UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

ALJOŠA ŽERJAV

ANALIZA VELIKOSTI LIPIDNIH VEZIKLOV IN NJIHOVIH NA DETERGENT ODPORNIH MEMBRANSKIH FRAKCIJ S POMOČJO TRANSMISIJSKE ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE

DIPLOMSKO DELO Univerzitetni študij

SIZE ANALYSIS OF LIPID VESICLES AND THEIR DETERGENT-RESISTANT MEMBRANE FRACTIONS USING TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

GRADUATION THESIS University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na katedrah za biokemijo in zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 26.09.2005 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Kristina Sepčić, za somentorico prof. dr. Jasna Štrus in za recenzentko prof. dr. Damjana Drobne.

Mentorica: prof. dr. Kristina Sepčić Somentorica: prof. dr. Jasna Štrus Recenzentka: prof. dr. Damjana Drobne

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Ines Mandić Mulec
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Članica:	prof. dr. Kristina Sepčić
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica:	prof. dr. Jasna Štrus
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica:	prof. dr. Damjana Drobne
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Aljoša Žerjav

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 577.11:576.3:547.915(043)=863
- KG / lipidni vezikli / liposomi / modelne membrane / na detergent odporne membranske frakcije / lipidni rafti / transmisijska elektronska mikroskopija / TEM /
- AV ŽERJAV, Aljoša
- SA SEPČIĆ, Kristina (mentorica)/ ŠTRUS, Jasna (somentorica)/ DROBNE, Damjana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2007
- IN ANALIZA VELIKOSTI LIPIDNIH VEZIKLOV IN NJIHOVIH NA DETERGENT ODPORNIH MEMBRANSKIH FRAKCIJ S POMOČJO TRANSMISIJSKE ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE
- TD diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XII, 54 str., 3 pregl., 29 sl., 24 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V nalogi smo primerjali velikosti majhnih enomembranskih lipidnih veziklov oziroma liposomov v različnih fazah. Predvidevali smo, da so vezikli v urejeni tekoči fazi (vezikli iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola) večji od veziklov v neurejeni fazi (vezikli iz pamitoil-oleoil fosfatidilholina). Vezikle smo tudi obdelali z detergentom Triton X-100 in opazovali na detergent odporne membrane, ki se pojavljajo v veziklih v urejeni tekoči fazi. Za opazovanje veziklov smo uporabili tehniko dinamičnega sipanja svetlobe, ki nam poda velikosti struktur v raztopini. Vezikle smo nato preučevali z direktno metodo presevne elektronske mikroskopije, za katero je bila predhodno potrebna optimizacija. Rezultati so potrdili naše domneve, saj smo z obema metodama dokazali, da so vezikli v urejeni tekoči fazi večji. Ravno tako smo pod elektronskim mikroskopom opazovali na detergent odporne mebrane, ki so v obliki velikih plaht razpotegnjene na površini nosilca za elektronsko mikroskopijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dn
- DC UDC 577.11:576.3:547.915(043)=863
- CX / lipid vesicles / liposomes / model membranes / detergent-resistant membrane fractions / lipid rafts / transmition electron microscopy / TEM /
- AU ŽERJAV, Aljoša
- AA SEPČIĆ, Kristina (supervisor) / ŠTRUS, Jasna (co-advisor) / DROBNE, Damjana (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2007
- TI SIZE ANALYSIS OF LIPID VESICLES AND THEIR DETERGENT-RESISTANT MEMBRANE FRACTIONS USING TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XII, 54 p., 3 tab., 39 fig., 24 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In this work, we compared the dimensions of small unilamelar lipid vesicles or liposomes existing in different phases. We hypothesized that vesicles in the liquid-ordered phase (composed of an equimolar sphingomyelin-cholesterol mixture) will be larger than those in liquid-disordered phase (composed of palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine). Both preparations of vesicles were treated with Triton X-100 and the occurence of detergent-resistant membranes was further observed, Lipid vesicles were analysed using a dynamic light scattering technique, that gave us information on dimensions of particles in the solution. They were further observed by a direct method, transmission electron microscopy, that was previously optimized. The results confirmed our hypotheses, since liposomes in the liquid-ordered phase were found larger using both techniques. Finally, detergent-resistant membranes that occured in liposomes in the liquid ordered phase were observed microscopy sample holder.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	NAMENI IN HIPOTEZE:	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	LIPOSOMI	3
2.1	1.1 Različne metode za pripravo liposomov	6
2.1	1.2 Uporaba lipidnih veziklov	7
2.2	LIPIDNI RAFTI IN NA DETERGENT ODPORNE MEMBRANE	8
2.2	2.1 Načini za opazovanje lipidnih raftov in na detergent odpornih membran	10
2.3	TEHNIKE ZA OPAZOVANJE IN DOLOČANJE VELIKOSTI LIPOSOMOV.	10
3	MATERIALI IN METODE	12
3.1	MATERIALI	12
3.1	1.1 Kemikalije	12
3.1	1.2 Oprema	12
3.2	METODE	13
3.2	2.1 Priprava lipidnih veziklov	13
3	3.2.1.1 Sonikacija	13
3.2	2.2 Priprava na detergent odpornih membran	14
3.2	2.3 Merjenje velikosti veziklov z Zetasizerjem Malvern 3000	15
3	3.2.3.1 Zetasizer Malvern 3000	15
3	3.2.3.2 Postopek merjenja	15
3.2	2.4 Opazovanje veziklov s presevno elektronsko mikroskopijo (TEM)	15
3	3.2.4.1 Presevna elektronska mikroskopija (TEM)	15
3	3.2.4.2 Priprava lipidnih veziklov za presevno elektronsko mikroskopijo	16
4	REZULTATI	18
4.1	VELIKOSTI VEZIKLOV IZMERJENIH Z DINAMIČNIM SIPANJEM	
	SVETLOBE	18

4.1.1 Velikost veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola	a,
pripravljenih na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator	· Mk.2 z
različnimi pogoji soniciranja	
4.1.2 Velikosti veziklov z različno lipidno sestavo, pripravljenih na novem	
sonikatorju tipa Vibracell ultrasonic disintegrator z različnimi pogoji	
soniciranja	19
4.2 OPAZOVANJE VEZIKLOV Z ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM	20
4.2.1 Vezikli pripravljeni s sonikatorjem tipa MSE 150W ultrasonic disinte	egrator
Mk.2 in kontrastirani z uranil acetatom	20
4.2.1.1 Vezikli iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola	20
4.2.1.2 Vezikli iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina	24
4.2.1.3 Negativna kontrola (uranil acetat)	25
4.2.2 Vezikli pripravljeni s sonikatorjem tipa MSE 150W ultrasonic disinte	egrator
Mk.2 in kontrastirani s fosfovolframovo kislino	27
4.2.2.1 Vezikli iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola	27
4.2.2.2 Vezikli iz pamitoil-oleoil fosfatidilholina	
4.2.2.3 Negativna kontrola (fosfovolframova kislina)	
4.2.3 Vezikli pripravljeni z novim sonikatorjem tipa Vibracell ultrasonic	
disintegrator in kontrastirani z uranil acetatom	
4.2.3.1 Vezikli iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola	
4.2.3.2 Vezikli iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina	
4.2.3.3 Negativna kontrola (uranil acetat)	
4.2.4 Artefakti, ki jih lahko zamenjamo za lipidne vezikle	
4.3 OPAZOVANJE NA DETERGENT ODPORNIH MEMBRAN Z ELEKTR	ONSKIM
MIKROSKOPOM	
4.3.1 Velikosti na detergent odpornih membran, določene z Zetasizerjem N	1alvern42
4.3.2 Opazovanje na detergent odpornih membran z elektronskim mikrosk	copom42
4.3.2.1 Na detergent odporne membrane, pridobljene po ekstrakciji veziklov iz	
ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, z mrzlim detergente	om Triton
X-100	42
4.3.2.2 Na detergent odporne membrane, pridobljene po ekstrakciji veziklov iz	palmitiol-
oleoil fosfatidilholina z mrzlim detergentom Triton X-100	44
4.3.2.3 Negativna kontrola (mešanica deionizirane vode in detergenta Triton X-	-100)45
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	47

5.1	RAZPRAVA	-7
5.1.1	1 Sonikacija4	7
5.1.2	2 Opazovanje lipidnih veziklov s presevno elektronsko mikrosopijo4	8
5.1.3	3 Primerjava velikosti veziklov v tekoči urejeni fazi in tekoči neurejeni fazi4	8
5.1.4	4 Na detergent odporne membrane4	8
5.1.5	5 Nadaljnje delo4	9
5.2	SKLEPI	60
6	POVZETEK	51
7	VIRI	52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Velikost veziklov izmerjenih z Zetasizerjem Malvern. Vezikli so bili	
pridobljeni z različnimi metodami na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic	
disintegrator Mk21	8
Preglednica 2: Velikost veziklov izmerjenih z Zetasizerjem Malvern. Vezikli so bili	
pridobljeni z novim sonikatorjem tipa Vibracell ultrasonic disintegrator in z	
različnimi pogoji soniciranja1	9
Preglednica 3: Velikosti lipidnih struktur, pridobljenih po raztapljanju veziklov s Tritonom X-	-
1004	2

