost za tvorbo domen (Wang in sod., 2004). V tej nalogi smo z uporabo različnih spektroskopskih in elektroforetskih testov poskušali pokazati, kako modifikacija –OH skupine steroida vpliva na tvorbo urejenih membranskih domen. Uporabili smo lipidne vezikle (dvosloje) in membranske monosloje iz steroidov v kombinaciji z SM (molsko razmerje 1/1), ki v literaturi še niso bili raziskani. Večinoma so podobne efekte študirali z vezikli, ki so vsebovali različno nasičen fosfatidilholin. Kot označevalec urejenih membranskih domen smo uporabili protein ostreolizin, za katerega je bilo dokazano, da se preferenčno veže na membrane, sestavljene iz SM in Hol (Sepčić in sod., 2004). Naši rezultati nakazujejo, da je nespremenjena –OH skupina ne mestu C3 pomemben dejavnik pri tvorbi urejenih domen in da imajo steroli z modificirano –OH skupino slabšo sposobnost za njihovo tvorbo. Keto skupina pri 5-cholesten-3-onu ter acetatna skupina pri holesteril-acetatu (glej Sliko 7) sta vzrok za zmanjšano sposobnost tvorbe urejenih domen teh sterolov. Domnevamo, da je to posledica slabše tvorbe vodikovih vezi med keto- oz. acetatno skupino pri teh steroidih z molekulami vode oz. z drugimi lipidnimi molekulami v membrani ter spremenjene, bolj naključne orientacije teh sterolov v membrani, ki posledično ne morejo tvoriti dovolj tesno pakiranih membranskih struktur. Zmanjšana sposobnost tvorbe urejenih membranskih domen je bila nedavno dokazana tudi s poskusi polarizacije / anizotropije, kjer so lipidnim veziklom dodajali difenilheksatrien (Rebolj in sod., 2006).

V prvem delu naloge smo želeli kvantitativno določiti prisotnost DRM, oz. raftom podobnih struktur z metodo raztapljanja lipidnih veziklov z detergentom Triton X-100.

Zaradi svoje molekularne strukture detergenti težijo k tvorbi struktur z močno ukrivljeno površino (t.i. miceli) za razliko od fosfolipidov, ki težijo k tvorbi urejenih ravnih dvoslojev. Ko se molekula detergenta vrine v membranski dvosloj in ko je doseženo kritično razmerje med detergentom in lipidi, nastanejo miceli, ki pozneje razpadejo. Pri membranah, odpornih na raztapljanje z detergentom ne pride do micelizacije niti pri zelo visokih koncentracijah detergenta. Do raztapljanja sicer pride, vendar to nikoli ni popolno. Obstajajo različni detergenti, med katerimi pa membrane najbolj učinkovito raztaplja Triton X-100. S tem se je pojavilo vprašanje o morebitnem obstoju različnih vrst lipidnih raftov, ki bi jih bilo mogoče izolirati z različnimi detergenti. Vendar dokazi temu nasprotujejo, saj bi v primeru obstoja različnih vrst raftov morali obstajati tudi različni proteinski kompleksi, odgovorni za njihovo regulacijo (Lichtenberg in sod., 2005).

Zanimalo nas je, kako modifikacija –OH skupine sterolov vpliva na njihovo sposobnost za tvorbo DRM in posledično na raztapljanje z detergentom. Do popolnega in hitrega raztapljanja je prišlo le pri veziklih, sestavljenih iz čistega sfingomielina, ki pri sobni temperaturi obstajajo v čisti S fazi (De Almeida in sod., 2003). Vezikli, sestavljeni iz mešanice sfingomielina in holesterola, ki so v tekoči urejeni (L_o) fazi, so ostali skoraj popolnoma neraztopljeni tudi pri zelo visokih koncentracijah detergenta (višjih od 4,5 mM) (glej Sliko 8), iz česar sklepamo, da je bil v teh veziklih prisoten velik delež DRM. Pri veziklih, sestavljenih iz mešanice sfingomielina in sterolov z modificirano –OH skupino (Hol-Ac in Hol-on) je po dodatku detergenta prišlo do raztapljanja in sicer je intenziteta sipane svetlobe v primeru Hol-Ac padla za 50%, pri Hol-on pa za 40%, kar kaže na manjšo količino prisotnih DRM. Ta rezultat v grobem potrjuje naše domneve, da modifikacija –OH skupine holesterola zmanjša sposobnost za tvorbo DRM.

