

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Katja OTA

**PROUČEVANJE VPLIVA STRUKTURE STEROIDOV NA TVORBO  
MEMBRANSKIH DOMEN V LIPIDNIH VEZIKLIH Z ELEKTRONSKO  
PARAMAGNETNO REZONANCO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF STEROID STRUCTURE ON MEMBRANE DOMAIN  
FORMATION STUDIED BY ELECTRON PARAMAGNETIC  
RESONANCE**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2009

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 Stefan, Ljubljana.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Kristino Sepčič, za somentorico dr. Marjeto Šentjuro, za recenzenta prof. dr. Petra Mačka, za predsednika komisije pa prof. dr. Nino Gunde-Cimerman.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN

Član: prof. dr. Kristina SEPČIČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: dr. Marjeta ŠENTJURC

Inštitut Jožef Stefan, 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: 27.05.2009

Katja Ota

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 577.11:579.23:582.28(043.2)=163.6

KG bukov ostrigar / domenska struktura / elektronska paramagnetna resonanca / fosfatidilholin / holesterol / lipidni rafti / lipidni vezikli / ostreolizin / *Pleurotus ostreatus* / sfingomielin / steroidi / tekoča urejena faza

AV OTA, Katja

SA SEPČIČ Kristina – mentorica/ŠENTJURC, Marjeta - somentorica

KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2009

IN PROUČEVANJE VPLIVA STRUKTURE STEROIDOV NA TVORBO MEMBRANSKIH DOMEN V LIPIDNIH VEZIKLIH Z ELEKTRONSKO PARAMAGNETNO RESONANCO

TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)

OP XII, 89 str., 28 sl., 12 pregl., 86 vir.

IJ sl.

JI sl/an.

AI Steroidi imajo različno sposobnost urejanja lipidnih molekul in tvorbe urejenih membranskih domen (lipidnih raftov). Ostreolizin, citolitični protein gobe bukove ostrigar (*Pleurotus ostreatus*), specifično prepoznava s holesterolom obogatene lipidne rafte, ki so v tekoči urejeni fazi in je litičen za membrane, ki vsebujejo sfingomielin in holesterol. Membranska aktivnost ostreolizina je močno inhibirana ob dodatku nenasičenih lipidov in lizofosfolipidov. Namen diplomskega dela je bil preučiti vpliv različnih steroidov, različno nasičenih fosfolipidov in lizofosfolipidov na domensko strukturo membran veziklov ter ugotoviti sovpadanje te strukture z membransko aktivnostjo ostreolizina. Z metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR) smo detektirali tri soobstoječe vrste domen z različnimi karakteristikami fluidnosti. Na ostreolizin občutljive membrane imajo podobno domensko strukturo, ki se značilno razlikuje od membran, na katere se ostreolizin ne veže. Zamenjava sfingomieline z nenasičenim fosfatidilholinom močno zmanjša urejenost membrane, kar se kaže v zmanjševanju deleža in vrednosti ureditvenega parametra najbolj urejene vrste domene. Dodatek lizofosfatidilholina v nasprotju s pričakovanji ne povzroči opaznih razlik v domenski strukturi.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 577.11:579.23:582.28(043.2)=163.6
- CX oyster mushroom / domain structure / electron paramagnetic resonance / phosphatidylcholine / cholesterol / lipid rafts / lipid vesicles / ostreolysin / *Pleurotus ostreatus* / sphingomyelin / steroids / liquid ordered phase
- AU OTA, Katja
- AA SEPČIĆ Kristina – supervisor/ŠENTJURC, Marjeta – co-supervisor
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PU University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology
- PY 2009
- TI THE EFFECT OF STEROID STRUCTURE ON MEMBRANE DOMAIN FORMATION STUDIED BY ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XII, 89 p., 28 fig., 12 tab., 86 ref.
- LA sl.
- JI sl/en.
- AI Steroids exert different ability to order lipid molecules and form ordered membrane domains (lipid rafts). Ostreolysin, a cytolytic protein from the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) specifically recognizes cholesterol-rich lipid rafts in liquid ordered phase, and is lytic to membranes containing sphingomyelin and cholesterol. Ostreolysin membrane activity is strongly inhibited by the addition of unsaturated lipids and lysophospholipids. The objective of the graduation thesis was to study the effect of different steroids, phospholipids with different degree of saturation, and lysophospholipids on domain structure of vesicles, and to ascertain how the domain structure coincides with the membrane activity of ostreolysin. By utilizing electron paramagnetic resonance method (EPR) we detected three coexisting domain types with different fluidity characteristics. The domain structures of ostreolysin-sensitive membranes are similar and significantly differ from ostreolysin-insensitive membranes. Replacing sphingomyelin with unsaturated phosphatidylcholine considerably decreases membrane ordering, which is reflected in the decrease of proportion and value of order parameter of the most ordered domain type. The addition of lysophosphatidylcholine does not exhibit expected differences in domain structure.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XI
1 UVOD.....	13
2 PREGLED OBJAV .....	15
2.1 LIPIDNI RAFTI.....	15
2.1.1 Vrste lipidnih raftov v membrani .....	17
2.1.2 Funkcija raftov.....	18
2.1.3 Koncept lipidnih raftov.....	19
2.2 METODE ZA PREUČEVANJE LIPIDNIH RAFTOV .....	20
2.2.1 Elektronska paramagnetna resonanca.....	22
2.3 CITOLITIČNI PROTEINI, KI SE VEŽEJO NA LIPIDNE RAFTE .....	27
2.3.1 OSTREOLIZIN .....	28
2.4 VPLIV STRUKTURE STEROIDOV IN NASIČENOSTI ACILNIH VERIG FOSFOLIPIDOV NA SPOSOBNOST TVORBE UREJENIH MEMBRANSKIH DOMEN..	30
3 MATERIAL IN METODE.....	33
3.1 MATERIAL.....	33
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema .....	33
3.1.2 Raztopine .....	35
3.1.3 Laboratorijska oprema.....	35
3.2 PRIPRAVA LIPIDNIH VEZIKLOV .....	36
3.2.1 Priprava multilamelarnih veziklov (MLV).....	37
3.2.2 Priprava malih unilamelarnih veziklov (SUV).....	37
3.2.3 Priprava vzorca za EPR .....	37

3.3	DOLOČANJE KONCENTRACIJE LIPIDOV S KOLORIMETRIČNIM ENCIMSKIM TESTOM .....	38
3.3.1	Encimski test Phospholipids B .....	38
3.3.2	Encimski test Free Cholesterol C .....	39
3.4	ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA REZONANCA .....	40
4	REZULTATI .....	42
4.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE LIPIDOV Z ENCIMSKIM TESTOM .....	42
4.2	ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA REZONANCA .....	43
4.2.1	EPR meritve veziklov pri različnih temperaturah .....	43
4.2.2	EPR meritve veziklov z različnimi vrstami steroidov .....	50
4.2.3	EPR meritve veziklov iz holesterola in fosfatidilholina .....	62
5	RAZPRAVA IN SKLEPI .....	73
5.1	RAZPRAVA .....	73
5.2	SKLEPI .....	78
6	POVZETEK .....	79
7	VIRI .....	80
	ZAHVALA .....	89

## KAZALO SLIK

Slika 1: Biološka membrana, predstavljena z modelom tekočega mozaika.....	15
Slika 2: Energetski nivoji elektrona v magnetnem polju.....	23
Slika 3: Spinski označevalec MeFASL .....	25
Slika 4: Kemijska zgradba preučevanih sterolov in njihovih sintetičnih derivatov .....	31
Slika 5: Kemijska zgradba preučevanih fosfolipidov.....	32
Slika 6: Eksperimentalni EPR spektri veziklov, pripravljenih iz SM in CH, posneti v temperaturnem razponu od 277 do 312 K. Spinski označevalec je MeFASL (10,3).....	43
Slika 7: Eksperimentalni EPR spektri veziklov, pripravljenih iz SM in CH, posneti v temperaturnem razponu od 277 do 312 K. Spinski označevalec je MeFASL (2,11).....	44
Slika 8: Reprezentativni EPR spekter veziklov iz SM in CH, označenih z MeFASL (10,3). Spektri so izmerjeni pri sobni temperaturi (297 K).....	45
Slika 9: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra in deleža domen pri veziklih iz SM in CH. Spinski označevalec je MeFASL (10,3) .....	46
Slika 10: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra in deleža domen pri veziklih iz SM in CH. Spinski označevalec je MeFASL (2,11) .....	46
Slika 11: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra, kota $\varphi$ ter deleža domen v veziklih iz SM in CH. Spinski označevalec je MeFASL (10,3).....	48
Slika 12: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra, kota $\varphi$ ter deleža domen v veziklih iz SM in CH. Spinski označevalec je MeFASL (2,11).....	49
Slika 13: Eksperimentalni EPR spektri veziklov iz SM in različnih steroidov pri sobni temperaturi (297 K). Spinski označevalec je MeFASL (10,3).....	50
Slika 14: Eksperimentalni EPR spektri veziklov iz SM in različnih steroidov pri sobni temperaturi (297 K). Spinski označevalec je MeFASL (2,11).....	51
Slika 15: Maksimalni hiperfini razcep ( $2A_{\max}$ ) spinskega označevalca MeFASL (10,3) v odvisnosti od temperature v membranah veziklov iz SM in različnih steroidov .....	52

Slika 16: Maksimalni hiperfinski razcep ( $2A_{\max}$ ) spinskega označevalca MeFASL (10,3) v membranah veziklov iz SM in različnih steroidov pri sobni temperaturi (297 K).....	52
Slika 17: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra in deleža domen pri veziklih iz SM in ergosterola oz. 5-holesten-3-ona. Spinski označevalec je MeFASL (10,3) in MeFASL (2,11). .....	53
Slika 18: Odvisnost ureditvenega parametra, korekcijskega faktorja polarnosti ter deleža domen v veziklih iz SM in različnih steroidov. Spinski označevalec je MeFASL (10,3), merjeno pri 297 K.....	58
Slika 19: Odvisnost ureditvenega parametra, korekcijskega faktorja polarnosti ter deleža domen v veziklih iz SM in različnih steroidov. Spinski označevalec je MeFASL (10,3), merjeno pri 307 K.....	59
Slika 20: Odvisnost ureditvenega parametra, korekcijskega faktorja polarnosti ter deleža domen v veziklih iz SM in različnih steroidov. Spinski označevalec je MeFASL (2,11), merjeno pri 297 K.....	60
Slika 21: Eksperimentalni EPR spektri MeFASL (10,3) v veziklih iz CH in različno nasičenih fosfolipidov. Spektri so posneti pri sobni temperaturi (297 K).....	62
Slika 22: Eksperimentalni EPR spektri MeFASL (2,11) v veziklih iz CH in različno nasičenih fosfolipidov. Spektri so posneti pri sobni temperaturi (297 K).....	63
Slika 23: Maksimalni hiperfinski razcep ( $2A_{\max}$ ) MeFASL (10,3) v odvisnosti od temperature v membranah veziklov iz CH različno nasičenih fosfolipidov.....	64
Slika 24: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra in deleža domen MeFASL (10,3) in (2,11) pri veziklih iz CH in različno nasičenih fosfolipidov .....	65
Slika 25: Odvisnost ureditvenega parametra, korekcijskega faktorja polarnosti ter deleža domen v veziklih iz CH in različno nasičenih fosfolipidov. Spinski označevalec je MeFASL (10,3), merjeno pri 297 K. ....	69
Slika 26: Odvisnost ureditvenega parametra, korekcijskega faktorja polarnosti ter deleža domen v veziklih iz CH in različno nasičenih fosfolipidov. Spinski označevalec je MeFASL (10,3), merjeno pri 307 K.....	70



Slika 27: Odvisnost ureditvenega parametra, korekcijskega faktorja polarnosti ter deleža domen v veziklih iz CH in različno nasičenih fosfolipidov. Spinski označevalec je MeFASL (2,11), merjeno pri 297 K. ....	71
Slika 28: Vezava in permeabilizacija veziklov z ostreolizinom, merjena pri 25 °C.....	74

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Molsko razmerje lipidov v pripravljenih veziklih.....	36
Preglednica 2: Parametri meritev EPR.....	40
Preglednica 3: Izmerjeno molsko razmerje in koncentracija lipidov v veziklih .....	42
Preglednica 4: Deleži domen in ureditveni parameter v odvisnosti od temperature, vezikli iz SM in CH, MeFASL (10,3) in MefASL (2,11).....	47
Preglednica 5: Deleži domen in ureditveni parameter veziklov iz SM in različnih steroidov pri 297 K, MeFASL (10,3) .....	54
Preglednica 6: Deleži domen in ureditveni parameter veziklov iz SM in različnih steroidov pri 307 K, MeFASL (10,3) .....	55
Preglednica 7: Deleži domen in ureditveni parameter veziklov iz SM in različnih steroidov pri 297 K, MeFASL (2,11) .....	56
Preglednica 8: Deleži domen in ureditveni parameter veziklov iz SM in različnih steroidov pri 307 K, MeFASL (2,11) .....	57
Preglednica 9: Deleži domen in ureditveni parameter v veziklih iz CH in različno nasičenih fosfolipidov pri 297 K, MeFASL (10,3) .....	66
Preglednica 10: Deleži domen in ureditveni parameter v veziklih iz CH in različno nasičenih fosfolipidov pri 307 K, MeFASL (10,3) .....	67
Preglednica 11: Deleži domen in ureditveni parameter v veziklih iz CH in različno nasičenih fosfolipidov pri 297 K, MeFASL (2,11) .....	67
Preglednica 12: Deleži domen in ureditveni parameter v veziklih iz CH in različno nasičenih fosfolipidov pri 307 K, MeFASL (2,11) .....	68

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFM	mikroskopija na atomsko silo (atomic force microscopy)
BSA	goveji serumski albumin (bovine serum albumin)
CH	holesterol
CH-Ac	holesteril-acetat
CH-on	5-holesten-3-on
CH-su	holesteril-sulfat
D1	najbolj urejena domena
D2	srednje urejena domena
D3	najmanj urejena domena
7-DHC	7-dehidroholesterol
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin, dipalmitoilfosfatidilholin
DOPC	1,2-dioleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin, dioleilfosfatidilholin
DRM	na detergent odporne membrane (detergent resistant membranes)
DSC	kalorimetrija z diferencialnim skeniranjem (differential scanning calorimetry)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
EPR	elektronska paramagnetna resonanca, tudi ESR
Ergo	ergosterol
ESR	elektronska spinska resonanca
FRET	fluorescenčni prenos resonančne energije (fluorescent resonance energy transfer)
G <sub>M1</sub>	monosialogangliozid
GPI	glikozil fosfatidilinozitol
ITC	kalorimetrija z izotermalno titracijo (isothermal titration calorimetry)
Lano	lanosterol
<i>l<sub>d</sub></i>	tekoča neurejena faza (liquid disordered phase)
LizoPC	1-palmitoil-2-hidroksi- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin, lizofosfatidilholin
<i>l<sub>o</sub></i>	tekoča urejena faza (liquid ordered phase)

MLV	multilamelarni vezikli (multilamellar vesicles)
NMR	jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)
Oly	ostreolizin
POPC	1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin, palmitoiloleilfosfatidilholin
PPC	kalorimetrija s perturbacijo pritiska (pressure perturbation calorimetry)
rpm	obrati na minuto (revolutions per minute)
Sito	$\beta$ -sitosterol
SM	sfingomielin
$s_o$	trdna urejena faza (solid ordered phase)
Stigma	stigmasterol
SUV	majhni unilamelarni vezikli (small unilamellar vesicles)
$T_m$	temperatura faznega prehoda (melting temperature)
VCC	citolizin <i>Vibrio cholerae</i> ( <i>Vibrio cholerae</i> cytolysin)

## 1 UVOD

Lipidi predstavljajo razred molekul z veliko strukturno diverziteto in širokim spektrom bioloških funkcij. V celični membrani se ne porazdeljujejo homogeno, ampak tvorijo številne mikrodomene, ki se med seboj razlikujejo v sestavi in fizikalnih lastnostih. Prisotnost sterolov v membrani vodi v nastanek tekoče urejene faze, fizikalnega stanja, ki je značilno za lipidne rafte. Rafti imajo izjemno pomembne biološke funkcije: sodelujejo pri membranskem transportu, signalni transdukciji (Simons in Ikonen, 1997; London, 2002; Edidin, 2003) ter pritrditvi in vstopu celičnih patogenov, toksinov in drugih ligandov (Fivaz in sod., 1999; Simons in Ehehalt, 2002; Lafont in sod., 2004). Rezultati raziskav so pokazali, da že majhne strukturne modifikacije steroidnih molekul močno vplivajo na njihovo sposobnost pakiranja membranskih lipidov in posledično na tvorbo tekoče urejene faze (Xu in sod., 2001; Wang in sod., 2004; Scheidt in sod., 2003).

Tekočo urejeno ( $l_o$ ) fazo označuje visoka lateralna gibljivost lipidov, katerih acilne verige so iztegnjene in tesno pakirane (Brown in London, 2000; London, 2002). Membranski lipidi lahko tvorijo še tekočo neurejeno ( $l_d$ ) in trdno urejeno ( $s_o$ ) fazo. Vsaka od teh faz pa ima lahko različno stopnjo urejenosti, ki je podana z ureditvenim parametrom. V membranah  $l_o$  faza koeksistira z  $l_d$  fazo. Na lipidne rafte se vežejo številni citolitični proteini. Rafti služijo kot platforme za njihovo vezavo in oligomerizacijo. Eden izmed njih je ostreolizin užitne gobe bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*), katerega vezava je specifična in odvisna od hkratne prisotnosti holesterola in sfingolipidov. Ker njegova aktivnost do neke mere sovпада s sposobnostjo membranskih lipidov, da tvorijo rafte, bi lahko bil uporaben označevalec za detekcijo s holesterolom obogatenih lipidnih raftov.

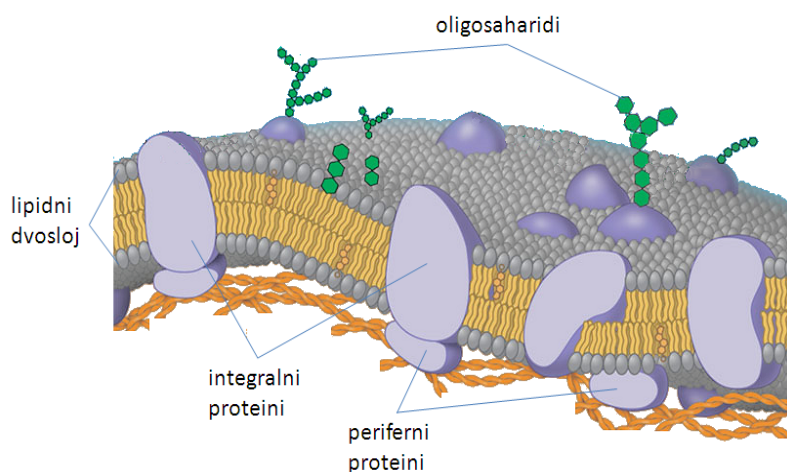
Ena od številnih metod za preučevanje membranskih domen je elektronska paramagnetna resonanca. Ta se je izkazala kot ustrezna tehnika za detekcijo in preučevanje tudi najmanjših heterogenih domenskih struktur lipidnih membran. Z uporabo dveh različnih označevalcev, MeFASL (10,3) in MeFASL (2,11), smo lahko preučili lastnosti površine in notranjosti membrane.

Namen diplomskega dela je bil preučiti, kako domenska struktura membran veziklov iz sfingomielina in različnih steroidov sovпада z membransko aktivnostjo ostreolizina. Naknadno smo preučili vpliv nasičenosti acilnih verig fosfatidilholina in vpliv dodatka lizofosfolipidov na domensko strukturo membran s holesterolom. Vzporedno je potekala raziskava Maje Garvas, ki je na enak način preučila vezikle iz sfingomielina in holesterola v različnih razmerjih. Obe diplomski nalogi predstavljata nadgradnjo diplomskih del Katje Dolgan Rebolj in Biserke Bakrač, kjer pa je bil uporabljen le spinski označevalec MeFASL (10,3).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 LIPIDNI RAFTI

Biološka membrana je sestavljena iz lipidov in proteinov, z ali brez na zunanji površini vezanih oligosaharidov (slika 1). Model tekočega mozaika jo opisuje kot dinamično strukturo, katere komponente se z lateralno difuzijo premikajo v ravnini membrane, debelina membrane pa se spreminja s časom (Singer in Nicholson, 1972; Frye in Edidin, 1970; Borochoy in Shnitzky, 1976). Danes si membrane predstavljamo po modelu mikrodomen, področij z različno sestavo in fizikalnimi lastnostmi. V tem kontekstu predstavljajo lipidni rafti tip domene, ki je obogatena s sfingolipidi (glikosfingolipidi, sfingomielin), holesterolom ter specifičnimi proteini (Lichtenberg in sod., 2005). K slednjim spadajo redki transmembranski proteini (Scheiffele in sod., 1997) ter lipidno sidrani proteini – GPI-vezani proteini (Brown in Rose, 1992) in acilirani proteini (Melkonian in sod., 1999).



Slika 1: Biološka membrana, predstavljena z modelom tekočega mozaika (povzeto po Biology, 2005: 119).

Interakcija med holesterolom (CH) in sfingomielinom (SM) v raftu je najmočnejša (Sankaram in Thompson, 1990). Med sterolnim obročem in nasičenimi acilnimi verigami sfingomielina se tvorijo van der Waalsove vezi (Krajewski-Bertrand in sod., 1992), med  $3\beta$ -OH skupino holesterola in amidno skupino sfingomielina pa se tvori vodikova vez (Ohvo-Rekila, 2002). Za povezovanje lipidov v membrani so poleg teh vezi odgovorne še hidrofobne vezi in interakcije med polarnimi glavami lipidnih molekul (Brown in London, 2000), večanje površinskega naboja pa privede do močnejše asociacije s holesterolom (Sankaram in Thompson, 1990). Holesterol z molekulami sfingomielina interagira prek celotne dolžine ter zapolni praznine med njimi (Simons in Ikonen, 1997).