KAZALO SLIK

Slika I: Amfifilne molekule z eno verigo iz ogljikovodikov v vodnem okolju agregirajo v
micele. Amfifilne molekule z dvema verigama pa v vodnem okolju tvorijo lipidni
dvosloj (Lasič, 1997)3
Slika 2: Lipidni dvosloji se v vodnem okolju zaprejo v kroglaste strukture – vezikle (Lasič,
1997)
Slika 3: Sfingomielin; (2S,3R,4E)-2-acilaminooktadeka-4-en-3-hidroksi-1-fosfoholin oz.
ceramid-1-fosfoholin (Sfingomielin 2006) 5
Slika 4 [·] Holesterol (Holesterol 2006) 6
Slika 5: Pazlični načini s katerimi linosomi prenesajo svojo vsehino (Kamps in Schernhof
2003)
Slika 6: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola.
Razvidna je gruča veziklov na kateri zlahka opazimo veliko lamelarnost, ki je
označena s puščicami 21
Slika 7: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola
Bazvidno je gruže veziklov iz ekviniolarie mesance singometnia in noiesterola.
Slile 9. Elektroneli a caratele conilelese in electrone meženice ofin comieline in helectorele
Slika 8: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mesanice singomielina in noiesterola.
Razvidne so gruce veziklov
Slika 9: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina. Na sliki je
prikazana gruča veziklov na kateri opazimo veliko lamelarnost in zlivanje veziklov 24
Slika 10: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina. Na sliki je velika
gmota veziklov25
Slika 11: Elektronski posnetek v filtrirani deionizirani vodi raztopljenega kontrastirnega
sredstva (uranil acetat) brez dodatka veziklov (negativna kontrola). Na negativni
kontroli ne opazimo veziklov, temveč samo artefakte, ki jih je moč pripisati
kontrastirnemu sredstvu
Slika 12 [.] Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola
Vezikli so boli izraziti ker se je fosfovolframova kislina zadržala v veziklih
Slike 12: Elektroneki negnetek veziklev iz elevimelerne meženice afingemieline in helegterele
Sinka 15. Elektroniski posielek veziklov iz ekviniolarne mesance sinigoinienna in holesterola.
Prikazani so slabse vidni vezikli obdani s fosfovoliramovo kislino. Ti fezultati
oziroma slike so vedno ponovljivi, vendar so vezikli slabše vidni, kot če jih
kontrastiramo z uranil acetatom
Slika 14: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola.
Kontrastirno sredstvo se je zadržalo v veziklih

Slika 15: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina. Razvidna je gruča
veziklov, ki se močno zlivajo
Slika 16: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina. Razvidne so gruče
veziklov, ki se močno zlivajo
Slika 17: Elektronski posnetek v filtrirani deionizirani vodi raztopljenega kontrastirnega
sredstva (fosfovolframova kislina) brez dodatka veziklov (negativna kontrola). Na
negativni kontroli ne opazimo veziklov, temveč samo fosfovolframovo kislino32
Slika 18: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola.
Vezikli, ki se ne zlivajo, ustrezajo velikostnemu razredu 50nm
Slika 19: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola.
Še vedno je moč opaziti lamelarnost veziklov, ki pa je posledica sušenja preparata35
Slika 20: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola.
Na sliki je razvidno, da so vezikli, ki se ne zlivajo, reda velikosti 30 nm do 50 nm35
Slika 21: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina. Na sliki je
razvidno, da so vezikli manjši od 30 nm
Slika 22: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina. Prikazana je slika
roba velike gruče veziklov, kjer poteka močno zlivanje veziklov
Slika 23: Elektronski posnetek v filtrirani deionizirani vodi raztopljenega kontrastirnega
sredstva (uranil acetat) brez dodatka veziklov (negativna kontrola). Na negativni
kontroli ne opazimo veziklov, temveč samo artefakte, ki jih je moč pripisati
kontrastirnemu sredstvu
Slika 24: Elektronski posnetek v filtrirani deionizirani vodi raztopljenega kontrastirnega
sredstva (uranil acetat) brez dodatka veziklov (negativna kontrola). Uranil acetat
lahko v nekaterih primerih tvori strukture, podobne lipidnim veziklom40
Slika 25: Elektronski posnetek pufra brez lipidnih veziklov. Artefakti so posledica pufra, v
katerem so raztopljeni lipidni vezikli41
Slika 26: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola
obdelanih s Tritonom X-100. Na detergent odporne membrane so razporejene na
površini nosilca za elektronski mikroskop43
Slika 27: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola
obdelanih s Tritonom X-100. Na detergent odporne membrane so razporejene v obliki
velikih plaht44

Slika 28: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil fosfatidilholina obdelanih s	
Tritonom X-100. Triton je popolnoma raztopil vezikle iz palmitoil-oleoil	
fosfatidilholina	45
Slika 29: Elektronski posnetek deionizirane vode in Tritona X-100. Na negativni kontroli so	
razvidni samo artefakti	46

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFM	mikroskopija na atomsko silo				
DLS	dinamično sipanje svetlobe (dynamic light scattering)				
DNA	deoksiribonukleinska kislina				
DRM	v detergentih netopne membrane				
ELISA	encimsko- imunosorpcijski test (enzyme linked immunosorbent assay)				
EPR	elektronska paramagnetna resonanca				
FRET	fluorescentni resonančni energijski transfer				
GPI	glikozilfosfatidilinozitol				
GUV	enomembranske vezikle celičnih velikosti (giant unilamellar vesicles)				
L _d	neurejeno tekoče stanje mebrane				
Lo	urejeno tekoče stanje membrane				
LUV	veliki enomembranski vezikli (large unilamellar vesicles)				
MLV	večmembranski vezikli (multilamellar vesicles)				
NMR	jedrna magnetna resonanca				
POPC	palmitoil-oleoil-fosfatidilholin				
RNA	ribonukleinska kislina				
SM	sfingomielin				
So	urejeno trdno stanje mebrane				
SUV	majhni enomembranski vezikli (small unilamellar vesicles)				
TEM	presevna elektronska mikroskopija				
T _m	temperatura prehoda med urejenim trdnim in neurejenim tekočim stanjem				
	membrane				
ULV	enomembranski vezikli (unilamellar vesicles)				

1 UVOD

Tekoči mozaični model lipidne membrane, v kateri se proteini in lipidi prosto gibljejo (Singer in Nicolson, 1972), se je predvsem v zadnjih letih močno razvil. Raziskave so pokazale, da so določeni lipidi in membranski proteini povezani v membranske domene, ki povečajo njihovo fiziološko funkcijo (Jacobson in sod. 1995). Lipidne membrane lahko sestavljajo zelo različni lipidi. Ob mešanju se nekateri lipidi s podobnimi lastnostmi preprosto zmešajo, drugi pa se povežejo in ločijo od ostalih. Tako nastanejo lipidne domene (Vrljic in McConnell, 2003). Te domene so sestavljene iz točno določenih lipidov (sfingolipidi in holesterol), pogosta pa je tudi povezava z membranskimi proteini. Zaradi povezave proteina s takšno domeno so ti lipidi v membrani pogosto statični (Simons in Ikonen 1997).

Lipidne domene v tekoči urejeni fazi imenujemo tudi lipidni rafti in se pojavljajo tako v živih celicah, kot tudi v umetnih membranah, kot so liposomi. Urejanje lipidov vpliva na fizikalne lastnosti membrane. Tako je urejena tekoča faza trdnejša, oziroma bolj rigidna od neurejene tekoče faze. Zato je ukrivljenost membrane v urejeni tekoči fazi manjša in je liposom večji (Lasič, 1997). To smo poskušali v tej nalogi dokazati in sicer z direktnim opazovanjem liposomov v urejeni tekoči fazi in liposomov v neurejeni tekoči fazi. Z direktno metodo elektronske mikroskopije smo opazovali tudi strukture, ki nastanejo, ko membrane v urejeni tekoči fazi izpostavimo detergentu. Take strukture imenujemo na detergent odporne membrane.

1.1 NAMENI IN HIPOTEZE:

- liposomi v urejeni tekoči fazi so večji od liposmov v neurejeni tekoči fazi
- primerjati velikosti liposomov, pridobljenih z indirektno metodo dinamičnega sipanja svetlobe in direktno metodo elektronske mikroskopije
- izločiti artefakte, ki se pojavljajo pri elektronski mikroskopiji in izpopolniti metodo priprave liposomov za elektronsko mikroskopijo
- pri opazovanju na detergent odpornih membran z elektronskim mikroskopom bomo le te opazili samo v liposmih v urejeni tekoči fazi
- z elektronskim mikroskopom ugotoviti, v kakšni obliki in velikosti se pojavljajo na detergent odporne membrane

2 PREGLED OBJAV

2.1 LIPOSOMI

Liposomi so zaokroženi koloidni delci, sestavljeni iz amfifilnih molekul. Amfifilne molekule so sestavljene iz dveh delov z različno topnostjo v vodi: hidrofilnega dela, ki ga imenujemo tudi polarna glava in privlači vodo ter hidrofobnega dela, ki ga imenujemo nepolarni rep in odbija vodo. Zaradi teh lastnosti se takšne molekule v vodnem okolju povežejo v urejene strukture. Amfifilne molekule, ki imajo en nepolarni rep, tvorijo micele (npr. milo in detergenti). Molekule, ki imajo dva nepolarna repa, zaradi obsežnega repnega dela ne morejo tvoriti micelov in se povežejo v lipidni dvosloj, kjer polarna površina ščiti nepolarno sredino. Ker je hidrofobna sredica na robovih takih lamel še vedno izpostavljena vodi se te v nizkih koncentracijah zaprejo v zaključene kroglaste strukture – liposome (Lasič, 1997). Liposome lahko definiramo kot samozapirljive kroglaste delce, v katere ena ali več lipidnih membran ujame del topila v katerem so raztopljeni.



Slika 1: Amfifilne molekule z eno verigo iz ogljikovodikov v vodnem okolju agregirajo v micele. Amfifilne molekule z dvema verigama pa v vodnem okolju tvorijo lipidni dvosloj (Lasič, 1997)

Liposome delimo v več skupin na podlagi velikosti in števila membran. Tako ločimo večmembranske oziroma večlamelne vezikle (multilamellar vesicles – MLV) ter enomembranske vezikle (unilamellar vesicles – ULV). Večmembranski vezikli dosegajo velikosti od 100 do 4000 nm. Enomembranske vezikle delimo na :

- majhne enomembranske vezikle (small unilamellar vesicles SUV), ki dosegajo velikosti od 20 do 100 nm.
- velike enomembranske vezikle (large unilamellar vesicles LUV), ki dosegajo velikosti od 100 do 800 nm
- enomembranske vezikle celičnih velikosti (giant unilamellar vesicles GUV), ki presegajo velikosti 1 μm (Kristl in sod., 1992; Douilez in sod., 2003)



Slika 2: Lipidni dvosloji se v vodnem okolju zaprejo v kroglaste strukture - vezikle (Lasič, 1997).