V drugem delu naloge smo z uporabo posrednih (test inhibicije hemolize in SDS/PAGE elektroforeza) in neposrednih (SPR) metod ugotavljali vezavo ostreolizina na lipidne mono- in dvosloje, ki so vsebovali različno modificirane steroide. Iz predpostavke, da se osterolizin veže le na urejene, raftom podobne membranske domene (Sepčić in sod., 2004), smo sklepali, ali so le te nastajale.

Do inhibicije hemolize pride v primeru, ko se ostreolizin predhodno veže na membrano, s tem pa ga ni na razpolago za hemolizo pozneje dodanih eritrocitov.

Do inhibicije hemolize je prišlo le pri veziklih, sestavljenih iz mešanice sfingomielina in holesterola (glej Sliko 10). To je dokaz, da se je ostreolizin vezal na vezikle in potrjuje domnevo, da je nespremenjena funkcionalna -OH skupina pomembna za njegovo vezavo. S to metodo smo potrdili, da je za vezavo ostreolizina potrebna specifična kombinacija holesterola in sfingomielina (Sepčić in sod., 2004) in nespremenjena -OH skupina na mestu C3.

Podobne rezultate smo dobili tudi z metodo SDS/PAGE, kjer smo posredno ugotavljali vpliv različnih sterolov oz. modifikacije njihove -OH skupine na vezavo ostreolizina na multilamelarne vezikle (MLV). Pri veziklih iz mešanice sfingomielina in holesterola se je ostreolizin v dobri meri vezal na MLV, pri veziklih iz mešanice sfingomielina in sterolov z modificirano -OH skupino (Hol-Ac in Hol-on) pa do vezave ni prišlo oz. je bila minimalna in je verjetno odražala prost ostreolizin, ki se je nahajal v pufru med lipidnimi vezikli (glej Sliko 11A, 11B). Preverjali smo tudi vezavo ostreolizina pri veziklih iz mešanice sfingomielina in različnih sterolov naravnega izvora, ki imajo modificirano alkilno verigo ali steroidni skelet, imajo pa popolnoma nespremenjeno -OH skupino na mestu C3 (ergosterol, stigmasterol, lanosterol, 7-dehidrosterol in β -sitosterol). Pri teh je bil delež vezanega ostreolizina bistveno višji kot v primeru Hol-on in Hol-Ac. Iz teh rezultatov sklepamo, da ima -OH skupina pomembnejšo vlogo pri tvorbi urejenih domen in vezavi ostreolizina kot pa steroidni skelet. Tudi testi vezave ostreolizina in njegove litične aktivnosti na veziklih, sestavljenih iz SM in naravnih sterolov (Žiberna, rezultati diplomske naloge) močno potrjujejo to predpostavko.

Vezavo ostreolizina na monosloje smo določali tudi neposredno z metodo površinske plazmonske resonance (SPR). Tudi tukaj smo največji odziv zabeležili pri veziklih iz mešanice sfingomielina in holesterola, kar pomeni, da je bila pri teh vezava ostreolizina najmočnejša. Šibak odziv je bil prisoten pri veziklih iz mešanice sfingomielina in Hol-on, pri veziklih iz sfingomielina in Hol-Ac ter pri veziklih iz čistega SM pa praktično ni prišlo do vezave (glej Sliki 13 in 14).

Litično aktivnost ostreolizina smo določali z metodo sproščanja kalceina iz lipidnih veziklov. Tudi v tem primeru je do sproščanja prišlo le pri veziklih, sestavljenih iz mešanice sfingomielina in holesterola, kar kaže na to, da se je ostreolizin nanje vezal in tvoril pore v membrani.

Pri veziklih, sestavljenih iz mešanice sfingomielina in sterolov z modificirano –OH skupino (Hol-Ac in Hol-on) pa ni prišlo do permeabilizacije ostreolizina niti pri zelo visokih koncentracijah ostreolizina (7 μ M) (glej Sliko 14).

Z metodo raztapljanja lipidnih veziklov z detergentom Triton X-100 smo posredno potrdili, da je učinkovitost sterolov z modificirano –OH skupino na mestu C3 za tvorbo raftom podobnih struktur slabša od sterolov z nespremenjeno –OH skupino (Hol).