Lastnost holesterola je tudi kondenzacija dvosloja s sfingomielinom, oz. površina mešanice lipidov je manjša od vsote površin posameznih lipidov (Ohvo-Rekila in sod., 2002). Membrane s holesterolom so debelejšje. Rafti se na spremembo količine ali dostopnosti komponent odzivajo s spremembo sestave (Pike, 2004). Količini sfingomielina in holesterola sta soodvisni, sprememba koncentracije enega lipida povzroči spremembo koncentracije drugega (Lichtenberg in sod., 2005). Holesterol se porazdeli med oba sloja membrane, sfingomielin pa ima preferenco do zunanjšega sloja (Edidin, 2003). Sfingolipidi zunanjšega sloja membrane naj bi pripomogli k sklopitvi domen obeh slojev, verjetno prek interdigitacije acilnih verig sfingolipida z lipidi nasprotnega sloja (Schmidt in sod., 1987).



### 2.1.1 Vrste lipidnih raftov v membrani

Ob odsotnosti zunanjega dražljaja so rafti majhni in nestabilni (zgrajeni iz 15 do 30 molekul sfingomielina in holesterola, z življenjsko dobo do 1 ms), a predstavljajo veliko površino membrane. Po stimulaciji z zunajceličnimi signali pa se tvorijo stabilni receptorski rafti (core receptor rafts), inducirani z vezavo liganda ali oligomerizacijo GPI-receptorskih molekul, ki se jim pridružijo nekateri transmembranski proteini. Njihova življenjska doba je daljša od 1 min. Ob difuziji le-ti inducirajo zlivanje majhnih nestabilnih raftov v prehodne rafte (transient confinement zone) z življenjsko dobo krajšo od 1 s. Imenujemo jih tudi signalni rafti, saj vsebujejo prožilce nadaljnje signalne kaskade (Suzuki in sod., 2001 in 2002). Rafti lahko hitro nastajajo, rastejo in izginjajo, kar je močno odvisno od funkcionalnih potreb celice.

V membrani se lipidi lahko uredijo v različne faze: tekočo neurejeno (liquid disordered,  $l_d$ ), tekočo urejeno (liquid ordered,  $l_o$ ) in trdno urejeno (gel) fazo (solid ordered,  $s_o$ ), odvisno od temperature in narave lipidov. Trdno urejeno fazo tvorijo lipidi z visoko temperaturo faznega prehoda (melting temperature,  $T_m$ ), katerih nasičene acilne verige so urejene, difuzija molekul pa je počasna. Obratno je v  $l_d$  fazi. V dvosloju čistega fosfolipida brez holesterola pride ob naraščanju temperature do faznega prehoda iz  $s_o$  v  $l_d$  fazo (Brown in London, 2000), fazni prehod je oster (London, 2000). Dodatek 30% holesterola (Brown in London, 1998; Hao in Chen, 2001) pa zabriše fazni prehod med njima (Brown in London, 2000). Tako se pojavi nova,  $l_o$  faza, v kateri so acilne verige iztegnjene in tesno pakirane kot v  $s_o$  fazi, imajo pa visoko stopnjo lateralne gibljivosti kot v  $l_d$  fazi (Brown in London, 2000; London, 2002). V binarnih mešanica fosfolipidov (z različnimi  $T_m$ ) brez holesterola pri fiziološki temperaturi koeksistirata  $s_o$  in  $l_d$  faza, ob dodatku 30% holesterola pa  $l_o$  in  $l_d$  faza (Brown in London, 1998; Brown in London, 2000).

V binarnih mešanica holesterol in sfingomielina se  $l_o$  faza tvori pri 30% holesterol, nad 50% holesterol pa so  $l_o$  domene kontinuirane (Hao in Chen, 2001). Biološke membrane vsebujejo lipide z nizko (glicerofosfatidi) in visoko  $T_m$  (sfingolipidi), kar nakazuje na možnost fazne separacije (Brown in London, 1998). Lipidni rafti se torej nahajajo v  $l_o$  fazi, v ravnini membranskega dvosloja so obdani z nenasičenimi glicerofosfatidi v  $l_d$  fazi (London, 2002). Gel faza v bioloških membranah razen v izjemnih okoliščinah ne obstaja (Parasassi in sod., 1993). Plazemska membrana vsebuje 30 do 40% holesterol in 10 do 20% sfingomielina (van Meer in Simons, 1982; Warnock in sod., 1993). Pri fizioloških koncentracijah teh lipidov je torej tvorba raftov v plazmatski membrani možna (London, 2002). Membrane intracelularnih organelov, npr. Golgijev aparat in endoplazmatski retikulum, prav tako tvorijo rafte (Heino in sod., 2000).

### 2.1.2 Funkcija raftov

Lipidni rafti v različnih organizmih in tkivih niso primerljivi, saj imajo vrsto različnih funkcij. Sodelujejo pri membranskem transportu, signalni transdukciji (Simons in Ikonen, 1997; London, 2002; Edidin, 2003), predstavljajo mesto pritrditve in vstopa celičnih patogenov, toksinov in drugih ligandov (Fivaz in sod., 1999; Simons in Ehehalt, 2002; Lafont in sod., 2004) ter sodelujejo pri predstavljanju antigenov. Signalni rafti naj bi z združevanjem receptorjev z efektorji sekundarnih sporočevalcev omogočili specializirano in učinkovito signalno transdukcijo (Subzynski in Kusumi, 2003; Zajchowski in Robbins, 2002). Spremembe v lipidnem dvosloju lahko spremenijo aktivnost receptorjev (Subzynski in Kusumi, 2003), ionskih kanalov (Morenilla-Palao in sod., 2009) in encimov (Lambert in sod., 2008). Rafti imajo verjetno pomembno vlogo pri sinaptičnem prevajanju nevronov (Pfrieger, 2003).

### 2.1.3 Koncept lipidnih raftov

Za poimenovanje membranskih domen so v uporabi trije pojmi: na detergent odporne membrane (detergent resistant membranes, DRM), tekoče urejene domene ( $l_o$ -fazne domene) in rafti. Ti imajo različne konceptualne izvore, nanašajo se na različne biološke entitete, zato jih med seboj ne smemo zamenjevati (Lichtenberg in sod., 2005).

- DRM so rezultat nepopolne topnosti membran v detergentu. Lahko so artefakt, ki nastane po tretiranju z detergenti in se v sestavi (Lichtenberg in sod., 2005), velikosti (Giocondi in sod., 2000) in arhitekturi razlikujejo od izvirne membrane. Odpornost je verjetno posledica termodinamskih in kinetičnih faktorjev. Ekstrakcija DRM karakterizira lastnosti molekule na osnovi njene diferencialne afinitete do različnih (umetnih) okolij. Najdba DRM zato ne opravičuje zaključka o prisotnosti raftov v nativni membrani (Lichtenberg in sod., 2005).
- Pomembno je razložiti termodinamski koncept lipidne faze – pojem se nanaša na različna strukturna stanja, ki lahko koeksistirajo v ravnotežju, npr.  $l_o$  in  $l_d$  faza. Domene so realni objekti, faze pa idealni koncepti. Torej membranska struktura, poimenovana tekoča urejena domena, spominja na  $l_o$  fazo. Le-ta je rezultat lokalne obogatitve s steroli, ki povečajo urejenost membrane brez vpliva na lateralno difuzijo lipidov ter z njimi asociiranih proteinov.  $l_o$ -fazne domene so bolj odporne na raztapljanje v detergentih kot  $l_d$ -fazne domene (Lichtenberg in sod., 2005).
- Rafti so definirani kot prehodne membranske domene *in vivo*, sestavljene iz sfingomielina in holesterola. Verjetno je, da njihova struktura predstavlja  $l_o$  fazo. Nekatere  $l_o$ -fazne domene so odporne na raztapljanje v detergentu, vendar je njihov obstoj neodvisen od prisotnosti detergentov (Lichtenberg in sod., 2005). Čeprav je izolacija DRM najbolj razširjena metoda za preučevanje lipidnih raftov (Simons in Ikonen, 1997), mora biti raft definiran s funkcijo, ne pa z metodo izolacije (Pike, 2004).

## 2.2 METODE ZA PREUČEVANJE LIPIDNIH RAFTOV

Za detekcijo in preučevanje membranskih domen se raziskovalne skupine poslužujejo najrazličnejših metod:

### a) kalorimetrične metode

- kalorimetrija s perturbacijo pritiska (pressure perturbation calorimetry, PPC)

Metoda meri spremembo v toploti vzorca ob nenadnem skoku pritiska. Vrednost porabljene ali sproščene toplote služi za izračun spremembe prostornine vzorca ob faznem prehodu (Heerklotz in Seelig, 2002).

- kalorimetrična izotermalna titracija (isothermal titration calorimetry, ITC)

Le s to metodo je možna neposredna meritev interakcijske entalpije biokemijskih interakcij. Prek nje lahko določimo konstanto ravnotežja, molsko razmerje interagirajočih molekul in termodinamski profil interakcij (O'Brien in sod., 2000).

- kalorimetrično diferencialno skeniranje (differential scanning calorimetry, DSC)

Termoanalitska tehnika omogoča meritev razlike v količini toplote, potrebne za dvig temperature vzorca in reference. Njena glavna aplikacija je študij faznih prehodov lipidov (Miao in sod., 2002), posredno pa podaja informacijo o tvorbi domen (London, 2002).

### b) mikroskopske metode

- mikroskopija na atomsko silo (atomic force microscopy, AFM)

Metoda omogoča preučevanje domenske strukture podprtih monoslojev z nanometrsko ločljivostjo (Rinia in sod., 2001).

- fluorescentna mikroskopija

To je verjetno najboljša metoda zaznave relativno velikih domen, kjer lahko preučujemo velikost, obliko, heterogenost in povezave domen, lateralno difuzijo komponent ter interakcije med domenami (Feigenson in Buboltz, 2001; Korlach in sod., 1999; Dietrich in sod., 2000).

- c) druge fluorescenčne metode

- gašenje fluorescence kratkega dosega (short-range fluorescence quenching)

Pri tej metodi dušilci kratkega dosega izničijo fluorescenco molekul v neposredni bližini. Zaznavanje domen z vgraditvijo fluorescentne sonde v dvosloj je možno zaradi nenenakomerne razporeditve dušilca med različne domene, oz. zaradi koeksistence z dušilcem bogatih in revnih domen (London in Feigenson, 1981). To je edina metoda, ki je občutljiva za zelo majhne domene (obsega 25 do 50 lipidov), a je njena aplikacija omejena zaradi zahteve po visoki koncentraciji označevalca (London, 2002).

- fluorescenčni prenos resonančne energije (fluorescence resonance energy transfer, FRET)

FRET omogoča zaznavo večjih domen. Izrablja lastnost molekule, da prevzame / duši energijo sosednjih molekul v razdalji od 1 do 10 nm (Maxfield, 2002). Ločimo FRET kratkega in dolgega dosega.

- d) raztapljanje membran z detergentom

Metoda temelji na dejstvu, da so lipidni rafti netopni v hladnem detergentu Triton X 100, ki se v glavnem uporablja za raziskave. Ekstrakcija z drugimi detergenti (LubrolWX in PX, Brij58, 96 in 98, CHAPS, oktilglukozid, Tween 20, Nonidet P40) daje DRM drugačne sestave (Pike, 2004).

e) spektroskopske metode

- jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance, NMR)

Glavne izvedbe, uporabljene za preučevanje membran, so  $^2\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  in  $^{31}\text{P-NMR}$ . Tehnika se uporablja za pridobivanje informacij o lokalni ureditvi in konformaciji funkcionalnih skupin oz. atomov (Seelig, 1987) lipidov v membrani.

- elektronska paramagnetna resonanca (EPR)

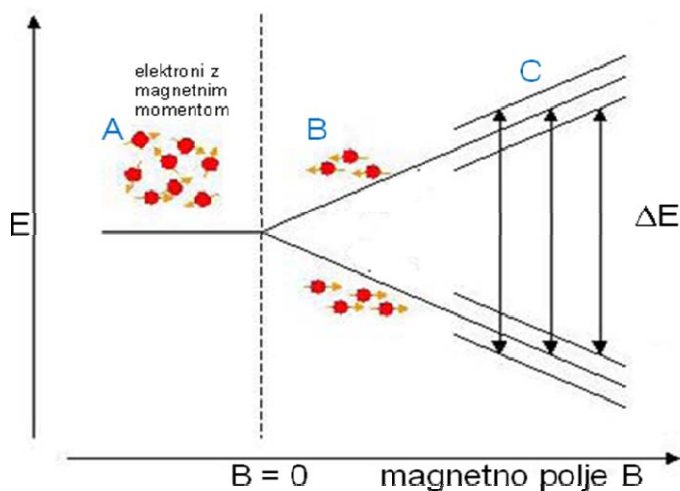
## 2.2.1 Elektronska paramagnetna resonanca

### 2.2.1.1 Osnove EPR

Elektronska paramagnetna resonanca (EPR), znana tudi kot elektronska spinska resonanca (ESR), je spektroskopska metoda s katero lahko zaznamo in opišemo paramagnetne centre v snovi. Naravno prisotni paramagnetni centri bioloških sistemov so prosti radikali (pojavljajo se kot vmesni produkti metabolnih reakcij) in ioni prehodnih elementov (encimski kofaktorji, npr.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ), lahko pa vanje vnesemo spinske označevalce, ki služijo kot sonde za opazovanje strukture v okolici.

Za EPR je pomemben spin elektrona - kvantnomehanska količina, ki karakterizira vrtenje elektrona okoli svoje osi, opisana s kvantnim številom  $S$ . Zaradi vrtenja elektron v okolici ustvarja magnetno polje in ima magnetni moment ( $\mu$ ), čigar smer je določena s smerjo vrtenja elektrona. Elektron ima spin  $S = \frac{1}{2}$ , pri čemer ločimo projekciji spina  $+1/2$  in  $-1/2$ . Magnetna momenta elektronskega para se zaradi različnih smeri vrtenja elektronov izničita, snovi s tako elektronsko strukturo so diamagnetne. Molekule z neparjenimi elektroni pa ohranijo magnetni moment – take snovi so paramagnetne. Mesto v molekuli z neparjenim elektronom imenujemo paramagnetni center.

V paramagnetni snovi, ki ni izpostavljena nobenim zunanjim vplivom, imajo poljubno usmerjeni elektroni enako energijo. Pod vplivom zunanjega magnetnega polja pa se elektroni v snovi orientirajo paralelno ali antiparalelno z magnetnim poljem, energetske nivoje elektronov pa se razcepi na dva nivoja (Zeemanov efekt). V mnogih paramagnetnih centrih imajo tudi jedra, okoli katerih krožijo nesparjeni elektroni, spin, ki ga označuje kvantno število  $I$ . Zaradi spina ima takšno jedro magnetni moment, ki interagira z magnetnim momentom elektrona. Posledica interakcije je razdelitev omenjenih energijskih nivojev na  $2I+1$  podskupin. Pri spinskih označevalcih ima jedro dušika spin  $I = 1$ , torej se vsak energijski nivo razcepi na tri. To je t.i. hiperfini razcep (slika 2).



Slika 2: Energetski nivoji elektrona v magnetnem polju (povzeto po Štrancar, 2004: 2)

A: Osnovni energijski nivo nesparjenega elektrona ( $B = 0$ ).

B: Razcep energijskih nivojev elektrona zaradi interakcije magnetnega momenta elektrona z zunanjim magnetnim poljem B.

C: Hiperfini razcep energijskih nivojev elektrona zaradi interakcije magnetnih momentov elektrona in jedra dušikovega atoma. Puščice označujejo možne prehode elektronov med energijskimi nivoji, ko je izpolnjen resonančni pogoj (Šentjurec in Štalc, 1976).

Kadar deluje na paramagnetne centre v magnetnem polju elektromagnetno valovanje z energijo, ki je enaka energijski razliki med nivojema (izpolnjen je resonančni pogoj), preidejo elektroni iz enega energijskega nivoja na drugega, posledica je absorpcija elektromagnetnega valovanja, ki jo lahko zaznamo z EPR spektrometrom (Šentjurs in Štalc, 1976).

Resonančni pogoj je izpolnjen, če je:

$$\Delta E = h\nu = \mu_B B g + A M_I \quad \dots(1),$$

kjer je:

$\Delta E$  - energijska razlika,

$h$  - Planckova konstanta ( $6,626 \cdot 10^{-34}$  Js),

$\nu$  - frekvenca elektromagnetnega valovanja,

$\mu_B$  - Bohrov magneton ( $9,27 \cdot 10^{-24}$  J/T),

$B$  - gostota magnetnega polja,

$g$  - Zeemanov spektroskopski cepitveni tenzor (značilen za dano snov),

$A$  - hiperfina sklopitveni tenzor,

$M_I$  - projekcija spina jedra.

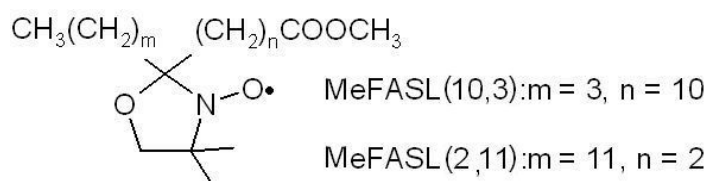
Pri običajnih izvedbah EPR spektrometrov je frekvenca elektromagnetnega valovanja konstantna, spreminjamo pa jakost magnetnega polja. Pri magnetnem polju okoli 0,34 T je resonančni pogoj izpolnjen pri frekvenci mikrovalov okoli 9,6 GHz. Poleg tega so spektrometri prirejeni tako, da je EPR spekter prvi odvod absorpcijske krivulje. To povečuje občutljivost aparature in omogoča natančnejšo določitev gostote magnetnega polja, pri kateri se elektromagnetno valovanje absorbira.



### 2.2.1.2 Spinski označevalci

Paramagnetne snovi v naravnih bioloških sistemih bodisi zaradi kratkoživosti bodisi zaradi nizkih koncentracij niso primerne za študij takih sistemov. Zato vanje vgrajujemo t.i. spinske označevalce, ki so stabilnejši in bolj občutljivi na okolico, v kateri se nahajajo. Med mnogimi spinskimi označevalci so zaradi velike kemijske stabilnosti zelo uveljavljeni nitroksidni radikali (Štrancar, 2000).

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 estra palmitinske kisline. Prvi ima doksilni obroč z nitroksidno skupino vezan na alkilni verigi na petem ogljikovem atomu od metilne skupine, torej odraža gibanje lipidov blizu površine membrane. Drugi spinski označevalec pa ima paramagnetni center na trinajstem ogljikovem atomu od metilne skupine in odraža gibanje v notranjosti membrane (slika 3). MeFASL ima nesparjen elektron, ki se z veliko verjetnostjo nahaja v  $\pi$  orbitali, le-ta pa je orientirana približno v smeri dolge osi molekule. Zato je EPR spekter označevalca močno odvisen od urejenosti molekul v sistemu. Označevalec se zaradi lipofilne alkilne verige zelo hitro vgrajuje v membrano (Štrancar, 2000).



Slika 3: Spinski označevalec MeFASL ( $M = 338$  g/mol)

Oblika EPR spektra odraža fizikalne značilnosti okolice spinskega označevalca, posreduje informacije o številu in različnih tipih membranskih domen, njihovi fluidnosti in deležu v

membrani. Membranske domene predstavljajo skupino molekul s podobno urejenostjo in dinamiko ne glede na lokacijo v membrani. Delež posamezne vrste domen ( $d$ ), ki ga določimo z EPR, ustreza dejanskemu deležu domen z enakimi značilnostmi (gibalnim vzorcem, ureditvijo in dinamiko), če predpostavimo, da se spinski označevalec med vse domene porazdeli enakomerno. V EPR spektroskopiji termin fluidnost opisuje svobodo gibanja spinskega označevalca znotraj domen, ki jo karakterizira ureditveni parameter ( $S$ ), rotacijsko-korelacijski čas ( $\tau_c$ ) in parameter  $\phi$ .

Ureditveni parameter podaja povprečni odklon acilne verige spinskega označevalca od normale na ravnino membrane. Za popolnoma urejene kristale je  $S = 1$ , za izotropne (hitro gibljive tekočine) pa  $S = 0$  (Šentjurs in sod., 2002). Rotacijski korelacijski čas opisuje rotacijsko gibanje spinskega označevalca v membrani oz. nam pove, koliko časa preteče, da označevalec ne zazna več svoje prejšnje prostorske orientacije (Curtain in Gordon, 1984; Šentjurs in sod., 2002). Parameter  $\phi$  je komponenta ureditvenega parametra, ki ponazarja oviranost vrtenja acilne verige okoli normale na ravnino membrane. Nizka vrednost  $\phi$  pomeni močno ovirano rotacijo, visoka pa izotropno gibanje označevalca.

Ostala dva parametra sta širina črte ( $W$ ) in korekcijski faktor polarnosti ( $p_A$ ). Širina črte vključuje prispevke zaradi nehomogenosti zunanjega magnetnega polja, interakcij med posameznimi spinskimi označevalci in paramagnetnih nečistoč (Šentjurs in sod., 2002). Korekcijski faktor polarnosti upošteva vpliv polarnosti okolja, v katerem je spinski označevalec. Večji  $p_A$  pomeni, da se spinski označevalec nahaja v bolj polarnem okolju, v katerem ima rahlo spremenjeno elektronsko strukturo (Šentjurs in sod., 1998). Parametri so določeni z računalniško simulacijo eksperimentalnega EPR spektra, pri čemer je izbran najboljši približek eksperimentalnemu spektru. Simulacija nam v primerjavi z oceno spektralnih parametrov neposredno iz spektra posreduje več informacij in omogoča natančnejšo analizo heterogenosti membrane.

