

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Ana ZOVKO

**VPLIV pH IN TEMPERATURE NA MEMBRANSKO AKTIVNOST  
ALKILPIRIDINIJEVIH POLIMEROV IZ MORSKE SPUŽVE  
*Reniera sarai***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF pH AND TEMPERATURE ON MEMBRANE  
ACTIVITY OF ALKYL PYRIDINIUM POLYMERS FROM  
THE MARINE SPONGE *Reniera sarai***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo in na Katedri za kemijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico imenovala prof. dr. Kristino Sepčič, za somentorico prof. dr. Natašo Poklar Ulrih in za recenzenta prof. dr. Toma Turka.

Mentorica: prof. dr. Kristina Sepčič

Somentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Član: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Tom Turk  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ana Zovko

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK 577.352:577.11:576.314(043)=863
- KG morske spužve / *Reniera sarai* / polimerne alkilpiridinijeve soli / poli-APS / modelne membrane / liposomi / vezava poli-APS / permeabilnost membran / pH / temperatura / lipidna sestava
- AV ZOVKO, Ana
- SA SEPČIČ, Kristina (mentorica)/POKLAR ULRIH, Nataša (somentorica)/TURK, Tom (recezent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2007
- IN VPLIV pH IN TEMPERATURE NA MEMBRANSKO AKTIVNOST ALKILPIRIDINIJEVIH POLIMEROV IZ MORSKE SPUŽVE *Reniera sarai*
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XIII, 61 str., 3 pregl., 33 sl., 55 vir.
- IJ sl
- Jl sl/en
- AI Polimerne alkilpiridinijeve soli (poli-APS) so spojine izolirane iz jadranske morske spužve *Reniera sarai*. Imajo celo vrsto bioloških aktivnosti: tvorijo pore v membrani, so citotoksične in kažejo citocidne lastnosti, inducirajo apoptozo celic ene izmed oblik pljučnega karcinoma, inhibirajo encim acetilholinesterazo in imajo protivegetativne lastnosti. V diplomski nalogi smo želeli bolje raziskati pod kakšnimi pogoji poli-APS deluje na membrano. Ugotavljali smo kakšen vpliv na vezavo in permeabilizacijo poli-APS imajo lipidna sestava, pH vrednost in temperatura. Uporabljali smo membrane z različno sestavo: fosfatidilholin, fosfatidilholin:fosfatidilserin (1:1) in fosfatidilholin:holesterol (3:1). Poskuse smo izvajali pri treh različnih temperaturah (5 °C, 25 °C in 40 °C) in pri petih različnih pH vrednostih (5, 6, 7, 8 in 9). S testom inhibicije hemolize in testom sipanja svetlobe smo ugotovili, da ima naboj velik vpliv na vezavo poli-APS na membrano. Test inhibicije hemolize je potrdil tudi hipotezo, da je vezava bolj učinkovita pri nižjih pH vrednostih, test sipanja svetlobe pa, da je vezava poli-APS bolj učinkovita pri nižjih temperaturah. S testom sproščanja kalceina smo ugotovili, da je permeabilizacija bolj učinkovita pri višjih temperaturah in pri višjih pH vrednostih. Bolj urejene membrane so manj dovzetne za permeabilizacijo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- D Dn
- DC 577.352:577.11:576.314(043)=863
- CX marine sponge / *Reniera sarai* / polymeric alkylpyridinium salts / poly-APS / artificial membranes / liposomes / binding of poly-APS / membrane permeabilisation / pH / temperature / lipid composition
- AU ZOVKO, Ana
- AA SEPČIĆ, Kristina (supervisor)/POKLAR ULRIH, Nataša (co-advisor)/TURK, Tom (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2007
- TI INFLUENCE OF pH AND TEMPERATURE ON MEMBRANE ACTIVITY OF ALKYLPIRIDINIUM POLYMERS FROM THE MARINE SPONGE *Reniera sarai*
- DT Graduation thesis (university studies)
- NO XIII, 61 p., 3 tab., 33 fig., 55 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Polymeric alkylpyridinium salts (poly-APS) are compounds isolated from the marine sponge *Reniera sarai*. They exert many biological activity: pore-forming, cytotoxic and cytotoxic (inducing apoptosis in one type of lung cancer cells), inhibition of acetylcholinesterase, and antifouling activity. In this work, we have investigated the conditions enhancing poly-APS activity towards membranes. We investigated the influence of lipid composition, pH values and temperature on binding and permeabilization of poly-APS. We used membranes with different composition:phosphatidylcholine, phosphatidylcholine:phosphatidylserine (1:1) and phosphatidylcholine:cholesterol (3:1). The experiments were performed under three different temperatures (5 °C, 25 °C in 40 °C) and five different pH values (5, 6, 7, 8, and 9). Using the hemolysis inhibition assay and scattering, we showed that membrane charge has great influence on binding of poly-APS. Hemolysis inhibition assay confirmed that binding increases at lower pH values, while the scattering assay showed that binding increases at lower temperatures. Using the calcein release test, we find out that permeabilization is more effective at higher temperatures and at higher pH values. Membranes with higher degree of ordering are more sensitive to permeabilization by poly-APS.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	XII
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 LIPOSOMI .....	3
<b>2.1.1 Lastnosti liposomov</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.2 Vrste liposomov</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.3 Priprava liposomov</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1.4 Uporaba liposomov</b> .....	<b>5</b>
2.2 ZGRADBA LIPIDNIH MEMBRAN .....	6
<b>2.2.1 Fosfolipidi</b> .....	6
<b>2.2.2 Holesterol</b> .....	8
<b>2.2.3 Modeli zgradbe bioloških membran</b> .....	8
<b>2.2.4 Fluidnost membran</b> .....	9
<b>2.2.5 Lipidni rafti</b> .....	10
2.3 POLIMERNE ALKILPIRIDINIJEVE SOLI (POLI-APS) .....	11
<b>2.3.1 Fizikalne lastnosti poli-APS</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3.2 Biološke aktivnosti poli-APS</b> .....	<b>12</b>
2.3.2.1 Membranska aktivnost .....	12
2.3.2.2 Inhibicija acetilholinesteraze .....	14
2.3.2.3 Antitumorska aktivnost .....	15
2.3.2.4 Protivegetativna aktivnost .....	16
<b>2.3.3 Možna uporabnost poli-APS</b> .....	<b>17</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>19</b>

3.1 MATERIALI .....	19
<b>3.1.1 Kemikalije .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2 Raztopine .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.3 Oprema .....</b>	<b>20</b>
3.2 METODE .....	21
<b>3.2.1 Izolacija poli-APS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.2 Priprava liposomov .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.3 Določanje koncentracije lipidnih veziklov .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.4 Določanje vpliva pH, temperature in lipidne sestave na urejenost membranskih lipidov .....</b>	<b>23</b>
3.2.4.1. Anizotropija in polarizacija .....	23
<b>3.2.5 Določanje vpliva pH, temperature in lipidne sestave na vezavo poli-APS na liposome .....</b>	<b>24</b>
3.2.5.1 Površinska plazmonska resonanca .....	24
3.2.5.2 Test inhibicije hemolize .....	26
3.2.5.3 Test sipanja svetlobe .....	27
<b>3.2.6 Določanje vpliva pH, temperature in lipidne sestave na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS .....</b>	<b>27</b>
3.2.6.1 Test sproščanja kalceina .....	27
<b>4 REZULTATI</b>	<b>29</b>
4.1 DOLOČANJE VPLIVA pH, TEMPERATURE IN LIPIDNE SESTAVE NA UREJENOST MEMBRANSKIH LIPIDOV .....	29
<b>4.1.1 Anizotropija in polarizacija .....</b>	<b>29</b>
4.2 DOLOČANJE VPLIVA pH, TEMPERATURE IN LIPIDNE SESTAVE NA VEZAVO POLI-APS NA LIPOSOME .....	32
<b>4.2.1 Površinska plazmonska resonanca .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2.2 Test inhibicije hemolize .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.3 Test sipanja svetlobe .....</b>	<b>37</b>
4.2.3.1 Vezikli, zgrajeni iz POPC (100 %) .....	37
4.2.3.2 Vezikli, zgrajeni iz POPC:Chol (3:1) .....	38
4.2.3.3 Vezikli, zgrajeni iz POPC:PS (1:1) .....	40

4.3 DOLOČANJE VPLIVA pH, TEMPERATURE IN LIPIDNE SESTAVE NA PERMEABILIZACIJSKO AKTIVNOST POLI-APS.....	42
<b>4.3.1 Test sproščanja kalceina .....</b>	<b>42</b>
4.3.1.1 Vezikli, zgrajeni iz POPC (100 %).....	43
4.3.1.2 Vezikli, zgrajeni iz POPC:Chol (3:1).....	45
4.3.1.3 Vezikli, zgrajeni iz POPC:PS (1:1) .....	46
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>48</b>
5.1 RAZPRAVA.....	48
5.2 SKLEPI.....	51
<b>6 POVZETEK</b>	<b>53</b>
<b>7 VIRI</b>	<b>55</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Uporabljene kemikalije	19
Preglednica 2: Uporabljene raztopine	20
Preglednica 3: Uporabljena oprema	20



## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Struktura fosfatidilholina (Fosfatidilholin..., 2007)	7
Slika 2: Struktura fosfatidilserina (Fosfatidilserin..., 2007)	7
Slika 3: Struktura sfingomielina (Sfingomielin..., 2007)	7
Slika 4: Struktura holesterola (Holesterol..., 2007)	8
Slika 5: Vpliv pH vrednosti in temperature na anizotropijo veziklov sestavljenih iz POPC (100 %)	29
Slika 6: Vpliv pH vrednosti in temperature na anizotropijo veziklov sestavljenih iz POPC:Chol (3:1)	30
Slika 7: Vpliv pH vrednosti in temperature na anizotropijo veziklov sestavljenih iz POPC:PS (1:1)	30
Slika 8: Vpliv pH vrednosti in temperature na polarizacijo veziklov sestavljenih iz POPC (100 %)	31
Slika 9: Vpliv pH vrednosti in temperature na polarizacijo veziklov sestavljenih iz POPC:Chol (3:1)	31
Slika 10: Vpliv pH vrednosti in temperature na polarizacijo veziklov sestavljenih iz POPC:PS (1:1)	32
Slika 11: Reprezentativni SPR sensorgram, ki prikazuje potek asociacije in disociacije poli-APS (1 µg/ml) na lipidnih veziklih imobiliziranih na L1 čipu. POPC (100 %) vezikli	33
Slika 12: Reprezentativni SPR sensorgram, ki prikazuje potek asociacije in disociacije poli-APS (1 µg/ml) na lipidnih veziklih imobiliziranih na L1 čipu. POPC:PS (1:1) vezikli	33
Slika 13: Vpliv temperature na vezavo poli-APS (1 µg/ml) na vezikle iz POPC (100 %)	34
Slika 14: Vpliv temperature na vezavo poli-APS (1 µg/ml) na vezikle iz POPC:Chol (3:1)	34
Slika 15: Vpliv lipidne sestave veziklov na inhibicijo s poli-APS (0,2 mg/ml) povzročene hemolize govejih eritrocitov pri pH 7 in pri 25 °C	35
Slika 16: Vpliv lipidne sestave veziklov na inhibicijo s poli-APS (0,2 mg/ml) povzročene hemolize govejih eritrocitov pri pH 8 in pri 25 °C	36
Slika 17: Vpliv lipidne sestave veziklov na inhibicijo s poli-APS (0,2 mg/ml) povzročene hemolize govejih eritrocitov pri pH 9 in pri 25 °C	36

Slika 18: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC (100 %) pri 5 °C	37
Slika 19: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC (100 %) pri 25 °C	38
Slika 20: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC (100 %) pri 40 °C	38
Slika 21: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC:Chol (3:1) pri 5 °C	39
Slika 22: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC:Chol (3:1) pri 25 °C	39
Slika 23: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC:Chol (3:1) pri 40 °C	40
Slika 24: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC:PS (1:1) pri 5 °C	41
Slika 25: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC:PS (1:1) pri 25°C	41
Slika 26: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC:PS (1:1) pri 40 °C	42
Slika 27: Reprezentativni časovni potek sproščanja kalceina, ki ga poli-APS (0,5 mg/ml) pri treh različnih temperaturah (5, 25 in 40 °C) povzročijo v veziklih zgrajenih iz POPC (100 %) pri pH 9	43
Slika 28: Vpliv temperature in pH vrednosti na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS (0,5 mg/ml) na lipidnih veziklih sestavljenih iz 100 % POPC	44
Slika 29: Vpliv temperature in pH vrednosti na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS (0,5 mg/ml) na lipidnih veziklih sestavljenih iz 100 % POPC	44
Slika 30: Vpliv temperature in pH vrednosti na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS (0,5 mg/ml) na lipidnih veziklih sestavljenih iz POPC:Chol (3:1)	45
Slika 31: Vpliv temperature in pH vrednosti na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS (0,5 mg/ml) na lipidnih veziklih sestavljenih iz POPC:Chol (3:1)	46
Slika 32: Vpliv temperature in pH vrednosti na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS (0,5 mg/ml) na lipidnih veziklih sestavljenih iz POPC:PS (1:1)	47

Slika 33: Vpliv temperature in pH vrednosti na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS (0,5 mg/ml) na lipidnih veziklih sestavljenih iz POPC:PS (1:1) 47

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACh	acetilholin
AChE	acetilholinesteraza
ChAT	holinacetiltransferaza
Chol	holesterol
CPC	cetilpiridinijev bromid
CTAB	cetiltrimetilamonijev bromid
Cu-P	biocidi na bazi bakrovih piritonov
DC 3F	diploidni pljučni fibroblasti kitajskega hrčka
DPH	1,6-difenil-1,3,5-heksatrien
DRM	v detergentih netopne membrane
GPI	glikozilfosfatidilinozitol
GSL	glikosfingolipidi
GUV	enomembranski vezikli celičnih velikosti
HeLa	človeški karcinom materničnega vratu
$l_o$	tekoča urejena faza
$l_d$	tekoča neurejena faza
LUV	veliki enomembranski vezikli
mAChRs	muskarinski holinergični receptor
MLV	večmembranski vezikli
nAChRs	nikotinski holinergični receptor
NSCLC	ne-male rakave pljučne celice
Poli-APS	polimerne alkilpiridinijeve soli
PC	fosfatidilholin
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
POPS	1-palmitoil-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3(fosfo-L-serin)
PS	fosfatidilserin
RU	resonančna enota (resonance units)
$s_o$	trdna urejena faza
SCLC	male rakave pljučne celice
SPR	površinska plazmonska rezonanca

SUV	majhni enomembranski vezikli
$t_{50}$	čas potreben za 50% hemolizo
$T_m$	temperatura prehoda
ULV	enomembranski vezikli
V-79	transfomirani diploidni pljučni fibroblasti kitajskega hrčka
VACHT	vezikularni transporter acetilholina
Zn-P	biocidi na bazi cinkovih piritionov

## 1 UVOD

Polimerne alkilpiridinijske soli (poli-APS) so spojine izolirane iz jadranske morske spužve *Reniera sarai* (Sepčić in sod., 1997a). Za te spojine so ugotovili, da imajo celo vrsto bioloških aktivnosti. Lahko tvorijo prehodne pore v membrani in na ta način omogočajo transfekcijo celic (Tucker in sod., 2003). Membranska aktivnost poli-APS se kaže tudi v sposobnosti zaviranja tvorbe celičnih kolonij in inhibiciji celične delitve (Sepčić in sod., 1997b). Odkrili so tudi, da imajo poli-APS zelo selektivno delovanje na en tip celic pljučnega raka. V koncentracijah, v katerih zavirajo rast rakavih celic, niso toksične za normalne celice (Paleari in sod., 2006). Poli-APS so se tudi izkazale kot zelo učinkoviti inhibitorji encima acetilholinesteraze (Sepčić in sod., 1998). Poli-APS imajo protivegetativne lastnosti kar pomeni, da zavirajo vsedanje, pritrjanje in rast živih organizmov na potopljene površine. Med drugim inhibirajo kolonizacijo ličink raka vitičnjaka vrste *Balanus amphitrite*, mikroalge vrste *Tetraselmis suecica* (Faimali in sod., 2003a) ter številnih bakterij, gliv in mikroalg (Garaventa in sod., 2003).

### 1.1 NAMEN DELA

Zaradi teh zanimivih lastnosti smo želeli bolj raziskati pod kakšnimi pogoji poli-APS delujejo na membrano. Cilj naloge je bil raziskati interakcije poli-APS z umetnimi lipidnimi membranami. Za potrebe naše raziskave smo izdelali liposome z različno lipidno sestavo: fosfatidilholin, fosfatidilholin:fosfatidilserin (1:1) in fosfatidilholin:holesterol (3:1) in tako bolj podrobno raziskali, kako lipidna sestava vpliva na vezavo in permeabilizacijsko sposobnost poli-APS. Ugotavljali smo tudi vpliv temperature in pH vrednosti in smo zato poskuse izvajali pri treh različnih temperaturah (5 °C, 25 °C in 40 °C) in pri petih različnih pH vrednostih (5, 6, 7, 8 in 9).

McLaggan in sodelavci (2006) so dokazali, da je s poli-APS inducirana transfekcija bolj učinkovita pri nižjih temperaturah. Zato smo predvidevali, da bo tudi vezava na liposome in njihova permeabilizacija bolj učinkovita pri nižjih temperaturah. Nadalje, pričakovali smo da naboj ima velik vpliv na vezavo. Poli-APS so polikationi in smo zato pričakovali,

da se bodo bolj vezale na negativno nabite membrane. Predvidevali smo tudi, da so poli-APS bolj učinkovite pri nižjih pH vrednostih.

Odvisnost vezave poli-APS na liposome od lipidne sestave, temperature in pH vrednostih smo ugotavljali z različnimi metodami. Uporabili smo test sipanja svetlobe, površinsko plazmonsko resonanco ter test inhibicije hemolize. Odvisnost permeabilizacijske aktivnosti od lipidne sestave, temperature in pH vrednosti pa smo ugotavljali s fluorimetričnim testom spoščanja kalceina. Z meritvami anizotropije in polarizacije smo ugotavljali urejenost membran ter fazno stanje v katerem se nahajajo.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 LIPOSOMI

#### 2.1.1 Lastnosti liposomov

Liposomi ali lipidni vezikli so zaokroženi delci, ki so sestavljeni iz enega ali več lipidnih dvoslojev. V notranjosti zadržujejo del topila v katerem plavajo, kar lahko izkoriščamo v različne namene. Obstoj liposomov je leta 1961 dokazal Alec Bangham, ko je pokazal, da fosfolipidi v vodi spontano tvorijo koncentrične enoslojne ali večslojne vezikle. Beseda liposom izvira iz grščine in pomeni maščobno telo. Liposomi so amfifilne narave, kar pomeni, da so sestavljeni iz hidrofobnega in hidrofilnega dela. Hidrofilni del predstavljajo polarne glave fosfolipidov, ki privlačijo vodo, hidrofobni pa so nepolarni repi, ki vodo odbijajo. Ta lastnost omogoča urejanje delcev v zaprte strukture, ko jih izpostavimo polarnemu mediju. Tiste amfifilne molekule, ki imajo le en nepolarni rep (npr. detergenti, maščobne kisline in lizofosfolipidi) tvorijo micelle, tiste, ki imajo dva nepolarna repa pa se povežejo v lipidni dvosloj. V lipidnem dvosloju so nepolarni repi v notranjosti, polarne glave pa so v stiku z vodo in ščitijo nepolarno sredico. Ker bi bila na robovih hidrofobna sredica v kontaktu z vodo, se dvosloj zapre, da nastanejo sferične strukture-liposomi. (Lasič, 1997).

