

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Tadas Ragaliauskas

**Lipidinių membranų imobilizavimas ant paviršiaus ir jų
tyrimas paviršiaus plazmonų rezonanso metodu**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

VILNIUS 2017

Disertacija rengta 2010 – 2016 metais Vilniaus universiteto Biochemijos institute.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas

dr. Gintaras Valinčius (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS IR ŽYMĖJIMAI	6
ĮVADAS	8
I SKYRIUS. TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGOS	12
1. Paviršiaus plazmonų rezonansas	12
2. Elektrocheminio impedanso spektroskopija	15
3. Eksperimentinė įranga	19
4. Medžiagos	22
5. Pavyzdžių ruošimo protokolai	23
II SKYRIUS. LIPIDINIŲ MEMBRANŲ MODELIŲ CHARAKTERIZAVIMAS	26
1. Literatūrinė dalis	26
1.1 Biologinės membranos	26
1.2 Membranų modeliai	28
1.3 Lipidinių membranų modelių paruošimas	32
2. Darbo rezultatai	36
2.1 hBLM ir sBLM sistemų tiolinės dalies tyrimas	36
2.2 hBLM ir sBLM sistemų lipidinės dalies tyrimas	39
2.3 tBLM sistemos tiolinės dalies tyrimas	42
2.4 tBLM sistemos lipidinės dalies tyrimas	48
2.5 tBLM (dHC18:βME) charakterizavimas	52
2.6 Mišraus SAM struktūros įtaka lipidinei membranai	54
3. Rezultatų apibendrinimas	57
III SKYRIUS. CHOLESTEROLIS IR JO ĮTAKA MEMBRANAI	59
1. Literatūrinė dalis	59
2. Darbo rezultatai	64
3. Rezultatų apibendrinimas	72
IV SKYRIUS. TBLM TAIKYMAS TOKSINŲ TYRIMUOSE	73
1. Literatūrinė dalis	73
1.1 Poras formuojantys toksinai	73

	5
1.2 CDC struktūra	75
1.3 Pneumolizinas ir vaginolizinas	76
2. Darbo rezultatai	77
2.1 PLY adsorbcijos tyrimas	77
2.2 VLY adsorbcijos tyrimas	85
3. Rezultatų apibendrinimas	91
IŠVADOS	92
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA	93
PATENTAI	93
LITERATŪROS SĄRAŠAS	95

SANTRUMPŲ SAŽAŠAS IR ŽYMĖJIMAI

SAM	savitvarkis monosluoksnis (angl. <i>self – assembled monolayer</i>)
sBLM	suspenduota lipidinė membrana (angl. <i>support bilayer lipid membrane</i>)
hBLM	hibridinė lipidinė membrana (angl. <i>hybrid bilayer lipid membrane</i>)
tBLM	prikabinta lipidinė membrana (angl. <i>tethered bilayer lipid membrane</i>)
βME	β – merkaptoetanolis
DOPC	1,2 – dioleoil – sn – glicerolio – 3 – fosfocholinas
Chol	cholesterolis
SPR	paviršiaus plazmonų rezonansas (angl. <i>surface plasmon resonance</i>)
EIS	elektrocheminio impedanso spektroskopija (angl. <i>electrochemical impedance spectroscopy</i>)
PLY	pneumolizinas
VLY	vaginolizinas
ODT	oktadekantiolis
EtOH	etanolis
WC14	20 – tetradeciloksio – 3, 6, 9, 12, 15, 18, 22 – heptaoksaheksatrikontano – 1 – tiolis
dHC18	20 – (Z – oktadeko – 9 – eniloksi) – 3, 6, 9, 12, 15, 18, 22 – heptaoksatetrakont – 31 – eno – 1 – ditiolis
MβCD	metil – β – ciklodekstrinas

M β CD – Chol	metil – β – ciklodekstrino ir cholesterolio kompleksas
C	elektrinė talpa, $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
C_R	elektrinės talpos realioji dalis, $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
C_M	elektrinės talpos menamoji dalis, $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
$\Delta\alpha$	SPR kampo pokytis, m° (mililaisnis) arba f° (femtolaipsnis)
n	lūžio rodiklis
Δm	masės kiekis, ng/cm^2
d	sluoksnio storis, nm arba Å
t	laikas, s
φ	fazė, $^\circ$
Z	impedansas, Ω arba $\Omega \cdot \text{cm}^2$
c	koncentracija, mM
Y	laidumas, S arba $\text{S} \cdot \text{cm}^2$
f_{min}	EIS dažnis ties fazės minimumu, Hz
n	„efektyvioji“ masės dalis, %
S	SPR jautrumas, $\text{ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$
CDC	nuo cholesterolio priklausomi toksinai (angl. <i>cholesterol – dependent cytolysins</i>)
MLV	daugiasluoksnės lipidinės liposomos (angl. <i>multilamellar lipid vesicles</i>)
SUV	dvisluoksnės liposomos (angl. <i>unilamellar lipid vesicles</i>)

ĮVADAS

Ląstelės membrana yra sudėtinga savitvarkė sistema, kurios viena pagrindinių funkcijų – apsaugoti ląstelės turinį nuo išorės veiksnių, o ypač nuo įvairias ligas sukeliančių toksinų. Tad membranos studijos turi ypač didelę reikšmę medicinai, fiziologijai ir daugeliui kitų sričių. Tačiau rimtą iššūkį meta itin sudėtinga membranos struktūra, kurią sudaro didelė įvairovė lipidų, baltymų ir angliavandenių. Tai labai apsunkina galimybę nustatyti, kas sąlygoja pačios membranos sąveiką su įvairiomis biomolekulėmis. Šiai problemai spręsti buvo pradėta kurti įvairius ląstelės membranos modelius, kurie jau gali būti sudaryti tik iš vieno tipo lipidų. Iki šiol yra sukonstruotos ir aprašytos kelios modelinės membranų sistemos: liposomos (vezikulės), hibridinės lipidinės membranos (**hBLM**) ir suspenduotos dvisluoksnės lipidinės membranos (**sBLM**), suformuotos ant aukso, silicio ar įvairiais junginiais modifikuotų paviršių. Bet pastaruoju metu itin aktyviai vystomas kitas membranos modelis – prie paviršiaus prikabintos dvisluoksnės fosfolipidinės membranos (**tBLM**), kur specialių junginių (inkarinio junginio ir skiediklio) pagalba yra sukuriamas vandens rezervuaras tarp kieto pagrindo ir lipidinio dvisluoksnio, taip priartinant patį modelį prie natūralių sąlygų. Šiame darbe kaip tik didžiausias dėmesys bus skiriamas **tBLM** analizei ir charakterizavimui, pasitelkiant paviršiaus plazmonų rezonanso metodą.

Didelę reikšmę turi ne tik pačių membranų modelių sukūrimas, bet ir jų taikymas įvairiuose moksliniuose darbuose. Ir viena iš tokių sričių – sąveikos su poras formuojančiais toksiniais tyrimai. Šie toksinai, infekcijos metu, suformuoja poras membranoje ir sutrikdo natūralią ląstelės homeostazę, taip sukeldami ląstelės žūtį. Ir šiame darbe bus tyrinėjama, kokią įtaką lipidinėms membranoms turi nuo cholesterolio priklausomi toksinai: pneumolizinas ir vaginolizinas.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Šio darbo pagrindinis tikslas – paviršiuje prikabintų fosfolipidinių dvisluoksnių charakterizavimas ir jų panaudojimas sąveikos su baltymais tyrimuose. Pagrindiniai uždaviniai:

1. Sukurti lipidinių sluoksnių paruošimo metodiką
2. Nustatyti **SPR** metodo jautrumą fosfolipidams, cholesteroliui ir tioliams
3. Nustatyti inkarinių junginių (**WC14** ir **dHC18**) skerspjūvio plotus
4. Nustatyti iš daugiasluoksnių liposomų paruoštose membranose cholesterolio kiekį.
5. Nustatyti pneumolizino ir vaginolizino poveikio membranai sąryšį su cholesterolio kiekiu. Bei nustatyti susidariusių porų aptikimo galimybes paviršiaus plazmonų rezonanso ir elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodais.

Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Lipidinis dvisluoksnis gali būti formuojamas perkeliant skystyje esančias dvisluoksnes lipidines liposomas ant plokščio paviršiaus. Tačiau, tas pats rezultatas (lipidinis dvisluoksnis) gali būti pasiektas naudojant ir daugiasluoksnes liposomas.
2. Nors **tBLM** struktūros ir sudėties nustatymas yra sudėtingas uždavinys ir jam spręsti dažniausiai naudojamas brangus ir ilgo pasiruošimo reikalaujantis neutronų reflektometrijos metodas, bet šio uždavinio sprendinys gali būti rastas pasitelkiant ir pigesnį bei paprastesnį metodą – paviršiaus plazmonų rezonansą.
3. **CDC** toksinų poveikis lipidinei membranai priklauso nuo cholesterolio kiekio membranoje, bet nebūtinai tai gali būti tiesioginė priklausomybė.

Mokslinis naujumas

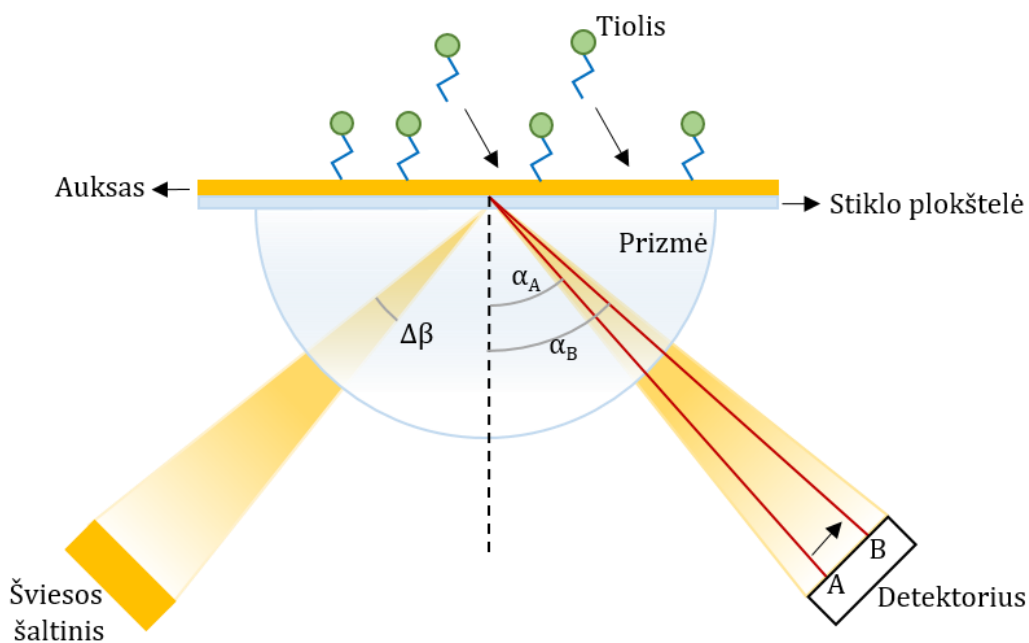
Prie paviršiaus prikabintos lipidinės membranos kuriamos ir vystomos jau daugelį metų, bet iki šiol nėra detaliai išsiaiškinta tiksli **tBLM** sudėtis (inkarinio junginio, skiediklio ir lipidų kiekiai). Tam nemažai įtakos turėjo ir tai, kad nebuvo atrastas/išrastas paprastas ir greitas **tBLM** (**tBLM** sudaro tiolinė ir lipidinė dalys) lipidinės dalies paruošimo būdas. Ir šiame darbe buvo pritaikytas naujas lipidinių sluoksnių formavimo metodas – daugiasluoksnės lipidinės liposomos (**MLV**). Tai žymiai supaprastino visą lipidinių paviršių formavimo metodiką, nes šių liposomų paruošimas užtrunka iki 30 minučių (paruošti dvisluoksnės liposomas reikia nuo 4 iki 12 valandų) ir nereikalauja brangios įrangos (galingos ultragarsinės maišyklės ar ekstruderio). **MLV** panaudojimas leido realiu laiku stebėti membranos formavimosi eigą ant įvairių paviršių (hidrofilinio, hidrofobinio ir mišraus savitvarkio monosluoksnio) bei pirmą kartą nustatyti **SPR** metodo jautrumą lipidams. Tai suteikė galimybę įvertinti, kokią dalį įvairiuose **tBLM** sudaro lipidai, o kokią – inkarinio junginio ir skiediklio molekulės. Bei taip nustatyti tikslią **tBLM** sudėtį, taikant tik vieną metodą – paviršiaus plazmonų rezonansą.

tBLM panaudojimas poras formuojančių toksinų tyrimuose dažnai kelia klausimą: kokia prie paviršiaus adsorbavusi toksino kiekio dalis sudaro poras membranoje? Ir šiame darbe kaip tik pirmą kartą buvo pademonstruota, kaip, taikant du metodus – **SPR** (registruoja adsorbavusios medžiagos kiekį) ir **EIS** (registruoja susidariusių porų kiekį), keičiasi fiksuojamų defektų skaičius ir baltymo kiekis nuo **tBLM** sudėties, baltymo koncentracijos ir kokios yra detekcijos ribos, taikant tiek **SPR**, tiek **EIS**.

I SKYRIUS

TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGOS

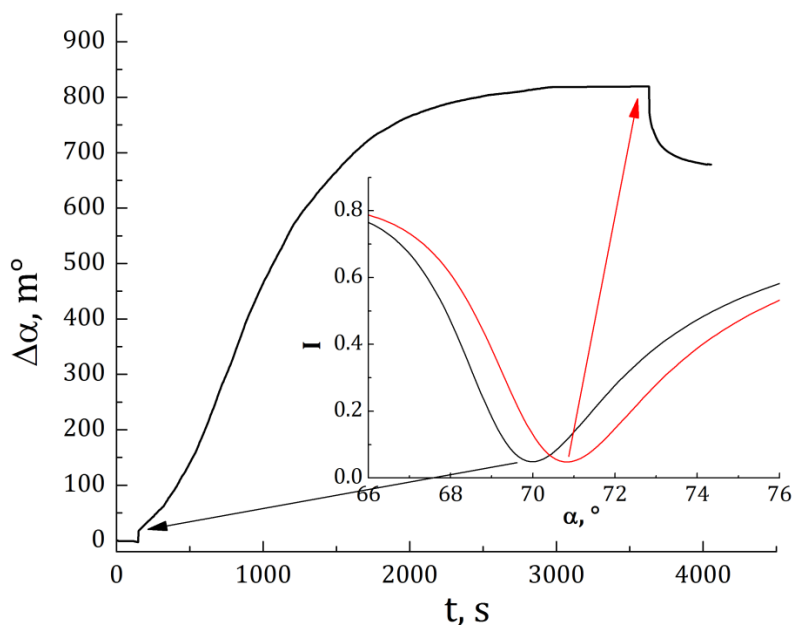
1. PAVIRŠIAUS PLAZMONŲ REZONANSAS



1 pav. Paviršiaus plazmonų veikimo principas.

Paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopija (**SPR**) – tyrimo metodas, leidžiantis realiu laiku stebėti sąveiką (adsorbiciją/desorbaciją) tarp įvairių medžiagų ir jutiklio (stiklo plokštelės, padengtos metalu) paviršiaus ¹⁻³. Metodo veikimo principas paremtas optiniu – elektriniu reiškiniu, kai sąlyčio riboje tarp dviejų medžiagų (metalas – skystis arba metalas – oras) metalo elektronams yra perduodamas tam tikras šviesos energijos kiekis, taip priverčiant elektronus osciliuoti (paviršiaus plazmonų rezonansas). Bet šis reiškinys galimas tik tada, kai

plokščiai poliarizuota šviesa yra tam tikro bangos ilgio ir į metalo paviršių nukreipta tam tikru kampu – α_{Rez} (rezonansinis kampas). Kadangi neįmanoma iš anksto žinoti, koku kampu turi būti skleidžiama šviesa matavimo metu, tai į paviršių nukreipiamas šviesos srautas, apimantis tam tikrą kampo diapazoną (1 pav. $\Delta\beta$). Srautas, pasiekęs metalą ir atsispindėjęs tokiu pačiu kampu, yra registruojamas detektoriumi, rodančiu atėjusios šviesos intensyvumą. Šviesos, kuri buvo sugerta, intensyvumas ties α_{Rez} bus mažiausias (1 pav. α_A ir α_B), o likusi nesugerta šviesa tuo pačiu kampu atsispindės atgal ir jos intensyvumas (I), kuo toliau nuo α_{Rez} , tuo bus didesnis.



2 pav. SPR spektras (vidinis paveikslas) ir sensograma (išorinis paveikslas).

Taip gali būti išbrėžta visa kreivė, rodanti priklausomybę tarp šviesos kampo (α) ir jos intensyvumo (I) (2 pav. vidinis paveikslas). Matuojant realiu laiku neįpraktiška kas kartą brėžti visą spektrą ir ieškoti α_{Rez} ties mažiausiu intensyvumu, be to susidarytų milžiniškas kiekis duomenų. Todėl daugelis prietaisų automatiškai patys apdoroja kreivę ir į ekraną išveda tik pačios kreivės minimumo tašką. Tyrimuose dažnu atveju ties rezonansiniu kampu šviesos

intensyvumas nesikeičia, kinta tik jo padėtis kampo atžvilgiu, tai dažniausiai brėžiamos sensogramos, rodančios α_{Rez} kitimą laike (2 pav. išorinis paveikslas).

Kiekvieną medžiagą galima apibūdinti tam tikrais parametrais, kaip tankis, molinė masė, lydymosi temperatūra etc. **SPR** metodas remiasi lūžio rodiklio (n) parametru, kuris visoms medžiagoms ar jų grupėms yra skirtingas, t. y. α_{Rez} tiesiogiai priklauso nuo metalo paviršiuje esančios terpės lūžio rodiklio ⁴. Ilustruojant paprastu pavyzdžiu, tarkim, kad aukso paviršius yra užpildytas etanolu, kurio $n_{EtOH}=1,36$, tai $\alpha_{Rez} = \alpha_A$ (1 pav.). Kad pasikeistų šis kampas, tai lūžio rodiklis jutiklio paviršiuje turi būti didesnis arba mažesnis už 1,36. Tegul į šį skystį įleidžiamas daug kartų mažesnis už tirpalo tūrį tam tikras tiolio ($n_{tiolis}=1,5$) kiekis, kuris turi savybę adsorbuotis prie aukso paviršiaus. Kuo daugiau tiolio molekulių kabinsis prie aukso, tuo labiau keisis bendras lūžio rodiklis aukso paviršiuje ($n_{EtOH} \rightarrow n_{tiolis}$), o kartu ir rezonansinis kampas. Taigi, po tiolių adsorbcijos, kai užpildomas visas aukso paviršius, tai $\alpha_{Rez} = \alpha_B$ (1 pav.). Tai rezultate gaunama, kad aukso paviršiaus padengimas tioliais iššaukė rezonansinio kampo pokytį $\alpha_B - \alpha_A = \Delta\alpha$ (2 pav.), kuris dažniausiai išreiškiamas mililaisniais (m°). Žinant $\Delta\alpha$ pokytį ir rezonansinio kampo jautrumą konkrečioms medžiagoms (jautrumo nustatymas bus aprašytas eksperimentinėje dalyje), galima įvertinti medžiagos kiekį aukso paviršiuje. Kadangi, **SPR** – realaus laiko matavimo metodas ir yra žinoma, kad $\Delta\alpha$ tiesiogiai proporcingas medžiagos kiekiui, tai iš sensogramų, nežinant tikslios medžiagų įtakos rezonansiniam kampui, taip pat galima nustatyti ir įvairius kinetinius sistemos parametrus (greičio, disociacijos, asociacijos konstantas ir t.t.).

Šis tyrimo metodas gana plačiai naudojamas pasaulyje, bet vienas pagrindinių jo trūkumų – to paties eksperimento rezultatai, gauti vienoj laboratorijoje, gali skirtis nuo kitoje laboratorijoje gautų rezultatų. To priežastis – daugelyje laboratorijų esantys **SPR** prietaisai naudoja skirtingas prizmes ir bangų ilgius. Pavyzdžiui, prietaisas turi prizmę iš BK7 ($n_{BK7} = 1,515$) ^{5,6} stiklo ir yra naudojama 635 nm bangos ilgio šviesa ir kai ant paviršiaus bus suformuotas 3 nm storio baltymo sluoksnis, tai $\Delta\alpha_{baltymas} = 750 m^\circ$. Visiškai kitas rezultatas bus

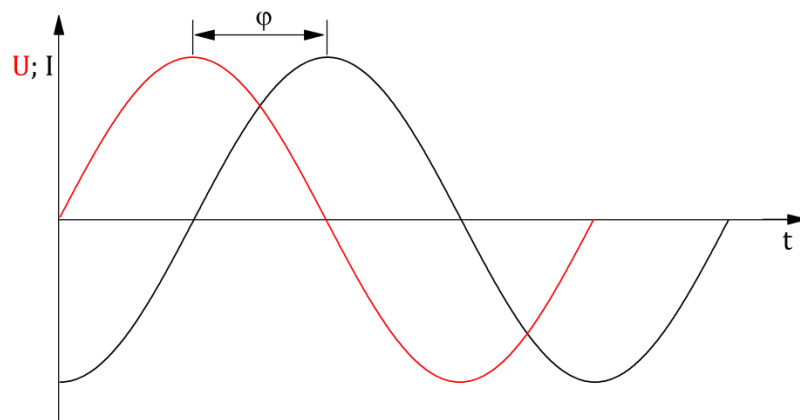
gautas, jei šioje visoje sistemoje vietoj BK7 bus naudojama SF10 prizmė ($n_{SF10} = 1,723$), ir tada $\Delta\alpha_{baltymas} = 350 \text{ m}^\circ$. Tas pats galioja ir bangos ilgiui, kuriam didėjant mažėja prietaiso jautrumas medžiagoms. Taigi, prieš atliekant SPR duomenų analizę labai svarbu yra išsiaiškinti prietaiso jautrumą tiriamai medžiagai.

2. ELEKTROCHEMINIO IMPEDANSO SPEKTROSKOPIJA

Elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS) – metodas, skirtas tirti medžiagų elektrines savybes (dielektrinė konstanta, laidumas, elektrinė talpa, etc.) ⁷. EIS nustato sistemos impedansą, kuris yra lygus sistemai užduodamos kintamos įtampos ir matuojamos srovės santykiui:

$$Z = \frac{U}{I}, \quad (1)$$

kur U ir I – atitinkamai įtampa ir srovės stipris, Z – impedansas arba kompleksinė varža (Ω arba $\Omega \cdot \text{cm}^2$). Tiriamos sistemos, atliekant EIS matavimus, sužadinas vykdomas sinusoidiškai kintama srove (įtampa) (3 pav).



3 pav. Sinusoidinės kintamos srovės grandinės atsakas.

Taigi, kai sužadinti įtampa yra :

$$U(t) = U_0 \cos \omega t, \quad (2)$$

tai srovė atsilieka nuo sužadinančio signalo tam tikru fazės kampu (φ):

$$I(t) = I_0 \cos(\omega t - \varphi), \quad (3)$$

kur $I(t)$ yra momentinė srovė, I_0 – amplitudės signalas, ω – dažnis (rad/s) t.y.

$$\omega = 2\pi f, \quad (4)$$

kur f – dažnis (Hz), t – laikas (s), φ – fazės poslinkio kampas (rad). Harmoninės funkcijos yra aprašomos dviem dydžiais – amplitude ir faze. Kompleksinis skaičius taip pat aprašomas dviem dydžiais ir gali būti atvaizduotas vektoriumi. Taigi, grafinius veiksmus su harmoniniais virpesiais galime pakeisti analiziniais, jų vektorius užrašę kompleksiniais skaičiais. Impedansas, kuris yra apibrėžiamas lygtimi, bendru atveju yra kompleksinis dydis, charakterizuojamas amplitudžių santykiu (U_0/I_0) ir faziniu postūmiu (φ):

$$Z = \frac{U(t)}{I(t)} = \frac{U_0 \cos(\omega t)}{I_0 \cos(\omega t - \varphi)} = |Z|(\cos \varphi + i \sin \varphi), \quad (5)$$

kur impedansą galima išskirti į realią (Z_R) ir menamą (Z_M) dalis:

$$Z_R = |Z| \cos \varphi \quad (6)$$

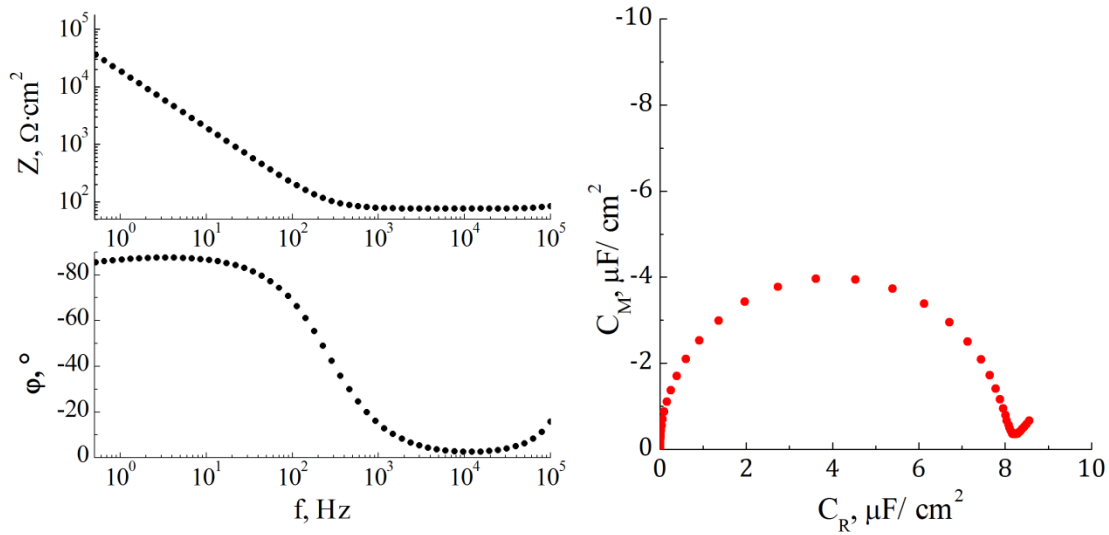
$$Z_M = |Z| \sin \varphi \quad (7)$$

5 lygties išraiška yra adekvati kompleksinio skaičiaus algebrinei formai: $a + ib$ (šiuo atveju $Z_R + iZ_M$), kur $i = \sqrt{-1}$, a – realioji dalis, b – menamoji, o $\sqrt{a^2 + b^2}$ – kompleksinio skaičiaus modulis. Tai iš to seka, kad absoliuti impedanso vertė ir fazės kampas apskaičiuojami:

$$|Z| = \sqrt{Z_R^2 + Z_M^2}, \quad (8)$$

$$\varphi = \arctan^{-1} \frac{Z_M}{Z_R}, \quad (9)$$

Įprastai EIS duomenys gali būti pateikiami keliais būdais, bet dažniausiai naudojama Bode diagrama (4 pav. kairysis paveikslas), pateikiant impedanso modulio ir jo fazės kitimus nuo dažnio. Bet yra naudojamos ir kitos diagramos (Nyquist, Cole – Cole), kur xy koordinatinių ašyse atidedamos impedanso, admitanso ar kito dydžio realios ir menamos dalys, kurios leidžia detaliau aprašyti tiriamas sistemas [8,9,10,11](#).