### 2.3 CITOLITIČNI PROTEINI, KI SE VEŽEJO NA LIPIDNE RAFTE

Citolitične proteine proizvajajo bakterije, glive, rastline, žuželke, kače in ljudje. Pri glivah so bili do danes izolirani iz različnih vrst askomicet in bazidiomicet (Seeger, 1980; Berne in sod., 2002). Glede na molekularni mehanizem delovanja delimo citolitične proteine v štiri večje skupine (Harvey, 1990): toksine, ki tvorijo pore, citolitične encime, toksine z detergenskim načinom delovanja in toksine z neznanim mehanizmom delovanja. Uporabljajo se kot imunotoksini (Potrich in sod., 2000), biosenzorji (Gu in sod., 1999) ter kot orodje za študij membran (Ishitsuka in sod., 2005). Številni citolitični proteini se v membrani vežejo z lipidnimi rafti, ki služijo kot platforme za njihovo vezavo in oligomerizacijo:

- Perfringolizin O ( $\Theta$  toksin) je citolitični protein bakterije *Clostridium perfringens*. Le-ta v odvisnosti od holesterola v membranah inducira nastanek transmembranskih por. Na interakcijo vpliva tako struktura acilnih verig kot tudi struktura sterola, a za interakcijo sposobnost sterola, da tvori urejene domene (lipidne rafte), ni kritična (Dang in sod., 2005, Nelson in sod., 2008). S proteolizo in biotiniziranjem pridobljen derivat BC $\Theta$  se uporablja za detekcijo holesterola v lipidnih raftih (Ohno-Iwashita in sod., 2003).
- Lizenin je porinski toksin deževnika *Eisenia foetida*, ki specifično prepozna sfingomielin v membrani, v interakciji z njim oligomerizira v poro in inducira celično lizo (Kwiatkowska in sod., 2007). Netoksična mutanta je uporabna za preučevanje porazdelitve in funkcije sfingomielina v membrani (Shogomori in Kobayashi, 2007).
- Stiholizin morske vetrnice *Stichodactyla helianthus* je zanimiv z vidika, da je enako kot pri ostreolizimu pogoj za njegovo vezavo in delovanje hkratna prisotnost holesterola in sfingomielina v binarnih mešanicah ali ternarnih mešanicah s fosfatidilholinom. Za asociacijo toksina z membrano so pomembne membranske mikrodomene (Martínez in sod., 2007).

- Podobno dvojno specifičnost za holesterol in sfingolipide (ceramid) kaže citolizin *Vibrio cholerae* (*Vibrio cholerae* cytolysin, VCC) (Zitzer in sod., 1999). Za detekcijo lipidnih raftov pa se uporablja nelitična podenota kolera toksina *Vibrio cholerae*, ki se veže na gangliozid G<sub>M1</sub> (Schengrundt in Ringler, 1989).
- Ostreolizin

### 2.3.1 OSTREOLIZIN

Ostreolizin je citolitični protein užitne gobe bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*), predstavnik egerolizinske družine proteinov. Vanjo uvrščamo tudi egerolizin užitne gobe topolove njivnice (*Agrocybe aegerita*), izoformno obliko ostreolizina – pleurotolizin A gobe *Pleurotus ostreatus* (Tomita in sod., 2004; Sakurai in sod., 2004), Asp-hemolizin patogene plesni *Aspergillus fumigatus* (Ebina in sod., 1994) ter dva hemolizinu podobna proteina bakterije *Clostridium bifermentans* (Barloy in sod., 1998). Združujejo jih podobna primarna struktura in molekulska masa (približno 15 kDa), nizka izoelektrična točka, termolabilnost ter hemolitična aktivnost pri nanomolarnih koncentracijah (Sepčić in sod., 2003).

Pomembni lastnosti egerolizinskih proteinov sta interakcija z lipidi in tvorba por v membranah celic in umetnih lipidnih veziklov. Koloidno-osmotska liza ovčjih, govejih in človeških eritrocitov z ostreolizinom nastopi pri nanomolarnih koncentracijah (Žužek in sod., 2006). Ostreolizin se specifično veže na s holesterolom in sfingolipidi obogatene membranske mikrodomene in v njih tvori pore funkcionalnega premera 4 nm (Sepčić in sod., 2003). Dosedanje raziskave so nakazale, da je učinek ostreolizina posledica njegovega prepoznavanja lipidnih kompleksov v *l<sub>o</sub>*-fazi (Sepčić in sod., 2004; Rebolj in sod., 2006):

- Najdemo ga v membranski frakciji, ki je odporna na ekstrakcijo z detergentom Triton X 100 (DRM) – tako v umetnih lipidnih membranah, kot v sesalskih celicah (Sepčič in sod., 2004).
- Permeabilizacijska aktivnost ostreolizina v binarnih in ternarnih veziklih iz fosfolipidov in holesterola se pojavi, ko vsebnost holesterola v membrani doseže 30%, nad to vrednostjo se hitrost in odstotek sproščanja vsebine veziklov hitro povečuje (Sepčič in sod., 2003 in 2004).
- Vezavna in litična aktivnost ostreolizina je možna le ob hkratni prisotnosti obeh komponent lipidnih raftov, holesterola in sfingomielina, oziroma drugega nasičenega fosfolipida, npr. dipalmitoilfosfatidilholina (DPPC). V slednjem primeru je aktivnost ostreolizina bistveno manjša, kar nakazuje na ključno vlogo sfingomielina (Sepčič in sod., 2004). To so potrdile raziskave vezave ostreolizina z metodo površinske plazmonske resonance.
- Dodatek čistih lizofosfolipidov, tudi v koncentraciji, ko sami niso litični, zmanjša hemolitično aktivnost ostreolizina (Sepčič in sod., 2003).

Biološka vloga ostreolizina še ni znana. Sintetizira se v času razvoja primordijev in plodišč (Berne in sod., 2002), domnevno pa naj bi sodeloval pri diferenciaciji hif, bazidijev in bazidiospor. Verjetno nima vloge toksina, sodeloval naj bi v regulatornih procesih v celici (Berne in sod., 2002).

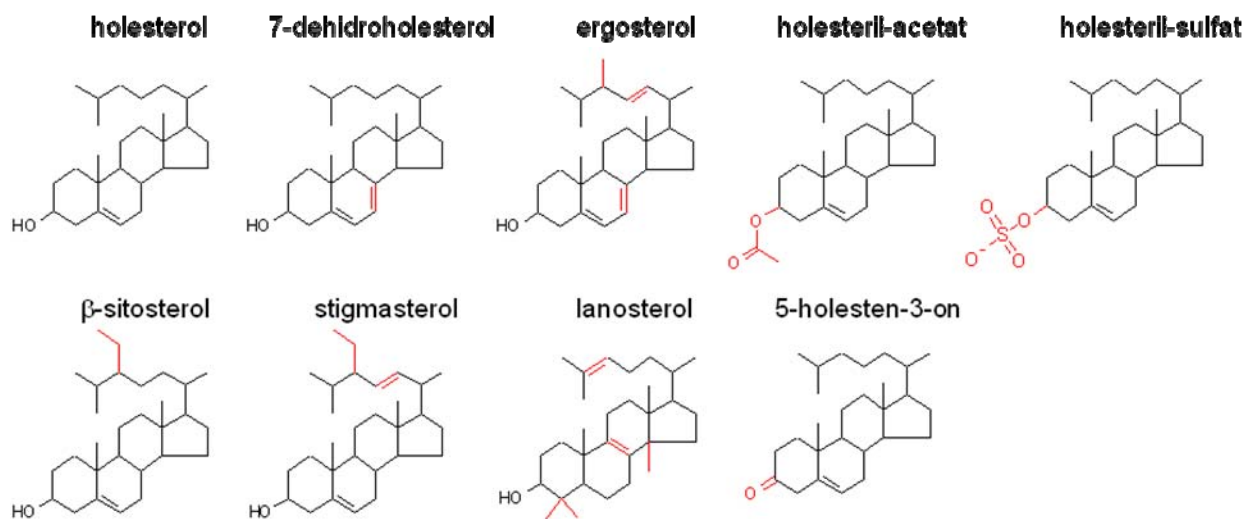
## 2.4 VPLIV STRUKTURE STEROIDOV IN NASIČENOSTI ACILNIH VERIG FOSFOLIPIDOV NA SPOSOBNOST TVORBE UREJENIH MEMBRANSKIH DOMEN

Različni steroli imajo različno sposobnost tvorbe urejenih membranskih domen. Majhne strukturne modifikacije steroidnih molekul močno vplivajo na njihovo sposobnost pakiranja membranskih lipidov in posledično na tvorbo urejene tekoče faze (Xu in sod., 2001; Wang in sod., 2004; Scheidt in sod., 2003). Le-ta je odvisna od zgradbe sterola - števila dvojnih vezi in alkilacije steroidnega skeleta ter zgradbe alifatske verige (Xu in sod., 2001).

Dodatna dvojna vez pri ergosterolu in 7-dehidroholesterolu (med atomoma C7 in C8) poveča sposobnost tvorbe urejenih domen, oba sterola tvorita urejene membranske domene bolj učinkovito kot holesterol (Xu in sod., 2001; Rebolj in sod., 2006). Ta modifikacija vpliva na van der Waalsove vezi med acilnimi verigami lipida in sterolom. Dodatne modifikacije, npr. dodatek alkilne skupine in dodatna dvojna vez v alifatski verigi steroida, te interakcije oslabijo (Scheidt in sod., 2003). Fitosterola sitosterol in stigmasterol imata v primerjavi s holesterolom dodatno etilno skupino na mestu C24 alifatske stranske verige. Oba imata slabšo sposobnost tvorbe urejenih domen, kar je verjetno posledica razvejanosti alifatske verige (Hallig in Slotte, 2004). Sitosterol je nekoliko učinkovitejši od stigmasterola (Xu in sod., 2001), vzrok je v dodatni dvojni vezi med atomoma C22 in C23 v stigmasterolu (Hallig in Slotte, 2004). Lanosterol ima na sterolnem obroču dodatni metilni skupini, kar močno zmanjša sposobnost tvorbe urejenih membranskih domen (Yeagle in sod., 1977, Xu in sod., 2000).

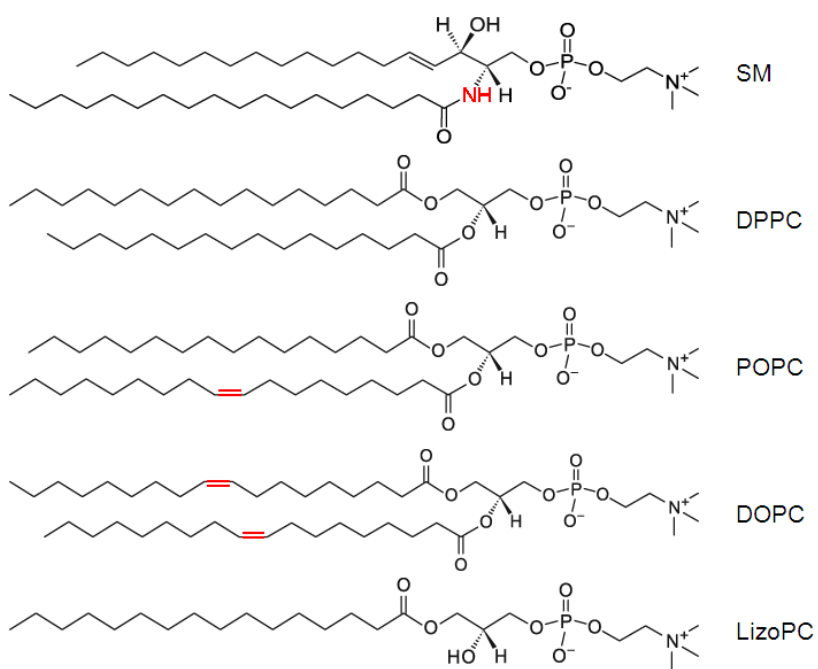
Prosta -OH skupina na mestu C3 holesterola je pomembna pri tvorbi urejenih membranskih domen (Ben-Yashar in Barenholz, 1989). Spremembe na tem mestu, npr. v acilno skupino kot pri holesteril-acetatu, keto skupino pri holestenonu ali sulfatno skupino pri holesteril-sulfatu, močno zmanjšajo sposobnost tvorbe urejenih domen zaradi slabše sposobnosti tvorbe

vodikove vezi in vzdrževanja orientacije v membrani (Scheidt in sod., 2003; Wang in sod., 2004; Slotte, 1995). Holestenon in holesteril-sulfat naj bi celo preprečevala tvorbo urejenih membranskih domen (Xu in London, 2000) (slika 4).



Slika 4: Kemijska zgradba preučevanih steroidov in njihovih sintetičnih derivatov. Z rdečo barvo so označene strukturne razlike posameznih steroidov glede na strukturo holesterola.

Heterogenost acilnih verig omogoča veliko variabilnost fizikalnih lastnosti dvosloja (Sankaram in Thompson, 1990), prek interakcije s steroli naj bi vplivale na tvorbo raftov. Čeprav meritve s fosfatidilholinom kažejo, da je vpliv dolžine verige robnega pomena za jakost interakcije s holesterolom, se le-ta manjša z njenim krajšanjem (Sankaram in Thompson, 1990). Prisotnost dvojne vezi v verigi ima večji vpliv, saj omejuje tvorbo van der Waalsove vezi s steroli in ovira skladnost molekul (Davies in sod., 1990; London in Brown, 2000; Scheidt in sod., 2003) (slika 5).



Slika 5: Kemijska zgradba preučevanih fosfolipidov. Z rdečo barvo so označene strukturne razlike posameznih steroidov glede na strukturo dipalmitoilfosfatidilholina (DPPC).



### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

Kemikalije/oprema:	Proizvajalec:
acetone	Merck, Nemčija
EDTA	Kemika, Hrvaška
etanol	Merck, Nemčija
goveji serumski albumin (BSA)	Sigma, ZDA
kloroform	Merck, Nemčija
metanol	Merck, Nemčija
natrijev klorid	Merck, Nemčija
natrijev hidroksid	Merck, Nemčija
etanojska kislina	Merck, Nemčija
Tris	Merck, Nemčija
vodikov klorid	Merck, Nemčija
7-dehidroholesterol	Sigma, ZDA
ergosterol	Sigma, ZDA
holesterol	Avanti Polar Lipids, ZDA
holesteril-acetat	Fluka, Švica
holesteril-sulfat	Sigma, ZDA

5-holesten-3-on	Aldrich, ZDA
lanosterol	Sigma, ZDA
$\beta$ -sitosterol	Sigma, ZDA
stigmasterol	Sigma, ZDA
DPPC (1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin)	Avanti Polar Lipids, ZDA
DOPC (1,2-dioleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin)	Avanti Polar Lipids, ZDA
POPC (1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin)	Avanti Polar Lipids, ZDA
LizoPC (1-palmitoil-2-hidroksi- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin)	Sigma, ZDA
sfgomielin (iz svinjskih možgan)	Avanti Polar Lipids, ZDA
MeFASL (10,3)	Sintetiziran na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani
MeFASL (2,11)	Sintetiziran na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani
encimski test za določanje holesterola in fosfolipidov	Wako Chemicals, Nemčija
steklene kapilare	Euroglass, Slovenija
mikrotitrne plošče	TPP, Švica
epruvete	Eppendorf, Nemčija

### 3.1.2 Raztopine

Pufer za vezikle (pH 8.0):	140 mM NaCl
	20 mM Tris
	1 mM EDTA

### 3.1.3 Laboratorijska oprema

avtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija
centrifuge	Centric 322A, Tehtnica, Slovenija
čitalec mikrotitrnih plošč	MRX, Dynex Technologies, Nemčija
EPR-spektrometer	Spectrometer ELEXSYS E500, Bruker, Nemčija
magnetno mešalo	Tehtnica MM 540, Slovenija
pH meter	Mettler Toledo, Nemčija
rotavapor	R-134 in R-200, Büchi, Švica
sonikator	Vibracell Ultrasonic Disintegrator, Sonics and Materials, ZDA
vodna kopel	B-480, Büchi, Švica
vibracijski stresalnik	Vibromix 114 EV, Tehtnica, Slovenija

### 3.2 PRIPRAVA LIPIDNIH VEZIKLOV

Lipidne vezikle smo pripravili iz lipidov z znanimi molskimi masami. Uporabljeni lipidi so bili: sfingomielin (SM), dipalmitoilfosfatidilholin (DPPC), palmitoiloleilfosfatidilholin (POPC), dioleilfosfatidilholin (DOPC), palmitoil-lizofosfatidilholin (LizoPC), ergosterol (Ergo), 7-dehidroholesterol (7-DHC), holesterol (CH), holesteril-acetat (CH-Ac), holesteril-sulfat (CH-su), 5-holesten-3-on (CH-on), lanosterol (Lano),  $\beta$ -sitosterol (Sito) in stigmasterol (Stigma). Podatki so navedeni v preglednici 1.

Preglednica 1: Molsko razmerje lipidov v pripravljenih veziklih.

Sestava veziklov	Molsko razmerje (mol:mol)
SM : 7-dehidroholesterol	1:1
SM : ergosterol	1:1
SM : holesterol	1:1
SM : holesteril-acetat	1:1
SM : holesteril-sulfat	1:1
SM : 5-holesten-3-on	1:1
SM : $\beta$ -sitosterol	1:1
SM : stigmasterol	1:1
DPPC : holesterol	1:1
POPC : holesterol	1:1
DOPC : holesterol	1:1
SM : holesterol : LizoPC	4,5:4,5:1

### **3.2.1 Priprava multilamelarnih veziklov (MLV)**

Ustrezno količino lipidov, shranjenih pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , smo raztopili v mešanici kloroform: metanol v razmerju 2 : 1 in posušili pod znižanim tlakom (10 mbar) v majhni bučki na rotacijski vodni vakuumski črpalki (3 ure). Dobljenemu lipidnemu filmu v bučki smo dodali 10 do 15 steklenih kroglic in ustrezno količino Tris pufru 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 minut sonicirali na ledu z 10-sekundnimi pulzi, da so nastali sonicirani unilamelarni vezikli (SUV). Tako pripravljene vezikle v Tris pufru smo dali v vodno kopel ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) za 45 minut. Po centrifugiranju (5 min, 6000 rpm,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) smo supernatant prenesli v čiste Eppendorfove epruvete, jih prepihali s tekočim dušikom in shranili pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Količino in koncentracijo lipidov v veziklih 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.

### **3.2.3 Priprava vzorca za EPR**

Lipidne vezikle smo na dan meritve 6 minut sonicirali na ledu z 10-sekundnimi pulzi ter jih nato dali v vodno kopel ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) za 20 minut. Sledilo je centrifugiranje (5 minut, 6000 rpm,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Na vodni vakuumski črpalki smo pri znižanem tlaku (1,3 kPa) posušili ustrezno količino (13 do 15  $\mu\text{L}$ ) 1 mM spinskega označevalca MeFASL (10,3) ali MeFASL (2,11), raztopljenega v etanolu. Filmu spinskega označevalca smo dodali 100  $\mu\text{L}$  supernatanta

veziklov, tako da je bilo molsko razmerje med lipidi v veziklih in MeFASL približno 1:250. Na vibracijskem stresalniku smo mešanico krožno mešali še 10 minut. Te vzorce smo dali v kapilare s premerom 1 mm in opravili meritve z EPR.

### 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 sterolov) v skladu z navodili proizvajalca (Wako Chemicals GmbH, Nemčija).

Suspenzijo smo 6 minut sonicirali na ledu z 10-sekundnimi pulzi, jo dali v vodno kopel (20 minut, 40 °C) in jo nato centrifugirali (5 minut, 6000 rpm, 25 °C).

#### 3.3.1 Encimski test Phospholipids B

Ker encimski test določa koncentracije lipidov v razponu od 0,5 do 5 mg/mL, smo 10 µL vzorca redčili s pufrom za vezikle (faktor redčenja 3). Nato smo k 10 µL redčenega vzorca, pufru za vezikle (slepi poskus) ali standarda (holin-klorid s koncentracijo 3 mg/mL) dodali 300 µL pripravljene encimske raztopine (ta vsebuje fosfolipazo D, holin oksidazo, peroksidazo v Tris pufru, fenol in 4-aminoantipirin) s koncentracijo 1 mg/mL in inkubirali 30 minut pri 37 °C. Med inkubacijo fosfolipaza D hidrolizira fosfolipide do prostega holina. Le tega holin oksidaza pretvori v betain in vodikov peroksid, ki nadalje oksidativno združi fenol in 4-aminoantipirin. Rezultat se kaže v razvoju rdeče barve. Po inkubaciji smo izmerili absorpcijo (A) rdeče barve pri valovni dolžini 550 nm in izračunali koncentracijo lipidov (c) po formuli:

$$C_{\text{holinski lipidi}} = 3F_R(A_{\text{vzorec}} - A_{\text{slepa}})/(A_{\text{standard}} - A_{\text{slepa}}) \quad \dots(2)$$

kjer je:

$A_{\text{vzorec}}$  - absorpcija vzorca,

$A_{\text{standard}}$  - absorpcija standarda,

$A_{\text{slepa}}$  - absorpcija pufru za vezikle (slepi poskus)

$F_R$  - faktor redčitve

### 3.3.2 Encimski test Free Cholesterol C

Princip izvedbe testa Free Cholesterol C je enak kot v točki (3.3.1). Razlikuje se le v sestavi standarda (holesterol s koncentracijo 1 mg/mL) in encimske raztopine (holesterol oksidaza, peroksidaza v Tris pufru, fenol in 4-aminoantipirin). V času inkubacije holesterol oksidaza pretvori prosti sterol v holestenon in vodikov peroksid, slednji ob prisotnosti peroksidaze kondenzira fenol in 4-aminoantipirin, kar se kaže v razvoju rdeče barve. Po inkubaciji smo izmerili absorpcijo (A) rdeče barve pri valovni dolžini 550 nm in izračunali koncentracijo lipidov (c) po formuli:

$$c_{\text{sterolni lipidi}} = F_R(A_{\text{vzorec}} - A_{\text{slepa}})/(A_{\text{standard}} - A_{\text{slepa}}) \quad \dots(3)$$

Testa smo izvedli pri treh vrstah veziklov: SM:CH, SM:CH:LizoPC ter SM:7-DHC. V primeru veziklov z drugačno sestavo je bila ugotovljena (Bakrač, 2005) slabša kakovost določitve koncentracije sterolov. Iz koncentracije holina in sterola v vzorcu veziklov smo izračunali molsko razmerje ter končno koncentracijo lipidov v veziklih.