Rezultati metod, s katerimi smo določali vezavo ostreolizina na lipidne vezikle (inhibicija hemolize, SDS/PAGE, SPR), so bili med seboj dobro primerljivi in dokazujejo, da se ostreolizin specifično veže na lipidne vezikle iz SM in Hol, ki se pri 25°C nahajajo v L_0 fazi (De Almeida in sod., 2005), oz. na raftom podobne strukture, in da je za nastanek DRM potrebna istočasna prisotnost holesterola in sfingomielina. Ti testi posredno kažejo na to, da imajo steroli z modificirano –OH skupino slabšo sposobnost za tvorbo lipidnih raftov. Isto smo uspeli dokazati tudi z metodo sproščanja kalceina, s katero smo preučevali litično aktivnost ostreolizina.

5.2 SKLEPI

- Steroli z modificirano –OH skupino na mestu C3 imajo v primerjavi s holesterolom slabšo sposobnost za tvorbo urejenih membranskih domen. 5-holesten-3-on ima na mestu C3 keto skupino, ki je vzrok za zmanjšano sposobnost tvorbe urejenih domen, holesteril-acetat pa na istem mestu acetatno skupino in v primerjavi s 5-holesten-3-on-om še nižjo sposobnost za njihovo tvorbo.
- Ostreolizin, citolitični protein užitne gobe bukov ostrigar, potrebuje za svojo vezavo in aktivnost tako prisotnost holesterola kot tudi sfingomielina in se z veliko

afiniteto specifično veže na domene, ki so bogate s tema dvema steroloma. Njegova vezava je odvisna od prisotnosti urejenih membranskih domen ter specifičnih sterolov, predvsem holesterola.

- Prisotnost steroidov z modificirano –OH skupino (holesteril-acetat in 5-holesten-3-on) v primerjavi s holesterolom ne omogoča vezave oz. močno zmanjša vezavo ostreolizina na membrano in njegovo litično aktivnost, saj ti steroidi ne omogočajo tvorbe urejenih domen oz. jih tvorijo v manjšem obsegu.
- Nemodificirana -OH skupina sterola na mestu C3 je ključnega pomena za aktivnost ostreolizina in verjetno sodeluje pri njegovem prepoznavanju vezavnih mest na membrani.

6 POVZETEK

Membranske domene, bogate s holesterolom, sfingomielinom in specifičnimi proteini imenujemo lipidni rafti. Ti imajo pomembno vlogo pri številnih celičnih funkcijah, poleg tega pa so pomembna vezavna mesta nekaterih toksinov, med katerimi je tudi ostreolizin in užitne gobe bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*). Zaradi netopnosti v mrzlem detergentu Triton X-100 imenujemo rafte tudi na detergent odporne membrane (DRM). Slednjo lastnost pogosto izrabljamo pri njihovi izolaciji. V okviru diplomske naloge smo dokazali, da modifikacija –OH skupine sterolov močno vpliva na njihovo sposobnost za tvorbo urejenih domen v lipidnih veziklih. Z metodo raztapljanja membran z detergentom Triton x-100 smo dokazali, da imajo steroli z modificirano –OH skupino na mestu C3 (holesteril-acetat in 5-holesten-3-on) v primerjavi s holesterolom (ki ima prosto –OH skupino na mestu C3) manjšo sposobnost za tvorbo urejenih domen. Ta je pri veziklih, sestavljenih iz mešanice sfingomielina in holesteril-acetata še nižja kot pri veziklih iz mešanice sfingomielina in 5-holesten-3-ona. Temu je vzrok manj polarna acetatna in keto skupina v molekuli holesteril-acetata in 5-holesten-3-ona, zaradi česar se ti steroli bolj naključno orientirajo v membrani in slabše tvorijo vodikove vezi z ostalimi lipidnimi molekulami v membrani in posledično ne omogočajo tvorbe urejenih domen. Vpliv modifikacije –OH skupine na zmanjšano sposobnost tvorbe urejenih domen smo potrdili tudi z metodami ugotavljanja vezave ostreolizina. Ker se ta specifično veže le na urejene lipidne domene bogate s Hol in SM, smo v primeru, da je prišlo do njegove vezave sklepali, da so bili rafti v veziklih prisotni. Pri vseh uporabljenih metodah (inhibicija hemolize, SDS/PAGE, SPR, sproščanje kalceina) so bili rezultati primerljivi in so potrdili domnevo, da imajo steroli z modificirano –OH skupino (acetatna, keto skupina) na mestu C3 zmanjšano sposobnost za tvorbo urejenih domen oz. da jih sploh ne tvorijo.

