

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Doris PAVLIN

**MERJENJE EKSTRAKCIJE HOLESTEROLA IZ LIPIDNIH
MEMBRAN S POVRŠINSKO PLAZMONSKO REZONANCO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Doris PAVLIN (BREMEC)

**MERJENJE EKSTRAKCIJE HOLESTEROLA IZ LIPIDNIH
MEMBRAN S POVRŠINSKO PLAZMONSKO REZONANCO**

DIPLOMSKO DELO
(Univerzitetni študij)

**MEASUREMENT OF CHOLESTEROL EXTRACTION FROM LIPID
MEMBRANES WITH SURFACE PLASMON RESONANCE**

GRADUATION THESIS
(University studies)

Oktober 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo, Oddelka za Biologijo Biotehniške fakultete.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Gregorja Anderluha.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Član: prof. dr. Gregor Anderluh
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Datum zagovora: 15. oktober 2008

Doris Pavlin (Bremec)

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	579.61:577.2(043.2)=163.6
KG	površinska plazmomska resonanca/metil- β -ciklodekstrin/ekstrakcija holesterola
KK	
AV	PAVLIN, Doris
SA	ANDERLUH, Gregor (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo 2008
IN	MERJENJE EKSTRAKCIJE HOLESTEROLA IZ LIPIDNIH MEMBRAN S POVRŠINSKO PLAZMONSKO RESONANCO
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 40 str., 4. preg., 17 sl., 56 ref.
IJ	sl
JI	sl /en
AI	<p>Površinska plazmomska resonanca se je izkazala kot ena najpomembnejših tehnik za študije medmolekulskih interakcij, saj omogoča merjenje v realnem času in s tem analizo kinetike interakcij, za poskus pa potrebujemo relativno malo preiskovane snovi. Predvsem se je uporabljala za študije proteinov, v zadnjem desetletju pa se uporablja tudi za preučevanje interakcij med lipidi in ostalimi makromolekulami. V tem diplomskem delu smo opredelili sistem za merjenje ekstrakcije holesterola s površinsko plazmomska resonanco z uporabo metil-β-ciklodekstrina. Ugotovili smo, da je ekstrakcija holesterola odvisna od temperature pri kateri poteka reakcija, ne pa od pretoka metil-β-ciklodekstrina preko merilnih celic. Ekstrakcija tudi ni odvisna od koncentracije holesterola v veziklih, vsaj v razponu od 26 do 33 molskih procentov holesterola. Metil-β-ciklodekstrin je v naših poskusih najbolj ekstrahirale holesterol iz veziklov iz 1,2 dioleoil-<i>sn</i>-glicero-3-fosfatidilholina, nekoliko slabše pa iz veziklov iz 1-palmitoil-2-oleoil-<i>sn</i>-glicero-3-fosfatidilholina in veziklov iz 1,2-dimiristoil-<i>sn</i>-glicero-3-fosfatidilholina. Pokazali smo, da iz veziklov z metil-β-ciklodekstrinom ekstrahiramo ves holesterol. Metil-β-ciklodekstrin poleg holesterola v manjši meri ekstrahira tudi druge lipide. Tako je poleg holesterola ekstrahirale najbolj 1,2-dimiristoil-<i>sn</i>-glicero-3-fosfatidilholin, nekoliko manj 1,2 dioleoil-<i>sn</i>-glicero-3-fosfatidilholin, 1-palmitoil-2-oleoil-<i>sn</i>-glicero-3-fosfatidilholin pa je ekstrahirale le pri največjih koncentracijah (5mM). Ocenili smo lahko tudi hitrost flip-flop premikov holesterola, ki je bil v naših poskusih izredno hiter (nekaj sekund). Površinska plazmomska resonanca je primerna tehnika za merjenje ekstrakcije holesterola iz lipidnih membran, ter proučevanje lipidnih membran na splošno.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 579.61:577.2(043.2)=163.6
CX surface plasmon resonance/methyl- β -cyclodextrin/cholesterol extraction
CC
AU PAVLIN, Doris
AA ANDERLUH, Gregor (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jaminkarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Biological Department 2007
TI MEASUREMENT OF CHOLESTEROL EXTRACTION FROM LIPID MEMBRANES WITH SURFACE PLASMON RESONANCE
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 40 p., 4 tab., 17 fig., 56 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Surface plasmon resonance has proven itself to be one of the most important techniques for investigating intermolecular interactions, because it makes real time measurements and kinetics analysis possible, and only small amounts of analyzed substances are needed. The techniques was mainly used for research of protein-protein interaction, but in the last decade it is also used for studying interactions between lipids and other macromolecules. In this graduation thesis, we characterized the system for measuring cholesterol extraction from lipid membranes with methyl- β -cyclodextrin using surface plasmon resonance. We found that cholesterol extraction was highly temperature-dependent, but it did not depend on the flow of methyl- β -cyclodextrin over flow cells. Extraction was also not dependent on the concentration of cholesterol in large unilamellar vesicles, at least not in the range of 26 to 33 mol %. In our experiments cholesterol extraction was the highest from 1,2 dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin large unilamellar vesicles and a little lower from 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin large unilamellar vesicles. Other lipids beside cholesterol can be extracted using methyl- β -cyclodextrin. Among 1,2 dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin, 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin, 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin extraction was the highest, 1,2 dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin lower and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin was extracted only when the highest (5 mM) concentration of methyl- β -cyclodextrin was used. We were also able to establish cholesterol flip-flop rate. We found the flip-flop to be relatively fast, in the range of seconds. Surface plasmon resonance technique is very appropriate for measuring cholesterol extraction from lipid membranes and for studying lipid membranes in general.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV.....	2
2.1 POVRŠINSKA PLAZMONSKA REZONANCA	2
2.1.1 Merjenje s SPR	3
2.1.2 Uporabnost merjenja s SPR	3
2.2 CIKLODEKSTRINI	4
2.2.1 Sinteza ciklodekstrinov	4
2.2.2 Oblika ciklodekstrinov in tvorba vključitvenih kompleksov	5
2.2.3 Vpliv ciklodekstrinov na sestavo lipidnih membran – interakcije s holesterolom	6
2.2.4 Vpliv ciklodekstrinov na sestavo lipidnih membran – interakcije z ostalimi lipidi	7
2.3 HOLESTEROL	8
2.3.1 Vloga holesterola v membranah celic	8
2.3.2 Biosinteza CHO	8
2.3.3 Medsebojni vpliv CHO in membranskih fosfolipidov	9
2.3.4 Transverzalno gibanje holesterola v membranah (flip-flop)	9
2.4 STREPTOLIZIN O.....	11
3 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	12
4 METODE IN MATERIALI	13
4.1 PRIPRAVA PUFRA IN RAZTOPIN	13
4.1.1 Fosfatni pufer	13
4.1.2 0,5 % NaDS	13

4.2	PRIPRAVA VEZIKLOV	13
4.3	DELO NA SISTEMU BIACORE X	14
4.3.1	Ekstrakcija holesterola pri različnih temperaturah in pretokih	14
4.3.2	Flip-flop	16
4.3.3	Vezava streptolizina	16
4.4	STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV	17
5	REZULTATI	18
5.1	POTEK POSKUSA	18
5.2	KARAKTERIZACIJA SISTEMA	18
5.2.1	Izhajanje lipidov z M β CD	18
5.2.2	Reprezentativni rezultati izhajanja holesterola	20
5.2.3	Pretoki	21
5.2.4	Količina ekstrahiranega holesterola	21
5.2.5	Izločanje ostalih lipidov	24
5.3	OBDELAVA EKSPERIMENTALNIH KRIVULJ	24
5.3.1	Prikaz ugotavljanja prileganja eksperimentalnih krivulj teoretičnemu modelu	24
5.3.2	Hitrost izhajanja holesterola pri različnih temperaturah	26
5.4	FLIP-FLOP HOLESTEROLA	28
6	RAZPRAVA IN SKLEPI	30
6.1	EKSTRAKCIJA HOLESTEROLA	30
6.2	KOLIČINA EKSTRAHIRANEGA HOLESTEROLA	30
6.3	EKSTRAKCIJA DRUGIH LIPIDOV	33
6.4	TRANSVERZALNO GIBANJE HOLESTEROLA	33
6.5	SKLEPI	34
7	POVZETEK	35
8	LITERATURA	36

KAZALO SLIK

2.1	Sistem za merjenje s površinsko plazmonsko resonanco (A) in intenziteta odbite svetlobe pri različnih upadnih kotih (Stenberg ., 1991).....	2
2.2	Oblika naravnih ciklodekstrinov (H in ID za β -ciklodekstrin sta 0,78 nm) (A) in kemijska struktura ciklodekstrinov (za M β CD je n=1, R=H) (Brewster <i>in sod.</i> , 2007)	6
2.3	Elektronska mikrografija eritrocitnih dukov, tretiranih s SLO, kjer so dobro vidni prstani SLO (Sekiya <i>in sod.</i> , 2007).....	11
4.1	Strukture uporabljenih lipidov: DMPC (A), DOPC (B), POPC (C), CHO (D) in DOPE z vezanim biotinom (E).....	14
4.2	Shematska predstavitev ujemanja LUV na SA čip (prekrit s streptavidinom) in ekstrakcije CHO z M β CD	15
5.1	Potek poskusa na aparaturi Biacore X ter sprememba RU v času na referenčni celici Fc1 (rdeča) in vzorčni celici Fc2 (modra)	18
5.2	Odgovor na referenčni in vzorčni celici, ko smo vanju injicirali 3 mM M β CD za 22 s pri pretoku 150 μ l/min pri LUV DOPC : CHO v razmerju 1 : 0,5 (mol : mol)	19
5.3	Razlika v odzivih na referenčni in vzorčni celici (Fc2-Fc1). potem ko smo odšteli pufer, pri uporabi različnih lipidov s PC : CHO razmerjem 1 : 0,5 (mol : mol): DOPC (A), POPC (B) in DMPC (C).....	20
5.4	Razlika odzivov na referenčni in vzorčni celici pri veziklih DOPC : CHO v razmerju 1 : 0,5 (mol : mol) po različnih hitrostih pretoka M β CD čez obe celici .	21
5.5	Ekstrahiranje CHO iz veziklov DOPC : CHO v razmerju 1 : 0,5 (mol : mol) 3x zaporedoma s 4 mM M β CD – razlika med referenčno in vzorčno celico	22
5.6	Senzogram vezave SLO na DOPC vezikle (svetlo rdeča) in DOPC+CHO vezikle (temno zelena) pred ekstrakcijo CHO z M β CD in po ekstrakciji (A) in količina vezanega SLO na vezikle različne sestave (B).....	23
5.7	Izločanje PC pri različnih koncentracijah M β CD: Izločanje različnih lipidov v odvisnosti od koncentracije M β CD (A) in izločanje DOPC pri različnih temperaturah v odvisnosti od koncentracije M β CD (B).....	24
5.8	Odziv na vzorčni in referenčni celici po nanosu M β CD (A) in razliko v odzivu na referenčni in vzorčni celici po nanosu pufera in nanosu M β CD (modra krivulja) in krivulja, kjer smo odšteli pufer od M β CD (zelena krivulja) (B).....	25
5.9	Ugotavljanje prileganja eksperimentalne krivulje teoretičnemu modelu s podatki prileganja.....	25

- 5.10 Razlike v odzivih na vzorčni in referenčni celici pri ekstrakciji holesterola z MBCD pri različnih temperaturah in različnih koncentracijah M β CD26
- 5.11 Navidezne konstante hitrosti izločanja holesterola (k) v odvisnosti od koncentracije M β CD pri veziklih iz DOPC in CHO v razmerju DOPC : CHO 1 : 0,5 (mol : mol) pri različnih temperaturah (A) in pri veziklih s sestavo DOPC : CHO 1 : 0,5 ali DOPC : CHO 1 : 0,35 (mol : mol)27
- 5.12 Razlika odzivov na referenčni in vzorčni celici ko smo 2x nanesti nanju M β CD v različnih časovnih intervalih (drugi nanos takoj, po 100 s, po 300 s in po 600 s) (A). Delež ekstrahirane holesterola v drugi ekstrakciji po različnih časovnih obdobjih glede na količino holesterola ekstrahirane v prvi ekstrakciji (B)28

KAZALO PREGLEDNIC

2.1	Pregled objav o transverzalnem gibanju (flip-flop) holesterola v membranah	10
5.1	Vrednosti p za primerjave vezave SLO na različne liposome	23
5.2	Vrednosti p za primerjave ekstrakcij z različnim zamikom injiciranja	29
6.1	Lomni količniki snovi, ki smo jih uporabili pri tem diplomskem delu, dobljeni iz literature	32

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2OHβCD	2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin
A	amplituda
CHO	holesterol
CHO-K1	celice ovarija kitajskega hrčka K1
Co-A	koencim A
DIMEB	heptakis (2,6-di-O-metil) β -ciklodekstrin
DMPC	1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilholin
DOPC	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilholin
DOPE	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidiletanolamin
DPI	dvojna polarizacijska interferometrija
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilholin
DTT	ditiotreitrol
ER	endoplazemski retikulum
Fc1	merilna celica 1
Fc2	merilna celica 2
GA	Golgijev aparat
HIV	človeški virus imunske pomanjkljivosti
<i>k</i>	navidezna konstanta hitrosti
LUV	veliki unilamelarni vezikli
MβCD	metil- β -ciklodekstrin
MLV	multilamelarni vezikli
NaDS	natrijev dodecil sulfat
n.s.	ni signifikantno
PC	fosfatidilholin
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilholin
PWR	valovno vodena plazmonska resonanca
PP	pirofosfat
R_{max}	maksimalni odziv
RU	refrakcijska enota
SD	standardna deviacija
SLO	streptolizin O

SM	sfingomielin
SOPC	1-stearoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilholin
SOPG	1-stearoil-2-oleoil- <i>sn</i> -fosfatidilglicerol
SPR	površinska plazmonska resonanca (ang. »surface plasmon resonance«)
SUV	majhni unilamelarni vezikli
TRIMEB	heptakis (2,3,6-tri-O-metil) β -ciklodekstrin
USD	ameriški dolar
X₀	čas začetka merjenja

1 UVOD

Pravilna porazdelitev holesterola (CHO) med celičnimi membranami je pomembna za številne biološke funkcije, med drugim za prenos signalov in prenos snovi preko membrane. CHO je malo v endoplazmatskem retikulumu (ER), koncentracija se poveča v Golgijevem aparatu (GA), največja pa je v plazemski membrani, ki vsebuje od 60-80 % celotnega celičnega CHO (Maxfield *in sod.*, 2002).

Pomemben problem pri proučevanju CHO in drugih lipidov v celičnih membranah je, da je težko ugotoviti njihovo količino v različnih membranah in slojih membran, saj membrane lahko hitro poškodujemo. Porazdelitev CHO med obema deloma lipidnega dvosloja se ugotavlja s fluorescenčnimi steroli in dušilci emisije, ki ne prehajajo preko dvoslojne membrane. Metoda pa ni idealna, predvsem zaradi fizikalno-kemijskih značilnosti fluorescenčnih sterolov.

Fluorescenčne derivate CHO so uporabljali tudi pri študijah s fluorescenčno mikroskopijo. Skupno količino CHO v celici lahko merimo tudi z direktnimi kemijskimi analitskimi metodami kot so plinska kromatografija in masna spektroskopija ali z indirektnimi encimskimi metodami, na primer s testom s CHO oksidazo, vendar ta test ni vedno zanesljiv (Maxfield *in sod.*, 2002).

Metoda površinske plazmonske resonance (SPR) se je razvila v zadnjih desetletjih, predvsem za študije medsebojnega delovanja med proteini. Šele zadnjih nekaj let se uporablja tudi za študije drugih molekul. Sedaj je ena najpomembnejših tehnik za proučevanje medmolekulskih interakcij.

Za metodo SPR smo se odločili, ker se z njo da spremljati ekstrakcijo CHO v realnem času, kar omogoča tudi analizo kinetike ekstrakcije CHO, to pa je pomemben podatek za razumevanje, kako biološki sistemi delujejo na molekularni ravni (Morton *in sod.*, 1998).