4 pav. EIS duomenų atvaizdavimas **Bode** (kairėj) ir **Cole – Cole** (dešinėj) diagramomis.

Vienas iš neretai taikomų EIS duomenų atvaizdavimų yra Cole – Cole diagramos (4 pav. dešinysis paveikslas), kur impedanso realios ir menamos dalys yra perskaičiuojamos atitinkamai į realias ir menamas elektrines talpas (C_R , C_M) pagal lygtis:

$$C_R = \frac{Z_M}{\omega|Z|^2} \quad (10)$$

$$C_M = \frac{Z_R}{\omega|Z|^2} \quad (11)$$

Cole – Cole diagrama yra dažnai taikoma ant elektrodo paviršiaus suformuotų homogeniškų ir elektrai nelaidžių sluoksnių tyrimuose. Ir vienas iš pavyzdžių – tai savitvarkiai monosluoksniai ar fosfolipidiniai dvisluoksniai ¹², kur šie sluoksniai atlieka kondensatoriaus vaidmenį (5 pav.). Šis elektrinis elementas charakterizuojamas per elektrinę talpą (C). Idealiu atveju, Cole – Cole diagramose galima nubrėžti tobulą pusapskritimą, kurio minimumas (kai $C_M \rightarrow 0$) rodo pilnai įkrauto kondensatoriaus talpą (5 pav.). Tai gali būti tik tada, kai $\varphi \approx -90^\circ$. Tokiu atveju, pagal 5 lygtį, $Z = iZ_M$, o $Z_R = 0$, nes $\sin(-90^\circ) = 1$ ir $\cos(-90^\circ) = 0$. Tai iš 10 lygties seka, kad pilnai įkrauto kondensatoriaus/dielektrinio sluoksnio talpa:

$$C_{Real} = \frac{1}{\omega Z}, \quad (12)$$

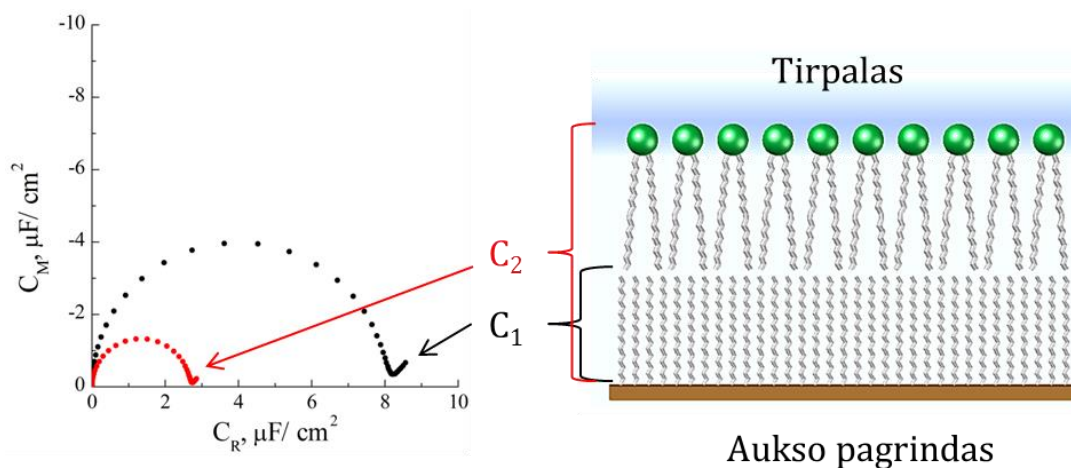
Elektrinės talpos dydis gali priklausyti nuo dielektrinio sluoksnio storio, jo dielektrinių savybių ir elektrodų matmenų:

$$C = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon A}{d}, \quad (13)$$

kur ε_0 – vakuomo dielektrinė konstanta ir yra lygi $8,85 \cdot 10^{-14}$ F/cm, ε – elektrai nelaidaus sluoksnio santykinė dielektrinė skvarba, A – sluoksnio paviršiaus plotas (cm^2), d – sluoksnio storis (cm). Ir kuo ant aukso paviršiaus yra storesnis sluoksnis, tuo C bus mažesnė. Taip pat talpa priklauso ir nuo sluoksnių skaičiaus, kuo daugiau sluoksnių bus suformuota, tuo mažesnė talpa bus gauta:

$$\frac{1}{C_2} = \frac{1}{C_1} + \frac{1}{C_0}, \quad (14)$$

Taigi, EIS duomenų pateikimas Cole – Cole diagramose labai tinkamas stebėti atskirų sluoksnių susidarymą, kur su vis kiekvienu nauju sluoksniu mažėja talpa (5 pav.).



5 pav. Elektrinės talpos priklausomybė nuo sluoksnių skaičiaus.

Bet realiose sistemose dažnu atveju kondensatoriaus talpa nėra ideali. Vietoje to, ji elgiasi kaip pastovios fazės elementas (CPE), kurio impedansas apibrėžiamas lygtimi:

$$Z = \frac{1}{CPE(i\omega)^\alpha}, \quad (15)$$

kur α – pastovios fazės elemento laipsnio rodiklis – skaičius, kurio kitimo sritis gali būti nuo 0 iki 1. Idealaus kondensatoriaus atveju $\alpha = 1$ ir CPE tampa paprasta elektrine talpa. Tokiomis elektrinėmis savybėmis pasižymi idealūs homogeniški paviršiai. Tačiau realių paviršių, kurie yra tiek geometriškai, tiek energetiškai heterogeniški $\alpha < 1$. Kuo labiau α nutolsta nuo vieneto, tuo heterogeniškesnė, netvarkingesnė yra paviršinė struktūra.

3. EKSPERIMENTINĖ ĮRANGA

Visi tyrimai buvo atliekami lygiagrečiai naudojant paviršiaus plazmonų rezonanso (Autolab Twingle) ir elektrocheminio impedanso spektroskopijos (Autolab PGSTAT302N) kompiuterizuotas darbo stotis iš firmos Metrohm (Olandija).

EIS matavimai buvo atliekami naudojant NOVA 1.8 (Metrohm, Olandija) programinę įrangą. EIS spektrų dažnio diapazonas nuo 0,5 Hz iki 100 kHz, naudojant trijų elektrodų elektrocheminio matavimo schemą: palyginamasis elektrodas – Ag/AgCl/NaCl sotusis elektrodas (Microelectrodes Inc, JAV); pagalbinis elektrodas – spirale, aplink palyginamojo elektrodo stiklinį vamzdelį, susukta 0,25 mm diametro platinos viela (Sigma Aldrich, Vokietija); darbinis elektrodas – BK7 stiklo 25 mm diametro diskas, padengtas auksu. EIS duomenys apdoroti ZView (Scribner Associates, JAV) programine įranga.

SPR matavimai buvo atliekami SPR Acquisition (Metrohm, Olandija) programine įranga. Eksperimentuose buvo naudojama plokščiai poliarizuota 670 nm bangos ilgio šviesa, kurios atsispindėjusio srauto intensyvumas registruotas 4 laipsnių diapazono detektoriaus kamera su galimybe rankiniu būdu persukti į reikalingą sritį (nuo 62° iki 78°). SPR duomenys apdoroti su Kinetic Evaluation programa. SPR spektrų simuliacijai naudota Winspall 3.02 programinė įranga su 1 lentelėje nurodytais parametrais: n – lūžio rodiklis, k – ekstincijos koeficientas, d – sluoksnio storis.

1 lentelė.

Sluoksnis	Medžiaga	n	k	d , Å
1	Prizmė	1,518 ^A	0	-
2	Titanas	2,7844 ^B	3,8693 ^B	~10
3	Auksas	0,188 ^C	3,77 ^C	500
4	Tiriamasis sluoksnis	n	0	d
5	Tirpalas	n_0	0	-

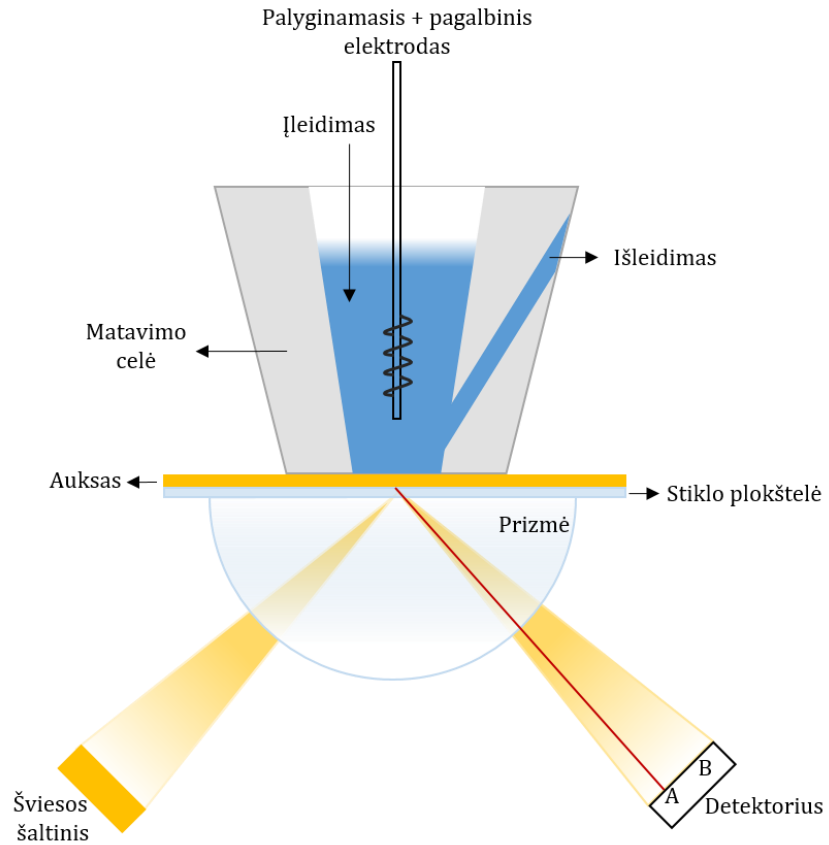
A – nurodyta Autolab gamintojo;

B – refractiveindex.info;

C – atlikta simuliacija su Winspall 3.02

Matavimo celė. Visiems tyrimams buvo naudota Metrohm firmos sukonstruota ir iš perfluoroalkoksi alkano (PFA) pagaminta celė (6 pav.). Ją sudaro 2 kanalai, kuriuose lygiagrečiai galima atlikti du skirtingus matavimus. Vieno kanalo tūris – 150 μl. Aktyvus jutiklio plotas – 7,8 mm². Temperatūra (~21 °C) palaikoma Model F34 termostatu (Julabo, Vokietija). Skystis į celę

įleidžiamas švirškutinės pompos sistema iš viršaus (6 pav. “Įleidimas”), o ištraukiamas peristaltinės pompos sistemos pagalba (6 pav. “Išleidimas”). Elektroda į celę įleidžiamas per viršų.



6 pav. SPR ir EIS matavimo celė.

4. MEDŽIAGOS

Dejonizuotas vanduo	– dist. H ₂ O (Milli-Q plius, JAV)
natrio chloridas	– NaCl (FLUKA, Šveicarija);
natrio dihidrofosfatas	– NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (FLUKA, Šveicarija)
etanolis	– EtOH (AB „Vilniaus degtinė“, Lietuva)
β – merkaptoetanolis	– βME (Sigma–Aldrich, Vokietija);
di β – merkaptoetanolis	– dβME (FMTC, Lietuva);
chloroformas	– CHCl ₃ (Sigma–Aldrich, Vokietija);
metil – β – ciklodekstrinas	– MβCD (Sigma–Aldrich, JAV);
sieros rūgštis	– H ₂ SO ₄ (Reachem, Slovakija);
amonio persulfatas	– (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (Reachem, Slovakija);
natrio hidroksidas	– NaOH (Sigma–Aldrich, Vokietija)

Inkariniai junginiai:

20–tetradeksiloksio–3,6,9,12,15,18,22–heptaoksaheksatrikontano–1–tiolis – WC14;

20–(Z–oktadeko–9–eniloksio)–3,6,9,12,15,18,22–heptaoksatetrakonto–31–konteno–1–tiolis – dHC18;

Inkariniai junginiai susintetinti dr. D. J.Vanderah grupėje (NIST, Marylandas, JAV).

Lipidai:

1,2–dioleoil sn–glicerolio–3–fosfocholinas – DOPC;

Cholesterolis – Chol;

Visi lipidai pirkti iš Avanti Polar Lipids (JAV);

Poras formuojantys toksinai:

Pneumolizinas – PLY

Vaginolizinas – VLY

Toksinai gauti iš dr. Aurelijos Žvirblienės, Vilniaus Universiteto Biotechnologijos Instituto.

5. PAVYZDŽIŲ RUOŠIMO PROTOKOLAI

Pavyzdžių ruošimas. SPR matavimams 25 mm skersmens ir 1 mm storio BK7 stiklo diskas inkubuojamas 20 min sieros rūgšties ir amonio persulfato (10 g/l) mišinyje. Po to nuplaunamas dejonizuotu vandeniu ir nudžiovinamas azoto dujų srove. Naudojant magnetroninio garinimo sistemą PVD 75 (Kurt J. Lesker Company, JAV) BK7 pavyzdys padengiamas ~1 nm storio titano (galia – 100 W, argono slėgis – 4,5 mTorr) arba chromo (galia – 200 W, argono slėgis – 4 mTorr) pasluoksniu ir ~50 nm storio aukso sluoksniu (galia – 200 W, argono slėgis – 3 mTorr).

Daugiasluoksnių liposomų paruošimas. DOPC milteliai ištirpinami chloroforme iki 10 mM koncentracijos ir gautas tirpalas laikomas –20 °C temperatūroje. Iš anksčiau paruošto tirpalo paimamas į atskirą stiklinį indą – buteliuką toks kiekis, kuris jau reikalingas pagaminti norimos koncentracijos ir tūrio MLV kiekį. Chloroformas išgarinamas azoto dujų srove (apie 30 minučių), kad ant indo sienelių susidarytų lipidinės plėvelės. Lipidinės plėvelės užpilamos fosfatinio buferiniu tirpalu (PBS: 0,1 mM NaCl, 0,01 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, pH – 4,4) iki norimos koncentracijos. Į tirpalą įleidžiamas dozatorius ir įsiurbimo – išsiurbimo (ciklas) veiksmu lėtai pašalinami lipidai nuo indo sienelių, kol tirpalas tampa homogeniškas, pieno spalvos. Tai užtrunka ~50 ciklų. Liposomų tirpalas laikomas +4 °C temperatūroje ir gali būti naudojamas 2 savaites.

Metil – β – ciklodekstrino ir cholesterolio komplekso ruošimas. MβCD milteliai ištirpinami fosfatiname buferiniame tirpale (pH=7,1), kad koncentracija būtų 20 mM. Gautas tirpalas maišomas ir šildomas iki 55 °C temperatūros, tuomet į jį pipete suleidžiamas chloroformo ir metanolio (2:1) mišinyje ištirpintas cholesterolis. Suleidžiamo cholesterolio tūris apskaičiuotas taip, kad MβCD tirpale prasiskiestų iki 1 mM. Tirpalo temperatūra pakeliama iki 80 °C ir kaitinama maišant dar 60 minučių, kol pilnai ištirpsta cholesterolis ir visiškai išgaruoja organiniai tirpikliai. Tirpalas iš ruošimo taros ištraukiamas

vienkartiniu švirkštu ir į naują buteliuką perleidžiamas per 0,22 μm filtrą. Paruoštas kompleksas stabilus keletą mėnesių ir laikomas +4 °C temperatūroje.

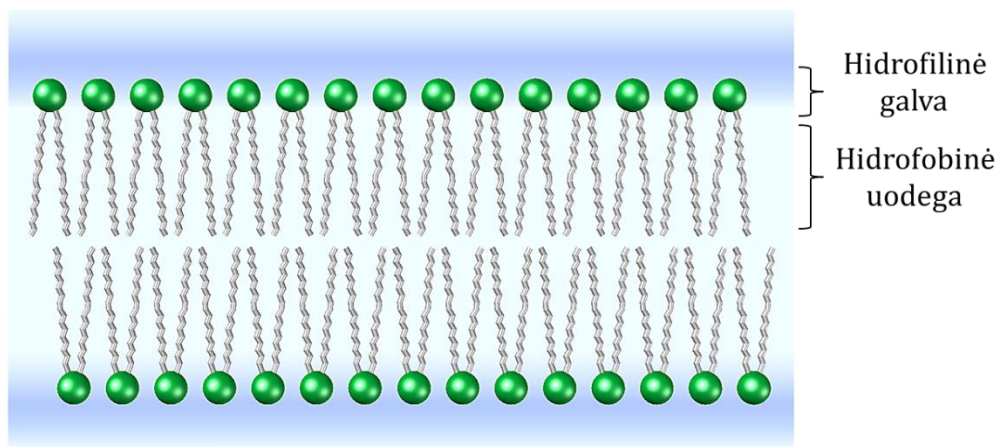
II SKYRIUS

LIPIDINIŲ MEMBRANŲ MODELIŲ CHARAKTERIZAVIMAS

1. LITERATŪRINĖ DALIS

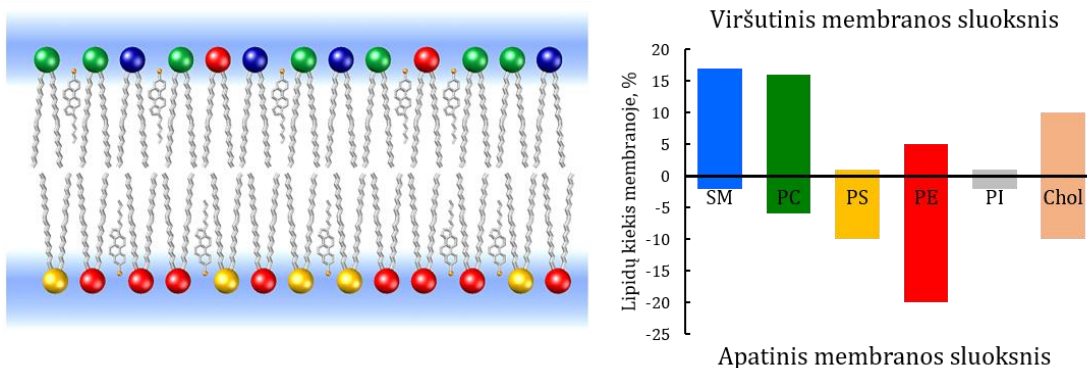
1.1 **Biologinės membranos**

Ląstelės membrana – skeletas (karkasas), be kurio negalėtų egzistuoti gyvybė, gaubia ląstelės vidų su visu jos turiniu ir sukuria barjerą, atskiriantį ląstelės vidų nuo išorės ir atliekanti apsauginę funkciją. Kartu ši apsauga geba vykdyti ir tam tikrą atranką, leidžiančią į ląstelės vidų patekti reikalingoms medžiagoms, be kurių būtų neįmanomas gyvybinių funkcijų palaikymas. Kadangi ląstelės membrana yra iš visų pusių apsupta vandeniu, tai per ją lengvai gali judėti tik vandenyje tirpios ir mažos molekulinės masės medžiagos. Kitos reikalingos medžiagos, kaip baltymai ar angliavandeniai, transportuojamos nešiklių ir kanalų pagalba.



7 pav. Lipido ir membranos struktūra.

Pagrindinis ląstelės membranos struktūros elementas – lipidas, sudarantis membranos karkasą ¹³, ir pasižymintis amfifilinėmis savybėmis – viena dalis molekulės yra hidrofobinė, kita – hidrofiliinė (7 pav.). Ši savybė sąlygota lipido cheminės sudėties ir struktūros, kur šią molekulę galima išskirti į dvi dalis: uodegą (hidrofobinę) ir galvą (hidrofilinę). Toks išskirtinumas leidžia vandeninėje terpėje sukurti tam tikras apibrėžtas struktūras, kurių viena – dvisluoksnė lipidinė membrana (7 pav.), susidaranti iš dviem eilėm išsidėsčiusių lipidų, kur hidrofobinės uodegos nukreiptos į vidų, o hidrofiliinės galvos – į išorę. Uodegą sudaro viena arba dvi riebiosios rūgštys – linijinės angliavandenilių grandinės, kurių ilgis gali būti nuo 12 iki 18 anglies atomų ir užsibaigiančios karboksilo grupe. Šios grandinės gali turėti kelias dvigubas jungtis, nuo kurių kaip ir anglies atomų skaičiaus priklauso membranos takumas, klampumas, fazinio virsmo temperatūra (T_m) ¹⁴. Pastarosios angliavandenilių grandinės yra prijungtos prie glicerolio per vieną ar dvi esterines jungtis. O likusi trečia jungtis sudaro ryšį su lipido galva, susidedanti iš fosfato ir tam tikrų funkciinių grupių, kurios įvairiose organizmo dalyse gali būti skirtingos.



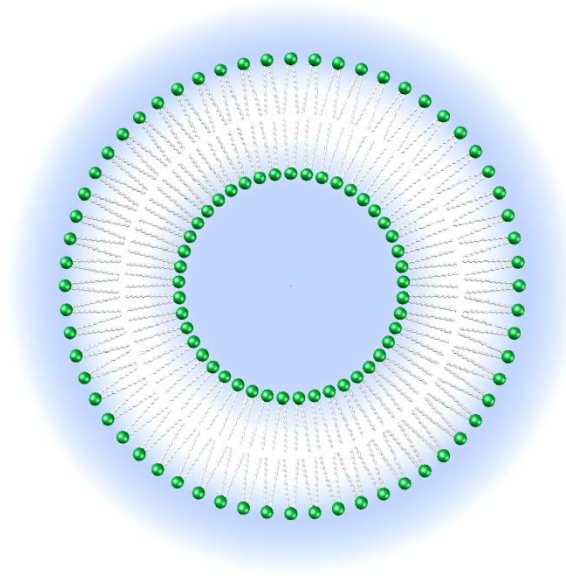
8 pav. Membranos asimetriškumas ir lipidų pasiskirstymas.

Pagal funkcines grupes fosfolipidai išskiriami į kelias pagrindines dalis: fosfotidilcholinas (PC), fosfotidiletanolaminas (PE), fosfotidilserinas (PS) ir fosfotidilinozitolis (PI). Tokia lipidų įvairovė leidžia sudaryti skirtingos sudėties lipidines membranas, reikalingas vienai ar kitai ląstelių grupei. Be to,

membranoms būdingas asimetriškumas (8 pav.), kai kiekviename sluoksnyje dominuoja skirtingas kiekis ir lipidų tipas ¹⁵. Toks pasiskirstymas reikalingas atlikti tam tikras funkcijas. Tarkim, kad ir neigiamai įkrautas fosfotidilserinas, kuris dalyvauja kaip kofaktorius daugeliui membranoje esančių fermentų (baltymų kinazė C ir $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPazė}$) ^{16,17}.

1.2 Membranų modeliai

Membranų modeliai – tai bet kokie dvisluoksniai dariniai (skystyje ar ant paviršiaus), imituojantys pačios ląstelės ar jos organelių membranas ¹⁸. Šių modelių sistemų vienas pagrindinių privalumų yra tas, kad jų sudėtis gali būti kontroliuojama (paruošti iš vienos ar kelių rūšių lipidų).



9 pav.: Lipidinė dvisluoksnė liposoma

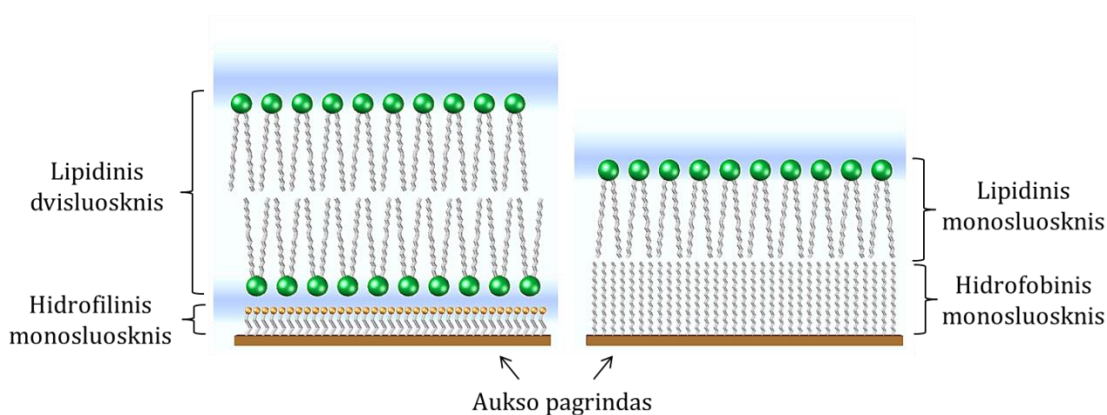
Viena iš dažniausiai naudojamų tokių sistemų – dvisluoksnės lipidinės liposomos (SUV) (9 pav.), kurios yra panašios į ląstelę, bet vidus užpildytas ne įvairiomis organėlėmis, o tik skysčiu ¹⁹. Šias struktūras galima tirti įvairia tyrimo technika, kurių viena plačiai naudojamų – fluorescencijos metodai, leidžiantys stebėti modelinės membranos pažeidimą, kuriai atsiradus viduje esantis dažas

pradeda difunduoti į išorę, kaip pradurtas oro balionėlis ²⁰. Tokiu būdu galima realiu laiku stebėti membranos ir jas pažeidžiančių baltymų (medžiagų) sąveikas. Taip pat yra taikoma ir skenuojanti elektronine mikroskopija, skirta tirti įvairias struktūras liposomos viduje ²¹ ar dvigubos poliarizacijos interferometras, nustatantis liposomos struktūrą ²².

Bet **SUV** tinkamos tik siauram tyrimo metodų ratui (dinaminė šviesos sklaida ²³, konfokalinė mikroskopija ²⁴, fluorescentinė koreliacinė mikroskopija ²⁵ ir t.t.). Visų pirma, šie metodai nesuteikia informacijos apie pačią membranos sudėtį (kokią membranos dalį sudaro vienas ar kitas lipidai). Antra, dvisluoksnėse lipidinėse membranose įmanoma užfiksuoti patį pažaidos susidarymo faktą, bet nėra galimybių išsiaiškinti jos prigimtį ir dydį, nes membranos pažaidos susiformavimas dažniausiai siejamas su tam tikrų molekulių (toksinų) adsorbcija ir struktūrų susidarymu ant lipidinio paviršiaus. Tokiems procesams ir pačių membranų sudėčiai tirti tinkamiausia naudoti techniką, kuriai reikalingas plokščias kietas pagrindas (kvarcinės mikrosvartyklės (QCM) ²⁶, paviršiaus plazmonų rezonansas (SPR) ²⁷, atominės jėgos mikroskopija (AFM) ²⁸, neutronų reflektometrija (NR) ²⁹, elektrocheminio impedanso spektroskopija (EIS) ³⁰). Taigi, norint taikyti prieš tai minėtus metodus yra naudojamas kitas membranų modelis – plokščiosios lipidinės dvisluoksnės sistemos, kitaip dar vadinamos suspenduotos lipidinės membranomis (sBLM) (10 pav.) ^{31,32,33}, kurios savo struktūra ir sudėtimi yra tapačios liposomoms, tik išlietos ant plokščio hidrofilinio pagrindo (silicio oksido ar SAM padengto aukso). sBLM modelio panaudojimas turi kelis privalumus: pirma – membranos stabilumas, kuris reikalingas atliekant daug laiko reikalaujančius matavimus (nuo vienos iki keliolikos valandų). Antra – membranose pažaidos formuojasi lokaliai. Tai suteikia galimybę išlaikyti tam tikras struktūras paviršiuje, kurias jau galima tirti, kad ir su atominiu jėgos mikroskopu.