Liposome lahko naredimo iz različnih fosfolipidov in sterolov. Vloga sterolov, npr. holesterola, je zmanjševanje prepustnosti za hidrofilne molekule in večja stabilnost v prisotnosti bioloških topil. V liposome lahko vgrajujemo lipofilne, hidrofilne in amfifilne učinkovine. Hidrofilne ležijo v vodnem mediju, v osrednjem delu liposoma in ob membrani liposoma, amfifilne so ob membrani, lipofilne pa so vključene v membrano (Kočevar in Kristl, 2005).

#### 2.1.2 Vrste liposomov

Glede na velikost ločimo enomembranske (ang. ULV- unilamellar vesicles) in večmembranske (ang. MLV- multilamellar vesicles) vezikle. Enomembranske liposome



ločimo glede na velikost na majhne enomembranske (ang. SUV- small unilamellar vesicles), velike (ang. LUV- large unilamellar vesicles) in enomembranske celičnih velikosti (ang. GUV- giant unilamellar vesicles). Velikosti majhnih se gibljejo med 20 in 100 nm, velikih med 100 in 800 nm, enomembranski vezikli celičnih velikosti pa presegajo velikost 1  $\mu\text{m}$ . Debelina lipidnega dvosloja je okoli 4 nm (Kočevar in Kristl, 2005).

### 2.1.3 Priprava liposomov

Obstaja veliko različnih metod za pripravo liposomov, ki se med seboj ločijo po zahtevnosti priprave, homogenosti lipidnih veziklov, količini dobljenih lipidov in času, ki je potreben za pripravo (Lasch in sod., 2003). Na voljo so tri glavne metode: hidratacija in sonikacija, priprava s filtri in homogenizacija.

Pri prvi metodi lipide najprej raztopimo v organskem topilu, da jim zagotovimo optimalno mešanje. Po evaporaciji topilo izpari in ostane samo lipidni film, ki mu dodamo polarni medij. Z mešanjem sprožimo tvorbo večslojnih veziklov. Le-te s sonikacijo nato pretvorimo v enoslojne vezikle. Čeprav je enostavna, metoda ni primerna za izdelavo večje količine lipidnih veziklov, pogosto pa nastanejo vezikli različnih velikosti (Lasič, 1997; Lasch in sod., 2003).

Pri filtraciji uporabljamo filtre z različno velikimi porami, skozi katere potiskamo večslojne vezikle. Najprej uporabimo filtre z največjimi porami (1  $\mu\text{m}$ ), nato pa take z 400-200  $\mu\text{m}$  porami, nazadnje pa še filtre s porami do 100 nm. Tako dobimo velike enomembranske vezikle. Če pa postopek nadaljujemo še s filtri, ki imajo pore velikosti 50-80 nm bomo dobili majhne enomembranske vezikle. Če uporabljamo le filtre s končno velikostjo por, je potrebno predhodno večkratno zamrzovanje in odtaljevanje veziklov. Ta postopek zagotovi razslojevanje večslojnih veziklov. Če uporabljamo filtre s porami manjšimi od 30 nm pridobimo večje vezikle, ker so membrane tako pridobljenih veziklov preveč ukrivljene in podvržene zlivanju. Metodo lahko uporabimo za pridobivanje večje količine veziklov, vendar pa je postopek zelo zahteven in zamuden (Lasič, 1997; Lasch in sod., 2003).

Tretja metoda je homogenizacija. Večslojne liposome potisnemo skozi majhno luknjo v oviro, da se curek tekočine razdeli na dva dela, ki trčita skupaj s pritiskom 20000 psi. Prednost te metode je hitrost, enostavnost in možnost pridobivanja velike količine veziklov, lahko pa nastanejo preveliki ali premajhni vezikli (Lasič, 1997; Lasch in sod., 2003).

Liposome lahko pripravimo tudi v ultrazvočni kopeli. V sistem dovajamo veliko energije in zmes liposomov vzbujamo z ultrazvočnim valovanjem. Metoda je zelo hitra.

Lahko uporabljamo tudi kemične postopke homogenizacije, pri katerih v zmes liposomov dodamo fosforjevo kislino, ki destabilizira zunanje membrane veziklov. Po kratkem času nevtraliziramo z bazo in dvignemo pH na vrednost pri kateri so vezikli najbolj stabilni. Slabost te metode je vezava nečistoč med lipide.

Poznamo še en način pridobivanja liposomov. To je vbrizgavanje koncentriranih lipidov, raztopljenih v etanolu ali etru, v posodo z vodo, ki jo mešamo z veliko hitrostjo. Pri tem se tvorijo kapljice liposomov. Produkt te metode je nehomogena zmes večplastnih liposomov.

Tvorba liposomov je endotermen proces. Lastnosti liposomov pridobljenih s temi metodami so odvisne od kemične sestave pripravkov, tehnike nastajanja liposomov in porazdelitve po laminarnosti in velikosti (Lasič, 1997).

#### **2.1.4 Uporaba liposomov**

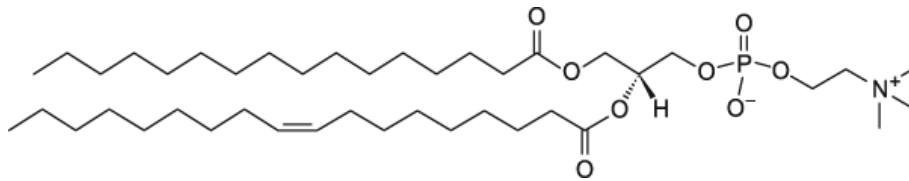
Liposomi se uporabljajo za različne namene. Uporabni so v medicini kot prenašalci zdravil, ker so biokompatibilni, razgradljivi in ne povzročajo imunskega odziva ter zdravilo prenesejo do tarčnega mesta v organizmu. Liposomi so tudi eni izmed najbolj preučevanih dostavnih sistemov za zdravljenje rakavih obolenj (Kočevar in Kristl, 2005). Uporabljajo jih tudi pri pripravi cepiv. V kozmetični industriji liposomi prenašajo hidrofilne in hidrofobne snovi. V genetiki se uporabljajo za prenos DNA oz. RNA v celice. V biofiziki so liposomi model, na katerem preučujejo prepustnost, dinamiko in strukturo membran. Uporabni so tudi v ekologiji, živilski industriji in diagnostiki (Lasič, 1997).

## 2.2 ZGRADBA LIPIDNIH MEMBRAN

### 2.2.1 Fosfolipidi

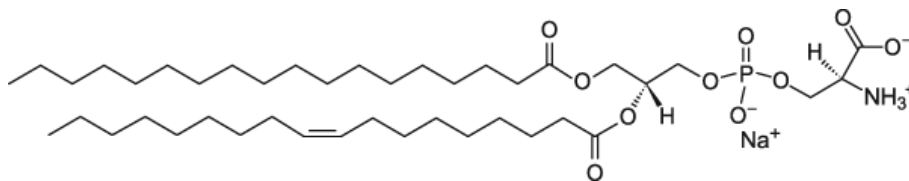
Osnovni gradniki fosfolipidov so maščobne kisline, glicerol, fosfatna skupina in dodatna polarna skupina (ponavadi alkoholna). Maščobne kisline so amfifilne molekule sestavljene iz polarne karboksilne skupine in nepolarne ogljikovodikove verige. Število ogljikovih atomov je od 4 do 36. Če so ogljikovi atomi povezani z enojnimi vezmi govorimo o nasičenih maščobnih kislinah, če je prisotna vsaj ena dvojna vez pa o nenasičenih. Na mestu dvojne vezi, ki je v *cis* konfiguraciji se nenasičena maščobna kislina upogne in zato se ne morejo v agregatih pakirati tesno kot nasičene. Nenasičene maščobne kisline so tudi bolj reaktivne. Maščobne kisline so dobro topne v organskih topilih, topnost v vodi pa pada z dolžino verige. Pri sobni temperaturi so vse nenasičene in vse nasičene maščobne kisline z manj kot deset ogljikovih atomov oljnate. Maščobne kisline gradijo nepolarne in polarne lipide. V nepolarnih triacilglicerolih se na osnovno molekulo glicerola vežejo tri maščobne kisline. Triacilgliceroli v celicah predstavljajo vir energije in toplotno izolacijo. Fosfolipide, ki imajo polaren in nepolaren del, najdemo v membranah in jih delimo v dve veliki skupini: glicerofosfolipide in sfingolipide. V glicerofosfolipidih sta na C1 in C2 mesto glicerola vezani dve maščobni kislini, C3 mesto pa je zaestreno s fosfatno skupino. Fosfatna skupina je dodatno zaestrena s še eno substituentom, ki je lahko vodik, etanolamin, holin, glicerol, serin ali inozitol. Pri fiziološkem pH imajo vsi glicerofosfolipidi razen fosfatidilholina in fosfatidiletanolamina negativen neto naboj (Boyer, 2002).

Fosfatidilholin (slika 1) je običajno najbolj pogost glicerofosfolipid v membranah živali in rastlin. Je nevtralen, sodeluje pri celični signalizaciji in vzdržuje strukturo celičnih membran. Je tudi najpomembnejši fosfolipid, ki kroži v plazmi, kjer predstavlja integralno komponento lipoproteinov. V bakterijskih membranah ni zelo pogost, vsebuje ga le približno 10 % bakterij.



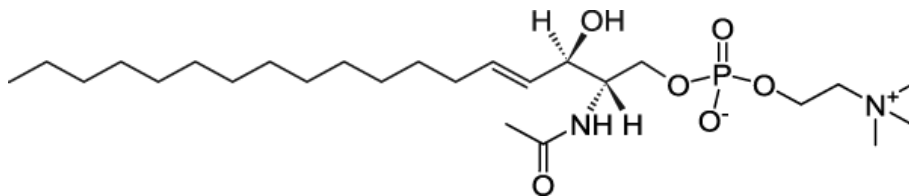
Slika 1: Struktura fosfatidilholina (Fosfatidilholin..., 2007)

Fosfatidilserin (slika 2) je negativno nabit glicerofosfolipid. Čeprav je prisoten v rastlinah, živalih in mikroorganizmih, predstavlja le 10 % fosfolipidov.



Slika 2: Struktura fosfatidilserina (Fosfatidilserin..., 2007)

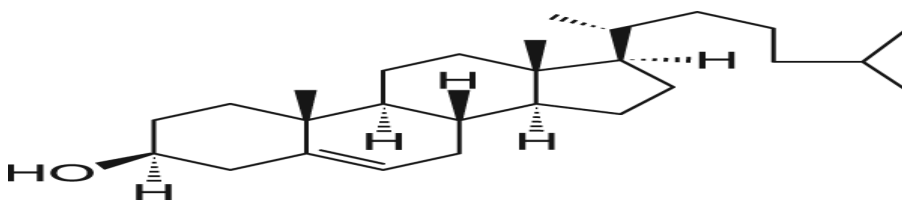
Osnovna molekula sfingolipidov je sfingozin, ki ima aminske in hidroksilne skupine. Na C2 atomu aminske skupine je vezana maščobna kislina, na C1 atom hidroksilne skupine pa je vezana substituenta, ki je lahko vodik, fosfoholin, glukoza ali kompleksni oligosaharid. Sfingomielin (SM) je edini sfingolipid, ki vsebuje fosfor (Slika 3). Maščobna kislina je vezana preko aminske skupine, hidroksilna skupina pa je zaestrena s fosfoholinsko enoto. Molekula ima polarno ionizirano glavo in dva nepolarne repa. Sfingomielini so prisotni v mielinskih ovojnicah, kjer izolirajo aksonske glave (Boyer, 2002).



Slika 3: Struktura sfingomielina (Sfingomielin..., 2007)

## 2.2.2 Holesterol

Razen fosfolipidov je eden glavnih membranskih lipidov v živalski celici tudi holesterol. Tako kot ostali steroidi je tudi holesterol sestavljen iz treh šestčlenskih obročev (A, B in C) in enega petčlenskega obroča (D). Na mesto C3 v obroču A je vezana hidroksilna skupina, med atomoma C5 in C6 v obroču B je dvojna vez, na mestu C17 v obroču D pa je vezana stranska veriga, ki je fleksibilna (Slika 4). Amfifilnost molekule je posledica prisotnosti hidroksilne skupine, ki predstavlja polarni del molekule, kondenzirani obroči in ogljikovodikov rep pa tvorijo hidrofoben del. Hidroksilna skupina omogoča vezavo molekule holesterola na molekule vode in druge lipidne molekule na ta način, da tvori vodikovo vez s polarnimi fosfolipidi (Boyer, 2002). Holesterol omogoča večjo urejenost membrane in njen prehod v tekočo urejeno fazo (McConnel in Vrljic, 2003).



Slika 4: Struktura holesterola (Holesterol..., 2007)

## 2.2.3 Modeli zgradbe bioloških membran

Osnovno strukturno ogrodje membrane je dvojna lipidna plast (Boyer, 2002). Celične membrane so sestavljene iz domen, ki vsebujejo različne polarne lipide, proteine in ogljikove hidrate. Vsebnost ogljikovih hidratov je majhna, nahajajo se samo na zunanji plasti membranskega dvosloja in so vedno vezani na lipide (glikolipidi) ali na proteinske molekule (glikoproteini).

Prvi model, ki sta ga predlagala Davson in Danieli je razlagal membrano kot dvosloj, ki vsebuje fosfolipide, nevtralne lipide in membranske proteine. Leta 1972 sta Singer in Nicholson predlagala model tekočega mozaika. Dokazala sta obstoj amfifilnih proteinov v dvosloju ter dinamično strukturo membrane. Pokazala sta, da lahko majhne nepolarne

molekule prehajajo skozi lipidni dvosloj, polarne molekule pa tega niso zmožne in jim pri prehodu pomagajo membranski proteini. Fosfolipidni dvosloj je fluidni matriks, v katerem se lipidi in proteini lahko lateralno premikajo, kar pomeni, da se premikajo v vseh smereh znotraj svojega sloja. Membrana naj bi bila sestavljena iz lipidnega dvosloja, v katerega so vgrajeni periferni in integralni proteini. Pri tem imajo lipidi strukturno vlogo, proteini pa transportno ter encimsko vlogo (Boyer, 2002). Nadaljnje raziskave pa so privedle do sprememb modela, ki sta ga predlagala Singer in Nicholson. Odkrili so, da membranski proteini in lipidi niso naključno razporejeni v membrani, ampak se lateralno združujejo v določene domene (Lichtenberg, 2005). Asimetričnost je lahko tudi vertikalna. Tako je v eritrocitnih membranah notranja plast sestavljena iz fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinozitola in glikolipidov, zunanja pa iz fosfatidilholina in sfingomielina (Boyer, 2002). Novejši model razlage membranske heterogenosti je model membranskih raftov, ki sta ga predlagala Simons in Ikonen leta 1997.

#### **2.2.4 Fluidnost membran**

Znano je, da so membranski lipidi lahko v tekoči neurejeni fazi (liquid disordered,  $l_d$ ) ali trdni urejeni fazi (solid ordered,  $s_o$ ). Stopnja fluidnosti je odvisna od temperature in lipidne sestave. Pri nizkih temperaturah je dvosloj v trdnem urejenem stanju, nad določeno temperaturo pa postane neurejen. Temperatura prehoda ( $T_m$ ) je temperatura, pri kateri lipidi iz  $s_o$  stanja preidejo v  $l_d$  stanje (London, 2002).  $T_m$  je odvisna predvsem od dolžine in nasičenosti ogljikovodikovih verig, ki sestavljajo nepolarne rep amfifilnih lipidov, medtem ko ima polarna glava manjši vpliv na  $T_m$  (Lasič, 1997). Z naraščajočo dolžino acilnih verig in stopnjo nasičenosti narašča tudi  $T_m$ . V trdni urejeni fazi prevladujejo lipidi z visoko  $T_m$ , ki vsebujejo dolge nasičene acilne verige, kot so recimo sfingolipidi. V tekoči neurejeni fazi pa so prisotni predvsem glicerofosfolipidi z eno- ali polinasičenimi verigami ter nižjo  $T_m$  (London, 2002). Evkariontska membrana je mešanica sfingolipidov z visoko  $T_m$  in fosfolipidov z nizko  $T_m$ .

Holesterol se tesno vrinja med fosfolipide in jih kondenzira ter na ta način zabriše fazne prehode med  $s_o$  in  $l_d$  fazo. Na ta način nastanejo membrane brez faznega prehoda- tekoča urejena faza ( $l_o$ ) (Lasič, 1997). V tej fazi so lipidi tesno skupaj, še vedno pa imajo

sposobnost hitrega lateralnega premikanja (London, 2002). Najmočnejšo povezavo s holesterolom dosežejo sfingolipidi in glicerofosfolipidi, ki imajo nasičeno C18 verigo ogljikovodikov in so posledično najbolj rigidni.

### 2.2.5 Lipidni rafti

Lipidni rafti so membranske mikrodomene, bogate s holesterolom in sfingolipidi. Sodelujejo pri nekaterih temeljnih procesih v celici kot so: celična signalizacija, razvrščanje lipidov in proteinov, endocitoza, eksocitoza in membranski transport. Nekateri intracelularni paraziti in patogeni prepoznavajo lipidne rafte kot vstopno mesto v celico (London, 2002). Rafti so pomembni tudi pri patofiziologiji raka, virusnih infekcij, Alzheimerjevi bolezni in prionskih boleznih (Simons in Ehehalt, 2002).

Sfingolipidi imajo dolge in nasičene acilne verige, ki omogočajo tesno povezovanje z ostalimi lipidi v membrani. Imajo  $T_m$  pri višjih temperaturah kot drugi fosfolipidi, ki so bogati z nenasičenimi acilnimi verigami. Zaradi različnega pakiranja sfingolipidov in glicerofosfolipidov pride do fazne porazdelitve v membrani. Tako so v membrani prisotni tako rafti bogati z sfingolipidi, kot tudi domene bogate z glicerofosfolipidi. Holesterol pospeši fazno porazdelitev zaradi afinitete do nasičenih lipidov (Brown in London, 2000). Dodatek holesterola, ki zabriše fazne prehode med  $s_o$  in  $l_d$  fazo (McConnel in Vrljic, 2003), vodi v nastanek lipidnih raftov, ki so verjetno v tekoči urejeni fazi ( $l_o$ ).

V raftih so razen holesterola in sfingolipidov pogosto prisotni tudi glikozilfosfatidilinozitol (GPI), ki so sidrišni proteini kovalentno vezani na nasičene acilne verige lipidov in glikosfingolipidi (GSL), včasih pa so prisotni tudi transmembranski proteini (Edidin, 2003). Majhne rafte sestavljene iz 15 do 30 molekul holesterola in sfingomielina imenujemo osnovni rafti. Ob stimulaciji z ekstracelularnimi signali se zaradi visoke afinitete do holesterola in sfingomielina vežejo še GPI in transmembranski proteini. Tako nastanejo receptorski rafti. Le-ti lahko oblikujejo še večje prehodne rafte z življensko dobo manjšo kot 1 s (Subczynski in Kusumi, 2003). Življenska doba raftov je kratka, hitro nastanejo, rastejo in izginejo (Edidin, 2003). Zaradi visoke stopnje pakiranja molekul v

tekoči urejeni fazi ( $l_o$ ) se rafti ne raztapljajo v detergentih kot je Triton X-100 (London, 2002).

V literaturi se pogosto izenačujejo pojmi lipidni rafti, v detergentih netopne membrane (DRM) in tekoča urejena faza ( $l_o$ ), vendar je pri tem treba biti pozoren. V detergentih netopne membrane nastanejo kot posledica nepopolne topnosti membran v detergentih. To pomeni, da tudi po obdelavi membran z visokimi koncentracijami detergenta del membrane ostane v dvoslojnih fragmentih in se ne preuredi v micelle. Dodatek detrgenov inducira nastanek DRM in ni nujno, da so membranske strukture enake tistim, ki so obstajale pred dodatkom detergentov. Čeprav je tekoča urejena faza ( $l_o$ ) bolj odporna na raztapljanje v detergentih kot tekoča neurejena faza ( $l_d$ ), jo ne moremo enačiti z DRM. Obstoj raftov je neodvisen od uporabe detergentov, njihova odpornost na raztapljanje v detergentih pa še ni popolnoma dokazana (Lichtenberg in sod., 2005).