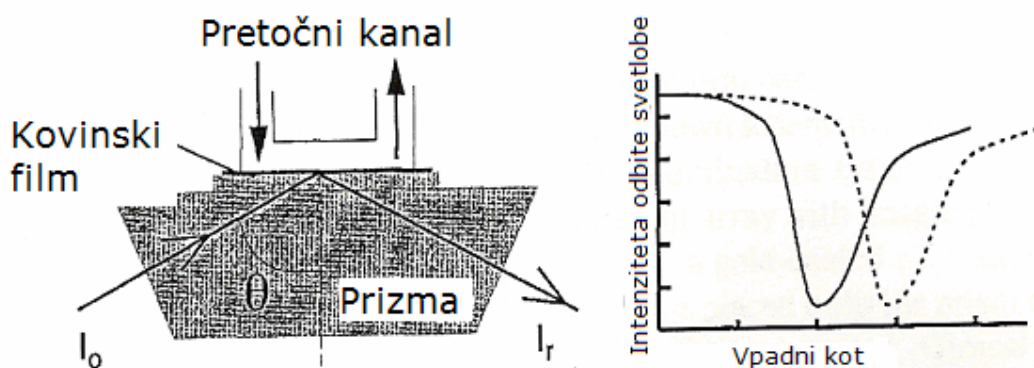
β -ciklodekstrini so poznani akceptorji sterolov, verjetno zaradi njihove hidrofobne sredine, ki se ujema za velikostjo sterolnih molekul. CHO je iz membrane možno ekstrahirati tudi z majhnimi unilamelarnimi vezikli (SUV), vendar je tak proces manj učinkovit. Z uporabo ciklodekstrinov je ekstrakcija hitra in učinkovita (Ohvo-Rekila *in sod.*, 2000).

V tem diplomskem delu smo želeli pripraviti sistem za ekstrakcijo CHO iz lipidnih membran z metil- β -ciklodekstrinom (M β CD) in analizirati kinetiko ekstrakcije CHO. Poleg tega smo poskusili oceniti hitrost transverzalnega gibanja (ang. flip-flop) CHO s pomočjo SPR.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POVRŠINSKA PLAZMONSKA REZONANCA

Fenomen SPR je bil prvič opisan v zgodnjih 60-ih letih prejšnjega stoletja, v 80-ih so izdelali prve SPR senzorce in šele v zgodnjih 90-ih letih je bil na voljo prvi komercialni biosenzor, ki je temeljil na SPR (Jongerius-Gortemaker *in sod.*, 2002). SPR se zgodi pri pogojih popolnega odboja na tankih plasteh nekaterih kovin. Polarizirana laserska svetloba je usmerjena skozi medij z visokim lomnim količnikom (ponavadi prizma), na tanko plast zlata, ki leži na meji z medijem z nizkim lomnim količnikom. Pri kritičnem naklonskem kotu lahko tanek sloj zlata privzame del energije vpadne svetlobe. To je vidno kot močan upad intenzitete odbite svetlobe. Kritični kot je odvisen od več faktorjev, v največji meri pa od lomnega količnika v nekaj 100 nm od površine, in se spremeni, ko se molekule vežejo na površino (Beseničar *in sod.*, 2006).



Slika 2.1: Sistem za merjenje s površinsko plazmnsko resonanco (A) in intenziteta odbite svetlobe pri različnih vpadnih kotih (Stenberg *in sod.*, 1991).

Optični biosenzorji so se pojavili kot pomembno orodje za karakterizacijo interakcij bioloških makromolekul. Pomagajo nam lahko pri pridobivanju kvalitativnih informacij kot je interakcija makromolekul pri različnih pogojih ali kvantitativnih informacij, npr. ravnotežne vezavne konstante za nastanek kompleksov (Morton *in sod.*, 1998). Tako je merjenje s SPR ena najpomembnejših tehnik za študije molekularnih interakcij (Rich *in sod.*, 2000, Beseničar *in sod.*, 2006, Anderluh *in sod.*, 2003, Ziblat *in sod.*, 2006).

2.1.1 Merjenje s SPR

V tipičnem poskusu s SPR je ena od medsebojno delujočih molekul v raztopini, tej rečemo analit, druga, ligand, pa je pritrjena na površino merilne celice biosenzorja. Nastanek in razpad kompleksa sta kontrolirana s konstanto asociacije in konstanto disociacije. Pogosto uporabljene aparature, ki za merjenje uporabljajo SPR senzorje so Biacore aparature, kakršne smo uporabili pri našem delu. Merjenje z Biacore sistemom poteka na površini tako imenovanih senzorskih čipov z dvema merilnima celicama (Morton *in sod.*, 1998). Biacore sistem za opis spremembe signala uporablja 'resonančne enote' (RU), ki ustrezajo spremembi kritičnega kota za 10^{-4} stopinje. Pri proteinih je med maso snovi na površini čipa in RU linearen odnos, tako da 1 RU ustreza okoli 1 pg/mm^2 vezane snovi (Stenberg *in sod.*, 1991).

2.1.2 Uporabnost merjenja s SPR

Najboljši pokazatelj uspeha optičnih biosenzorjev je naraščujoče število tržno dostopnih aparatov. V večini člankov navajajo uporabo biosenzorjev Biacore (Rich *in sod.*, 2000). Število objav, ki opisujejo poskuse, pri katerih so za merjenje uporabili SPR, je iz leta v leto večje (Beseničar *in sod.*, 2006). Biacore biosenzorji so skupaj z analizo postali standardna metoda za karakterizacijo biomolekulskih interakcij, tako v laboratorijih kot v prehranski industriji in farmaciji (Li *in sod.*, 2008).

Biacore ponuja več različnih senzorskih čipov, ki omogočajo različne metode imobilizacije (Rich *in sod.*, 2000) in s tem veliko raznovrstnost. V splošnem je mogoče za vsako biološko interakcijo najti pravi senzorski čip (Nguyen *in sod.*, 2007). Druge metode za proučevanje medmolekulskih interakcij ponavadi potrebujejo velike količine snovi, ki jo proučujemo, SPR pa je zelo občutljiva metoda z visoko resolucijo, ki potrebuje relativno malo proučevane snovi (Abdiche *in sod.*, 2004, Podlesnik-Beseničar *in sod.*, 2008).

Pomembna prednost merjenja s SPR je tudi, da je rezultate mogoče dobiti v realnem času, brez potrebe po fluorescenčnem ali radioaktivnem označevanju proučevanih molekul (Podlesnik-Beseničar *in sod.*, 2008).

Merjenje s SPR omogoča tudi študije kinetike interakcij. SPR je močno orodje za merjenje kinetike reakcije in ravnotežne konstante (Hartmann-Petersen *in sod.*, 2005). Če krivulje prilegamo teoretičnemu modelu, lahko določimo konstante hitrosti asociacije in disociacije (Morton *in sod.*, 1995).

Poskus na SPR sistemu tudi vzame relativno malo časa (Ahmad *in sod.*, 2001), zato jo v povezavi z detekcijo protiteles nekateri avtorji že označujejo kot enakovredno ELISA testu (Leonard *in sod.*, 2004, Jongerius-Gortemaker *in sod.*, 2002).

SPR se uporablja študije vezav zelo raznolikih molekul. Tako se SA čip, prevlečen s streptavidinom učinkovito uporablja za vezavo nukleinskih kislin, ki imajo na 3' ali 5' koncu vezan biotin (take nukleinske kisline se lahko kupi že biotilirane). Mi smo uporabili z biotinom označene lipidne vezikle. Vsak protein s prostimi amino skupinami lahko imobiliziramo preko aaminskih skupin, s katerimi tvori vezi z aktiviranimi

karboksilnimi skupinami CM čipa (Nguyen *in sod.*, 2007). Na L1 čip lahko vežemo liposome. Liposomi se na L1 čip ujamejo zaradi interakcije z lipofilnimi alkilnimi skupinami, ki so vezane na dekstranski matriks L1 čipa (Baird *in sod.*, 2002), vendar je treba biti previden, saj se na L1 čip lahko vežejo druge nepolarne snovi zaradi hidrofobnih interakcij. Na HPA čipu, na katerem je hidrofoben monosloj pa lahko ustvarimo hibridne lipidne dvosloje (Rich *in sod.*, 2000). Ligandi so torej raznovrstni, prav tako raznovrstni pa so lahko tudi analiti, saj je analit lahko vsaka molekula v raztopini, ki se lahko veže z imobiliziranim ligandom (Ahmad *in sod.*, 2001). V zadnjih letih se je SPR začela uporabljati tudi za merjenje ekstrakcije CHO iz membran (Podlesnik-Beseničar *in sod.*, 2008).

Že nekaj časa ima merjenje z SPR čisto praktično uporabo v biotehnologiji, farmaciji in živilski industriji. Uporabljali so ga namreč za detekcijo različnih protiteles v človeškem serumu, kot so protitelesa proti glikoproteinu ovojnice HIV, povzročitelju sifilisa in virusu herpes simpleks. Metoda je enako natančna kot tradicionalna metoda ELISA (Jongorius-Gortemaker *in sod.*, 2002). Uporablja se tudi v prehranski industriji, na primer za detekcijo bakterije *Listeria monocytogenes* v hrani (Leonard *in sod.*, 2004) ali detekcijo protiteles proti vrstam *Salmonella enteritidis* in *Salmonella tiphimurium* v piščancih (Jongorius-Gortemaker *in sod.*, 2002).

2.2 CIKLODEKSTRINI

Leta 1891 je francoski znanstvenik A. Villiers odkril bakterijski presnovek, ki ga je izoliral iz škroba. Poskusi so pokazali, da je snov dekstrin. Villiers jo je poimenoval celulozin. Kasneje je avstrijski mikrobiolog F. Schardinger opisal dve kristaline snovi α -dekstrin in β -dekstrin. Tem snovem zdaj rečemo ciklodekstrini (povzeto po Brewster *in sod.*, 2007).

Pomembni so tudi v farmaciji saj lahko močno izboljšajo topnost nekaterih zdravil, ko z njimi tvorijo komplekse. Uporabljajo se tudi v prehranski industriji kot stabilizatorji okusa (Szejtli *in sod.*, 1986) in v industrijskih procesih npr. za proizvodnjo masla brez holesterola (Yamamoto *in sod.*, 2005), predvsem odkar so postali tako cenovno dostopni.

V zadnjem desetletju se ciklodekstrini uporabljajo za spreminjanje sestave bioloških in umetnih membran (Ohvo-Rekila *in sod.*, 2000, Jouni *in sod.*, 2002, Tsamaloukas *in sod.*, 2005, Anderson *in sod.*, 2004).

2.2.1 Sinteza ciklodekstrinov

Ciklodekstrini so oligosaharidi, ki nastanejo pri bakterijski razgradnji škroba in ponavadi vsebujejo 6 (α), 7 (β) ali 8 (γ) glukopiranoznih enot, povezanih z 1-4 glikozidnimi vezmi (Szejtli, 1990). Schardinger je odkril, da je za nastanek ciklodekstrinov odgovorna bakterija *Bacillus macerans*. Z obdelavo škrobov z amilazo iz *B. macerans* dobimo mešanico ciklodekstrinov, α -ciklodekstrina (cca. 60 %), β -ciklodekstrina (cca. 20 %) in γ -ciklodekstrina (cca. 20 %), ter majhne količine ciklodekstrina z več kot osmimi glukopiranoznimi enotami. Tako mešanico pa je težko očistiti in pogosto vsebuje tudi druge razvejane in linearne dekstrine, ter majhne količine proteinov in drugih snovi (Brewster *in sod.*, 2007).

S pomočjo genskega inženiringa so lahko izolirali različne tipe ciklodekstrin glukozil transferaz, ki so bolj aktivne in bolj specifične pri produkciji pretežno α -, β -, ali γ -ciklodekstrinov. Encimi prepoznajo 6, 7 ali 8 glukopiranoznih enot iz nereducirajočega konca amiloze, linearne komponentne škroba, in predstavijo pripadajočo α -1,4 vez na C4 mesto, tako da nastanejo α -, β -, ali γ -ciklodekstrini. Letna proizvodnja β -ciklodekstrinov je bila leta 2007 skoraj 10.000 ton, cena pa se je od leta 1970 znižala iz 2000 USD/kg na 5 USD/kg (Brewster *in sod.*, 2007). Tako velika proizvodnja je potrebna predvsem zaradi uporabe ciklodekstrinov v farmaciji ter v prehranski industriji (Szejtli *in sod.*, 1986, Yamamoto *in sod.*, 2005).

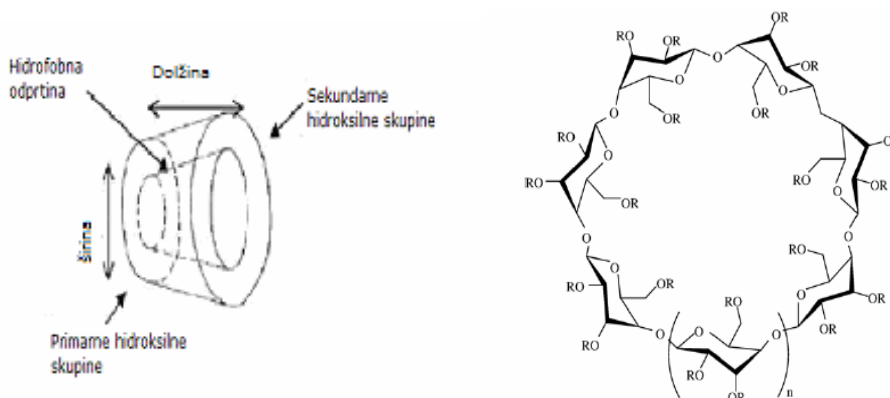
Ciklodekstrini so bolj odporni na razpad v kislem ali alkalnem okolju. Visoke temperature (do temperature karamelizacije, več kot 200 °C) v suhem stanju ali v raztopini med pH 2 in 12 ne povzročijo poškodb. Hitro pa jih razgrajujejo specifični encimi, ciklodekstrinaze (Szejtli, 1990).

Naravne ciklodekstrine so predvsem zaradi topnosti modificirali. Zamenjava katerekoli hidroksilne skupine močno poveča topnost ciklodekstrinov v vodi (Brewster *in sod.*, 2007).

2.2.2 Oblika ciklodekstrinov in tvorba vključitvenih kompleksov

Ciklodekstrini imajo obliko prisekanega stožca (slika 2.2). Hidroksilne skupine so nameščene na zunanosti stožca, notranjost stožca pa je obrobljena s skeletnimi ogljiki in kisiki glukoznih enot, zato je lipofilna (Brewster *in sod.*, 2007). V stožčasti odprtini lahko vežejo veliko različnih hidrofobnih molekul, ki imajo velikost benzenskega obroča ali molekule naftalena, ali pa imajo stransko verigo podobne velikosti (Szejtli, 1990). Ni potrebno, da se hidrofobna molekula popolnoma sklada z odprtino stožca, vendar bo od tega odvisna učinkovitost vezave te molekule v odprtino ciklodekstrina (Pitha *in sod.*, 1988). Velikost odprtine derivatov α -ciklodekstrinov je 5 Å, β -ciklodekstrinov 6 Å in γ -ciklodekstrinov 8 Å. V derivate α -ciklodekstrinov se bolje vežejo snovi z dolgimi alifatskimi verigami, za ostale snovi so boljši derivati β - in γ -ciklodekstrinov (Pitha *in sod.*, 1988).

Ciklodekstrini lahko tvorijo tako imenovane vključitvene komplekse, kjer gostiteljska molekula (ciklodekstrin) veže drugo molekulo brez kovalentnih vezi (Szejtli, 1990). Sile, ki molekulo držijo v odprtini ciklodekstrina so van der Waalove, do neke mere pa tudi interakcije med dipoli, v vodni raztopini je kompleks stabiliziran tudi s hidrofobnimi interakcijami (Casu *in sod.*, 1978). V vodni raztopini odprtino zasedejo molekule vode, kompleks pa je nestabilen in druge manj polarne molekule vodo lahko zamenjajo. Gonilna sila za sprejem manj polarne molekule je zamenjava povezave med vodo in ciklodekstrinom (ta kompleks ima veliko entalpijo), z energetsko bolj ugodno molekulo. Prisotnost ciklodekstrina v vodni raztopini poveča topnost nepolarnih snovi (Szejtli, 1990).