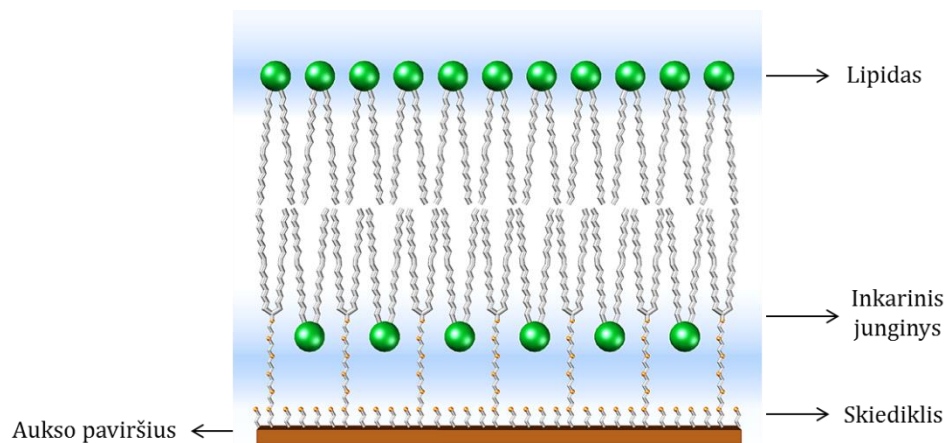
Pasakymas „Lipidinė membrana, gaubianti ląstelę, sudaro barjerą“ savaime rodo, kad pati membrana turi būti nelaidi, kad atliktų vieną iš pagrindinių savo funkcijų – apsaugoti ląstelės turinį nuo išorės poveikio. Ir

geriausiai membranos laidį galima įvertinti taikant elektrocheminio impedanso spektroskopiją (EIS). Pastarasis metodas ypač naudingas įvertinti membranos pažaidos mastą: kuo daugiau susidaro porų membranoje, tuo labiau didėja ir pačios membranos laidumas. Be to, EIS šiuo metu yra jautriausias metodas, kuris leidžia detektuoti 1 susidariusią porą $1 \mu\text{m}^2$ plote (SPR ir QCM metodu, priklausomai nuo poros prigimties, galima detektuoti >100 porų/ μm^2). Bet EIS metodas nėra taikomas sBLM tyrimuose, nes šis membranų modelis netenkina vienos EIS metodui reikalingos sąlygos: per maža pomembraninio sluoksnio varža ³⁴. Kad tai išspręsti, naudojamos hibridinės membranos (hBLM) (10 pav.) ^{35,36}, kuriose apatinis lipidų sluoksnis yra pakeičiamas alkantioliais ar tiolipidais. Šie junginiai per tiolinę grupę fiksuojami prie paviršiaus, kurie sukuria hidrofobinį paviršių ir taip leidžia suformuoti stabilų lipidinį monosluoksnį, tvirtai prikabinatą prie paviršiaus. Kadangi tokioje sistemoje pomembraninio sluoksnio nėra, tai gaunamos elektrai nelaidžios sistemos, kas turėtų leisti hBLM taikyti įvairių toksinų tyrimuose. Bet šiuo atveju nukenčia EIS metodo jautrumas – membranoje reikia sukurti daugiau pažaidų, kad EIS detektuotų laidžio pokyčius ^{34a}. Bet nepaisant šių trūkumų, hBLM sistema, dėl savo paprasto paruošimo, labai patogi įvairiems lipidinio monosluoksnio įvėčiams atlikti (lipidų kiekis monosluoksnyje; monosluoksnio storis; prietaisų jautrumo nustatymas ir t.t.), kuriuos vėliau galima pritaikyti sudėtingesnėse sistemose ^{35a}.



10 pav. Lipidinės membranos: suspenduota (kairė) ir hibridinė (dešinė)

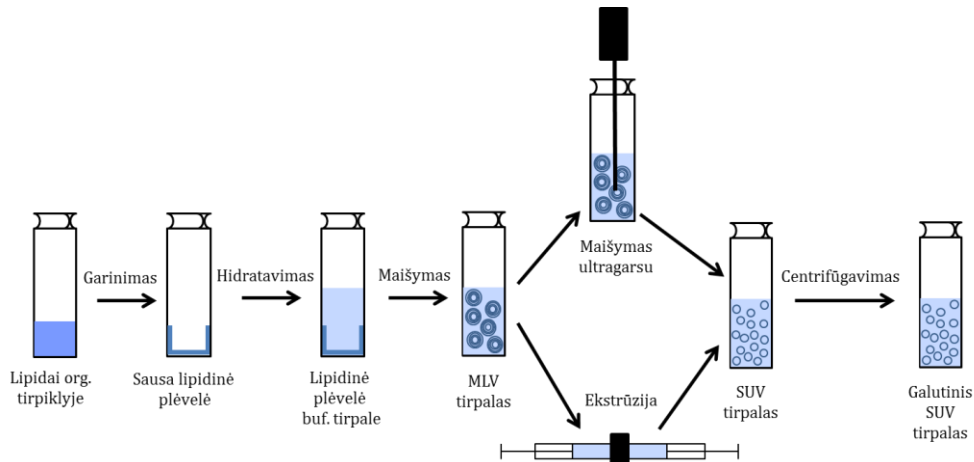
Šiuo metu yra vystomas trečias membranos modelis – prikabintos lipidinės membranos (tBLM) ^{37–48} (11 pav.), kurios pagal savo struktūrą yra tarpinis variantas tarp sBLM ir hBLM. tBLM sistema labiausiai orientuota į EIS tyrimo metodo taikymą, nes leidžia kontroliuoti pomembraninio sluoksnio laidį. Šiame modelyje membrana per specialius junginius – inkarus pritvirtinama prie paviršiaus. Pastarieji junginiai struktūriškai yra panašūs į lipidus: turi hidrofobinę dalį, kurią sudaro sočiosios arba nesočiosios anglies grandinės, o hidrofiliinėje dalyje esančios fosfato ir funkcinės grupės yra pakeičiamos etilenoksidine (EO) grandine, prie kurio galo prijungta siera arba sierą turinti grupė, gebanti sąveikauti su aukso paviršiumi. Šio junginio anglies grandinės sudaro apatinį membranos sluoksnį, taip suteikiant sistemai stabilumo. O pomembraniniam sluoksnyje esantys EO fragmentai iškart atlieka du vaidmenis: pirma – sumažina pomembraninio rezervuaro laidį, o antra – kontroliuoja membranos aukštį nuo jutiklio paviršiaus. Bet jutiklio paviršiaus užpildymas vien šiais inkariniais junginiais visą lipidinę sistemą daro panašią į hBLM, kas sumažina membranos pažaidos detektavimo galimybes ⁴⁹. Kad to būtų išvengta, inkarinis junginys yra maišomas su skiedikliu. Pastaroji molekulė dažniausiai esti įvairaus ilgio grandinė sudaryta iš EO fragmentų, bet be hidrofobinės dalies, kuri užpildo tarpus pomembraniniame sluoksnyje. Taigi, skiediklis leidžia kontroliuoti inkarinių junginių kiekį paviršiuje.



11 pav. Prikabinta lipidinė membrana.

1.3 Lipidinių membranų modelių paruošimas

Visų šių modelių paruošimo protokolas šiuo metu yra identiškas ir atliekamas per dvi stadijas: I stadijoje iš spiritinių tirpalų suformuojami atitinkami savitvarčiai monosluoksniai (**sBLM** sistemoje lipidinis paviršius formuojamas ant hidrofilinio monosluoksniu, **hBLM** – hidrofobinio monosluoksniu, **tBLM** – mišraus monosluoksniu, sudaryti iš inkarinio junginio ir skiediklio), o II stadijoje jau vykdomas lipidinių sluoksnių formavimas. I stadija, iš esmės, nereikalauja ypatingų sąlygų, išskyrus tai, kad visi tioliai turi būti tirpūs etanolyje. Auksu padengta plokštelė inkubuojama etanoliniame tiolių tirpale nuo 1 iki 12 valandų. II stadija yra atliekama, kaip vienas iš paruošimo būdų, pasitelkiant dvisluoksnes lipidines liposomas (**SUV**)⁵⁰, t.y. ant suformuoto savitvarčio monosluoksniu yra užnešamas vandeninis dvisluoksnių liposomų tirpalas.



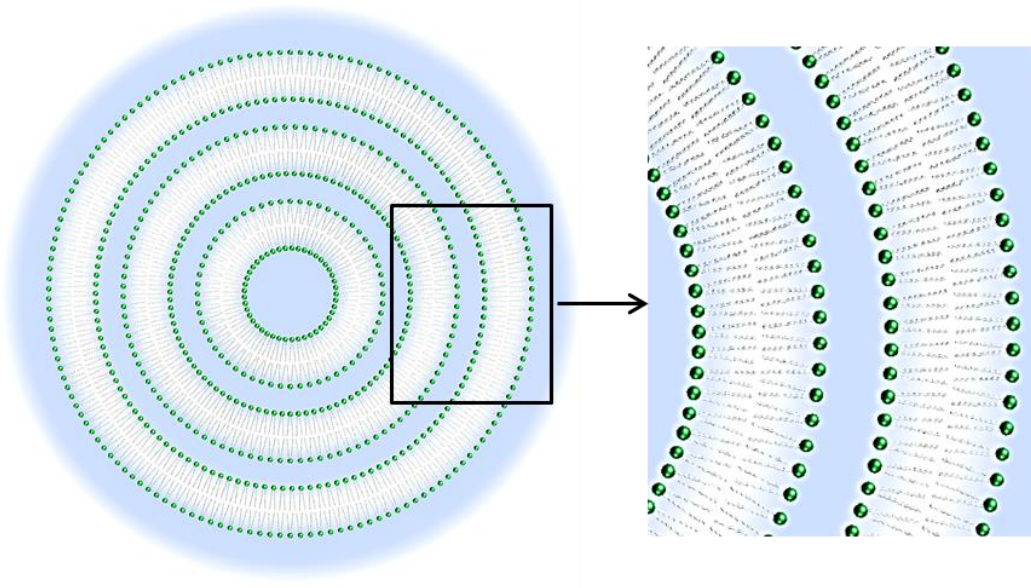
12 pav. Dvisluoksnių liposomų paruošimo schema.

SUV metodo trūkumas – šis formavimo metodas tinkamas paruošti tik **hBLM** ir **sBLM**. O **tBLM** paruošimas iš šių liposomų jau tampa sunkesniu uždaviniu, nes: 1) lėtas formavimasis (2 – 24 valandos)^{51,52}; 2) negalima formuoti ant retų inkarų, ant kurių geriausiai detektuoti membranos pažeidimas

EIS metodu ^{51a,53,54}; 3) didelis membranų defektiškumas, t.y. membranų laidumas – per aukštas, kad būtų tinkamas naudoti kaip biojutiklius EIS tyrimuose; 4) didelę svarbą turi ir liposomų dydis – modelių paruošime gali būti naudojamos nedidesnės nei 50 nm skersmens liposomos ⁵⁵. Pačių dvisluoksnių liposomų paruošimo metodika taip pat reikalauja pakankamai daug laiko bei specifinės įrangos (12 pav.) ⁵⁶⁻⁵⁸.

Modelių lipidinė dalis gali būti paruošiama ir tirpiklio pakeitimo metodu (RSE) ^{37a,59,60,61}. Tai irgi gana plačiai naudojama ir viena paprasčiausių lipidinių paviršių formavimo technikų, leidžiančių sukonstruoti izoliuojančias, stabilias ir tvarias lipidines membranas imituojančias sistemas ^{54a,62}. Metodikos esmė: lipidai yra ištirpinami etanolyje, metanolyje ar kitame alkoholyje. Tirpalas injektuojamas ant paviršiaus ir po 5 minučių atliekamas praplovimas su fosfatiniu buferiu. Vienas pagrindinių trūkumų – neįmanomas realaus laiko formavimas. Antras trūkumas, kad nevisose sistemose ši metodika tinkama dėl tyrimo technikos ar pačios sistemos konstrukcijos, t. y. matavimai, pavyzdžiui atliekami su SPR ar QCM, turi būti vykdomi toje pačioje terpėje (dažniausiai vandeniniame tirpale), o RSE metodas gali būti taikomas tik ant sauso paviršiaus arba prieš tai užpildžius sistemą tuo pačiu tirpikliu (organiniu). Ir galiausiai, ne visų lipidų tirpumas alkoholyje yra pakankamas, ypač tai liečia cholesterolį, kurio tirpumas, išskyrus propanolį, yra labai ribotas.

Taigi, apžvelgtos lipidinių paviršių paruošimo metodikos turi vienų ar kitų trūkumų. Tačiau šiame darbe bus taikomas naujas membranų modelių lipidinės dalies paruošimo protokolas – daugiasluoksnės lipidinės liposomos (MLV) ⁶³⁻⁶⁵. Šias liposomas sudaro ne du sluoksniai lipidų kaip SUV atveju, bet daug sluoksnių, tarp kurių kiekvieno yra tam tikras kiekis vandens (13 pav.) ⁶⁶. Jos yra ruošiamos panašiai kaip dvisluoksnės liposomos, tik jau nebetaikomos paskutinės stadijos (maišymas ultragarsu ar ekstrūzija), kai prasideda skaidymas iš MLV į SUV ⁶⁷ (12 pav.).



13 pav. Daugiasluoksnė liposoma.

2. DARBO REZULTATAI

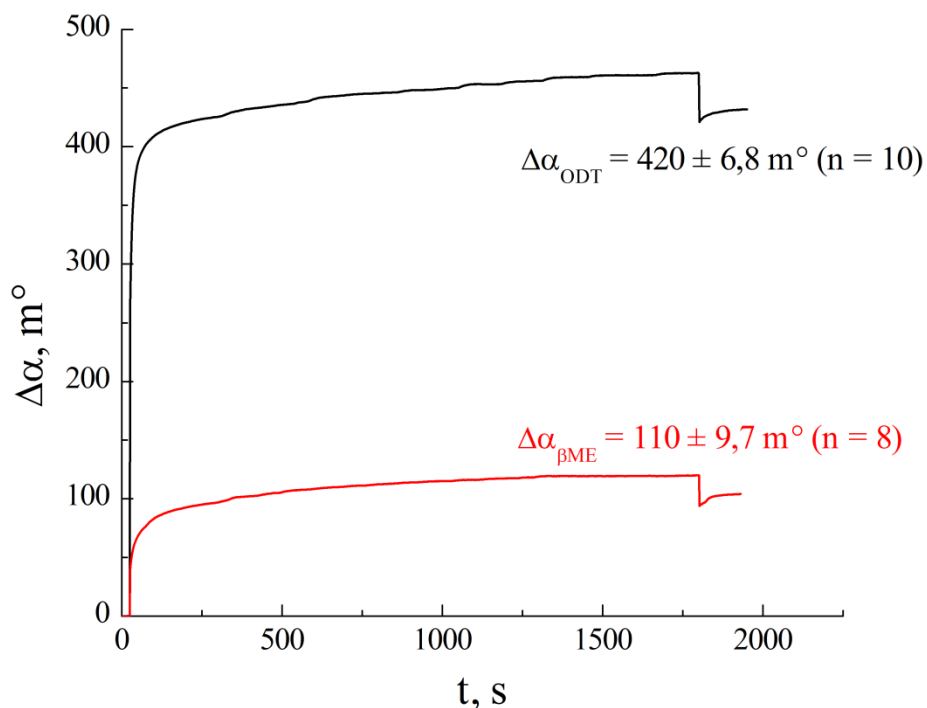
Apžvalgoje aptartos prikabintos fosfolipidinės dvisluoksnės membranos (**tBLM**) yra kuriamos kaip didelį potencialą turinčios modelinės sistemos, gebančios atlikti biojutiklių vaidmenį įvairių procesų tyrimuose. Tačiau mažai informacijos surinkta apie šių modelių vidinę struktūrą: kaip inkariniai junginiai pasiskirstę paviršiuje, kokią viso mišraus savitvarkio monosluoksnio dalį paviršiuje sudaro skiediklis, ar inkariniai junginiai pagal savo užimamą plotą yra tapatūs lipidams ir t.t. Atsakymus į šiuos ir kitus klausimus kaip tik buvo bandyta atrasti šiame skyriuje, kartu išsprendžiant ir vieną iš pagrindinių uždavinių – greitą ir efektyvų stabilios modelinės sistemos paruošimą, pasitelkiant naują lipidinių sluoksnių paruošimo metodiką.

Šiame darbe dauguma matavimų bus atliekami paviršiaus plazmonų rezonansu, iš kurio duomenų bus įvertinti adsorbuotos medžiagos kiekiai jutiklio paviršiuje. Iš pradžių bus atliekami **sBLM** ir **hBLM** sistemų tyrimai, kad nustatyti **SPR** prietaiso jautrumą tioliams ir lipidams, nes iki šiol dauguma tyrėjų lipidiniam sluoksniui įvertinti naudoja **SPR** jautrumą, pritaikytą baltymams ^{4a,68-70}. Toliau bus atlikta **tBLM** formavimo stebėseną ir iš **SPR** duomenų atlikta **tBLM** sistemos analizė. Kaip papildoma tyrimo priemonė pasitelkiama ir elektrocheminio impedanso spektroskopija, kurios pagalba bus galima įvertinti **tBLM** sistemų elektrinę talpą bei laidį.

2.1 **hBLM ir sBLM sistemų tiolinės dalies tyrimas**

hBLM ir **sBLM** lipidiniai sluoksniai formuojami atitinkamai ant hidrofobinių ir hidrofilinių savitvarkių monosluoksnių. Pastarasis sluoksnis ant aukso paviršiaus paruošiamas iš beta merkaptoetanolio (**βME**) etanolinio tirpalo, $c_{\beta ME} = 0,1$ mM. Pradžioje matavimo **SPR** celė užpildoma etanoliumi (**EtOH**) ir nusistovėjus bazinei linijai injektuojamas tiolių tirpalas. Praėjus 30 minučių nuo injektavimo ir $\Delta\alpha$ kitimo greičiui esant mažesniai nei $0,1$ m°/min atliekamas

celės praplovimas su EtOH. Analogiška procedūra atliekama ir su oktadekantolio (ODT) etanoliniu tirpalu, iš kurio ruošiamas hidrofobinis paviršius.



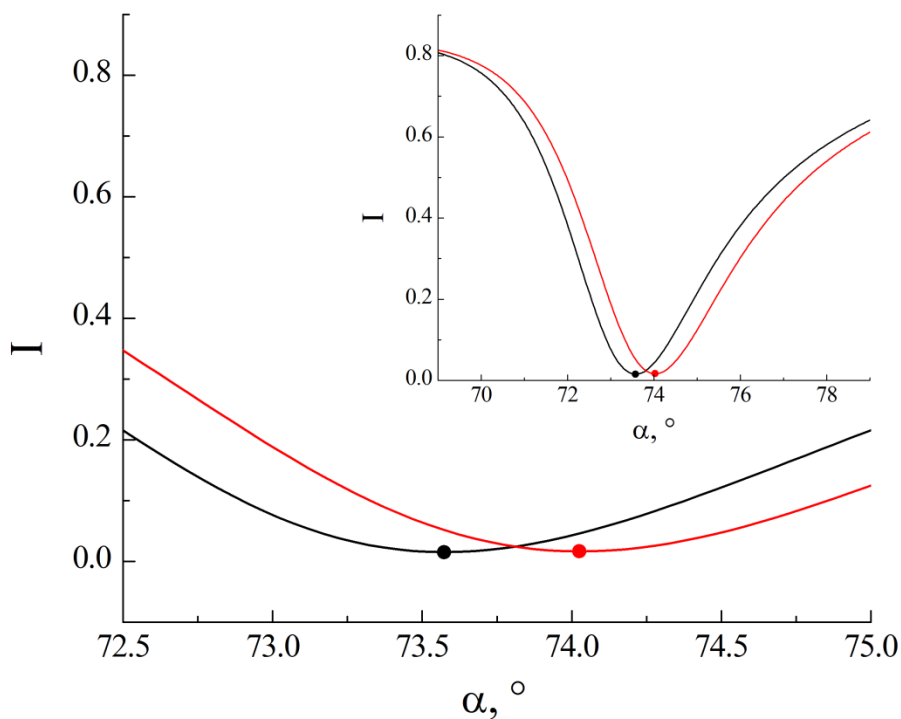
14 pav. SPR sensogramos. Savitvarkių monosluoksnių iš etanolinių tirpalų formavimas.

Duomenys, pateikti 14 paveiksle, leidžia pastebėti, kad adsorbcijos greičio atžvilgiu abiem atvejais toliai prie aukso paviršiaus adsorbuojasi kelių dešimčių sekundžių bėgyje. Bet jų $\Delta\alpha$ ant aukso paviršiaus skirtingi: $\Delta\alpha_{\beta ME}$ – 110 m°; $\Delta\alpha_{ODT}$ – 420 m°, kas ir turėtų būti natūralu, žinant, kad abiejų junginių grandinės ilgiai yra skirtingi (be gale esančios sieros ODT sudaro 18 anglies atomų, βME – 2). Norint pagrįsti tokį $\Delta\alpha_{ODT}$ kitimą, galimas keliapakopis įvertinimo kelias, kai medžiagos kiekis ant jutiklio paviršiaus apskaičiuojamas trim etapais, pereinant nuo medžiagos masės kiekio ant paviršiaus iki jo lūžio rodiklio. Pirmame etape pakanka žinoti tik vienos molekulės užimamą plotą. Imant konkrečiai ODT, yra žinoma, kad pastarojo junginio skerspūvio plotas (A) – 22,5 Å² ⁷¹ ir kai šios molekulės pilnai užpildo visą paviršių, tai teoriškai 1

cm² plote turėtų būti 4,44·10¹⁴ molekulių arba 211 ng/cm² medžiagos. Antrame etape, medžiagos masės kiekis (Δm) įvertinamas pasitelkiant de Feijter lygtį, kuri aprašo medžiagos kiekio priklausomybę nuo lūžio rodiklio ⁷²:

$$\Delta m = d \frac{n - n_0}{dn/dc}, \quad (16)$$

kurioje d – adsorbuotos medžiagos storis, n_0 – tirpiklio lūžio rodiklis, n – adsorbuotos medžiagos lūžio rodiklis ir dn/dc – medžiagos lūžio rodiklio priklausomybė nuo jo koncentracijos. ODT monosluoksniui taikant šiuos dydžius: $d_{ODT} = 24 \text{ \AA}$ ⁷³, $n_{ETOH} = 1,36$, $n_{ODT} = 1,5$ ⁷⁴ ir $dn/dc = 0,16 \text{ ml/g}$ ⁷⁵, apskaičiuojamas identiškas, kaip ir pirmame etape, ODT masės kiekis jutiklio paviršiuje – 211 ng/cm².



15 pav. Sumodeliuotas SPR spektras: juoda kreivė – be ODT, raudona kreivė – su ODT.

Galutiniame etape, naudojant 16 lygties kintamuosius (d , n ir n_0) bei 1 lentelės parametrus, atliekamas SPR kreivės modeliavimas. Pati SPR kreivė

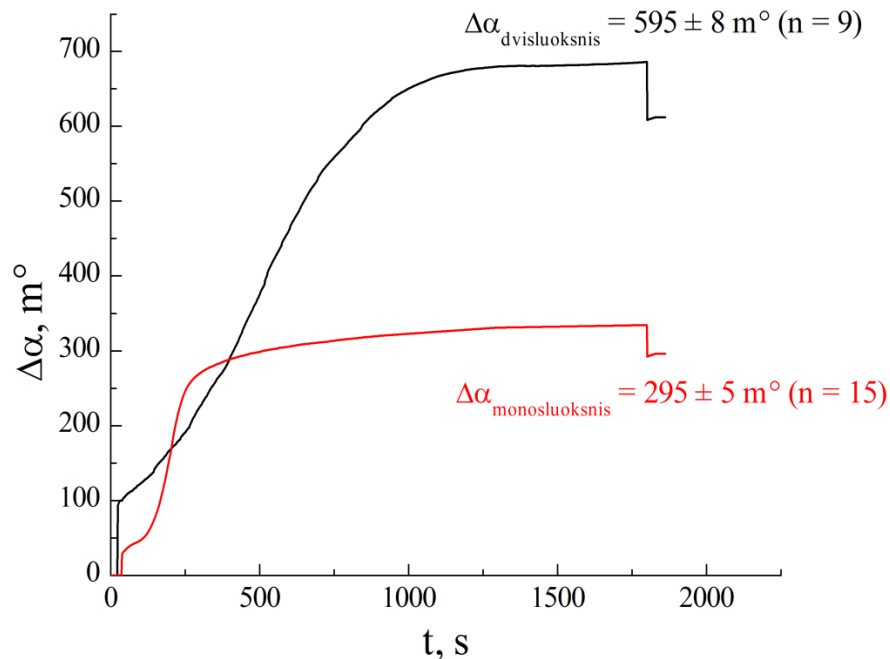
simuliacijos būdu gali būti aprašoma Fresnelio lygtimi ⁷⁶, kuri leidžia nuspėti šviesos atspindžio elgseną daugiasluoksnėse sistemose. Taigi, atlikus modeliavimą, SPR kreivės minimumo taškas (15 pav.) po ODT sluoksnio įterpimo į sistemą pasislinko ~ 420 m°, kas tapatu eksperimentiniams duomenims (14 pav. juoda kreivė). Tolimesniuose skaičiavimuose tiolių jautrumas (S) paviršiaus plazmonų rezonansui bus taikoma ši vertė : $S_{iolių} = \Delta m_{ODT} / \Delta \alpha_{ODT} = 0,502$ ng/(cm²·m°).

Pasitelkus anksčiau nustatytą tiolių jautrumą SPR kampui, apskaičiuota, kad βME atveju aukso paviršiuje esti 60 ng/cm² medžiagos, kas atitinka 21,5 Å² skerspjūvio plotą vienai βME molekulei.

2.2 hBLM ir sBLM sistemų lipidinės dalies tyrimas

Prieš atliekant tBLM formavimo eksperimentus buvo atliktas ir lipidinių membranų paruošimas ant praeitame skyriuje aprašytų paviršių, kad būtų įvertinta, kiek turi pasikeisti $\Delta\alpha$, kai ant paviršiaus yra lipidinis monosluoksnis sBLM sistemoje arba dvisluoksnis hBLM. Pats lipidinių sluoksnių formavimas buvo vykdomas iš MLV liposomų, sudarytų iš DOPC lipidų, kurių bendra tirpale koncentracija – 1 mM, prieš tai celę užpildžius buferiniu tirpalu.

Atlikti lipidinių paviršių formavimo duomenys (16 pav.) rodo, kad liposomų prisikabinimas prie paviršiaus ir plokščiųjų membranų susidarymas nėra greitas procesas ir reikalauja laiko tam tikrai savitvarkai susidaryti, nei formuojant sBLM iš dvisluoksnių liposomų (lipidinio dvisluoksnio formavimas iš SUV ant silicio pagrindo užtrunka ~ 5 minutes) ^{26a}. Bet po 20 minučių, kai SPR kampas beveik nebekinta (16 pav.), $\Delta\alpha$ vertės abiem atvejais žymiai skiriasi ir po sistemos praplovimo (~ 1800 s) lipidų kiekis ant hidrofiliinio paviršiaus yra 2 kartus didesnis nei ant hidrofobinio: $\Delta\alpha_{(dvisl.)} = 595$ m°, $\Delta\alpha_{(monosl.)} = 295$ m° iš esmės įrodantis, kad, taikant MLV metodą, galima suformuoti pageidaujamą lipidinę sistemą (dvisluoksnį ar monosluoksnį) paviršių.