## 2.3 POLIMERNE ALKILPIRIDINIJEVE SOLI (POLI-APS)

### 2.3.1 Fizikalne lastnosti poli-APS

Polimerne alkilpiridinijeve soli (poli-APS) so spojine, ki so jih izolirali iz jadranske morske spužve vrste *Reniera sarai* (Sepčič in sod., 1997a). Poli-APS so mešanica dveh polimerov, ki imata enako strukturo, ampak različni molekularni masi, 5520 Da in 18900 Da, kar ustreza polimerom sestavljenim iz 29 oz. 99-100 oktilpiridinijevih enot (Sepčič in sod., 1997a). Strukturno in funkcijsko so podobni halitoksinu iz različnih spužev rodu *Halicona*. Halitoksin je 0,5-25 kDa velik 3-alkilpiridinijev polimer. Piridinijevi obroči v halitoksinu so povezani z razvejanimi metiliranimi alkilnimi verigami sestavljenimi iz 8-11 ogljikovih atomov, v poli-APS pa z nerazvejanimi oktilnimi verigami (Sepčič in sod., 1997a; Schmitz in sod., 1978; Scott in sod., 2000). Molekule poli-APS so amfifilne z hidrofilno kationsko glavo iz piridinijevih obročev in hidrofobno ogljikovodikovo verigo. Topne so le v vodi in ne v organskih topilih kot ostali 3-alkilpiridinijevi polimeri (Sepčič in sod., 1997a). To je verjetno posledica višje stopnje polimerizacije. Raztopina poli-APS je polidisperzna; delci, ki jo sestavljajo so veliki od 15 nm do 80 nm. Povprečni hidrodinamski radij sferičnih struktur v katere se poli-APS povezujejo v vodnih raztopinah



je  $23 \pm 2$  nm. Molske mase teh agregatov so okrog  $3 \times 10^6$  Da. Radij je neodvisen od koncentracije poli-APS in ionske jakosti raztopine (Sepčič in sod., 1997a).

### 2.3.2 Biološke aktivnosti poli-APS

#### 2.3.2.1 Membranska aktivnost

Zelo pomembna lastnost poli-APS je sposobnost tvorbe prehodnih por v celičnih membranah. Poli-APS povzročajo kolaps membranskega potenciala in redukcijo vhodne upornosti ter večjo permeabilnost za  $\text{Ca}^{2+}$  (Tucker in sod., 2003). McClelland in sodelavci (2003) so pri raziskavi uporabljali podganje nevrone in pri koncentraciji poli-APS 50  $\mu\text{g/ml}$  ugotovili ireverzibilen padec membranskega potenciala z  $-65 \pm 1$  na  $-9 \pm 3$  mV in vhodne upornosti s  $350 \pm 79$  na  $56 \pm 27$  M $\Omega$ . Pri nižjih koncentracijah (5  $\mu\text{g/ml}$  in 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) sta sprememba membranskega potenciala in vhodne upornosti bili reverzibilni. Obstaja več teorij, ki razlagajo reverzibilne spremembe membranskega potenciala in vhodne upornosti (McClelland in sod., 2003). Možno je, da večja stopnja polimerizacije poli-APS rezultira v manj stabilnih interakcijah s celičnimi membranami. Zaradi manj stabilnih interakcij lahko pride do izpiranja večjih toksinov, ki tvorijo pore in so posledično pore le začasne. Bolj verjetno pa je, da večje molekule poli-APS zaradi fleksibilnosti dovoljujejo prerazporejanje lipidov po nastanku pore. Na ta način se blokira pretok ionov skozi membrano. To se lahko zgodi zaradi hidrofobnega kolapsa, ko je toksin v membrani. V takšnih pogojih lahko alkilne verige obkrožijo piridinijeve skupine, ki postanejo kompatibilne z membrano (McClelland in sod., 2003). Ključni faktorji za reverzibilno tvorbo por bi lahko bili sposobnost poli-APS, da tvori nekovalentne agregate s hidrodinamskim radijem  $23 \pm 2$  nm (Sepčič in sod., 1997a), ter njihova amfifilnost (Malovrh in sod., 1999).

Z višanjem koncentracije poli-APS od 0,005 do 5  $\mu\text{g/ml}$  narašča tudi koncentracija znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$  (Koss in sod., 2007). Poli-APS povzroči membransko depolarizacijo, ki aktivira endogene  $\text{Ca}^{2+}$  kanalčke, tako da  $\text{Ca}^{2+}$  vstopa tako skozi naravne kot tudi skozi s poli-APS inducirane pore. Poli-APS so tudi direktno odgovorne za sproščanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz znotrajceličnih zalog (McClelland in sod., 2003). Cink blokira učinek poli-APS na

membranski potencial, vhodno upornost in permeabilnost  $\text{Ca}^{2+}$  ter preprečuje nastanek por (McClelland in sod., 2003). Ena od možnih razlag tega fenomena je Shai-Matsuzaki-Huangov model, po katerem se  $\text{Zn}^{2+}$  veže na negativno nabite ione na membrani in prepreči vezavo poli-APS. Afiniteta cinka je verjetno večja kot afiniteta piridinijevih obročev (Zaslhoff, 2002). Možno pa je, da cink reagira direktno s poli-APS in onemogoči njihovo aktivnost (McClelland in sod., 2003). Malovrh in sodelavci (1999) so tudi prišli do ugotovitve, da cink in ostali dvovalentni kationi zapirajo pore, ki jih naredijo poli-APS, ne pa tudi poškodbe membrane povzročene z hipoosmotskim šokom.  $\text{Zn}^{2+}$  in  $\text{Hg}^{2+}$  močno inhibirata hemolizo, medtem ko so  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Co}^{2+}$  manj učinkoviti.

V isti raziskavi so primerjali hemolitično aktivnost poli-APS z aktivnostjo kationskih detergentov cetilpiridinijevega bromida (CPC) in cetiltrimetilamonijevega bromida (CTAB). Časovni potek hemolize je sigmoiden, hitrost hemolize pa je sorazmerna koncentraciji poli-APS. Aktivnost poli-APS lahko primerjamo z aktivnostjo CPC in CTAB, kljub polimerni naravi poli-APS in znatno krajši alkilni verigi. Kljub podobnosti z detergenti, je s poli-APS inducirano lizo eritrocitov možno blokirati z različnimi sladkorji (osmotskimi protektanti). Le tisti osmoprotektanti, ki imajo molekulsko maso večjo od 1500 Da preprečijo hemolizo. Sladkorji z manjšo molekulsko maso (glukoza, saharoza) ne preprečijo hemolize ali pa jo le delno preprečijo. Sladkorji z višjo molekulsko maso (2 ali 4 kDa polietilenglikol) pa upočasnijo hemolizo. Hemolitična aktivnost CPC je v prisotnosti 1 kDa polietilenglikola za 80% manjša, aktivnost poli-APS pa je nespremenjena. To kaže da, poli-APS delajo večje pore v membrani kot CPC. Radij por, ki jih v membrani naredijo poli-APS, je okoli 2,9 nm.

Poli-APS so polikationi, vežejo se na negativno nabite molekule, torej je pričakovati, da se bodo vezali tudi na negativno nabite membranske lipide kot je npr. fosfatidna kislina. Pri vezavi fosfatidne kisline in poli-APS dejansko pride do agregacije. Posledica je popolna inhibicija hemolize. Pri pozitivno nabitih in nevtralnih lipidih (sfingomielin, holesterol, L- $\alpha$ -fosfatidilholin, gangliozid) ni opaziti inhibicije hemolize, ker se ti ne vežejo na poli-APS.

Membranska aktivnost poli-APS se kaže tudi v sposobnosti zaviranja nastanka celičnih kolonij (citocidni učinek) in inhibiciji celične delitve (citostatski učinek). Sepčić in sodelavci (1997b) so opazovali citocidni in citostatski učinek poli-APS na celice V-79, DC 3F in HeLa. Koncentracija, pri kateri preživi 50% celic za V-79 znaša  $4,1 \times 10^{-7}$ , za DC 3F  $2,8 \times 10^{-7}$  ter za HeLa celice  $2,9 \times 10^{-7}$  g/ml. Opazno je, da so transformirane celične linije HeLa in DC 3F nekoliko bolj občutljive od celic V-79, ki so normalna celična linija.

### 2.3.2.2 Inhibicija acetilholinesteraze

Acetilholinesteraza (AChE) je encim, ki hidrolizira nevrottransmitter acetilholin (ACh) do holina in acetata. Encim je v sinaptičnih špranjah med dvema živčnima celicama, oz. med živčno in mišično celico. Acetilholin je nevrottransmitter in ima vlogo pri odpiranju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  kanalov in pri depolarizaciji celice. Inhibicija AChE pripelje do smrti organizma zaradi nenehne vzdraženosti postsinaptične membrane (Sussman in sod., 1991). Hidroliza acetilholina poteka na dnu aktivnega žepa, v katerem ležita esterazno mesto z aktivnim serinom in katalitično anionsko mesto s negativno nabitimi aminokislinskimi ostanki (Quinn, 1987). Za hidrolizo je odgovoren serin, ki ga aktivira katalitična triada Ser-Glu-His (Rosenberry, 1975). Na vhodu v žep je periferno anionsko mesto. Vezava ligandov na periferno anionsko mesto destabilizira vezavo substrata (Kitz in sod., 1970) in modulira aktivnost encima (Mooser in Sigman, 1974) zaradi konformacijskih sprememb, ki ob tem nastanejo (Barak in sod., 1995). Zaradi tega je vezava na to mesto odgovorna za inhibicijo pri prebitku substrata. Nekateri inhibitorji AChE se vežejo le na anionsko mesto, nekateri le na periferno anionsko, nekateri pa se lahko vežejo na oba (Sepčić in sod., 1998).

Poli-APS učinkovito inhibirajo AChE, vendar je časovni potek inhibicije nenavaden in sestavljen iz treh različnih faz. Raziskave biološke aktivnosti sintetičnih 3-alkilpiridinijevih spojin (monomeri, dimeri, tetrameri) so pokazale, da veliko vlogo pri inhibiciji igrata stopnja polimerizacije in dolžina alkilne verige. Z višanjem stopnje polimerizacije je večja tudi inhibicija acetilholinesterazne aktivnosti, spreminja pa se tudi mehanizem inhibicije (Mancini in sod., 2004). Poli-APS se vežejo na periferno anionsko regijo encima, ki ima zaradi velikega števila negativno nabitih aminokislinskih ostankov najvišjo afiniteto za vezavo. Začetna stopnja interakcije med encimom in inhibitorjem kaže nekompetitivno

reverzibilno inhibicijo, saj poli-APS tekmujejo s substratom za vezavo na periferno anionsko mesto. Na periferno anionsko mesto se lahko veže tudi reverzibilni inhibitor propidij, ki delno zaščiti encim pred inhibicijo s poli-APS. Obstaja veliko dokazov, da se po vezavi na periferno aktivno mesto poli-APS veže tudi na preostala mesta na encimu, kot so aromatski in negativno nabiti aminokislinski ostanki. Do ireverzibilne inhibicije AChE običajno prihaja zaradi kovalentne vezave encima in inhibitorja (npr. pri karbamatih in organofosfatih), vendar poli-APS nimajo nobene reaktivne skupine, ki bi lahko tvorila kovalentno vez v aktivnem mestu, poleg tega pa so tudi prevelike molekule, ki jim je dostop do aktivnega mesta onemogočen. Vezava na večih mestih, ki vodi v agregacijo in obarjanje encima, verjetno povzroči ireverzibilno inhibicijo (Sepčić in sod., 1998). Še en dokaz v potrditev hipoteze o vezavi inhibitorja na več mestih, je interakcija poli-APS s triptofanom. Poli-APS se vežejo na dostopne triptofanske ostanke na molekuli AChE in dušijo njihovo fluorescenco (Sepčić in sod., 1999). Nad določeno koncentracijo poli-APS se triptofanska fluorescenca ne spreminja več, saj so vsa vezavna mesta že zasedena, preostala fluorescenca pa izhaja le še iz nedostopnih triptofanov (Lakowicz, 1988).

### 2.3.2.3 Antitumorska aktivnost

Nedavno so odkrili, da poli-APS delujejo selektivno na enega od tipov celic pljučnega raka (Paleari in sod., 2006). Obstajata dva glavna tipa pljučnega raka. V približno 75-80% primerov gre za ne-male rakave pljučne celice (NSCLC), v 20-25% pa za male rakave pljučne celice (SCLC).

SCLC je drobnocelični pljučni rak. Zelo hitro se širi in metastazira in je ozko povezan z uporabo tobaka (Weiss, 1983). Del holinergičnega sistema so nikotinski receptorji, ki vežejo nikotin (Cattaneo in sod., 1997). SCLC izražajo acetilholinske receptorje in če te receptorje stimulira nikotin ali drugi agonist, pride do aktivacije nikotinskega holinergičnega receptorja (nAChRs) in/ali muskarinskega holinergičnega receptorja (mAChRs) in posledično do celične rasti (Maneckjee in Minna, 1990; Chini in sod., 1992). SCLC celice izražajo holinacetiltransferazo (ChAT), vezikularni transporter ACh (VAChT) in holinergične receptorje.

NSCLC je najbolj pogosta oblika pljučnega raka. NSCLC se sicer pojavlja tudi pri nekadilcih, a je tobak ključni dejavnik za razvoj raka (Pathak in sod., 2004). NSCLC celične linije in celice izolirane iz primarnih NSCLC izražajo holinacetyltransferazo (ChAT), vezikularni transporter ACh (VACHT) in acetilholinesterazo (AChE) (Paleari in sod., 2006).

Glede na to, da so ACh receptorji v povezavi z rastjo celic pljučnega raka, bi teoretično poli-APS kot inhibitorji AChE lahko ustavili ali vsaj upočasnili rast rakavih celic. Interakcija AChE z visoko polimeriziranim poli-APS konča z ireverzibilno inhibicijo encima. Poli-APS so zato toksične za NSCLC celice v koncentracijah, ki niso toksične za normalne celice.

#### 2.3.2.4 Protivegetativna aktivnost

Protivegetativna aktivnost (antifouling) je preprečevanje naseljevanja živih organizmov na potopljene površine, zlasti v morju. Odsotnost epibiontov na površini spužve *Reniera sarai* nakazuje, da poli-APS ščitijo spužvo pred preraščanjem z različnimi mikro- in makroorganizmi. Faimali in sodelavci (2003a) so preučevali vpliv poli-APS na inhibicijo kolonizacije ličink raka vitičnjaka *Balanus amphitrite*, Garaventa in sodelavci (2003) pa so preučevali inhibicijo tvorbe biofilmov. Rezultate inhibicije s poli-APS so primerjali z delovanjem komercialno dostopnih biocidov na bazi bakrovih (Cu-Omadine®, oz. Cu-P) in cinkovih (Zn-Omadine®, oz. Zn-P) kompleksov s piritioni. Ugotovili so, da so poli-APS v primerjavi z omenjenimi biocidi okrog 10 krat manj uspešne kot Zn-P, in celo 100 krat manj uspešne kot Cu-P.  $EC_{50}$  za *B. amphitrite* je bil za poli-APS (0,27 µg/ml) višji kot za komercialne biocide (za bakrov kompleks je  $EC_{50}$  manj kot 0,01 µg/ml, za cinkov pa je  $EC_{50}$  0,02 µg/ml). Tudi uspešnost preprečevanja kolonizacije mikroalge *Tetraselmis suecica* s poli-APS je 100 krat manj učinkovita kot s Zn-P in 1000 krat manj kot s Cu-P. Vendar pa so komercialni biocidi zelo toksični, pri poli-APS pa toksičnih vplivov niso dokazali. Ob dodatku poli-APS pride do inhibicije vsedanja in pritrjevanja ličink vrste *B. amphitrite* na potopljene površine, po zamenjavi morske vode in odstranitvi poli-APS pa postanejo ličinke spet aktivne in lahko kolonizirajo druge površine. Po drugi strani ličinke, ki so jih izpostavili komercialnim biocidom izgubijo zmožnost ponovne kolonizacije

površin. Molekularni mehanizem inhibicije kolonizacije s poli-APS lahko razložimo na več načinov. Poli-APS inhibira acetilholinesterazno (AChE) aktivnost (Sepčić in sod., 1998). Faimali in sodelavci (2003b) so opazili da je acetilholin, ki je prisoten v antenah *B. amphitrite* igra določeno vlogo pri prepoznavanju ustrezne podlage in pritrjevanju ličink. Paradoksalno se zaradi inhibicije AChE zviša raven acetilholina kar posledično poveča obseg kolonizacije. To pa je opazno le pri nizkih koncentracijah inhibitorjev AChE ( $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ ), pri višjih koncentracijah pa pride do inhibicije kolonizacije. Alternativna razlaga inhibicije kolonizacije s poli-APS so lahko njegove detergentom podobne lastnosti, ki preprečijo vezavo. V vodnih raztopinah se poli-APS obnašajo podobno kot detergenti in imajo podobne lastnosti kot kationski detergenti CPC in CTAB (Malovrh in sod., 1999). Posledično poli-APS preprečuje tudi nastanek mikrobnih biofilmov (Garaventa in sod., 2003). Poli-APS ne inhibirajo rast kopenskih (Sepčić in sod., 1997b; Mancini in sod., 2004), ampak samo morskih bakterij pri koncentracijah od 0.1 do 1  $\mu\text{g/ml}$  (Garaventa in sod., 2003).

### 2.3.3 Možna uporabnost poli-APS

Zaradi svojih lastnosti poli-APS lahko uporabljamo za različne namene.

Sposobnost poli-APS, da tvorijo pore v membrani lahko izkoriščamo pri transfekciji. Pri tem sta pomembna dejavnika velikost por ter njihova prehodna narava, ki omogočata prenos cDNA v celico ne da bi pri tem trajno poškodovali plazemsko membrano. Protokol zahteva predhodno inkubacijo celic s poli-APS, tako da se pore formirajo že pred dodatkom cDNA. Interakcije poli-APS in cDNA bi namreč lahko zmanjšale sposobnost nastanka por ali prenosa cDNA. Čeprav je lipofektamin bolj uspešen pri transfekciji, imajo poli-APS nekaj nedvomnih prednosti kot so visoka stabilnost, dobra topnost v vodi in enostavnost uporabe (Tucker in sod., 2003).

Zaradi izrazite protivegetativne aktivnosti, poli-APS lahko nadomestijo sedanja sredstva, ki se uporabljajo v ta namen. Prednost poli-APS je manjša toksičnost, saj so organizmi izpostavljeni poli-APS po določenem času brez poli-APS sposobni ponovno naseliti nove površine (Faimali in sod., 2003a). Zaradi nizke toksičnosti, topnosti in stabilnosti in

verjetno tudi razgradljivosti v morskem okolju, so poli-APS obetavni kandidati za vključevanje v zaščitne premaze za plovila in ostale potopljene površine (Sepčić in Turk, 2006).