Slika 2.2: Oblika naravnih ciklodekstrinov (širina in dolžina za β -ciklodekstrin sta 0,78 nm) (A) in kemijska struktura ciklodekstrinov (za M β CD je $n=1$, $R=H$) (Brewster *in sod.*, 2007)

2.2.3 Vpliv ciklodekstrinov na sestavo lipidnih membran – interakcije s CHO

Ciklodekstrini se ne vežejo na komponente membran in se v membrane ne vključujejo (Ziblat *in sod.*, 2006, Podlesnik-Beseničar *in sod.*, 2008), lahko pa ekstrahirajo komponente membran in tako vplivajo na sestavo membrane (Pitha *in sod.*, 1988). CHO lahko ekstrahirajo tako iz celic kot iz membran (Ohvo in Slotte, 1996).

Naravni ciklodekstrini, še posebej β -ciklodekstrini, so slabo topni v vodi, zato so jih kemično modificirali. Eden od kemično modificiranih β -ciklodekstrinov je M β CD (Brewster *in sod.*, 2007), ki smo ga uporabili tudi pri našem delu. Topnost naravnega β -ciklodekstrina v vodi je 18,5 mg/ml, topnost M β CD v vodi pa je več kot 500 mg/ml. M β CD je primeren za študije CHO, saj je učinkovit tako pri vnašanju CHO v membrane pri določenih pogojih, kot ekstrahiranju CHO iz njih (Christian *in sod.*, 1997). Če M β CD nasičimo s CHO, lahko vključimo CHO v membrano, če pa uporabimo sam M β CD, iz membran ekstrahiramo CHO (Ziblat *in sod.*, 2006).

Narejeno je bilo veliko študij, pri katerih so s pomočjo M β CD ekstrahirali CHO iz membran (npr. Ohvo-Rekila *in sod.*, 2000, Ohvo in Slotte, 1995, Ziblat *in sod.*, 2006) ali ga dovajali v membrane (npr. Christian *in sod.*, 1997, Ziblat *in sod.*, 2006). Pokazali so tudi, da je CHO, ki ga v membrane dovaja ciklodekstrin, biološko dostopen (Cristian *in sod.*, 1997). M β CD so uporabili tudi kot pospeševalec prenosa CHO med velikimi unilamelarnimi lipidnimi vezikli (LUV). Spontani prenos CHO med LUV vezikli 1-stearoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3-fosfatidilholin (SOPC): 1-stearoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3-fosfatidilglicerol (SOPG) v molskem razmerju 85 : 15 (mol : mol) je brez uporabe M β CD 60-krat počasnejši kot v prisotnosti M β CD (Leventis *in sod.*, 2001).

Aktivacijska energija, potrebna za odstranitev CHO iz membrane, če je prejemnik fosfolipid, je 20 kcal/mol. Ciklodekstrini odstranjujejo CHO iz membran tako učinkovito zato, ker zmanjšajo aktivacijsko energijo na 7-9 kcal/mol. Če je prejemnik fosfolipid mora namreč CHO najprej preiti v vodno fazo, preden se vključi v fosfolipidne liposome, če pa je prejemnik ciklodekstrin, se CHO vključi skoraj direktno v hidrofobno votlino, tako da

prehod v vodno fazo, ki je najbolj energetsko zahteven proces ni potreben (Christian *in sod.*, 1997).

Predvidena stohiometrija vključitvenega kompleksa je ciklodekstrin : CHO 2 : 1 (mol : mol) (Tsamaloukas *in sod.*, 2005).

Predpostavljen je obstoj dveh rezervoarjev (ang. »pool«) CHO v celici glede na kinetiko ekstrakcije CHO; hitri in počasni rezervoar. Hitri rezervoar verjetno predstavlja CHO v plazemski membrani celice, počasni rezervoar pa CHO v notranji plasti plazemske membrane (Haynes *in sod.*, 2000) ali pa CHO v notranjosti celice (Zidovetzki *in sod.*, 2007). Haynes *in sod.* so objavili, da hitri rezervoar obsega približno 25 %, počasni pa približno 75 % celičnega CHO v CHO-K1 celicah. Receptor CHO je bil v njihovih poskusih 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin (2Ohp β CD). Predvidevajo še obstoj tretjega rezervoarja CHO v celicah. CHO iz tega rezervoarja naj ne bi bilo mogoče ekstrahirati in obsega 5-10 % celičnega CHO. Predvidevajo, da je to CHO, ki je vključen v notranje membrane celice (Haynes *in sod.*, 2000).

Steck *in sod.*, 2002 so v nasprotju z zgodnejšimi deli opazili le en rezervoar CHO pri odstranitvi CHO iz eritrocitnih membran z M β CD, torej vsaj pri eritrocitih obstaja le en kinetični rezervoar CHO. Ugotavljajo tudi, da se je v kratkem času (1 s) izločilo več kot 90 % celičnega CHO (povzeto po Zidovetzki *in sod.*, 2007).

2.2.4 Vpliv ciklodekstrinov na sestavo lipidnih membran – interakcije z ostalimi lipidi

Ciklodekstrini reagirajo tudi z drugimi membranskimi fosfolipidi. Metilirani β -ciklodekstrini zmanjšajo lipofilnost 1,2 di-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidolholin (DOPC). (Szejtli *in sod.*, 1986). Substituirani β -ciklodekstrini so bolj lipofilni kot naravni ciklodekstrini, zato lahko nastanejo tudi hidrofobne podstrukture fosfolipidov. Pri mešanju različnih maščobnih kislin z β -ciklodekstrini so opazili več nenasičenih maščobnih kislin v kompleksih s ciklodekstrinom, kar kaže na to, da so nenasičene maščobne kisline boljši partner v ciklodekstrinskih kompleksih (Szejtli *in sod.*, 1986).

Pri kalorimetričnem merjenju interakcij M β CD in fosfolipidov so ugotovili, da M β CD lahko tvori vključitvene komplekse z 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilholin (POPC). Ta vezava je reverzibilna, zato lahko M β CD služi tudi kot katalizator prenosa POPC med vezikli. Predpostavljajo, da se na vsako acilno verigo POPC vežeta 1-2 molekuli M β CD (stohiometrija $n=4$), vendar dopuščajo možnost drugačne strukture (Anderson *in sod.*, 2004). Anderson *in sod.* so pri kalorimetričnem merjenju interakcij POPC z M β CD prišli do zaključka, da M β CD lahko raztaplja fosfolipidne membrane (koncentracija M β CD je bila od 20 do 100 mM, koncentracija POPC pa od 0,25 do 4 mM), kar je lahko nezaželeno, vendar se temu lahko izognemo z uporabo koncentracij M β CD pod 15 mM, kar je ponavadi dovolj za večino aplikacij (Anderson *in sod.*, 2004).

Leventis *in sod.* so delali poskuse prenosa 1,2-di-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilholina (DPPC) (označenega s H³) med LUV iz SOPC : SOPG v molskem razmerju 85 : 15 (mol : mol) in ugotovili, da M β CD 250-krat pospeši prenos DPPC med vezikli, kar je več kakor pospeši prenos CHO. Ugotovili so tudi, da je le polovica DPPC dostopna za ekstrakcijo s

M β CD, iz česar so sklepali, da se izloči le DPPC iz zunanjšega dela membrane, ter da M β CD ne vpliva na flip-flop DPPC (Leventis *in sod.*, 2001).

Poskusi s heptakis (2,3,6-tri-O-metil) β -ciklodekstrinom (TRIMEB) in heptakis (2,6-di-O-metil) β -ciklodekstrinom (DIMEB) so pokazali, da DIMEB zmanjša lipofilnost DOPC, verjetno zato, ker se hidrofobne maščobne kisline vežejo v odprto ciklodekstrina (Szejtli *in sod.*, 1986). Ugotovili so tudi, da inkubacija M β CD z dvoslojno membrano iz DOPC in sfingomielina (SM), povzroči nastanek lukenj v dvoslojni membrani, kar spet nakazuje, da M β CD ekstrahira ne samo CHO, ampak tudi fosfolipide (Zidovetzki *in sod.*, 2007).

2.3 HOLESTEROL

2.3.1 Vloga CHO v membranah celic

Kljub temu, da se CHO sintetizira v ER, je koncentracija CHO v ER zelo majhna, le 0,5-1 % celičnega CHO. V GA je koncentracija CHO nekje med koncentracijo v ER in koncentracijo v plazemski membrani. Ocenjeno je, da je v plazemski membrani 60-80 % celičnega CHO in da CHO v plazemski membrani predstavlja 30-40 % vseh lipidov (Maxfield *in sod.*, 2002). Koncentracija CHO v notranjih membranah je regulirana tudi s koncentracijo CHO v plazemski membrani (Zidovetzki *in sod.*, 2007).

Pravilna razporeditev CHO med celičnimi membranami je pomembna za pravilno delovanje sesalčjih celic, med drugim je pomembna za prenos signalov in transport preko membrane (Maxfield *in sod.*, 2002).

CHO je ključen za nastanek membranskih mikrodomen, ki jim rečemo lipidni rafti, za katere se meni, da so pomembni za različne celične funkcije, receptorsko sporočanje, nastanek sinaps in njihovo aktivnost. Skupaj s proteini, ki se vežejo nanje pa so pomembni tudi v osrednjem živčnem sistemu, na primer pri vzdražnosti nevronov in sinaptičnem prenosu (Frank *in sod.*, 2008).

Učinek membranskega CHO je tudi, da poveča notranji membranski električni dipolni potencial, s čimer vpliva na permeabilnost ionov, kar vpliva na številne membranske procese, na primer na prevodnost gramicidinskega kanalčka, vstavljanje v membrano in zlaganje amfifilnih peptidov, zlivanje membran, aktivnost fosfolipaze A₂, kinetiko redoks reakcij na površini membran, permeabilnost kože, aktivnost Na⁺/K⁺-ATP-aze, prehodnost membrane za splošne anestetike in spreminjanje interakcije med molekulami in membrano v lipidnih raftih, kar lahko vpliva na celično sporočanje (Starke-Peterkovic *in sod.*, 2006). CHO vpliva tudi na pasivno permeabilnost membrane za druge snovi, npr. glukozo, neelektrolite in vodo (Nemecz *in sod.*, 1988).

2.3.2 Biosinteza CHO

CHO je lipid, ki ga uvrščamo v skupino steroidov (Ziblat *in sod.*, 2006). Sintetizira se v ER, po izoprenoidni biosintetski poti. Biosinteza se začne z acetyl-CoA, ki se s šestimi zaporednimi encimskimi reakcijami pretvori v izopentil-PP. Prvi intermediat iz katerega nastajajo skoraj izključno sterolni izoprenoidi je skvalen C30 (iz šestih izoprenskih enot), iz katerega po ciklizaciji nastane lanosterol C30. Za nastanek CHO C27 iz lanosterola je potrebnih vsaj osem različnih encimskih reakcij. Zaporedje po katerem bodo te reakcije

pretvorbe lanosterola v CHO potekale je odvisno od tkiva, v katerem se dogajajo. V splošnem sta predvideni dve poti, ki se razlikujeta od časa redukcije dvojne vezi (Δ^{24}), tako da nastane 7-dihidrosterol ali dezmosterol kot zadnji prekursor CHO (Waterham, 2006).

2.3.3 Medsebojni vpliv CHO in membranskih fosfolipidov

CHO pospešuje nastanek urejenega tekočega stanja membran (ang. »liquid-orderd phase«). Razlog zato je predvsem v različnih interakcijah CHO z različnimi fosfolipidi in sfingolipidi (Leventis *in sod.*, 2001). Študije s fluorescenčno polarizacijo kažejo, da je skoraj polovica plazemske membrane pri 37 °C v urejenem stanju, kar je v skladu z dejstvom, da je v plazemski membrani velika koncentracija CHO in sfingolipidov (Maxfield *in sod.*, 2002). Prisotnost CHO v tekoči kristalinični fazi dvosloja poveča molekularno ureditev acilnih verig fosfolipidov. Dodatek CHO v gel fazi pa zmanjša urejenost acilnih verig. Dodatek CHO zmanjša prepustnost membran, debelina membran pa se poveča (Filippov *in sod.*, 2003).

Količina CHO lahko vpliva tudi na lateralno difuzijo lipidov. Pri poskusih, kjer so merili koeficiente lateralne difuzije lipidov s pomočjo nuklearne magnetne resonance za različne fosfatidilholine (PC) z različno koncentracijo CHO, so ugotovili, da se v neurejenem tekočem stanju PC sistemov, lateralna difuzija zmanjšuje linearno z naraščanjem koncentracije CHO, v urejenem tekočem stanju pa je le malo odvisna od koncentracije CHO. Pri membranah iz POPC in CHO ter DOPC in CHO niso opazili dvofaznega obnašanja zato predpostavljajo, da so ti sistemi za temperature nad 25 °C v neurejenem stanju (Filippov *in sod.*, 2003).

Študije so pokazale, da ima SM večjo afiniteto za CHO kot nasičeni PC, ti pa imajo večjo afiniteto kot nenasičeni fosfatidiletanolamini. CHO ima večjo afiniteto za fosfolipide z nasičenimi acilnimi verigami (Leventis *in sod.*, 2001).

Hitrost izmenjave CHO med SUV iz PC z nenasičenimi acilnimi verigami je približno 10-krat večja od izmenjave CHO med SUV iz PC z nasičenimi acilnimi verigami. Pri 37 °C so je bila razpolovna doba 1,0 h za 1,2 di-miristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilholin (DMPC) vezikle in 14 h za DPPC vezikle. Vsi uporabljeni PC z nenasičenimi acilnimi verigami so imeli po eno dvojno vez v acilnih verigah (Lund-Katz *in sod.*, 1988).

Afiniteta CHO do različnih lipidov je odvisna tudi od molskega procenta CHO v veziklih. Pri študiji izmenjave CHO med vezikli DOPC so ugotovili, da se aktivacijska energija močno poveča z manjšanjem molskega odstotka CHO iz 30 % na 20 % (Poznansky *in sod.*, 1978).

2.3.4 Transverzalno gibanje holesterola v membranah (flip-flop)

V literaturi najdemo zelo različne podatke o flip-flopu holesterola v membranah, odvisni pa so od metode, uporabljene za merjenje ter tipa membran, na katerih so merili.

Preglednica 2.1: Pregled objav o transverzalnem gibanju (flip-flop) holesterola v membranah

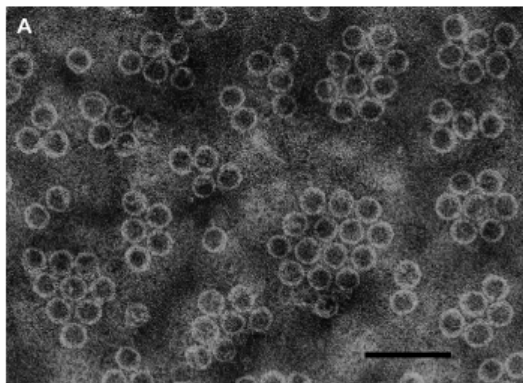
Čas	Metoda	Temperatura °C	vezikli	Avtor
1 do 2 min	prenos CHO med vezikli z M β CD (sklepanje)	37	LUV (SOPC : SOPG)	Leventis <i>in sod.</i> , 2001
manj kot 1h	izmenjava CHO med eritrocitnimi membranami	37	eritrocitne membrane	Kirby <i>in sod.</i> , 1977
72 min	uporaba fluorescenčnega sterola in gašenje fluorescence s pomočjo kalijevega jodida	30	vezikli	Smith <i>in sod.</i> , 1974
13 dni	ekvilibracija CHO v virusnih membranah z PC-CHO vezikli	37	virusna membrana (virus gripe)	Lenard <i>in sod.</i> , 1975
manj kot 1 min	preverjanje s CHO oksidazo	ni podatka	vezikli	Backer <i>in sod.</i> , 1981 (povzeto po Zachowski <i>in sod.</i> , 1993)
18-24h	toliko časa potrebujejo za rast s pomočjo zunanjega holesterola	ni podatka	membrane rastočih mikoplazem	Razin, 1978
manj kot 1 min	sklepanje iz ekstrakcije CHO s M β CD	37	eritrociti	Steck <i>in sod.</i> , 2002

Podatki iz starejših študij kažejo na to, da je flip-flop CHO razmeroma dolg (od približno ene ure do nekaj dni). Za ugotavljanje so uporabljali predvsem sposobnost holesterola, da sam prehaja med membranami veziklov, in iz tega določali hitrost flip-flopa. Novejše raziskave pa predvidevajo hitrejši flip-flop. Tako je Leventis *in sod.*, 2001 z M β CD pospeševal prenos CHO med vezikli iz SOPC : SOPG v molskem razmerju 85 : 15 (mol : mol) in SOPC vezikli, ter ugotovil, da flip-flop CHO ni omejujoči korak prenosa tudi pri najvišji uporabljeni koncentraciji M β CD. Iz tega je sklepal, da se mora flip-flop zgoditi v manj kot dveh minutah (ostali podatki so zbrani v preglednici 2.1).