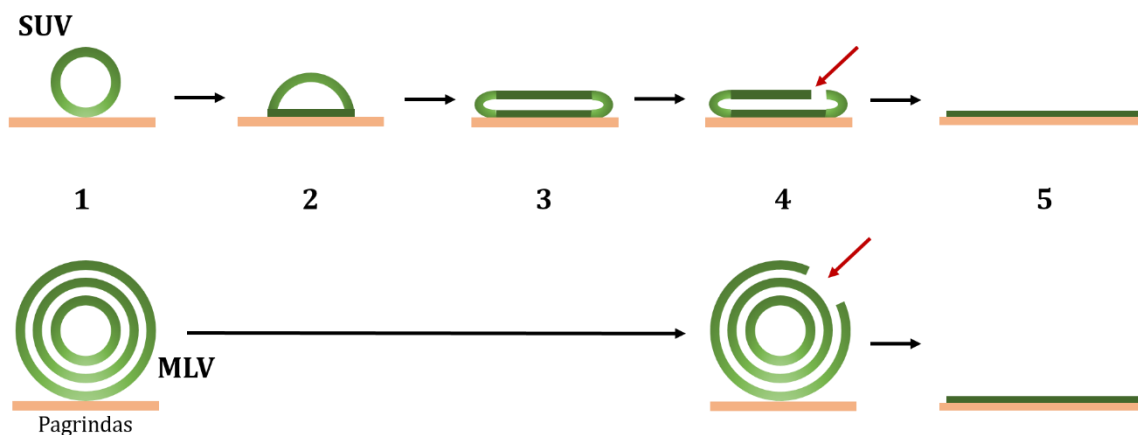


16 pav. SPR sensogramos. Lipidinio monosluoksnio ir dvisluoksnio formavimas iš DOPC daugiassluoksnių liposomų.

Įsitikinimui, kad hBLM sistemoje buvo suformuotas vien tik lipidinis monosluoksnis, vėl gi galima taikyti keliapakopį įvertinimo kelią, aprašytą prieš tai buvusiame skyriuje. I etapas: kai $A_{DOPC} - 72,5 \text{ \AA}^2$ ⁷⁷, tai $\Delta m_{DOPC} - 181 \text{ ng/cm}^2$. II etapas: kai de Feijterio lygties kintamieji: $n_{DOPC} - 1,478$ ⁷⁸; $n_{PBS} - 1,335$; $dn/dc_{DOPC} - 0,138 \text{ ml/g}$ ^{78a} ir $d_{DOPC} - 18,5 \text{ \AA}$ ^{77a}, tai $\Delta m_{DOPC} - 181 \text{ ng/cm}^2$. III etapas: kai SPR kreivės modeliui taikomas ODT monosluoksnis (14 pav.) + lipidinis monosluoksnis (n_{DOPC} , n_{PBS} , d_{DOPC}), tai $\Delta\alpha_{(monosl.)} - 295 m^\circ$. Taigi, paskutinis rezultatas patvirtina anksčiau išsakytą teiginį, kad iš MLV liposomų gaunamas, priklausomai nuo paviršiaus, tik monosluoksnis ar dvisluoksnis. Tolimesniuose skaičiavimuose, kurie susiję su lipidais (DOPC), bus taikomas šis SPR jautrumas lipidams: $S_{DOPC} - 0,62 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot m^\circ)$.

Liposomų liejimosi mechanizmas. Kadangi šiame darbe nėra taikoma tyrimo metodų, kurie nusakytų patį membranos formavimosi mechanizmą, tai galima daryti tik tam tikras prielaidas. Liejant membranas iš SUV yra laikomasi

nuostatos, kad visas membranos liejimosi mechanizmas vyksta per tris stadijas (17 pav.): 1) liposomos prisikabinimas prie paviršiaus; 2) liposomos deformacija; 3) liposomos plyšimas ⁷⁹. Liposoma tirpale yra rutulio formos (17 pav. 1). Priartėjus prie pagrindo ji pradeda sąveikauti su paviršiumi ir plokštėti, stengdamasi užimti kuo didesnę paviršiaus plotą (17 pav. 2). Ir kuo stipresnė yra ši sąveika, tuo liposoma labiau plokštėja. Bet šis procesas vyksta tik iki tol, kol vis dar yra įmanomas plokštėjimas (17 pav. 3). Toliau liposoma gali tik plyšti (17 pav. 4) ir taip galutinai užpildyti paviršių lipidais (17 pav. 5).



17 pav. Membranų liejimosi mechanizmas.

Taigi, galima pastebėti, kad visam šiam procesui įtakos turi keli faktoriai. Pirmiausia, turi būti pakankamai stipri sąveika tarp paviršiaus ir lipido, kuri ne tik leistų maksimaliai deformuoti liposomą, bet ir nutrauktų kurioj nors liposomos vietoj tarplipidinių ryši, taip suardant pačią liposomą. Tai puikiai iliustruoja darbas, kur lipidinis dvisluoksnis iš SUV (DOPC) buvo liejamas ant silicio oksido ir aukso ^{26b}. Pirmu atveju vyksta pilnas išsiliejimas, antru atveju liposomos prisikabina, bet jos neplyšta dėl nepakankamos sąveikos su paviršiumi. Antras svarbus faktorius – liposomos dydis. Vėl gi buvo atliktas eksperimentas, rodantis, kaip keičiasi lipidinio dvisluoksnio formavimosi kinetika ant silicio oksido nuo SUV dydžio. Ir buvo parodyta, kad kuo didesnė liposoma, tuo lėčiau vyksta liejimasis ⁸⁰. Bet kai kuriais atvejais trūkis liposomoje gali ir visai

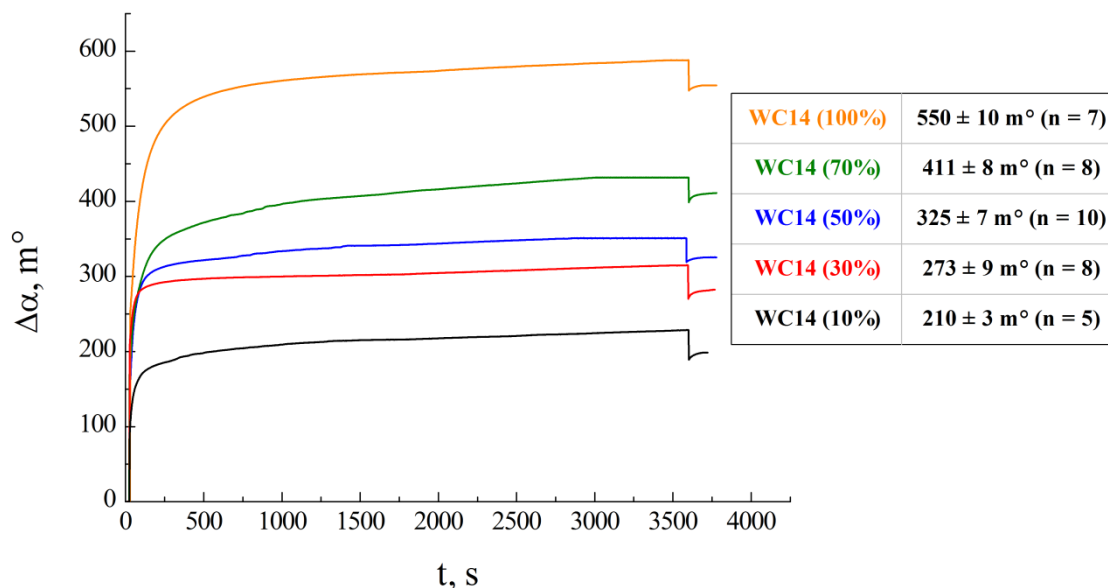
neatsirasti ⁸¹. Ir paskutinis svarbus faktorius, tai tarplipidinė sąveika: kuo ji stipresnė, tuo sunkiau suplėšyti pačią liposomą. Tai puikiai parodo aprašytas eksperimentas, kur iš **SUV**, kurias sudarė **DOPC** + **Chol**, buvo bandyta lieti dvisluoksnius ant SiO₂ ⁸². Esant liposomų iki 20% cholesterolio, pavyko suformuoti membranas, bet jau virš 20% liposomos tik prisikabino prie paviršiaus. Tai susiję su tuom, kad susidaro stipresnis ryšys tarp **DOPC** – **Chol** nei tarp **DOPC** – **DOPC**, kurio nebepajėgiama nutraukti ⁸³. **MLV** atveju, galima įtarti, viskas vyksta paprasčiau. Imant tą pačią analogiją kaip ir su **SUV**, tai po prisikabinimo pačios liposomos deformacija (17 pav. 2 ir 3) šioj sistemoj yra neįmanoma, nes liposomos vidus užpildytas kitais lipidiniais dvisluoksniais. Tokiu atveju liposomai išardyti pakanka tik nutraukti tarplipidinius ryšius, po ko seka jau pačios membranos formavimasis. Skirtumą tarp formavimosi iš **SUV** ir **MLV** galima aiškinti susiejant ir su laisvąja energija ^{84, 85}, kur teigiama, kad **MLV** turi mažiau laisvosios energijos nei **SUV**, tad ir atitinkamai **MLV** reikia suteikti mažiau energijos, kad išardyti liposomą.

2.3 **tBLM** sistemos tolinės dalies tyrimas

tBLM – tai tam tikra lipidų ir jų analogų (inkarinių junginių) sistema, kuri, kaip minėta anksčiau, paruošiama per dvejas stadijas: pirma – nuo paviršiaus pakelto karkaso konstravimas iš inkarinių junginių, kurių kiekis yra kontroliuojamas skiediklio pagalba, ir antra – šio karkaso užpildymas lipidais bei viršutinio membranos sluoksnio suformavimas. Taigi, siekiant detaliau ištirti **tBLM** sistemą, pirma buvo atliekamas karkaso – mišraus savitvarkio monosluoksnio formavimas ir jo duomenų analizė, o vėliau ir antros stadijos tyrimas.

SPR duomenys. **tBLM** karkaso formavimas ant aukso paviršiaus realiu laiku buvo atliekamas etanoliniame tirpale inkarinių junginių **WC14** tam tikrais santykiais maišant kartu su skiedikliu **βME**, kur bendra abiejų medžiagų koncentracija – 0,1 mM. Šiame darbe **WC14** ir **βME** molekulių santykis buvo

išreiškiamas procentais WC14 atžvilgiu, pvz.: WC14 (30%) reiškia, kad spiritiniame tirpale 30% visų molekulių sudarė WC14 ir 70% – β ME. Karkaso formavimosi stebėsenai paviršiaus plazmonų rezonansu buvo naudojami WC14 10%; 30%; 50%; 70% ir 100% sudėties tirpalai. O visa eksperimento atlikimo eiga tokia pati kaip ir ODT bei β ME monosluoksnių matavimuose.

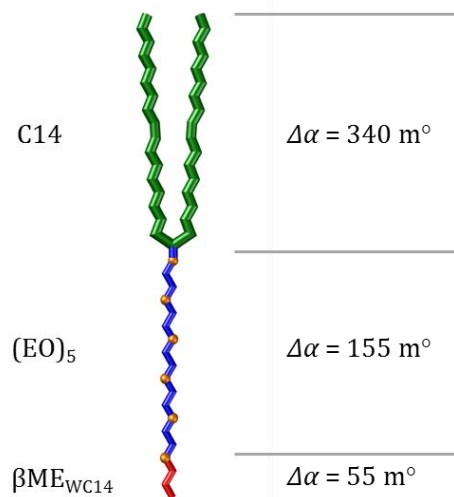


18 pav. SPR sensogramos. Mišraus savitvarkio monosluoksnio (WC14: β ME) formavimas iš etanolinių tirpalų.

Pirmas atkreiptinas dėmesys, kad mišrūs savitvarkiai monosluoksniai formuojasi pakankamai greitai ir $\Delta\alpha$ dažniausiai esti stabilizavęsi jau po 1 val. (18 pav.). Kitas svarbus pastebėjimas, kad keičiant WC14 kiekį tirpale, kartu keičiasi ir $\Delta\alpha_{(WC14(x))}$ (18 pav. lentelė), signalizuojantis ir inkarinio junginio kiekio kitimą jutiklio paviršiuje. Bet bandant kiekybiškai įvertinti tiek WC14, tiek β ME tenka susidurti su dviem problemom: **1)** inkariniai junginiai – palyginti neseniai pradėtos naudoti molekulės ir nėra nustatytos jų optinės konstantos (n , dc/dn), kas neleidžia duomenų apdorojimui naudoti keliapakopės skaičiavimo metodikos, aprašytos 2.1 skyriuje; kaip alternatyvą būtų galima naudoti S_{ODT} dydį, nes vis gi inkarinis junginys didžiąja dalimi panašus į paprastą tiolį, bet čia didelį neaiškumą įneša etilenoksidinio fragmento lūžio rodiklis (skirtingais

šaltinių duomenimis: 1,44 – 1,47) ^{86,87}; **2**) tiesiogiai iš matavimų duomenų neįmanoma išskirti, kokiais santykiais paviršiuje yra pasiskirsčiusios **WC14** ir **βME** molekulės. Taigi, detalesnei duomenų analizei reikalingas tam tikras atspirties taškas. Kadangi pirmiausiai reikia išspręsti pirmą problemą, tai tolimesniam tyrimui buvo pasirinktas **WC14** (100%) savitvarkis monosluoksnis.

WC14 (100%). Pagal **SPR** matavimus (18 pav. oranžinė kreivė) šio savitvarkio monosluoksnio $\Delta\alpha_{WC14(100\%)} = 550 \text{ m}^\circ$. **SPR** – tyrimo metodas, kurio duomenis galima interpretuoti tiriamąjį objektą išskirsčius į atskirus sluoksnius, t.y. jei paviršiuje yra k sluoksnių, tai kiekvieno jų $\Delta\alpha_k$ suma sudarys bendrą $\Delta\alpha$. Pagal tą patį principą įmanoma nagrinėti ir **WC14** (100%) monosluoksnį, kurį, žiūrint struktūriškai, įmanoma išskirti į dvi dalis: vieną (viršutinę) sudarytų inkarinio junginio hidrofobinė dalis, susidedanti iš 14 anglies atomų turinčių sočiųjų grandinių (**C₁₄**) (19 pav. žalia spalva), o apatinę – hidrofiliinės grandinės, susidedančias iš etilenoksido fragmentų.



19 pav.: Inkarinio junginio **WC14** struktūra ir dydžiai.

Kadangi pagal savo sudėtį **C₁₄** grandinės yra labai panašios į **ODT**, tai taikytina sąlyga, kad šios grandinės yra išsidėsčiusios taip pat kaip ir **ODT** monosluoksnio atveju ir užima tą patį plotą ($22,5 \text{ \AA}^2$). Tokiu atveju inkarinių

junginių 1 cm^2 plote bus $2,22 \cdot 10^{14}$, nes vieną inkaro molekulę sudaro dvi C_{14} grandinės, ir dalinė inkaro molekulinė masė – 467 g/mol . Tai tada paviršiuje turėtų būti $\sim 171 \text{ ng/cm}^2$ organinės medžiagos. Laikantis tos pačios nuostatos, kad $S = 0,502 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$ (iš **ODT** eksperimento, *II skyrius 2.1 dalis*), tai $\Delta\alpha_{C_{14}} = 340 \text{ m}^\circ$.

Taigi, likę 210 m° (iš 550 m°) atitenka apatinei daliai, kuri susideda iš 6 etilenoksido (EO) fragmentų ir prie galo prijungtos sieros grupės. Bet tolimesniems skaičiavimams praktiškiau būtų visą hidrofiliinę dalį išskirti į du atskirus komponentus, kurių vieną sudarytų 5 EO fragmentai (**(EO)₅**) (19 pav. mėlyna spalva), o kitą – 1 EO fragmentas su prijungta sieros grupe, kuri tampa panaši į beta merkaptotanolį (**$\beta\text{ME}_{WC_{14}}$**) (19 pav. raudona spalva). Kadangi **$\beta\text{ME}_{WC_{14}}$** fragmentų yra tiek pat kiek ir inkaro WC14 molekulių, bei laikantis sąlygos, kad C14 ir **$\beta\text{ME}_{WC_{14}}$** skerspjūvio plotai yra panašūs, tai iš to seka, kad **$\beta\text{ME}_{WC_{14}}$** fragmentų yra dvigubai mažiau nei C14 ir $\Delta\alpha_{\beta\text{ME}_{WC_{14}}} = 55 \text{ m}^\circ$ (iš **βME** monosluoksniu formavimo eksperimento $\Delta\alpha_{\beta\text{ME}} = 110 \text{ m}^\circ$). Taigi, likusi dalis $\Delta\alpha = 155 \text{ m}^\circ$ atitenka **(EO)₅** grandinėms, kurių masė – $81,7 \text{ ng/cm}^2$.

Aprašytame skaičiavime išskirtas **$\beta\text{ME}_{WC_{14}}$** leidžia supaprastinti mišrių savitvarčių monosluoksnių sudėties įvertinimą, nes visais atvejais paviršius bus pilnai padengtas **βME** ir **WC14** molekulėmis: jei būtų pašalintos visos C_{14} ir **(EO)₅** grandinės nuo paviršiaus, tai beliktų **βME** kaip skiediklis ir **$\beta\text{ME}_{WC_{14}}$** iš inkarinio junginio **WC14**, kur teoriškai $\Delta\alpha$ turėtų būti lygus 110 m° (iš **βME** matavimų, *II skyrius 2.1 dalis*). Tai iš bendro $\Delta\alpha$ atėmus 110 m° , belieka tas medžiagos kiekis, kuris sudarytas tik iš **(EO)₅** ir C_{14} fragmentų, kurių įtaka lūžio rodikliui jutiklio paviršiuje jau yra žinoma. Ir bendras **SPR** jautrumas ($S_{WC_{14}}$) šiai inkarinio junginio daliai ($C_{14} + (\text{EO})_5$) būtų $0,51 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$.

Tokia skaičiavimo metodika leidžia įvertinti, koku santykiu yra pasiskirstę inkariniai junginiai ir skiediklio molekulės ant aukso paviršiaus. O bendru atveju apskaičiavimo lygtis inkarinio junginio kiekiui (N_{ink}) ir skiedikliui (N_{skied}) atrodytų taip:

$$N_{ink} = \frac{(\Delta\alpha - \Delta\alpha_{skied}) \cdot S}{M} \cdot N_A, \quad (17)$$

$$N_{skied} = N - N_{ink}, \quad (18)$$

kur $\Delta\alpha$ – bendras mišraus savitvarkio monosluoksnio SPR kampo pokytis, $\Delta\alpha_{skied}$ – skiediklio monosluoksnio SPR kampo pokytis, M – molekulinė inkarinio junginio masė išeliminavus skiediklio fragmentą, S – SPR kampo jautrumas inkariniam junginiui, N_A – Avogadro skaičius, N – skiediklio molekulių skaičius sudarantis pilną monosluoksnį.

Remiantis 17 ir 18 lygtimis, eksperimento rezultatais (18 pav.), bei sekančiais parametrais: $\Delta\alpha_{\beta ME} = 110 \text{ m}^\circ$; $M = 687 \text{ g/mol}$; $S = 0,51 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$ ir $N = 4,65 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$, buvo apskaičiuoti inkarinio junginio WC14 ir βME kiekiai ant aukso paviršiaus 1 cm^2 plote, kurių skaičiavimo duomenys pateikti 2 lentelėje.

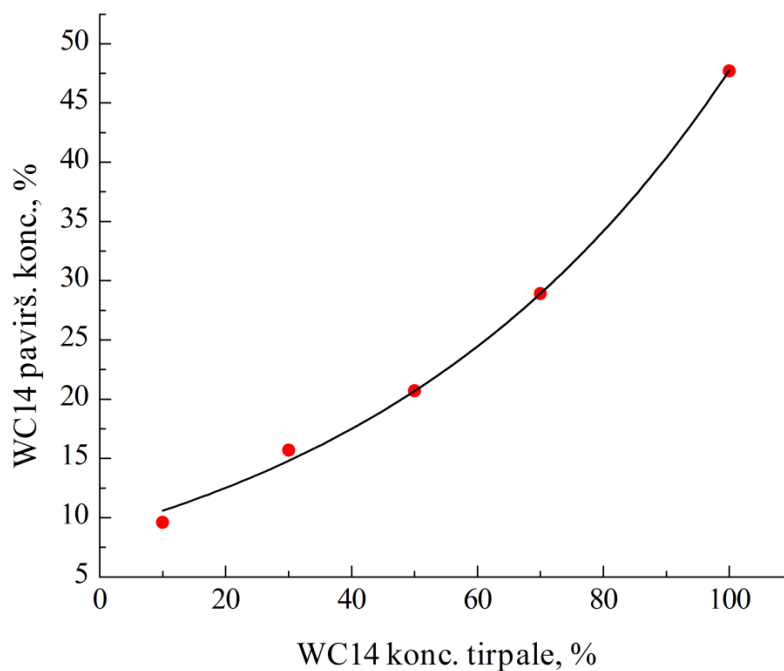
2 lentelė. Inkarinio junginio WC14 ir skiediklio βME paviršinių koncentracijų priklausomybė nuo tirpalo sudėties.

$C_{WC14}, \%$	WC14		βME	
	$N_{ink}, \text{ mol. sk.} \cdot 10^{14}$	$N_{ink}, \%$	$N_{skied}, \text{ mol. sk.} \cdot 10^{14}$	$N_{skied}, \%$
10	0,447	9,6	4,2	90,4
30	0,729	15,7	3,92	84,3
50	0,961	20,7	3,69	79,3
70	1,346	28,9	3,3	71,1
100*	2,22	47,7	2,43	52,3

100* – inkarinio junginio užpildymas, esant tirpale 100%, skaičiuojamas, jei apatinėje dalyje laisvi plotai tarp inkarinio junginio molekulių būtų užpildyti skiedikliu.

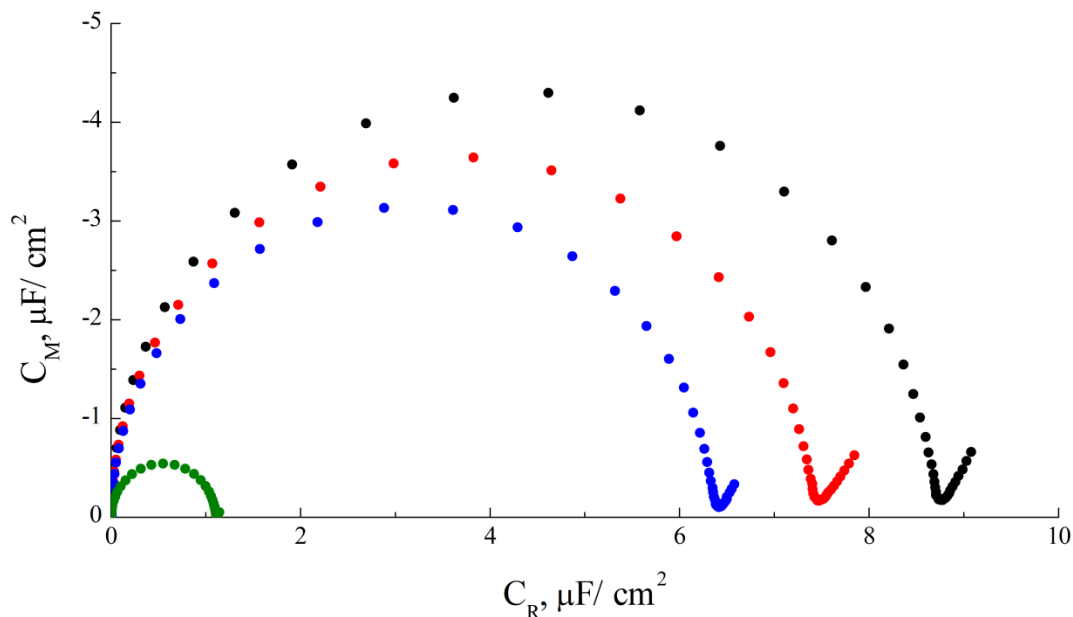
Iš antros lentelės duomenų galima pastebėti, kad tiolių procentinė koncentracija tirpale skiriasi nuo paviršinės koncentracijos. Ir jei atidėjus tirpalo sudėtį ($c_{Tirp.}$) nuo inkarinio junginio paviršinės koncentracijos ($c_{Pavirš.}$) (20 pav.), tai galima išvesti eksponentinę priklausomybę:

$$c_{Pavirš.} = 8,63 e^{0,0173 c_{Tirp.}}, \quad (19)$$



20 pav.: Inkarinio junginio WC14 paviršinės koncentracijos priklausomybė nuo tūrinės koncentracijos. Raudoni taškai – apskaičiuoti duomenys, juoda linija – priklausomybė.

EIS duomenys. Iš elektrocheminio impedanso spektroskopijos duomenų (21 pav.) matoma, kad didėjant WC14 kiekiui atitinkamai mažėja ir sluoksnio talpa – C_R ^{61a}. Bet ši priklausomybė galioja tik 10% – 60% savitvarkiams monosluoksniams, nes ties 70% SAM talpa drastiškai mažėja iki $1,1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Tai galima įtarti (paaiškinimas bus pateiktas sekančiame skyriuje), kad ties šia koncentracija inkariniai junginiai paviršiuje jau turi kitokią struktūrą. Naudojant 13 lygtį, kuri aprašo talpos priklausomybę nuo sluoksnio storio, ir taikant šiai lygčiai šiuos parametrus: ϵ_0 – vakuomo dielektrinė konstanta ($8,85 \cdot 10^{-14} \text{ F}/\text{cm}$), ϵ – angliavandenilių dielektrinė konstanta (2,3), tai rezultate gaunama, kad šio SAM storis $d = 1,85 \text{ nm}$. Bet šis skaičiavimas visiškai netinka mažesnių koncentracijų inkariniams junginiams, kur d yra 3 \AA ar mažiau ir visiškai nedera su SPR duomenimis. Taigi, šiuo atveju teisingiau būtų teigti, kad talpos mažėjimas nėra tiesiogiai susijęs su sluoksnio storio didėjimu, o labiau su paviršiaus užpildymu ir specifine inkarinio junginio struktūra.



21 pav. EIS Cole – Cole koordinatės. Mišrus savitvarkis monosluoksnis (WC14 ir β ME): 10%; 30%; 50%; 70%.