Poli-APS bi lahko uporabljali tudi kot kemoterapeutik, saj so toksične za rakave NSCLC celice in obenem netoksične za normalne celice (Paleari in sod, 2006)

Zaradi vseh naštetih razlogov je vsekakor treba čimprej razviti učinkovito strategijo za kemijsko sintezo poli-APS in podobnih snovi. Monomeri, dimeri in tetrameri so bili že sintetizirani in testirani na nekatere biološke aktivnosti (Mancini in sod., 2004; Faimali in sod., 2005), vendar še vedno kažejo slabšo aktivnost od naravnih spojin z višjo stopnjo polimerizacije.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kemikalije

Preglednica 1: Uporabljene kemikalije

POPC	Avanti Polar Lipids, ZDA
POPS	Avanti Polar Lipids, ZDA
holesterol	Avanti Polar Lipids, ZDA
Kalcein	Sigma, ZDA
Sephadex G-50	Sigma, ZDA
Kloroform	Merck, Nemčija
NaOH	Merck, Nemčija
EDTA	Kemika, Hrvaška
NaCl	Merck, Nemčija
Tris	Merck, Nemčija
Fosfolipid B	Wako Chemicals, Nemčija
Izopropanol	Merck, Nemčija



### 3.1.2 Raztopine

Preglednica 2: Uporabljene raztopine

pufri	140 mM NaCl; 20 mM MES; 1 mM EDTA; pH 5
	140 mM NaCl; 20 mM MES; 1 mM EDTA; pH 6
	140 mM NaCl; 20 mM TRIS/HCl; 1 mM EDTA; pH 7
	140 mM NaCl; 20 mM TRIS/HCl; 1 mM EDTA; pH 8
	140 mM NaCl; 20 mM TRIS/HCl ; 1 mM EDTA; pH 9
Raztopina kalceina v vodi	80 mM
Raztopina detergenta Triton X-100	100 mM
DPH	0,5 $\mu$ M
Raztopina NaOH	100 mM
Suspencija govejih eritrocitov	

### 3.1.3 Oprema

Preglednica 3: Uporabljena oprema

pH meter	Mettler Toledo, Nemčija
magnetno mešalo	MM 540, Tehtnica, Slovenija
Rotavapor	R-134, Büchi, Švica
Ekstrudor	Avestin Lipid Extrudor, Kanada
Polikarbonatni filtri	Avestin, Kanada
Čitalec mikrotitrnih plošč MRX	Dynex Technologies, Denkendorf, Nemčija

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 3: Uporabljena oprema

Spektrofluorimeter	Jasco FP-750, Jasco Ltd, Essex, UK
Refraktometer Biacore X	Biacore, Uppsala, Švedska
Čip L1	Biacore AB, Uppsala, Švedska
Tehtnica	Sartorius, Švedska
Vibracijski stresalnik	Vibromix 114 EV, Tehtnica, Slovenija
Avtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija
Mikrotitrne plošče	Biacore AB, Uppsala, Švedska
Zamrzovalnik, -20 °C	Gorenje, Slovenija
Hladilnik, 4 °C	Gorenje, Slovenija
Centifuga	Centric 322A, Tehtnica, Slovenija
Spektrofluorimeter	Eclipse, Varian, Mulgrave, Victoria, Australia
Sonikator	Vibracell Ultrasonic Disintegrator, Sonics and Materials, ZDA

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Izolacija poli-APS

Poli-APS smo izolirali iz morske spužve *Reniera sarai*, kot je opisano v članku Sepčić in sod., 1997a.

### 3.2.2 Priprava liposomov

V okviru diplomske naloge smo uporabljali vezikle z naslednjo lipidno sestavo: fosfatidilholin (POPC), fosfatidilholin:fosfatidilserin (POPC:PS) v razmerju 1:1 in fosfatidilholin:holesterol (POPC:Chol) v razmerju 3:1. Za izdelavo teh liposomov smo uporabili komercialne lipide v prahu z znanimi molekulskimi masami: POPC (1-palmitoil-

2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin) z molsko maso 759,578 g/mol, POPS (1-palmitoil-oleoil-*sn*-glicero-3(fosfo-L-serin)) z molsko maso 783,503 g/mol in holesterol z molsko maso 386,355 g/mol. Pripravili smo liposome brez kalceina ter liposome s kalceinom. Pri pripravi slednjih smo uporabljali 80 mM kalcein. Komercialne lipide smo raztopili v kloroformu in potem 2 uri sušili v mali bučki na rotavaporju. Na stenah bučke je nastal lipidni film, ki smo mu dodali 1 ml ustreznega puфра (140 mM NaCl; 20 mM TRIS/HCl; 1 mM EDTA) ali 1 ml kalceina in 10-15 steklenih kroglic. Z mešanjem na vibracijskem stresalniku smo odlepili lipidni film s stene bučke, tako da so nastali multilamelarni vezikli (MLV). Pripravljene MLV smo predstavili v epico in prepihali z dušikom ter jih shranili na -20 °C do nadaljne uporabe. MLV smo prenesli v kriogeno posodico in jih izpostavili 8 ciklom zamrzovanja s tekočim dušikom in odtaljevanja v vodi s temperaturo 40 °C. Na ta način so se lipidne plasti odlepile ena od druge in so se povečali interlamelarni prostori. Naslednji korak pri pripravi LUV je ekstruzija. MLV smo filtrirali 29-krat čez 2 polikarbonatna filtra, nameščena v ekstrudor. Filtri imajo pore točno določene velikosti (100 nm), tako da smo na ta način dobili homogeno populacijo liposomov. Iz raztopine LUV s kalceinom smo prosti kalcein, ki je v okolici veziklov, odstranili z gelsko filtracijo. Uporabili smo kolone Pierce, ki smo jih napolnili z gelom Sephadex G-50 in trikrat spirali s puфrom (140 mM NaCl; 20 mM TRIS/HCl; 1 mM EDTA; pH 8). Na gel smo nanесли 75  $\mu$ l vzorca in centrifugirali pri 1000 obratih/min. V enominutnih intervalih smo zbirali frakcije liposomov. Pripravljene LUV smo hranili pri 4 °C. Pri vsakem odpiranju epic z liposomi smo vsebino na kratko prepihali z dušikom, da bi liposome zaščitili pred oksidacijo. Vezikle s kalceinom smo zaščitili pred svetlobo z alufolijo. Pripravljene lipidni vezikli so imeli koncentracijo 10 mg/ml in smo jih po potrebi redčili.

### 3.2.3 Določanje koncentracije lipidnih veziklov

Pri pripravi liposomov se zaradi izgub pri ekstruziji koncentracija veziklov običajno zmanjša, zato smo koncentracijo lipidov določali še z encimskim testom Phospholipids B, ki zazna prisotnost holinskih lipidov. Zmešali smo 10  $\mu$ l vzorca ali puфра za slepo kontrolo ali standarda in 300  $\mu$ l pripravljene encimske raztopine. Standard je bil holin klorid s koncentracijo 3 mg/ml. Encimska raztopina je mešanica fosfolipaze D, holin oksidaze, peroksidaze v Tris puфru, fenola in 4-aminoantiprina s koncentracijo 1 mg/ml. Mešanice

smo inkubirali 30 minut pri 37 °C. Med inkubacijo fosfolipaza D hidrolizira fosfolipide do prostega holina. Holin nato v prisotnosti holin oksidaze oksidira v betain. Pri tem nastane vodikov peroksid, ki oksidativno združi 4-aminoantipirin in fenol, kar zaznamo kot pojav rdeče barve. Po inkubaciji smo izmerili absorpcijo pri valovni dolžini 550 nm in izračunali koncentracije lipidov po formuli:

$$\text{koncentracija} = 3 \text{ mg/ml} * (A_{\text{vzorec}} - A_{\text{stepta}}) / (A_{\text{standard}} - A_{\text{stepta}}) \quad \dots(1)$$

Iz dobljenih koncentracij smo izračunali koncentracije veziklov.

### 3.2.4 Določanje vpliva pH, temperature in lipidne sestave na urejenost membranskih lipidov

#### 3.2.4.1. Anizotropija in polarizacija

S spektrofluorimetrom smo določali anizotropijo in polarizacijo. Obe metodi sta zelo občutljivi na spremembe v rotacijskih gibanjih molekul. Temeljita na fluorescenci. Fluorescenca je emisija svetlobe, ki se pojavi, ko se molekula iz vzbujenega stanja vrne v osnovno. Emisijski spektri imajo daljše valovne dolžine. Če sistem, ki fluorescira obsevamo s polarizirano svetlobo, bo tudi emitirana svetloba polarizirana. To je posledica selektivnega vzbujanja fluoroforjev. Pride do vzbujanja le tistih fluoroforjev, katerih absorpcijski momenti so v isti ravnini kot polarizirana vzbujevalna svetloba. Z večanjem kota, za katerega se fluorofor zasuka, se vrednost polarizacije zmanjšuje. Kot zasuka fluorofora je odvisen od rigidnosti okolja. V manj rigidnih okoljih je kot zasuka večji in posledično vrednost polarizacije manjša (Poklar Ulrich, 1994).

Polarizacijo lahko izračunamo na naslednji način:

$$P = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + GI_{VH}) \quad \dots(2)$$

Faktor G je mrežni korekcijski faktor, ki ga dobimo z uporabo naslednje enačbe:

$$G = I_{HV} / I_{HH} \quad \dots(3)$$

$I_{VV}$ ,  $I_{VH}$ ,  $I_{HV}$  in  $I_{HH}$  so fluorescenčne intenzitete. Prvi indeks označuje, da je polarizator vzbujevalne svetlobe v vertikalnem (V) oz. v horizontalnem (H) položaju. Drugi indeks označuje položaj polarizatorja emisijske svetlobe (Rajkovski in Cittanova, 1981).

Anizotropijo lahko dobimo z uporabo naslednje enačbe:

$$A = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH}) \quad \dots(4)$$

V kiveto smo dodali pufer ustrezne pH vrednosti, lipidne vezikle v končni koncentraciji 5 mg/ml in 1,6-difenil-1,3,5-heksatrien (DPH) s koncentracijo 0,5  $\mu$ M. Skupni volumen je bil 2500  $\mu$ l. Mešanico smo nato sonicirali. Meritve so potekale pri eksitacijski valovni dolžini 358 nm in emisijski 410 nm. Delali smo pri treh različnih temperaturah (5 °C, 25 °C in 40 °C) in uporabljali pH vrednosti 5, 6, 7, 8 in 9.

### **3.2.5 Določanje vpliva pH, temperature in lipidne sestave na vezavo poli-APS na liposome**

#### **3.2.5.1 Površinska plazmonska resonanca**

Vezavo poli-APS na liposome smo prvotno spremljali z merjenjem površinske plazmonske resonance (ang. surface plasmon resonance, SPR) z aparatom Biacore X. Do pojava površinske plazmonske resonance pride, ko polarizirana svetloba trči ob kovinsko površino v razmerah, ki omogočajo popoln odboj svetlobe. Z uporabo pojava površinske plazmonske resonance določamo interakcije med molekulami na osnovi hitrosti asociacije in disociacije. Ob tem molekul ni potrebno kemijsko spremeniti. Vezavo spremljamo v realnem času in zaradi velike občutljivosti instrumenta potrebujemo zelo majhno količino ligandov in analitov, ne potrebujemo različnih označevalcev in lahko spremljamo tudi interakcije v kompleksnih sistemih. Analit imenujemo molekulo katere vezavo opazujemo, njeno tarčo na čipu pa ligand. Aparaturo za merjenje SPR sestavljajo senzorski čip, optični detektor in mikrotekočinski sistem. Senzorski čip je sestavljen iz steklene ploščice, prekrite s tanko plastjo zlata in dodatnih kemijskih skupin, ki omogočajo imobilizacijo liganda. Pri naših poskusih smo uporabili senzorski čip L1. Na senzorski čip imobiliziramo ligand; v

našem primeru so to različni LUV. Mikrotekočinski sistem so cevke, ki dovajajo raztopino molekule, ki jih želimo analizirati (analit) do površine senzorskega čipa. Vezava molekule analita (v našem poskusu poli-APS) na ligand (v našem poskusu različni liposomi) spremeni lomni količnik in posledično se spremeni kot popolnega odboja svetlobe, pri katerem zaznamo SPR. Optični detektor izmeri spremembo kota. Detektiran signal izražamo v RU enotah (resonance units). Med maso snovi na površini čipa in RU obstaja linearna veza. Senzorgram je krivulja, ki nam podaja spremembo odziva v času. Prva faza senzorgrama je faza asociacije, ko se analit veže na ligand. Zaznamo jo kot naraščanje signala. Ko so vsa vezavna mesta liganda zasedena, pride do nasičenja in se signal ustali. To je faza ravnotežja. Naslednja stopnja je disociacija, do katere pride ko prenehamo vbrizgavati vzorec preko senzorskega čipa. V tej stopnji se analit sprošča z liganda. Na koncu je na čipu vezan le ligand in je odziv enak kot na začetku. Iz faze asociacije in disociacije lahko določimo hitrost vezave, iz faze ravnotežja pa sklepamo koliko analita je vezanega na čip. V idealnih razmerah v fazi disociacije pride le do disociacije, pogosto pa pride do ponovne vezave analitov. Pojav je posledica masnega transporta zaradi visoke gostote liganda, saj se na površini čipa vezava analita podaljša v fazo disociacije. Z masnim transportom omejena asociacija ima za posledico nižjo stopnjo vezave, zato je za določanje asociacije potrebno meritve izvajati v razmerah, ko masni transport ni omejitveni dejavnik. To lahko dosežemo z povečevanjem hitrosti pretoka in z zmanjševanjem količine liganda (Anderluh, 2007).

Za naše poskuse smo uporabili L1 senzorski čip (Biacore AB, Uppsala, Sweden).

Površina L1 čipa je prekrita s polisaharidom dekstranom, na katerega so vezane alkilne verige. Alkilne verige so lipofilne in imobilizirajo nanešene lipidne vezikle. Vezikle je potrebno nanašati pri nizkih pretokih. Vezavna kapaciteta L1 čipa je omejena, maksimalno število vezanih veziklov je  $125 \times 10^6$  (Anderluh in sod., 2005).

Vse ostale kemikalije (izopropanol:100 mM NaOH v razmerju 2:3, 100 mM NaOH, poli-APS) smo pripravili v odzračnem in filtriranem pufru z ustrežno vrednostjo pH. Isti pufer smo uporabili tudi za spiranje. Poskuse smo delali z enako količino poli-APS (1  $\mu\text{g/ml}$ ), spreminjali smo pa pH (5, 6, 7, 8 in 9), vezikle (POPC, POPC:Chol in POPC:PS) in temperaturo (25 °C in 40 °C). Pri temperaturi 5 °C nismo merili, ker aparat ne more meriti

pri nizkih temperaturah. Vezikle smo razredčili v pufru z ustrežno pH vrednostjo do končne koncentracije 0,5 mM. Injicirali smo 10  $\mu$ l LUV in jih nanašali na čip z hitrostjo 1  $\mu$ l/min, dokler nismo dosegli popolne prekritosti čipa (7000-8000 RU). Potem smo injicirali 100  $\mu$ l NaOH pri pretoku 30  $\mu$ l/min in na ta način sprali lipidne agregate in slabo absorbiran material. Spiranje smo nadaljevali s pufrom ustrezne pH vrednosti. Preko stabilno imobiliziranih LUV smo nato injicirali 100  $\mu$ l poli-APS pri pretoku 30  $\mu$ l/min. Ob kontinuiranem spiranju s pufrom ustrezne pH vrednosti smo spremljali disociacijsko kinetiko. Po zaključku poskusa smo čip sprali z mešanico izopropanola in 100 mM NaOH v razmerju 2:3. Vsak poskus smo izvedli v dveh ponovitvah.

#### 3.2.5.2 Test inhibicije hemolize

Test inhibicije hemolize je test, s katerim lahko posredno ugotovimo če se poli-APS vežejo na lipidne vezikle. Po inkubaciji MLV in poli-APS dodamo eritrocite in ugotavljamo, če pride do hemolize eritrocitov. Če se poli-APS vežejo na liposome, potem le-te niso na razpolago za hemolizo eritrocitov. Če pa se poli-APS ne vežejo na liposome, bodo ostale na razpolago za hemolizo eritrocitov, ki jo lahko spremljamo. Hemolizo smo merili s turbimetrično metodo na mikrotitrnih ploščah s čitalcem mikrotitrnih plošč MRX, Dynex Technologies (ZDA) pri 25 °C.

MLV smo redčili do koncentracije 5 mg/ml. V prvo vrstico mikrotitrne plošče smo dodali 150  $\mu$ l pufra ustrezne pH vrednosti (od 5 do 9) in 50  $\mu$ l MLV. Z multikanalno pipeto smo v naslednje vrstice prenašali po 100  $\mu$ l raztopine in tako jo vsakič 2x razredčili. V zadnjo vrstico smo dodali samo pufer. V vsako luknjico mikrotitrne plošče smo potem dodali po 5  $\mu$ l poli-APS s koncentracijo 0,2 mg/ml. V vrstici A je bila koncentracija MLV 1,25 mg/ml. V naslednjih vrsticah (B, C, D, E, F, G) se je koncentracija zmanjševala (0,625, 0,312, 0,156, 0,078, 0,039 in 0,019 mg/ml), medtem ko v vrstici H sploh ni bilo MLV (slepa proba). Ploščo smo inkubirali 30 min pri sobni temperaturi. V vse jamice smo nato z multikanalno pipeto dodali po 100  $\mu$ l suspenzije govejih eritrocitov in spremljali potek hemolize 30 min pri 630 nm. Začetna absorpcija mešanice je pri 630 nm imela vrednost 0,5. Po končanih meritvah smo odčitali čas, ki je bil potreben za 50 % hemolizo ( $t_{50}$ ). Pri

pH 5 in pH 6 so tudi v kontrolah eritrociti lizirali in zato teh podatkov nismo upoštevali. Poskuse smo izvedli samo pri 25 °C.

### 3.2.5.3 Test sipanja svetlobe

Vezavo poli-APS na lipidne vezikle smo spremljali tudi s spektrofotometričnim testom sipanja svetlobe. Če sta emisijska in eksitacijska valovni dolžini enaki, ali če je emisijska valovna dolžina večkratnik eksitacijske, je v raztopini možno opaziti večje komplekse in agregate. Meritve so potekale pri enaki emisijski in eksitacijski valovni dolžini (400 nm). V spektrofotometer Jasco FP-750 smo dodali 1 ml pufru ustrezne pH vrednosti (od 5 do 9) in toliko LUV, da je bil začetni signal okrog 200 (okrog 0,5 mM). V 60-sekundnih presledkih smo štirikrat zapored dodali po 2,5 µl poli-APS s koncentracijo 2 mg/ml. Poskusi so potekali pri 5 °C, 25 °C in 40 °C. Sipanje svetlobe smo spremljali v odvisnosti od pH, temperature in lipidne sestave.