2.4 STREPTOLIZIN O

Za preverjanje, koliko CHO se je izločilo pri naših poskusih smo uporabili streptolizin O (SLO). SLO je bakterijski toksin in pripada družini od holesterola odvisnih citolizinov, ki jih izdelujejo številne Gram-pozitivne bakterije (Tweten *in sod.*, 2005). Ti toksini se vežejo na CHO v citoplazemski membrani kot monomeri, v membrani pa oligomerizirajo v strukturo prstanov ali lokov s približno 50-80 podenotami, tako da nastane pora premera cca 30 nm. Pore prepuščajo tako ione kot makromolekule (Palmer *in sod.*, 1998) (slika 2.3).

Za interakcijo s CHO je odgovoren C-terminalni del SLO. V tem delu je prisoten en sam cisteinski ostanek in kemična modifikacija tega ostanka onemogoči vezavo toksina na membrane, torej inaktivira toksin (Harris *in sod.*, 1998).



Slika 2.3: Elektronska mikrografija eritrocitnih duhkov, tretiranih s SLO, kjer so dobro vidni prstani SLO (Sekiya *in sod.*, 2007).

3 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen našega dela je bil:

1. Na sistemu Biacore X pripraviti in opredeliti sistem za ekstrakcijo CHO iz lipidnih membran sestavljenih iz PC z nenasičenimi ali nasičenimi acilnimi verigami.
2. Ekstrahirati CHO iz liposomov z različno količino CHO v membranah in pri različnih temperaturah.
3. Analizirati kinetiko ekstrakcije CHO pri različnih vsebnostih CHO in različnih temperaturah.
4. Ugotoviti hitrost transverzalnega gibanja CHO v dvoslojni membrani

Hipoteza:

1. Izhajanje CHO bo odvisno od nasičenja acilnih repov PC.

4 METODE IN MATERIALI

4.1 PRIPRAVA PUFRA IN RAZTOPIN

4.1.1 Fosfatni pufer

Materiali:

- MilliQ voda
- NaCl
- NaH_2PO_4

Postopek: Pripravili smo pufer (20 mM NaH_2PO_4 , 140 mM NaCl). V čašo smo zatehtali 4,09 g NaCl in 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, ter raztopili v 400 ml MilliQ vode. pH smo nastavili na 7 s pH metrom (Metler Toledo, Seven multi S-40-K) in 10 mM NaOH. Dodali smo MilliQ vodo do 500 ml ter pufer prefiltrirali preko 100 nm filtra. Pufer smo pred delom na Biacore X odzračili.

4.1.2 0,5 % NaDS

Materiali:

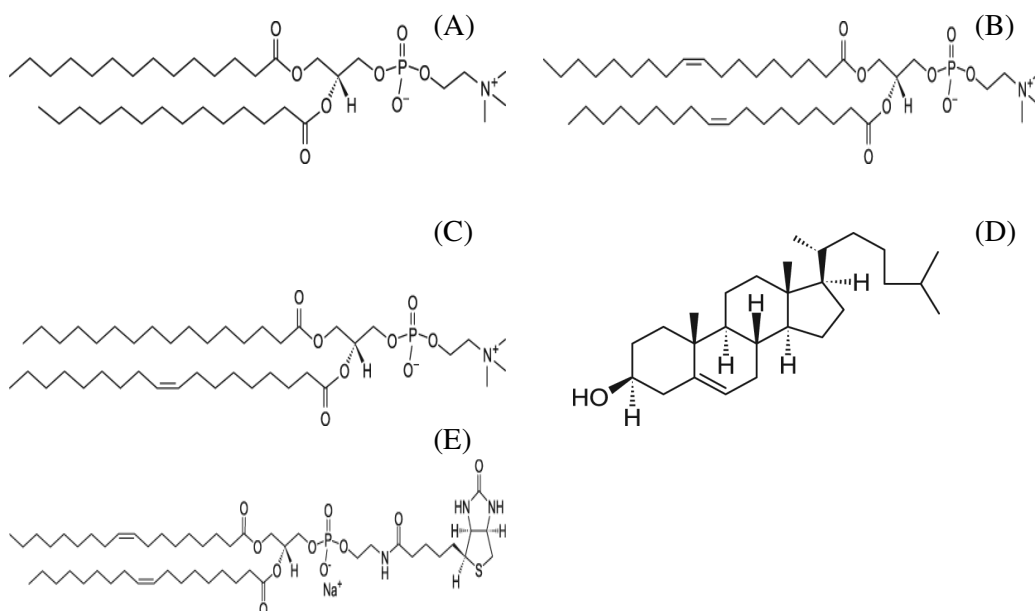
- MilliQ voda
- NaDS

Postopek: Zatehtali smo 0,250 g NaDS (Merck KgaA, Nemčija), dolili smo 50 ml MilliQ vode ter raztopino prefiltrirali preko celulozno acetatnega filtra s porami velikosti 45 μm (Sartorius AG, Nemčija).

4.2 PRIPRAVA VEZIKLOV

Materiali:

- lipidi: - DOPC, DMPC ali POPC (Avanti Polar Lipids, Inc.)
- DOPE z vezanim biotinom (raztopljen v kloroformu 1,809 mM) (Avanti Polar Lipids, Inc.)
- CHO (raztopljen v kloroformu, 50 mg/ml) (Avanti Polar Lipids, Inc.)
(strukture lipidov so prikazane na sliki 4.1)
- fosfatni pufer (20 mM NaH_2PO_4 , 140 mM NaCl, pH 7)
- kloroform : metanol 3:1 (V/V)
- tekoči dušik



Slika 4.1: Strukture uporabljenih lipidov: DMPC (A), DOPC (B), POPC (C), CHO (D) in DOPE z vezanim biotinom (E)

Postopek: Lipide smo ekvilibrirali 20 – 30 min na sobni temperaturi, potem pa smo v dve bučki za rotavapor zatehtali okoli 5 mg lipidov DOPC, DMPC ali POPC, ter dodali DOPE z vezanim biotinom v molskem razmerju DOPC (ali DMPC ali POPC) : DOPE-biotin 1 : 0,001 (mol : mol), v eno od bučk pa še holesterol v ustreznem molskem razmerju. Lipide v bučkah smo raztopili v raztopini kloroform : metanol 3 : 1 (400 μ l), ter obe bučki dali za 3,5 ure na rotavapor. Filme smo prepihali z N_2 , ter jih do uporabe shranili pri $-20^\circ C$.

Lipidna filma smo ekvilibrirali na sobni temperaturi in dodali 800 μ l fosfatnega pufra, nekaj steklenih kroglic (Sigma Aldrich inc., ZDA) ter premešali, da so se lipidi resuspendirali v pufu. Lipide smo prenesli v nove plastične epruvetke (ependorfke) na navoj ter jih 6x zamrznili v tekočem dušiku in odtajali v vroči vodi. Tako smo dobili multilamelarne vezikle (MLV) različnih velikosti. Te vezikle smo 31x prefiltrirali skozi polikarbonatne membrane s 100 nm porami, tako da smo dobili velike unilamelarne vezikle (LUV).

4.3 DELO NA SISTEMU BIACORE X

4.3.1 Ekstrakcija holesterola pri različnih temperaturah in pretokih

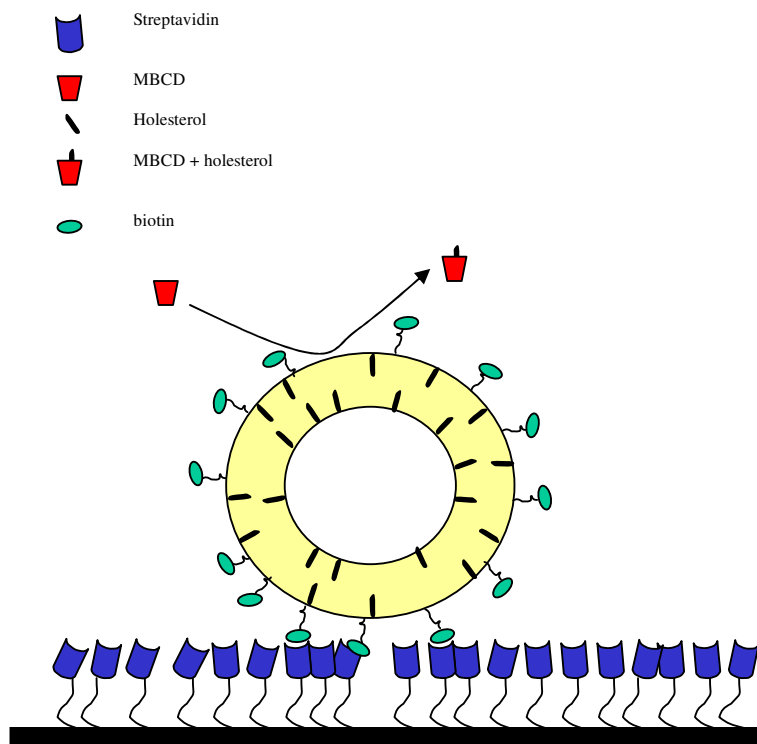
4.3.1.1 Različne temperature

Materiali:

- SA senzorski čip (prekrit s streptavidinom) (GE, Biacore)
- 0,5 % NaDS
- fosfatni pufar

- 100 nm LUV iz PC z ali brez CHO
- redčitvena vrsta M β CD (Sigma Aldrich inc., ZDA) (1 – 5 mM) v fosfatnem pufru.

Metode:



Slika 4.2: Shematska predstavitev ujemanja LUV na SA čip (prekrit s streptavidinom) in ekstrakcije CHO z M β CD

Ekstrakcijo CHO smo merili pri različnih temperaturah (20°C, 25°C, 30°C in 37°C) z Biacore X sistemom (GE Healthcare, Uppsala, Švedska) in senzorskim čipom, prekritim s streptavidinom (SA senzorski čip). Obe celici SA senzorskega čipa smo pred začetkom poskusa 3–5 x sprali z 0,5 % NaDS (1 min pri pretoku 10 μ l/min), da smo odstranili lipide ali druge nečistoče, ki bi lahko ostale vezane na čip. Celica Fc1 (ang. »Flowcell 1«) je služila kot referenčna celica, zato smo nanjo nanegli liposome brez CHO, na drugo, merilno celico smo nanegli liposome s CHO, oboje pri pretoku 10 μ l/min, do približno 1000 RU (shema vezave je prikazana na sliki 4.2). Počakali smo, da se signal ni več spreminjal, potem pa smo v obe celici injicirali pufer pri pretoku 150 μ l/min za 22 s. Spet smo počakali, da se signal ni več spreminjal in v obe celici injicirali še določeno koncentracijo M β CD (od 1 – 5 mM) pri pretoku 150 μ l/min za 22 s. Na koncu smo čip 3 – 5 x sprali z 0,5 % NaDS, dokler ni signal prišel na začetno raven, ter poskus ponovili z drugo koncentracijo M β CD. Del krivulj, kjer smo nanašali M β CD smo izrezali, ter jih med seboj odšteli, tako da smo dobili samo del signala, ki je nastal zaradi ekstrakcije CHO s ciklodekstrinom. Od tega smo odšteli še signal Fc2 – Fc1 iz dela krivulje, kjer smo injicirali pufer. S tem smo odšteli še možne učinke pufru.

Dobljeno krivuljo smo prilegali v programu Origin pro 7.5 po enačbi 1, kjer A predstavlja amplitudo, k je navidezna konstanta hitrosti, R_{max} je maksimalni odziv, X_0 pa čas začetka ekstrakcije.

$$y = R_{max} - A * (1 - \exp(-k * (X - X_0))) \quad (1)$$

4.3.1.2 Različni pretoki

Podobno smo na referenčno celico SA senzorskega čipa do približno 1000 RU nanegli liposome brez CHO, na drugo, merilno celico pa liposome z željeno koncentracijo CHO, potem pa smo pri različnih pretokih (150 $\mu\text{l}/\text{min}$, 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, 75 $\mu\text{l}/\text{min}$, 50 $\mu\text{l}/\text{min}$) injicirali 55 μl pufru in kasneje 55 μl M β CD, da bi ugotovili učinkovitost ekstrakcije pri različnih pretokih.

4.3.2 Flip-flop

Naredili smo 4 zaporedne poskuse, kjer smo na referenčno celico nanegli liposome brez holesterola, na merilno pa liposome s holesterolom, do okoli 1000 RU, potem pa smo v obe celici injicirali pri pretoku 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ za 22 s:

- najprej pufer, potem M β CD in brez izpiranja takoj še enkrat M β CD
- najprej pufer, potem M β CD, izpiranje mikrotekočinskega sistema in po 100 s še enkrat M β CD
- najprej pufer, potem M β CD, izpiranje in po 300 s še enkrat M β CD
- najprej pufer, potem M β CD, izpiranje in po 600 s še enkrat M β CD

4.3.3 Vezava streptolizina

Materiali:

- SA senzorski čip
- 0,5 % NaDS
- fosfatni pufer
- streptolizin
- 40 mM DTT
- 100 nm LUV iz DOPC brez CHO
- 100 nm LUV iz DOPC s CHO
- M β CD (3 mM) v fosfatnem pufru

Metode:

SA senzorski čip smo najprej 5x sprali z 0,5 % NaDS, potem pa na referenčno celico nanegli liposome brez CHO, na drugo merilno celico pa liposome s CHO, oboje do 1000 RU.

Najprej smo naredili kontrolo, tako da smo v celici pri pretoku 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ injicirali 95 μl pufru in 5 μl DTT. Časa asociacije in disociacije sta bila 2 min. Pripravili smo streptolizin. 9 μl SLO smo razredčili v 86 μl pufru ter dodali še 5 μl DTT, tako da smo dobili 100 μl in mešanico vbrizgali z zračnimi mehurčki pri pretoku 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ v Biacore X sistem. Ravno

tako sta bila časa asociacije in disociacije 2 min. Površino čipa smo regenerirali z injiciranjem 0,5 % NaDS.

V drugem poskusu smo ponovno nanесли na eno celico lipide s CHO in na referenčno celico liposome brez CHO. Pri pretoku 150 μ l/min za 22 s smo 3x v obe celici injicirali po 5 mM M β CD, da smo izločili ves CHO iz membran, potem pa po enakem postopku kot zgoraj naredili poskus s SLO.