Sestava lipidnega dvosloja je ključnega pomena za lastnosti veziklov. Vpliva na površinski naboj, sterične interakcije in rigidnost membrane. Rigidnost lipidnega dvosloja vpliva na samo ukrivljenost membrane, ki je manjša, če je lipidni dvosloj bolj trden (Lasič, 1997). Tako se vezikli iz različnih lipidov, ki jih pripravimo na enak način, ločijo po velikosti.

Rigidnost membrane opredelimo s prehodom membrane iz urejenega trdnega stanja (S_o) v neurejeno tekoče stanje (L_d) pri temperaturi prehoda (T_m). Temperatura T_m je odvisna od dolžine in nasičenosti ogljikovodikovih verig, iz katerih je sestavljen nepolarni rep amfifilnih lipidov. Polarna glava ima veliko manjši vpliv na T_m. Tako naprimer fosfatidiletanolaminska polarna glava rahlo poveča T_m v primerjavi s fosfatidilholinsko polarno glavo, ki je povezana z enako maščobnokislinsko verigo. Nabite skupine v polarni glavi pa povečini vrednost T_m zmanjšajo za nekaj stopinj (Lasič, 1997).

Če v lipidno membrano vključimo holesterol, se ob višanju njegove koncentracije zabrišejo fazni prehodi med urejeno in neurejeno fazo. Tako dobimo membrano brez faznega prehoda, ki jo imenujemo urejena tekoča faza (L_o). Lipidni dvosloji, ki vsebujejo holesterol, so tudi mehansko bolj povezani. Najmočnejšo povezavo s holesterolom dosežejo lipidi, ki imajo nasičeno C18 verigo ogljikovodikov. Membrane z mešanico takih lipidov in holesterola so tako najbolj rigidne (Lasič, 1997). Holesterol ima tudi kondenzirajoči učinek. To je fizikalni pojav, ki še ni popolnoma raziskan. Če namreč na površino vode nanesemo mešanico sfingomielina in holesterola, ta zasede manjšo površino, kot bi jo zasedla vsota obeh komponent nanesenih posamično (Lichtenberg in sod., 2005).



Slika 3: Sfingomielin; (2S,3R,4E)-2-acilaminooktadeka-4-en-3-hidroksi-1-fosfoholin oz. ceramid-1-fosfoholin (Sfingomielin ... , 2006)



Slika 4: Holesterol (Holesterol ... , 2006)

2.1.1 Različne metode za pripravo liposomov

Za pripravo liposomov so na voljo tri glavne metode, ki se med seboj ločijo po težavnosti priprave, homogenosti lipidnih veziklov, količini vloženega časa za pripravo ter možnosti pridobivanja večjih količin lipidnih veziklov (Lasch in sod., 2003).

- Priprava veziklov s hidratacijo in sonikacija. Pri tej metodi lipide najprej raztopimo v organskem topilu, da zagotovimo optimalno mešanje. Nato topilo z evaporacijo odstranimo in vnesemo polarni medij npr. vodo ali pufer in z mešanjem sprožimo tvorbo večmembranskih veziklov. Te nato s sonikacijo pretvorimo v enomembranske vezikle. Metoda je lahka za uporabo, vendar ni primerna za pripravo večje količine lipidnih veziklov. Ravno tako se pogosto zgodi, da so vezikli različnih velikosti in populacija ni homogena (Lasič, 1997; Lasch in sod., 2003).
- Priprava veziklov s filtri. Pri tej metodi večmembranske vezikle potiskamo skozi filter z različno velikimi porami. Najprej je treba vezikle filtrirati skozi pore velikosti 1 µm. Nato jih petkrat potisnemo skozi filter s porami 0,4 µm in 0,2 µm. Temu sledi desetkratno filtriranje s filtrom, ki ima velikost por 100 nm. Tako dobimo velike enomembranske vezikle. Če želimo s to metodo pridobiti majhne enomembranske vezikle, moramo postopek nadaljevati s filtri, ki imajo velikosti por med 50 nm in 80 nm. Vezikle lahko potisnemo skozi samo en filter s končno velikostjo por, vendar je

pred tem potrebno večkratno zamrzovanje in odtaljevanje večmembranskih veziklov, s katerim dosežemo njihovo razslojevanje. Če uporabljamo filtre s še manjšimi porami (30 nm in manj), ne pridobimo manjših veziklov temveč večje, saj imajo membrane tako pridobljenih veziklov preveliko ukrivljenost in so podvržene zlivanju. Prednost te metode je velika homogenost veziklov. Metodo je možno uporabiti tudi za pripravo večjih količin veziklov. Slaba stran metode je zahtevnost in čas priprave veziklov (Lasič, 1997; Lasch in sod., 2003).

Priprava veziklov s homogenizacijo. Pri tej metodi mešanico večmembranskih liposomov potisnemo skozi majhno luknjo v oviro, ki je lahko kroglica ali vrh piramide. Mikrotekočinski sistem curek tekočine razdeli na dva dela, ki nato trčita s pritiskom 20.000 psi. Prednost te metode je hitrost priprave, enostavnost ter možnost pridobivanja velikih količin veziklov. Slabo stran pa predstavlja kontaminacija s prevelikimi ali premajhnimi vezikli (Lasič, 1997; Lasch in sod., 2003).

2.1.2 Uporaba lipidnih veziklov

Liposomi se lahko uporabljajo v različne industrijske in laboratorijske namene ter v medicini. Najbolj znana je uporaba v kozmetični industriji, kjer liposomi služijo kot prenašalci hidrofilnih ali hidrofobnih snovi. Zaradi njihovih koloidnih lastnosti jih uporabljajo tudi v agrokulturi. Uporabni so tudi v ekologiji, živilski industriji in diagnostiki. Primer take uporabe je test ELISA (encimsko- imunosorpcijski test), kjer en ligand nosi eno markersko molekulo. Če pa uporabimo liposome za nosilce markerskih molekul, ojačamo signal (Lasič, 1997). Liposome uporabljajo tudi v medicini, predvsem kot nosilce za zdravila, saj so biokompatibilni, razgradljivi in ne povzročajo burnega imunskega odziva. Zdravila, ki jih nosijo, tako ne potujejo prosto po telesu. S tem zagotovimo manjšo toksičnost zdravil. V teku so tudi raziskave, za točkovno delovanje takih liposomov na obolelo mesto v telesu s pomočjo signalnih molekul, ki se jih vgradi v membrano. Mnoga zdravila, ki delujejo na tak način, so sedaj že v klinični razvojni fazi. Liposomi so uporabni tudi za vakciniranje. Primer take

uporabe je cepivo za hepatitis, ki je v uporabi od leta 1994. Še ena pomembna uporaba liposomov je vnos DNA (deoksiribonukleinska kislina) v celice, pri kateri liposomi služijo kot nosilec DNA oziroma RNA (ribonukleinska kislina) molekul, ki jih ujamemo v liposome. V te namene se uporabljajo pozitivno nabiti liposomi, ki vežejo in ščitijo molekule DNA (Lasič, 1997).



Slika 5: Različni načini s katerimi liposomi prenesejo svojo vsebino v celico. 1. Adsorbcija liposoma na celično površino, ki ji sledi sprostitev vsebine liposoma in prehod skozi membrano s pomočjo aktivnega ali pasivnega transporta. 2. Adsorbcija liposoma, ki ji sledi selektivni transport lipofilne vsebine v celico. 3. Endocitoza liposoma, ki ji sledi fagocitoza in posledično sprostitev vsebine liposoma. 4. Zlitje membrane liposoma z membrano celice ali membrano endosoma (znotrajcelična fuzija) in sprostitev vsebine. (Kamps in Scherphof, 2003)

2.2 LIPIDNI RAFTI IN NA DETERGENT ODPORNE MEMBRANE

Lipidni rafti so metastabilne membranske mikrodomene, sestavljene iz sfingolipidov in holesterola. V njih lahko najdemo tudi glicerofosfolipide, proteine GPI (glikozilfosfatidilinozitol), ki so vezani na nasičene lipide ter redke transmembranske proteine (Edidin, 2003). Vlogo lipidnih raftov še vedno preučujejo, vendar raziskave kažejo, da so povezani s prenosom signalov, razvrščanjem lipidov in proteinov, transportom holesterola, eksocitozo in endocitozo (London, 2002; Edidin, 2003). Razlogi za slabo raziskanost lipidnih raftov so posledica njihove majhnosti in dinamične organizacije. Velikost raftov ocenjujejo na skupek petnajstih do dvajsetih molekul sfingolipida in holesterola, obstojnost pa ocenjujejo na 30 ms. Vendar pa so raziskave pokazale, da zasedajo veliko površino membrane (Subczynski in Kusumi, 2003). Če se na lipidni raft poveže protein GPI oziroma receptor ali transmembranski protein, se lipidne mikrodomene med seboj povežejo in oligomerizirajo. Na ta način nastanejo stabilni receptorski rafti (core receptor rafts) z življensko dobo daljšo od 1 minute. Ti difundirajo naokrog in inducirajo tvorbo večjih prehodnih raftov (transient confinement zone – TCZ). Njihovo življenjsko dobo ocenjujejo na manj kot 1 sekundo. Taki so signalni rafti. Regulacijo raftov v celici pripisujejo proteinom (Subczynski in Kusumi, 2003; Anderson in Jacobson, 2002).