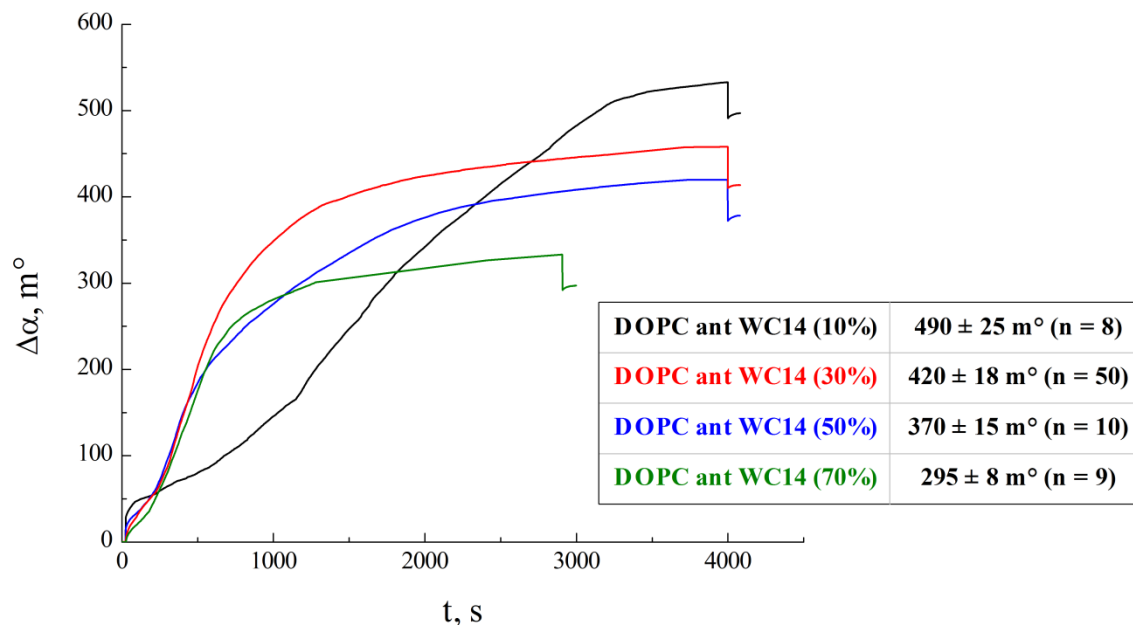
2.4 tBLM sistemos lipidinės dalies tyrimas

tBLM lipidinės dalies paruošimas – tai karkaso (mišraus savitvarkio monosluoksnio) užpildymas lipidais bei viršutinio membranos sluoksnio suformavimas. Šios dalies pagrindinis tyrimo tikslas ir yra išsiaiškinti, kokių santykiu yra pasiskirsčiusios inkarinio junginio ir lipidų molekulės apatiniame tBLM membranos sluoksnyje, bei nustatyti WC14 molekulės plotą.

Prikabintos membranos buvo liejamos ant anksčiau suformuotų mišrių savitvarkių monosluoksnių (WC14: β ME) (*II skyrius 2.3 dalis*) iš daugiasluoksnių liposomų (DOPC), kur inkarinių junginių procentinė koncentracija tirpale varijuoja nuo 10% iki 70% (14 pav.).

SPR duomenys. Pagal matavimo rezultatus, pateiktus 22 paveiksle, pirmiausia privalu atkreipti dėmesį į tai: lipidų kiekis kinta kryptingai – didėjant inkarinio junginio kiekiui paviršiuje, mažėja bendras lipidų kiekis, be to visų suformuotų lipidinių sluoksnių $\Delta\alpha_{(DOPC \text{ ant } WC14(x))}$ yra ne mažesnis nei lipidinis

monosluoksnis ($\Delta\alpha_{(monosl.)} = 295 \text{ m}^\circ$) ir ne didesnis nei lipidinis dvisluoksnis ($\Delta\alpha_{(dvisl.)} = 595 \text{ m}^\circ$).



22 pav. SPR sensogramos. Lipidinių (DOPC) bisluoksnių formavimas ant mišraus savitvarkio monosluoksnio (WC14:βME) iš daigiasluoksnių liposomų.

Kadangi, yra žinoma, kad **tBLM** viršutinį sluoksnį sudaro tik lipidai, kur šiuo atveju yra vien tik **DOPC** molekulės ($\Delta\alpha_{(monosl.)} = 295 \text{ m}^\circ$), tai aktualiau yra išsiaiškinti apatinio sluoksnio sudėtį, t.y. kokį paviršiaus plotą padengia **DOPC** lipido molekulės, o kokį – inkariniai junginiai WC14. Ir imant kaip pavyzdį **tBLM** sistemą (**DOPC + WC14 (30%)**) (22 pav. raudona kreivė), kurioje bendras lipidų kiekis atitinka 420 m° , tai apatiniame membranos sluoksnyje bus $420 - 295 = 125 \text{ m}^\circ$ lipidų. Tokiu atveju lipido molekulės turėtų užpildyti 43% ($125 \text{ m}^\circ / 295 \text{ m}^\circ \cdot 100\%$) paviršiaus, o likusi dalis (57%) turėtų atitekti savitvarkiam monosluoksniui iš inkarinių junginių. Iš ankstesnio skyriaus matavimo rezultatų yra žinoma, kad $\Delta\alpha_{WC14(30\%)} = 273 \text{ m}^\circ$ (18 pav. raudona kreivė), ir pasinaudojus 13 lygtimi, apskaičiuojama, kad 1 cm^2 ploto paviršiuje yra $7,29 \cdot 10^{13}$ molekulių. Jei šis inkarinio junginio molekulių kiekis būtų padalintas iš likusio ploto (57%),

kurį jos užpildo, tai gautųsi, kad viena WC14 molekulė užima $78,2 \text{ \AA}^2$. Tai yra $\sim 1,7$ karto daugiau, nei sudėjus dvi C_{14} grandines, kurių bendras plotas – 45 \AA^2 . Kadangi inkarinis junginys yra lipido analogas, tai sočiosios grandinės C_{14} gali būti ir nesusiglaudusios viena šalia kitos, kai užpildymas nesiekia 100%.

Žvelgiant į kitų WC14 koncentracijų duomenis ir tariant, kad šio inkarinio junginio vienos molekulės užimamas plotas nekinta ir taikant anksčiau aprašytą skaičiavimo metodiką, tai aukso paviršiaus užpildymas WC14 molekulėmis yra atvirkščiai proporcingas lipido užpildymui (3 lentelė). Ir ši priklausomybė galioja iki WC14 70%. Pastarojoje koncentracijoje paviršiaus užpildymas siekia jau daugiau 100%, ką rodo ir staigus talpos kritimas Cole – Cole diagramoje (21 pav.). Galima numanyti, kad pradeda mažėti inkarinio junginio hidrofobinės dalies skerspjūvio plotas, nes kitu atveju ties WC14 70% ir 100% koncentracijomis neturėtų būti skirtumo mišrių savitvarkių monosluoksnių formavime (18 pav.).

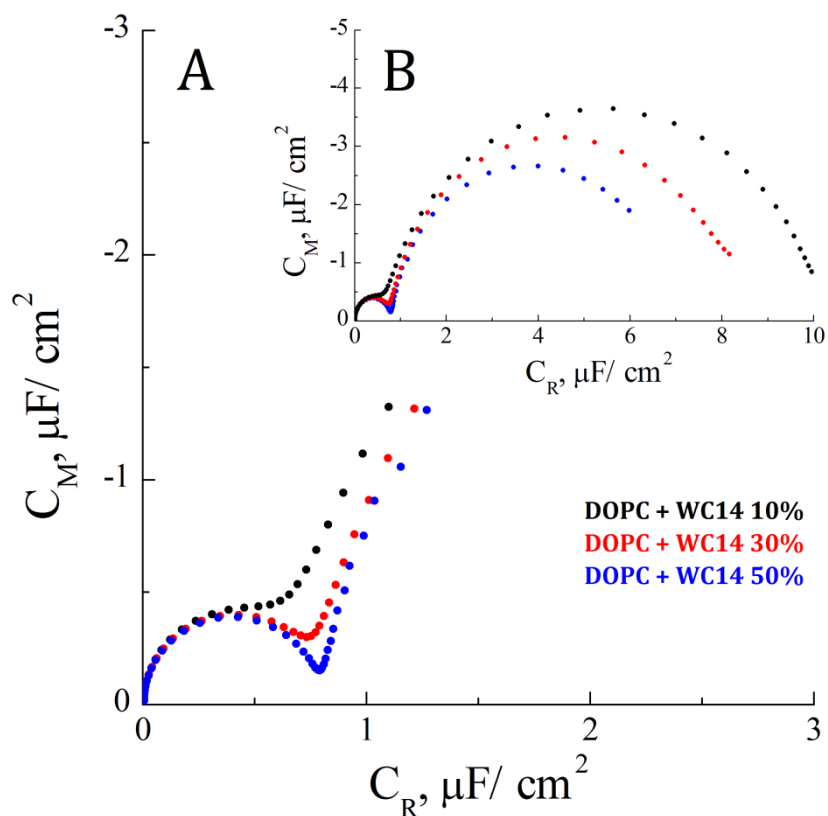
3 lentelė. Lipidų kiekio priklausomybė nuo mišraus savitvarkio monosluoksnių sudėties.

Procentinė $c_{WC14}, \%$	Inkarinis junginys WC14		Lipidas DOPC	
	$N_{ink},$ mol. sk. $\cdot 10^{14}$	Pavir. Užpildymas, %	$N_{DOPC},$ mol. sk. $\cdot 10^{14}$	Pavir. Užpildymas, %
10	0,447	34,9	0,9	65,1
30	0,729	57	0,59	43
50	0,961	75,1	0,35	24,9
70	1,346	100	0	0

EIS duomenys. Membranų formavimo metodika turi ne tik leisti kurti lipidines membranas imituojančius modelius, bet kartu šiems modeliams suteikti ir tam tikras savybes, kurias būtų galima tirti kitais metodais. Tokios savybės yra membranos elektrinis laidumas, elektrinė talpa, kurie nustatomi elektrocheminio impedanso spektroskopijos būdu.

Yra žinoma, kad didėjant dielektrinio sluoksnio storiui, bendra sluoksnio elektrinė talpa mažėja (13 lygtis). Tai tas pats galioja ir tBLM, kurio bendra talpa turi būti mažesnė už C_{SAM} (14 lygtis). Taigi, iš EIS matavimo duomenų (23 pav.)

galima pastebėti, kad visuose EIS spektruose, po lipidinių sluoksnių suformavimo, matomas tBLM sistemai būdingas nepilnas pusapskritimis, kurio minimumas, atspindintis matuojamos sistemos talpą, varijuoja $0,7 - 0,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ srityje realios talpos ašyje. Tuo tarpu vien tik $C_{WC14(10\%-50\%)}$ yra 10 kartų didesnė (21 pav.). Tai rodo, kad taikant MLV metodą, galima suformuoti izoliuojančias membranas.



23 pav. EIS Cole – Cole diagramos. tBLM talpos priklausomybė nuo WC14 koncentracijos.

Taip pat iš EIS duomenų galima nustatyti ir pačios membranos defektiškumą, kurį parodo pusapskritimio minimumo padėtis menamos talpos atžvilgiu ir po jo besitęsianti „uodega“⁸⁸. Ir iš 23 pav. duomenų galima pastebėti, kad membranos defektiškumas didėja (ilgėja „uodega“ ir kyla į viršų pusapskritimio minimumas) mažėjant inkarinio junginio kiekiui. Todėl svarbu išsiaiškinti, kokia turi būti optimali inkarinio junginio koncentracija paviršiuje,

kad membrana būtų pakankamai izoliuojanti, bet kartu turėtų pakankamą pomembraninį rezervuarą.

2.5 tBLM (dHC18:βME) charakterizavimas

Šiame darbe buvo naudojamas ir kitas inkarinis junginys **dHC18**, kurio esminis skirtumas nuo **WC14** yra tai, kad hidrofobinės dalies grandinė yra 4 anglies atomais ilgesnė bei turi dvigubą jungtį grandinės viduryje. Visa eksperimento eiga buvo atliekama kaip ir **WC14** atveju: iš pradžių formuojamas mišrus savitvarkis monosluoksnius inkarinių junginių **dHC18** maišant su **βME**, o toliau ant šių monosluoksnių formuojami lipidiniai sluoksniai iš daugiasluoksnių liposomų. Visi matavimai buvo atliekami su paviršiaus plazmonų rezonansu, kurio matavimo duomenys pateikiami 4 lentelėje, kuriais remiantis ir pasitelkiant anksčiau aprašytą skaičiavimo metodais buvo atliekamas šio junginio charakterizavimas.

4 lentelė. Inkarinio junginio dHC18 matavimo ir skaičiavimo duomenys.

A	B	C	D	E	F
Tūrinė C_{dHC18} , %	$\Delta\alpha_{dHC18}$, m°	N_{dHC18} , mol. sk. $\cdot 10^{14}$	Paviršinė C_{dHC18} , %	$\Delta\alpha_{DOPC}$, m°	S_{dHC18} , Å^2
10	210	0,348	7,5	485	102
40	285	0,637	12,5	410	105
70	340	0,850	19,9	315	101
100	475	1,672	36,0	295	~60

Pirmas atkreiptinas dėmesys, kad vien inkarinio junginio **dHC18** monosluoksniu kiekis pagal **SPR** ($475 m^\circ$) yra mažesnis nei **WC14** atveju ($550 m^\circ$), nors hidrofobinės dalies grandinės 4 anglies atomais yra ilgesnės. Toks sumažėjimas rodo, kad paviršiuje yra mažesnis kiekis inkarinių junginių. Tai patvirtina ir skaičiavimai, kai tariama, kad jautrumas yra $0,51 \text{ ng/cm}^2$, rodantys, kad paviršiuje yra $1,67 \cdot 10^{14}$ molekulių **dHC18** junginio. O tai beveik 25% mažiau nei **WC14** atveju. Šis sumažėjimas gali būti tik dėl vienos priežasties – inkarinio

junginio **dHC18** hidrofobinės dalies paviršiaus plotas yra didesnis, kuris sąlygotas grandinių išsilankstymu, nes kiekvienoje jų yra po vieną dvigubą jungtį, kuri leidžia susidaryti cis arba trans konformacijai. Laikant, kad molekulių skaičius paviršiuje atvirksčiai proporcingas užimam plotui, tai viena **dHC18** molekulė užims 59,8 Å².

Nagrinėjant kitų sudėčių mišrius (**dHC18:βME**) monosluoksnius, taikomos jau anksčiau išvestos 17 ir 18 lygtys ir jų parametrai, tik pakeičiant **dHC18** molekulinę masę ($M = 795$ g/mol), kurių pagalba galima apskaičiuoti paviršines koncentracijas. Šie skaičiavimai vėl gi parodė, kad yra priklausomybė tarp tūrinės ir paviršinės koncentracijų (4 lentelė: A ir D stulpeliai). Ir ši priklausomybė gali būti aprašoma eksponentės lygtimi, panašia **WC14** atveju (19 lygtis):

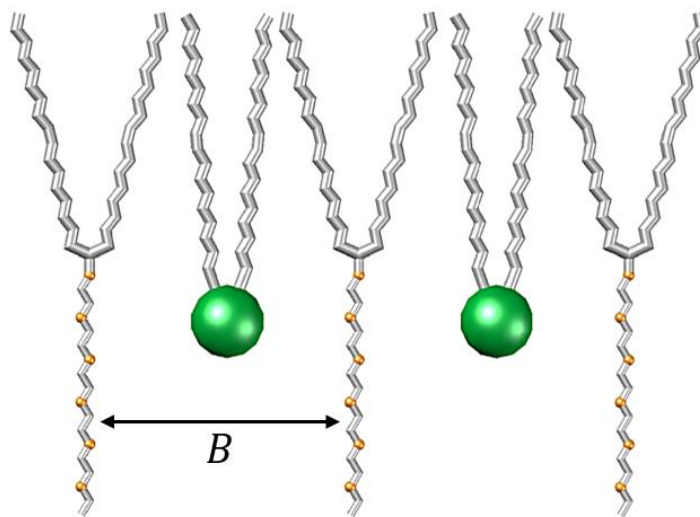
$$c_{Pavirš.} = 6,21 e^{0,0173 c_{Tirp.}} \quad (20)$$

Pažiūrėjus į abi priklausomybes, iškart galima atkreipti dėmesį, kad laipsnyje esanti konstanta yra beveik tokia pati, kaip **WC14** atveju.

Membranos formavimas iš lipidinių daugiasluoksnių liposomų, taip pat parodė, kad esant skirtingam kiekiui inkarinių junginių, atitinkamas kiekis yra ir lipidų. Atlikus analogiškus skaičiavimus kaip ir **WC14** atveju. Gaunama, kad **dHC18** užima ~103 Å². Dar kartą įrodantis, kad lipido analogas užima didesnę plotą už patį lipidą. Svabu pastebėti, kad inkarinio junginio plotas nesuspaustoj būsenoje yra 29% didesnis, nei suspausto kaip ir **WC14** atveju.

tBLM modelių struktūros ypatumai. Iš eksperimentinių duomenų buvo nustatyta: $A_{WC14(100\%)} = 45$ Å² ir $A_{WC14(30\%)} = 78$ Å². Ir kaip galima pastebėti, A_{WC14} (100% -> 30%) padidėja ~ 1,75 karto. Tas pats rezultatas gaunamas ir su **dHC18** junginiu, kur $A_{dHC18(100\%)} = 60$ Å² bei $A_{dHC18(40\%)} = 105$ Å² ir jų santykis ~ 1,75. Iš čia kyla klausimas: kodėl formuojant membraną abiejų junginių užimami paviršiaus plotai padidėja 1,75 karto?

Pirmiausia reikėtų atkreipti dėmesį į tai, kad abiejų inkarinių junginių užimamo ploto padidėjimas įvyksta tada, kai tarp jų įsiterpia lipidai. Taigi, turime apatinę membranos sluoksnį, kur tiek lipidą, tiek inkarinį junginį sudaro dvi dalys – hidrofilinė ir hidrofobinė. Pastaroji dalis abiejų molekulių yra labai panaši, nes sudaryta iš anglies grandinių. Bet visiškai kitaip yra su hidrofiline dalimi, kur lipide hidrofilinę galvą sudaro fosfocholinas, o inkariniame junginyje – etilenoksidinė grandinė. Taigi, numanoma priežastis (dėl ko padidėja inkarinio junginio plotas įterpus lipidą) gali būti ta, kad turi būti išlaikytas tam tikras arba didesnis atstumas B tarp etilenoksidinių grandinių, kad tarp jų galėtų įsiterpti lipido galva (24 pav.), nes abi grupės nėra pakankamai hidrofilinės, kad galėtų viena su kita sąveikauti.

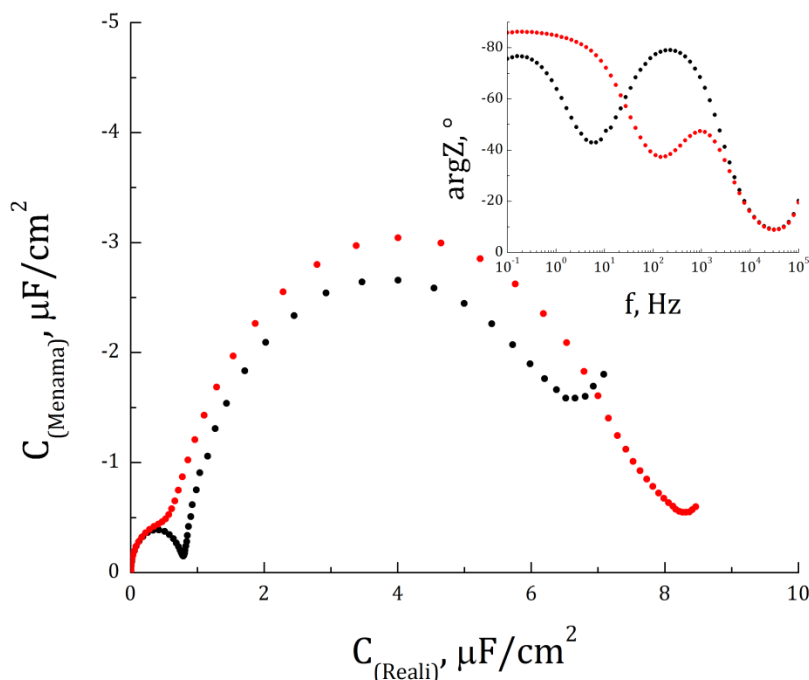


24 pav. Lipido įtaka inkarinio junginio struktūrai.

2.6 Mišraus SAM struktūros įtaka lipidinei membranai

Ruošiant tBLM taip pat neišvengiama ir tam tikrų veiksmų, kurie blogina elektrines membranos savybes. Tam tikrais atvejais pasitaikanti situacija, kai C_{iBLM} sumažėjimas stebimas tik aukštų dažnių diapazone, kaip ir fazės minimumo

mažesnis poslinkis link žemesnių dažnių srities (25 pav.), kas rodo, kad membranoje yra daugiau defektų.

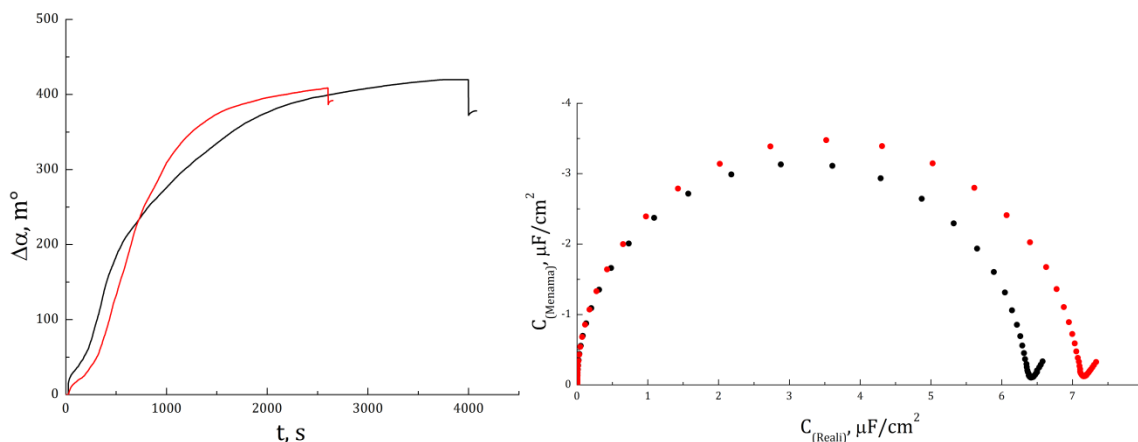


25 pav. EIS Cole – Cole ir fazės diagramos. Pakabinamos membranos talpos ant WC14 50% savitvarkio monosluoksnio: **izoliuojanti membrana**; „defektuota“ **membrana**.

Bet kaip bebūtų keista, membranos „defektiškumas“ visiškai nematomas SPR sensogramose (26 A pav.). Abiem atvejais SPR kampo pokytis po lipidinės membranos formavimo yra tiek pat – 390 m° . Tai leidžia įtarti, kad tai nėra susiję su lipidais ir tai turėtų labiau priklausyti nuo mišraus savitvarkio monosluoksnio.

Požymis, kad membranos modelis nebus visiškai izoliuojantis, tai savitvarkio monosluoksnio talpos padidėjimas (26 B pav.) nuo $6,5\ \mu\text{F}/\text{cm}^2$ iki $7,3\ \mu\text{F}/\text{cm}^2$ arba daugiau. Tai gali būti susijęs tik dviem atvejais: arba inkarinio junginio WC14 degradavimas, arba tam tikrų specifinių struktūrų susidarymas paviršiuje. Pirmą atvejį patvirtinti ar paneigti buvo atliktas eksperimentas: celė su WC14 (50%) paviršiumi užpildoma vandeniu ir 12 valandų stebimas SPR kampo kitimas. Ir šis bandymas neparodė jokių pakitimų (SPR kampas nei padidėjo, nei

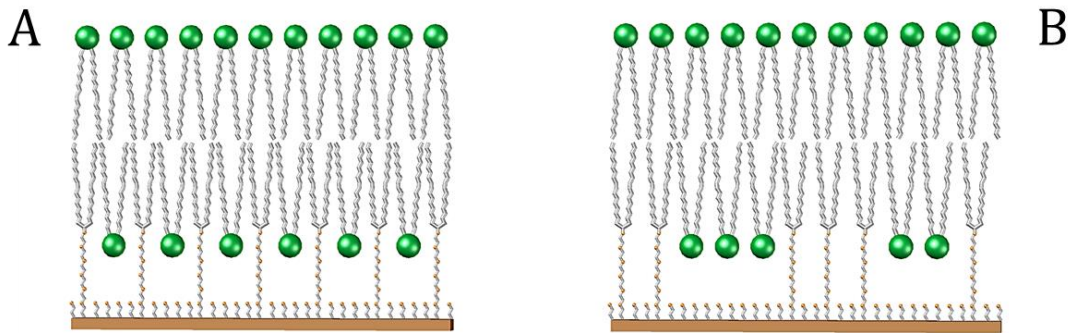
nesumažėjo). Tad, Bioelektrochemijos ir Biospektroskopijos skyriuje (VU, Biochemijos Institutas) buvo išvystytas antras variantas: WC14 molekulės dėl tam tikrų veiksmų paviršiuje sudaro tam tikrus klasterius ⁸⁹.



26 pav.: A – SPR sensograma. Lipidinės membranos formavimas ant WC14 50% savitvarkio monosluoksniu: **izoliuojanti membrana**; „defektuota“ **membrana**. B – EIS Cole-Cole diagrama. WC14 50% savitvarkio monosluoksniu talpos: **tvarkingas**; „defektuotas“.

Iš ankstesnių matavimų ^{61b} yra žinoma, kad mišraus savitvarkio monosluoksniu talpa priklauso nuo inkarinių junginių kiekio paviršiuje (kuo mažiau inkarinio junginio, tuo didesnė talpa), kurie paviršiuje išsidėstę tolygiai. Klasterių susidarymo atveju, WC14 molekulės išsidėsčiusios tam tikromis salelėmis, kurias gali sudaryti 2 ar daugiau viena šalia kitos esančios molekulės. Ir tokiu atveju, vienas klasteris pradeda elgtis kaip vienas inkarinis junginys. Kadangi klasterių kiekis visada bus mažesnis už inkarinių junginių kiekį, tai kartu bus ir didesnė mišraus savitvarkio monosluoksniu talpa. Ir tokiu atveju vietoj WC14 (50%) teoriškai gaunama WC14(30%) talpa, kur paties tBLM defektiškumas yra didesnis. Ir pagal 6 pav. duomenis galima pastebėti, kad šio paviršiaus talpa (6,4 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$) jau tampa artima 30% WC14 savitvarkiam monosluoksniui (7,1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$), kuriame inkariniam junginiui tenka jau 58,8 Å² laisvo ploto. Toks sprendinys leidžia paaiškinti, kodėl nesikeičia lipidų kiekis paviršiuje – abiem atvejais bendras savitvarkio monosluoksniu užimamas plotas nekinta, keičiasi tik jų išsidėstymas paviršiuje. Tokio reiškinio pagrindimas būtų

toks, kad inkarinio junginio WC14 viršutinės dalis yra hidrofobinė, kuriai hidratuota aplinka yra labai nepalanki, tai C₁₄ grandinėms yra patogiau atsidurti šalia vienas kito, kad sumažinti pasipriešinimą vandens molekulėms. O toks judėjimas gali būti įmanomas dėl EO grandinės, kuri gali išsisukti ar keisti savo išsidėstymą vandenyje ir leisti suartėti C₁₄ grandinėms. Taip pat keičiasi ir pomembraninio sluoksnio varža, kuri įtakoja membranos izoliuotumą.



27 pav. A – izoliuojanti membrana, B – defektuota membrana

3. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

Šioje darbo dalyje, siekiant detaliai ištirti tBLM sudėtį, buvo nustatytas SPR metodo jautrumas inkariniams junginiams ir lipidams ($S_{tioliai} = 0,52 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$, $S_{lipidai} = 0,62 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$). Tai leido įvertinti tBLM sistemos tiolinės dalies sudėtį (inkarinio junginio ir skiediklio pasiskirstymą aukso paviršiuje) (2 lentelė), bei jo eksponentinę priklausomybę tiolių sudėties etanoliniame tirpale (19 pav.).