4.4 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

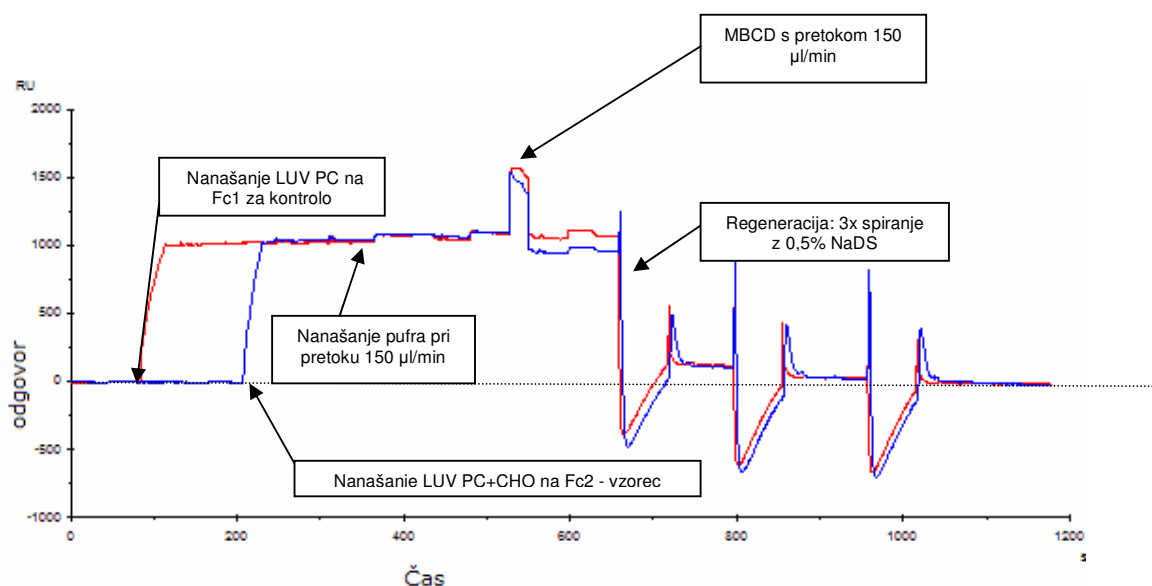
Metode:

Pri flip-flopu smo preverjali, ali so razlike med ekstrakcijami po različnem času statistično značilne. Uporabili smo statistični t-test za primerjavo dveh podobnih vzorcev (ang. »two sample paired t-test«). Pri preverjanju ekstrakcije s SLO smo preverjali, ali so razlike pri vezavi SLO statistično značilne z statističnim t-testom za primerjavo dveh različnih vzorcev (ang. »two sample independent t-test«). Razliko smo vzeli za statistično značilno, če je bila vrednost p manjša od 0,05.

5 REZULTATI

5.1 POTEK POSKUSA

Na obe celici smo nanесли okoli 1000 RU lipidov. Na referenčno celico smo nanесли LUV iz PC, na vzorčno celico pa LUV iz PC in CHO. Ko se je signal ustalil smo spremenili pretok na 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ ter v obe celici injicirali pufer. Signal se je na obeh celicah le malenkostno spremenil. Ko smo v obe celici injicirali M β CD pri pretoku 150 $\mu\text{l}/\text{min}$, se je signal na obeh celicah povečal zaradi spremembe lomnega količnika na račun M β CD prisotnega v pufru (ang. »bulk effect«), vendar je na vzorčni celici hitro upadal že v 22 s injiciranja. Po končanem injiciranju se je signal na vzorčni celici ustalil nižje kot na referenčni celici, kar kaže na to, da je M β CD iz veziklov na referenčni celici ekstrahiral lipide. Po poskusu smo celice regenerirali tako, da smo jih 3x sprali z 0,5 % NaDS. Signal je padel nazaj na začetno vrednost (slika 5.1).



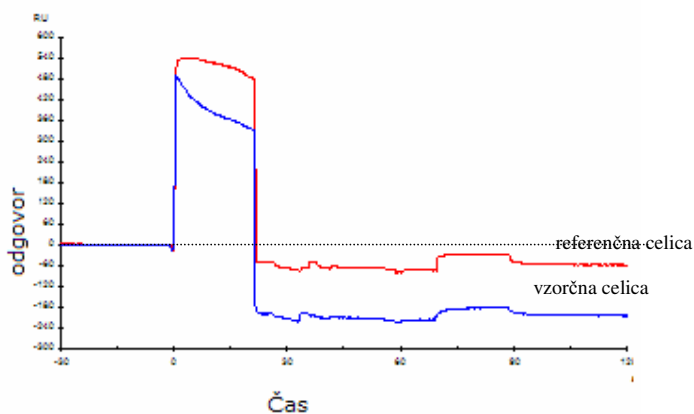
Slika 5.1: Potek poskusa na aparaturi Biacore X ter sprememba RU v času na referenčni celici Fc1 (rdeča) in vzorčni celici Fc2 (modra)

5.2 KARAKTERIZACIJA SISTEMA

5.2.1 Izhajanje lipidov z M β CD

Ko smo v referenčno in vzorčno celico injicirali M β CD, je signal na obeh celicah narasel zaradi spremembe lomnega količnika na račun M β CD prisotnega v pufru (ang. »bulk effect«), potem pa je takoj na obeh celicah začel padati, vendar na vzorčni celici, na katero smo nanесли LUV PC in CHO, veliko hitreje. Po končanem nanosu se je signal na referenčni celici ustalil le malo pod začetnim signalom, signal na vzorčni celici pa je bil

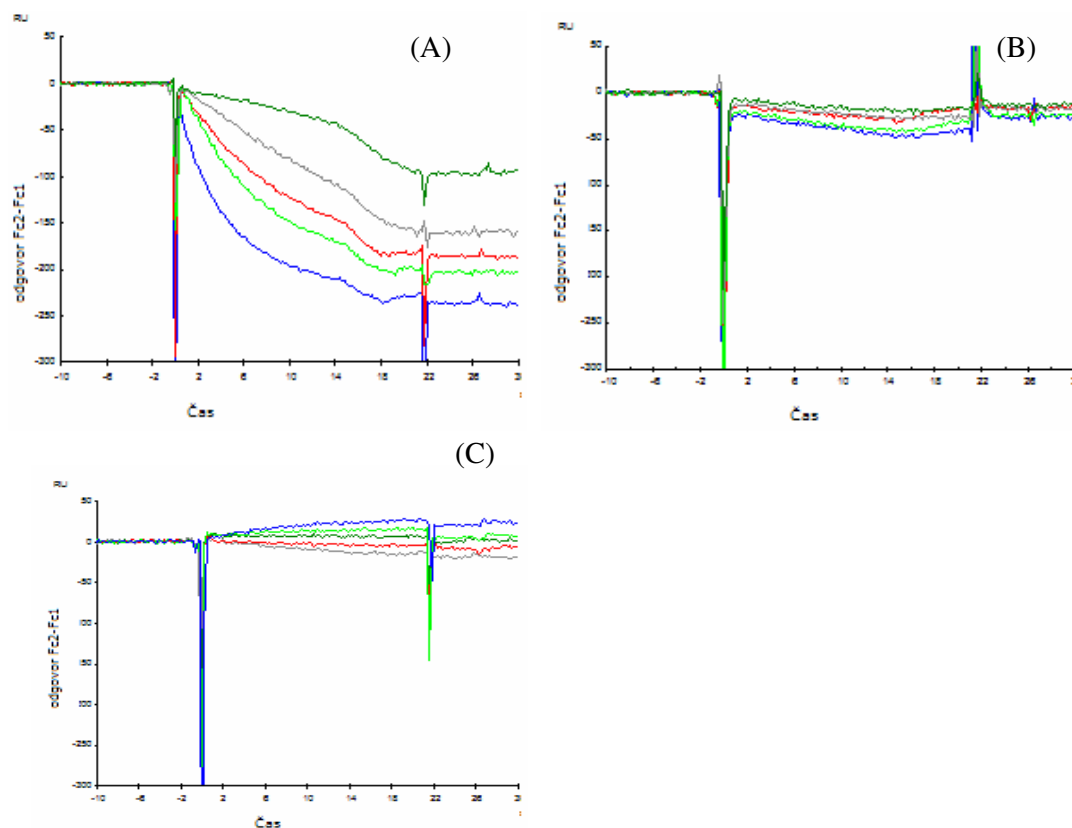
precej nižji od začetnega, kar nakazuje, da je M β CD več lipidov ekstrahiral iz vzorčne celice, majhno količino pa tudi iz referenčne, kjer so bili PC vezikli brez CHO (slika 5.2).



Slika 5.2: Odgovor na referenčni in vzorčni celici, ko smo vanju injicirali 3 mM M β CD za 22 s pri pretoku 150 μ l/min pri LUV DOPC : CHO v razmerju 1 : 0,5 (mol :mol). Referenčna celica vsebuje vezane vezikle iz PC (rdeče), vzorčna pa vezane vezikle iz PC in CHO

5.2.2 Reprezentativni rezultati izhajanja holesterola

Preverili smo, kakšno je izhajanje CHO iz liposomov različne sestave, tako da smo uporabili PC z nasičenimi, nenasičenimi acilnimi verigami in PC, ki je vseboval eno nasičeno in eno nenasičeno acilno verigo. Razlike v izhajanjih CHO prikazuje slika 5.3.



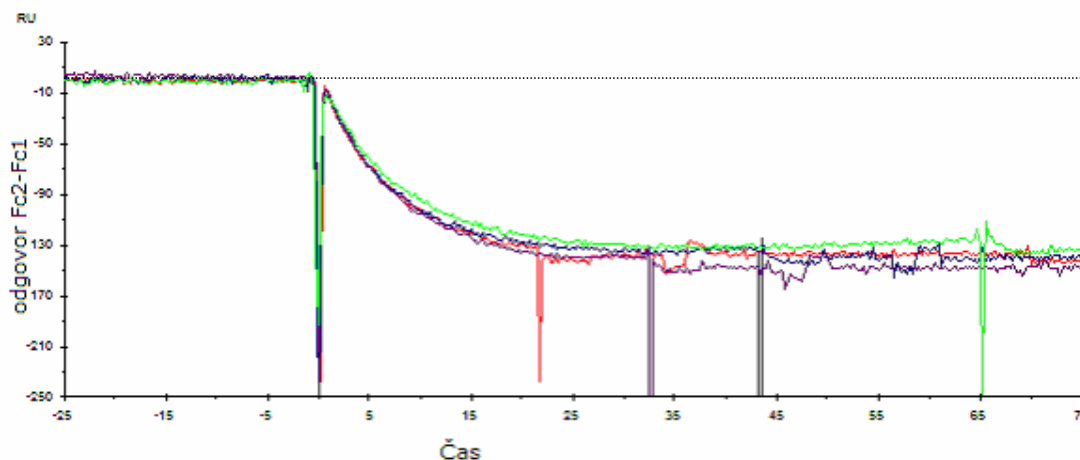
Slika 5.3: Razlika v odzivih na referenčni in vzorčni celici (Fc2-Fc1), potem ko smo odšteli pufer, pri uporabi različnih lipidov s PC : CHO razmerjem 1 : 0,5 (mol : mol): DOPC (A), POPC (B) in DMPC (C). Koncentracija MβCD: 1 mM – temno zelena, 2 mM – siva, 3 mM – rdeča, 4 mM – svetlo zelena in 5 mM – modra.

Tudi pri veliki koncentraciji CHO (50 %) v veziklih, se je veliko manj CHO izločilo iz POPC veziklov kot iz DOPC veziklov, tudi če smo uporabili 5 mM MβCD. Pri uporabi veziklov iz DMPC je razlika med vzorčno in referenčno celico celo narasla, kar pomeni, da se je več lipidov izločilo na vzorčni kot na referenčni merilni celici.

5.2.3 Pretoki

Preverili smo tudi ekstrakcijo CHO pri različnih pretokih M β CD.

Podatki kažejo, da hitrost pretoka M β CD čez celici ne vpliva niti na količino ekstrahiranih lipidov, niti na hitrost ekstrakcije lipidov (slika 5.4).

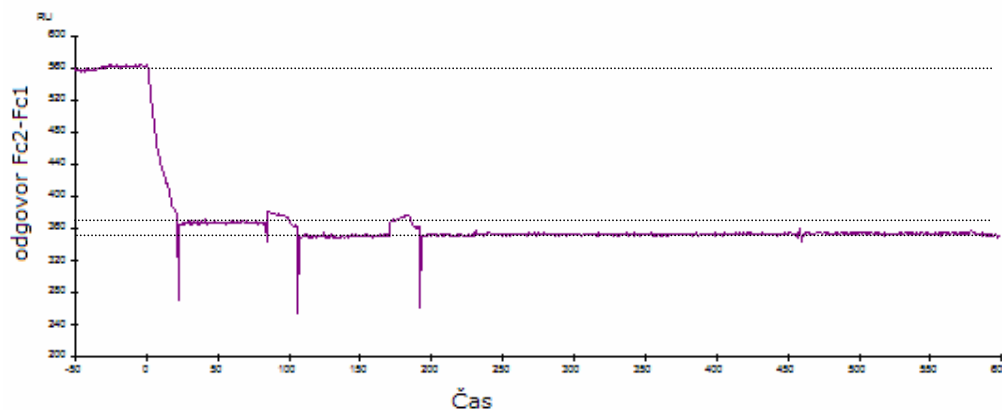


Slika 5.4: Razlika odzivov na referenčni in vzorčni celici pri veziklih DOPC : CHO v razmerju 1 : 0,5 (mol : mol) po različnih hitrostih pretoka M β CD čez obe celici. Pretoki so bili: 50 μ l/min (zelena), 75 μ l/min (modra), 100 μ l/min (vijolična) in 150 μ l/min (rdeča).

5.2.4 Količina ekstrahiranega holesterola

5.2.4.1 Preverjanje ekstrahirane količine CHO z večkratnim injiciranjem M β CD

Da bi preverili, ali se iz LUV pri ekstrakciji izloči celoten CHO smo iste vezikle večkrat spirali z M β CD (slika 5.5).

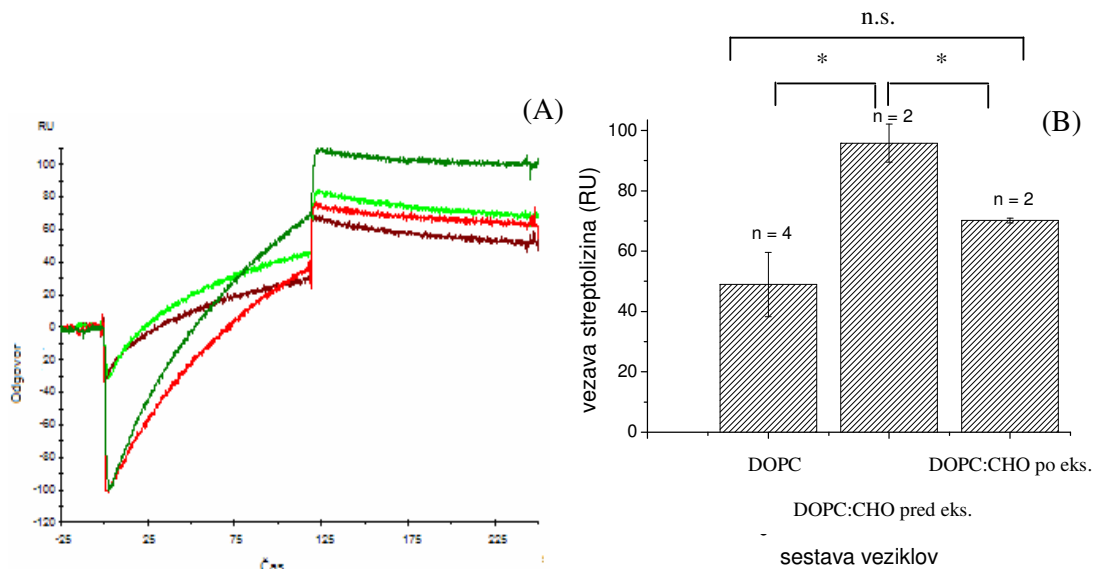


Slika 5.5: Ekstrahiranje CHO iz veziklov DOPC : CHO v razmerju 1 : 0,5 (mol : mol) 3x zaporedoma s 4 mM M β CD – razlika med referenčno in vzorčno celico

Ko smo 3x zaporedoma v obe celici injicirali M β CD, se je večina CHO izločila že pri prvi ekstrakciji (sprememba RU za 200). Drugič smo ekstrahirali še nekaj CHO (sprememba RU za 25), po tretjem injiciranju pa je signal ostal na isti vrednosti. Po 3-kratni ekstrakciji torej ekstrahiramo ves dostopni CHO.

5.2.4.2 Preverjanje ekstrahirane količine CHO s SLO

S SLO smo preverjali, ali se izloči ves CHO iz veziklov po večkratni ekstrakciji z M β CD. Predpostavljali smo, da se bo na liposome brez CHO ali na liposome s CHO po ekstrakciji z M β CD vezal slabo, na liposome s CHO pa dobro. SLO se je po ekstrakciji vezal manj, a še vedno bolj kot na vezikle iz samega DOPC. Signal (RU) na aparaturi BiacoreX se je povečal za $51,5 \pm 8,5$ RU ($n=4$), ko smo SLO vezali na DOPC vezikle, za $98 \pm 2,8$ RU ($n=2$), ko smo SLO vezali na vezikle z DOPC in CHO, preden smo iz njih z M β CD odstranili CHO, ter za $72 \pm 2,8$ RU ($n=2$) (povprečje \pm SD), ko smo SLO vezali na DOPC in CHO vezikle, katerim smo prej odstranili CHO (slika 5.6). Vrednosti p so opisane v preglednici 5.1.