### 3.4 ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA REZONANCA

Meritve smo opravili na EPR-spektrometru ELEXSYS E500 (Bruker, Nemčija) na Inštitutu Jožef Stefan, v laboratoriju za biofiziko. Meritve posameznih vzorcev smo opravili v temperaturnem razponu od 277 K do 312 K (4 do 39 °C), v intervalih 5 K. Po meritvi smo neposredno iz spektrov odčitali maksimalni hiperfini razcep ( $2A_{\max}$ ). Za interpretacijo rezultatov smo uporabili eno serijo vzorcev. Pri tem smo upoštevali medsebojno primerljivost serij, kar smo potrdili s primerjavo dobljenih spektrov.

Preglednica 2: Parametri meritev EPR.

ojačanje (receiver gain)	65 dB
konverzijski čas (conversion time)	20,48 ms
čas snemanja (sweep time)	20,97 s
časovna konstanta (time constant)	5,12 s
centralno magnetno polje (center field)	3320 G
območje meritve (sweep width)	100 G
mikrovalovna moč (microwaves attenuation)	10 mW (13 dB)
število snemanj za 1 spekter	7

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. Pri tem smo upoštevali, da je membrana heterogena oz., da je zaradi različnih načinov gibanja spinskega označevalca v različnem okolju membrane spekter sestavljen iz večih spektralnih komponent, ki opisujejo različna področja membrane. Vsaka



komponenta predstavlja vrsto domen z določeno ureditvijo in dinamiko, za njihovo simulacijo pa je v EPRSIM uporabljenih 5 spektralnih parametrov: ureditveni parameter ( $S$ ), parameter  $\phi$ , rotacijski korelacijski čas ( $\tau_c$ ), širina črte ( $W$ ) ter korekcijski faktor polarnosti ( $p_A$ ), poleg njih pa še delež spinskih označevalcev v posamezni vrsti domen. Parametri določajo obliko in izračun EPR spektra, ki se najboljše prilega eksperimentalnemu spektru. Program izvede 200 simulacij, ki določajo najboljši približek eksperimentalnemu EPR spektru in predstavljajo 200 rešitev oz. teoretičnih EPR spektrov.

Parametri teh spektrov so s pomočjo GHOST kondenzacijske metode (program GHOSTmaker 3.5.1) predstavljeni v štirih dvodimenzionalnih diagramih ( $S$ - $\phi$ ,  $S$ - $W$ ,  $S$ - $p_A$ ,  $S$ - $\tau_c$ ), z intenziteto rdeče, zelene in modre barve v diagramu pa so določeni parametri  $\tau_c$ ,  $W$  in  $p_A$ . Rezultati simulacij so v GHOST diagramih združeni v skupine rešitev, kjer vsaka predstavlja obliko gibanja spinskega označevalca v membrani (Štrancar in sod., 2005). Ti diagrami podajo informacijo o številu različnih vrst domen, dinamiki gibanja, urejenosti ter polarnosti okolice spinskega označevalca v posamezni vrsti domen. Rezultate smo obdelali tako v celotnem temperaturnem območju meritve kot tudi v odvisnosti od vrste sterola oz. holinskega lipida.

## 4 REZULTATI

### 4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE LIPIDOV Z ENCIMSKIM TESTOM

Pripraviti smo nameravali vezikle z lipidno koncentracijo 20 mg/mL, zaradi metode dela je prišlo do izgub od 10 do 45% lipidov zaradi adhezije deleža lipidov na laboratorijsko opremo in usedanja oborine lipidov pri centrifugiranju. Izmerjeno molsko razmerje lipidov pa dokaj dobro ustreza razmerjem zatehtanih lipidov (preglednica 3).

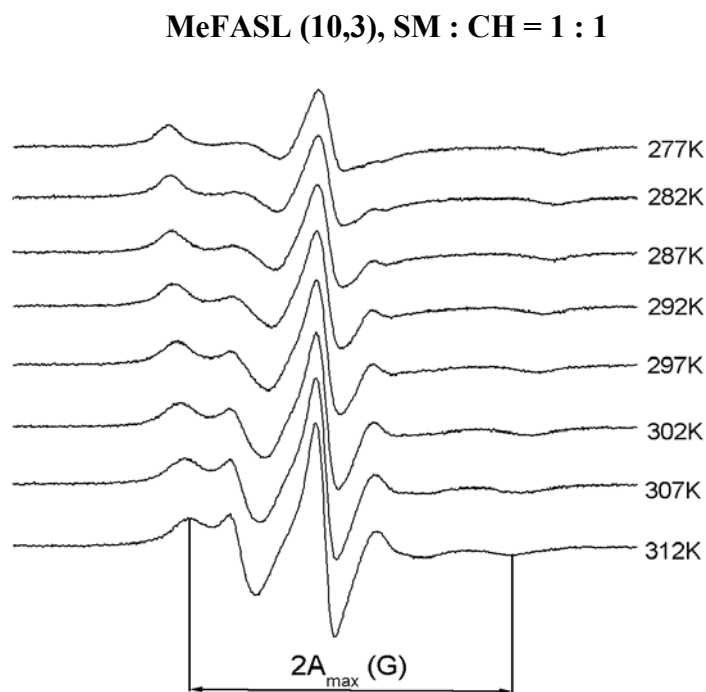
Preglednica 3: Izmerjeno molsko razmerje in koncentracija holinskih lipidov in steroidov v veziklih, uporabljenih pri EPR meritvah izračunano po formuli 2 in 3.

Sestava veziklov	SM:CH	SM:LizoPC:CH	SM:7-DHC
zatehtano molsko razmerje lipidov (mol:mol)	50:50	55:45	50:50
izmerjeno molsko razmerje lipidov 1. serija (mol:mol)	42:58	51:49	50:50
izmerjeno molsko razmerje lipidov 2. serija (mol:mol)	44:56	53:47	50:50
izmerjena koncentracija celokupnih lipidov 1. serija (mg/mL)	12,85	17,75	11,35
izmerjena koncentracija celokupnih lipidov 2. serija (mg/mL)	11,65	18,03	11,1

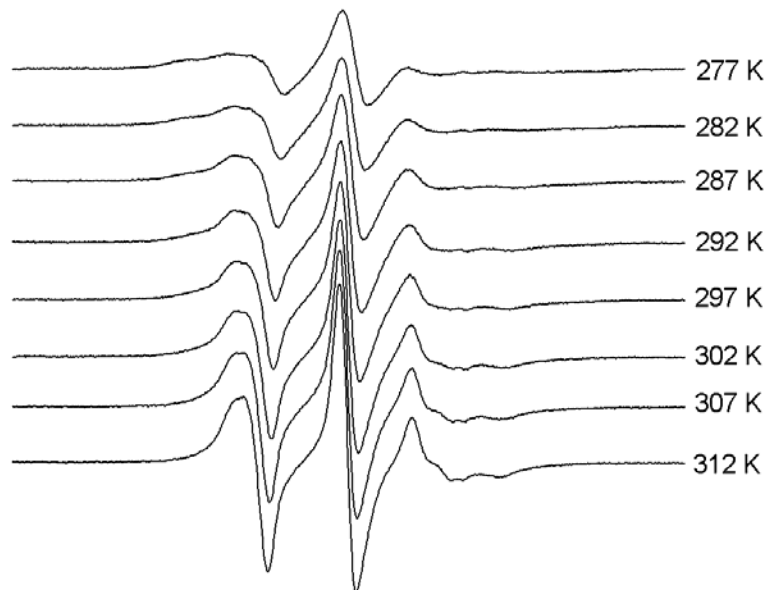
## 4.2 ELEKTRONSKA PARAMAGNETNA REZONANCA

### 4.2.1 EPR meritve veziklov pri različnih temperaturah

Z X-pasovnim EPR-spektrometrom smo pri osmih temperaturah (od 277 do 312 K, interval 5 K) posneli spektre določene lipidne mešanice, označene tako z MeFASL (10,3) kot MeFASL (2,11). Meritve z MeFASL (2,11) smo izvajali v dveh paralelkah. Ker so bili rezultati primerljivi, smo meritve z MeFASL (10,3) izvedli le v eni paralelki. Kot primer so prikazani spektri veziklov s sfingomielinom (SM) in holesterolom (CH) (slika 6 in 7).



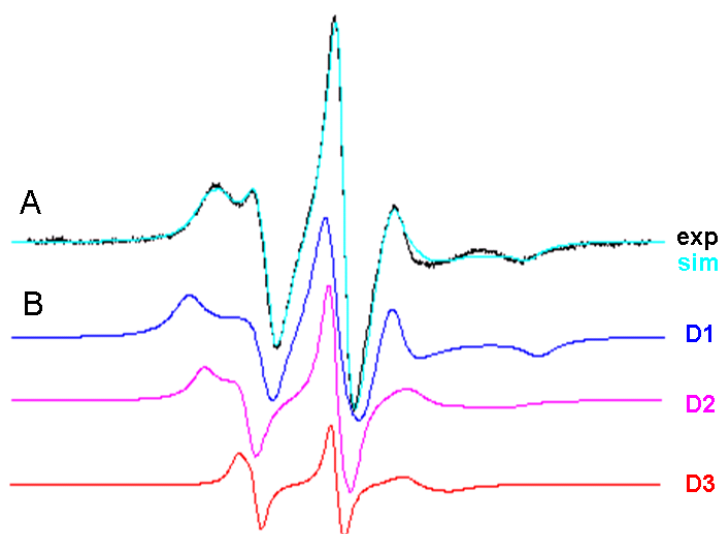
Slika 6: Eksperimentalni EPR spektri veziklov, pripravljenih iz sfingomielina (SM) in holesterola (CH) v molskem razmerju 1:1. Spektri so posneli v temperaturnem razponu od 277 do 312 K. Razdalja med puščicama predstavlja maksimalni hiperfinski razcep ( $2A_{\max}$ ). Spinski označevalec je MeFASL (10,3).

**MeFASL (2,11), SM : CH = 1 : 1**

Slika 7: Eksperimentalni EPR spektri veziklov, pripravljenih iz sfingomieline (SM) in holesterola (CH) v molskem razmerju 1:1. Spektri so posneti v temperaturnem razponu od 277 do 312 K. Spinski označevalec je MeFASL (2,11).

EPR spektri lipidnih veziklov, označenih z MeFASL (10,3), odražajo urejeno gibanje nitroksidne skupine spinskega označevalca. Membrana lipidnih veziklov je torej v zgornjem delu urejena. Iz slike 6 je razvidno, da se oblika spektra z naraščanjem temperature spreminja. Zato smo neposredno iz eksperimentalnih spektrov odčitati maksimalni hiperfinski razcep ( $2A_{\max}$ ), ki je parameter za oceno urejenosti membrane. Vrednost le-tega z naraščajočo temperaturo upada, kar pomeni, da se z višanjem temperature urejenost membrane manjša. Pri nižjih temperaturah so membrane bolj rigidne (večji  $2A_{\max}$ ), urejenost lipidov je večja. Obratno je pri višjih temperaturah (manjši  $2A_{\max}$ ), kjer je membrana bolj fluidna oz. je urejenost lipidov manjša. Spektri lipidnih veziklov, označenih z MeFASL (2,11), kažejo manj urejeno gibanje spinskega označevalca. V notranjosti membranskega dvosloja je torej gibanje acilnih verig manj urejeno kot na površini. V tem primeru maksimalnega hiperfinega razcepa ni bilo mogoče odčitati.

$2A_{\max}$  da informacijo o povprečnih spremembah fluidnosti v membrani, ker pa je membrana heterogena tvorba iz domen z različno fluidnostjo, dobimo natančnejšo sliko o membranskih karakteristikah z računalniško simulacijo EPR spektrov. S simulacijo EPR spektrov v celotnem temperaturnem področju smo poleg ureditvenega parametra določili tudi druge parametre (delež posameznih domen, parameter  $\phi$ , rotacijski korelacijski čas, širino črte, korekcijski faktor polarnosti). Ugotovili smo, da so EPR spektri večinoma seštevki treh vrst domen: najbolj urejene vrste domen D1, srednje urejene vrste domen D2 in najmanj urejene vrste domen D3. Na sliki 8 je prikazan reprezentativni spekter veziklov s sfingomielinom in holesterolom pri sobni temperaturi (297 K).

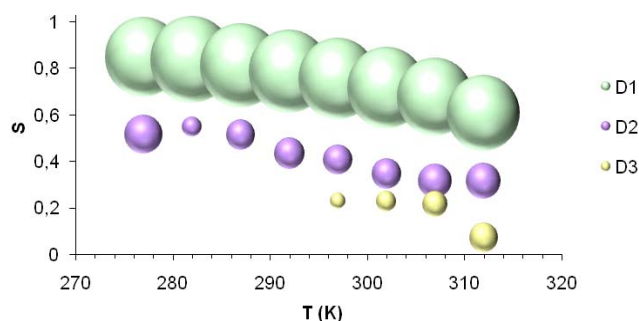


Slika 8: Reprezentativni EPR spekter veziklov iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 1:1, označenih z MeFASL (10,3). Spektri so izmerjeni pri sobni temperaturi (297 K).

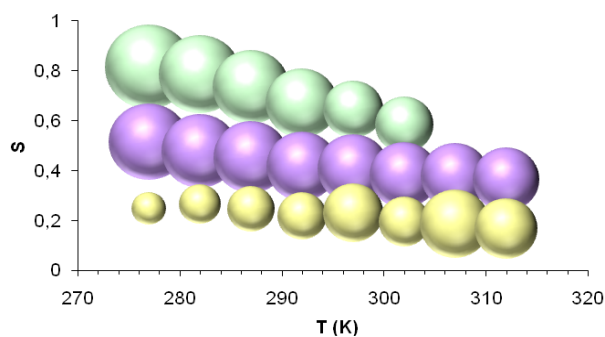
A: Eksperimentalni (exp) in izračunani spekter (sim), ki je najboljši približek eksperimentalnemu spektru EPR.

B: Izračunani spekter je seštevki treh spektralnih komponent, ki predstavljajo membranske domene z različno urejenostjo: D1-najbolj urejena vrsta domen, D2-srednje urejena vrsta domen, D3-najmanj urejena vrsta domen.

Temperaturna odvisnost spremembe ureditvenega parametra in deleža domen je prikazana na slikah 9 in 10. Rezultati so prikazani za vezikle s sfingomielinom in holesterolom. V primeru spinskega označevalca MeFASL (10,3) so deleži domen prek celotnega temperaturnega območja dokaj konstantni, ureditveni parameter se manjša. Pri veziklih, označenih z MeFASL (2,11) pa se delež najbolj urejene vrste domen D1 manjša na račun manj urejenih domen D2 in D3. Ureditveni parameter in delež domen se pri vseh domenah z naraščajočo temperaturo manjšata. Vrednosti so primerjane v preglednici 4.



Slika 9: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra ( $S$ ) in deleža domen ( $d$ , podan s premerom krožcev) pri veziklih iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 1:1. Spinski označevalec je MeFASL (10,3). D1-najbolj urejena domena, D2-srednje urejena domena, D3-najmanj urejena domena.

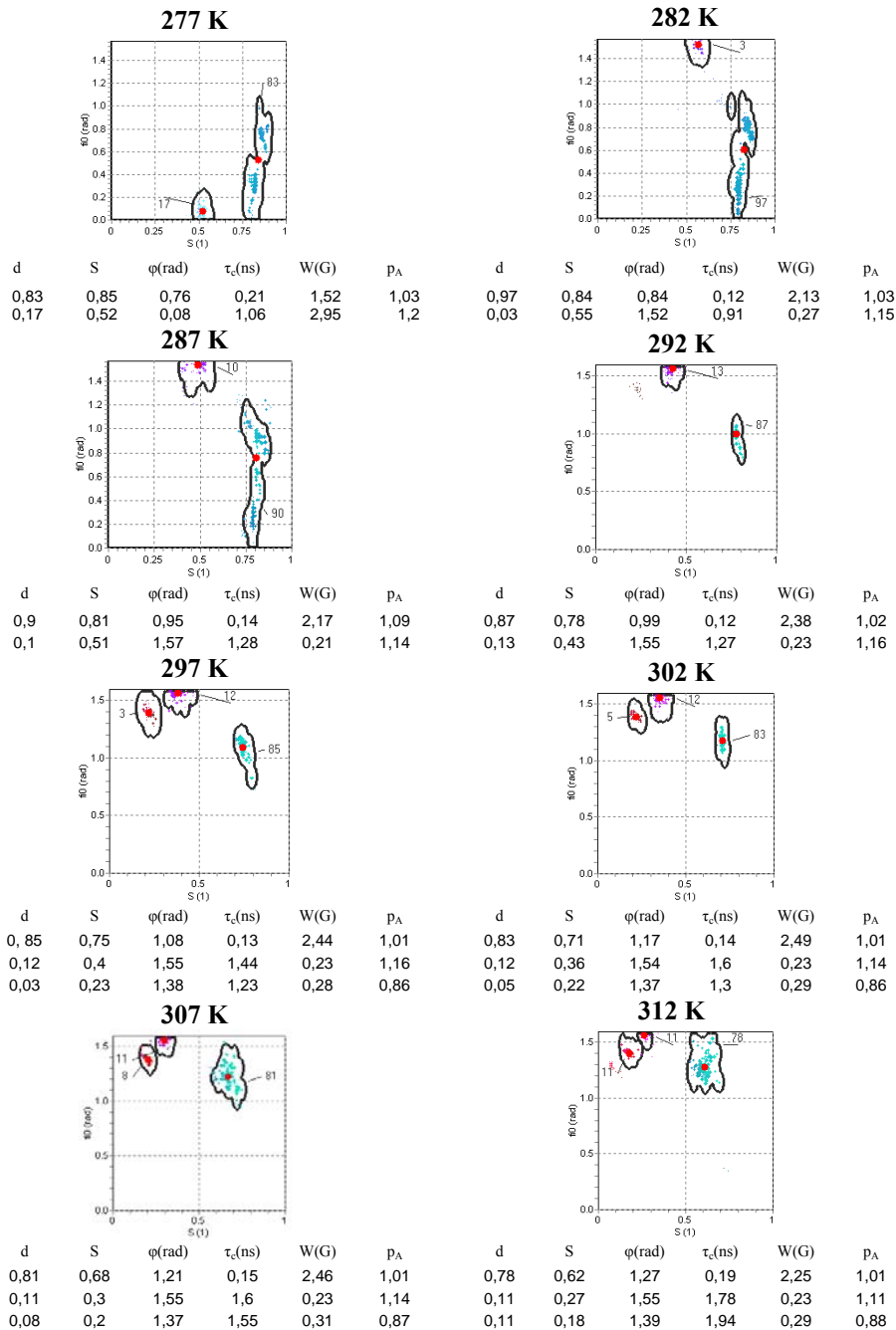


Slika 10: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra ( $S$ ) in deleža domen ( $d$ , podan s premerom krožcev) pri veziklih iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 1:1. Spinski označevalec je MeFASL (2,11). D1-najbolj urejena domena, D2-srednje urejena domena, D3-najmanj urejena domena.

Preglednica 4: Deleži domen in ureditveni parameter S v odvisnosti od temperature pri veziklih iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 1:1, označenih s spinskim označevalcem MeFASL (10,3) in MeFASL (2,11). D1 predstavlja najbolj urejeno vrsto domen, D2 srednje fluidno in D3 najbolj fluidno vrsto domen. Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

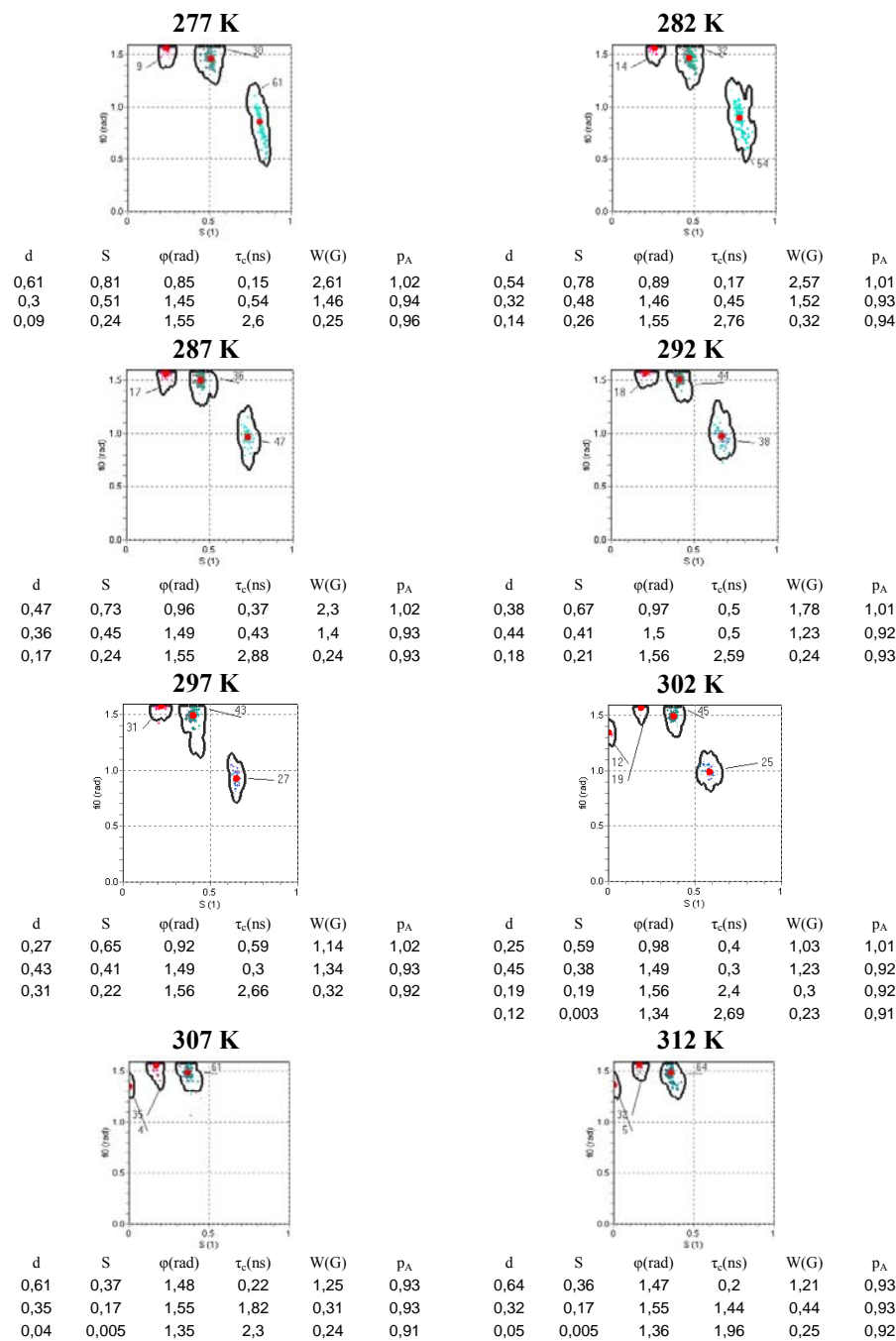
T (K)	Delež domene d						Ureditveni parameter S					
	MeFASL(10,3)			MeFASL(2,11)			MeFASL(10,3)			MeFASL(2,11)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
277	0,83	0,17	/	0,61	0,3	0,09	0,85	0,52	/	0,81	0,51	0,24
282	0,97	0,03	/	0,54	0,32	0,14	0,84	0,55	/	0,78	0,48	0,26
287	0,9	0,1	/	0,47	0,36	0,17	0,81	0,51	/	0,73	0,45	0,24
292	0,87	0,13	/	0,38	0,44	0,18	0,78	0,43	/	0,67	0,41	0,21
297	0,85	0,12	0,03	0,27	0,43	0,31	0,75	0,4	0,23	0,65	0,41	0,22
302	0,83	0,12	0,05	0,25	0,45	0,19	0,71	0,36	0,22	0,59	0,38	0,19
307	0,81	0,11	0,08	/	0,61	0,35	0,68	0,3	0,2	/	0,37	0,17
312	0,78	0,11	0,11	/	0,64	0,32	0,62	0,27	0,18	/	0,36	0,17

Pripadajoči GHOST diagrami (z vsemi izračunanimi parametri), ki omogočajo boljši vpogled v lastnosti membranskih domen so prikazani na slikah 11 in 12.