Taipogi buvo panaudotas/išvystytas naujas imituojančių membranų paruošimo metodas – daugiasluoksnės lipidinės liposomos, leidžiančios suformuoti lipidinius sluoksnius įvairiuose membranų modeliuose. Ypač tai aktualu tBLM, pademonstruojant, kaip lipidų kiekis prikabintoje lipidinėje membranoje priklauso nuo mišraus SAM sudėties.

Ištirta inkarinių junginių (**WC14** ir **dHC18**) kiekio priklausomybė aukso paviršiuje nuo jų santykio su **βME** tirpale. Taip pat nustatytas vienos inkaro molekulės užimamams paviršiaus plotas.

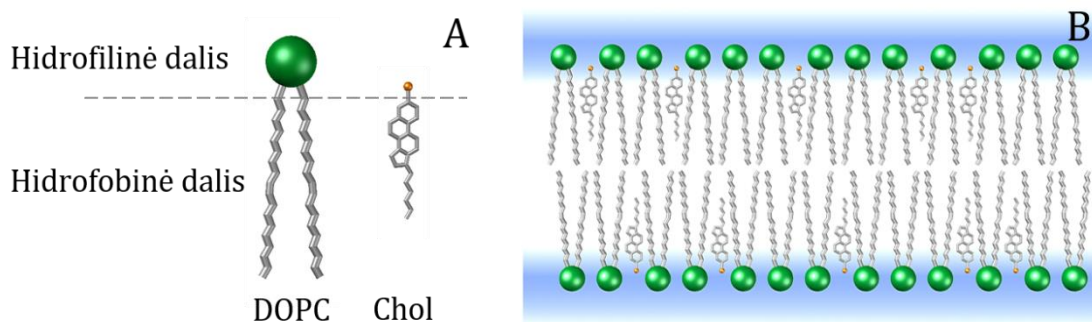
SPR pagalba buvo nustatytas metodo jautrumas tioliams bei lipidams.

III SKYRIUS

CHOLESTEROLIS IR JO ĮTAKA MEMBRANAI

1. LITERATŪRINĖ DALIS

Kaip anksčiau ir buvo minėta (*II skyrius, 1.1 dalis*), ląstelės membraną sudaro didelė įvairovė lipidų (fosfolipidai, steroliai etc.), atliekantys vieną ar kitą svarbų vaidmenį ląstelės gyvavimo periode. Ne išimtis yra ir cholesterolis, kurio randama iki 20 % nuo visų membranoje esančių lipidų ⁹⁰, o tam tikruose dariniuose – lipidiniuose plaustuose (angl. *lipid rafts*) net iki 50 % ^{91,92}.



28 pav.: A – DOPC ir Cholesterolio molekulių palyginimas. B – cholesterolio turinti membrana.

Cholesterolis, kaip ir kiti lipidai, yra amfifilinė molekulė, turinti tiek hidrofilinę, tiek hidrofobinę dalis (28 pav. A). Bet pačios molekulės struktūra ir sudėtis visiškai nepanaši į fosfolipidus: vietoj įprastinių hidrofobinių uodegų (linijinių angliavandenilių grandinių) cholesterolis turi tarpusavyje susijungusius 4 angliavandenilių žiedus, o hidrofilinę dalį sudaro tik hidroksilo grupė (-OH) (28 pav. A). Dėl šios struktūros cholesterolis yra „kieta“ molekulė, t.y. labai mažai arba visiškai nekeičiantis formos junginys, kas neleidžia sudaryti specifinių

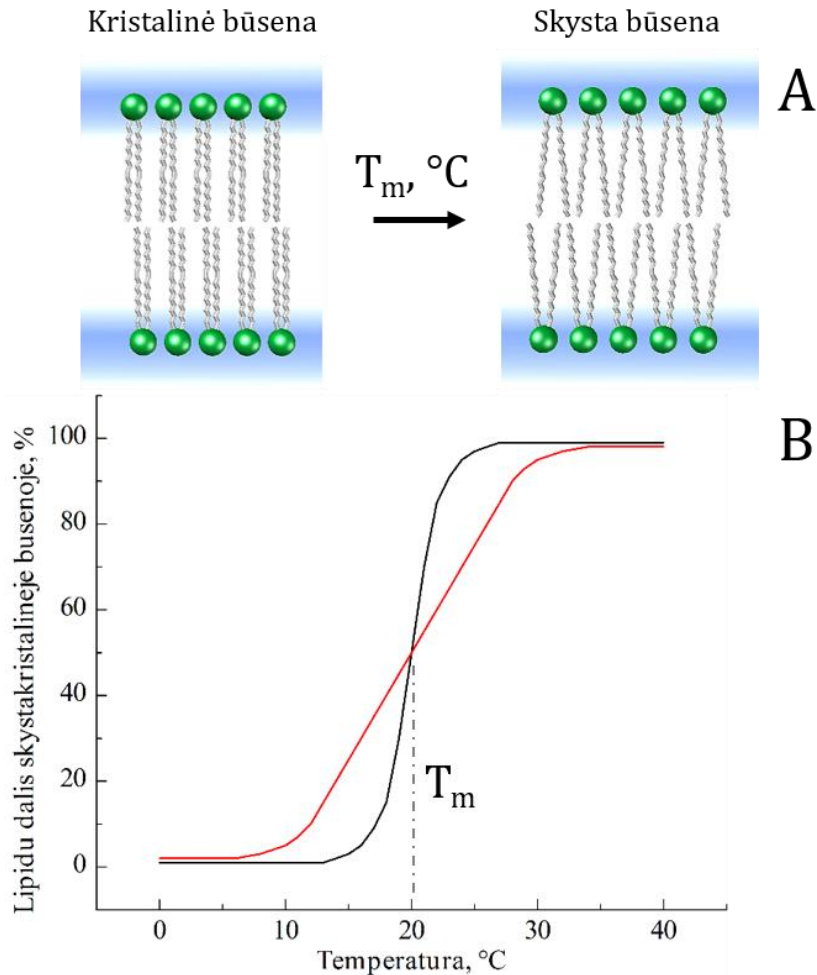
ir apibrėžtų darinių ar sistemų, tame tarpe ir ląstelės membranos karkaso ⁹³. Bet nepaisant to, cholesterolis atlieka svarbų vaidmenį membranoje.

Bet prieš aprašant cholesterolio įtaką membranai, derėtų trumpam grįžti prie fosfolipidų.

Yra žinoma, kad lipidinės membranos gali egzistuoti keliose būsenose (formose, fazėse): skystoje (angl. *liquid - disordered*), kristalinėje (angl. *gel*) ir skystakristalinėje (angl. *liquid - ordered*) būsenose ⁹⁴. Tačiau, tiek skysta, tiek kristalinė būsenos pačiai ląstelei yra pražūtingos. Pirmu atveju per skystą membraną praeitų daug nereikalingų mažos molekulinės masės medžiagų, beigi pačiai ląstelei sunku būtų išlaikyti tam tikrą formą ⁹⁵. Tai siejama su tuom, kad pačioje membranoje lipidai yra išsidėstę netvarkiai ir silpnai sąveikauja tarpusavyje, kas leidžia netrukdomai judėti molekulėms visoje membranoje (29 pav. A). Kristalinėje būsenoje membranoje esantys lipidai yra išsidėstę tankiausiai įmanomu būdu, kas leidžia susidaryti stipriems Van der Valso ryšiams tarp hidrofobinių uodegų (29 pav. A). Tai labai sumažina pačių lipidų judėjimą (lateralinis ar flip – flop) membranoje. Šis judėjimas ypatingai svarbus laidumui kontroliuoti bei veikia kaip integralių membranos baltymų tirpiklis ^{95a}. Ideali membranos būseną – skystakristalinę (tarpinis variantas tarp skystos ir kristalinės), kurioje lipidinis dvisluoksnis nėra kietas, bet gali išlaikyti savo formą, ir nėra per skystas, bet jau geba atrankiai praleisti reikalingas medžiagas.

Membranos būseną pagrindė nulemia fazinio virsmo temperatūra (T_M). Šis dydis kiekvienam lipidui yra skirtingas ir priklauso nuo lipidų sudarančių „uodegų“ sudėties. Pavyzdžiui: **DOPC** molekulė kiekvienoj „uodegos“ grandinėje turi po vieną dvigubą jungtį ir šio lipido $T_M = -17\text{ °C}$ ⁹⁶, tačiau DSPC lipido $T_M = 55\text{ °C}$ ⁹⁷, nors nuo **DOPC** skiriasi tik tuom, kad jau nebeturi dvigubų jungčių. T_M dydis apsprendžia membranos būseną: jei aplinkos temperatūra bus aukštesnė nei T_M , tai membrana suskystės, o jei bus žemiau T_M , tai lipidai egzistuos kristalinėje būsenoje ⁹⁸. Ir yra tik labai siauras temperatūrinis intervalas, kurioje membrana bus skystakristalinėje formoje (29 pav. B, juoda kreivė). Taigi, cholesterolio viena iš funkcijų – praplėsti temperatūrinį intervalą

reikalingą skystakristalinei būsenai ⁹⁹. Šis junginys įsiterpdamas tarp lipidų mažina pačios membranos takumą, kas leidžia jai išlaikyti tam tikrą formą bei kartu mažinti ir pralaidumą mažoms molekulėms ¹⁰⁰. Bet kartu neleidžia ir lipidams suartėti vienas su kitu, kad susiformuotų kristalinė kieta būseną (29 pav. B, raudona kreivė).

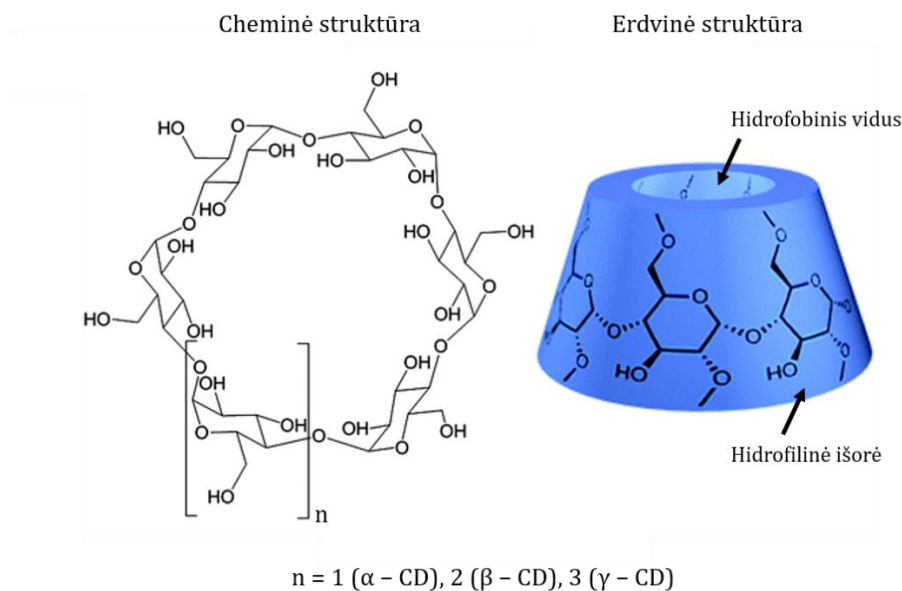


29 pav. A – fosfolipidų išsidėstymas kristalinėje ir skystoje būsenose. B – reprezentacinės kreivės, kurios rodo, kaip priklauso lipidų skystakristalinėje būsenoje kiekis nuo temperatūros: juoda kreivė – lipidinė membrana be cholesterolio, raudona kreivė – lipidinė membrana su cholesteroliu. 0% reiškia, kad visi fosfolipidai yra kristalinėje būsenoje; 100% – skystoje būsenoje.

Membranos būseną ne tik įtakoja laidumą įvairioms medžiagoms, bet kartu yra atsakinga ir už membranos baltymų tirpumą ¹⁰¹, kurie veikia kaip receptoriai, fermentai, kanalai ir t.t. Bet kaip yra žinoma, ne visi baltymai yra

naudingi organizmui. Dalis baltymų veikia kaip toksinai, kurių viena grupė veikia tik tada, kai membranoje yra cholesterolio ¹⁰² (apie tai bus plačiau kalbama *IV skyriuje*).

Taigi, kaip galima matyti, aktualu yra ne tik pačią membraną paruošti, bet paruošti ir cholesterolio turinčią membraną. Tokią membraną suformuoti galima dviem būdais. Vienas jų, taikant visas **tBLM** lipidinių sluoksnių formavimo metodikas (**SUV**, **MLV** ir RSE), kai lipidai yra kartu sumaišomi su cholesteroliu ir ištirpinami reikalingame tirpiklyje. Bet viena pagrindinių problemų – nei vienas iš šių metodų neleidžia sukurti membranos su dideliu ar labai dideliu kiekiu cholesterolio: **SUV** liposomos, turinčios daugiau nei 20% cholesterolio, neformuoja lipidinių sluoksnių ^{82a}; RSE metodas netinkamas dėl riboto cholesterolio tirpumo etanolyje ar metanolyje ¹⁰³; naujai naudojamas membranų paruošimo metodas (**MLV**) taip pat neleidžia sukurti cholesteroliu turtingos membranos (tai bus parodyta darbo rezultatų dalyje).



30 pav. Ciklodekstrino cheminė ir erdvinė struktūros ¹⁰⁴.

Antras būdas, siekiant lipidinę membraną praturtinti cholesteroliu, tai metil – β – ciklodekstrino ir cholesterolio komplekso panaudojimas. Ciklodekstrinas (CD) – oligosacharidas, turintis šešias (α -CD), septynias (β -CD)

ar aštuonias (γ -CD) gliukozės liekanas, sujungtas į žiedą 1,4-gliukozidinėmis jungtimis (30 pav. cheminė struktūra) ¹⁰⁵. Šio junginio pagrindinė ypatybė – molekulės vidinė ertmė yra hidrofobinė, o išorė – hidrofilinė (30 pav.). Tokios struktūros dėka įmanoma vandeninėje terpėje pernešti vandenyje netirpias molekules, kurios prisijungia prie CD vidinėje ertmėje, o išorės hidrofiliškumas suteikia gerą tirpumą vandeniniuose tirpaluose ¹⁰⁶. Tai ypač plačiai taikoma cholesterolio pašalinimui iš membranos ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Ir šio darbo eksperimentuose buvo naudojamas metil – β – ciklodekstrinas, kad pašalinti cholesterolį iš membranos. Bet taip pat buvo taikomas ir atvirkštinis procesas, kai taikant specialią paruošimo metodiką (Tado Penkausko magistrinis darbas „Paviršiuje imobilizuotų membranų sudėtis, struktūros ir funkcijos modifikavimas vandens terpėje“), įmanoma ir įnešti cholesterolį į membraną, taip reguliuojant jo kiekį membranoje ^{110,111}.

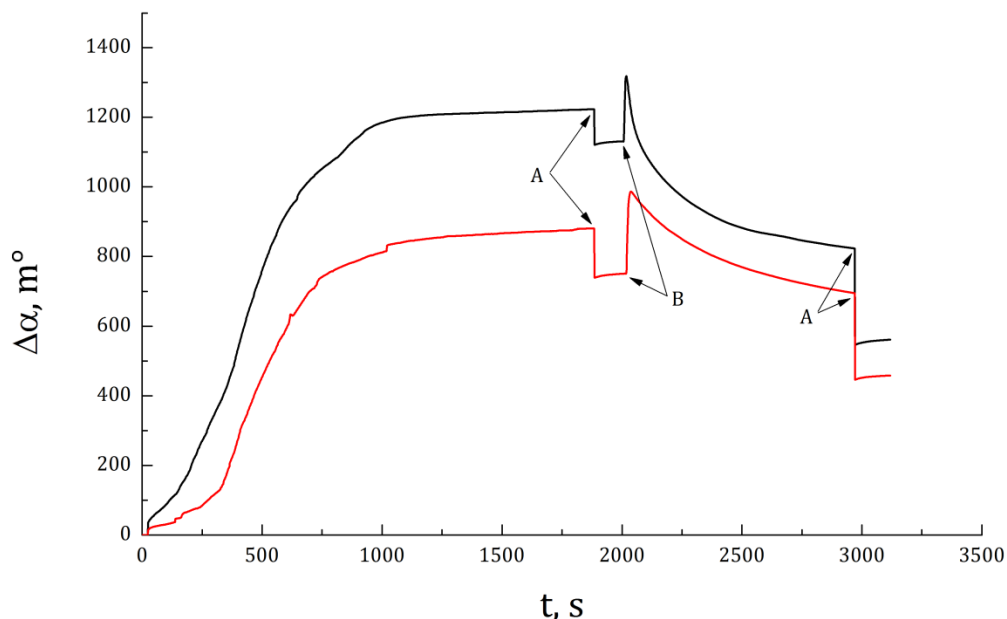
2. DARBO REZULTATAI

Šioje dalyje bus sprendžiami trys uždaviniai, iš kurių pirmas – nustatyti **SPR** jautrumą cholesteroliui. Jam išspręsti, membrana turinti cholesterolio buvo formuojama iš **DOPC** ir cholesterolio lipidų daugiasluoksnių liposomų metodu ant hidrofilinio (β ME) paviršiaus. Antras uždavinys – cholesterolio kiekio įvertinimas **tBLM** modelyje, keičiant **MLV** sudėtį (**DOPC** ir **Chol** santykį). Ir paskutinis uždavinys – nustatyti kaip keičiasi cholesterolio kiekis membranoje nuo **M β CD** – **Chol** komplekso koncentracijos.

Kaip buvo minėta anksčiau (*II skyrius, 2.3 dalis*), iš **SPR** matavimo duomenų neįmanoma tiesiogiai įvertinti sluoksnį, kuris sudarytas iš kelių komponentų (medžiagų). Šiai problemai išspręsti gali būti panaudoti keli būdai, kurių vienas – atlikti matematinius skaičiavimus (*II skyrius 2.3 dalis*), o kitas – specifinių junginių pagalba pašalinti iš lipidinio sluoksnio vieną iš komponentų. Pastarasis sprendimo būdas bus pritaikytas sekančiame šio darbo skyriuje, kur lipidinis monosluoksnis buvo formuojamas iš **DOPC** ir cholesterolio turinčių daugiasluoksnių liposomų. Ir tada iš lipidinio sluoksnio ciklodekstrino (**M β CD**) pagalba buvo pašalinamas cholesterolis, ko pasekoje atitinkamai sumažėjo ir **SPR** kampas.

Cholesterolio jautrumo nustatymas sBLM. 31 paveiksle pateiktos dvi **SPR** sensogramos, rodančios lipidinio dvisluoksnio susidarymą ant hidrofilinio (β ME) paviršiaus, naudojant **DOPC:Chol** (20%) (31 pav. raudona kreivė) ir **DOPC:Chol** (40%) (31 pav. juoda kreivė) daugiasluoksnes liposomas, kur atitinkamai $\Delta\alpha_{DOPC:Chol(20\%)} = 750 \text{ m}^\circ$ ir $\Delta\alpha_{DOPC:Chol(40\%)} = 1100 \text{ m}^\circ$ (31 pav. po pirmo praplovimo). Kol kas iš šių duomenų sunku spręsti, kodėl atsiranda toks skirtumas tarp abiejų membranų, nes yra žinoma, kad cholesterolis gali įtakoti ne tik membranos sudėtį, bet ir pačių lipidų struktūrą ¹¹². Sekančiame eksperimento žingsnyje vykdomas cholesterolio pašalinimas iš membranos **M β CD** pagalba (28 pav. taškas B). Po šios procedūros (28 pav. po antro praplovimo) abejose

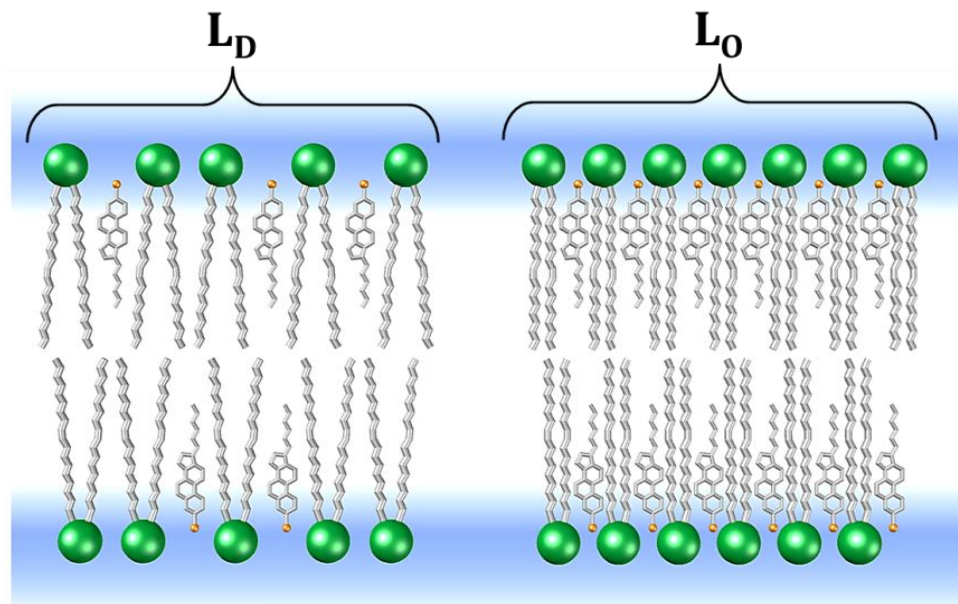
sistemose stebimas $\Delta\alpha$ sumažėjimas: $\Delta\alpha_{Chol} = -300 \text{ m}^\circ$ iš **DOPC:Chol** (20%) membranor ir $\Delta\alpha_{Chol} = -550 \text{ m}^\circ$ iš **DOPC:Chol** (40%) membranor.



31 pav.: SPR sensogramos. sBLM formavimas ant hidrofiliro paviršiaus iš MLV, kurių sudėtis: **DOPC:Chol 80%:20%**; **DOPC:Chol 60%:40%**. A – praplovimas*; B – MβCD injektavimas.

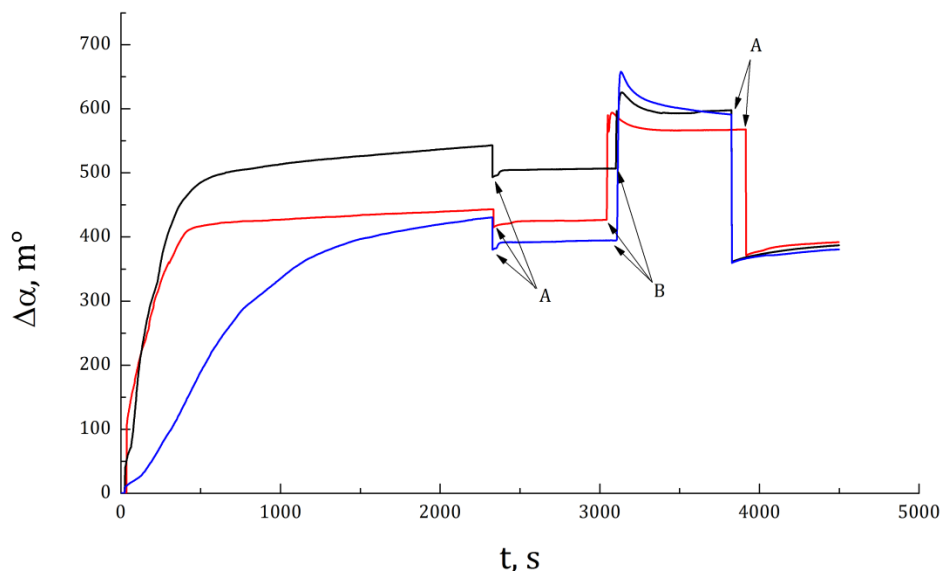
Taigi, rezultate atitinkamai lieka 450 m° ir 550 m° **DOPC**. Kad paaškinti skirtumą tarp šių dviejų membranų, reikėtų pažymėti, kad lipidai gali egzistuoti keliose būsenose, iš kurių derėtų išskirti dvi: skystą – netvarkią (L_D) ir skystą – tvarkią (L_O) ¹¹³ (32 pav.). L_D atveju, kai yra maža cholesterolio koncentracija, **Chol** molekulė įsiterpia tarp **DOPC** lipidų, beveik nekeisdama **DOPC** molekulės užimamo ploto ($72,5 \text{ \AA}^2$). L_O būsenoje (didelė cholesterolio koncentracija) **Chol**, norėdamas įsiterpti tarp **DOPC** lipidų, priverčia **DOPC** molekulę susimąžinti savo užimamą plotą ¹¹⁴.

* Visuose SPR sensogramose, kuriuose buvo naudojamas MβCD arba MβCD:Chol, stebimas staigus SPR kampo kitimas (neretai siekiantis kelis šimtus mililaispnių) po komplekso injektavimo (SPR kampo padidėjimas) ir jo nuplovimo (SPR kampo sumažėjimas). Tai įvyksta dėl nespecifinės MβCD sąveikos su lipidine membrana ^{109a}, bei labai didelio MβCD lūžio rodiklio ($n_{M\beta CD} = 1,591$).



32 pav. Lipidinės membranos, turinčios cholesterolį, fazinės būsenos: L_D – skysta netvarki, L_O – skysta tvarki.

Tegul šis modelis būna pritaikytas ir **sBLM** sistemai su cholesteroliu, kur L_D atitinka 20% cholesterolio turinčią membraną, o L_O – 40%. Pirmu atveju **DOPC** molekulės turėtų užimti $72,5 \text{ \AA}^2$. Tai žinant, kad šioje sistemoje **DOPC** sudaro 450 m° arba $2,1 \cdot 10^{14}$, tai paviršiaus užpildymas turėtų siekti $\sim 76\%$. Likęs plotas (24%) atitenka cholesteroliui. Kadangi $A_{Chol} = 40 \text{ \AA}^2$ ¹¹⁵, tai paviršiuje turėtų būti $1,19 \cdot 10^{14}$ Chol molekulių. Ir $S_{Chol} = 0,25 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$. L_O atveju nėra žinomas **DOPC** lipido užimamas plotas, bet jau yra žinomas S_{Chol} . Tai turint $\Delta\alpha_{Chol} = 550 \text{ m}^\circ$ L_O būsenoje, **Chol** turėtų užimti 43,5 % paviršiaus. Apskaičiavus **DOPC** molekulių skaičių ($\Delta\alpha_{DOPC} = 550 \text{ m}^\circ$ ir $S_{DOPC} = 0,25 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$) ir padalinus iš likusio ploto, gaunama, kad **DOPC** molekulės plotas siekia tik $\sim 43 \text{ \AA}^2$. Tai rodo, kad cholesterolio didinimas įtakoja ne tik jo kiekio buvimą membranoje, bet ir membraną sudarančių komponentų struktūrą, ką patvirtina ir kompiuteriniai modeliavimo darbai ^{115a}.