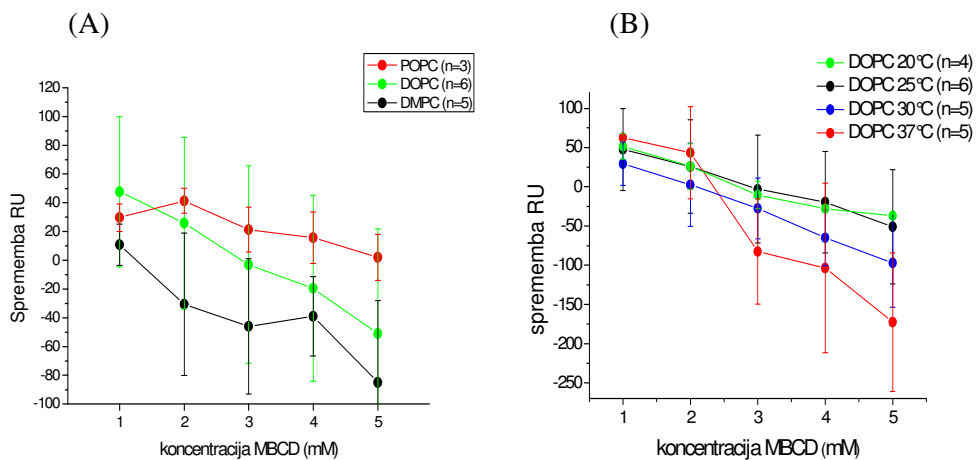
Slika 5.6: Sensorgram vezave SLO na DOPC vezikle (svetlo rdeča) in DOPC+CHO vezikle (temno zelena) pred ekstrakcijo CHO z M β CD in po ekstrakciji (temno rdeča – DOPC vezikli, svetlo zelena – DOPC+CHO vezikli) (A). Količina SLO vezanega na vezikle različne sestave (B). * $p < 0,05$; n.s. $p > 0,05$.

Preglednica 5.1: Vrednosti p za primerjave vezave SLO na različne liposome

primerjava vezave SLO	p vrednost
DOPC : DOPC+CHO pred ekstrakcijo	0,00511
DOPC : DOPC+CHO po ekstrakciji	0,05619
DOPC+CHO pred eks. : DOPC+CHO po eks.	0,02985

5.2.5 Izločanje ostalih lipidov

M β CD ni popolnoma selektiven pri ekstrahiranju, poleg CHO se vanj lahko vključijo tudi drugi lipidi. Sprememba signala na referenčni celici (Fc1) po injiciranju različnih koncentracij M β CD je prikazana na sliki 5.7.



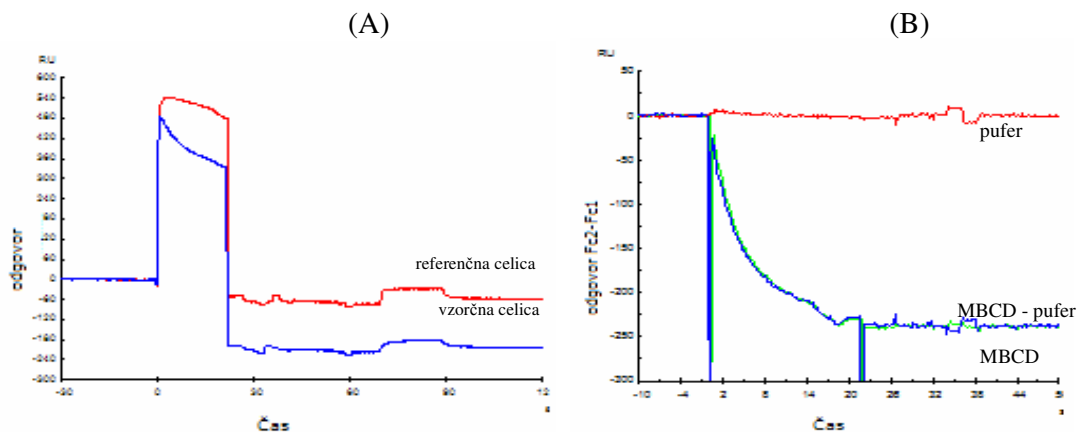
Slika 5.7: Izločanje PC pri različnih koncentracijah M β CD: Izločanje različnih lipidov v odvisnosti od koncentracije M β CD (A) in izločanje DOPC pri različnih temperaturah v odvisnosti od koncentracije M β CD (B). Uporabili smo liposome iz čistega DOPC, DMPC ali POPC.

Kljub veliki standardni deviaciji rezultati nakazujejo, da M β CD poleg CHO najbolj od uporabljenih lipidov ekstrahira tudi DMPC, nekoliko manj DOPC in najmanj POPC. Pri višjih temperaturah ekstrahira več DOPC kot pri nižjih, količina ekstrakcije pa je odvisna od koncentracije M β CD.

5.3 OBDELAVA EKSPERIMENTALNIH KRIVULJ

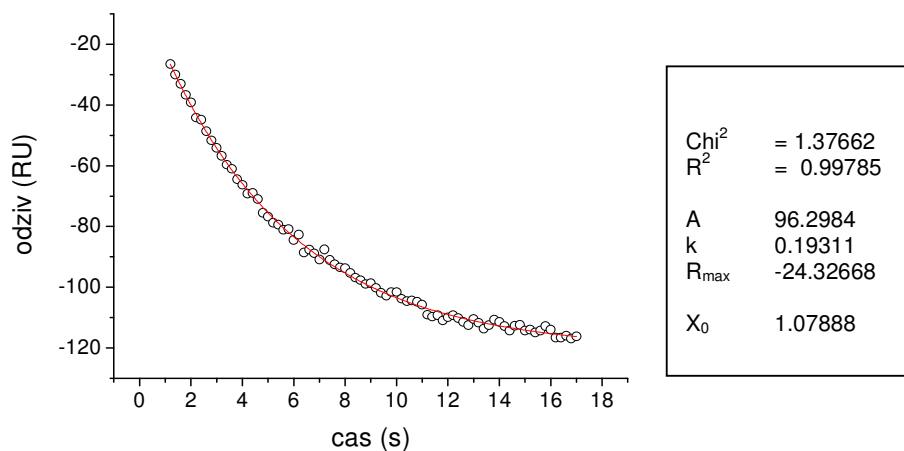
5.3.1 Prikaz ugotavljanja prileganja eksperimentalnih krivulj teoretičnemu modelu

Na referenčno celico smo nanесли liposome brez CHO, na vzorčno pa liposome s CHO. V obe celici smo injicirali najprej pufer, potem pa M β CD. Po nanosu M β CD smo dobili senzogramе, ki so prikazani na sliki 5.8 (A). Ko smo ta dva dela krivulj med seboj odšteli smo dobili razliko med referenčno in vzorčno celico po injiciranju M β CD. Enako smo naredili tudi z deloma krivulj po injiciranju puфра. Odšteli smo še krivuljo razlike med injiciranjem puфра na obeh celicah od krivulje razlike med injiciranjem M β CD v obe celici, da smo dobili le spremembo signala, ki nastane zaradi injiciranja M β CD v vzorčno celico, ne pa zaradi injiciranja puфра ali ekstrakcije PC z M β CD, t.i. dvojno korigiranje signalov. Razlika v odzivu med referenčno celico in vzorčno celico po injiciranju puфра in M β CD, ter krivulja, kjer smo pufer odšteli od M β CD, je prikazana na sliki 5.8 (B).



Slika 5.8: Odziv na vzorčni in referenčni celici po nanosu MβCD (A) in razliko v odzivu na referenčni in vzorčni celici po nanosu pufera in nanosu MβCD (modra krivulja) in krivulja, kjer smo odšteli pufer od MβCD (zeleni krivulja) (B). Referenčna celica vsebuje vezikle iz PC (rdeče), vzorčna celica vsebuje vezikle iz PC in CHO.

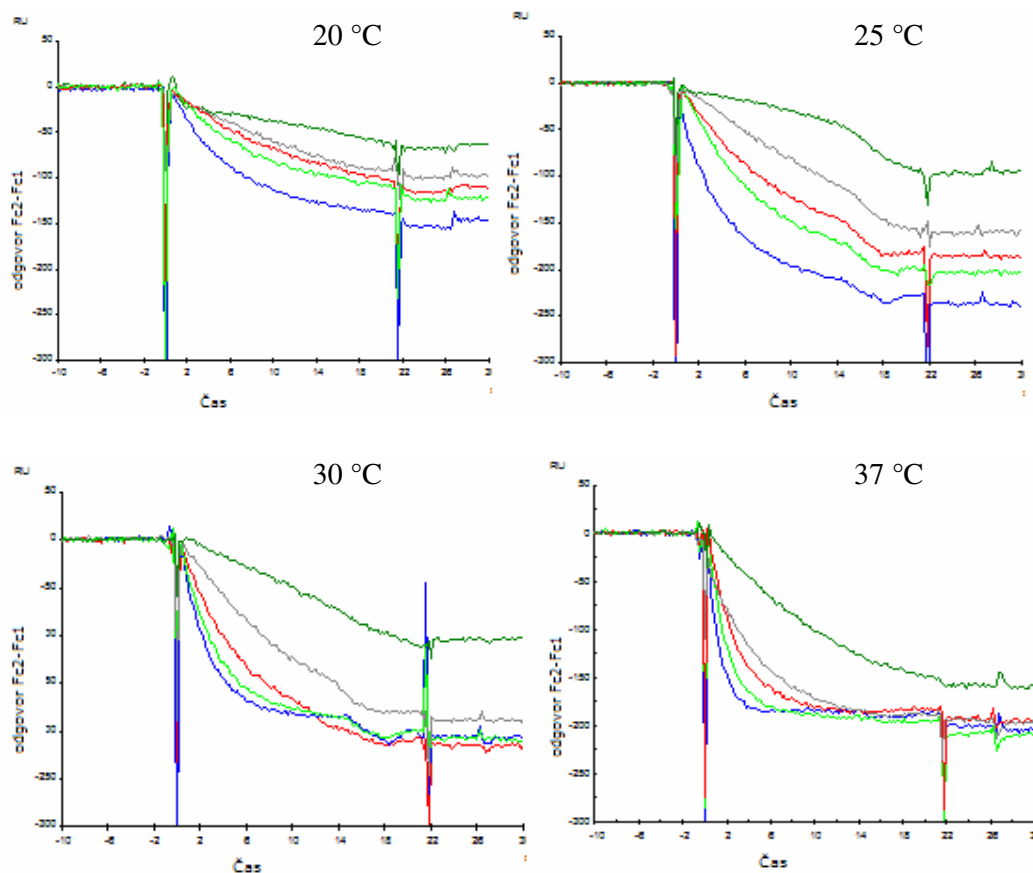
Ko smo dobili krivuljo kjer smo odšteli referenčno celico in pufer, smo jo prilegali teoretičnemu modelu po enačbi 4.1, ter tako dobili podatke prileganja (slika 5.9).



Slika 5.9: Ugotavljanje prileganja eksperimentalne krivulje teoretičnemu modelu s podatki prileganja

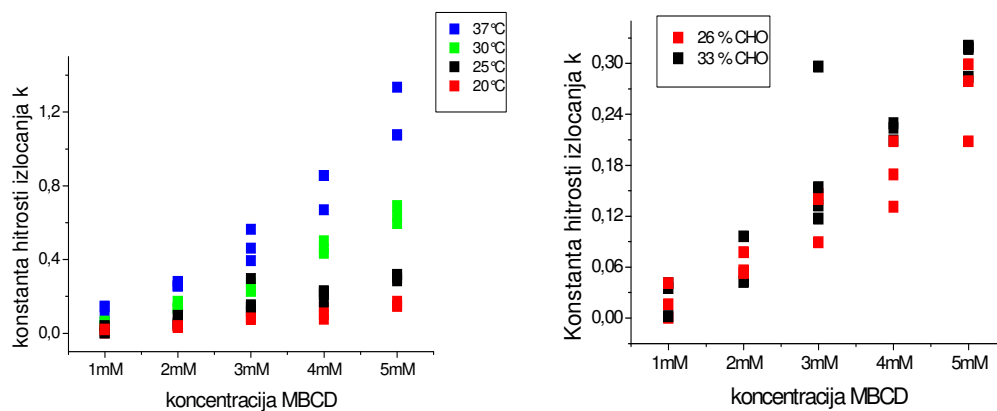
5.3.2 Hitrost izhajanja holesterola pri različnih temperaturah

Preverili smo tudi izhajanje CHO iz LUV z DOPC in CHO s M β CD pri različnih temperaturah. Večje koncentracije (4 in 5 mM) M β CD ekstrahirajo CHO iz veziklov hitreje, poleg tega pa ekstrahirajo tudi več CHO. Pri visokih temperaturah že manjše koncentracije ekstrahirajo ves CHO iz veziklov, zato pri 30 °C in 37 °C 5 mM M β CD ekstrahira skoraj enako količino CHO kot 2 mM (slika 5.10).



Slika 5.10: Razlike v odzivih na vzorčni in referenčni celici pri ekstrakciji holesterola z M β CD pri različnih temperaturah in različnih koncentracijah M β CD (koncentracije M β CD: 1 mM – temno zelena, 2 mM – siva, 3 mM – rdeča, 4 mM – svetlo zelena in 5 mM – modra)

Izračunali smo navidezne konstante hitrosti izločanja CHO pri različnih temperaturah in različnih koncentracijah CHO.

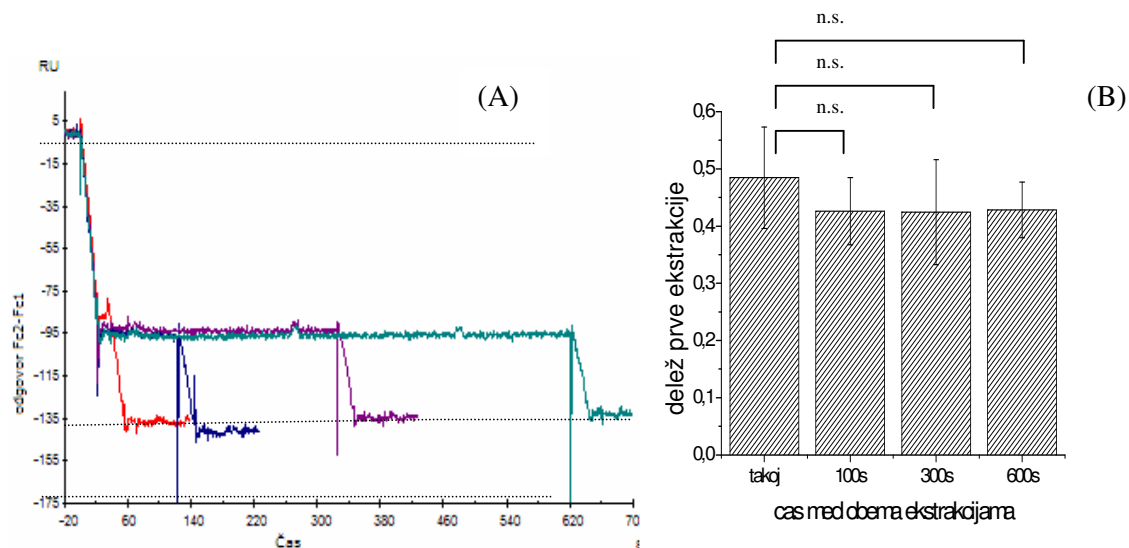


Slika 5.11: Navidezne konstante hitrosti izločanja holesterola (k) v odvisnosti od koncentracije M β CD pri veziklih iz DOPC in CHO v razmerju DOPC : CHO 1 : 0,5 (mol : mol) pri različnih temperaturah (A) in pri veziklih s sestavo DOPC : CHO 1 : 0,5 ali DOPC : CHO 1 : 0,35 (mol : mol)

Po izračunanih konstantah hitrosti izločanja CHO iz veziklov lahko sklepamo, da izločanje CHO ni odvisno od razmerja DOPC : CHO, odvisno pa je od temperature. Pri višjih temperaturah so konstante izločanja CHO večje (slika 5.11).