Slika 11: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra  $S$ , kota  $\varphi$  ter deleža domen  $d$  (vrednosti, označene na diagramih) v veziklih iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 1:1. Ostali parametri so navedeni v tabelah pod GHOST diagrami, kjer je  $d$  = delež,  $S$  = ureditveni parameter,  $\varphi$  = komponenta ureditvenega parametra,  $\tau_c$  = rotacijski korelacijski čas,  $W$  = širina črte in  $p_A$  = korekcijski faktor polarosti. Uporabljen spinski označevalec je MeFASL (10,3). Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

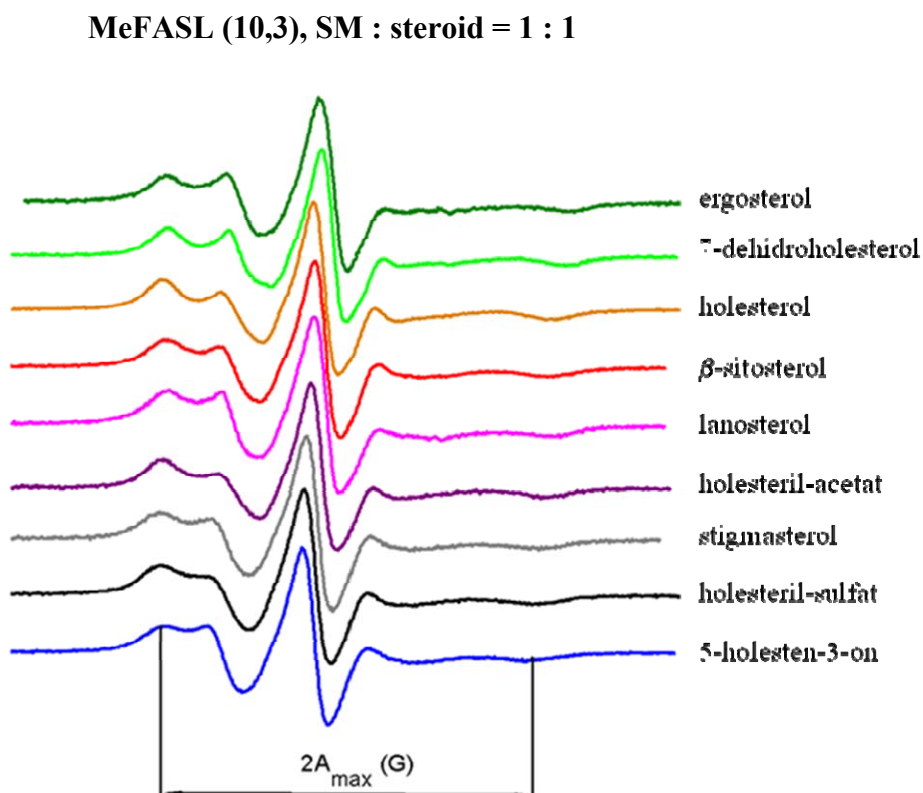




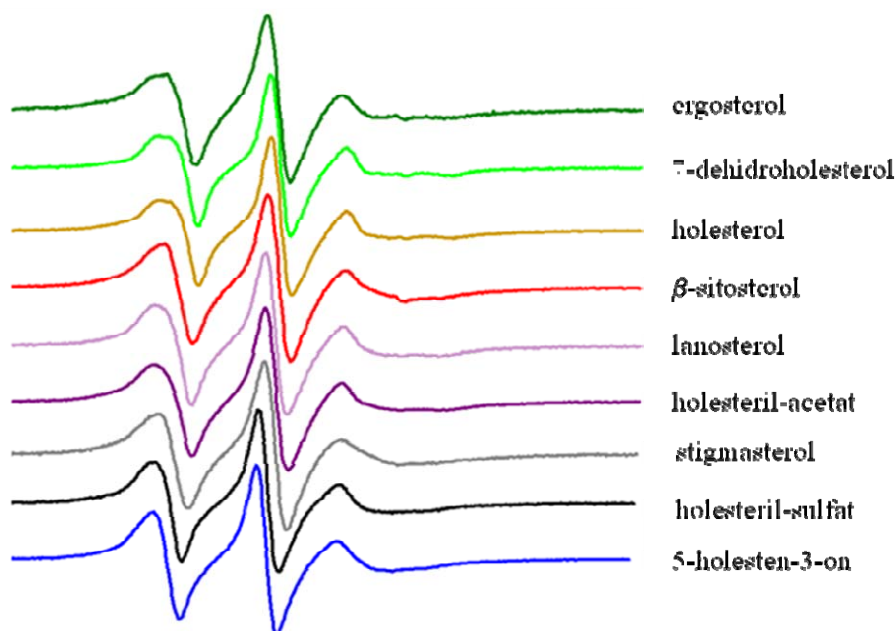
Slika 12: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra S, kota  $\varphi$  ter deleža domen d (vrednosti, označene na diagramih) v veziklih iz sfingomielina in holesterola v molskem razmerju 1:1. Ostali parametri so navedeni v tabelah pod GHOST diagrami, kjer je d = delež, S = ureditveni parameter,  $\varphi$  = komponenta ureditvenega parametra,  $\tau_c$  = rotacijski korelacijski čas, W = širina črte in  $p_A$  = korekcijski faktor polarosti. Uporabljen spinski označevalec je MeFASL (2,11). Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

#### 4.2.2 EPR meritve veziklov z različnimi vrstami steroidov

Z X-pasovnim EPR-spektrometrom smo pri osmih temperaturah (od 277 do 312 K, intervali 5 K) posneli spektre določene lipidne mešanice, označene tako z MeFASL (10,3), kot MeFASL (2,11). Kot primer so prikazani eksperimentalni spektri, izmerjeni pri sobni temperaturi (297 K) (sliki 13 in 14).



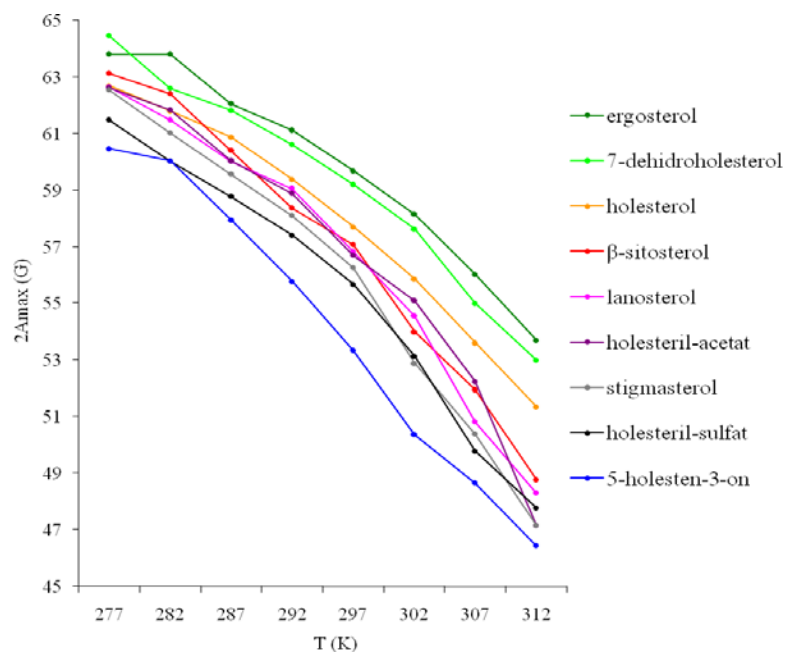
Slika 13: Eksperimentalni EPR spektri veziklov, pripravljenih iz sfingomielina (SM) in različnih steroidov v molskem razmerju 1:1. Razdalja med puščicama predstavlja maksimalni hiperfinski razcep ( $2A_{\max}$ ). Spinski označevalec je MeFASL (10,3). Spektri so posneti pri sobni temperaturi (297 K).

**MeFASL (2,11), SM : steroid = 1 : 1**

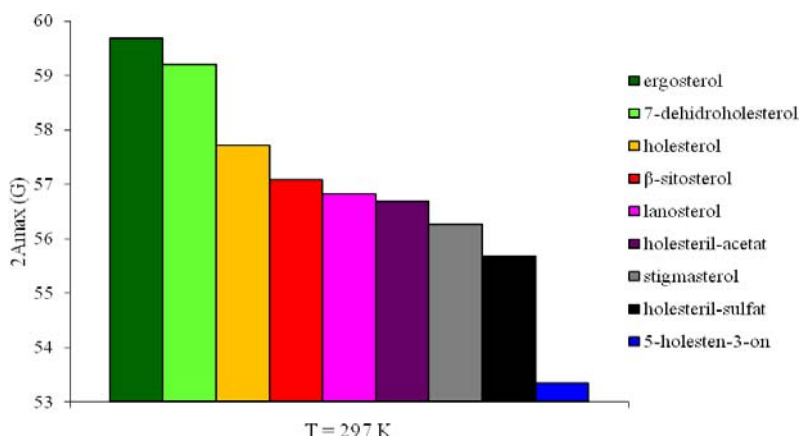
Slika 14: Eksperimentalni EPR spektri veziklov, pripravljenih iz sfingomielina (SM) in različnih steroidov v molskem razmerju 1:1. Spinski označevalec je MeFASL (2,11). Spektri so posneti pri sobni temperaturi (297 K).

Oblike EPR spektrov veziklov iz sfingomielina in različnih steroidov, označenih z MeFASL (10,3), se med seboj razlikujejo. Zato smo neposredno iz eksperimentalnih spektrov odčitali maksimalni hiperfinski razcep ( $2A_{\max}$ ). Pri sobni temperaturi (297 K) povprečna urejenost membrane veziklov z različnimi steroli upada v vrstnem redu:

ergosterol → 7-dehidroholesterol → holesterol →  $\beta$ -sitosterol → lanosterol → holesteril-acetat → stigmasterol → holesteril-sulfat → 5-holesten-3-on (sliki 15 in 16).

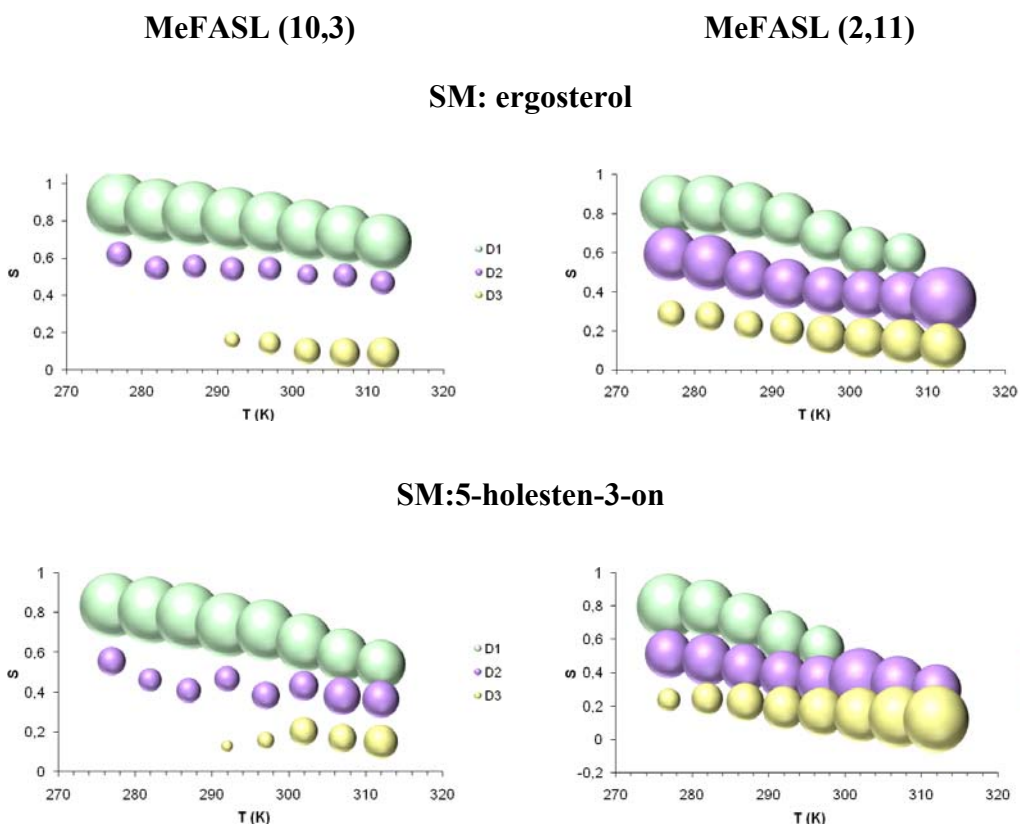


Slika 15: Maksimalni hiperfinski razcep ( $2A_{\max}$ ) spinskega označevalca MeFASL (10,3) v odvisnosti od temperature v membranah veziklov iz sfingomielina in različnih steroidov v molskem razmerju 1 : 1. Vsaka točka je povprečje treh meritev, kjer standardna napaka ne presega 5%.



Slika 16: Maksimalni hiperfinski razcep ( $2A_{\max}$ ) spinskega označevalca MeFASL (10,3) v membranah veziklov iz sfingomielina in različnih steroidov v molskem razmerju 1 : 1. Spektri so izmerjeni pri sobni temperaturi (297 K). Vsaka točka je povprečje treh meritev, kjer standardna napaka ne presega 5%.

Temperaturna odvisnost spremembe ureditvenega parametra in deleža domen, ki smo jih dobili z računalniško simulacijo EPR spektrov, je prikazana na sliki 17. Rezultati so prikazani za vezikle iz sfingomielina in ergosterola (tvori najbolj urejeno membrano) ter iz sfingomielina in 5-holesten-3-ona (tvori najmanj urejeno membrano).



Slika 17: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra ( $S$ ) in deleža domen ( $d$ , podan s premerom krožcev) pri veziklih iz sfingomielina (SM) in ergosterola oz. 5-holesten-3-ona v molskem razmerju 1:1. Spinski označevalec je MeFASL (10,3) in MeFASL (2,11). D1- najbolj urejena domena, D2-srednje urejena domena, D3-najmanj urejena domena.

Slika 17 kaže razlike med steroidoma, ki tvorita najbolj in najmanj urejeno membrano veziklov, označenih z MeFASL (10,3). Vrednosti ureditvenega parametra najbolj urejene vrste domen D1, ki predstavljajo večinski delež membrane, so pri veziklih iz ergosterola značilno

višje v primerjavi s 5-holesten-3-onom in s temperaturo počasneje upadajo. Delež domen D1 je pri veziklih iz ergosterola prek celotnega temperaturnega razpona dokaj konstanten, pri veziklih iz 5-holesten-3-ona pa opazimo rahel upad deleža domen D1 na račun srednje in najmanj urejenih domen. Domenska struktura v notranjosti membrane, kot jo podaja spinski označevalec MeFASL (2,11), kaže hitrejši upad ureditvenega parametra in deleža domen D1 s temperaturo. Ureditveni parameter domen D1 se zniža do te mere, da se te domene združijo z domenami z nižjim ureditvenim parametrom (pri 302 K pri veziklih iz 5-holesten-3-ona in pri 312 K pri veziklih iz ergosterola). Vrednosti ureditvenega parametra in deleža domen pri sobni in fiziološki temperaturi vseh vrst lipidnih veziklov so primerjane v preglednicah 5, 6, 7 in 8.

Preglednica 5: Deleži domen in ureditveni parameter S veziklov iz sfingomielina (SM) in različnih steroidov v molskem razmerju 1:1, označenih s spinskim označevalcem MeFASL (10,3). D1 predstavlja najbolj urejeno vrsto domen, D2 srednje fluidno in D3 najbolj fluidno vrsto domen. Merjeno pri sobni temperaturi (297 K). Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

SM:	Delež domen d				Ureditveni parameter S			
	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
ergosterol	0,82	0,09	0,09	/	0,78	0,58	0,16	/
7-dehidroholesterol	0,85	0,1	0,06	/	0,71	0,43	0,13	/
holesterol	0,86	0,11	0,03	/	0,75	0,4	0,23	/
$\beta$ -sitosterol	0,8	0,16	0,04	/	0,72	0,41	0,17	/
lanosterol	0,66	0,21	0,04	0,08	0,75	0,63	0,5	0,13
holesteril-acetat	0,8	0,06	0,13	0,01	0,75	0,62	0,38	0,17
stigmasterol	0,81	0,16	0,03	/	0,72	0,35	0,23	/
holesteril-sulfat	0,78	0,1	0,12	/	0,73	0,55	0,34	/
5-holesten-3-on	0,74	0,04	0,16	0,06	0,7	0,49	0,38	0,15

Preglednica 6: Deleži domen in ureditveni parameter S veziklov iz sfingomielina (SM) in različnih steroidov v molskem razmerju 1:1, označenih s spinskim označevalcem MeFASL (10,3). D1 predstavlja najbolj urejeno vrsto domen, D2 srednje fluidno in D3 najbolj fluidno vrsto domen. Merjeno pri fiziološki temperaturi (307 K). Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

SM:	Delež domen d				Ureditveni parameter S			
	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
ergosterol	0,71	0,11	0,18	/	0,72	0,5	0,09	/
7-dehidroholesterol	0,78	0,12	0,1	/	0,71	0,45	0,13	/
holesterol	0,81	0,12	0,08	/	0,68	0,3	0,2	/
$\beta$ -sitosterol	0,73	0,21	0,06	/	0,63	0,34	0,18	/
lanosterol	0,73	0,17	0,1	/	0,64	0,4	0,09	/
holesteril-acetat	0,71	0,29	/	/	0,66	0,33	/	/
stigmaterol	0,72	0,11	0,9	0,08	0,61	0,4	0,33	0,13
holesteril-sulfat	0,65	0,08	0,27	/	0,65	0,46	0,31	/
5-holesten-3-on	0,55	0,29	0,16	/	0,59	0,38	0,18	/

Preglednica 7: Deleži domen in ureditveni parameter S veziklov iz sfingomielina (SM) in različnih steroidov v molskem razmerju 1:1, označenih s spinskim označevalcem MeFASL (2,11). D1 predstavlja najbolj urejeno vrsto domen, D2 srednje fluidno in D3 najbolj fluidno vrsto domen. Merjeno pri sobni temperaturi (297 K). Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

SM:	Delež domen d			Ureditveni parameter S		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
ergosterol	0,43	0,34	0,23	0,68	0,4	0,18
7-dehidroholesterol	0,12	0,52	0,36	0,67	0,39	0,22
holesterol	0,27	0,43	0,31	0,65	0,41	0,22
$\beta$ -sitosterol	0,49	0,26	0,25	0,56	0,37	0,14
lanosterol	/	0,82	0,18	/	0,39	0,17
holesteril-acetat	0,32	0,33	0,35	0,6	0,41	0,23
stigmasterol	0,42	0,33	0,26	0,56	0,38	0,15
holesteril-sulfat	0,41	0,36	0,24	0,58	0,33	0,18
5-holesten-3-on	0,31	0,37	0,33	0,54	0,35	0,16