Obdelava membrane z neionskimi detergenti, je bila tudi pogosta metoda za preučevanje in izolacijo lipidnih raftov, zato so pri dosedanjem raziskovanju lipidnih mikrodomen pogosto izenačevali lipidne rafte z v detergentih netopnimi membranami (DRM). Obe strukturi sta prisotni v tekoči urejeni fazi in sta podobnih sestav (holesterol in sfingolipidi). Vendar zadnje raziskave nakazujejo, da ju kljub tesnemu odnosu, ne smemo preprosto enačiti (Lichtenberg in sod., 2005). DRM so rezultat nepopolne topnosti membrane v detergentih in v takem stanju obstajajo le po obdelavi z detergentom. Odpornost na topnost v detergentu pa je lahko tudi posledica termodinamskih ali kinetičnih faktorjev (Lichtenberg in sod., 2005). Rafte po drugi strani definiramo kot prehodne, dinamične in nestabilne mebranske mikrodomene, ki se pojavljajo v *in vivo* pogojih. Njihov obstoj je neodvisen od uporabe detergentov, njihova odpornost na raztapljanje v detergentih pa še ni dokazana (Lichtenberg in sod., 2005).

2.2.1 Načini za opazovanje lipidnih raftov in na detergent odpornih membran

Za opazovanje membranskih mikrodomen uporabljajo zelo različne metode (Rivas in Genarro, 2003):

- kalorimetrične metode: izotermalna titracija, diferencialno skeniranje, perturbacije pritiska;
- mikroskopske metode: mikroskopija na atomsko silo (AFM), opazovanje z elektronskim mikroskopom, fluorescentna mikroskopija;
- druge fluorescentne metode: gašenje oziroma metoda FRET (fluorescentni resonančni energijski transfer);
- spektroskopske metode: elektronska paramagnetna resonanca (EPR), NMR oziroma jedrna magnetna resonanca;
- metode pri katerih uporabljamo molekule, ki se specifično vežejo na lipidne rafte.
 Primer je B-podenota koleratoksina, ki se veže na gangliozide GM1, ki so obogateni v
 lipidnih raftih (Bacia in sod., 2004). Raziskave potekajo tudi na proteinu ostreolizinu.
 Ta protein se specifično veže na membranske domene bogate s sfingomielinom n
 holesterolom ter tvori pore v membrani (Sepčić in sod., 2004)

2.3 TEHNIKE ZA OPAZOVANJE IN DOLOČANJE VELIKOSTI LIPOSOMOV

Liposome lahko opazujemo z direktnimi in indirektnimi metodami. Indirektni metodi za opazovanje velikosti sta dinamično sipanje svetlobe ter gelska kromatografija. Z obema metodama lahko pridobimo zelo natančne podatke o velikosti, vendar pa na tak način ne moremo zaznati lamelarnosti liposomov. V ta namen uporabljamo NMR spektroskopijo ali pa direktne metode za opazovanje. Te temeljijo predvsem na različnih tehnikah elektronske mikroskopije. Vezikle tako lahko opazujemo s presevno elektronsko mikroskopijo, pri kateri lahko liposome negativno kontrastiramo, ali pa s tehniko lomljenja z zamrzovanjem (freeze-fracturing). Pri obeh tehnikah se pojavljajo problemi z artefakti in spremembo lipidnih veziklov pri sušenju preparata. Najučinkovitejša direktna metoda pa je elektronska

mikroskopija z zamrzovanjem (cryoelectron microscopy), pri kateri vezikle na hitro zamrznemo in opazujemo brez dodatnega barvila. Pri tej metodi tako dobimo najbolj verodostojne podatke, saj na vezikle minimalno vplivamo (Lasič, 1997). Vzorec za elektronsko mikroskopijo z zamrzovanjem nanesemo v tankem sloju na nosilec prevlečen z ogljikovo plastjo. Nato nosilec z vzorcem potopimo v hladilno sredstvo (npr. tekoči etan). Tako pridobimo zamrznjen vzorec brez kristalov ledu. Za občutljivejše vzorce, med katere spadajo tudi liposomi, moramo med pripravo vzorca preprečiti izhlapevanje vode iz tankega sloja vzorca na nosilcu. To dosežemo tako, da vzorce pripravljamo v okolju v katerem nadzorujemo temperaturo in relativno vlago. Zamrznjene vzorce nato opazujemo s presevnim elektronskim mikroskopom, ki podpira elektronsko mikroskopijo z zamrzovanjem (Frederik in Sommerdijk, 2005).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

- Sfingomielin iz svinjskih možgan (Avanti Polar Lipids, ZDA)
- Holesterol iz ovčjega loja (Avanti Polar Lipids, ZDA)
- Palmitoil-oleoil-fosfatidilholin (Avanti Polar Lipids, ZDA)
- Bidestilirana voda (dd H₂O)
- Etanol (Merck, Nemčija)
- EDTA (Kemika, Hrvaška)
- Tris (Merck, Nemčija)
- NaCl (Merck, Nemčija)
- 2% nasičen uranil acetat
- 1% fosfovolframova kislina
- Kloroform (Merck, Nemčija)
- Triton X-100 (Sigma, ZDA)
- Tris pufer za vezikle (140 mM NaCl; 20 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0)

3.1.2 Oprema

- sonikator (Vibracell Ultrasonic Disintegrator, Sonics and Materials, ZDA)
- sonikator (MSE 150W Ultasonic Disintegrator Mk 2, MSE Scientific instruments, Anglija)
- presevni elektronski mikroskop Philips CM 100 (FEI, Nizozemska)
- digitalna kamera Gatan Bio Scan Camera Model 792 (Gatan Inc., ZDA)
- programska oprema Digital Micrograph 3.31 (Gatan Inc., ZDA)
- rotavapor in vodna kopel B-480 (Büchi, Švica)
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Slovenija)

- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- Zetasizer Malvern 3000 (Malvern, ZDA)

3.2 METODE

3.2.1 Priprava lipidnih veziklov

Komercialne lipide v prahu, z znanimi molekulskimi masami (holesterol, palmitoil-oleoilfosfatidilholin), smo raztopili v kloroformu ali v kloroformu z dodatkom minimalne količine etanola (sfingomielin) v koncentracijah 50 mg/ml oziroma 25 mg/ml. Ustrezne količine lipidov, ki so bili raztopljeni v kloroformu, smo posušili v bučki pri znižanem tlaku z vodno vakumsko črpalko ali rotavaporjem. Na stenah bučke se je nabral tanek lipidni sloj. V bučko smo nato dodali 1 ml deionizirane vode, filtrirane skozi 0.22 µm membranski filter, in 10-20 steklenih kroglic. Te so z mešanjem na stresalniku mehansko odstranile lipidni sloj in lipidi so se v vodi zaradi hidrofobnosti zaprli v večmembranske (multilamelarne) vezikle. Večmembranske vezikle smo nato obdelali s sonikatorjem.

3.2.1.1 Sonikacija

Sonikator deluje tako, da pretvarja električno napetost standardne frekvence 50/60 Hz v visokofrekvenčno napetost ter jo nato s pretvornikom spreminja v mehanske vibracije. Te dosežejo največjo moč na konici sonde, ki je potopljena v vzorec. Vibracije v tekočini ustvarijo mikroskopske mehurčke, ki se razširjajo ob negativnem pritisku in močno implodirajo ob pozitivnem pritisku. Ta pojav povzroči udarne valove v tekočini, stranski produkt je povišan pritisk in temperatura. Udarni valovi omogočijo vnos velike količine energije v tekočino. Ključni pomen ima tudi oblika sonde. Večji kot je vrh sonde, večje volumne vzorca lahko obdelamo, vendar na račun manjše intenzitete.

Na našem sonikatorju tipa Vibracell ultrasonic disintegrator lahko določamo tudi amplitudo vibracij. Ta je izražena v procentih od 0 do 100. Večja kot je amplituda, več energije bomo

vnesli v vzorec. Procesor v sonikatorju nadzoruje vnos energije v vzorec na podlagi upora, ki ga ta predstavlja sondi. Ta je namreč odvisen od viskoznosti vzorca, tipa sonde in globine na katero potopimo sondo. To je tudi razlog, da je amplituda izražena v procentih (High intensity ..., 2004).

Z našo metodo s soniciranjem povzročimo nastajanje enomembranskih (unilamelarnih) veziklov. Za ta proces je potrebna velika energija. Če sonikator dovede premalo energije v vzorec, dobimo zelo nehomogeno populacijo veziklov, ki jih sestavljajo eno- in večmembranski vezikli. Zaradi segrevanja vzorca moramo vezikle sonicirati s pulzi in jih hladiti z ledom.

V nalogi smo uporabili dva tipa sonikatorjev: Vibracell ultrasonic disintegrator ter MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 in pri tem spreminjali moč, amplitudo in trajanje sonikacije. Za optimalno se je izkazala metoda, pri kateri smo 1 ml veziklov soniciali 30 minut.pri amplitudi 50%. Soniciranje je potekalo z 10 sekundnimi pulzi. Ependorfova epruveta z vezikli je bila ves čas soniciranja potopljena v čašo z ledeno vodo. Po sonikaciji smo vezikle potopili za 45 minut v vodno kopel s temperaturo 40 °C. Ependorfovo epruveto smo nato prenesli v centrifugo (20 minut, 13000 rpm, 25 °C). Po centrifugiranju smo supernatant prenesli v čisto Ependorfovo epruveto, jo prepihali z dušikom in do uporabe zamrznili. Preden smo vzorec uporabili za nadaljnje analize, smo ga še enkrat sonicirali 10 min pri istih pogojih.