5.4 FLIP-FLOP HOLESTEROLA

V literaturi najdemo zelo različne podatke o hitrosti transverzalnega gibanja CHO v membranah (flip-flop), zato smo naredili poskus, da bi ocenili hitrost transverzalnega gibanja CHO s SPR.



Slika 5.12: Razlika odzivov na referenčni in vzorčni celici, potem ko smo nanju 2x nanесли MβCD v različnih časovnih intervalih (drugi nanos takoj, po 100 s, po 300 s in po 600 s) (A). Delež ekstrahiranega CHO v drugi ekstrakciji po različnih časovnih obdobjih glede na količino CHO ekstrahirano v prvi ekstrakciji (B). n.s. $p > 0,05$

Majhno koncentracijo MβCD (1 mM) smo dvakrat zaporedoma injicirali v obe celici v različnih časovnih intervalih, tako da smo drugič MβCD injicirali takoj po prvi ekstrakciji, 100 s po prvi ekstrakciji, 300 s po prvi ekstrakciji ali 600 s po prvi ekstrakciji. Ker smo uporabili majhno koncentracijo MβCD je nekaj CHO še ostalo v membrani. Predvidevamo, da smo v prvi ekstrakciji izločili le CHO v zunanem sloju membrane, v notranjem pa je še ostal. V času med ekstrakcijama se je CHO ekvilibiral med obema slojema membrane.

Ko smo drugič injicirali MβCD takoj po prvi ekstrakciji, se je izločilo v povprečju $48,5 \pm 8,9$ % prve ekstrakcije CHO, po drugi ekstrakciji po 100 s se je izločilo $42,6 \pm 5,9$ % prve ekstrakcije, po 300 s $42,5 \pm 9,2$ % prve ekstrakcije in po 600 s $42,8 \pm 4,9$ % (povprečje \pm SD, $n=4$) prve ekstrakcije CHO. Razlike v vseh primerih niso statistično značilne ($p > 0,05$) glede na ponovno ekstrakcijo takoj po prvi ekstrakciji. Vrednosti p so izpisane v preglednici 5.2. Razlika odzivov na referenčni in vzorčni celici ter grafični prikaz ekstrakcije kaže slika 5.12.

Ker se je pri vseh drugih ekstrakcijah izločila enaka količina CHO ne glede na to, kakšen je bil interval med ekstrakcijama, predvidevamo, da ekvilibracija CHO med obema slojema membrane poteče v nekaj sekundah, kolikor je bilo potrebno, da smo takoj ponovno injicirali MβCD v merilne celice.

Preglednica 5.2: Vrednosti p za primerjave ekstrakcij z različnim zamikom injiciranja.

primerjava ekstrakcij	p vrednost
takoj : 100 s	0,05367
takoj : 300 s	0,40083
takoj : 600 s	0,37661

6 RAZPRAVA IN SKLEPI

V našem delu smo okarakterizirali sistem za merjenje ekstrakcije holesterola z SPR. Uporabili smo senzorski čip na katerega je vezan biotin, saj smo želeli čimbolj omejiti nespecifično vezavo. Na L1 dekstranski čip bi se teoretično lahko vezal tudi M β CD (Podlesnik-Beseničar *in sod.*, 2008). Vezikle smo zato morali označiti z biotinom.

Največja topnost CHO v PC veziklih je 66 molskih procentov (Huang *in sod.*, 1999). Če uporabimo več CHO, precipitira iz membran in tvori kristale ali čisti holesterol monohidrat. Zato smo uporabljali vezikle, ki so imeli razmerje DOPC : CHO največ 1 : 0,5 (mol : mol).

6.1 EKSTRAKCIJA HOLESTEROLA

CHO se je najbolje ekstrahiralo iz DOPC LUV, precej slabše iz POPC LUV in DMPC LUV. Rezultat je najverjetneje posledica nasičenja verig, kar je bila tudi naša hipoteza, saj ima CHO največjo afiniteto za PC z nenasičenimi acilnimi verigami (Leventis *in sod.*, 2001, Lund-Katz *in sod.*, 1988). Z DOPC je torej najslabše reagiral, saj je aktivacijska energija za prehod v vodno fazo najnižja pri nasičenih lipidih (Lund-Katz *in sod.*, 1988), zato ga je M β CD lažje ekstrahiralo. Bolje je reagiral z DMPC in POPC, zato je bila tam razlika med signalom na referenčni in vzorčni celici najmanjša. Razliko v aktivacijski energiji bi lahko pripisali večji interakciji CHO z PC z nasičenimi acilnimi verigami z van der Waalsovimi vezmi (Lund-Katz *in sod.*, 1988).

Ekstrakcija CHO v naših poskusih ni bila odvisna od hitrosti pretoka M β CD preko merilnih celic, saj je pri različnih pretokih tako hitrost ekstrakcije, kot količina ekstrahirane CHO ostala enaka. Odvisna pa je bila od temperature. Pri višji temperaturi so bile konstante hitrosti višje kot pri manjši, z manjšimi koncentracijami M β CD pa se je izločilo več CHO. Tako je bila pri 37 °C količina CHO v veziklih omejujoč dejavnik za ekstrakcijo. Pri 20 °C niti z največjo koncentracijo M β CD (5 mM) nismo ekstrahirali vsega CHO.

Ekstrakcija CHO tudi ni bila odvisna od njegove koncentracije v veziklih, vsaj ne v razponu 26-33 molskih odstotkov. To je v skladu z literaturo, saj so tudi Poznansky *in sod.* ugotovili, da se pri izmenjavi CHO med vezikli DOPC in eritrocitnimi duhki aktivacijska energija močno poveča pri zniževanju koncentracije CHO v membranah eritrocitnih duhkov iz 30 na 20 molskih odstotkov (Poznansky *in sod.*, 1978). Torej je pri obeh koncentracijah, ki smo jih preskušali mi, aktivacijska energija še dovolj nizka, da razlika v ekstrakciji ni očitna.

6.2 KOLIČINA EKSTRAHIRANEGA HOLESTEROLA

Na dva načina smo skušali pokazati, da smo v poskusih ekstrahirali ves dostopen CHO iz veziklov. Najprej s trikratno ekstrakcijo z 5 mM M β CD, kjer je signal po tretji in drugi ekstrakciji ostal na istem nivoju, torej smo že v drugem spiranju ekstrahirali skoraj ves dostopen CHO. Za drug dokaz smo uporabili SLO, ki se pretežno veže na CHO. Manj SLO se je vezalo na vezikle DOPC+CHO po ekstrakciji CHO, kot pred ekstrakcijo. Po

ekstrakciji se je sicer vezalo več SLO kot na vezikle samo iz DOPC, vendar razlika ni bila statistično značilna ($p > 0,05$), tako da smo tudi tu ugotovili, da se iz veziklov izloči večina CHO.

Ugotovili smo, da znižanje signala na Biacore X aparaturi pri naših poskusih ni ustrezalo količini CHO v veziklih. Signal, ki ga dobimo pri merjenju z SPR je odvisen od lomnega količnika blizu površine. Ker smo merili ekstrakcijo iz veziklov različne sestave predvidevamo, da DOPC, POPC, DMPC in CHO ne prispevajo enako k lomnemu količniku, zato smo v literaturi poiskali lomne količnike različnih lipidov.

Če bi vsi lipidi prispevali enako k lomnemu količniku, bi se moral signal znižati pri LUV z 33,3 % CHO za približno 330 RU, pri uporabi LUV z 26 % CHO pa za 260 RU, če bi izločili ves CHO. Pri naših poskusih se je signal pri ekstrakciji lipidov iz LUV iz DOPC spremenil za največ 210 RU, pri LUV iz POPC pa za 110 RU. Ker smo na več načinov pokazali, da smo izločili ves dostopen CHO iz veziklov, sklepamo, da lipidi ne prispevajo enako k spremembi lomnega količnika. Lomni količniki za različne snovi, ki smo jih uporabili pri tem diplomskem delu so izpisani v preglednici 6.1.

Lomni količniki se močno razlikujejo, odvisno od metode, s katero so jih merili, spreminjajo pa se tudi s spremembo temperature pri merjenju in debelino sloja. V poskusih z SPR se ponavadi predpostavlja, da vse snovi enako prispevajo k spremembi signala, vendar je pri tem potrebna previdnost, saj se lomni količniki lahko zelo razlikujejo.

Pri preverjanju lomnega količnika lipidov je pomembno tudi, ali imamo opravka z vezikli (unilamelarnimi, multilamelarnimi) ali z membrano. Pri študiji lomnih količnikov različnih liposomov je bilo ugotovljeno, da so tisti liposomi, ki imajo lomni količnik blizu lomnega količnika pufra najverjetneje unilamelarni. Bolj ko se lomni količnik od pufra razlikuje, večja je verjetnost da so vezikli multilamelarni. Največji lomni količnik imajo membrane, pri najmanjši debelini sloja (Poppewell *in sod.*, 2007).

Pri dodatku CHO v membrano SM se membrane uredijo, kar se kaže v višjem lomnem količniku pri večji debelini membrane (Devanathan *in sod.*, 2006). Podobno se je lahko dogajalo v naših poskusih, če je holesterol uredil membrane PC. Če so membrane veziklov prešle iz urejenega v neurejeno fazo, bi lahko ekstrakcija CHO povzročila večji padec lomnega količnika, kot bi ustrezal ekstrahirani količini CHO in s tem vplivala na signal. Ali bi bil vpliv dovolj velik, da bi pomembno spremenil signal, iz naših poskusov ni mogoče predvideti.

Preglednica 6.1: Lomni količniki različnih snovi, ki smo jih uporabili pri tem diplomskem delu, dobljeni iz literature.

Metoda	Lipidi	Lomni količnik	Temperatura (°C)	Debelina lipidnega sloja (nm)	Vir
DPI (dvojna polarizacijska interferometrija)	DOPC vezikli	1.385	20	10-12	Pooplewell <i>in sod.</i> , 2005
PWR (valovno vodena plazmonska resonanca)	DOPC membrana	1.443	ni podatka	5,0	Salamon <i>in sod.</i> , 2005
PWR	SM membrana	1.495	ni podatka	6,1	Salamon <i>in sod.</i> , 2005
PWR	DOPC membrana	1.453	20	5,0	Devenathan <i>in sod.</i> , 2006
PWR	SM membrana	1,485	20	5.8	Devenathan <i>in sod.</i> , 2006
PWR	membrana SM:CHO 1:0,35 (mol:mol)	1.539	20	6.2	Devenathan <i>in sod.</i> , 2006
DPI	DMPC (hibrid z dekanoično kislino)	1.435 (dekanoična ksl. 1.450)	20	2,12±0,34	Terry <i>in sod.</i> , 2006
PWR	POPC membrana	1.458	ni podatka	5,4	Salamon <i>in sod.</i> , 2005
elipsometrija	CHO	1,47	5	približno 3	Lafont <i>in sod.</i> , 1998
DPI	POPC vezikli	1,376	20	25,6	Popplewell <i>in sod.</i> , 2007
DPI	DMPC vezikli	1,348	20	43,3	Popplewell <i>in sod.</i> , 2007
DPI	DOPC vezikli	1,375	20	18,5	Popplewell <i>in sod.</i> , 2007

6.3 EKSTRAKCIJA DRUGIH LIPIDOV

Pri nižjih koncentracijah je M β CD precej specifičen in ekstrahira predvsem CHO, pri višjih koncentracijah pa ekstrahira tudi druge lipide. Anderson *in sod.*, so v objavi leta 2004 dejali, da se nespecifični ekstrakciji s M β CD izognemo tako, da uporabimo manj kot 15 mM M β CD (Anderson *in sod.*, 2004). Pri merjenju z SPR bi morala biti ta koncentracija še precej manjša (1 do 2 mM), da resnično zagotovimo specifičnost. V naših poskusih se je pokazalo, da M β CD bolj ekstrahira druge lipide tudi pri višji temperaturi, zato večjo specifičnost zagotovimo tudi z merjenjem pri nižjih temperaturah (20 °C ali 25 °C), kjer je ekstrakcija ostalih lipidov majhna.

Najbolj je M β CD poleg CHO ekstrahirala DMPC, nekoliko manj DOPC, POPC pa se je izločal šele pri najvišji koncentraciji. Razlog za močno ekstrakcijo DMPC je verjetno v nasičenosti acilnih verig in dolžini acilnih verig. DMPC ima namreč najkrajše acilne verige med vsemi PC, ki smo jih uporabljali, zato se verjetno lažje vstavi v odprtino M β CD. Tako DOPC kot POPC imata daljše acilne verige. Pokazano je tudi že bilo, da CD lažje tvorijo komplekse z PC z nenasičenimi acilnimi verigami (Szejtli *in sod.*, 1986), zato se je verjetno DOPC, ki ima dve nenasičeni acilni verigi, bolje ekstrahirala kot POPC, ki ima eno nenasičeno acilno verigo.

V poskusih z LUV z DMPC je M β CD veliko lipidov ekstrahirala tudi iz veziklov na referenčni celici, kjer je bil prisoten samo DMPC, komaj kaj več lipidov se je izločilo na vzorčni celici, kjer so bili vezikli z DMPC in CHO. Tak rezultat verjetno nismo dobili, ker M β CD ne bi ekstrahirala CHO iz veziklov, pač pa bi to lahko bila posledica sposobnosti CHO, da uredi membrane na vzorčni celici, medtem ko so bile membrane na referenčni v neurejenem stanju. Ker CHO uredi membrane na vzorčni celici so lipidi (CHO in DMPC) težje dostopni za M β CD, na referenčni celici pa so membrane v neurejenem stanju zato M β CD lažje ekstrahira DMPC.

6.4 TRANSVERZALNO GIBANJE HOLESTEROLA

Ker za hitrost flip-flopa v literaturi najdemo zelo različne podatke tudi za zelo podobne membrane, smo jo s SPR tehniko sami preverili. Ena od možnosti, zakaj so podatki v literaturi tako različni je občutljivost metode, ki so jo avtorji uporabljali. Ker je SPR izredno občutljiva metoda, smo lahko dobili zelo natančne rezultate, pri ocenjevanju iz spontanega prehajanja CHO med vezikli pa to največkrat ni mogoče, saj že samo prehajanje traja nekaj ur, tako da ni možno določiti hitrosti flip-flopa natančneje kot na nekaj ur. Druga možnost za tako različne podatke v literaturi je tudi, da avtorji namesto CHO uporabljajo nadomestke, analoge CHO označene spinskimi ali fluorescenčnimi označevalci. Ti morda ne interagirajo enako kot CHO. Za fluorescenčne analoge CHO je bilo že pokazano, da se v membranah ne obnašajo enako kot CHO (Ohvo-Rekila *in sod.*, 2000). Tudi uporaba detergentov v poskusu ali sestava pufra lahko poškoduje lipidno membrano.

Tudi tu se je pokazala prednost merjenja medmolekulskih intrakcij z SPR metodo, saj je bilo pokazano, da se membrane pri tej metodi ne poškodujejo (Podlesnik-Beseničar *in sod.*, 2008), uporablja pa se CHO in ne njegovi analogi.

CHO smo ekstrahirali z nizko koncentracijo M β CD (1 mM), tako da smo ekstrahirali le CHO v zunanem delu lipidnega dvosloja. V času med dvema ekstrakcijama se je CHO iz notranjega dela dvosloja razporedil med obema deloma dvosloja. Če bi bil flip-flop počasen, bi se v drugi ekstrakciji ekstrahiralo več CHO, če bi pustili več časa za ekvilibracijo. Glede na to, da se je po dveh zaporednih ekstrakcijah v drugi ekstrakciji takoj, po 100 s, po 300 s in po 600 s ekstrahirala enaka količina CHO, lahko rečemo, da je flip-flop CHO izredno hiter in ni omejujoč dejavnik za ekstrakcijo. Hitrost flip-flopa je po naših ocenah v rangu nekaj sekund, kolikor potrebujemo, da smo M β CD ponovno injicirali v merilni celici. To je tudi v skladu z literaturo (Leventis in sod., 2001, Zachowski, 1993).