7 SUMMARY

Membrane domains enriched in cholesterol, sphingomyelin and specific proteins, also known as lipid rafts, play important roles in a number of cellular functions and also act as protein binding sites. Ostreolysin, a pore forming protein from edible oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*, specifically binds to lipid rafts. Because of their insolubility in cold detergent Triton X-100, rafts are also called detergent-resistant membranes (DRMs). Triton X-100 is a major tool in the investigation and isolation DRMs. In this study, we confirmed that modification of steroid –OH group strongly affects their ability to promote ordered lipid domains. Results obtained with solubilization by Triton X-100 showed that steroids with modified –OH group at the position C3 (cholesteryl-acetate and 5-cholesten-3-one) in general have a deleterious effect on their ability to form ordered lipid domains compared with cholesterol (that has unmodified –OH group at the same position). The polar region of cholesteryl-acetate and 5-cholesten-3-one, which lacks the hydrogen-bonding capability is smaller than of cholesterol, due to the differences between the acetate or keto, and the –OH groups at the position C3 of the two steroids. On the other hand, cholesteryl-acetate and 5-cholesten-3-one are randomly distributed in the bilayer plane and therefore they do not promote formation of such ordered lipid domains. Results, obtained from binding of ostreolysin to lipid vesicles also showed a lower ability of such modified steroids to form ordered lipid domains. Since ostreolysin specifically binds on domains enriched with cholesterol and sphingomyelin, we concluded that vesicles susceptible to ostreolysin binding contained lipid rafts. Taken together, results obtained with all methods (inhibition of hemolysis, SDS/PAGE, SPR, calcein release) indicate that steroids with modified –OH group at the position C3 have lower capability to form ordered lipid domains or even, this ability is completely absent.

8 VIRI

- Ahmed S.N., Brown D.A., London E. 1997. On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry*, 36: 10944-10953
- Alegre-Cebollada J., Rodriguez-Crespo I., Gavilanes J.G., Martinez del Pozo A. 2005. Detergent-resistant membranes are platforms for actinoporin pore-forming activity on intact cells. *FEBS Journal*, 273: 863-871
- Alvarez V.C., Dalla-Serra M., Potrich C., Bernhart T., Tejuca M., Martinez D., Pazus F., Lanio M.L., Manestrina G. 2001. Effect on lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolytins of the sea anemone *Stichodactyla heliathus*. *Biophysical Journal*, 80: 2761-2774
- Anderluh G. 2006. Tehnologija BIACORE. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. (10.3.2006) <http://www.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/SPR/TEHNOLOGIJA%20BIACORE.html> (februar 2006): 4 str.
- Anderluh G., Maček P. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemone (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*, 40: 111-124
- Barenholz Y. 2002. Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts". *Progress in Lipid Research*, 41:1-5
- Barenholz Y., Ben-Yashar V. 1989. The interaction of cholesterol and cholest-4-en-3-one with dipalmitoylphosphatidylcholine. Comparison based on the use of three fluorophores. *Biochimica et Biophysica Acta*, 985: 271-278