## 3.2.6 Določanje vpliva pH, temperature in lipidne sestave na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS

### 3.2.6.1 Test sproščanja kalceina

S spektrofotometrom Jasco FP-750 smo spremljali s poli-APS povzročeno sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov. Uporabili smo kvarčno kiveto in magnetno mešalo, ki je poskrbelo za konstantno mešanje vzorcev. Kiveto smo napolnili z 1 ml pufru ustrezne pH vrednosti (od 5 do 9). Vezikle in pufre smo predhodno 15 minut inkubirali pri izbrani temperaturi. V kiveto s pufrom smo potem dodali ustrezno količino LUV (POPC, POPC:Chol, POPC:PS) in odčitali začetno fluorescenco ( $F_{\min}$ ). Nato smo dodali še 2 µl poli-APS s koncentracijo 0,5 mg/ml. Spremljali smo kinetiko sproščanja kalceina, dokler se krivulja ni umirila, oz. dokler sproščanje ni bilo maksimalno. Vrednost fluorescence po dodatku poli-APS ( $F_{izm}$ ) smo določali po prvi minuti in po peti minuti poteka reakcije, ko je bilo sproščanje maksimalno. Po končanem poskusu smo dodali še 10 µl detergenta Triton X-100 (100 mM), ko se je signal ustalil smo odčitali maksimalno fluorescenco ( $F_{\max}$ ). Triton X-100 namreč povzroči popolno lizo veziklov. Postopek smo ponovili pri



treh različnih temperaturah (5 °C, 25 °C in 40 °C). Delali smo v treh ponovitvah. Emisijo smo merili pri valovni dolžini 520 nm, eksitacijska valovna dolžina pa je bila 485 nm. Čas merjenja je bil 10 min. Odstotek sproščenega kalceina smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\% \text{ sproščenega kalceina} = (F_{izm} - F_{min}) / (F_{max} - F_{min}) \times 100 \quad \dots(5)$$

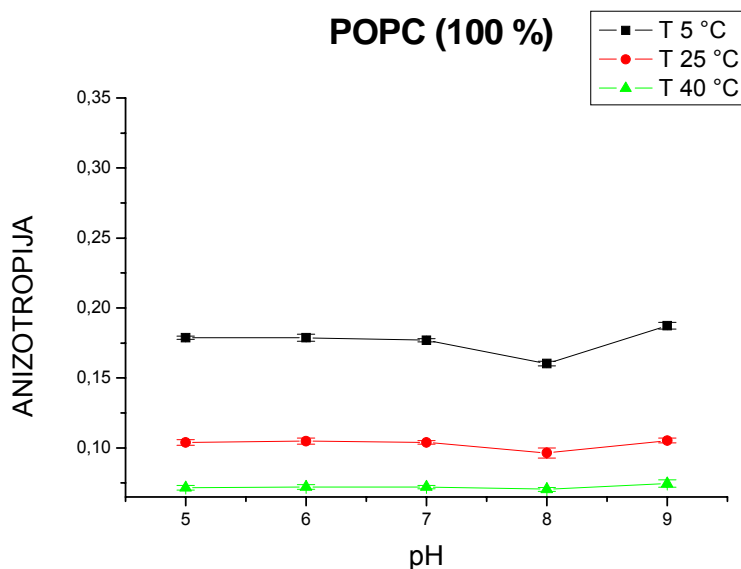
Izračunali smo procent sproščanja kalceina po eni minuti in po petih minutah, ko je bilo sproščanje maksimalno.

## 4 REZULTATI

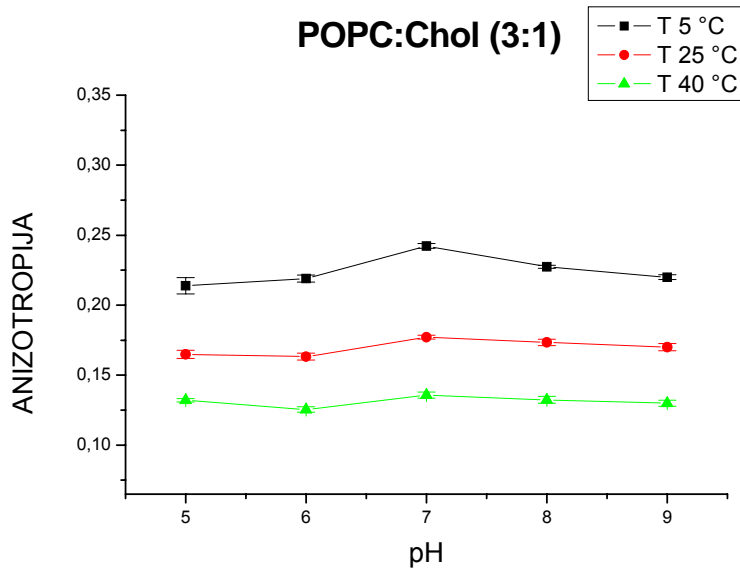
### 4.1 DOLOČANJE VPLIVA pH, TEMPERATURE IN LIPIDNE SESTAVE NA UREJENOST MEMBRANSKIH LIPIDOV

#### 4.1.1 Anizotropija in polarizacija

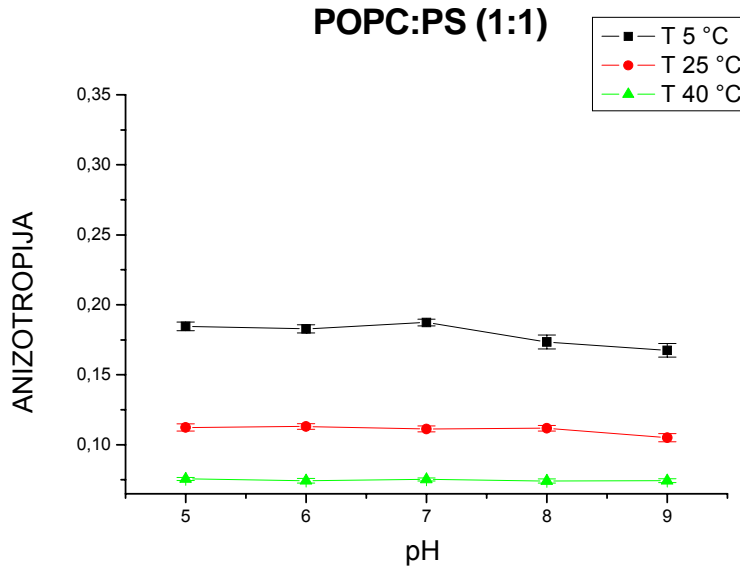
Odvisnost anizotropije od pH in temperature je prikazana na slikah 5, 6 in 7 odvisnost polarizacije pa na slikah 8, 9 in 10. Vrednosti anizotropije in polarizacije so višje pri nižjih temperaturah za vse vezikle. Ni opazna odvisnost od pH vrednosti. Najvišje vrednosti anizotropije in polarizacije smo dobili pri POPC:Chol (3:1) veziklih. POPC (100 %) in POPC:PS (1:1) pa imajo podobne vrednosti anizotropije in polarizacije.



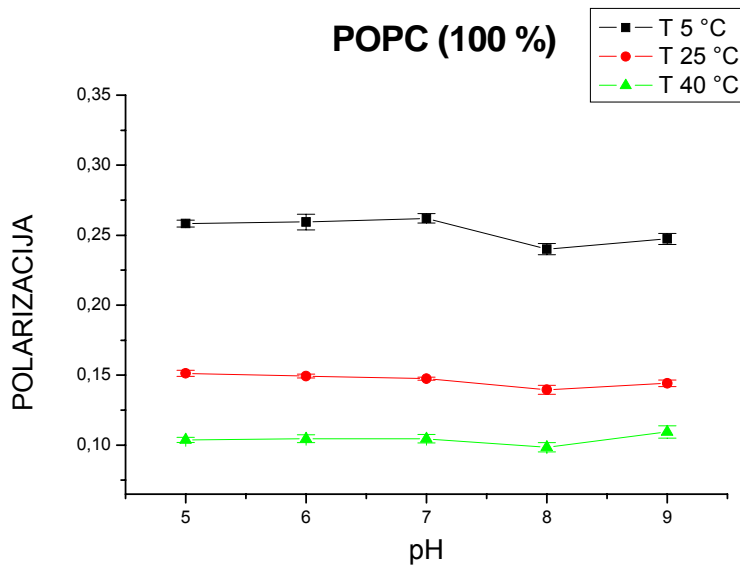
Slika 5: Vpliv pH vrednosti in temperature na anizotropijo veziklov sestavljenih iz POPC (100 %). Anizotropijo smo spremljali kot je opisano v poglavju 3.2.4.1.



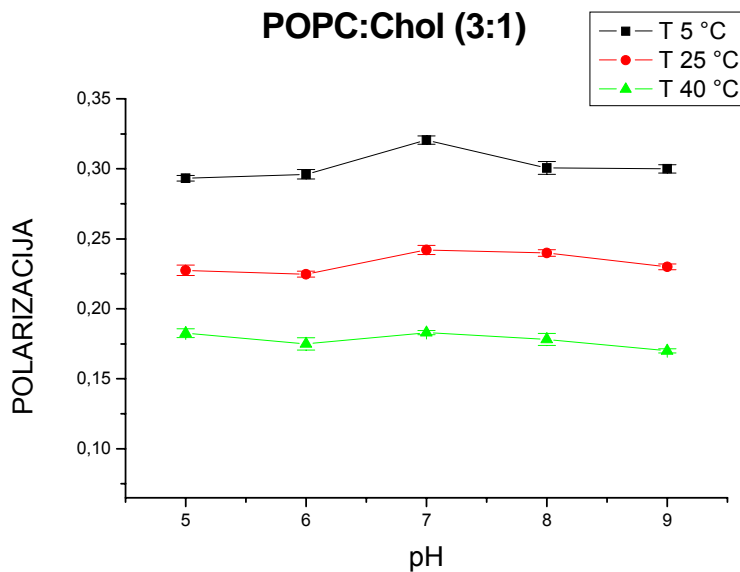
Slika 6: Vpliv pH vrednosti in temperature na anizotropijo veziklov sestavljenih iz POPC:Chol (3:1). Anizotropijo smo spremljali kot je opisano v poglavju 3.2.4.1.



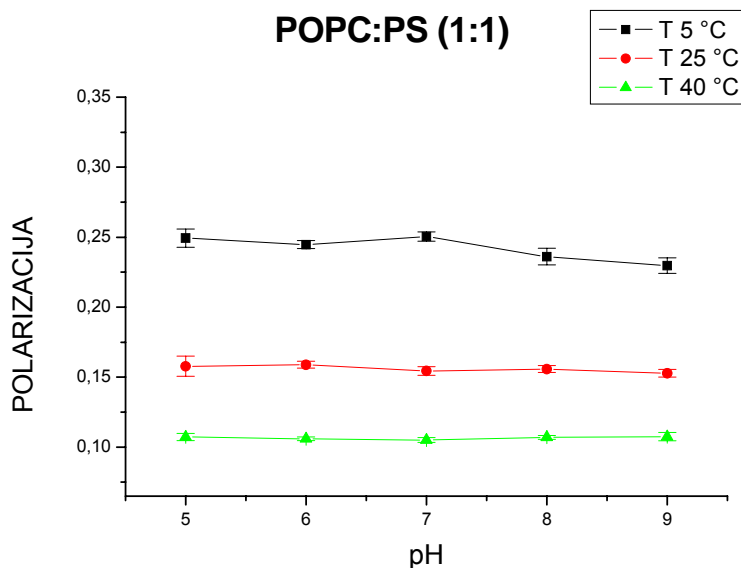
Slika 7: Vpliv pH vrednosti in temperature na anizotropijo veziklov sestavljenih iz POPC:PS (1:1). Anizotropijo smo spremljali kot je opisano v poglavju 3.2.4.1.



Slika 8: Vpliv pH vrednosti in temperature na polarizacijo veziklov sestavljenih iz POPC (100 %). Polarizacijo smo spremljali kot je opisano v poglavju 3.2.4.1.



Slika 9: Vpliv pH vrednosti in temperature na polarizacijo veziklov sestavljenih iz POPC:Chol (3:1). Polarizacijo smo spremljali kot je opisano v poglavju 3.2.4.1.



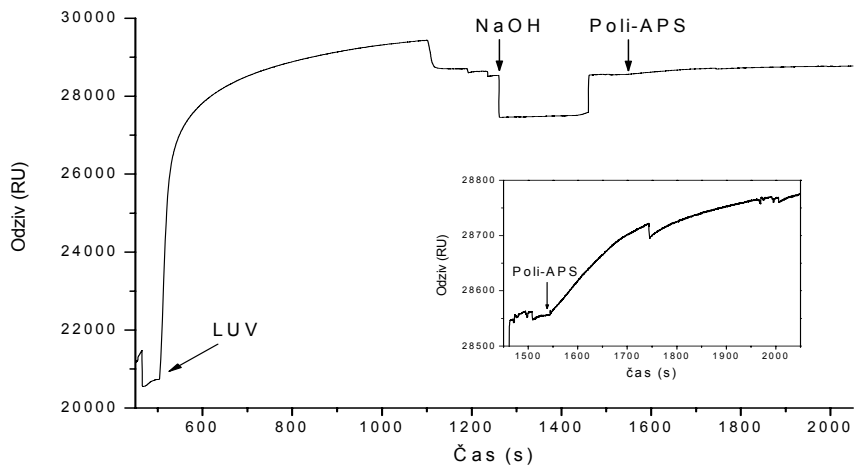
Slika 10: Vpliv pH vrednosti in temperature na polarizacijo veziklov sestavljenih iz POPC:PS (1:1). Polarizacijo smo spremljali kot je opisano v poglavju 3.2.4.1.

## 4.2 DOLOČANJE VPLIVA pH, TEMPERATURE IN LIPIDNE SESTAVE NA VEZAVO POLI-APS NA LIPOSOME

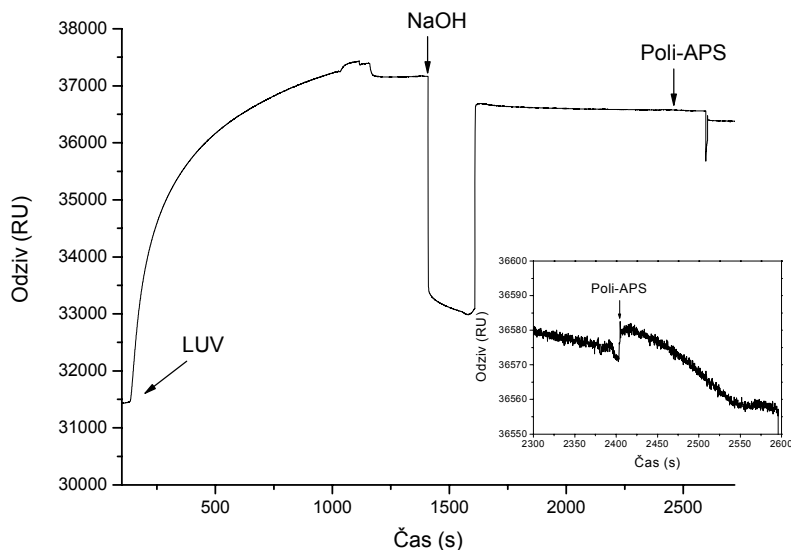
### 4.2.1 Površinska plazmonska resonanca

S površinsko plazmonsko resonanco naj bi ugotovili vezavo in disociacijo poli-APS, ki smo ga uporabili kot analit. Pri popolni prekritosti čipa z LUV je odziv bil 7000 do 8000 RU. Po nanosu poli-APS optični čitalec zazna spremembo kota, ga prevede v spremembo signala, ki ga izražamo v RU enotah. RU uporabimo pri določanju časovnega poteka asociacije in disociacije. Po koncu nanosa pride do disociacije in bi končni signal moral biti enak signalu pred dodatkom poli-APS. Naši poskusi žal niso bili ponovljivi. Signal je ponekod ostajal visok tudi po disociaciji, ponekod pa je po disociaciji bil celo nižji kot pred asociacijo, kot je prikazano na slikah 11 in 12. Slike, na katerih smo prikazali odvisnost vezave (RU) od pH, temperature in lipidne sestave veziklov zato niso reprezentativne, saj iz njih ne moremo določiti vzorca obnašanja. Iz slik 13 in 14, ki kažeta odvisnost vezave od pH oz. temperature lahko sklepamo, da metoda ni primerna za določanje vezave poli-APS na liposome. Neponovljivost meritev, oz. močan padec signala

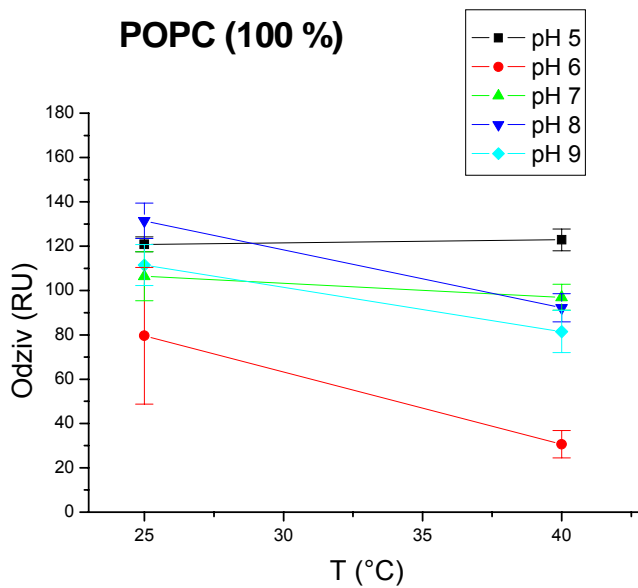
po končani disociaciji je bil razviden predvsem pri veziklih POPC:PS (1:1), zato teh rezultatov nismo prikazali v grafični obliki.



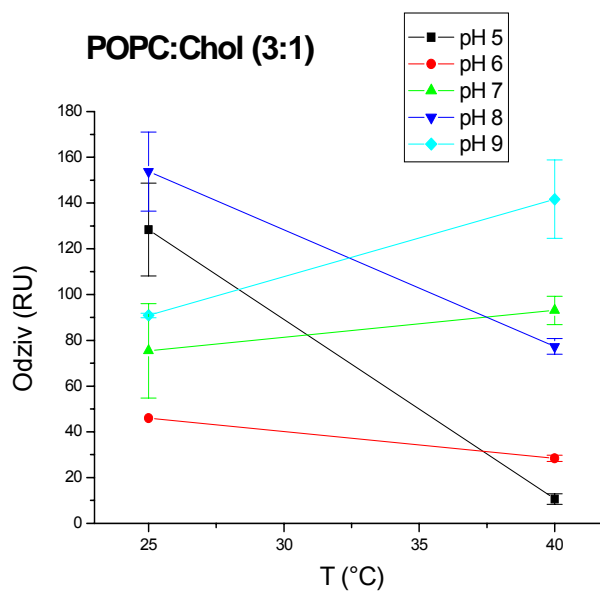
Slika 11: Reprezentativni SPR sensorgram, ki prikazuje potek asociacije in disociacije poli-APS (1 µg/ml) na lipidnih veziklih imobiliziranih na L1 čipu. Prikazan je primer, pri katerem signal po disociaciji narašča (vezikli POPC(100 %)). Povečano je prikazana faza po dodatku poli-APS.



Slika 12: Reprezentativni SPR sensorgram, ki prikazuje potek asociacije in disociacije poli-APS (1 µg/ml) na lipidnih veziklih imobiliziranih na L1 čipu. Prikazan je primer, pri katerem je signal po disociaciji nižji od signala pred disociacijo (vezikli POPC:PS (1:1)). Povečano je prikazana faza po dodatku poli-APS.



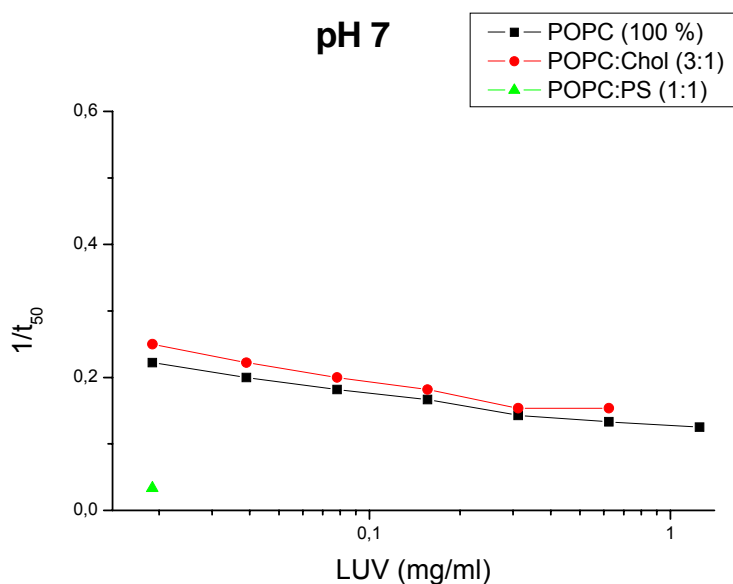
Slika 13: Vpliv temperature na vezavo poli-APS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) na vezikle iz POPC (100 %). Vezavo smo določali s tehniko površinske plazmske resonanice in smo je izvedli kot je opisano v poglavju 3.2.5.1.