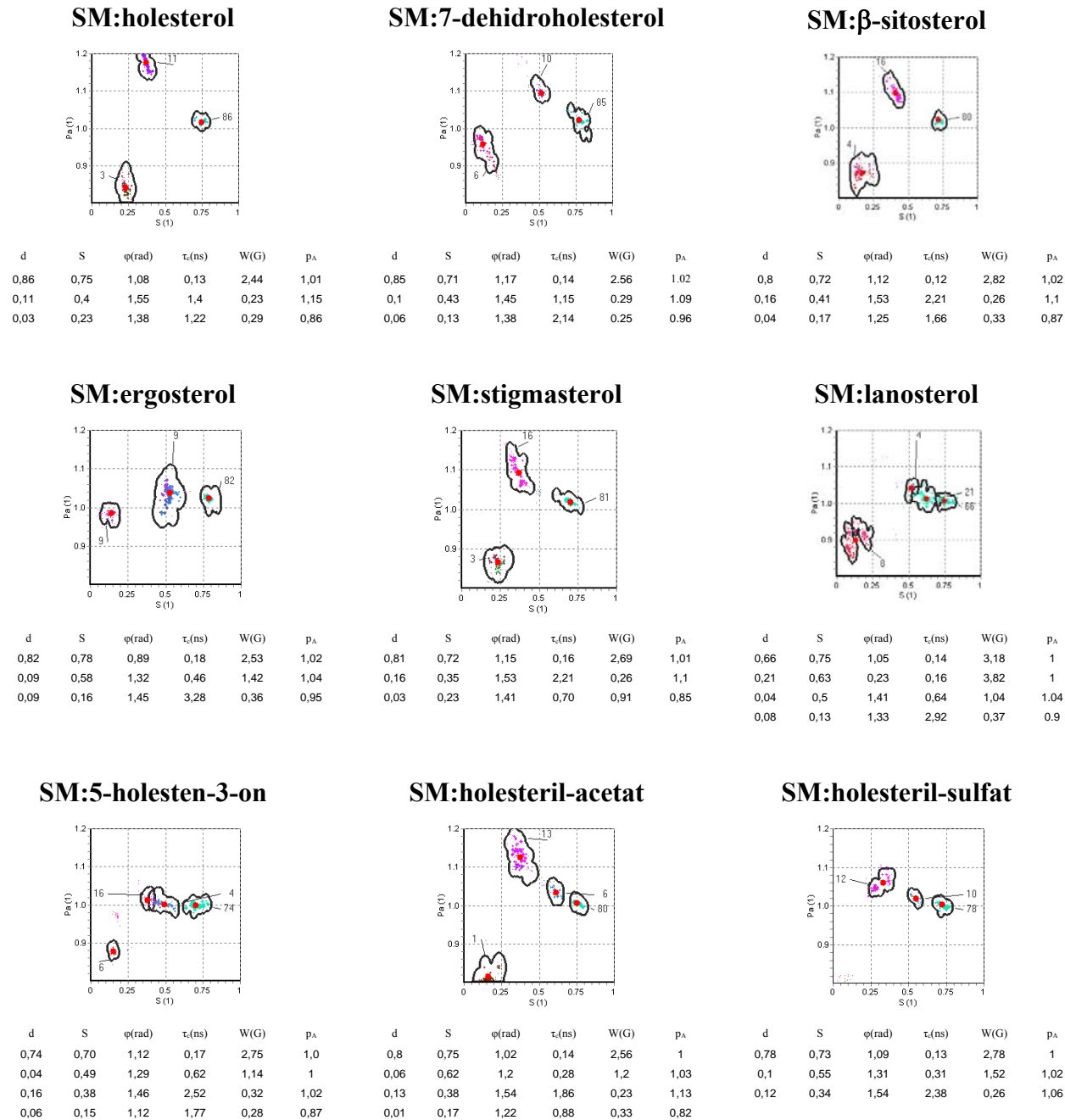
Preglednica 8: Deleži domen in ureditveni parameter S veziklov iz sfingomielina (SM) in različnih steroidov v molskem razmerju 1:1, označenih s spinskim označevalcem MeFASL (2,11). D1 predstavlja najbolj urejeno vrsto domen, D2 srednje fluidno in D3 najbolj fluidno vrsto domen. Merjeno pri fiziološki temperaturi (307 K). Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

SM:	Delež domen d			Ureditveni parameter S		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
ergosterol	0,28	0,41	0,31	0,58	0,37	0,15
7-dehidroholesterol	0,10	0,54	0,17	0,62	0,36	0,17
holesterol	/	0,66	0,34	/	0,40	0,19
$\beta$ -sitosterol	/	0,55	0,45	/	0,36	0,12
lanosterol	/	0,47	0,53	/	0,33	0,16
holesteril-acetat	/	0,42	0,58	/	0,37	0,17
stigmasterol	/	0,39	0,61	/	0,35	0,12
holesteril-sulfat	/	0,44	0,56	/	0,33	0,16
5-holesten-3-on	/	0,44	0,56	/	0,31	0,13

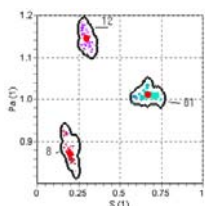
Pripadajoči GHOST diagrami meritev pri sobni (297 K) in fiziološki temperaturi (307 K) so prikazani na slikah 18,19 in 20.

Ota K. Proučevanje vpliva strukture steroidov na tvorbo membranskih domen v lipidnih veziklih z elektronsko paramagnetno resonanco.

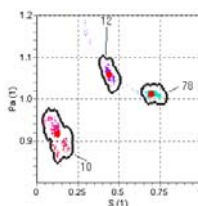
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2009



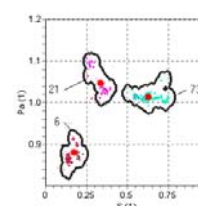
Slika 18: Odvisnost ureditvenega parametra S, korekcijskega faktorja polarnosti  $p_A$  ter deleža domen d (vrednosti, označene na diagramih) v veziklih iz sfingomielina (SM) in različnih steroidov v molskem razmerju 1:1. Ostali parametri so navedeni v tabelah pod GHOST diagrami, kjer je d = delež, S = ureditveni parameter,  $\varphi$  = komponenta ureditvenega parametra,  $\tau_c$  = rotacijski korelacijski čas, W = širina črte in  $p_A$  = korekcijski faktor polarnosti. Uporabljen spinski označevalec je MeFASL (10,3), merjeno pri 297 K. Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

**SM:holesterol**

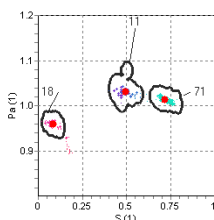
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,81	0,68	1,21	0,15	2,46	1,01
0,12	0,3	1,55	1,57	0,22	1,14
0,08	0,2	1,37	1,56	0,31	0,87

**SM:7-dehidroholesterol**

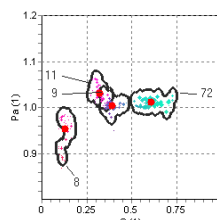
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,78	0,71	1,17	0,14	2,56	1,01
0,12	0,45	1,46	1,2	0,26	1,06
0,1	0,13	1,39	2,1	0,26	0,92

**SM: $\beta$ -sitosterol**

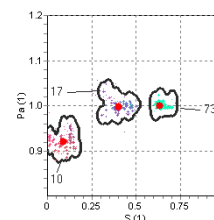
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,73	0,63	1,26	0,16	2,81	1,01
0,21	0,34	1,52	2,28	0,30	1,04
0,06	0,18	1,33	1,38	0,5	0,88

**SM:ergosterol**

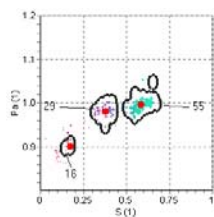
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,71	0,72	1,09	0,14	2,64	1,01
0,11	0,5	1,42	0,64	0,81	1,03
0,18	0,09	1,46	3,43	0,39	0,96

**SM:stigmasterol**

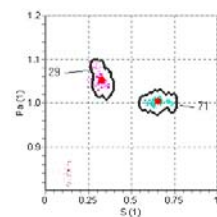
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,72	0,61	1,26	0,22	2,59	1,01
0,11	0,4	1,4	0,79	0,84	1
0,09	0,33	1,51	2,85	0,3	1,03
0,08	0,13	1,46	2,68	0,24	0,95

**SM:lanosterol**

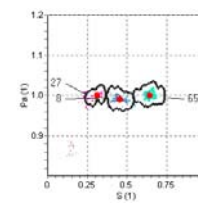
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,73	0,64	1,28	0,16	3,38	1
0,17	0,41	1,37	0,95	1,01	1
0,1	0,09	1,42	1,83	0,74	0,92

**SM:5-holesten-3-on**

d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,55	0,59	1,2	0,27	2,56	0,99
0,29	0,38	1,33	0,98	0,91	0,98
0,16	0,18	1,42	1,39	0,78	0,9

**SM:holesteril-acetat**

d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,71	0,66	1,2	0,17	2,59	1
0,29	0,33	1,52	2,51	0,24	1,05

**SM:holesteril-sulfat**

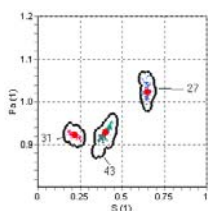
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,65	0,65	1,21	0,17	2,82	1
0,08	0,46	1,31	0,5	1,32	0,99
0,27	0,31	1,49	2,72	0,3	1

Slika 19: Odvisnost ureditvenega parametra  $S$ , korekcijskega faktorja polarnosti  $p_A$  ter deleža domen  $d$  (vrednosti, označene na diagramih) v veziklih iz sfingomielina (SM) in različnih steroidov v molskem razmerju 1:1. Ostali parametri so navedeni v tabelah pod GHOST diagrami, kjer je  $d$  = delež,  $S$  = ureditveni parameter,  $\varphi$  = komponenta ureditvenega parametra,  $\tau_c$  = rotacijski korelacijski čas,  $W$  = širina črte in  $p_A$  = korekcijski faktor polarnosti. Uporabljen spinski označevalec je MeFASL (10,3), merjeno pri 307 K. Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

Ota K. Proučevanje vpliva strukture steroidov na tvorbo membranskih domen v lipidnih veziklih z elektronsko paramagnetno resonanco.

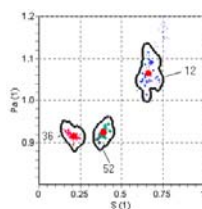
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2009

### SM:holesterol



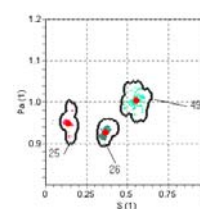
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,27	0,65	0,92	0,59	1,14	1,02
0,43	0,41	1,49	0,3	1,34	0,93
0,31	0,22	1,56	2,66	0,32	0,92

### SM:7-dehidroholesterol



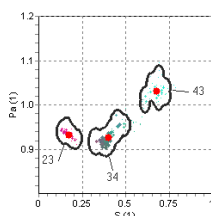
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,12	0,67	0,79	0,35	0,54	1,06
0,52	0,39	1,5	0,33	1,36	0,92
0,36	0,22	1,56	3,06	0,27	0,91

### SM: $\beta$ -sitosterol



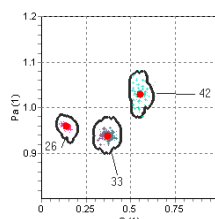
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,49	0,56	1,02	0,39	3,24	1
0,26	0,37	1,49	0,44	1,33	0,93
0,25	0,14	1,51	2,27	0,65	0,95

### SM:ergosterol



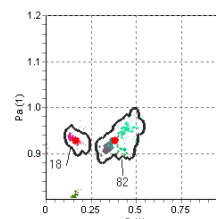
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,43	0,68	1	0,34	2,84	1,03
0,34	0,4	1,5	0,52	1,37	0,93
0,23	0,18	1,55	3,97	0,25	0,93

### SM:stigmasterol



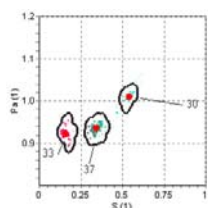
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,42	0,56	1,12	0,37	2,8	1,03
0,33	0,38	1,47	0,77	1,14	0,94
0,26	0,15	1,54	2,52	0,46	0,96

### SM:lanosterol



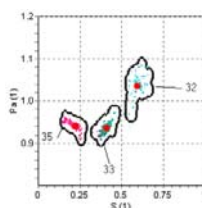
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,82	0,39	1,39	0,41	1,74	0,93
0,18	0,17	1,55	2,23	0,3	0,93

### SM:5-holesten-3-on



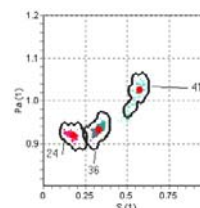
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,30	0,54	1,16	0,38	2,78	1,01
0,37	0,35	1,44	0,44	1,66	0,94
0,33	0,16	1,52	2,11	0,48	0,92

### SM:holesteril-acetat



d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,32	0,60	1,03	0,36	2,36	1,03
0,33	0,41	1,49	0,34	1,59	0,94
0,35	0,23	1,54	2,93	0,45	0,94

### SM:holesteril-sulfat



d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,41	0,58	1,11	0,42	2,7	1,02
0,36	0,33	1,47	0,48	1,28	0,93
0,24	0,18	1,54	2,29	0,32	0,92

Slika 20: Odvisnost ureditvenega parametra S, korekcijskega faktorja polarnosti  $p_A$  ter deleža domen d (vrednosti, označene na diagramih) v veziklih iz sfingomielina (SM) in različnih steroidov v molskem razmerju 1:1. Ostali parametri so navedeni v tabelah pod GHOST diagrami, kjer je d = delež, S = ureditveni parameter,  $\varphi$  = komponenta ureditvenega parametra,  $\tau_c$  = rotacijski korelacijski čas, W = širina črte in  $p_A$  = korekcijski faktor polarnosti. Uporabljen spinski označevalec je MeFASL (2,11), merjeno pri 297 K. Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

GHOST analize veziklov, ki vsebujejo holesterol, 7-dehidroholesterol in  $\beta$ -sitosterol, označenih z MeFASL (10,3) (temperatura 297 K), kažejo podoben vzorec domen s karakterističnimi razlikami v polarnosti (visok  $p_A$  domen D2 in zelo nizek  $p_A$  domen D3). Najbolj urejena vrsta domen D1 z ureditvenim parametrom  $S \geq 0,71$  predstavlja 80% ali več membrane ( $d \geq 0,8$ ) in je jasno ločena od manj urejenih vrst domen (D2 in D3). Domenske strukture veziklov drugih sterolov se od le-teh opazno razlikujejo ter se močno razlikujejo med seboj (slika 18).

Pri temperaturi 307 K (vezikli označeni z MeFASL (10,3)) se delež in ureditveni parameter najbolj urejene vrste domen D1 zmanjšata. Domenska struktura veziklov s holesterolom, 7-dehidroholesterolom in  $\beta$ -sitosterolom se ohrani. Vrsta domen D1 z ureditvenim parametrom  $S > 0,63$  predstavlja 73% ali več membrane ( $d \geq 0,73$ ) in je še vedno jasno ločena od manj urejenih vrst domen (D2 z visokim  $p_A$  in D3 z nizkim  $p_A$ ) (slika 19).

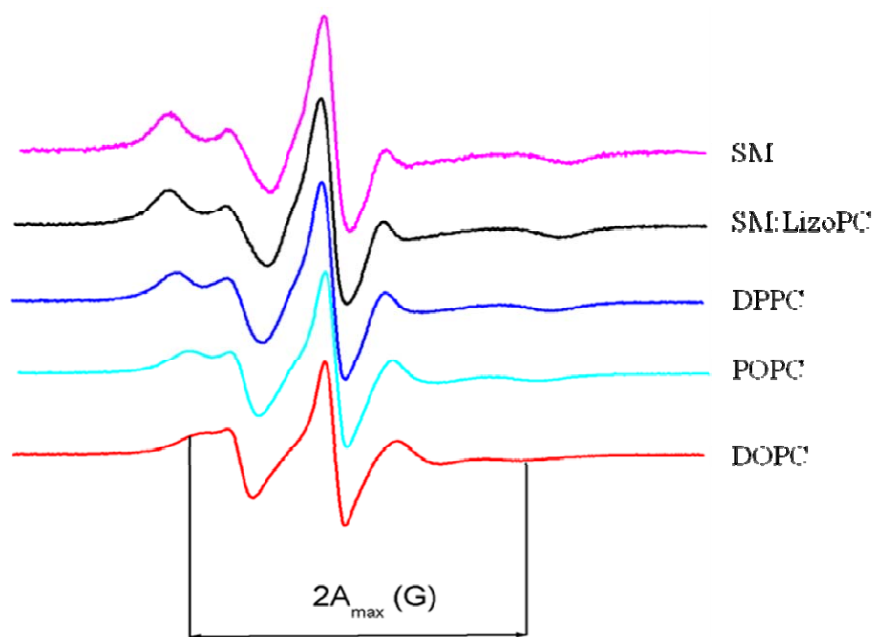
GHOST analiza veziklov z vgrajenim MeFASL (2,11) pri sobni temperaturi (297 K) kaže manjše razlike v domenski strukturi notranjosti membrane, kjer je gibanje spinskega označevalca manj omejeno (slika 20). Domene D2 in D3 notranjosti membrane v nasprotju s površino ne kažejo enakih razlik v polarnosti (podobne, nizke vrednosti  $p_A$  domen D2 in D3).

Pri fiziološki temperaturi (307 K) je domenska struktura membran veziklov (označeni z MeFASL (2,11)) vseh steroidov podobna (GHOST diagrami niso prikazani). Prisotni sta le še dve vrsti domen (D2 in D3) z zelo podobnimi vrednostmi ureditvenega parametra  $S$ , deleža domen  $d$  in vrednosti  $p_A$ . Le pri veziklih iz ergosterola in 7-dehidroholesterola, ki tvorita najbolj urejeno membrano, je prisotna vrsta domen D1, ki predstavlja 28 oz. 10% membrane (preglednica 8).

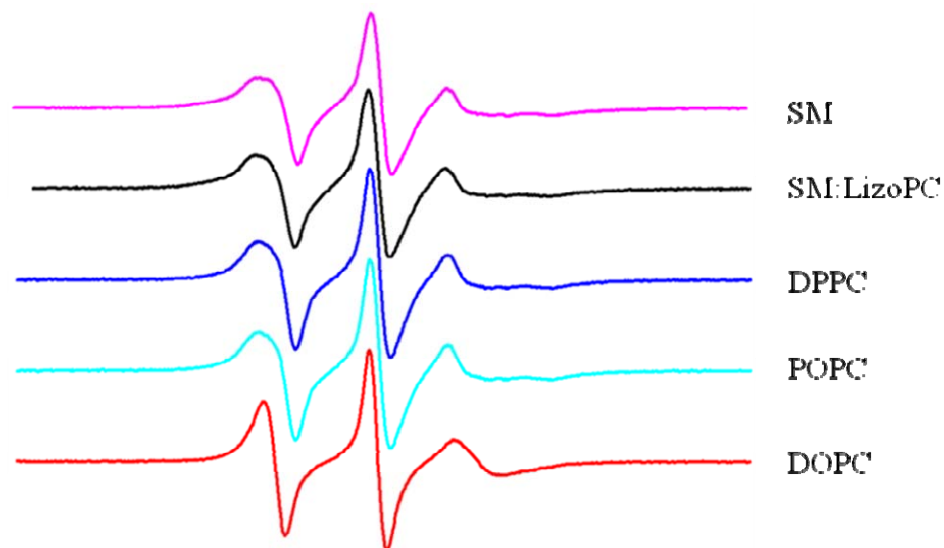
### 4.2.3 EPR meritve veziklov iz holesterola in fosfatidilholina

Z X-pasovnim EPR-spektrometrom smo pri osmih temperaturah (od 277 do 312 K, intervali 5 K) posneli spektre določene lipidne mešanice, označene tako z MeFASL (10,3), kot MeFASL (2,11). Kot primer so prikazani eksperimentalni spektri, izmerjeni pri sobni temperaturi (297 K) (slika 21 in 22).

#### MeFASL (10,3), CH : fosfolipidi = 1 : 1



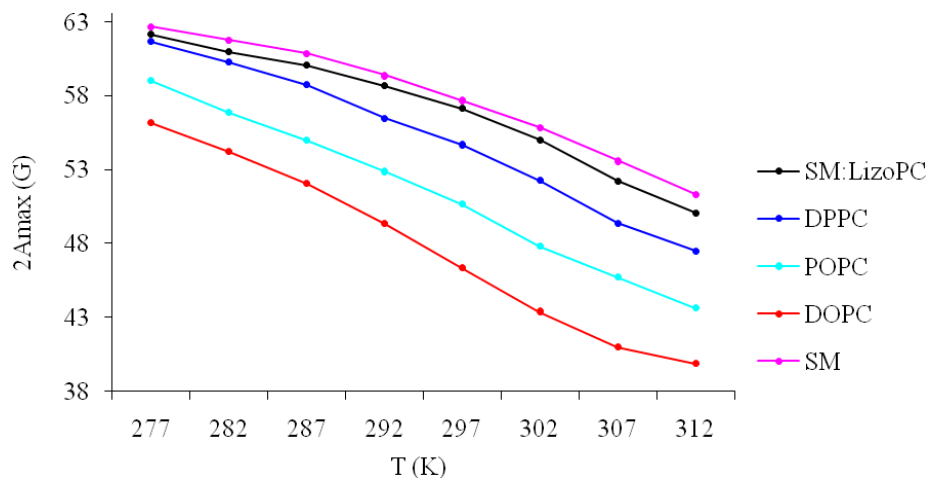
Slika 21: Eksperimentalni EPR spektri MeFASL (10,3) v veziklih, pripravljenih iz sfingomielina (SM), holesterola in lizofosfatidilholina (LizoPC) v molskem razmerju 1 : 1 : 0 in 4,5 : 4,5 : 1 ter različnih fosfatidilholinov (DPPC, POPC, DOPC) in holesterola v molskem razmerju 1 : 1. Razdalja med puščicama predstavlja maksimalni hiperfinski razcep ( $2A_{\max}$ ). Spektri so posneli pri sobni temperaturi (297 K).

**MeFASL (2,11), CH : lipidi = 1 : 1**

Slika 22: Eksperimentalni EPR spektri MeFASL (2,11) v veziklih pripravljenih iz sfingomielina (SM), holesterola in lizofosfatidilholina (LizoPC) v molskem razmerju 1 : 1 : 0 in 4,5 : 4,5 : 1 ter različnih fosfatidilholinov (DPPC, POPC, DOPC) in holesterola v molskem razmerju 1 : 1. Spektri so posneti pri sobni temperaturi (297 K).