- Barlič A., Gutierrez A., Caaveiro J.M., Cruz A., Riz-Arguello M.B., Perez-Gil J., Gonzalez-Manas J.M. 2004. Lipid phase coexistence favors membrane insertion of equinatoxin II, a pore-forming toxin from *Actinia equina*. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 34209-34216
- Barloy F., Lecadet M.M., Delécluse A. 1998. Cloning and sequencing of three new putative toxin genes from *Clostridium bifermentans* CH18. *Gene*, 211: 293-299
- Beattie E.M., Veatch L.S., Stottrup L.B., Keller L.K. 2005. Sterol structure determines miscibility transitions in lipid vesicles. *Biophysical Journal*, 89: 1760-1768
- Berne S., Križaj I., Pohleven F., Turk T., Maček P., Sepčič K. 2002. *Pleurotus* and *Agrocybe* hemolysis, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1570: 153-159
- Berne S., Sepčič K., Anderluh G., Turk T., Maček P., Ulrih P. 2005. Effect of pH on the pore forming activity and conformational stability of ostreolysin, a lipid raft-binding protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochemistry*, 44: 11137-11147
- Beseničar M., Maček P., Lakey H.J., Anderluh G. 2006. Surface plasmon resonance in protein membrane interactions. *Chemistry and Physics Lipids*, 141: 169-178
- Bittman R., Duportail G., Heissler D., Vilchezes C., London E. 2001. Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). *Journal of Biological Chemistry*, 276: 33540-33546
- Boyer R.F. 2005. Lipidi, biološke membrane in transport. V: Boyer R.F. Temeljni biokemije. 2nd ed. Ljubljana, Študentska založba: 208-240

Brown D.A., Rose J.K. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68: 533-544

Brown D.A., London E. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 17221-17224

Brown R.E. 1998. Sphingolipid organizations in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *Journal of Cell Science*, 111: 1-9

Dahl C.E. 1981. Effect of sterol structure on acyl chain ordering in phosphatidylcholine vesicles: A deuterium nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study. *Biochemistry*, 20:7158-7161

de Almeida R.F.M., Fedorov A., Prieto M. 2003. Sphingomyelin/Phosphatidylcholine/Cholesterol phase diagram: Boundaries and composition of lipid rafts. *Biophysical Journal*, 85: 2406-2416

Ebina K., Sakagami H., Yokota K., Kondo H. 1994. Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1219: 148-150

Edidin M. 2003. The state of lipid rafts: From model membranes to cells. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure*, 32: 257-283

Evans E., Needham D. 1987. Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion, and colloidal interactions. *Journal of Physical Chemistry*, 91: 4219-4228

- Halling K.K., Slotte J.P. 2004. Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1664: 161-171
- Hsuch Y.W., Gilbert K., Trandum C., Zuckermann M., Thewalt J. 2004. The effect ergosterol on dipalmitoyl/phosphatidylcholine bilayers: a deuterium NMR and calorimetric study. *Biophysical Journal*, 88: 1700-1808
- Ishitsuka R., Sato S.B., Kobayashi T. 2005. Imaging lipid rafts. *Japanese Biochemical Society (Tokyo)*, 137: 249-254
- Keller K.P., Arnold T.P., Flieser S.J. 2004. Formation of 7-dehydrocholesterol-containing membrane rafts in vitro and vivo, with relevance to the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Journal of Lipid Research*, 45: 347-355
- Lala A.K., Buttke T.M., Bloch K. 1979. Communication on the role of the sterol hydroxyl group in membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 254: 10582-10585
- Li X.M., Momsen M.M., Smaby J.M., Brockman H.L., Brown R.E. 2001. Cholesterol decreases the interfacial elasticity and detergent solubility of sphingomyelins. *Biochemistry*, 40: 5954-5963
- Li X.M., Momsen M.M., Brockman H.W., Brown R.E. 2003. Sterol structure and sphingomyelin acyl chain length modulate lateral packing elasticity and detergent solubility in model membranes. *Biophysical Journal*, 85: 3788-3801
- Lichtenberg D., Goñi F.M., Heerklotz H. 2005. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends in Biochemical Sciences*, 30: 430-436
- London E. 2002. Insights into lipid structure and formation from experiments in model membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 480-486

- London E., Brown D.A. 2000. Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508: 182-195
- Martin S.W., Glover B.J., Davies M.J. 2005. Lipid microdomains-plant membranes get organized. *Trends in Plant Science*, 10: 263-265
- McIntosh T.J., Simon S.A., Needham D., Huang C.H. 1992. Structure and cohesive properties of sphingomyelin/cholesterol bilayers. *Biochemistry*, 31: 2012-2020
- Needham D., Nunn R.S. 1990. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophysical Journal*, 58: 997-1009
- Nelson D.L., Cox M.M. 2000. Lipids. V: Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd ed. New York, Worth Publishers: 363-388
- Ohvo-Rekilä H., Ramstedt B., Leppimäki P., Slotte J.P. 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*, 41: 66-97
- Rebolj K., Ulrih Poklar-N., Maček P., Sepčič K. 2006. Steroid structural requirements for interaction of ostreolysin, a lipid-raft binding cytolysin, with lipid monolayers and bilayers. *Biochimica et Biophysica 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*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1679: 65-73.
- Scheidt H.A., Müller P., Herrmann A., Huster D. 2003. The potential of fluorescent and spin-labeled steroid analogs to mimic natural cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 45563-45569