Slika 14: Vpliv temperature na vezavo poli-APS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) na vezikle iz POPC:Chol (3:1). Vezavo smo določali s tehniko površinske plazmske resonanice in smo je izvedli kot je opisano v poglavju 3.2.5.1.

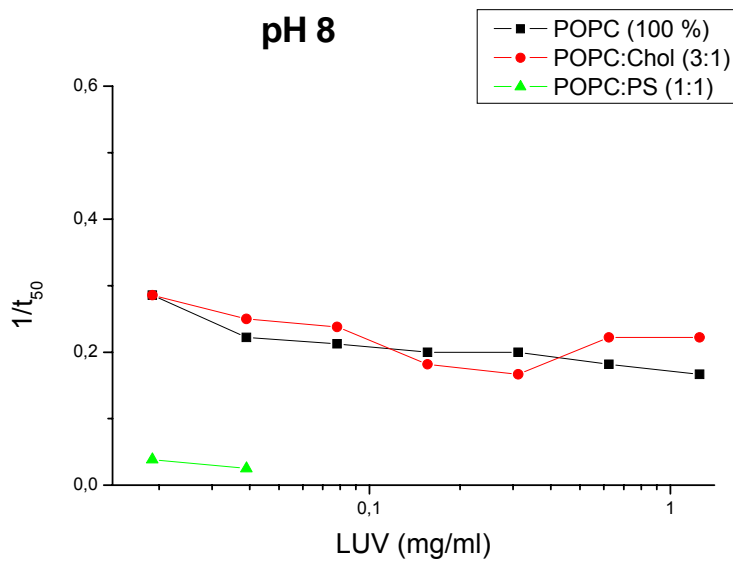
#### 4.2.2 Test inhibicije hemolize

S testom inhibicije hemolize smo posredno ugotavljali, kako lipidna sestava in pH vplivata na vezavo poli-APS na lipidne vezikle in posledično na inhibicijo hemolize. Iz slik 15, 16 in 17 pa je razvidna odvisnost hemolize od lipidne sestave in pH vrednosti. Pri pH 5 in pH 6 so eritrociti spontano lizirali in zato teh podatkov nismo upoštevali. Do inhibicije hemolize pride v primeru, ko se poli-APS predhodno vežejo na membrano, s tem pa jih ni na razpolago za hemolizo pozneje dodanih eritrocitov. Posledično pride do inhibicije hemolize. Iz grafov je razvidno, da so vezikli, ki vsebujejo PS najbolj dovzetni za vezavo s poli-APS, saj so pri vseh izmerjenih pH vrednostih (7, 8 in 9) najmočnejše inhibirali hemolizo. Dodatek holesterola na vezavo ni vplival – stopnja inhibicije je bila pri vseh pH vrednostih enaka tako pri vezikih iz POPC (100 %) kot pri tistih iz POPC:Chol (3:1). Vrednost pH vpliva na stopnjo inhibicije, saj je bila pri vseh treh vrstah veziklov vezava višja pri nižjih pH vrednostih ( $7 > 8 > 9$ ).

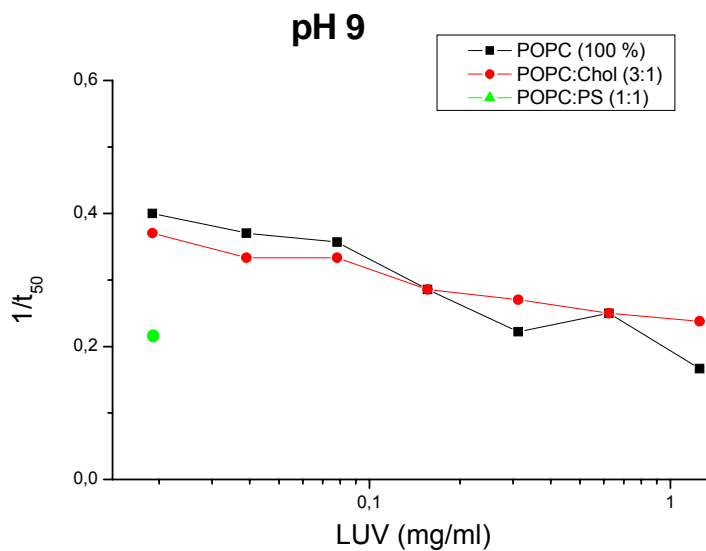


Slika 15: Vpliv lipidne sestave veziklov na inhibicijo s poli-APS (0,2 mg/ml) povzročene hemolize govejih eritrocitov pri pH 7 in pri 25 °C. Poskus smo izvedli, kot je opisano v točki 3.2.5.2.





Slika 16: Vpliv lipidne sestave veziklov na inhibicijo s poli-APS (0,2 mg/ml) povzročene hemolize govejih eritrocitov pri pH 8 in pri 25 °C. Poskus smo izvedli, kot je opisano v točki 3.2.5.2.



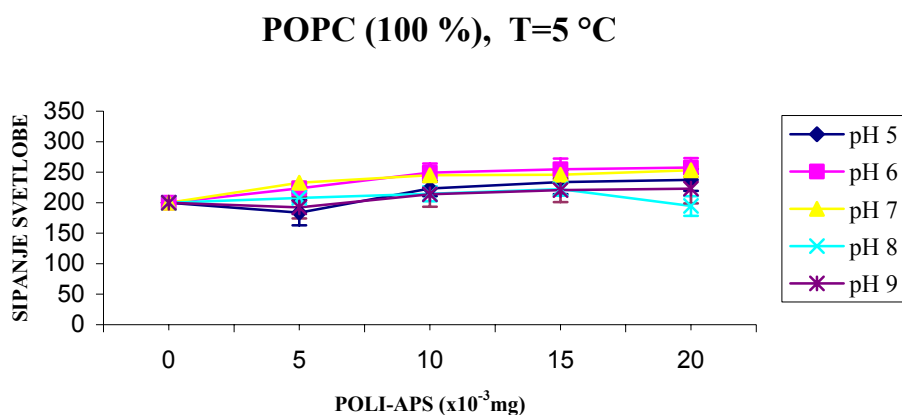
Slika 17: Vpliv lipidne sestave veziklov na inhibicijo s poli-APS (0,2 mg/ml) povzročene hemolize govejih eritrocitov pri pH 9 in pri 25 °C. Poskus smo izvedli, kot je opisano v točki 3.2.5.2.

### 4.2.3 Test sipanja svetlobe

S testom sipanja svetlobe smo opazovali, kako se agregacija in precipitacija lipidnih veziklov s poli-APS spreminjata v odvisnosti od pH (pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 in pH 9), temperature (5 °C, 25 °C in 40 °C) in lipidne sestave (POPC, POPC:Chol in POPC:PS).

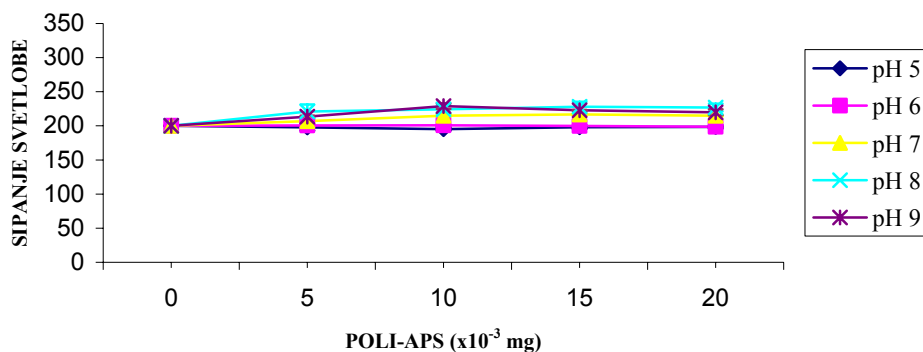
#### 4.2.3.1 Vezikli, zgrajeni iz POPC (100 %)

Iz slik 18, 19 in 20 je razvidno, da se z višanjem temperature sipanje svetlobe zmanjšuje. Če upoštevamo standardne napake pri 5 °C in 40 °C, sklepamo da sipanje svetlobe ni odvisno od pH vrednosti. Povečano sipanje svetlobe z naraščanjem koncentracije poli-APS je najbolj opazno pri 5 °C. Pri 25 °C je naraščanje sipanja nekoliko manj izraženo, pri 40 °C pa sipanje ni odvisno od višanja koncentracije poli-APS. V nobenem primeru pa nismo opazili zmanjšanja sipanja pri višjih koncentracijah poli-APS.



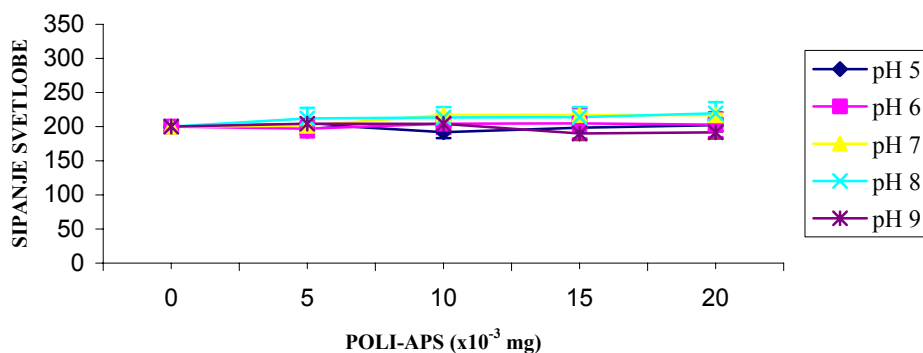
Slika 18: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC (100 %) pri 5 °C. Večje komplekse, ki bi lahko nastali zaradi agregacije poli-APS in lipidnih veziklov, smo spremljali s testom sipanja svetlobe kot je opisano v poglavju 3.2.5.3.

### POPC (100 %), T= 25 °C



Slika 19: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC (100 %) pri 25 °C. Večje komplekse, ki bi lahko nastali zaradi agregacije poli-APS in lipidnih veziklov, smo spremljali s testom sipanja svetlobe kot je opisano v poglavju 3.2.5.3.

### POPC (100 %), T=40 °C



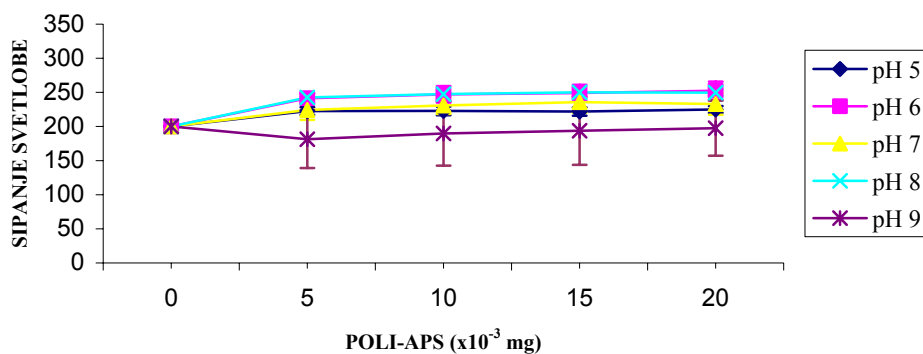
Slika 20: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC (100 %) pri 40 °C. Večje komplekse, ki bi lahko nastali zaradi agregacije poli-APS in lipidnih veziklov, smo spremljali s testom sipanja svetlobe kot je opisano v poglavju 3.2.5.3.

#### 4.2.3.2 Vezikli, zgrajeni iz POPC:Chol (3:1)

Tudi iz slik 21, 22 in 23 je, če ne upoštevamo krivulj, ki zelo odstopajo od ostalih (pH 9 pri 5 °C in pH 6 pri 40 °C), razvidno, da se sipanje zmanjšuje z višanjem temperature. Sipanje svetlobe ni odvisno od pH vrednosti. Pri vseh temperaturah in pH vrednostih je opazno

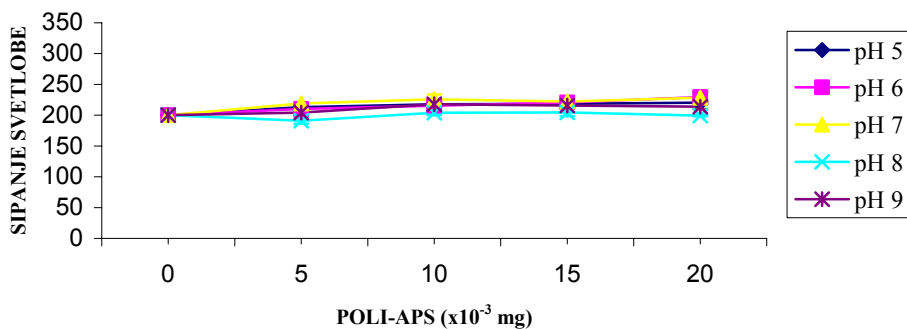
večje sipanje svetlobe z naraščanjem koncentracije poli-APS. Tako kot pri POPC veziklih, tudi pri POPC:Chol ni opazno obarjanje pri višjih koncentracijah poli-APS.

### POPC:Chol (3:1), T=5 °C

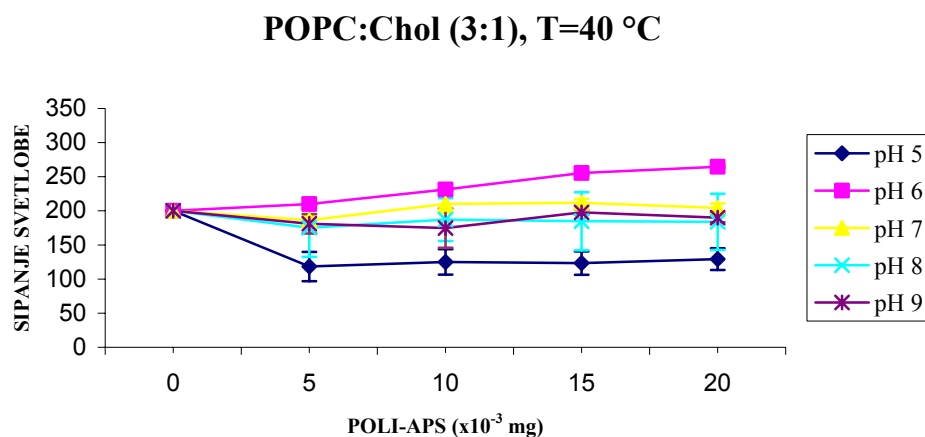


Slika 21: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC:Chol (3:1) pri 5 °C. Večje komplekse, ki bi lahko nastali zaradi agregacije poli-APS in lipidnih veziklov, smo spremljali s testom sipanja svetlobe kot je opisano v poglavju 3.2.5.3.

### POPC:Chol (3:1), T=25 °C



Slika 22: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC:Chol (3:1) pri 25 °C. Večje komplekse, ki bi lahko nastali zaradi agregacije poli-APS in lipidnih veziklov, smo spremljali s testom sipanja svetlobe kot je opisano v poglavju 3.2.5.3.

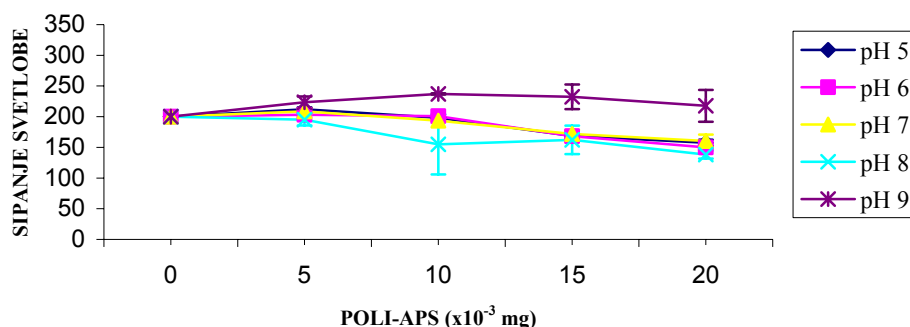


Slika 23: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC:Chol (3:1) pri 40 °C. Večje komplekse, ki bi lahko nastali zaradi agregacije poli-APS in lipidnih veziklov, smo spremljali s testom sipanja svetlobe kot je opisano v poglavju 3.2.5.3.

#### 4.2.3.3 Vezikli, zgrajeni iz POPC:PS (1:1)

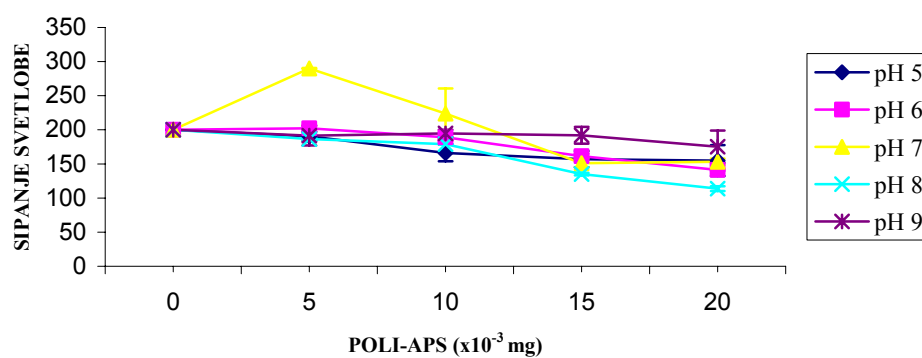
Slike 24, 25 in 26 prikazujejo vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC:PS (1:1). Tudi pri POPC:PS veziklih opazimo zmanjševanje sipanja svetlobe z višanjem temperature. Le pri pH 7 in 25 °C ter pH 9 in 40 °C tega nismo opazili. Ne opazimo odvisnosti sipanja svetlobe od pH vrednosti. Na začetku naraščanje koncentracije poli-APS spremlja močan dvig sipanja svetlobe. Pri 25 °C in pH 7 sipanje zelo naraste po dodatku 5 µg poli-APS. Pri 40 °C pa smo isti pojav opazili pri pH vrednostih 5, 6, 8 in 9 in sicer po dodatku 10 µg poli-APS. Z nadaljnim višanjem koncentracije poli-APS se sipanje svetlobe zmanjšuje.

### POPC:PS (1:1), T=5 °C

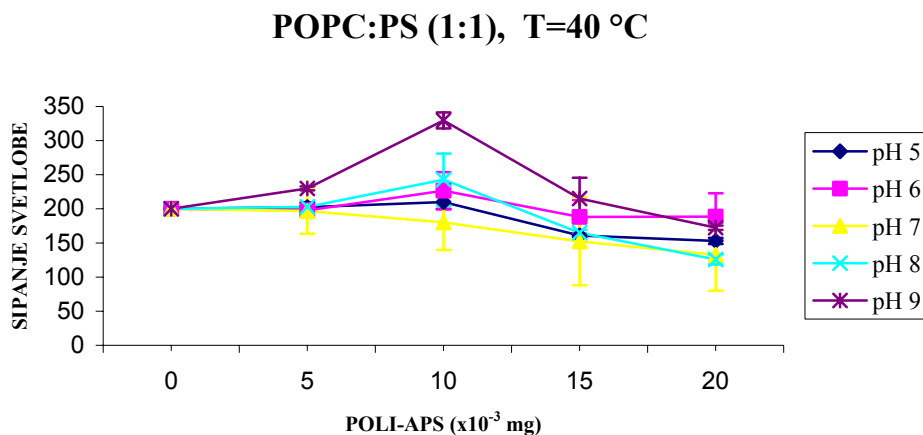


Slika 24: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC:PS (1:1) pri 5 °C. Večje komplekse, ki bi lahko nastali zaradi agregacije poli-APS in lipidnih veziklov, smo spremljali s testom sipanja svetlobe kot je opisano v poglavju 3.2.5.3.