3.2.2 Priprava na detergent odpornih membran

V čisto Ependorfovo epruveto smo dodali 0,5 ml enomembranskih veziklov. Vzorcu smo nato dodali 25 µl 10% neionskega detergenta Triton X-100. Rahlo smo premešali, tako da smo petkrat obrnili Ependorfovo epruveto. Vzorec smo nato 30 minut inkubirali pri 4 °C. Pred nadaljnjo obdelavo oziroma preučevanjem smo vzorec hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.3 Merjenje velikosti veziklov z Zetasizerjem Malvern 3000

3.2.3.1 Zetasizer Malvern 3000

Zetasizer Malvern 3000 uporablja princip dinamičnega sipanja svetlobe (DLS – dynamic light scattering) oziroma fotonske korelacijske spektroskopije (PCS – photon correlation spectroscopy) za merjenje velikosti delcev v raztopini. DLS spada med neinvazivne tehnike. Delci v raztopini so podvrženi Brownovemu gibanju. Ko jih osvetlimo z laserjem, se svetloba razprši. Intenziteta razpršene svetlobe, ki jo detektiramo pod različnimi koti, se spreminja glede na difuzijsko hitrost delcev v raztopini. Ta pa je odvisna od velikosti delcev. Velikost delcev tako določimo iz analize sprememb v intenziteti razpršene svetlobe. Naprava Zetasizer Malvern 3000 uporablja patentirano različico metode DLS. Ta metoda, ki se imenuje NIBS (noninvasive backscatter technology), izboljša detekcijo delcev in poveča razpon koncentracije delcev, ki jo lahko merimo (Kaszuba in sod., 2004).

3.2.3.2 Postopek merjenja

V plastično kiveto smo prenesli 1,5 ml veziklov, raztopljenih v deionizirani vodi s koncentracijo 0,5 mg/ml. Kiveto smo vstavili v Zetasizer Malvern 3000. V napravi vzorec pomerimo 300 krat in obdelamo podatke s statističnim programom. Tako dobimo povprečno velikost delcev v vzorcu, relativno napako in porazdelitveni graf. Naprava zazna tudi več skupin različno velikih delcev in jih pravilno porazdeli.

3.2.4 Opazovanje veziklov s presevno elektronsko mikroskopijo (TEM)

3.2.4.1 Presevna elektronska mikroskopija (TEM)

S presevnim ali transmisijskim elektronskim mikroskopom s pomočjo elektronov obsevamo zelo tanke rezine preparata, vklopljenega v smolo ali suspenzije kontrastiranih delcev, ki smo jih nanesli na kovinsko mrežico. Presevni elektronski mikroskop je analogen presevnemu

svetlobnemu mikroskopu. Slika nastane zaradi različnega sipanja elektronov na atomih z različnimi atomskimi števili, ki se nahajajo na različnih mestih v preparatu. Z njim lahko dosegamo veliko večje ločljivosti kot pri svetlobnem mikroskopu. Tako povečave z elektronskim mikroskopom lahko dosegajo tudi 500.000x vrednosti (Dykstra, 1992).

Vir elektronov je kovinski filament ali katoda, ki pod električnim tokom oddaja elektrone (valovna dolžina elektronov je 0,005 nm). Visoka napetost, ki obstaja med anodo in katodo (40–120 kV), pospeši snop elektronov skozi odprtino v anodi. Pot gibanja elektronov usmerjajo elektromagnetna polja. Celoten snop elektronov mora potovati v vakuumu, saj bi molekule zraka ustavile elektrone.

Analogno funkcijo steklenih leč v elektronskem mikroskopu predstavljajo elektromagnetne leče, ki usmerjajo tok elektronov. Kondenzor zbere snop elektronov na preparatu, objektiv poveča sliko predmeta, projektiv, ki je analog okularju, pa projicira sliko na fluorescentni zaslon ali fotografski film (Dykstra, 1992).

V diplomski nalogi smo uporabljali elektronski mikroskop Philips CM 100. Slike smo posneli s kamero Gatan – Bio Scan Camera Model 792. Za obdelavo slik smo uporabljali računalniški program Digital Micrograph 3.31 proizvajalca Gatan Inc. iz ZDA.

3.2.4.2 Priprava lipidnih veziklov za presevno elektronsko mikroskopijo

Priprava lipidnih veziklov je temeljila predvsem na ustreznem kontrastiranju. Ker je težko doseči učinkovito vezavo kontrastirnega sredstva na lipidni dvosloj, smo uporabili tehniko negativnega kontrastiranja. Pri tej tehniki za razliko od pozitivnega kontrastiranja, opazovane strukture ali delce obdamo s težkimi kovinami, same strukture pa ostanejo presojne za elektronski snop. Tako ni potrebno, da se kontrastirno sredstvo kemijsko veže na opazovani objekt. Za negativno kontrastiranje se najpogostoje uporablja fosfovolframovo kislina, amonijev molibdat ter uranil acetat. Pri kontrastiranju s slednjim lahko v nekaterih primerih v

vzorcu opazimo hkrati negativno in pozitvno kontrastiranje. Negativno kontrastiranje se uporablja za opazovanje makromulekul, površinskih celičnih struktur, celičnih organelov in virusov (Dykstra, 1992).

3.2.4.2.1 Negativno kontrastiranje z uranilacetatom

V čisto Ependorfovo epruveto smo prenesli 35 µl lipidov, raztopljenih v deionizirani vodi s koncentracijo 0,5 mg/ml. Lipidom smo dodali 5 µl 2% uranilacetata (pH 7), ki služi kot kontrastirno sredstvo. Vzorec smo premešali z nastavkom za pipeto in pustili kontrastirati 1 minuto. Nato smo na bakreni nosilec za elektronsko mikroskopijo, ki je prevlečen s plastjo ogljika, nanesli 6 µl kontrastiranega vzorca. Odvečno količino vzroca smo odpivnali z nosilca s pomočjo filtrirnega papirja. Ko se je kapljica posušila, je bil vzorec pripravljen za opazovanje.

3.2.4.2.2 Negativno kontrastiranje s fosfovolframovo kislino

V čisto Ependorfovo epruveto smo prenesli 100 μ l lipidov raztopljenih v deionizirani vodi s koncentracijo 5 mg/ml in dodali 100 μ l 1% fosfovolframove kisline (1/1). Vzorec smo sonicirali 3 minute. Sonikacija povzroči kratkotrajno odprtje veziklov in izenačenje koncentracije kontrastirnega sredstva v veziklih in v okolici. Nato smo vzorec desetkrat razredčili. Tako smo dobili desetkrat višjo koncentracijo kontrastirnega sredstva v veziklih kot v okolici. Na bakreni nosilec za elektronsko mikroskopijo, ki je prevlečen z plastjo ogljika, smo nanesli 6 μ l kontrastiranega vzorca. Odvečno količino vzroca smo odpivnali z nosilca s pomočjo filtrirnega papirja. Ko se je kapljica posušila, je bil vzorec pripravljen za opazovanje.

4 REZULTATI

4.1 VELIKOSTI VEZIKLOV IZMERJENIH Z DINAMIČNIM SIPANJEM SVETLOBE

4.1.1 Velikost veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, pripravljenih na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 z različnimi pogoji soniciranja

Pred kratkim so na katedri za biokemijo Oddelka za biologijo opazili, da s pripravo enomembranskih veziklov po standardni metodi (30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in močjo 6 μ), dobijo prevelike vezikle. Mali enomembranski vezikli bi, glede na podatke iz literature, morali imeti velikost 30-40 nm, medtem ko so velikosti veziklov, pripravljenih s sonikatorjem tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator, vedno presegale 100 ali pa celo 200 nm. Velikost veziklov smo poskušali zmanjšati tako, da smo poizkusili z novimi postopki priprave veziklov. Ti so vključevali zamrzovanje in odtaljevanje vzorca ter povečevanje moči in tudi zamrzovanje in odtaljevanje pripomorejo k nastanku manjših veziklov, vendar rezultati še vedno ne izpolnjujejo pričakovanega velikostnega razreda 30 nm velikih veziklov.

ČAS SONIKACIJE, ENERGIJA TER ZAMRZOVANJE VEZIKLOV	Premer veziklov,
	sestavljenih iz SM/CHOL
	(1:1, mol/mol)
30 min, 10 s pulzi, 6 µ (standardna metoda)	287 nm +/- 73 nm
30 min, 10 s pulzi, 12 µ	160 nm +/- 51 nm
30 min, 10 s pulzi, 6 μ , 10x zamrzovanje in odtaljevanje vzorca	159 nm +/- 86 nm

30 min, 10 s pulzi, 12 μ , 10x zamrzovanje in odtaljevanje vzorca

179 nm +/- 45 nm

Preglednica 1: Velikost veziklov izmerjenih z Zetasizerjem Malvern. Vezikli so bili pridobljeni z različnimi metodami na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk2.

4.1.2 Velikosti veziklov z različno lipidno sestavo, pripravljenih na novem sonikatorju tipa Vibracell ultrasonic disintegrator z različnimi pogoji soniciranja

V preglednici 2 so prikazane velikosti lipidnih veziklov obdelanih z novim sonikatorjem tipa Vibracell ultrasonic disintegrator. Novi sonikator smo umerili z različnimi močmi in trajanjem soniciranja. Upoštevali smo tudi, da je bilo v Ependorfovi epruveti vedno 1 ml vzorca ter, da je bila sonda sonikatorja potopljena do 2/3 vzorca. Iz preglednice 2 je tako razvidno, da je optimalni čas soniciranja 30 minut in da mora biti sonikator nastavljen na 50% moči delovanja. Na ta način dobimo zelo enakomerno populacijo veziklov. Velikost veziklov je bila pod 100 nm in tako smo se približali velikosti, ki je navedena v literaturi. Opazili smo tudi, da je pri višji moči, času in amplitudi soniciranja velikost veziklov sestavljenih iz POPC, približno dvakrat manjša od velikosti veziklov, sestavljenih iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in hoesterola.

ČAS IN AMPLITUDA	SM/CHOL (1:1)	POPC
SONIKACIJE	(premer veziklov)	(premer veziklov)
60 min,10 s pulzi, 40%	57 nm +/- 29 nm	64 nm +/- 4 nm
30 min,10 s pulzi, 40%	97 nm +/- 52 nm	52 nm +/- 41 nm
30 min,10 s pulzi, 50%	52 nm +/- 6 nm	25 nm +/- 6 nm
60 min,10 s pulzi, 50%	155 nm +/- 35 nm	66 nm +/- 41 nm

Preglednica 2: Velikost veziklov izmerjenih z Zetasizerjem Malvern. Vezikli so bili pridobljeni z novim sonikatorjem tipa Vibracell ultrasonic disintegrator in z različnimi pogoji soniciranja.