Vezikli s holesterolom in različnimi kombinacijami lipidov, označenih z MeFASL (10,3), se med seboj razlikujejo po obliki krivulj. Iz eksperimentalnih spektrov smo zato odčitati maksimalni hiperfinski razcep ( $2A_{\max}$ ). Le-ta se manjša z naraščanjem temperature. Pri 297 K (slika 23) povprečna urejenost membrane upada v vrstnem redu:

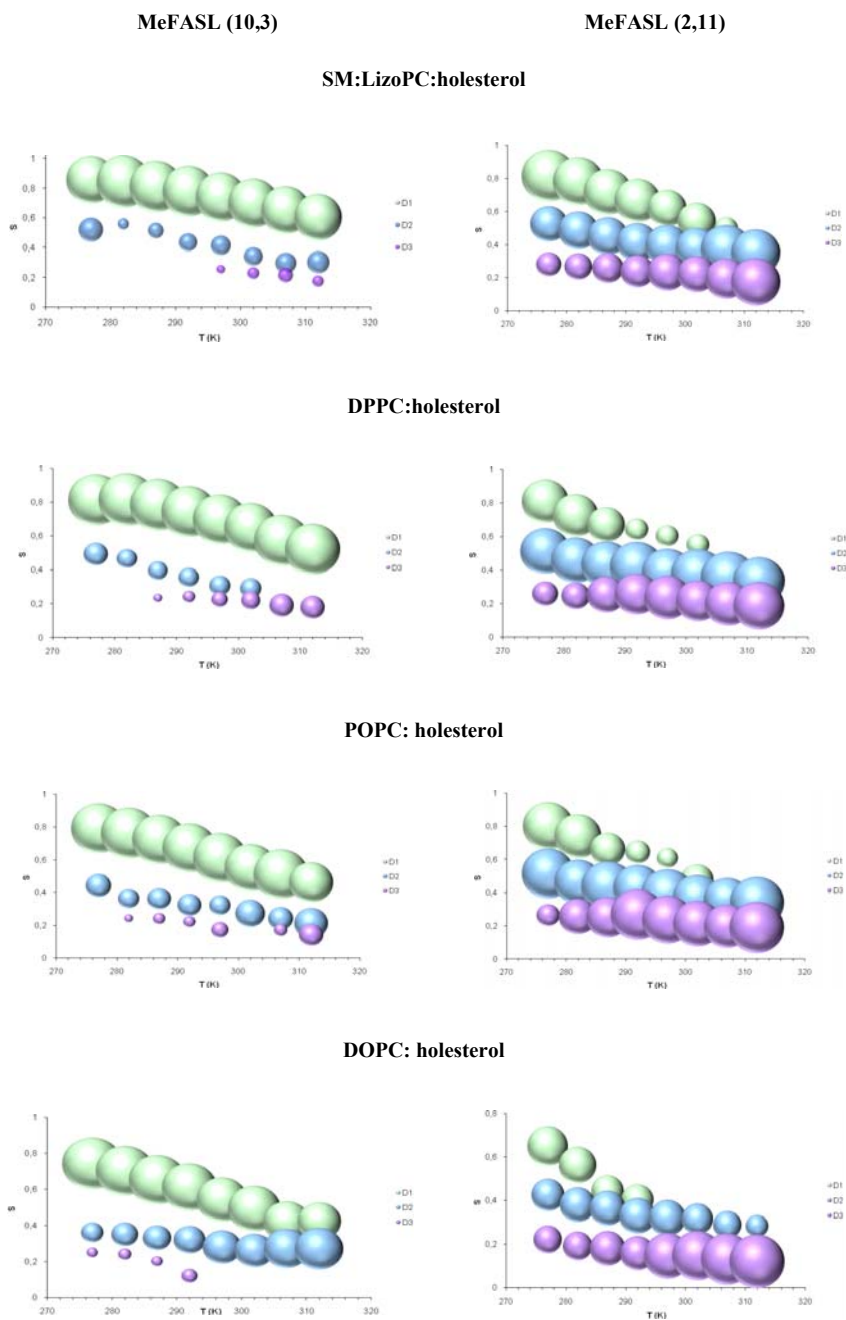
SM → SM in LizoPC → DPPC → POPC → DOPC.



Slika 23: Maksimalni hiperfinski razcep ( $2A_{\max}$ ) v odvisnosti od temperature v membranah veziklov iz različnih fosfatidilholinov (DPPC, POPC, DOPC) in holesterola v molskem razmerju 1 : 1 ter iz sfingomielina (SM), holesterola in lizofosfatidilholina (LizoPC) v molskem razmerju 4,5 : 4,5 : 1 in 1 : 1 : 0. Vezikli so označeni s spinskim označevalcem MeFASL (10,3). Vsaka točka je povprečje treh meritev, kjer standardna napaka ne presega 5%.

Temperaturna odvisnost spremembe ureditvenega parametra in deleža domen, ki jo dobimo z računalniško simulacijo EPR spektrov, je prikazana na sliki 24 (za vezikle iz SM in CH na slikah 9 in 10).





Slika 24: Temperaturna odvisnost ureditvenega parametra ( $S$ ) in deleža domen ( $d$ ) MeFASL (10,3) in (2,11) pri veziklih iz sfingomielina (SM), holesterola in lizofosfatidilholina (LizoPC) v molskem razmerju 4,5 : 4,5 : 1 ter različnih fosfatidilholinov (DPPC, POPC, DOPC) in holesterola v molskem razmerju 1 : 1. D1-najbolj urejena domena, D2-srednje urejena domena, D3-najmanj urejena domena.

Zamenjava SM z DPPC, POPC in DOPC v veziklih močno spremeni domensko strukturo veziklov, označenih tako z MeFASL (10,3), kot z MeFASL (2,11). Opazen je večji in hitrejši upad ureditvenega parametra in deleža najbolj urejene vrste domen D1. V notranjosti membrane se ureditveni parameter lipidov domen D1 zniža do te mere, da se ta vrsta domen združi z manj urejenimi domenami (pri DPPC in POPC pri temperaturi 302 K, pri DOPC pa že pri 297 K). Dodatek 10% LizoPC veziklom iz SM in CH ne povzroči značilne spremembe v deležu in ureditvenem parametru domen. Vrednosti ureditvenega parametra in deleža domen za vse vrste lipidnih veziklov so primerjane v preglednicah 9, 10, 11 in 12.

Preglednica 9: Deleži domen in ureditveni parameter S MeFASL (10,3) v veziklih iz sfingomielina (SM), holesterola in lizofosfatidilholina (LizoPC) v molskem razmerju 1 : 1 : 0 in 4,5 : 4,5 : 1 ter različnih fosfatidilholinov (DPPC, POPC, DOPC) in holesterola v molskem razmerju 1 : 1. D1 predstavlja najbolj urejeno vrsto domen, D2 srednje fluidno in D3 najbolj fluidno vrsto domen. Merjeno pri sobni temperaturi (297 K). Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

Holesterol:	Delež domen d			Ureditveni parameter S		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
SM	0,86	0,11	0,03	0,75	0,4	0,23
SM:LizoPC	0,84	0,14	0,02	0,74	0,41	0,25
DPPC	0,81	0,12	0,08	0,7	0,31	0,23
POPC	0,75	0,2	0,05	0,6	0,32	0,16
DOPC	0,62	0,26	0,12	0,54	0,28	0,05

Preglednica 10: Deleži domen in ureditveni parameter S MeFASL (10,3) v veziklih iz sfingomielina (SM), holesterola in lizofosfatidilholina (LizoPC) v molskem razmerju 1 : 1 : 0 in 4,5 : 4,5 : 1 ter različnih fosfatidilholinov (DPPC, POPC, DOPC) in holesterola v molskem razmerju 1 : 1. D1 predstavlja najbolj urejeno vrsto domen, D2 srednje fluidno in D3 najbolj fluidno vrsto domen. Merjeno pri fiziološki temperaturi (307 K). Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

Holesterol:	Delež domen d				Ureditveni parameter S			
	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
SM	0,81	0,11	0,08	/	0,68	0,3	0,2	/
SM:LizoPC	0,79	0,14	0,07	/	0,65	0,29	0,21	/
DPPC	0,83	0,17	/	/	0,57	0,19	/	/
POPC	0,61	0,25	0,11	0,04	0,5	0,23	0,16	0,03
DOPC	0,45	0,42	0,12	/	0,45	0,28	0,07	/

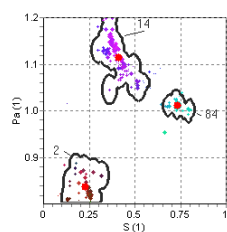
Preglednica 11: Deleži domen in ureditveni parameter S MeFASL (2,11) veziklov iz sfingomielina (SM), holesterola in lizofosfatidilholina (LizoPC) v molskem razmerju 1 : 1 : 0 in 4,5 : 4,5 : 1 ter različnih fosfatidilholinov (DPPC, POPC, DOPC) in holesterola v molskem razmerju 1 : 1. D1 predstavlja najbolj urejeno vrsto domen, D2 srednje fluidno in D3 najbolj fluidno vrsto domen. Merjeno pri sobni temperaturi (297 K). Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

Holesterol	Delež domen d			Ureditveni parameter S		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
SM	0,27	0,43	0,31	0,65	0,43	0,31
SM:LizoPC	0,3	0,4	0,3	0,6	0,4	0,21
DPPC	0,09	0,48	0,36	0,6	0,4	0,23
POPC	/	0,48	0,52	/	0,35	0,18
DOPC	/	0,4	0,6	/	0,32	0,14

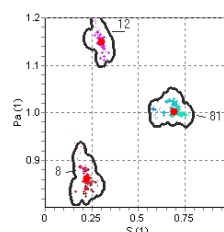
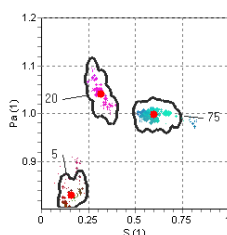
Preglednica 12: Deleži domen in ureditveni parameter S MeFASL (2,11) veziklov iz sfingomielina (SM), holesterola in lizofosfatidilholina (LizoPC) v molskem razmerju 1 : 1 : 0 in 4,5 : 4,5 : 1 ter različnih fosfatidilholinov (DPPC, POPC, DOPC) in holesterola v molskem razmerju 1 : 1. D1 predstavlja najbolj urejeno vrsto domen, D2 srednje fluidno in D3 najbolj fluidno vrsto domen. Merjeno pri fiziološki temperaturi (307 K). Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

Holesterol	Delež domen d			Ureditveni parameter S		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
SM	/	0,66	0,34	/	0,40	0,19
SM:LizoPC	/	0,59	0,41	/	0,38	0,18
DPPC	/	0,59	0,41	/	0,35	0,2
POPC	/	0,36	0,64	/	0,31	0,15
DOPC	/	0,22	0,78	/	0,29	0,13

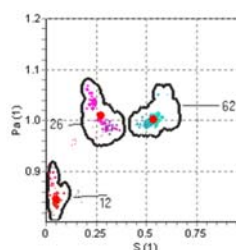
Pripadajoči GHOST diagrami meritev pri sobni (297 K) in fiziološki temperaturi (307 K) so prikazani na slikah 25, 26 in 27.

**SM:CH:LizoPC**

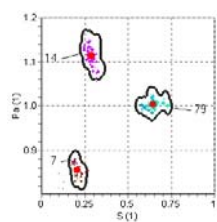
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$	d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,84	0,74	1,11	0,12	2,47	1,01	0,81	0,7	1,21	0,15	2,45	1
0,14	0,41	1,55	1,49	0,23	1,12	0,12	0,31	1,54	1,84	0,22	1,15
0,02	0,25	1,35	0,97	0,32	0,82	0,08	0,23	1,4	1,56	0,29	0,86

**CH:DPPC****CH:POPC**

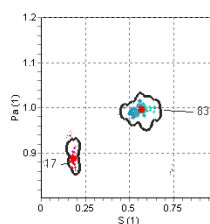
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$	d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,75	0,6	1,25	0,2	2,23	1	0,62	0,54	1,23	0,26	2,19	1
0,2	0,32	1,54	2,18	0,34	1,04	0,26	0,28	1,49	2,22	0,28	1,01
0,05	0,16	1,27	0,98	0,42	0,83	0,12	0,05	1,31	2,01	0,44	0,85

**CH:DOPC**

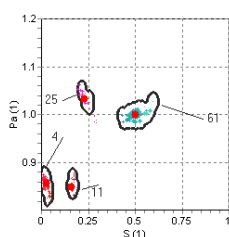
Slika 25: Odvisnost ureditvenega parametra  $S$ , korekcijskega faktorja polarnosti  $p_A$  ter deleža domen  $d$  (vrednosti, označene na diagramih) v veziklih iz sfingomielina (SM), holesterola (CH) in lizofosfatidilholina (LizoPC) v molskem razmerju 4,5 : 4,5 : 1 ter različnih fosfatidilholinov (DPPC, POPC, DOPC) in holesterola (CH) v molskem razmerju 1 : 1. Ostali parametri so navedeni v tabelah pod GHOST diagrami, kjer je  $d$  = delež,  $S$  = ureditveni parameter,  $\varphi$  = komponenta ureditvenega parametra,  $\tau_c$  = rotacijski korelacijski čas,  $W$  = širina črte in  $p_A$  = korekcijski faktor polarnosti. Uporabljen spinski označevalec je MeFASL (10,3), merjeno pri 297 K. Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

**SM:CH:LizoPC**

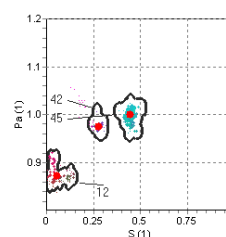
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,79	0,65	1,23	0,16	2,5	1
0,14	0,29	1,54	1,67	0,23	1,11
0,07	0,21	1,4	0,97	0,51	0,85

**CH:DPPC**

d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,83	0,57	1,3	0,26	1,93	0,99
0,17	0,19	1,47	1,75	0,3	0,89

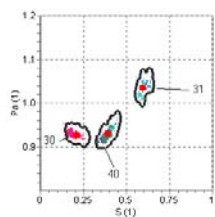
**CH:POPC**

d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,61	0,5	1,24	0,22	1,98	1
0,25	0,23	1,56	2,65	0,23	1,03
0,11	0,16	1,45	1,08	0,56	0,85
0,04	0,03	1,34	2,39	0,34	0,85

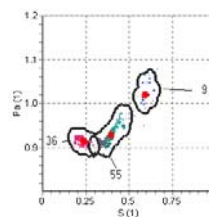
**CH:DOPC**

d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,45	0,45	1,22	0,21	2,04	1
0,42	0,28	1,52	0,98	0,58	0,97
0,12	0,07	1,39	1,3	0,53	0,87

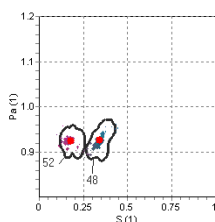
Slika 26: Odvisnost ureditvenega parametra  $S$ , korekcijskega faktorja polarnosti  $p_A$  ter deleža domen  $d$  (vrednosti, označene na diagramih) v veziklih iz sfingomielina (SM), holesterola (CH) in lizofosfatidilholina (LizoPC) v molskem razmerju 4,5 : 4,5 : 1 ter različnih fosfatidilholinov (DPPC, POPC, DOPC) in holesterola (CH) v molskem razmerju 1 : 1. Ostali parametri so navedeni v tabelah pod GHOST diagrami, kjer je  $d$  = delež,  $S$  = ureditveni parameter,  $\varphi$  = komponenta ureditvenega parametra,  $\tau_c$  = rotacijski korelacijski čas,  $W$  = širina črte in  $p_A$  = korekcijski faktor polarnosti. Uporabljen spinski označevalac je MeFASL (10,3), merjeno pri 307 K. Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

**SM:CH:LizoPC**

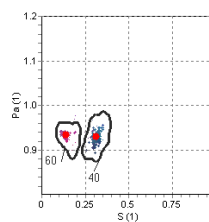
d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,31	0,6	1,07	0,36	1,82	1,03
0,4	0,4	1,5	0,37	1,29	0,93
0,3	0,21	1,56	2,66	0,28	0,93

**CH:DPPC**

d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,09	0,6	0,88	0,32	0,57	1,02
0,55	0,4	1,47	0,33	1,3	0,93
0,36	0,24	1,55	2,09	0,4	0,91

**CH:POPC**

d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,48	0,35	1,49	0,29	1	0,92
0,52	0,18	1,54	1,28	0,5	0,92

**CH:DOPC**

d	S	$\varphi$ (rad)	$\tau_c$ (ns)	W(G)	$p_A$
0,4	0,32	1,49	0,36	0,88	0,93
0,6	0,14	1,53	1,28	0,52	0,93

Slika 27: Odvisnost ureditvenega parametra  $S$ , korekcijskega faktorja polarnosti  $p_A$  ter deleža domen  $d$  (vrednosti, označene na diagramih) v veziklih iz sfingomielina (SM), holesterola (CH) in lizofosfatidilholina (LizoPC) v molskem razmerju 4,5 : 4,5 : 1 ter različnih fosfatidilholinov (DPPC, POPC, DOPC) in holesterola (CH) v molskem razmerju 1 : 1. Ostali parametri so navedeni v tabelah pod GHOST diagrami, kjer je  $d$  = delež,  $S$  = ureditveni parameter,  $\varphi$  = komponenta ureditvenega parametra,  $\tau_c$  = rotacijski korelacijski čas,  $W$  = širina črte in  $p_A$  = korekcijski faktor polarnosti. Uporabljen spinski označevalec je MeFASL (2,11), merjeno pri 297 K. Rezultati so pridobljeni z GHOST kondenzacijsko metodo.

Iz GHOST diagramov je razvidno, da dodatek 10% LizoPC veziklom s SM in CH (označeni z MeFASL (10,3) in MeFASL (2,11)) ne povzroči bistvene spremembe v domenski strukturi.

V nasprotju s tem pa zamenjava DPPC s POPC oz. DOPC v veziklih, označenih z MeFASL (10,3) (pri sobni in fiziološki temperaturi), povzroči bistveno znižanje ureditvenega parametra in deleža najbolj urejene vrste domen D1 ter močno znižanje vrednosti pA domen D2.

Pri veziklih, označenih z MeFASL (2,11) pri 297 K, je obseg znižanja vrednosti ureditvenega parametra in deleža domen D1 tolikšen, da se domene združijo z manj urejenima tipoma domen. Pri 307 K domenska struktura kaže enak trend kot pri 297 K, le da so najbolj urejene domene v vseh primerih odsotne. GHOST diagrami niso prikazani.



## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

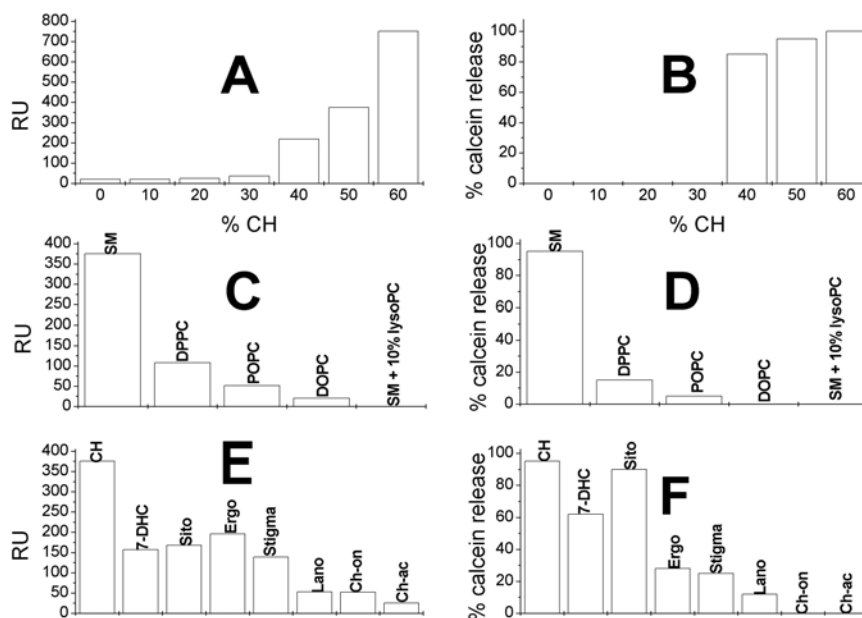
### 5.1 RAZPRAVA

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti:

- kako na lateralno domensko zgradbo veziklov, sestavljenih iz mešanice sfingomielina ter različnih naravnih in sintetičnih steroidov, vpliva zgradba steroida;
- kako na domensko strukturo veziklov, sestavljenih iz mešanice holesterola in fosfatidilholina, vpliva nasičenost acilnih verig fosfatidilholina;
- ali dodatek lizofosfolipidov binarni mešanici sfingomielina in holesterola spremeni domensko zgradbo membrane veziklov

in, ali obstaja povezava med pridobljenimi rezultati in membransko aktivnostjo citolitičnega proteina ostreolizina v odvisnosti od sestave membrane (slika 28).

Rezultate smo pridobili z elektronsko paramagnetno resonanco, ki omogoča zaznavo in preučevanje domenske strukture lipidnih membran. Meritve smo opravili v temperaturnem razponu od 277 do 312 K, v intervalih 5 K. Osredotočili smo se na rezultate, merjene pri sobni (297 K) in fiziološki temperaturi (307 K). Z računalniško simulacijo eksperimentalnih spektrov in GHOST kondenzacijsko metodo smo rezultate natančneje analizirali in detektirali koeksistenco treh različno urejenih vrst domen v membranah veziklov. Ker smo uporabili dva različna spinska označevalca, MeFASL (10,3) in MeFASL (2,11), z različno lokacijo doksilne skupine na alkilni verigi (na petem oziroma trinajstem atomu od metilne skupine), smo pridobili informacije o obnašanju molekul na površini in v notranjosti dvosloja. Različno okolje spinskega označevalca se je odrazilo v razlikah v obliki spektra in vrednostih izračunanih parametrov.



Slika 28: Vezava in permeabilizacija veziklov z ostreolizinom, merjena pri 25 °C. Vezava ostreolizina (levi stolpec) je bila merjena s površinsko plazmno resonanco in je izražena v resonančnih enotah (RU). Monosloji so bili sestavljeni iz SM/CH v različnih molskih razmerjih (A), iz ekvimolarnih mešanic CH in različnih fosfolipidov (C), oz. ekvimolarnih mešanic SM in različnih steroidov (E). Permeabilizacija (desni stolpec) je bila spremljana spektrofotometrično z merjenjem sproščanja kalceina iz veziklov. Vezikli so bili sestavljeni iz SM/CH v različnih molskih razmerjih (B), ekvimolarnih mešanic CH in različnih fosfolipidov (D), oz. ekvimolarnih mešanic SM in različnih steroidov (F). Razmerje lipid/protein je 25 oz. 5,4 (povzeto po Sepčić in sod., 2004, Rebolj in sod., 2006).