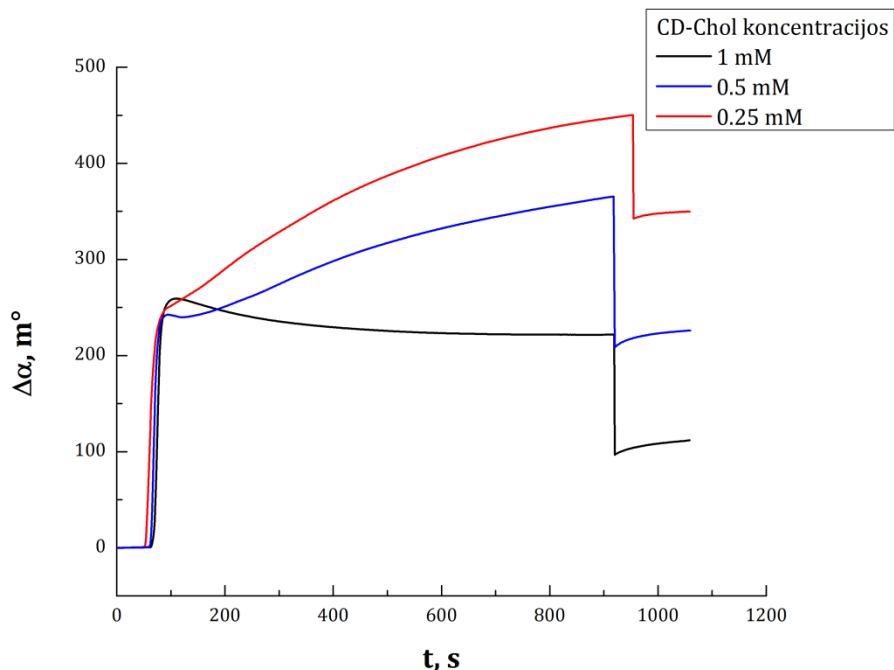


33 pav.: SPR sensogramos. tBLM formavimas ant dHC18(30%) paviršiaus iš daugiasluoksnių liposomų, kurių sudėtis: **DOPC:Chol 80%:20%**; **DOPC:Chol 60%:40%**; **DOPC**. A – praplovimas; B – MβCD injektavimas.

Cholesterolio kiekio įvertinimas tBLM. Visiškai kita situacija yra, kai bandoma formuoti cholesterolį turinčias membranas ant mišraus savitvarkio monosluoksniu (dHC18(30%)) naudojant **DOPC:Chol (40%)** (33 pav. juoda kreivė) ir **DOPC:Chol (20%)** (33 pav. raudona kreivė) daugiasluoksnes liposomas. Cholesterolio kiekis po MβCD panaudojimo (33 pav. po antro praplovimo) sumažėjo atitinkamai tik 100 m° ir 50 m°. Jei sBLM atveju, $\Delta\alpha_{Chol}/\Delta\alpha_{DOPC}$ abejuose membranose siekė 0,4, tai tBLM sistemoje šis santykis ~ 0,25 **DOPC:Chol (40%)** membranoje. Kitas svarbus pastebėjimas, **DOPC** kiekis abejuose membranose po cholesterolio pašalinimo išlieka toks pat ($\Delta\alpha_{DOPC} = 380$ m°). Tai leidžia manyti, kad tBLM sistemose, nepriklausomai nuo cholesterolio kiekio, dominuoja L_O būseną, kuri susidaro ne tik dėl **Chol**, bet ir dėl mišraus savitvarkio monosluoksniu sukurtu hidrofobinio paviršiaus ^{60a}, kur **DOPC** dalyvauja kaip dominuojantis struktūrinis elementas.

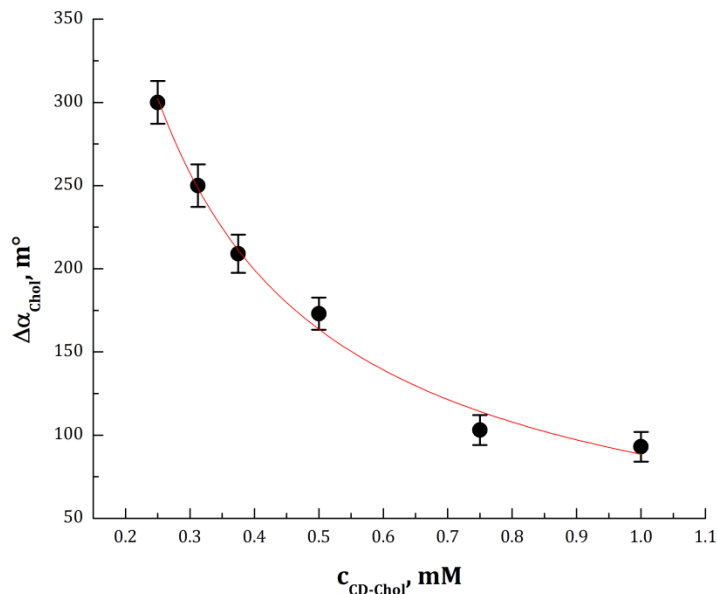
Cholesterolio kiekio membranoje priklausomybė nuo MβCD:Chol koncentracijos. Siekiant išvystyti tBLM kaip biojutiklius, kurie bus naudojami nuo cholesterolio priklausomų toksinų tyrimuose, reikalingas metodas,

leidžiantis į membraną įnešti daugiau cholesterolio nei naudojant **MLV** metodą ($\Delta\alpha_{Chol} > 100 \text{ m}^\circ$). Taigi, šiam tikslui toliau bus pasitelktas anksčiau aprašytas Tado Penkausko išstobulintas **M β CD:Chol** kompleksas, siekiant nustatyti įterpiamo **Chol** kiekio į membraną priklausomybę nuo **M β CD:Chol** komplekso koncentracijos.



34 pav. SPR sensogramos. Įterpiamo cholesterolio kiekio į membraną priklausomybė nuo **M β CD – Chol** koncentracijos.

Šiame darbo etape **M β CD – Chol** vandeninis tirpalas buvo injektuojamas į **tBLM** sistemą, sudarytą iš **dHC18(30%)** ir **DOPC**. Iš 34 paveiksle pateiktų duomenų, galima pastebėti, kad po **M β CD – Chol** panaudojimo visais atvejais registruojamas bendras **SPR** kampo padidėjimas, signalizuojantis apie cholesterolio įnešimą į membraną. Tačiau galima pastebėti, kad cholesterolio kiekis atvirkščiai proporcingas naudojamai komplekso koncentracijai: mažinant komplekso koncentraciją, į membraną įterpiama daugiau cholesterolio (35 pav.).

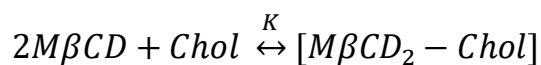


35 pav. Membranoje esančio cholesterolio priklausomybė nuo CD – Chol komplekso koncentracijos. Kiekvienam taške atlikta ne mažiau nei po 7 matavimus.

Ir ši priklausomybė gali būti aprašoma sekančia lygtimi:

$$\Delta\alpha_{Chol} = 88,5 \cdot c_{M\beta CD-Chol}^{-0,88} \quad (21)$$

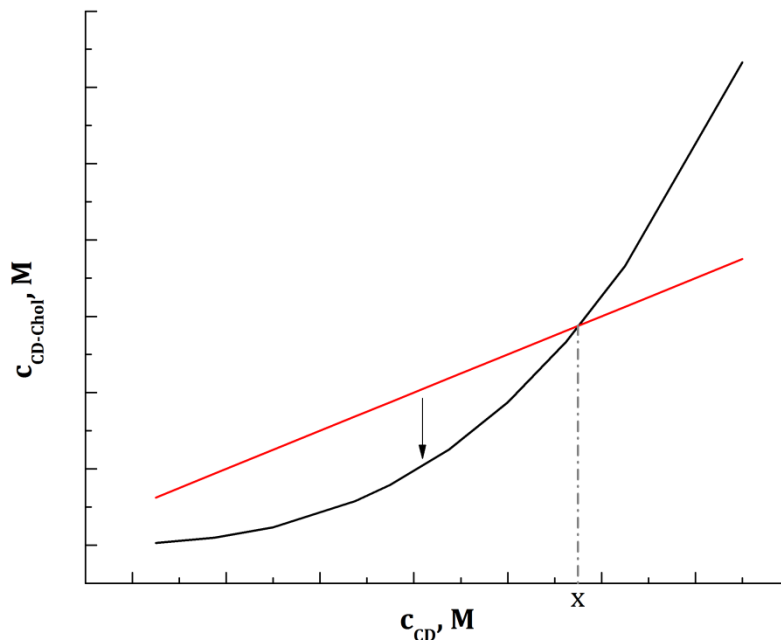
kur $\Delta\alpha_{Chol}$ – SPR kampo pokytis įnešus į membraną cholesterolį, o $c_{CD-Chol}$ – komplekso koncentracija celėje. Kodėl didinant celėje $M\beta CD - Chol$ komplekso koncentraciją, gaunamas mažesnis cholesterolio kiekis membranoje? Pradžiai reikėtų atkreipti dėmesį į tai, kad tuo pačiu junginiu (ciklodekstrinu) galima ir ištraukti, ir įterpti cholesterolį į membraną. Taigi, turi būti varomoji jėga, kuri nulemtų, į kurią pusę (ištraukimas ar įterpimas) vyks procesas. Kadangi tarp ciklodekstrino ir cholesterolio susidaro silpnas (hidrofobinis) ryšys ¹¹⁶, tai kartu turi egzistuoti ir tam tikra pusiausvyra tarp pradinių medžiagų ir paties komplekso ¹¹⁷:



O pati pusiausvyra gali būti aprašoma lygtimi ¹¹⁸:

$$K = \frac{[M\beta CD_2 - Chol]}{[M\beta CD]^2 [Chol]} \quad (22)$$

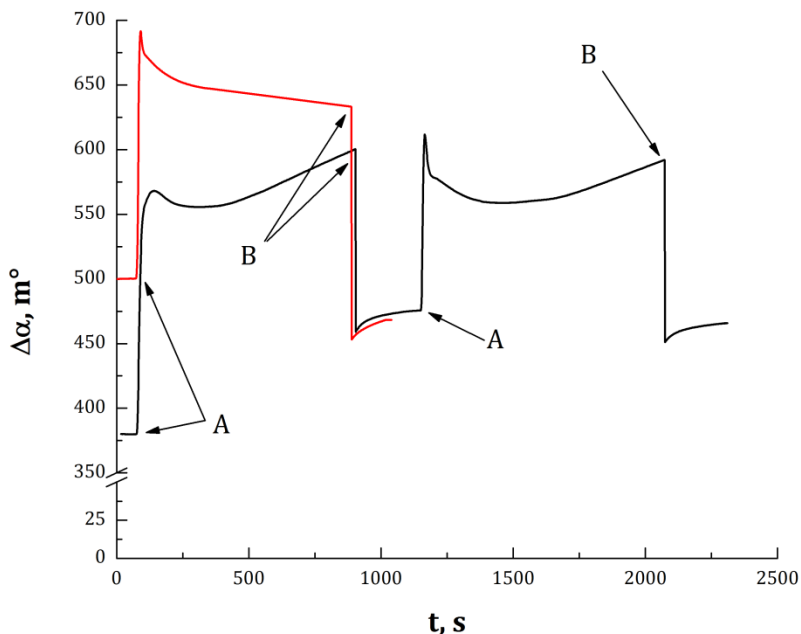
kur K – pusiausvyros konstanta. Tokia lygties išraiška rodo, kad egzistuoja tam tikra netiesinė priklausomybė tarp ciklodekstrino ir $M\beta CD - Chol$ komplekso (pav. 36 juoda kreivė) t.y. kiek komplekso gali susidaryti, keičiant $M\beta CD$ koncentraciją ^{117a}.



36 pav. Reprezentacinė $CD - Chol$ komplekso kiekio tirpale priklausomybė nuo CD koncentracijos (juoda kreivė). Raudona kreivė – teorinė komplekso priklausomybė nuo CD , kai visas tirpalas yra tiesiog skiedžiamas.

Taigi, iš šios kreivės galima pamatyti, kad esant aukštai $M\beta CD$ koncentracijai, susidaro santykinai $(M\beta CD - Chol / M\beta CD)$ didesnė komplekso koncentracija, nei esant žemai $M\beta CD$ koncentracijai. Kaip tai susiję su cholesterolio įterpimu į membraną? Šiame darbe $M\beta CD - Chol$ komplekso kiekis reguliuojamas visą tirpalą praskiedžiant, t.y. bendra visų medžiagų koncentracija mažėja, bet teorinis santykis $M\beta CD - Chol / Chol$ išlieka tas pats (36 pav. raudona kreivė). Ir jei bus sugretintos abi kreivės (36 pav. juoda ir raudona kreivės), tai galima pamatyti, kad iki $c_{M\beta CD} > x$, komplekso tirpalas gali būti skiedžiamas ir pats $M\beta CD - Chol$

kompleksas išliks stabilus. Bet kai jau yra $c_{M\beta CD} < x$, tai praskiestame tirpale dalis komplekso suyra (36 pav. rodyklė), nes nebetenkina 22 lygties, ir cholesterolis išeina į tirpalą, o šiuo atveju į membraną.



37 pav. SPR sensogramos. Juoda kreivė – į DOPC membraną cholesterolis įnešamas du kartus naudojant 1 mM M β CD – Chol kompleksą. Raudona kreivė – cholesterolis „įnešamas“ į membraną (DOPC–Chol 60%–40%) naudojant M β CD – Chol kompleksą (komplekso koncentracija 1 mM).

Kad tarp membranoje esančio cholesterolio ir tirpale ištirpusio ciklodekstrino egzistuoja tam tikra pusiausvyra, patvirtina ir kitas eksperimentas: į tą pačią membraną bandoma du kartus įnešti cholesterolį naudojant tą pačią M β CD – Chol kompleksą koncentraciją (37 pav. juoda kreivė). Jei per pirmą komplekso panaudojimą įnešamas tam tikras kiekis Chol, naudojant antrą kartą tą pačią komplekso koncentraciją, cholesterolio membranoje daugiau neatsiranda. Jei antram cholesterolio įnešimui naudojama didesnė komplekso koncentracija, tai gaunasi atvirkštinis procesas – cholesterolio pašalinimas iš membranos iki tam tikro lygio. Tai patvirtina eksperimentas, kai į membraną, kuri buvo suformuota iš MLV lipomų turinčių 60% DOPC ir 40% cholesterolio, injektuojamas kompleksas ir stebimas SPR kampo sumažėjimas, rodantis dalies cholesterolio pašalinimą iš membranos (37 pav. raudona kreivė).

3. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

tBLM modelių, turinčių cholesterolį, tyrimas leido atsakyti tik į dalį klausimų. Viena pagrindinių problemų: kodėl cholesterolio kiekis yra toks žemas tBLM modeliuose lyginant su liposomomis? Gal tai tiesiog gamtos sutvarkyta, kad normaliomis sąlygomis ląstelės membranose egzistuoja tik toks kiekis cholesterolio (20%), ką rodo tyrimai. O jo kiekio padidėjimas iššaukia šalutinį efektą. Bet nepaisant to, galima padaryti keletą išvadų:

- 1) Atrastas būdas, leidžiantis nustatyti ir apskaičiuoti cholesterolio kiekį membranoje.
- 2) Įvaldytas cholesterolio reguliavimo membranoje įrankis – ciklodeskrino ir cholesterolio kompleksas.

IV SKYRIUS

tBLM TAIKYMAS TOKSINŲ TYRIMUOSE

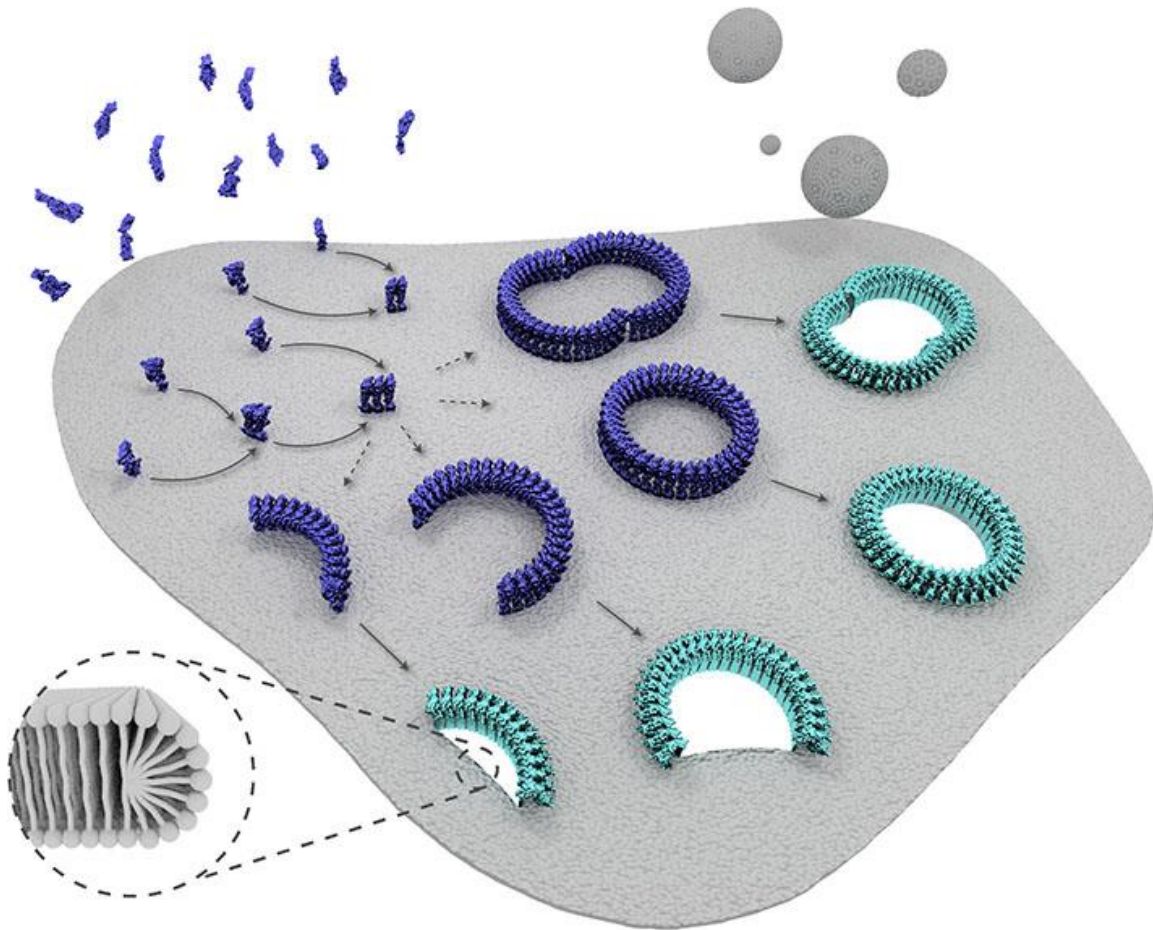
1. LITERATŪRINĖ DALIS

1.1 Poras formuojantys toksinai

Viena iš membranų modelių panaudojimo sričių – sąveikos su įvairiais toksiniais tyrimai. Toksinai – nuodingos medžiagos (peptidai, baltymai ar mažos molekulinės masės molekulės), kurias gamina ir išskiria tam tikros bakterijos ir parazitai, galinčios sukelti patologinius pokyčius gyvuose organizmuose, kartais pasibaigiančius ir mirtimi. Bet šie pažeidimai ar netgi ląstelės žūtis gali įvykti tik tada, kai toksinas pasiekia ir ima sąveikauti su ląstelės membrana. Toksinų medžiagų veikimo mechanizmas gali būti dvejopas: vieni toksinai, prisikabindami prie membranos, sutrikdo signalų perdavimą ląstelei, taip iššaukdami nepageidautinus procesus (tam tikrų medžiagų gamybos padidinimas ar sumažinimas) ^{119,120}. Kiti toksinai pažeidžia pačią membraną: infekcijos metu toksino baltymai, kurie sekretuojami monomerų pavidalu ir gerai tirpsta vandenyje, difunduoja iki ląstelės membranos, prie jos prisikabina ir oligomerizuojasi, taip galiausiai suformuodami įvairaus dydžio poras ^{121,122}. Tokie baltymų toksinai vadinami poras formuojančiais toksiniais (PFT). Šie baltyminiai dariniai suardo ląstelės bajerą – membraną ir taip sutrikdo natūralią ląstelės homeostazę, sukeldami jos žūtį.

PFT gali būti klasifikuojami į dvi šeimas: RTX (angl. *repeats – in – toxin*) ir CDC (angl. *cholesterol – dependent cytolysins*). RTX – toksinas, kuris turi trumpas tandemiškai pasikartojančias 9 amino rūgščių sekas, tiesiogiai arba per įvairius receptorių jungiasi prie membranos, kurioje suformuoja porą ^{123,124,125}.

CDC šeimai priskiriami nuo cholesterolio priklausomi toksinai, kurie dažnu atveju identifikuojami gram – teigiamų bakterijų šeimose: pneumolizinas iš *Streptococcus pneumoniae*, vaginolizinas iš *Gardnerella vaginalis* etc. Šie toksinai išskirtinai veikia tik cholesterolį turinčiose membranose, kur geba formuoti ypatingai dideles poras (20 – 50 nm) (RTX šeimos baltymas, α – hemolizinas iš *Staphylococcus aureus*, formuoja tik kelių nm skersmens poras ^{126,127}), kurios dėl savo dydžio yra ypač pavojingos, nes pro membraną gali praeiti ne tik mažos molekulės ar jonai, bet ir įvairūs baltymai.

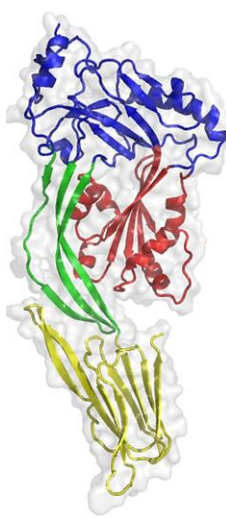


38 pav. Schematinis poras formuojančių toksinų monomerų prisijungimo prie membranos, susirinkimo į oligomeros ir porų suformavimo mechanizmas ¹²⁸.

Poros susidarymas vyksta keliais etapais (38 pav.). Iš pradžių, CDC monomeras vandeninėje terpėje difunduoja iki membranos ir prie jos prisijungia.

Tada prasideda oligomerizacija, kurios metu monomerai jungiasi vienas prie kito ir taip suformuoja preporą. Galutinėje stadijoje prepora insertuojasi į membraną, taip suformuodama porą ir sukeldama membranos pažaidą ¹²⁹. Bet šiuo metu vis dar aiškinamasi, kodėl vandenyje tirpūs monomeriniai baltymai tik membranoje susirenka į didelę kompleksinę porą. Taip pat vis dar nėra aišku, kaip cholesterolio praradimas blokuoja CDC prepūros virtimą į toksiškąją porą ¹³⁰.

1.2 CDC struktūra



39 pav. CDC Monomero struktūra

Struktūriškai visus CDC vienija keletas bendrų bruožų. Visų pirma, CDC baltymų pirminės sekos tarpusavyje yra labai panašios – tapatumas siekia nuo 40 % iki 80 % ¹³¹, o molekulinė masė svyruoja tarp 50 ir 70 kDa. Antra, visų jų monomerą galima išskaidyti į 4 atskirus domenų: D1 (39 pav. mėlyna), D2 (39 pav. žalia), D3 (39 pav. raudona) ir D4 (39 pav. geltona) ¹³². Pirmi trys domenai yra hidrofiliiniai, kurie nedalyvauja pirminėje baltymo sąveikoje su lipidine membrana. Už šią sąveiką yra atsakingas D4 domenas, kuriame kaip tik randama aminorūgščių pora (treoninas – leucinas), tiesiogiai dalyvaujanti sąveikoje su lipidais ¹³³. Prisijungus baltymui prie membranos prasideda oligomerizacijos

procesas: monomerai, difunduodami membranoje, jungiasi vienas prie kito ir sudaro preporą, kuri galiausiai insertuojasi į membraną, virsdama pora ¹³⁴.

1.3 Pneumolizinas ir vaginolizinas

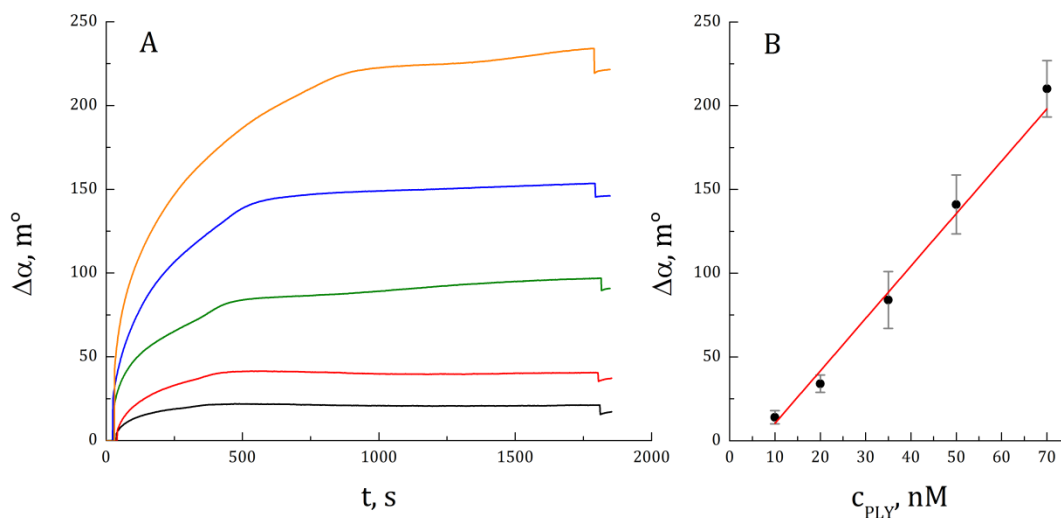
Streptococcus pneumoniae bakterijos – daugelio dideliu sergamumu ir mirtingumu pasižyminčių ligų, kaip pneumonija, otitas, meningitas, sukėlėjas. Šios bakterijos dažniausiai kaupiasi žmogaus nosiaryklėje, kur išskiria toksiną – pneumoliziną (PLY). Šis baltymas yra tipiškas CDC šeimos atstovas ir veikia išskirtinai tik cholesterolio turinčiose membranose ¹³⁵. Pneumolizino monomerą sudaro 471 aminorūgštys, kurių bendra masė – 53 kDa. Atlikta nemažai tyrimų ir nustatytas poros ir preporos susidarymo mechanizmas, bei kokio dydžio poros susiformuoja (40 nm skersmens ir 7 nm aukščio) ¹³⁶. Bet nepaisant šių rezultatų, iki šiol vis dar nežinomas cholesterolio vaidmuo šio toksino veikime. Ir ypač mažai atlikta eksperimentų ant dirbtinių fosfolipidinių membranų.

Bakterinė vaginozė – pasaulyje paplitusi vaginalinė infekcija, susijusi su natūraliai makštyje esančių bakterijų *Gardnerella vaginalis* pagausėjimu, kas padidina priešlaikinio gimdymo, persileidimo, priešlaikinio vaisiaus vandenių nutekėjimo, pogimdyminių ir pooperacinių infekcijų riziką ¹³⁷. Bakterijos išskiria, CDC šeimai priskiriamą, toksiną – vaginoliziną (VLY) ¹³⁸. VLY monomerą sudaro 516 aminorūgščių, kurių bendra masė – 57 kDa. Yra žinoma, kad jis specifiškai atpažįsta ir rišasi su žmogaus ląstelėje esančiu CD59 (gliukozilfosfotidilinozitolis) – inkariniu baltymu, bet jo aktyvumas taip pat priklauso ir nuo membranoje esančio cholesterolio ¹³⁹.