6.5 SKLEPI

- 1.) Merjenje z SPR je primerna tehnika za spremljanje ekstrakcije CHO iz lipidnih membran v realnem času.
- 2.) M β CD bolje ekstrahira CHO iz membran s PC, ki vsebujejo nenasičene acilne verige.
- 3.) Ekstrakcija CHO je odvisna od temperature, ne pa od koncentracije CHO v veziklih ali hitrosti pretoka M β CD.
- 4.) Poleg holesterola se z M β CD v manjši meri ekstrahirajo tudi drugi lipidi. Ekstrakcija drugih lipidov je najverjetneje odvisna od nasičenja acilnih repov fosfatidilholina in dolžine acilnih repov.
- 5.) Flip-flop CHO pri ekstrakciji CHO ni omejujoč dejavnik, torej je hitrost flip-flopa nekaj sekund.

7 POVZETEK

SPR se je izkazala kot ena najpomembnejših tehnik za študije medmolekulskih interakcij, saj omogoča merjenje v realnem času in s tem analizo kinetike interakcij, za poskus pa potrebujemo relativno malo preiskovane snovi. Predvsem se je uporabljala za študije proteinov, v zadnjem desetletju pa se uporablja tudi za preučevanje interakcij med lipidi in ostalimi makromolekulami.

CHO je izredno pomembna biološka molekula, saj je v membrani odgovoren za številne procese v celici ter za pravilno delovanje celice. Skupaj s SM in nasičenimi fosfatidilholini tvori debelejšo in bolj kondenzirano dele membrane, lipidne rafte. Ti so mesto vezave za številne proteine, tako kot je mesto vezave tudi sam CHO. Za proučevanje delovanja celic je zato pomembno, da ugotovimo, kaj se spremeni, če iz membran ekstrahiramo CHO.

Ekstrakcije CHO smo se lotili z M β CD. M β CD je oligosaharid sestavljen iz sedmih glukopiranoznih enot modificiranih z metilnimi skupinami, povezanih z 1-4 glikozidnimi vezmi. Ima obliko prisekanega stožča, v notranjosti pa ima odprtino, ki je zelo hidrofobna. Vanjo se lahko vključijo številne lipofilne molekule. Tako M β CD naredi te molekule topne v vodi. M β CD med drugim dobro ekstrahira CHO, tudi zaradi ravno prave velikosti odprtine.

V tem diplomskem delu smo opredelili sistem za merjenje ekstrakcije CHO z SPR z uporabo M β CD. Ugotovili smo, da je ekstrakcija CHO odvisna od temperature pri kateri poteka reakcija, ne pa od pretoka M β CD preko merilnih celic. Ekstrakcija tudi ni odvisna od koncentracije CHO v veziklih, vsaj v razponu od 26 do 33 molskih odstotkov CHO. M β CD je v naših poskusih najbolj ekstrahiralo CHO iz veziklov DOPC, nekoliko slabše pa iz veziklov POPC in DMPC. Da resnično ekstrahiramo ves CHO iz veziklov smo pokazali na dva načina, z večkratno ekstrakcijo CHO, kjer že po tretji ekstrakciji ni bilo več sprememb v signalu, ter z vezavo SLO, toksina, ki se veže na CHO, na vezikle. Razlika v vezavi SLO na vezikle DOPC in vezikle DOPC in CHO po ekstrakciji CHO ni bila statistično značilna. S tem smo dokazali, da z M β CD ekstrahiramo večino CHO.

Ugotovili smo, da M β CD poleg CHO v manjši meri ekstrahira tudi druge lipide. Tako je poleg CHO ekstrahiralo najbolj DMPC, nekoliko manj DOPC, POPC pa je ekstrahiralo le pri največjih koncentracijah.

Ker v literaturi najdemo zelo različne podatke o hitrosti transverzalnega gibanja CHO v membranah, tudi za zelo podobne membrane, smo sami preverili hitrost flip-flopa. Ko smo dvakrat zaporedoma injicirali M β CD v različnih časovnih zamikih preko veziklov smo ugotovili, da je flip-flop CHO zelo hiter, v rangu nekaj sekund, kolikor potrebujemo za ponovno injiciranje M β CD. Po takojšnji ponovni ekstrakciji CHO z M β CD smo ekstrahirali enako količino CHO kot če smo pred ponovno ekstrakcijo čakali 600 s. Flip-flop CHO torej ni omejujoč dejavnik za ekstrakcijo.

SPR je primerna tehnika za merjenje ekstrakcije CHO iz lipidnih membran, ter proučevanje lipidnih membran na splošno. S SA čipom pa zmanjšamo možnost nespecifičnih interakcij, torej preprečimo vezavo M β CD na dekstranski matriks čipa L1. Interakcija med streptavidinom in biotinom je namreč zelo specifična.

8 LITERATURA

- Abdiche Y. N., Myszka D. G. 2004, Probing the mechanism of drug/lipid interaction using Biacore. *Analytical Biochemistry*, 328; 233-243.
- Ahmad A., Ramakrishnan A., McLean M. A., Breau A. P. 2003, Use of surface plasmon resonance biosensor technology as a possible alternative to detect differences of binding of enantiomeric drug compounds to immobilized albumins. *Biosensors and Bioelectronics*, 18; 399-404.
- Anderluh G., Maček P., Lakey J. H. 2003, Peeking into a secret world of pore-forming toxins: membrane binding processes studied by surface plasmon resonance. *Toxicon*, 42; 225-228.
- Anderson T. G., Tan A., Ganz P., Seelig J. 2004, Calorimetric Measurement of Phospholipid Interaction with Metyl- β -Cyclodextrin. *Biochemistry* 43; 2251-2261.
- Baird C. L., Courenay E. S., Myszka D. G., 2002, Surface plasmon resonance characterization of drug/liposome interactions. *Analytical Biochemistry*, 310; 93-99.
- Beseničar M., Maček P., Lakey J. H., Anderluh G. 2006, Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 141; 169-178.
- Brewster M. E., Loftsson L. 2007, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, doi: 10.1016/j.addr.2007.05.012
- Cristian A. E., Haynes P., Phillips M. C., Rothblat G. H. 1997, Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research*, 38; 2264-2272.
- Casu B., Reggiani M., Sanderson G. R. 1978, Methylated cycloamyloses (cyclodextrins) and their inclusion properties. *Carbohydrate Research*, 76; 59-66.
- Devanathan S., Salamon Z., Lindblom G., Grobner G., Tollin G. 2006, Effects of sphingomyelin, cholesterol and zinc ions on the binding, insertion and aggregation of amyloid A β_{1-40} peptide in solid-supported lipid bilayers. *FEBS Journal*, 273; 1389-1402.
- Filippov A., Oradd G., Lindblom G. 2003, The Effect of Cholesterol on the Lateral Diffusion of Phospholipids in Oriented Bilayers. *Biophysical Journal*, 84; 3079-3086.
- Frank C., Rufini S., Tancredi V., Forcina R., Grossi D., D'Arcangelo 2008, Cholesterol depletion inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity in rat hippocampus. *Experimental Neurology*, doi:10.1016/j.expneurol.2008.04.019
- Harris J. R., Adrian M., Bhakdi S., Palmer M. 1998, Cholesterol-streptolysin O interaction: An EM study of wild-type and mutant streptolysin O. *Journal of Structural Biology*, 121; 343-355.

-
- Hartmann-Petersen R., Gordon C. 2005, Quantifying protein-protein interactions in the ubiquitin pathway by surface plasmon resonance. *Methods in Encymology*, 399; 164-177.
- Haynes M. P., Phillips M. C., Rothblat G. H. 2000, Efflux of Cholesterol from Different Cellular Pools. *Biochemistry*, 39; 4508-4517.
- Huang J., Buboltz J. T., Feigenson G. W. 1999, Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1417; 89-100.
- Jongorius-Gortemaker B. G. M., Goverde R. L. J., van Knapen F., Bergwerff A. A. 2002, Surface plasmon resonance (BIACORE) detection of *Salmonella interetidis* and *Salmonella tyipimurium*. *Journal od immunological methods*, 266; 33-44.
- Jouni Z. E., Yun H. K., Wells M. A. 2002, Cholesterol efflux from larval *Manduca sexta* fat body in vitro: high-density lipophorin as the acceptor. *Journal of Insect Physiology*, 48; 609-618.
- Kirby C. J., Green C. 1977, Transmembrane migration ('Flip-flop') of cholesterol in Erythrocyte Membranes. *Biochemical Journal*, 168;575-577.
- Lafont S., Rapaport H., Somjen J. G., Renault A., Howes P. B., Kristian K., Als-Nielsen J., Leiserowitz L., Lahav M. 1998, Monitoring the Nucleation of Crystalline Films of Cholesterol on Water and in the prsence of Phospholipid. *Journal of Physical Chemistry*, 102;761-765.
- Lenard J., Rothman J. E. 1976, Transbilayer distribution and movement of cholesterol and phospholipid in the membrane of influenza virus. *Proceeding of the Nationa Academy of Sciences*, 73; 391-395.
- Leonard P., Hearty S., Quinn J., O'Kennedy R. 2004, A generic approach for the detection of whole *Lysteria monocytogenes* cells in contaminated samples using surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 19; 1331-1335.
- Leventis R., Silvius J. R. 2001, Use of Cyclodextrins to Monitor Transbilayer Movement and Differential Lipid Affinities of Cholesterol. *Biophysical Journal*, 81; 2257-2267.
- Li B., Chen J., Long M. 2008, Measuring binding kinetics of surface-bound molecules using the surface plasmone resonance technique. *Analytical Biochemistry*, 377; 195-201.
- Lund-katz S., Laboda H. M., McLean L. R., Phillips M. C. 1988, Influence of molecular packing and phospholipid type on the rates of cholesterol exchange. *Biochemistry*, 27; 3416-3423.
- Maxfield F. R., Wustner D. 2002, Intracellular cholesterol transport. *Journal of Clinical Investigation*, 110; 891-898.

-
- Morton T. A., Myszka D. G., Chaiken I. M. 1995, Interpreting Complex Binding Kinetics from Optical Biosensors: A Comparison of Analysis by Linearization, the Integrated Rate Equation and Numerical Integration. *Analytical Biochemistry*, 227; 176-185.
- Morton T. A., Myszka D. G. 1998, Kinetic Analysis of Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Methods in Enzymology*, 295; 268-294.
- Nemecz G., Fontaine R. N., Schroeder F. 1988, A fluorescence and radiolabel study of sterol exchange between membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 943; 511-521.
- Nguyen B., Tanious F. A., Wilson W. D. 2007, Biosensor-surface plasmon resonance: Quantitative analysis of small molecule – nucleic acid interactions. *Methodes*, 42; 150-161.
- Ohvo H., Slotte J. P., 1996, Cyclodextrin –mediated removal of sterols from monolayers: Effects of Sterol Structure and Phospholipids on desorption rate. *Biochemistry*, 35; 8018-8024.
- Ohvo-Rekilä H., Åkerlund B., Slotte J. P. 2000, Cyclodextrin-catalyzed extraction of fluorescent sterols from monolayer membranes and small unilamellar vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 105; 167-178.
- Palmer M., Harris R., Freytag C., Kehoe M., Tranum-Jensen J., Bhakdi S. 1998, Assembly mechanism of the oligomeric streptolysin O pore: the early membrane lesion is lined by a free edge of the lipid membrane and is extended gradually during oligomerization. *The EMBO Journal*, 17; 1598-1605.
- Pitha J., Irie T., Sklar P. B., Nye J. S. 1988, Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sciences*, 43; 493-502.
- Podlesnik Beseničar M., Bavdek A., Kladnik A., Maček P., Anderluh G. 2008, Kinetics of cholesterol extraction from lipid membranes by methyl- β -cyclodextrin – A surface plasmon resonance approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778; 175-184.
- Poppewell J., Freeman N., Carington S., Ronan G., McDonnell C., Ford R. C. 2005, Quantification of the effects of melittin on liposome structure. *Biochemical Society Transactions*, 33; 931-933.
- Poppewell J. F., Swann M. J., Freeman N. J., McDonnell C., Ford R. C., Quantifying the effects of melittin on liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768; 13-20.
- Poznansky M. J., Czekanski S. 1978, Cholesterol exchange as a function of cholesterol/phospholipid mole ratios. *Biochemical Journal*, 177; 989-991.
- Razin S., The Mycoplasmas. *Microbiological Reviews*, 42; 414-470.
- Rich R. L., Myszka D. G. 2000, advances in surface plasmon resonance sensor analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 11; 54-61.

-
- Salamon Z., Delavanathan S., Alves I. D., Tollin G. 2005, Plasmon-waveguide Resonance Studies of Lateral Segregation of Lipids and Proteins into Microdomains (Rafts) in Solid-supported Bilayers. *Journal of Biological Chemistry*, 280; 11175-11184.
- Sekiya K., Akagi T., Tatsuta K., Sakakura E., Hashikawa T., Abe A., Nagamume H. 2007, Ultrastructural analysis of the membrane insertion of domain 3 of streptolysin O. *Microbes and Infection*, 9; 1341-1350.
- Smith R. J. M., Green C. 1974, The rate of cholesterol flip-flop in lipid bilayers and its relation to membrane sterol pools. *Febs Letters*, 42; 108-111.
- Starke-Peterkovic T., Turner N., Vitha M. F., Waller M. P., Hibbs D. E., Clarke R. J., 2006, Cholesterol Effect on the Dipole Potential of Lipid Membranes. *Biophysical Journal*, 90; 4060-4070.
- Steck T. L., Ye J., Lange Y. 2002, Probing Red Cell Membrane Cholesterol Movement with Cyclodextrin. *Biophysical Journal*, 83; 2118-2125.
- Stenberg E., Persson B., Roos H., Urbaniczky C. 1991, Quantitative Determination of Surface Concentration of Protein with Surface Plasmon Resonance Using Radiolabeled Proteins. *Journal of Colloid and Interface Science*, 143; 513-526.
- Szejtli J., Cserhati T., Szögyi M. 1986, Interactions between cyclodextrins and cell-membrane phospholipids. *Carbohydrate Polymers*, 6; 35-49.
- Szejtli J. 1990, The cyclodextrins and their application in biotechnology. *Carbohydrate Polymers*, 12; 375-392.
- Terry C. J., Poppewell J. F., Swann M. J., Freeman N. J., Fernig D. G. 2006, Characterization of membrane mimetics on a dual polarisation interferometer. *Biosensors and Bioelectronics*, 22; 627-632.
- Tsamaloukas A., Szadkowska H., Slotte J., Heerklotz H. 2005, Interactions of Cholesterol with Lipid Membranes and Cyclodextrin Characterized by Calorimetry. *Biophysical Journal*, 89; 1109-1119.
- Tweten R. K. 2005, Cholesterol-Dependent Cytolysins, a family of Versatile Pore-forming Toxins. *Infection and Immunity*, 73; 6199-6209.
- Waterham H. R., Defects of Cholesterol Biosynthesis. *FEBS Letters*, 580; 5442-5449.
- Yamamoto S., Kurihara H., Mutoh T., Xing X., Unno H. 2005, Cholesterol recovery from inclusion complex of β -cyclodextrin and cholesterol by aeration at elevated temperatures. *Biochemical Engineering Journal*, 22; 197-205.
- Zachowski A., Phospholipids in animal eucaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochemical Journal*, 294; 1-14.

Ziblat R., Lirtsman V., Davidov D., Aroeti B. 2006, Infrared Surface Plasmon Resonance: A Novel Tool for Real Time Sensing of Variations in Living Cell. *Biophysical Journal* , 90; 2592-2599.

Zidovetzki R., Levitan I. 2007, Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768; 1311-1324.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju prof. dr. Gregorju Anderluhu, da me je sprejel v svojo raziskovalno skupino, za vso pomoč, nasvete ter potrpežljivost tekom eksperimentalnega dela in pisanja te diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi recenzentki prof. dr. Kristini Sepčič za hiter in natančen pregled, ter spodbudne besede, ter prof. dr. Petru Mačku za hiter pregled diplome.

Zahvala gre tudi vsem zaposlenim na katedri za biokemijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete za vso pomoč in prijetno druženje.

Na koncu bi se še posebej zahvalila svoji družini, mami in stari mami, ter svojemu možu. Vsi so mi tekom celega študija stali ob strani in me spodbujali, izkazali so mi vso podporo in razumevanje.