### POPC:PS (1:1), T=25 °C



Slika 25: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC:PS (1:1) pri 25 °C. Večje komplekse, ki bi lahko nastali zaradi agregacije poli-APS in lipidnih veziklov, smo spremljali s testom sipanja svetlobe kot je opisano v poglavju 3.2.5.3.

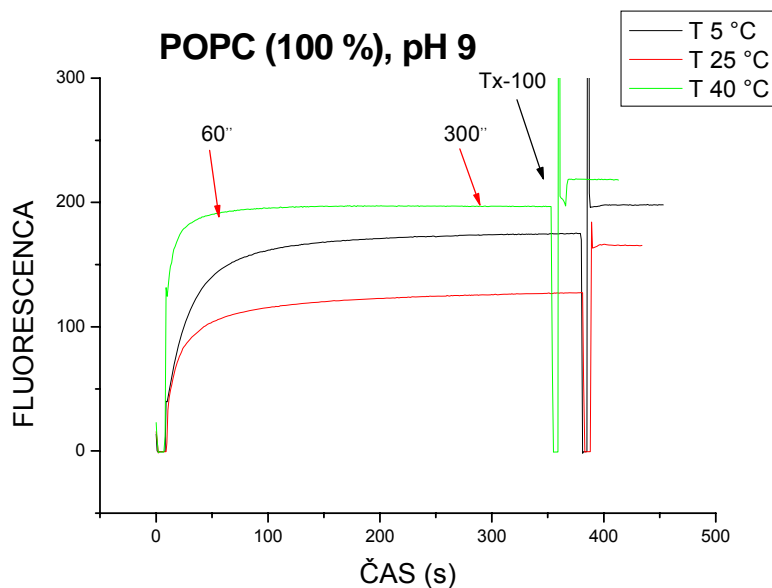


Slika 26: Vpliv pH vrednosti na vezavo poli-APS (2 mg/ml) in lipidnih veziklov sestavljenih iz POPC:PS (1:1) pri 40 °C. Večje komplekse, ki bi lahko nastali zaradi agregacije poli-APS in lipidnih veziklov, smo spremljali s testom sipanja svetlobe kot je opisano v poglavju 3.2.5.3.

#### 4.3 DOLOČANJE VPLIVA pH, TEMPERATURE IN LIPIDNE SESTAVE NA PERMEABILIZACIJSKO AKTIVNOST POLI-APS

##### 4.3.1 Test sproščanja kalceina

Na sliki 27 je prikazan reprezentativni časovni potek sproščanja kalceina, ki ga poli-APS (0,5 mg/ml) povzročijo v lipidnih veziklih.



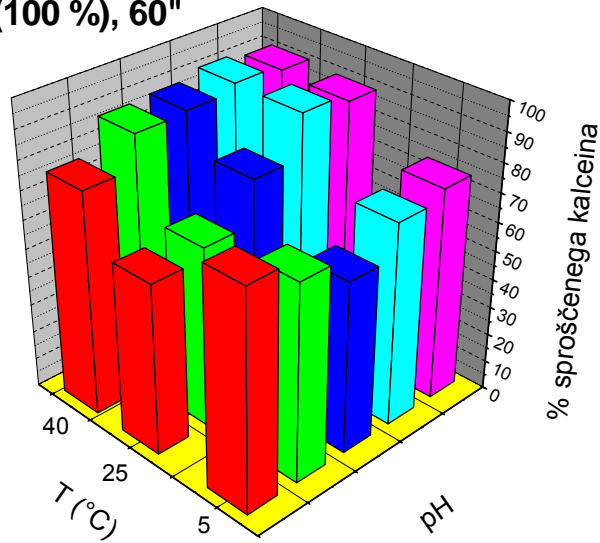
Slika 27: Reprezentativni časovni potek sproščanja kalceina, ki ga poli-APS (0,5 mg/ml) pri treh različnih temperaturah (5, 25 in 40 °C) povzročijo v veziklih zgrajenih iz POPC (100 %) pri pH 9. Črna puščica označuje čas, ko smo veziklom dodali detergent Triton X-100, s katerim smo dosegli 100% sproščanje kalceina. Z rdečimi puščicami je označen čas (60" in 300"), pri katerem smo odčitavali in računali količino sproščenega kalceina.

#### 4.3.1.1 Vezikli, zgrajeni iz POPC (100 %)

Odvisnost permeabilizacije POPC veziklov od pH in temperature prikazujeta sliki 28 in 29. Z višanjem temperature rahlo in zvezno narašča tudi procent sproščenega kalceina, kar pomeni, da je pri višjih temperaturah permeabilizacija nekoliko večja (Slika 28). To je najbolj opazno pri pH 7. Po 300 sekundah je vpliv temperature nekoliko manjši (Slika 29) in lahko sklepamo, da ima temperatura večji vpliv na sproščanje v začetnih fazah interakcije. Vpliv pH vrednosti je zelo variabilen in ne moremo določiti vzorca obnašanja.

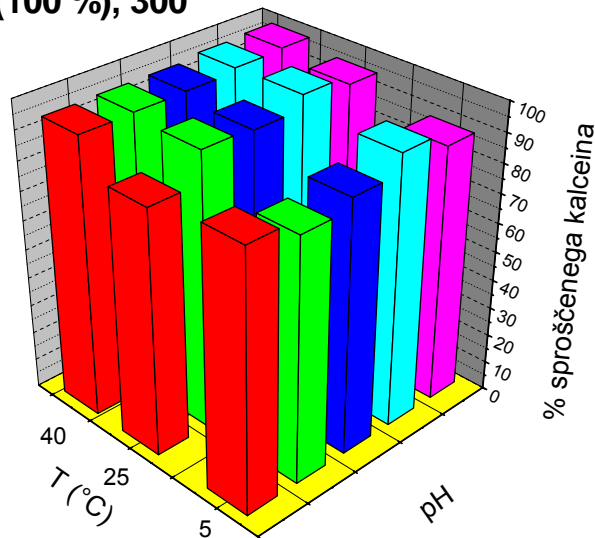


### POPC (100 %), 60"



Slika 28: Vpliv temperature in pH vrednosti na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS (0,5 mg/ml) na lipidnih veziklih sestavljenih iz 100 % POPC. Histogrami prikazujejo odstotek sproščenega kalceina 60" po dodatku poli-APS.

### POPC (100 %), 300"

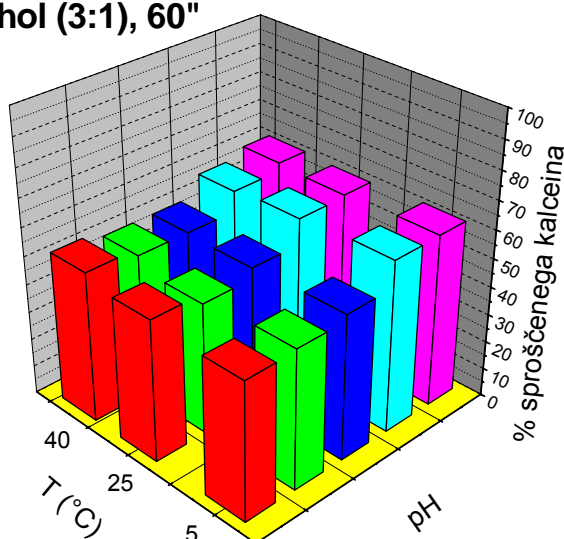


Slika 29: Vpliv temperature in pH vrednosti na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS (0,5 mg/ml) na lipidnih veziklih sestavljenih iz 100 % POPC. Histogrami prikazujejo odstotek sproščenega kalceina 300" po dodatku poli-APS.

#### 4.3.1.2 Vezikli, zgrajeni iz POPC:Chol (3:1)

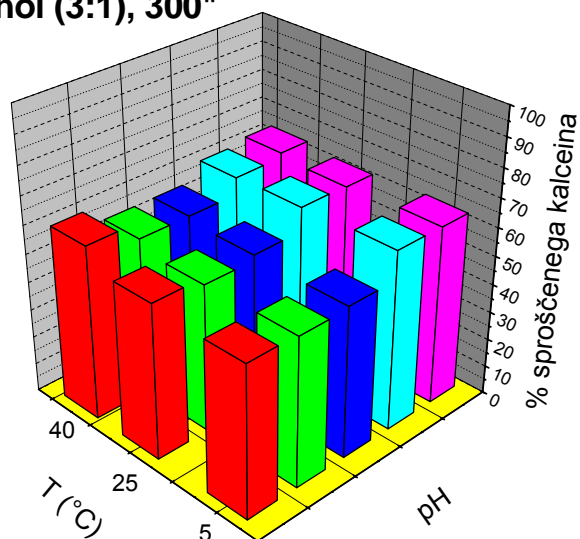
Sliki 30 in 31 prikazujeta odvisnost permeabilizacije POPC:Chol veziklov od pH in temperature. Odstotek sproščenega kalceina je bil pri veziklih s holesterolom neodvisno od pH in temperature bistveno nižji kot v primeru veziklov, sestavljenih iz čistega POPC (Sliki 28 in 29). Pri pH 5, pH 6 in pH 7 ne opazimo bistvenega spreminjanja aktivnosti v odvisnosti od temperature (Slika 30). Pri pH 8 in pH 9 sproščanje rahlo zvezno narašča z zviševanjem temperature in je nekoliko višje kot pri nižjih pH. Po 5 minutah reakcije smo opazili podobno obnašanje (Slika 31). Vpliv pH vrednosti je zelo variabilen. Od pH 5 do pH 7 zvezno pada, nato pa zopet začne naraščati.

**POPC:Chol (3:1), 60"**



Slika 30: Vpliv temperature in pH vrednosti na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS (0,5 mg/ml) na lipidnih veziklih sestavljenih iz POPC:Chol (3:1). Histogrami prikazujejo odstotek sproščenega kalceina 60" po dodatku poli-APS.

### POPC:Chol (3:1), 300"

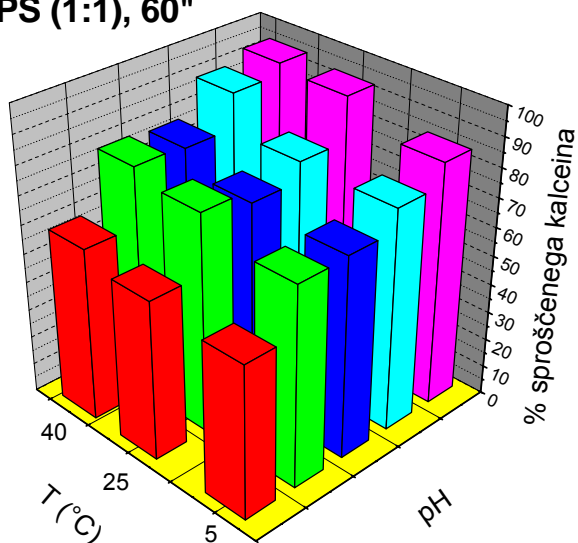


Slika 31: Vpliv temperature in pH vrednosti na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS (0,5 mg/ml) na lipidnih veziklih sestavljenih iz POPC:Chol (3:1). Histogrami prikazujejo odstotek sproščenega kalceina 300" po dodatku poli-APS.

#### 4.3.1.3 Vezikli, zgrajeni iz POPC:PS (1:1)

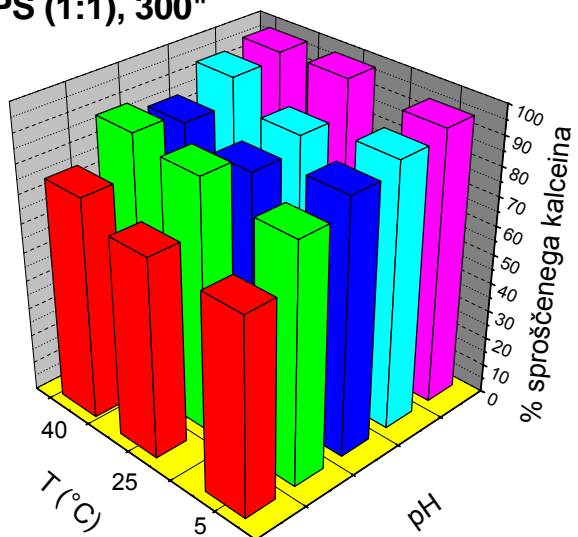
Odvisnost permeabilizacije POPC:PS veziklov od pH vrednosti in temperature je prikazana na slikah 32 in 33. Temperatura nima bistvenega vpliva na sproščanje kalceina. Sproščanje kalceina le rahlo in zvezno narašča z višanjem temperature (Slika 32), podobno kot pri maksimalnem sproščanju (Slika 33). Pri POPC:PS veziklih je najbolj izrazit vpliv pH vrednosti na sproščanje kalceina. Sproščanje kalceina pri vseh temperaturah zvezno narašča z višanjem pH vrednosti.

### POPC:PS (1:1), 60"



Slika 32: Vpliv temperature in pH vrednosti na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS (0,5 mg/ml) na lipidnih veziklih sestavljenih iz POPC:PS (1:1). Histogrami prikazujejo odstotek sproščenega kalceina 60" po dodatku poli-APS.

### POPC:PS (1:1), 300"



Slika 33: Vpliv temperature in pH vrednosti na permeabilizacijsko aktivnost poli-APS (0,5 mg/ml) na lipidnih veziklih sestavljenih iz POPC:PS (1:1). Histogrami prikazujejo odstotek sproščenega kalceina 300" po dodatku poli-APS.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Z metodo merjenja anizotropije in polarizacije smo ugotavljali kakšna je fluidnost membran sestavljenih iz POPC, POPC:Chol in POPC:PS. Višja polarizacija DPH, ki smo ga uporabljali pri poskusu, pomeni večjo urejenost membrane. Iz dobljenih podatkov lahko sklepamo, da je urejenost večja pri nižjih temperaturah, pH pa nima vpliva na urejenost membran. Najbolj urejene so POPC:Chol membrane, sledijo POPC:PS in na koncu POPC. Vrednosti anizotropije so najvišje v gel stanju, sledi tekoče urejeno stanje, najnižje vrednosti pa so v tekočem neurejenem stanju (Xu in London, 2000). Iz tega lahko sklepamo, da so membrane pri nižjih temperaturah v tekočem urejenem stanju. Lahko še enkrat potrdimo, da so POPC:Chol membrane v tekočem urejenem stanju, tiste iz POPC pa v tekočem neurejenem stanju.

Vezavo poli-APS na liposome z različno lipidno sestavo smo prvotno hoteli določiti s tehniko površinske plazmonske resonance (SPR). Podatki dobljeni s SPR metodo niso reprezentativni, saj iz sensorgramov, ki jih prikazujeta sliki 13 in 14, ni možno določiti vzorca obnašanja, oz. kinetike asociacije in disociacije. Lahko sklepamo, da je vezava poli-APS na lipide zelo močna. To je še posebno opazno pri veziklih iz POPC:PS, ki zaradi negativnega naboja zelo močno vežejo poli-APS. Signal po disociaciji je bil v določenih primerih višji od tistega pred asociacijo, kar pomeni, da je del poli-APS ostal vezan na liposome tudi po spiranju. Pri nekaterih vzorcih je bil signal po disociaciji celo nižji kot pred asociacijo. Ker imajo poli-APS lastnosti kationskih detergentov (Malovrh in sod., 1999), so verjetno liposome kar sprali s čipa. Zaradi neuspeha pri uporabi SPR metode smo le-to zamenjali z drugimi metodami in v nadaljevanju vezavo analizirali s testom inhibicije hemolize in s testom sipanja svetlobe.

S testom inhibicije hemolize smo posredno preverjali, kako pH in lipidna sestava vplivata na vezavo poli-APS na membrano. Ugotovili smo, da imajo poli-APS največjo afiniteto za vezavo na POPC:PS vezikle, saj je bila pri teh veziklih hemoliza skoraj popolnoma inhibirana že pri nizkih koncentracijah lipidnih veziklov. PS ima negativno nabito serinsko

glavo, ki omogoča lažjo vezavo polikationov kot so poli-APS. Pri POPC:Chol in POPC vezikli smo opazili hemolizo, kar pomeni, da se vse poli-APS niso vezale na vezikle in da jih je nekaj ostalo na voljo tudi za vezavo na eritrocite. Stopnja hemolize je približno enaka in lahko sklepamo, da ni bistvene razlike v vezavi poli-APS na POPC:Chol in POPC vezikle, ter da fluidnost membrane ne vpliva na vezavo. Pri pH 5 in pH 6 je prišlo do spontane lize eritrocitov in zato teh podatkov nismo upoštevali. Pri preostalih pH vrednostih (7, 8 in 9) pa je opazna večja vezava pri nižjih pH vrednostih. Iz zbranih rezultatov lahko sklepamo, da ima naboj lipidne membrane največji vpliv na vezavo, kot so opazili že Malovrh in sodelavci (1999). Vpliv na vezavo ima tudi pH, saj je pri nižjih pH vrednostih vezava močnejša.

Vezavo poli-APS na lipidne vezikle smo spremljali tudi s testom sipanja svetlobe, pri katerem smo spremljali spremembo agregacije v odvisnosti od pH, temperature in lipidne sestave. Zaradi agregacije pride do sipanja svetlobe, ki jo spektrofлуorimeter lahko zazna. V našem primeru lahko pride do agregacije zaradi vezave poli-APS na liposome. Nastanejo agregati, ki se pri visokih koncentracijah poli-APS zaradi obsežne agregacije lahko oborijo. Rezultati tega testa so bili primerljivi s tistimi, ki smo jih dobili s testom inhibicije hemolize. Agregacija je bila največja pri POPC:PS vezikli, ki se zaradi negativno nabite serinske glave najboljše vežejo na poli-APS. Zaradi zelo močne vezave pri višjih koncentracijah poli-APS pride celo do obarjanja agregatov, kar opazimo kot zmanjšano sipanje. Ponekod je opazen tudi porast sipanja pred obarjanjem iz česa lahko sklepamo, da so nastali zelo veliki agregati, ki so se potem oborili iz raztopine. POPC in POPC:Chol vezikli imajo podobno afiniteto do poli-APS, kar se prav tako ujema z rezultati, ki smo jih dobili s testom inhibicije hemolize. Iz obeh testov lahko sklepamo, da ima naboj največji vpliv na vezavo poli-APS. Čeprav smo s testom inhibicije hemolize dokazali, da je vezava veziklov na poli-APS močnejša pri nižjih pH vrednostih, s testom sipanja svetlobe tega nismo potrdili. S testom sipanja svetlobe smo lahko spremljali tudi odvisnost vezave poli-APS od spreminjanja temperature. Pri vseh veziklih smo opazili, da je agregacija manjša pri višjih temperaturah. To pomeni, da je vezava bolj učinkovita pri nižjih temperaturah. Pri nižjih temperaturah se membranski lipidi bolj tesno pakirajo in so bolj rigidni zaradi česa se poli-APS lažje vežejo na membrano.

Permeabilizacijsko sposobnost poli-APS smo spremljali spektrofluorimetrično, s testom sproščanja kalceina iz veziklov. Ugotavljali smo vpliv temperature, pH in lipidne sestave na nastanek por v membrani.

Pri POPC:PS veziklih sproščanje kalceina rahlo narašča z višanjem pH vrednosti. Permeabilizacija je največja pri pH 9, z nižanjem pH vrednosti pa se zmanjšuje. Možen razlog je v tem, da zniževanje pH vrednosti vodi do nastanka več  $H^+$ , ki lahko nevtralizirajo negativne naboje POPC:PS veziklov in jih naredijo manj dovzetne za vezavo poli-APS. Vpliv pH vrednosti na stopnjo permeabilizacije je posledica negativnega naboja POPC:PS veziklov. Pri POPC:Chol veziklih je vzorec sproščanja kalceina v odvisnosti od pH nekoliko drugačen. Največ kalceina se je sprostil pri pH 9, sledijo pH 8, pH 5, pH 6 ter na koncu pH 7. Vpliv pH na sproščanje kalceina iz POPC veziklov je zelo variabilen.