4.2 OPAZOVANJE VEZIKLOV Z ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM

4.2.1 Vezikli pripravljeni s sonikatorjem tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 in kontrastirani z uranil acetatom

4.2.1.1 Vezikli iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola

Na slikah 6-8 so prikazani vezikli pri treh različnih povečavah. Jasno je razvidno, da se lipidni vezikli nahajajo v gručah. To je predvsem posledica sušenja preparata, kar je del postopka priprav vzorca za elektronsko mikroskopijo. V gručah poteka tudi zlivanje veziklov. Iz slik je ravno tako lepo razviden še en vzrok za opažene prevelike velikosti veziklov, ki smo jih izmerili z Zetasizerjem. To so večmembranski vezikli, ki bi namreč po sonikaciji morali biti enomembranski.



Slika 6: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, pripravljenih s standardno metodo (30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in močjo 6 μ) na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 in kontrastiranih z uranil acetatom. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,5 mg/ml. Povečava mikroskopa: 92000x. Razvidna je gruča veziklov na kateri zlahka opazimo veliko lamelarnost, ki je označena s puščicami.



Slika 7: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, pripravljenih s standardno metodo (30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in močjo 6 μ) na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 in kontrastiranih z uranil acetatom. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,5 mg/ml. Povečava mikroskopa: 46000x. Razvidna je gruča veziklov in zlivanje veziklov.



Slika 8: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, pripravljenih s standardno metodo (30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in močjo 6 μ) na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 in kontrastiranih z uranil acetatom. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,5 mg/ml. Povečava mikroskopa: 10500x. Razvidne so gruče veziklov.

4.2.1.2 Vezikli iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina

Na slikah 9 in 10, ki prikazujeta vezikle iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina, opazimo še večje grmadenje veziklov kot pri veziklih iz sfingomielina ter holesterola. Vezikli so ravno tako večmembranski.



Slika 9: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina, pripravljenih s standardno metodo (30minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in močjo 6 μ) na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 in kontrastiranih z uranil acetatom. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,25 mg/ml. Povečava mikroskopa: 92000x. Na sliki je prikazana gruča veziklov na kateri opazimo veliko lamelarnost in zlivanje veziklov.



Slika 10: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina, pripravljenih s standardno metodo (30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in močjo 6 μ) na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2, in kontrastiranih z uranil acetatom. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,25 mg/ml. Povečava mikroskopa: 46000x. Na sliki je velika gmota veziklov.

4.2.1.3 Negativna kontrola (uranil acetat)

Negativna kontrola, pri kateri smo z elektronsko mikroskopijo opazovali v vodi raztopljeno kontrastirno sredstvo brez dodatka veziklov potrjuje, da so opazovani vzorci barvani z uranilacetatom res lipidni vezikli in ne artefakti, ki se pogosto pojavljajo pri opazovanju lipidnih struktur.



Slika 11: Elektronski posnetek v filtrirani deionizirani vodi raztopljenega kontrastirnega sredstva (uranil acetat) brez dodatka veziklov (negativna kontrola), pripravljenega s standardno metodo (30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in močjo 6 μ) na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2. Povečava mikroskopa: 13500x. Na negativni kontroli ne opazimo veziklov, temveč samo artefakte, ki jih je moč pripisati kontrastirnemu sredstvu.

4.2.2 Vezikli pripravljeni s sonikatorjem tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 in kontrastirani s fosfovolframovo kislino

4.2.2.1 Vezikli iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola

Za kontrastiranje vzorcev s fosfovolframovo kislino smo uporabili drugačno metodo priprave vzorcev za TEM, pri kateri smo vezikle soncirali skupaj s kontrastirnim sredstvom. Pokazalo se je, da z to metodo v nekaterih primerih dobimo boljšo slikovno detekcijo veziklov, vendar je težje ponovljiva. Vezikle, kot so na sliki 12, je moč opazovati le pri približno vsakem tretjem vzorcu. V teh primerih se kontrastirno sredstvo zadrži v veziklih in tako omogoči boljše opazovanje. V drugih primerih se kontrastirno sredstvo izlije iz veziklov in jih obda (Sliki 13 in 14). Metodo bi bilo treba še izpopolniti. Posnetki veziklov potrjujejo naše predhodne rezultate dela z uranil acetatom, kjer smo dobili večmembranske in zato tudi večje vezikle



Slika 12: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, pripravljenih s standardno metodo (30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in močjo 6 μ) na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 in kontrastiranih s fosfovolframovo kislino. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,5 mg/ml. Povečava mikroskopa: 130000x. Vezikli so bolj izraziti, ker se je fosfovolframova kislina zadržala v veziklih, puščice označujejo multilamelarnost veziklov.



Slika 13: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, pripravljenih s standardno metodo (30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in močjo 6 μ) na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 in kontrastiranih s fosfovolframovo kislino. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,5 mg/ml. Povečava mikroskopa: 46000x (a) in 19000x (b) . Prikazani so slabše vidni vezikli obdani z fosfovolframovo kislino.



Slika 14: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, pripravljenih s standardno metodo (30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in močjo 6 μ) na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 in kontrastiranih s fosfovolframovo kislino. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,5 mg/ml. Povečava mikroskopa: 92000x (a) in 46000x (b). Na sliki opazimo skupek lepše vidnih veziklov. Kontrastirno sredstvo se je zadržalo v veziklih.

4.2.2.2 Vezikli iz pamitoil-oleoil fosfatidilholina

Pri veziklih iz POPC-ja opazimo večje zlivanje kot pri veziklih iz sfingomielina ter holesterola (Sliki 15 in 16). Primerov, pri katerih kontrastirno sredstvo ostane v veziklih, nismo opazili.



Slika 15: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina, pripravljenih s standardno metodo (30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in močjo 6 μ) na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 in kontrastiranih s fosfovolframovo kislino. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,25 mg/ml. Povečava mikroskopa: 46000x. Razvidna je gruča veziklov, ki se močno zlivajo.



Slika 16: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina, pripravljenih s standardno metodo (30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in močjo 6 μ) na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 in kontrastiranih s fosfovolframovo kislino. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,25 mg/ml. Povečava mikroskopa: 46000x. Razvidne so gruče veziklov, ki se močno zlivajo.

4.2.2.3 Negativna kontrola (fosfovolframova kislina)

Negativna kontrola, pri kateri smo z elektronsko mikroskopijo opazovali v vodi raztopljeno kontrastirno sredstvo brez dodatka veziklov potrjuje, da so opazovani sivi vzorci barvani s fosfovolframovo kislino res lipidni vezikli in ne artefakti, ki se pogosto pojavljajo pri opazovanju lipidnih struktur (Slika 17).



Slika 17: Elektronski posnetek v filtrirani deionizirani vodi raztopljenega kontrastirnega sredstva (fosfovolframova kislina) brez dodatka veziklov (negativna kontrola), pripravljenega s standardno metodo (30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in močjo 6μ) na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2. Povečava mikroskopa: 25000x. Na negativni kontroli ne opazimo veziklov, temveč samo fosfovolframovo kislino.

4.2.3 Vezikli pripravljeni z novim sonikatorjem tipa Vibracell ultrasonic disintegrator in kontrastirani z uranil acetatom

4.2.3.1 Vezikli iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola

Vezikli, ki so bili pripravljeni z novim sonikatorjem tipa Vibracell ultrasonic disintegrator so tudi na slikah občutno manjši in ustrezajo velikostim, ki smo jih dobili z meritvami na Zetasizerju. Še vedno pa je ponekod moč opaziti zlivanje veziklov ter posledično večmembranske vezikle (Slike 18-19). Glede na to, da so podatki o velikosti veziklov prikazovali zelo enotno populacijo, lahko zlivanje pripišemo sušenju vzorca.



Slika 18: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, pripravljenih na sonikatorju tipa Vibracell ultrasonic disintegrator pod naslednjimi pogoji: 30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in amplitudo 50%. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,5 mg/ml in kontrastirani z uranil acetatom. Povečava mikroskopa: 34000x. Vezikli, ki se ne zlivajo, ustrezajo velikostnemu razredu 50 nm.



Slika 19: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, pripravljenih na sonikatorju tipa Vibracell ultrasonic disintegrator pod naslednjimi pogoji: 30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in amplitudo 50%. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,5 mg/ml in kontrastirani z uranil acetatom. Povečava mikroskopa: 34000x. Na sliki a in b je še vedno moč opaziti lamelarnost veziklov.



Slika 20: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, pripravljenih na sonikatorju tipa Vibracell ultrasonic disintegrator pod naslednjimi pogoji: 30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in amplitudo 50%. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,5 mg/ml in kontrastirani z uranil acetatom. Povečava mikroskopa: 64000x (a) in 92000x (b). Na sliki je razvidno, da so vezikli, ki se ne zlivajo, reda velikosti 30 nm do 50 nm.

4.2.3.2 Vezikli iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina

Opazovanje veziklov iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina potrjuje rezultate, pridobljene z metodo dinamičnega sipanja svetlobe. Ti vezikli so manjši kot vezikli iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola. Ravno tako pa je opaziti zlivanje veziklov. Ti se močno zlivajo v velikih gručah, na obrobju takih gruč pa je zlivanje veziklov manjše (Sliki 21 in 22).



Slika 21: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina, pripravljenih na sonikatorju tipa Vibracell ultrasonic disintegrator pod naslednjimi pogoji: 30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in amplitudo 50%. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,25 mg/ml in kontrastirani z uranil acetatom. Povečava mikroskopa: 92000x. Na sliki je razvidno, da je večina veziklov manjša od 30 nm.



Slika 22: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina, pripravljenih na sonikatorju tipa Vibracell ultrasonic disintegrator pod naslednjimi pogoji: 30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in amplitudo 50%. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,25 mg/ml in kontrastirani z uranil acetatom Povečava mikroskopa: 46000x. Na desni sliki (b) je prikazana slika roba velike gruče veziklov, kjer poteka močno zlivanje veziklov.