- Schroeder R.J., London E., Brown D. 1994. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipid and glycosylphosphatidyl (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, 91: 12130-12134
- Schroeder R.J., Ahmed S.N., Zhu Y., London E., Brown D.A. 1998. Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 1150-1157
- Sepčič K., Berne S., Potrich C., Turk T., Maček P., Menestrina G. 2003. Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. *European Journal of Biochemistry*, 270: 1199-1210
- Sepčič K., Berne S., Rebolj K., Batista U., Plemenitaš A., Šentjerc M., Maček P. 2004. Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interact specifically with membrane cholesterol-rich lipid domains. *FEBS Letters*, 575: 81-85
- Silvius R.J. 2003. Roles of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1610: 174-183
- Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387: 569-572
- Slotte P.J. 1995. Effect of sterol structure on molecular interactions and lateral domain formation in monolayers containing dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1237: 127-134

Sterols. 2000. Alabaster, Avanti Polar Lipids

<http://www-avantilipids.com> (August 2006): 1 str.

Subczynski W., Kusumi A. 2003. Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 78436: 1-13

Tomita T., Noguchi K., Mimuro H., Ukaji F., Ito F., Sugawara-Tomita N., Hashimoto Y. 2004. Pleurotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, assembles into a transmembrane pore complex. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 26975-26982

Vidic I., Berne S., Drobne D., Maček P., Frangež R., Turk T., Štrus J., Sepčič K. 2005. Temporal and spatial expression of ostreolysin during development of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Mycological Research*, 109: 377-382

Wachtler V., Baalasubramanian M.K. 2006. Yeast lipid rafts?-An emerging view. *Trends in Cell Biology*, 16: 1-4

Waheed. A.A., Shimada Y., Heijnen H.F.G., Nakamura M., Inomata M., Hayashi M., Iwashita S., Slot J. W., Ohno-Iwashita Y. 2001. Selective binding of perfringolysin O derivate to cholesterol-rich membrane microdomains (rafts). *Biochemistry*, 98: 4926-4931

Wang J., Megha, London E. 2004. Relationship between sterol/steroid structure and participation in ordered lipid domains (lipid rafts): Implications for lipid raft structure and function. *Biochemistry*, 43: 1010-1018

Wenz J.J., Barrantes F.J. 2003. Steroid structural requirements for stabilizing or Xu X., disrupting lipid domains. *Biochemistry*, 42: 14267-14276

Xu X., London E. 2000. The effect on sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry*, 39: 844-849

Xu X., Bittman R., Duportail G., Heissler D., Vilcheze C., London E. 2001. Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 276: 33540-33546

Yashar B.V., Barenholz Y. 1989. The interaction of cholesterol and cholest-4-en-3-one with dipalmitoylphosphatidylcholine. Comparison based on the use of three fluorophores. *Biochimica et Biophysica Acta*, 985: 271-278

Yeagle P.L., Martin R.B., Lala A.K., Lin H.K., Bloch K. 1977. Differential effect of cholesterol and lanosterol on artificial membranes. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, 74: 4924-4926

Žiberna A. 2006. Vpliv sterolne komponente tekoče urejene lipidne faze na vezavo citolitičnega proteina ostreolizina. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: v pripravi

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

ZAHVALA

Svoji mentorici prof. dr. Kristini Sepčič se iskreno zahvaljujem za vso podporo, prejeta znanje, nasvete in praktično pomoč.

Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Petru Mačku za pomoč pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvale tudi prof. dr. Tomu Turku za zanimiva predavanja med samim študijem.

Ireni Pavešič se prav tako zahvaljujem za vso praktično pomoč v laboratoriju.

Hvala lepa Katji Rebolj za vso praktično pomoč in koristne nasvete.

Hvala Mateju, Nataši, Sandiju, Tilnu, Jani, Julijani in Samotu za praktično pomoč.

Nazadnje pa velika zahvala svojim domačim za vso finančno podporo in spodbude tekom celotnega študija.