Ker so poli-APS podobne kationskim detergentom, smo predvidevali, da bo s temperaturo povzročena sprememba fizikalnih lastnosti poli-APS in lipidnih membran vplivala na nastanek por. Pri nižjih temperaturah membrane običajno postanejo bolj dovzetne za delovanje detergentov (Chernitsky in Senkovich, 1997). McLaggan in sodelavci (2006) so tudi dokazali, da je transfekcija povzročena s poli-APS bolj učinkovita pri nižjih temperaturah. V naših poskusih nismo opazili bistvenega vpliva temperature na permeabilizacijsko sposobnost poli-APS. Opazen je le minimalen vpliv spremembe temperature na sproščanje kalceina, tako da je pri višjih temperaturah sproščanje nekoliko večje. Ta učinek je najbolj opazen pri POPC veziklih. Lahko sklepamo, da je vpliv temperature variabilen in odvisen od pH vrednosti in lipidne sestave veziklov.

Za razliko od vezave, permeabilizacija ni odvisna od naboja membranskih lipidov, saj smo najmočnejše sproščanje kalceina dosegli pri veziklih iz čistega POPC. Negativni naboj (v našem primeru PS) bi lahko povzročil močno vezavo poli-APS na membrano in ga blokiral v tem položaju, ter posledično zmanjšal njegovo sposobnost za naslednje interakcije, ki vodijo v nastanek pore. Naši rezultati potrjujejo neobjavljene rezultate Kristine Sepčič, da višja kot je vsebnost PS v veziklih, nižja je permeabilnost za poli-APS.

Zelo pomemben vpliv na permeabilizacijo poli-APS ima lipidna sestava veziklov. Najbolj dovzetni za permeabilizacijo s poli-APS so POPC vezikli najmanj pa POPC:Chol. S testi anizotropije in polarizacije smo dokazali, da so vezikli sestavljeni iz POPC:Chol najbolj urejeni od vseh uporabljenih veziklov in zaradi manjše fluidnosti lahko preprečijo lizo s poli-APS.

Chertinsky in Senkovich (1997) ter McLaggan (2006) navajajo drugačne rezultate. Ugotovili so, da je transfekcija celic s poli-APS bolj učinkovita pri nižjih temperaturah oz. pri bolj urejenih membranah. V obeh raziskavah so poskuse izvajali na celicah (eritrociti in celične linije). Naravne membrane so strukturno veliko bolj kompleksne kot umetne membrane, ki smo jih uporabljali pri naših poskusih. Slednje predstavljajo le približek naravnih membran, ki imajo karakteristično lateralno heterogenost, oz. razporeditev posameznih skupin lipidov v domene z različno stopnjo urejenosti. Ravno te domene, katerih fizikalno stanje, število in razporeditev se tudi spreminjajo v odvisnosti od temperature, bi lahko igrale pomembno vlogo pri permeabilizaciji membran s poli-APS.

POPC vezikli imajo fazni prehod pri temperaturi  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Filippov, 2002) in so zato ves čas merjenja v neurejeni fazi, kar je očitno bolj ugodno za permeabilizacijo s poli-APS. POPC:PS vezikli so nekoliko bolj rigidni kot POPC (Petrache, 2003) in je zato tudi stopnja permeabilizacije manjša. Sklepamo, da so POPC:PS manj dovzetni za permeabilizacijo s poli-APS kot POPC. To je posebno opazno pri nižjih temperaturah, ko so ti v bolj urejeni fazi. S testom polarizacije smo ugotovili, da se z višanjem temperature urejenost membrane zmanjšuje in je posledično permeabilizacija večja pri višjih temperaturah. Iz vseh navedenih podatkov lahko sklepamo, da je pri permeabilizaciji pomembna fluidnost, saj je pri bolj urejenih membranah stopnja permeabilizacije nižja.

## 5.2 SKLEPI

- Z merjenjem polarizacije in anizotropije smo dokazali, da so membrane vseh uporabljenih veziklov bolj fluidne pri višjih temperaturah.



- Z istimi meritvami smo tudi pokazali, da se vezikli sestavljeni iz POPC in POPC:PS (1:1) bistveno ne razlikujejo v fluidnosti, medtem ko so vezikli POPC:Chol (3:1) bistveno bolj urejeni.
- S testom inhibicije hemolize in testom sipanja svetlobe smo ugotovili, da ima naboj velik vpliv na vezavo poli-APS na membrane.
- S testom inhibicije hemolize smo ugotovili, da je vezava poli-APS bolj učinkovita pri nižjih pH vrednosti.
- Test sipanja svetlobe je potrdil hipotezo, da je vezava poli-APS bolj učinkovita pri nižjih temperaturah.
- Fluidnost membran nima vpliva na stopnjo vezave poli-APS.
- Naboj nima neposrednega vpliva na permeabilizacijo membran s poli-APS.
- Permeabilizacija POPC:PS veziklov je zaradi njihovega negativnega naboja bolj učinkovita pri višjih pH vrednosti.
- S testom sproščanja kalceina smo ugotovili, da je permeabilizacija nekoliko bolj učinkovita pri višjih temperaturah.
- Bolj urejene membrane so manj dovzetne za permeabilizacijo.

## 6 POVZETEK

Poli-APS so spojine, ki so jih izolirali iz jadranske morske spužve *Reniera sarai*. Imajo veliko bioloških aktivnosti: tvorijo pore v membrani, inhibirajo encim acetilholineterazo, imajo protivegetativne, citostatične in citocidne lastnosti ter inhibitorno delujejo na celice pljučnega raka. V nalogi smo hoteli bolje raziskati njihove interakcije z membranami.

Ugotavljali smo kako vplivajo pH, temperatura in lipidna sestava na interakcije poli-APS z umetnimi membranami. Uporabljali smo fosfatidilholin, mešanico fosfatidilholina in fosfatidilserina v razmerju 1:1 in mešanico fosfatidilholina in holesterola v razmerju 3:1. Fosfatidilholin je nevtralen, fosfatidilserin negativno nabit, holesterol pa omogoča večjo urejenost membran. Poskuse smo izvajali pri 5 °C, 25 °C in 40 °C ter pri pH vrednostih pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 in pH 9.

Pred začetkom dela smo postavili nekaj hipotez, ki smo jih hoteli z raziskovalnim delom potrditi oziroma zavreči.

Poli-APS so polikationi in smo zato pričakovali, da se bodo bolje vezali na negativno nabite membrane, kot so POPC:PS. Testa inhibicije hemolize in sipanja svetlobe sta potrdila našo hipotezo, saj je bila v obeh primerih vezava POPC:PS večja kot vezava ostalih veziklov.

S testom inhibicije hemolize smo potrdili tudi hipotezo, da je vezava večja pri nižjih pH vrednostih.

Predvidevali smo, da bosta vezava in permeabilizacija bolj učinkoviti pri nižjih temperaturah. Test sipanja svetlobe je potrdil, da je vezava poli-APS bolj učinkovita pri nižjih temperaturah. Vpliv temperature na permeabilizacijo smo ugotavljali s testom sproščanja kalceina. Hipotezo, da je permeabilizacija večja pri nižjih temperaturah smo zavrgli saj smo dokazali nasprotno. Permeabilizacija je le v manjši meri odvisna od temperature in sicer z naraščanjem temperature narašča tudi permeabilizacija.

Odvisnost permeabilizacije od pH vrednosti je očitna le pri POPC:PS veziklih. Z nižanjem pH vrednosti se večja število  $H^+$  ionov. Le-ti nevtralizirajo negativne naboje POPC:PS in jih na ta način naredijo manj dovzetne za permeabilizacijo s poli-APS. Tako je permeabilizacija bolj učinkovita pri višjih pH vrednosti. Lahko sklepamo, da je pri POPC:PS veziklih zaradi njihovega negativnega naboja opazen vpliv pH vrednosti na stopnjo permeabilizacije.

Naboj nima neposrednega vpliva na stopnjo permeabilizacije, saj je nevtralen POPC bil najbolj dovzeten za permeabilizacijo.

Pričakovali smo, da bosta vezava in permeabilizacija bolj učinkoviti pri manj fluidnih membranah. S testom polarizacije smo dokazali, da so membrane pri višjih temperaturah manj urejene, ter da pH nima vpliva na urejenost. POPC:Chol vezikli so najbolj urejeni, POPC pa najmanj, kar so potrdile tudi meritve anizotropije in polarizacije. Ugotovili smo, da fluidnost ne vpliva na vezavo poli-APS ima pa vpliv na permeabilizacijo. Rezultati sproščanja kalceina kažejo, da je POPC najbolj dovzeten na permeabilizacijo, POPC:Chol pa najmanj. Lahko sklepamo da je stopnja permeabilizacije večja pri manj urejenih membranah.

## 7 VIRI

Anderluh G. 2007. Tehnologija BIACORE. Ljubljana, Biotehniška fakulteta (22.6.07.)  
<http://www.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/SPR/TEHNOLOGIJA%20BIACORE.html> (2007):  
4str.

Anderluh G., Beseničar M., Kladnik A., Lakey J. H., Maček P. 2005. Properties of nonfused liposomes immobilized on an L1 Biacore chip and their permeabilization by a eukaryotic pore-forming toxin. *Analytical Biochemistry*, 344, 1: 43-52

Barak D., Ordentlich A., Bromberg A., Kronman C., Marcus D., Lazar A., Ariel N., Velan B., Shaffermann A. 1995. Allosteric modulation of acetylcholinesterase activity by peripheral ligands involves a conformational transition of the anionic subsite. *Biochemistry*, 34: 15444-15452

Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.

Brown D.A., London E. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 23: 17221-17224

Cattaneo M.G., D'atri F., Vicentini L.M. 1997. Mechanisms of mitogen-activated protein kinase activation by nicotine in small-cell lung carcinoma cells. *Biochemical Journal*, 328: 499-503

Chernitsky E.A., Senkovich. 1997. Erythrocyte hemolysis by detergents. *Membrane and Cell Biology*, 11: 475-485

Chini B., Clementi F., Hukovic N., Sher E. 1992. Neuronal-type alpha-bungarotoxin receptors and the alpha 5-nicotinic receptor subunit gene are expressed in neuronal and non-neuronal human cell lines. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 1527-1576

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

Faimali M., Sepčič K., Turk T., Geraci S. 2003a. Non-toxic antifouling activity of polymeric 3-alkylpyridinium salts from the Mediterranean sponge *Reniera sarai* (Pulitzer-Finali). *Biofouling*, 19: 47-56

Faimali M., Falugi C., Gallus L., Piazza V., Tagliafierro G. 2003b. Involvement of acetyl choline in settlement of *Balanus amphitrite*. *Biofouling*, 19: 213-220

Faimali M., Garaventa F., Mancini I., Sicurelli A., Guella G., Piazza V., Greco G. 2005. Antisetlement activity of syntetic analogues of polymeric 3-alkylpyridinium salts isolated from the sponge *Reniera sarai*. *Biofouling*, 21:49-57

Filippov A., Orädd G., Lindblom G. 2003. The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers. *Biophysical Journal*, 84, 5: 3079–3086

Fosfatidilholin. 2007. Alabaster, Avanti Polar Lipids, Inc.  
[www.avantilipids.com/ProductStructures.aps?n=840051](http://www.avantilipids.com/ProductStructures.aps?n=840051) (2007): 1 str.

Fosfatidilserin. 2007. Alabaster, Avanti Polar Lipids, Inc.  
[www.avantilipids.com/ProductStructures.aps?n=840032](http://www.avantilipids.com/ProductStructures.aps?n=840032) (2007): 1 str.

Garaventa F., Faimali M., Sepčič K., Geraci S. 2003. Laboratory analysis of antimicrofouling activity of poly-APS extracted from *Reniera sarai* (Poifera: Demospongiae). *Biologia Marina Mediterranea*, 10: 565-567

Holesterol. 2007. Alabaster, Avanti Polar Lipids, Inc.  
[www.avantilipids.com/ProductStructures.aps?n=700000](http://www.avantilipids.com/ProductStructures.aps?n=700000) (2007): 1 str.

Kitz R.J., Braswell L.M., Ginsburg S. 1970. On the question: is acetylcholinesterase an allosteric protein? *Molecular Pharmacology*, 6: 108-121

Kočevar N., Kristl J. 2005. Ciljana dostava učinkovin v tumorske celice z liposomi. *Farmaceutski vestnik*, 56, 3: 202-206

Koss D.J., Hindley K.P., David K.C., Mancini I., Guella G., Sepčič K., Turk T., Rebolj K., Riedel G., Platt B., Scott R.H. 2007. A comparative study of the actions of alkylpyridinium salts from a marine sponge and related synthetic compounds in rat cultured hippocampal neurons. *BMC Pharmacology*, 2, 7: 17 str.  
<http://biomedcentral.com/1471-2210> (2007): 17 str.

Lasch J., Weissing V., Brandl M. 2003. Preparation of liposomes. V: *Liposomes*. 2<sup>nd</sup> ed. Torchilin V.P., Weissing V. (eds). Oxford, Oxford University Press: 3-29

Lakowicz J.R. 1988. Principles of frequency-domain fluorescence spectroscopy and applications to cell membranes. *Sub-cellular Biochemistry*, 13: 89-126

Lasič D.D. 1997. *Liposomes in gene delivery*. Boca Raton, CRC Press:320 str.

Lichtenberg D., Goni M.F., Heerklotz H. 2005. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends in Biochemical Science*, 30: 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

Malovrh P., Sepčič K., Turk T., Maček P. 1999. Characterization of hemolytic activity of 3-alkylpyridinium polymers from the marine sponge *Reniera sarai*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 124, 2: 221-226

Mancini I., Sicurelli A., Guella G., Turk T., Maček P., Sepčič K. 2004. Synthesis and bioactivity of linear oligomers related to polymeric alkylpyridinium metabolites from the Mediterranean sponge *Reniera sarai*. *Organic Biomolecular Chemistry*, 2: 1368-1375

Maneckjee R., Minna J.D. 1990. Opioid and nicotine receptor effect growth regulation of human cancer cell lines. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 3294-3298

McClelland R.M., Evans I., Abidin I., Sharma S., Choudhry F.Z., Jaspars M., Sepčić K., Scott R.H. 2003. Irreversible and reversible pore formation by polymeric alkylpyridinium salts (poly-APS) from the *Reniera sarai*. *British Journal of Pharmacology*, 139: 1399-1408

McConnell H.M., Vrljic M. 2003. Liquid-liquid immiscibility in membranes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32: 469-492

McLaggan D., Adjimatera N., Sepčić K., Jaspars M., Macewan D.J., Blagbrough I.S., Scott R.H. 2006. Pore forming polyalkylpyridinium salts from marine sponges versus synthetic lipofection systems: distinct tools for intracellular delivery of cDNA and siRNA. *BMC Biotechnology*, 16, 6: 6str  
<http://www.biomedcentral.com/1472-6750> (2007): 6 str.

Mooser G., Sigman D.S. 1974. Ligand binding properties of acetylcholinesterase determined with fluorescent probes. *Biochemistry*, 13: 2299-2307

Paleari L., Trombino S., Falugi C., Gallus L., Carlone S., Angelini C., Sepčić K., Turk T., Faimali M., Noonan D.M., Albin A. 2006. Marine sponge-derived polymeric alkylpyridinium salts as novel tumor chemotherapeutic targeting the cholinergic system in lung tumors. *International Journal of Oncology*, 29: 1381-1388

Pathak A.K., Bhutani M., Mohan A., Guleria R., Bal S., Kochupillai V. 2004. Non-small cell lung cancer (NSCLC): current status and future prospects. *Indian Journal of Chest Disease Allied Science*, 46: 191-203

Petrache H.I., Tristram-Nagle S., Gawrisch K., Harries D., Parsegian V.A., Nagle J.F. 2004. Structure and fluctuations of charged phosphatidylserine bilayers in the absence of salt. *Biophysical Journal*, 86, 3: 1574–1586

Poklar Ulrih N. 1994. Fizikalno kemijske raziskave denaturacije kimotripsinogena A s toploto in topili. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo, Oddelek za kemijo in kemijsko tehnologijo: 110 str.

Quinn D.M. 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87: 955-979

Rajkowski K.M., Cittanova N. 1981. Corrected equations for the calculation of protein-ligand binding results from fluorescence polarization data. *Journal of Theoretical Biology*, 93: 691-696

Rosenberry T.L. 1975. Acetylcholinesterase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 43: 103-218

Schmitz F.J., Hollenbeak K.H., Campbell D.C. 1978. Marine natural products: halitoxin, toxic complex of several marine sponges of the genus *Haliclona*. *Journal of Organic Chemistry*, 43: 3916-3922

Scott R.H., Whyment A.D., Foster A., Gordon K.H., Milne B.F., Jaspars M. 2000. Analysis of the structure and electrophysiological actions of halitoxin: 1,3-alkylpyridinium salts from *Callyspongia ridleyi*. *Journal of Membrane Biology*, 176: 119-31

Sepčić K., Batista U., Vacelet J., Maček P., Turk T. 1997a. Biological activities of aqueous extracts from marine sponges and cytotoxic effects of 3-alkylpyridinium polymers from *Reniera sarai*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*, 117: 47-53



Sepčič K., Guella G., Mancini I., Pietra F., Serra M.D., Menestrina G., Tubbs K., Maček P., Turk T. 1997b. Characterization of anticholinesterase-active 3-alkylpyridinium polymers from the marine sponge *Reniera sarai* in aqueous solutions. *Journal of Natural Products*, 10: 991-996

Sepčič K., Marcel V., Kläbe A., Turk T., Šuput D., Fournier D. 1998. Inhibition of acetylcholinesterase by an alkylpyridinium polymer from the marine sponge, *Reniera sarai*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1387: 217-225

Sepčič K., Poklar N., Vesnaver G., Fournier D., Turk T., Maček P. 1999. Interaction of 3-alkylpyridinium polymers from the sea sponge *Reniera sarai* with insect acetylcholinesterase. *Journal of Protein Chemistry*, 18, 3: 251-257

Sepčič K., Turk T. 2006. 3-alkylpyridinium compounds as potential non-toxic antifouling agents. V: *Marine molecular biotechnology. Progress in molecular and subcellular biology. Antifouling compounds*. Fustetani N., Clare A.S. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 105-124

Sfingomielin. 2007. Alabaster, Avanti Polar Lipids, Inc.  
[www.avantilipids.com/ProductStructures.aspx?n=860062](http://www.avantilipids.com/ProductStructures.aspx?n=860062) (2007): 1 str.

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

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

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

Sussman J.L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I. 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253: 872-879

Tucker S.J., McClelland D., Jaspars M., Sepčić K., MacEwan D.J., Scott R.H. 2003. The influence of alkyl pyridinium sponge toxins on membrane properties, cytotoxicity, transfection and protein expression in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1614, 2: 171-181

Weiss W. 1983. Epidemiology of lung cancer. V: Comparative respiratory tract carcinogenesis. Schuller H.M. (ed.). Boca Raton , CRC Press: 1-18

Xu X., London E. 2000. Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide. *Biochemistry*, 39: 844-849

Zaslloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-395

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Kristini Sepčič za strokovno pomoč in nasvete ter še posebej za prijaznost, optimizem in vzpodbudne besede med nastajanjem diplomske naloge.

Najlepše se zahvaljujem somentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrih in vsem na katedri za biokemijo za koristne napotke pri izvajanju laboratorijskega dela.

Prof. dr. Tomu Turku se zahvaljujem za hitro in temeljito recenzijo diplomskega dela.

Seveda pa diploma ne bi mogla nastati brez velikodušne podpore staršev. Zahvaljujem se jim, ker sta mi omogočila pogoje za realizacijo zastavljenih ciljev, ter mi vedno stala ob strani in me vzpodbujala.