4.2.3.3 Negativna kontrola (uranil acetat)

Negativna kontrola, pri kateri smo z elektronsko mikroskopijo opazovali v vodi raztopljeno kontrastirno sredstvo brez dodatka veziklov potrjuje, da so opazovani vzorci barvani z uranilacetatom res lipidni vezikli in ne artefakti, ki se pogosto pojavljajo pri opazovanju lipidnih struktur (Slika 23).



Slika 23: Elektronski posnetek v filtrirani deionizirani vodi raztopljenega kontrastirnega sredstva (uranil acetat) brez dodatka veziklov (negativna kontrola), pripravljenega na sonikatorju tipa Vibracell ultrasonic disintegrator z naslednjimi pogoji: 30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in amplitudo 50%. Povečava mikroskopa: 25000x (a) in 92000x (b). Na negativni kontroli ne opazimo veziklov, temveč samo artefakte, ki jih je moč pripisati kontrastirnemu sredstvu.

4.2.4 Artefakti, ki jih lahko zamenjamo za lipidne vezikle

Obe metodi za kontrastiranje lipidnih veziklov sta bili pridobljeni z veliko ponovitvami in izboljšavami obstoječih metod, ki pa niso bile tako zanesljive in ponovljive. Med preizkušanjem naših novih metod smo pogosto naleteli na strukture, ki jih je moč zamenjati z lipidnimi vezikli (Sliki 24 in 25). Te strukture smo izločili z negativnimi kontrolami. Ravno tako smo morali z deionizirano vodo zamenjati pufer (140 mM NaCl; 20 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0), v katerem smo prvotno pripravljali lipidne vezikle,. V pufru je bilo namreč opazovanje veziklov pod elektronskim mikroskopom oteženo.



Slika 24: Elektronski posnetek v filtrirani deionizirani vodi raztopljenega kontrastirnega sredstva (uranil acetat) brez dodatka veziklov (negativna kontrola), pripravljenega na sonikatorju tipa MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 z pogoji : 30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in amplitudo 6 μ . Povečava mikroskopa je 10500x. Uranil acetat lahko v nekaterih primerih tvori strukture, podobne lipidnim veziklom.



Slika 25: Elektronski posnetek pufra brez lipidnih veziklov. Vzorec je bil pripravljen kot negativna kontrola in zato obdelan z sonikatorjem MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 z pogoji: 30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in amplitudo 6 μ . Vozerc je kontastiran z uranil acetatom. Povečava mikroskopa je 25000x. Artefakti so posledica pufra, v katerem so raztopljeni lipidni vezikli.

4.3 OPAZOVANJE NA DETERGENT ODPORNIH MEMBRAN Z ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM

4.3.1 Velikosti na detergent odpornih membran, določene z Zetasizerjem Malvern

Velikosti lipidnih raftov, oziroma na detergent odpornih membran, ki smo jih pridobili z raztapljanjem veziklov v mrzlem detergentu Triton X-100, smo najprej izmerili z napravo Zetasizer tipa Malvern, saj nismo vedeli, kako velike strukture lahko pričakujemo pod elektronskim mikroskopom. V preglednici 3 so podane meritve, iz katerih razberemo, da so novonastale strukture reda velikosti 30 nm (vezikli iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola), oz. 10 nm (vezikli iz palmitoil-oleoil fosfatidilholina). Z napravo Zetasizer smo pri meritvah zaznali zelo majhno število trdnih struktur v raztopini, delovanje naprave je bilo na meji detekcije. Zato so rezultati le osnova za opazovanje z elektronskim mikroskopom.

Preglednica 3: Velikosti lipidnih struktur, pridobljenih po raztapljanju veziklov s Tritonom X-100

ČAS	IN	SM/CHOL (1:1)	TRITON X-100	POPC+	SM/CHOL (1:1)
ENERGIJA				TRITON X-100	+TRITON X-100
SONIKACIJ	Е	(premer veziklov)	(premer micelov)	(premer produkta)	(premer produkta)
30min	,10s	30nm +/- 12nm	11 nm +/- 1nm	12nm +/- 8nm	27nm +/- 8nm
pulzi, 50%					

4.3.2 Opazovanje na detergent odpornih membran z elektronskim mikroskopom

4.3.2.1 Na detergent odporne membrane, pridobljene po ekstrakciji veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, z mrzlim detergentom Triton X-100

Pri opazovanju na detergent odpornih membran oziroma lipidnih raftov nismo opazili struktur reda velikosti 30 nm, temveč velike površine oziroma "plahte", ki so najverjetneje sestavljene iz membran v tekoči urejeni fazi (Sliki 26 in 27), saj se pojavljajo le pri veziklih iz

sfingomielina in holesterola, ki smo jih izpostavili detergentu. Strukture najverjetneje nastanejo kot posledica zlivanja na detergent odpornih membran zaradi sušenja vzorca.



Slika 26: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola obdelanih s Tritonom X-100. Vzorec je pripravljen na sonikatorju tipa Vibracell ultrasonic disintegrator pod naslednjimi pogoji: 30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in amplitudo 50%. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,5 mg/ml, obdelani s Tritonom X-100 in kontrastirani z uranil acetatom. Povečava mikroskopa: 25000x. Na detergent odporne membrane so razporejene na površini nosilca za elektronski mikroskop.



Slika 27: Elektronski posnetek veziklov iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola obdelanih s Tritonom X-100. Vzorec je pripravljen na sonikatorju tipa Vibracell ultrasonic disintegrator pod naslednjimi pogoji: 30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in amplitudo 50%. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,5 mg/ml, obdelani so s Tritonom X-100 in kontrastirani z uranil acetatom. Povečava mikroskopa: 7900x (a) in 620x (b). Na detergent odporne membrane so razporejene v obliki velikih plaht.

4.3.2.2 Na detergent odporne membrane, pridobljene po ekstrakciji veziklov iz palmitiololeoil fosfatidilholina z mrzlim detergentom Triton X-100

Pri veziklih iz palmitiol-oleoil fosfatidilholina, ki smo jih obdelali s Tritonom X-100, ni bilo opaziti nikakršnih struktur in rezultati so bili enaki kot pri negativni kontroli (Slika 28). To nakazuje, da je detergent popolnoma raztopil vezikle.



Slika 28: Elektronski posnetek veziklov iz palmitoil-oleoil fosfatidilholina obdelanih s Tritonom X-100. Vzorec je pripravljen na sonikatorju tipa Vibracell ultrasonic disintegrator pod naslednjimi pogoji: 30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in amplitudo 50%. Vezikli so pripravljeni v filtrirani deionizirani vodi v koncentraciji 0,5 mg/ml, obdelani so s Tritonom X-100 in kontrastirani z uranil acetatom. Povečava mikroskopa: 28000x (a) in 19000x (b). Triton je popolnoma raztopil vezikle iz palmitoil-oleoil fosfatidilholina, obe sliki prikazujeti artefakte.

4.3.2.3 Negativna kontrola (mešanica deionizirane vode in detergenta Triton X-100)

Pri negativni kontroli, ki smo jo pripravili iz deionizirane vode z dodanim Tritonom X-100, smo opazili le artefakte, ki so posledica obdelave vzorca z detergentom in uranil acetatom (Slika 29).



Slika 29: Elektronski posnetek deionizirane vode in Tritona X-100. Vzorec je pripravljen na sonikatorju tipa Vibracell ultrasonic disintegrator pod naslednjimi pogoji: 30-minutna sonikacija z 10 sekundnimi pulzi in amplitudo 50%. Vzorec smo kontrastirani z uranil acetatom. Povečava mikroskopa: 19000x. V negativni kontroli so razvidni samo artefakti.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo z indirektno metodo dinamičnega sipanja svetlobe ter z direktno metodo elektronske mikroskopije poizkušali dokazati, da so majhni enomembranski vezikli v urejeni tekoči fazi večji od veziklov v neurejeni tekoči fazi. Pri tem je bilo ključno pridobiti učinkovito in ponovljivo metodo za pripravo lipidnih veziklov za presevno elektronsko mikroskopijo. Za zadnji cilj pa smo si zadali opazovanje na detergent netopnih membran z elektronsko mikroskopijo in njihovo kvantifikacijo.

5.1.1 Sonikacija

Pri tej nalogi smo za pripravo enomembranskih veziklov uporabljali dva različna sonikatorja. Sonikator MSE 150W ultrasonic disintegrator Mk.2 starejše izdelave ter novejši tip sonikatorja Vibracell ultrasonic disintegrator. Sonikacija je ključni del priprave majhnih enomembranskih veziklov iz večjih večmembranskih. Iz preglednice 1 in preglednice 2 je razvidno, da starejši sonikator ni bil ustrezen za pripravo veziklov željene velikosti, kljub dodatni obdelavi veziklov z zamrzovanjem, ker je v vzorec vnesel premalo energije za pridobivanje majhnih enomembranskih veziklov. Velikosti, ki smo jih izmerili z dinamičnim sipanjem svetlobe, močno presegajo 100 nm in relativna napaka v velikosti kaže na zelo nehomogeno populacijo. To potrjujejo tudi slike 6-18, kjer je jasno razvidna visoka lamelarnost veziklov. Z novim sonikatorjem Vibracell ultrasonic disintegrator smo po validaciji z različnimi močmi in trajanjem sonikacije nalogo opravili odlično. Iz preglednice 2 je razvidno, da je populacija enomebranskih veziklov manjša od 100 nm in zelo homogena. To potrjujejo tudi slike 18-23 z bistveno manjšimi vezikli, ki se po velikosti ujemajo z meritvami, pridobljenimi z dinamičnim sipanjem svetlobe.