Zgradba steroidov vpliva na interakcije s sosednjimi lipidnimi molekulami in posledično na njihovo ureditev. Prek maksimalnega hiperfinega razcepa (slika 16) smo pridobili podatke o povprečni urejenosti membrane ekvimolarnih mešanic sfingomielina in različnih steroidov, označenih z MeFASL (10,3). Membrana veziklov z ergosterolom in 7-dehidroholesterolom je v primerjavi s holesterolom bolj urejena, verjetno zaradi prisotnosti dodatne dvojne vezi v sterolnem obroču. Dodatni etilni verigi na alifatski stranski verigi  $\beta$ -sitosterola in stigmasterola (ergosterol ima na tem mestu manjšo metilno skupino), jo močno razvejata in posledično zmanjšata njuno sposobnost ureditve membrane. Stigmasterol in lanosterol pri

urejanju sosednjih molekul dodatno ovira dvojna vez v alifatski stranski verigi, slednjega pa še dodatni metilni skupini na sterolnem obroču. Membrana je najbolj fluidna v primeru steroidov z modificirano hidroksidno skupino na mestu 3 (holesteril-acetat, holesteril-sulfat, 5-holesten-3-on), ki sicer tvori vodikovo vez in vzdržuje orientacijo sterola v membrani. Rezultati se ujemajo s tistimi, pridobljenimi pri prejšnjih raziskavah (Xu in sod., 2001; Hallig in Slotte, 2004; Rebolj in sod., 2006; Scheidt in sod., 2003), a ne kažejo nobene povezave z membransko aktivnostjo ostreolizina. Ta postane razvidna šele pri določitvi drugih parametrov ( $d$ ,  $S$ ,  $\varphi$ ,  $\tau_c$ ,  $W$ ,  $p_A$ ).

GHOST diagrami MeFASL (10,3) (slika 18) kažejo, da imajo vezikli, ki kažejo največjo vezavno in litično aktivnost ostreolizina ( $SM : CH = 1 : 1$ ,  $SM : \beta\text{-sito} = 1 : 1$ ,  $SM : 7\text{-DHC} = 1 : 1$ ) (Sepčič in sod., 2004, Rebolj in sod., 2006, slika 28), podobno domensko strukturo, ki se značilno razlikuje od veziklov drugačne sestave. Domenske strukture veziklov z drugimi steroidi se tudi močno razlikujejo med seboj. Rezultati kažejo, da za aktivnost ostreolizina niso odločilne lastnosti najbolj urejenega tipa domen (ki zaseda največji delež membrane), temveč so odločilne lastnosti manj urejenih vrst domen.

Domene veziklov s holesterolom,  $\beta$ -sitosterolom in 7-dehidroholesterolom kažejo karakteristične razlike v polarnosti (visok  $p_A$  domene D2 in zelo nizek  $p_A$  domene D3). Pri sobni temperaturi najbolj urejena vrsta domen D1 z ureditvenim parametrom  $S \geq 0,71$  predstavlja 80% ali več membrane, pri fiziološki temperaturi pa več kot 73% membrane z ureditvenim parametrom  $S \geq 0,63$ . Skupina domen D1 je jasno ločena od manj urejenih domenskih tipov (D2 in D3). GHOST analiza veziklov z vgrajenim MeFASL (2,11) kaže manjše razlike v domenski strukturi, vzrok je v manj omejenem gibanju sonde v notranjosti membrane.

Membranska aktivnost ostreolizina se ob zamenjavi sfingomielina z DPPC ali ob dodatku nenasičenih glicerofosfatidov (npr. POPC, DOPC) v membrani s holesterolom bistveno zmanjša (Sepčić in sod., 2004, slika 28). EPR meritve z MeFASL (10,3) (slika 23) so pokazale, da je membrana iz holesterola in DPPC manj urejena kot v primeru holesterola in sfingomielina. Membrane z zgoraj navedeno sestavo so občutljive na delovanje ostreolizina (Sepčić in sod., 2004). Mono-, oziroma dinenasičenost acilnih verig pa vodi v drastično povečanje fluidnosti membrane, saj lipidi s tako zgradbo onemogočajo tesno medsebojno pakiranje lipidov. Najbolj urejen tip domen (D1) naj bi v veziklih iz sfingomielina in holesterola predstavljal  $l_o$ -fazne domene (Garvas, 2007). Na površini membrane (označene z MeFASL (10,3)) se delež domen D1 v veziklih s POPC zmanjša za 10 in 20% pri sobni oz. fiziološki temperaturi, v veziklih z DOPC pa celo za 30 in 35%. Vrednosti ureditvenega parametra pa se z vrednosti 0,75 oz. 0,7 pri DPPC zmanjšajo na 0,6 oz. 0,5 pri POPC ter 0,55 oz. 0,45 pri DOPC (preglednica 8 in 9). Povečanje fluidnosti pa se v notranjosti membrane s POPC in DOPC (označena z MeFASL (2,11)) kaže v odsotnosti vrste domen D1, te domene se namreč združijo s populacijo manj urejenih vrst domen. Zmanjšanje deleža oz. odsotnost  $l_o$ -faznih domen D1 v veziklih s POPC in DOPC je verjetno vzrok za zmanjšanje aktivnosti ali inhibicijo ostreolizina.

Nazadnje smo preučili vpliv lizofosfolipidov na membransko strukturo veziklov iz sfingomielina in holesterola (SM : CH : LizoPC = 4,5 : 4,5 : 1). Povprečna ureditev membrane se je rahlo znižala (slika 23). Dodatek LizoPC naj bi motil delovanje ostreolizina (Sepčić in sod., 2003, Chowdhury in sod., 2008, slika 28), a meritve niso pokazale vpliva na obliko EPR spektra (slika 22), niti na vrednosti izračunanih parametrov.

Delovanje ostreolizina je odvisno od prisotnosti sfingomielina in holesterola, zamenjava katerekoli od teh komponent z drugo močno atenuira njegovo delovanje. Ker se ostreolizin skupaj z nekaterimi drugimi citolitičnimi proteini veže na domene, ki ustrezajo lipidnim raftom, predstavlja potencialno zanimivo orodje za biomedicinske raziskave. Pred njegovo uporabo kot označevalca lipidnih raftov je potrebno poznavanje strukturnih lastnosti membranskih domen, ki jih prepozna in se nanje veže. Na podlagi naših ugotovitev lahko sklepamo, da je značilen vzorec domen na površini membrane hkrati z njihovimi lastnostmi ta, ki omogoča uspešno vezavo in delovanje ostreolizina.

## 5.2 SKLEPI

- Povprečna ureditev membrane ekvimolarnih mešanic sfingomielina in različnih steroidov se ne sklada, povprečna ureditev mešanic različnih glicerofosfatidov in holesterola pa se sklada z membransko aktivnostjo ostreolizina.
- Membrane, ki kažejo največjo občutljivost na delovanje ostreolizina, tvorijo podoben vzorec domen na površini membrane, njihova specifična površinska ureditev je verjetno bistvena za vezavo ostreolizina.
- Za aktivnost ostreolizina niso odločilne le lastnosti najbolj urejenega tipa domen (ki zaseda največji delež membrane), temveč tudi lastnosti manj urejenih domen.
- Primerjava tvorbe domen v membranah s holesterolom in različno nasičenimi fosfolipidi kaže, da nenasičenost acilnih verig prek onemogočanja tvorbe  $l_o$ -faznih domen inhibira delovanje ostreolizina.
- Vzrok inhibicije delovanja ostreolizina z dodatkom lizofosfolipidom ne leži v njegovem vplivu na domensko strukturo.

## 6 POVZETEK

Ostreolizin je citolitični protein bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*), ki ima verjetno biološko vlogo regulacije razvoja gobe. Kljub dejstvu, da v membranah tvori pore, verjetno nima vloge toksina. Zaradi dvojne specifičnosti vezave na membranske mikrodomene, zahteva namreč hkratno prisotnost sfingomieline in holesterola, je potencialno uporaben v raziskavah lipidnih raftov.

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti vpliv strukture lipidnih molekul na tvorbo membranskih domen in morebitno povezavo med domensko strukturo in membransko aktivnostjo ostreolizina z elektronsko paramagnetno resonanco. Ugotovili smo, da aktivnost ni odvisna od povprečne urejenosti membrane, ampak od specifične porazdelitve lipidov v domene. Primerjava stanja z dvema različnima označevalcema je pokazala, da so razlike večje v površinskem delu membrane. Površina na ostreolizin občutljivih membran ima podobno domensko strukturo, verjetno je specifična ureditev na površini nujna za vezavno in litično aktivnost ostreolizina. Dvojna vez nenasičenih glicerofosfolipidov onemogoča tvorbo  $l_o$ -faznih domen, na katere se ostreolizin veže. Dodatek majhnih količin lizofosfolipidov pa ne pojsni vzroka njihovi inhibiciji ostreolizina.

## 7 VIRI

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.

Ben-Yashar 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(3): 271-8.

Berne S., Križaj I., Pohleven F., Turk T., Maček P., Sepčič K. 2002. Pleurotus and Agrocybe hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1570 (3): 153-159.

Boročov H., Schnitzky M. 1976. Vertical displacement of membrane proteins mediated by changes in microviscosity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, ZDA*. 73: 4562-4530.

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

Brown D. A., London E. 1998. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *The Journal of Membrane Biology*. 164: 103-114.

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

Campbell N. A., Reece J. B. 2005. *Biology*. 7th edition. Eilbur B. (Ed.). Pearson Education Inc., San Francisco, ZDA: 119.

Curtain C.C., Gordon L.M. 1984. ESR Spectroscopy of membranes. *Membranes, Detergents, and Receptor Solubilization*: 177-213.



Dang T. X., Hotze E. M., Rouiller I., Tweten R. K., Wilson-Kubalek E. M. 2005. Preore to pore transition of a cholesterol-dependent cytolysin visualized by electron microscopy. *Journal of Structural Biology*. 150 (1): 100-108.

Davies M. A., Schuster H. F., Brauner J. W., Mendelsohn R. 1990. Effects of cholesterol on conformational disorder in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. A quantitative IR study of the depth dependence. *Biochemistry*. 29: 4368-4373.

Dietrich C., Bagatolli L. A., Volovyk Z. N., Thompson N. L., Levi M., Jacobsen K., Gratton E. 2000. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical Journal*. 80: 1417-1428

Dowhan W., Bogdanov M. 2002. Functional roles of lipids in membranes. 4th edition. V: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Vance D. E, Vance J. E. (Eds). Elsevier Science B. V.: 29.

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 (1): 148-150.

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

Feigenson G. W., Buboltz J. T. 2001. Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PD/dilauroyl-PC/cholesterol:nanoscopic domain formation driven by cholesterol. *Biophysical Journal*. 80: 2775-2788.

Fivaz M., Abrami L., van der Goot F.G. 1999. Landing on lipid rafts. *Trends in Cell Biology*. 9 (6): 212-3.

Frye L. D., Edidin M. 1970. The rapid intermixing cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *Journal of Cell Science*. 7: 319-335.

Garvas M. 2007. Preučevanje tvorbe membranskih domen v lipidnih veziklih iz sfingomielina in holesterola z elektronsko paramagnetno resonanco. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.

Giocondi M.-C., Vie V., Lesniewska E., Goudonnet J.-P., Le Grimellec C. 2000. In situ imaging of detergent-resistant membranes by atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology*. 131: 38-43.

Gu L.Q., Braha O., Conlan S., Cheley S., Bayley H. 1999. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature*. 398: 686-690.

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 (2):161-71.

Harvey A.L. 1990. Cytolytic toxins. V: Handbook of toxinology. Shier W.T., Mebs D. (Eds.). Marcel Dekker, New York, ZDA: 814.

HaoY.-H., Chen J.-W. 2001. Influence of cholesterol on the biophysical properties of the sphingomyelin/DOPC binary system. *Journal of Membrane Biology*. 183: 85-92.

Heino S., Lusa S., Somerharju P., Ehnholm C., Olkkonen V. M., Ikonen E. 2000. Dissecting the role of the Golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences, ZDA*. 97: 8375-8380.

Heerklotz H., Seelig, J. 2002. Application of pressure perturbation calorimetry to lipid bilayers. *Biophysical Journal*. 82 (3): 1445-1452.

Ishitsuka R., Yamaji-Hasegawa A., Makino A., Hirabayashi Y., Kobayashi T. 2004. A lipid-specific toxin reveals heterogeneity of sphingomyelin-containing membranes. *Biophysical Journal*. 86: 296-307.

Korlach J., Schwille P., Webb W. W., Feigenson G. W. 1999. Characterisation of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences, ZDA*. 96: 8461-9466.

Krajewski-Bertrand M. A., Milon A., Hartmann M.-A. 1992. Deuterium-NMR investigation of plant sterol effects on soybean phosphatidylcholine acyl chain ordering. *Chemistry and Physics of Lipids*. 63: 235-241.

Kwiatkowska K., Hordejuk R., Szymczyk P., Kulma M., Abdel-Shakor A. B., Plucienniczak A., Dolowy K., Szevczyk A., Sobota A. 2007. Lysenin-His, a sphingomyelin – recognizing toxin, requires tryptophan 20 for cation selective channel assembly, but not for membrane binding. *Molecular Membrane Biology*. 24 (2): 121-134.

Lafont F., Abrami L., van der Goot F. G. 2004. Bacterial subversion of lipid rafts. *Current opinion in microbiology*. 7 (1): 4-10.

Lambert S., Ameels H., Gniadecki R., Herin M., Poumay Y. 2008. Internalization of EGF receptor following lipid rafts disruption in ceratinocytes is delayed and dependent on p38 MAPK activation. *Journal of Cell Physiology*. 217 (3): 834-845.

Lichtenberg D., Goñi F., Heerklotz H. 2005. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends in Biochemical Sciences*. 30: 430-436.

London E., Feigenson G. W. 1981. An analysis of the local phospholipid enviroment of diphenylheksatriene and gramicidin A. *Biochimica et Biophysica Acta*. 649: 89-97.

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.

London E. 2002. Insights into lipid raft structure and formation from eperiments in model membranes. *Current Opinion in Structural Biology*. 12: 480-486.

Martnez D., Otero A., Alvarez C., Pazos F., Tejuca M., Lanio M. E., Gutiérrez-Aguirre I., Barlic A., Iloro I., Arrondo J. L., González-Mañas J. M., Lissi E. 2007. Effect of sphingomyelin and cholesterol on the interaction of St II with lipidic interfaces. *Toxicon*. 49 (1): 68-81.

Maxfield F. R. 2002. Plasma membrane microdomains. *Current Opinion in Cell Biology*. 14: 483-487.

Melkonian K. A., Ostermeyer A. G., Chen J. Z., Roth M. G., Brown D. A. 1999. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 3910-3917.

Miao L., Nielsen M., Thewalt J., Ipsen J. H., Bloom M., Zuckermann M. J., Mouritsen O. G. 2002. From lanosterol to cholesterol: structural evolution and differential effects on lipid bilayers. *Biophysical Journal*. 82: 1429-1444.

Morenilla-Palao C., Pertusa M., Mesequer V., Cabedo H., Viana F. 2009. Lipid raft segregation modulates TRPM8 channel activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 284 (14): 9215-9224.

Nelson L. D., Johnson A. E., London E. 2008. How interaction of perfringolysin O with membranes is controlled by sterol structure, lipid structure, and physiological low pH: Insights into the origin of perfringolysin O – lipid raft interaction. *Journal of Biological Chemistry*. 283 (8): 4632-4642.

O'Brien R., Ladbury J.E., Chowdry B.Z. 2000. Isothermal titration calorimetry of biomolecules. V: Protein-Ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry. Harding S.E., Chowdry B.Z (Eds). Oxford University Press, ZDA: 263.

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.

Ohvo-Rekilä H., Kuikka M., Ramstedt B., Tuuf J., Slotte J. P. 2001. Membrane properties of D-erythro-N-acyl sphingomyelins and their corresponding dihydro species. *Biophysical Journal*. 5: 2327-2337.

Parasassi T., Loiero M., Raimondi M., Ravagnan G., Gratton E. 1993. Absence of lipid gel-phase domains in seven mammalian cell lines and in four primary cell types. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1153: 143-154.

Pfriefer F. W. 2003. Cholesterol homeostasis and function in neurons in the central nervous system. *Cellular Molecular Life Sciences*. 60 (6): 1158-1171.

Pike L. J. 2004. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochemical Journal*. 378: 281-292.

Potrich C., Viero G., Tejuca M., Anderluh G., Maček P., Menestrina G. 2000. Construction of new immunotoxins by binding equinatoxin II to monoclonal antibodies via biotin-avidin interaction. Cytotoxic effects on human tumor cells. *Acta Biologica Slovenica*. 43: 47-51.

Rebolj K., Poklar-Ulrih N., Maček P., Sepčič K. 2006. Steroid structural requirements for binding of ostreolysin, a lipid raft binding cytolysin, with lipid monolayers and bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758: 1662-1670.

Rinia H. A., Snel M. M. E., van der Enden J. P. J. M., de Kruijff B. 2001. Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Letters*. 501: 92-96.

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 (1): 65-73.

Sankaram M. B., Thompson T. E., 1990. Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry*. 29: 10670-10675.

Scheidt H. A., Müller P., Herrmann A., Huster D. 2003. The potential of fluorescent and spin-labeled steroid analogs to mimic natural sterols. *The Journal of Biological Chemistry*. 46: 45563-45569.

Scheiffele P., Roth M. G., Simons K. 1997. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via transmembrane domain. *The EMBO Journal*. 16: 5501-5508.

Schengrundt C-L. in Ringler N.J. 1989. Binding of *Vibrio cholera* toxin and the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* to  $G_{M1}$ , derivatives of  $G_{M1}$ , and nonlipid oligosaccharide polyvalent ligands. *The Journal of Biological Chemistry*. 264: 13233-13237.

Schmidt C. F., Barenholz Y., Huang C., Thompson T. E. 1978. Monolayer coupling in sphingomyelin bilayer systems. *Nature*. 271: 775 – 777.

Seeger, R. 1975. Demonstration and isolation of phallolysin, a haemolytic toxin from *Amanita phalloides*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 287: 277-287.

Seelig J. 1987. <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids and sphingomyelin. Biochimica et Biophysica Acta. 515: 105-140.

Sepčić 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.

Sepčić 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 lipid domains. FEBS Letters. 575: 81-85.

Shogomori H., Kobayashi T. 2008. Lysenin: a sphingomyelin specific pore-forming toxin. Biochimica et Biophysica Acta. 1780 (3): 612-618.

Singer S. J., Nicholson G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science. 175: 720-731.

Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature. 387: 569-572.

Simons K., Ehehalt R., 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. The Journal of Clinical Investigation. 110: 597-603.

Slotte J. P. 1995. Lateral domain heterogeneity in cholesterol/phosphatidylcholine monolayers as a function of cholesterol concentration and phosphatidylcholine acyl chain length. Biochimica et Biophysica Acta. 1238 (2): 118-126.

Subczynski W. K., Kusumi A. 2003. Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membrane: approaches by pulse EPR spin-labelling and single molecule optical microscopy. Biochimica et Biophysica Acta. 1610: 231-243.

Suzuki K., Sanematsu F., Fujiwara T., Edidin M., Kusumi A. 2001. Rapid, continual formation/dispersion of raft-like domains in the resting cell membrane. *Molecular Biology of the Cell*. 12: 470a.

Suzuki K., Sanematsu F., Fujiwara T., Edidin M., Kusumi A. 2002. Stimulation-induced formation of temporal but stabilized rafts. *Biophysical Journal*. 82: 348a.

Šentjerc M., Štalc A. 1976. Uporaba elektronske paramagnetne resonance v biologiji in medicini. *Medicinski razgledi*. 15: 259-279.

Šentjerc M., Sok M., Serša G. 1998. Plasma membrane fluidity alterations in cancerous tissues. *Radiology and Oncology*. 32 (1): 109-117.

Šentjerc M., Štrancar J., Koklič T. 2002. Membrane domain alteration under the action of biologically active substances: an EPR study. *Current Topics in Biophysics*. 26 (1): 65-73

Štrancar J. 2000. EPR spektroskopija površinske plasti celičnih membran. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za matematiko in fiziko.

Štrancar J. 2004. EPR characterisation of biosystem. Ljubljana, Inštitut Jožef Stefan : 12.

Štrancar J., Koklič T., Arsov Z., Filipič B., Stopar D., Hemminga M. A. 2005. Spin label EPR-based characterization of biosystem complexity, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 45: 394-406.

Tomita T., Noguchi K., Mimuro H., Ukaji F., Ito K., 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 (26): 26975-26982.

van Meer G., Simons K. 1982. Viruses budding from either the apical or the basolateral plasma membrane domain of MDCK cells have unique phospholipid compositions. *The EMBO Journal*. 1 (7): 847-52.

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 (4): 1010-1018.

Warnock D. E., Roberts C., Lutz M. S., Blackburn W. A., Young W. W., Baenziger J. U. 1993. Determination of plasma membrane lipid mass and composition in cultured Chinese hamster ovary cells using high gradient magnetic affinity chromatography. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 10145 – 10153.

Xu X., London E. 2000. The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry*. 39 (5): 843-849.

Xu X., Bittman R., Duportail G., Heissler D., Vilcheze C., London E. 2001. Effect of structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). *Journal of Biological Chemistry*. 276: 33540-33546.

Yeagle P. L., Martin R. B., Lala A. K., Lin H. K., Bloch K. 1977. Differential effects of cholesterol and lanosterol on artificial membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, ZDA*. 74 (11): 4924-4626.

Zajchowski L. D., Robbins S. M. 2002. Lipid rafts and little caves: Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *European Journal of Biochemistry*. 269: 1-16.

Zitzer A., Zitzer O., Bhakdi S., Palmer M. Oligomerization of *Vibrio cholerae* cytolysin yields a pentameric pore and has a dual specificity for cholesterol and sphingolipids in the target membrane. 1999. *Journal of Biological Chemistry*. 274 (3): 1375-1380.

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**

*Iskreno se zahvaljujem mentoricama za nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Kristina, hvala za podporo v lepih in težkih trenutkih. Družini, posebno staršem, pa se zahvaljujem za vso ljubezen, podporo in vzpodbudo.*