5.1.2 Opazovanje lipidnih veziklov s presevno elektronsko mikrosopijo

Za pripravo veziklov za presevni elektronski mikroskop smo uporabili in optimizirali dva postopka negativnega kontrastiranja. Prvi je kontrastiranje z uranil acetatom, drugi pa kontrastiranje s fosfovolframovo kislino. Obe metodi sta po optimizaciji dali zelo dobre rezultate, nekatere slike veziklov kontrastiranih z fosfovolframovo kislino še posebaj izstopajo (slika 12, slika 14), vendar je ta metoda časovno zahtevnejša in kakovostni rezultati so zelo težko ponovljivi. Zato smo v večini primerov uporabljali metodo z uranil acetatom, ki je po zahtevni optimizaciji postala zelo učinkovita in ponovljiva. Z obema metodama smo tudi večkrat ponovili negativno kontrolo s filtrirano deionizirano vodo in tako potrdili rezultate in izključili artefakte (slika 24 in slika 25), ki se pojavljajo in bi jih lahko zamenjali za lipidne vezikle.

5.1.3 Primerjava velikosti veziklov v tekoči urejeni fazi in tekoči neurejeni fazi

Za vezikle v urejeni tekoči fazi smo izbrali vezikle iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, za vezikle v neurejeni tekoči fazi pa vezikle iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina. Iz preglednice 2 ter slik 18-22 je razvidno, da so vezikli v urejeni tekoči fazi večji. Razlog je najverjetneje v večji trdnosti oziroma rigidnosti membrane, ki ima posledično manjšo ukrivljenost. V prid tej predpostavki so tudi slike 6-23, na katerih je vidno zlivanje veziklov v gruče. Zlivanje je posledica sušenja vzorca med pripravo za elektronsko mikroskopijo. Vendar se vezikli iz palmitoil-oleoil-fosfatidilholina močneje zlivajo in tvorijo večje gruče. Ocenjujemo, da je poleg velikosti, tudi to posledica manj trdne membrane veziklov v tekoči neurejeni fazi.

5.1.4 Na detergent odporne membrane

Pri tem poizkusu smo oba tipa veziklov izpostavili detergentu Triton X-100, nato pa vzorce izmerili z napravo Zetasizer in opazovali z elektronskim mikroskopom. V preglednici 3 so

navedene velikosti lipidnih struktur po obdelavi z detergentom. Pri veziklih v urejeni tekoči fazi iz ekvimolarne mešanice sfingomielina in holesterola, smo po obdelavi s Tritonom X-100 opazili strukture velikostnega razreda 30 nm. Pri veziklih v neurejeni tekoči fazi iz palmitoiloleoil fosfatidilholina, pa se po dodatku detergenta, lipidne strukture po velikosti niso razlikovale od samega detergenta v negativni kontroli. V vseh primerih je bilo število trdnih struktur v raztopini na meji detekcije in zato podatki niso verodostojni, ampak so bili le vodilo za elektronsko mikroskopijo. Tu smo pri veziklih v urejeni tekoči fazi, ki so bili izpostavljeni detergentu, opazili velike ploskve (slika 26 in slika 27), ki jih pri negativni kontroli (slika 29) in veziklih v neurejeni tekoči fazi (slika 28) ni bilo moč opaziti. Predvidevamo, da so se na detergent odporne membrane pri sušenju zlile v velike ploskve, kar nakazujejo tudi podatki iz literature (Mayor in Maxfield, 1995).

5.1.5 Nadaljnje delo

V prihodnjih poizkusih bi bilo treba dodatno preučiti velikosti lipidnih struktur v raztopini po dodanem detergentu. Ravno tako bi bilo koristno lipidne rafte označiti s specifičnimi markerji in jih obdelati z detergentom, da bi določili povezavo med lipidnimi rafti in na detergent odpornimi membranami. Pri elektronski mikroskopiji bi lahko še dodelali metodo barvanja veziklov s fosfovolframovo kislino. Priporočljivo bi bilo tudi opazovanje veziklov ter na detergent odpornih struktur z elektronsko mikroskopijo z zamrzovanjem. Pri tej metodi namreč dobimo najbolj verodostojne podatke, saj s pripravo minimalno vplivamo na vzorec, ker ga ne sušimo in mu ne dodajamo kontrastnih sredstev.

5.2 SKLEPI

- Z dinamičnim sipanjem svetlobe in s presevno elektronsko mikroskopijo smo dokazali, da so majhni enomembranski vezikli v urejeni tekoči fazi, večji od veziklov v neurejeni tekoči fazi.
- Primerjali smo rezultate dinamičnega sipanja svetlobe in elektronske mikroskopije in dobili primerljive rezultate.
- Izpopolnili smo dve metodi za opazovanje lipidnih veziklov s presevno elektronsko mikroskopijo in opredelili artefakte, ki se pojavljajo pri pripravi vzorcev.
- Na detergent odporne membrane smo opazili le pri veziklih v urejeni tekoči fazi, ki smo jih obdelali z detergentom Triton X-100. Pri veziklih v neurejeni tekoči fazi podobnih struktur ni bilo moč opaziti. Na detergent odporne mebrane so pod presevnim elektroskim mikroskopom vidne kot velike plahte, ki verjetno nastanejo z zlivanjem.

6 POVZETEK

Liposomi so zaokroženi koloidni delci, sestavljeni iz amfifilnih molekul. Delimo jih na več skupin na podlagi velikosti in števila membran. Tako ločimo večmembranske ter enomembranske vezikle. V naši nalogi smo preučevali velikosti po sestavi različnih majhnih enomembranskih veziklov, ki dosegajo velikosti od 20 do 100 nm. Z elektronsko mikroskopijo in dinamičnim sipanjem svetlobe smo poizkušali dokazati, da so vezikli v urejeni tekoči fazi večji od veziklov v neurejeni tekoči fazi. Ravno tako smo z elektronsko mikroskopijo opazovali učinek detergenta na vezikle.

Majhne enomembranske vezikle smo pripravili s postopkom hidratacije in sonikacije. Tu je sonikacija ključnega pomena, saj mora sonikator v vzorec vnesti zadostno količino energije. Vezikle smo opazovali z dinamičnim sipanjem svetlobe, nato še s presevnim elektronskim mikroskopom. Za mikroskopijo je bilo potrebno optimizirati obstoječe postopke. Za najučinkovitejši postopek se je izkazalo kontrastiranje veziklov z uranil acetatom pri ph 7.

Rezultati dinamičnega sipanja svetlobe in presevne elektronske mikroskopije se medsebojno ujemajo in so potrdili naše domneve, da so vezikli v urejeni tekoči fazi večji od veziklov v neurejeni tekoči fazi. Razlog za to je najverjetneje v tesnejšem pakiranju nasičenih lipidov, ki tvorijo tekočo urejeno fazo, in v posledični manjši ukrivljenosti membrane. Pri obdelavi veziklov v urejeni tekoči fazi z detergentom Triton X-100, smo pod elektronskim mikroskopom opazovali na detergent odporne membrane, vidne kot velike plahte na površini nosilca za mikroskopijo. Pri veziklih v neurejeni tekoči fazi, ki smo jih obdelali z detergentom, takih membran ni bilo mogoče opaziti.

7 VIRI

- Anderson R.G.W., Jacobson K. 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. Science, 296: 1821-25
- Bacia K., Scherfeld D., Kahya N., Schwille P. 2004. Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. Biophysical Journal, 87: 1034-1043
- Douliez J.P., Lavenant L., Renard D. 2003. Formation of tubules and giant vesicles from large multilamellar vesicles. Journal of Colloid and Interface Science, 266: 477-480
- Dykstra M.J. 1992. Biological electron microscopy: Theory, techniques and troubleshooting. New York, Plenum Press: 380 str.
- Edidin M. 2003. The state of lipid rafts: From model membranes to cells. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 32: 257-283
- Frederik P.M., Sommerdijk N. 2005. Spatial and temporal resolution in cryo-electron microscopy. A scope for nano-chemistry. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 10: 245-249
- High intensity ultrasonic processor with temperature controller, Autotune series: Users guide. 2004. Newtown, Sonics & Materials Inc.: 30 str.
- Holesterol. 2006. Alabaster, Avanti Polar Lipids, Inc. www.avantilipids.com/ProductStructures.asp?n=700000 (2006): 1 str.
- Jacobson K., Sheets E.D., Simson R. 1995. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. Science, 268: 1441-1442
- Kamps J.A.A.M., Scherphof G.L. 2003. Liposomes in biological systems. V: Liposomes. 2nd
 ed. Torchilin V. P., Weissig V. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 267-288

- Kaszuba M., Connah M., Mattison K. 2004. High concentration particle size measurements using dynamic light scattering. Brussels, LabPlus International. http://www.labplusinternational.com/pdfgeneral/sept%20lpi%2050537.pdf (2006): 3 str.
- Kristl J., Šmid Korbar J., Srčič S. 1992. Farmacevtska tehnologija. 1. del in praktikum. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 157-159
- Lasch J., Weissig V., Brandl M. 2003. Preparation of liposomes. V: Liposomes. 2nd ed. Torchilin V. P., Weissig V. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 3-29
- Lasič D.D. 1997. Liposomes in gene delivery. Boca Raton, CRC Press: 320 str.
- Lichtenberg D., Goni F.M., Heerklotz H. 2005. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. Trends in Biochemical Science, 30, 8: 430-436
- London E. 2002. Insight into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. Current Opinion in Structural Biology, 12: 480-486
- Mayor S., Maxfield F.R. 1995. Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment. Molecular Biology of the Cell, 6: 929-944
- McConnell H. M., Vrljic M. 2003. Liquid-liquid immiscibility in membranes. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 32: 469-492
- Rivas M.G., Gennaro A.M. 2003. Detergent resistant domains in erytrocyte membranes survive after cell choesterol depletion: an EPR spin label study. Chemistry and Physics of Lipids, 00: 1-5
- 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 domains. FEBS Letters, 575: 81-85

Sfingomielin.2006. Alabaster, Avanti Polar Lipids, Inc.

www.avantilipids.com/ProductStructures.asp?n= 860062 (2006): 1 str.

- Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature, 387: 569-572
- Singer S.J., Nicolson G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 175: 720-731
- Subczynski W.K., Kusumi A. 2003. Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: Aproaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes, 1610:231-243