2. DARBO REZULTATAI

II ir *III* skyriuje aprašyti eksperimentai buvo atliekami, siekiant charakterizuoti vieną iš lipidinių membranų modelių – **tBLM**. Šis skyrius jau yra orientuotas į **tBLM** (biojutiklio) pritaikymą biocheminiams tyrimams, šiuo atveju, sąveikai su baltymiais toksinais, pneumolizinu ir vaginolizinu, tirti. Šis tyrimas buvo atliekamas lygiagrečiai taikant 2 metodus (**SPR** ir **EIS**), bandant išsiaiškinti kai kuriuos toksinų elgsenos aspektus: cholesterolio koncentracijos įtaka sąveikos su membrana pobūdžiui (tiesinė/netiesinė) ir mastui, bei įvertinti, kokia baltymo dalis sąveikaudama su membrana sudaro poras.

2.1 PLY adsorbcijos tyrimas



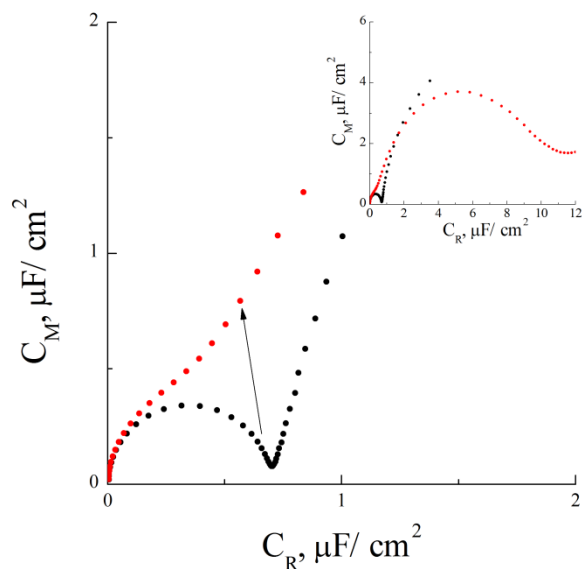
40 pav. SPR sensogramos (A paveikslas). PLY adsorbcijos priklausomybė ant tBLM (DOPC-Chol(40%)) nuo koncentracijos: **10 nM**; **20 nM**; **35 nM**; **50 nM**; **70 nM**.

Taigi, pradiniame etape pneumolizino tyrimams buvo pasirinktas **tBLM** modelis, kurį sudarė: **dHC18** (30%) ir **DOPC:Chol** (40%). Baltymo sąveikai su membrana tirti pasirinktas baltymo koncentracijos intervalas: 10 – 70 nM. Kaip ir galima buvo tikėtis, didėjant **PLY** koncentracijai tirpale, kartu didėja ir jo kiekis membranos paviršiuje. 40 B paveiksle pateikti duomenys rodo, kaip $\Delta\alpha_{PLY}$

priklauso nuo baltymo koncentracijos ir išvesta priklausomybė baltymo kiekio nuo jo koncentracijos, kuri gali būti aprašoma lygtimi:

$$\Delta\alpha_{PLY} = 3,7 c_{PLY} - 21, \quad (23)$$

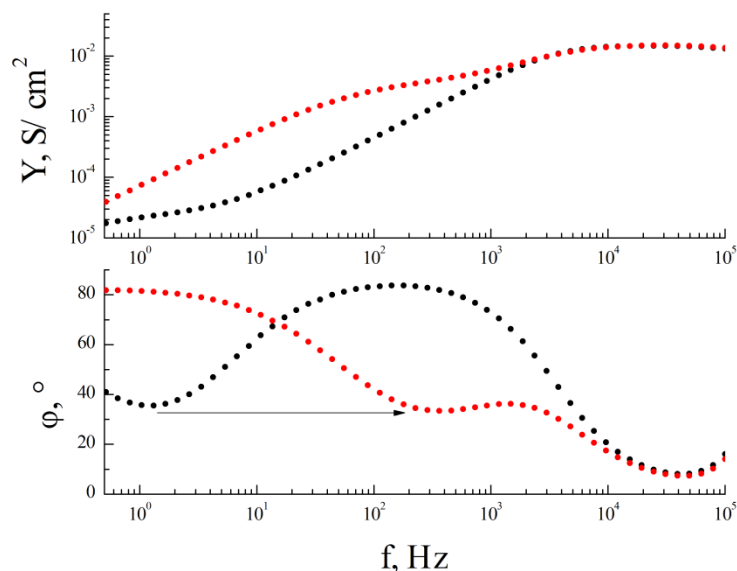
Ši priklausomybė iš esmės rodo, kad baltymas ne tik sąveikauja su cholesterolio turinčia lipidine sistema, bet kartu ši sąveika yra priklausoma nuo toksino koncentracijos. Bet **SPR** negali parodyti, kaip adsorbuotas baltymas paveikia pačią membraną, nes pneumolizinas – baltymas, kuris ne tik sąveikauja su **tBLM**, bet ir formuoja tam tikras darinius – poras. Šių darinių identifikavimui labiau tinkamas naudoti **EIS** tyrimo metodas.



41 pav. EIS Cole-cole diagramos. tBLM elektrinė talpa **prieš sąveiką** ir **po sąveikos su PLY**. Baltymo inkubacijos laikas celėje – 30 min, koncentracija – 10 nM.

Bendram supratimui, kaip membranos pažeida atsispindi **EIS** duomenyse, pakanka išnagrinėti vieną matavimą (41 pav.). Šiame matavime buvo naudota 10 nM **PLY**. Iš Cole – Cole diagramos galima pastebėti, kad talpos pusapskritimis, būdingas izoliuojančioms membranoms, po sąveikos su baltymu deformuojasi. Tai signalizuoja apie atsiradusią membranos pažeidą. Bet šis **EIS** duomenų atvaizdavimas Cole – Cole diagramoje rodo tik pačios membranos pažeidimo

faktą, bet sunku įvertinti pažaidos mastą. Tokiu atveju praktiškiau šį procesą stebėti laidumo (Y) ir jo fazės (φ) kitimo diagramoje, kurioje fazės minimumo taško poslinkis rodo pažaidos lygį (42 pav.).



42 pav. EIS Bode diagramos. *tBLM* fazė ir laidumas **prieš sąveiką** ir **po sąveikos su PLY**. Baltymo inkubacijos laikas celėje – 30 min; koncentracija – 10 nM.

Iš stebimo fazės minimumo poslinko galima skaitine verte įvertinti **tBLM** pažaidą. Beveik idealaus **tBLM** atveju fazės minimumas (φ_{min}) visada stebimas žemų dažnių diapazone ($f \leq 2$ Hz), šiuo atveju ties $\sim 1,5$ Hz dažniu. Tokio **tBLM** laidumas siekia tik $23 \mu\text{S}/\text{cm}^2$. Po sąveikos su baltymu φ_{min} pasislenka į didesnių dažnių pusę ir pasiekia ~ 220 Hz dažnį, o membranos laidumas padidėja iki $4370 \mu\text{S}/\text{cm}^2$. Tai įrodo, kad toksinas ne tik adsorbuojasi į **tBLM**, bet kartu formuoja ir poras, taip sukeldamas membranos pažaidą. Porų – defektų (N_{def}) skaičius iš φ_{min} poslinko dažnio skalėje gali būti įvertinamas šia lygtimi ^{34b}:

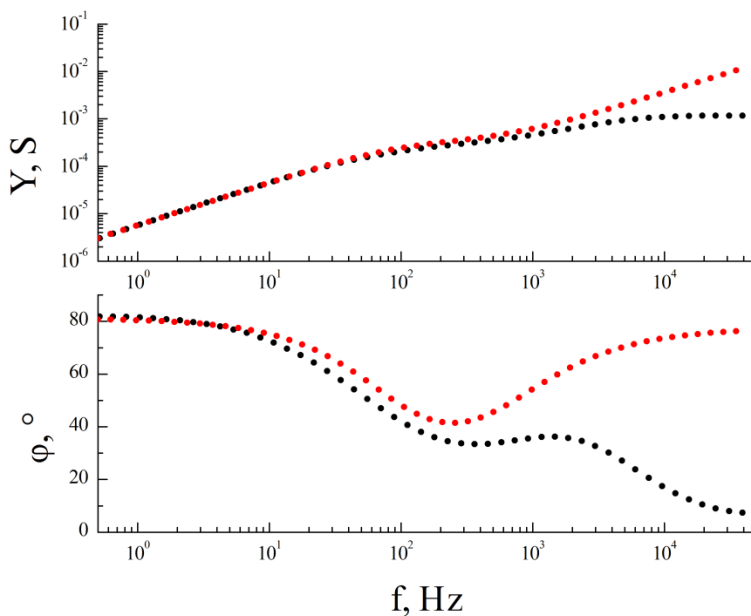
$$\lg(N_{def}) = 0,8644 \lg(f_{min}) - 1,142 , \quad (24)$$

Pritaikius šią lygtį apskaičiuojama, kad **tBLM** sistemoje susidaro $9,6 \cdot 10^8$ defektų – porų 1 cm^2 plote. **PLY** baltymas yra vienas labiausiai ištyrinėtų toksinų ir yra žinoma, kad vieną porą sudaro 44 monomerai ¹⁴⁰. Tad įmanoma iš **EIS** duomenų

kiekybiškai įvertinti baltymo kiekį membranoje (m_{EIS}) ir šiame matavime $m_{EIS} = 3,7 \text{ ng/cm}^2$. Šiame eksperimente **SPR** matavimas parodė, kad $\Delta\alpha_{PLY} = 5 \text{ m}^\circ$, o $S_{baltymai} = 0,82 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$ ^{4b}. Tai baltymo kiekis pagal **SPR** duomenis (m_{SPR}) bus $4,1 \text{ ng/cm}^2$. Toks abiejų metodų taikymas leidžia įvertinti, kokia adsorbuoto baltymo (pagal **SPR** matavimus) dalis (n_{PLY}) (toliau šiame darbe tai bus vadinama “efektyvioji baltymo dalis”) sudaro poras membranoje (pagal **EIS** matavimus):

$$n_{PLY} = \frac{m_{EIS}}{m_{SPR}} \times 100\% \quad (25)$$

Ir panaudojus šio eksperimento duomenis, gaunama, kad $n_{PLY} = 90 \%$. Tai rodo, kad beveik visas prie membranos prisikabinęs baltymas sudaro poras. Bet tolimesni skaičiavimai parodys, kad naudojant didesnes baltymo koncentracijas, n_{PLY} dydis nėra nekintantis ir priklauso nuo kelių faktorių.

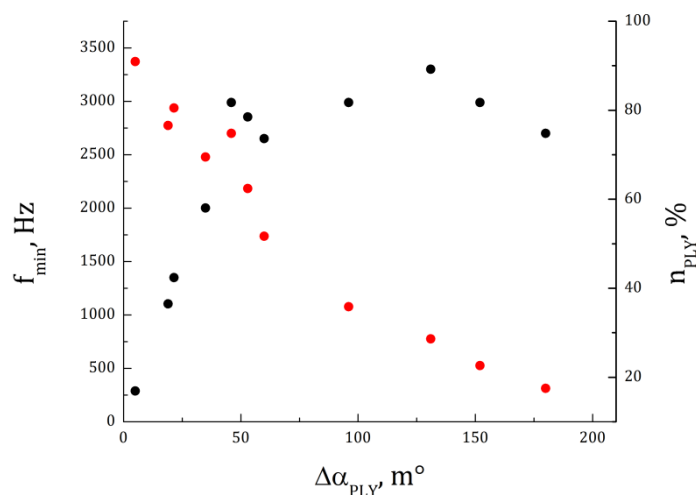


43 pav. EIS Bode diagramos. Admitanso ir fazės duomenys **prieš** ir **po** tirpalo varžos ir parazitinės talpos atėmimo.

Bet prieš atliekant šiuos skaičiavimus, buvo optimizuotas fazės minimumo suradimo taškas, nes iš 42 pav. (raudona kreivė) galima pastebėti, kad φ_{min} jau yra

ties ta dažnio riba, kurią peržengus būtų neįmanoma tiksliai identifikuoti fazės minimumo taško, žinant, kad šiame eksperimente buvo naudojama mažiausia PLY koncentracija. Sprendimas: iš EIS duomenų buvo atimta tirpalo varža ir parazatinė talpa, kas leidžia išskirti fazę su gerai išreikštu jos minimumu (43 pav. raudona kreivė).

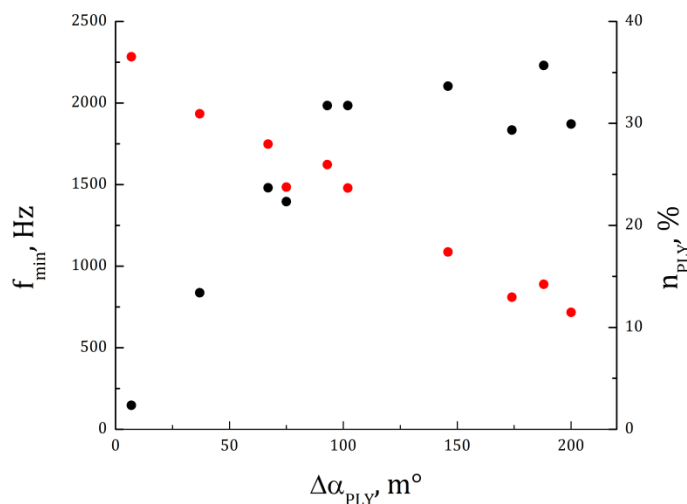
Taigi, taikant du tyrimo metodus (SPR ir EIS) bei anksčiau aprašytą duomenų įvertinimo metodą, buvo apskaičiuota ir nubrėžta priklausomybė tarp efektyviosios pneumolizino dalies membranoje ir adsorbuoto baltymo kiekio, bei kaip kartu keičiasi ir fazės minimumo padėtis dažnių srityje (44 pav.).



44 pav. Toksino f_{min} ir “efektyviosios” dalies (n_{PLY}) priklausomybė nuo bendro baltymo kiekio ($\Delta\alpha_{PLY}$). tBLM: dHC18(30%) – DOPC:Chol(40%)

Atidėjus n_{PLY} nuo $\Delta\alpha_{PLY}$ (44 pav., raudoni taškai), galima pastebėti, kad didėjant medžiagos kiekiui “efektyvaus” baltymo kiekis mažėja. Viena iš to priežasčių gali būti ta, kad nors pati baltymo adsorbcija (10 – 70 nM koncentracijų diapazone) nėra ribota (kuo didesnė baltymo koncentracija, tuo daugiau jo adsorbuojasi prie lipidinio paviršiaus), bet daugėjant defektų – porų skaičiui elektrocheminio impedanso metodu neįmanoma visų jų užregistruoti, t.y. pasiekama tam tikra riba. Tai patvirtina ir f_{min} kitimas nuo $\Delta\alpha_{PLY}$ (44 pav. juodi taškai), kur f_{min} kinta tik iki ~3000 Hz. Ši riba pasiekama, kai paviršiuje yra tik 50 m° baltymo, o n_{PLY}

siekia $\sim 70\%$. Toliau didinant baltymo koncentraciją, didėja tik m_{SPR} , o f_{min} tampa konstanta, tokiu atveju ir $m_{EIS} = \text{const}$. Todėl n_{PLY} mažėjimas vyksta tik dėl m_{SPR} didėjimo (pagal 25 lygtį).



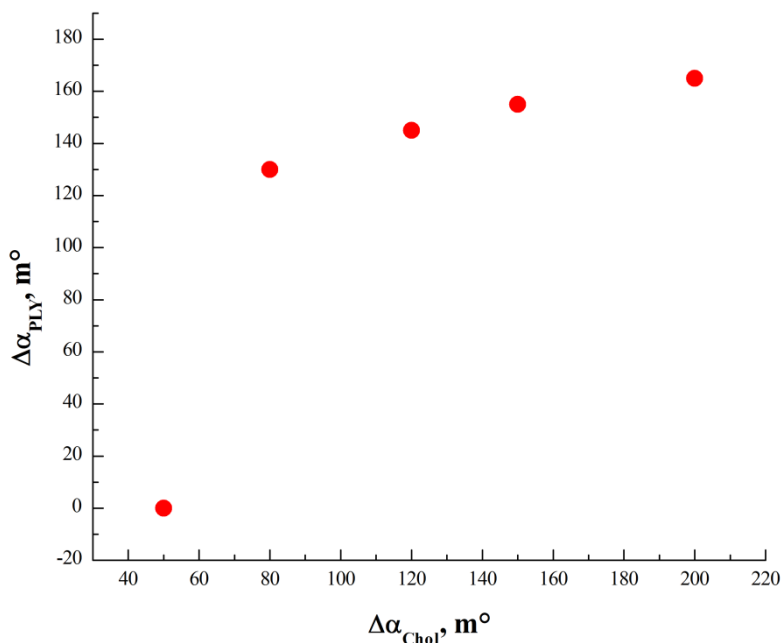
45 pav. Toksino f_{min} ir „efektyviosios“ dalies (n_{PLY}) priklausomybė nuo bendro baltymo kiekio ($\Delta\alpha_{PLY}$). tBLM: dHC18(40%) – DOPC:Chol(40%)

Priežastis, kodėl EIS metodu galima stebėti tik ribotą kiekį defektų, gali būti siejama su tBLM modelio struktūra. Viršutinį tBLM sluoksnį sudaro tik DOPC ir cholesterolis, prie kurio gali priklausomai nuo toksino koncentracijos adsorbuotis didelis kiekis baltymo. Apatinį tBLM sluoksnį sudaro ne tik DOPC ir cholesterolis, bet ir inkarinis junginys dHC18, kurių judrumas yra labai apribotas. Ir jei pora susidaro, kur yra daugiau inkarinio junginio, galimas mažesnis arba visiškai laidumo padidėjimo nebuvimas. Tai puikiai iliustruoja kita eksperimentų serija, kurioje visa tyrimo eiga buvo atliekama kaip ir prieš tai, tik tBLM modelyje buvo naudojamas ne dHC18(30%), o dHC18(40%) mišrus savitvarkis monosluoksnis (45 pav). Ir iš gautų duomenų galima pastebėti, kad fazės minimumo padėtis nebesikeičia, kai $f_{min} \geq 2000$ Hz (45 pav. juodi taškai). Tai tik patvirtina anksčiau išsakytą spėjimą, kad inkarinių junginių paviršinis

tankis įtakoja defektų detektavimo ribas. Kitas svarbus pastebėjimas: n_{PLY} yra dvigubai mažesnis (nuo 25% iki 40%, kai dažnis yra 0,5 – 2000 Hz diapazone) nei **dHC18(30%)** atveju (nuo 70% iki 100%, kai dažnis yra 0,5 – 3000 Hz diapazone). Šis skirtumas rodo, kad **SAM** įtakoja ne tik defektų detekcijos ribas, bet ir tai, kad **ne visi defektai yra registruojami žemų dažnių srityje** (kai kurios poros gali būti nepilnais įlindusios į membraną¹⁴¹) – kad pasiekti 3000 Hz ribą $tBLM_{dHC18(30\%)}$ modelyje pakanka tik $\Delta\alpha_{PLY} = 50$ m°, kai tuo tarpu $tBLM_{dHC18(40\%)}$ modelyje, 2000 Hz fazės minimumo padėčiai pasiekti sunaudojama jau 100 m° baltymo.

Taip pat reikia pažymėti, kad efektyvaus baltymo dalies skaičiavimams įtakos gali turėti ir pats baltymams. Pradžiai derėtų atkreipti dėmesį į tai, kad $tBLM_{dHC18(30\%)}$ sistemoje, esant mažiems baltymo kiekiams ($\Delta\alpha_{PLY} \leq 10$ m°) n_{PLY} siekia 100%, o $tBLM_{dHC18(40\%)}$ sistemoje $n_{PLY} \approx 40\%$. Jei laikytis sąlygos, kad n_{PLY} priklauso nuo inkarinio junginio kiekio, tai $tBLM_{dHC18(<30\%)}$ sistemoje teoriškai n_{PLY} turėtų būti daugiau nei 100%, kas yra neįmanoma. Bet visa tai galima susieti su tuom, kad šiuose skaičiavimuose buvo laikomasi prielaidos, kad baltymas membranoje sudaro pilną porą iš 44 monomerų. Tačiau yra duomenų, kad gali susidaryti ir nepilnos poros^{128a,142,143}. Tokiu atveju m_{SPR} gali būti pastovus dydis, bet keistis m_{EIS} , nes **EIS** fazės minimumo judėjimas labiau priklauso ne nuo poros dydžio, o nuo porų skaičiaus¹⁴⁴. Tarkim, kad membranoje yra 44 monomerai, jei bus viena pora – defektas, tai $n_{PLY} = 100\%$, kai dvi pusporės (po 22 monomerus) – defektai, tai $n_{PLY} = 200\%$ ir t.t. Taigi, galima daryti bendrą išvadą, kad interpretuojant **SPR** ir **EIS** metodais gaunamus membranos pažaidos duomenis, būtina atsižvelgti į: **1)** $tBLM$ sudėtį ir **2)** baltymo porų sukuriamų membranos defektų skaičių.

Siekiant išsiaiškinti sąryšį tarp adsorbuoto baltymo ir cholesterolio kiekio membranoje buvo atlikta eksperimentų serija (46 pav.). Šiame tyrimo etape buvo naudojamas **dHC18** (40%), o cholesterolio kiekis membranoje reguliuotas iš pradžių keičiant **MLV** sudėtį (**DOPC:Chol** 80%:20%; **DOPC:Chol** 70%:30% ir **DOPC:Chol** 60%:40%), o vėliau panaudojant **MβCD - Chol** kompleksą.



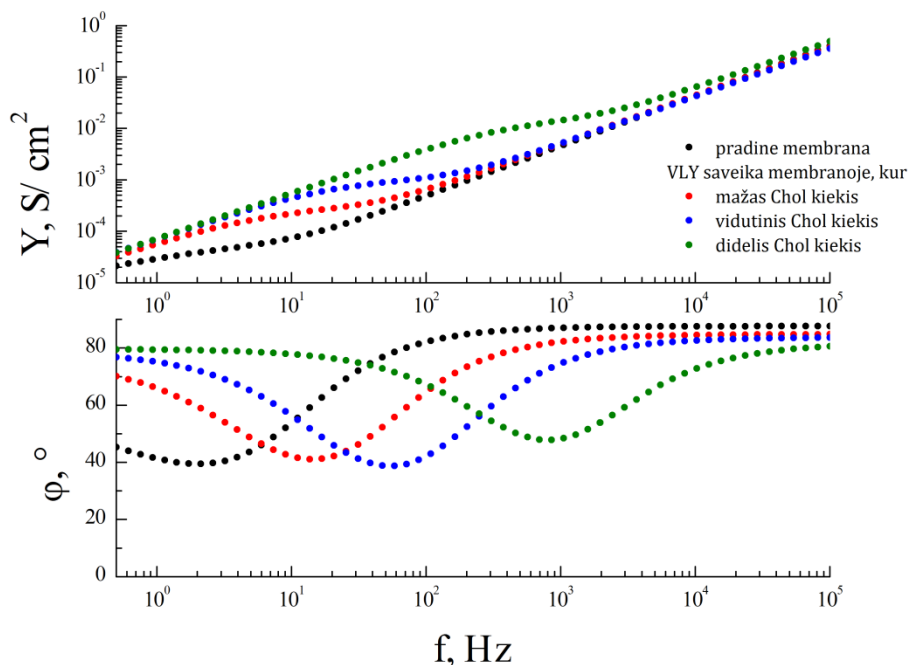
46 pav. Pneumolizino kiekio priklausomybė nuo Chol kiekio membranoje. PLY inkubacijos laikas – 30 min; koncentracija – 50 nM.

Iš 46 paveiksle pateiktų duomenų galima pastebėti, kad tarp **PLY** ir **Chol** nėra tiesinės priklausomybės: baltymas pradeda adsorbuotis ant paviršiaus, kai $\Delta\alpha_{Chol} \geq 80 m^\circ$. Kai $\Delta\alpha_{Chol} < 80 m^\circ$, tai **PLY** visiškai nesąveikauja su lipidine membrana. Šie rezultatai koreliuoja su kitų tyrimų duomenimis, kurie buvo atliekami tyrinėjant listerioliziną ¹⁴⁵ ir ostreoliziną ¹⁴⁶. Šiuose eksperimentuose buvo nustatyta, kad listeriolizinas sąveikauja su membrana, kuri buvo ruošta iš 40% cholesterolio turinčių liposomų, o ostreolizinas – 35% cholesterolio. Nuo ko priklauso toksino ir membranos sąveika, nėra iki galo iširta. Keliamos įvairios prielaidos, iš kurių viena sako, kad didėjant cholesterolio kiekiui membranoje susidaro tam tikri lipidų klasteriai, prie kurių jungiasi baltymo monomerai ¹⁴⁷. Kita hipotezė – lipidinė membrana turi būti tam tikroje būsenoje (*III skyrius, 1 dalis*), kuri jau yra palanki toksino sąveikai ¹⁴⁸. Taigi, iš **SPR** duomenų neįmanoma nustatyti, kas sąlygoja **PLY** prisikabinimą prie lipidinio paviršiaus.

2.2 VLY adsorbcijos tyrimas

Vaginolizinas struktūriškai ir savo aminorūgščių sudėtimi panašus į prieš tai tyrinėtą pneumoliziną, bet tyrimai atskleidė tam tikrus skirtumus tiek sąveikoje su lipidine membrana, tiek pačioje detekcijoje.

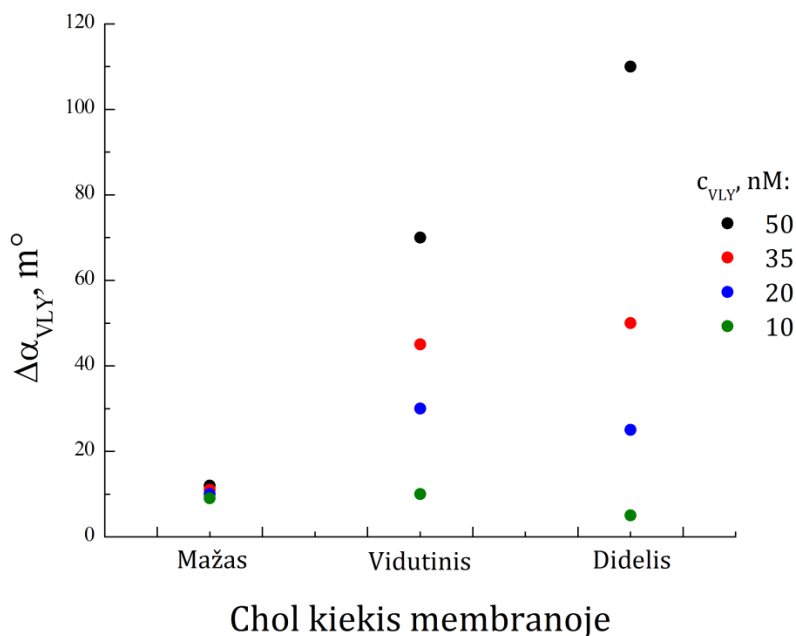
Šioje darbo dalyje iš pradžių buvo naudojamas tBLM, kur tiolinė dalis buvo suformuota iš dHC18 (40%), o lipidinė – iš MLV, turinčių 60% DOPC ir 40% cholesterolio. Bet bandant tirti VLY sąveiką su šia sistema, gautas kiek netikėtas rezultatas: neregistruojama jokia VLY sąveika nei SPR, nei EIS metodais, kas prieštarauja kitų mokslininkų gautiems duomenims ¹⁴⁹. Viena iš numanomų priežasčių gali būti ta, kad tame darbe membranos buvo formuojamos tirpiklio pakeitimo metodu, kurio metu iš tos pačios pradinės sudėties (40% Chol ir 60% DOPC) membranose įterpiamas didesnis cholesterolio kiekis. Taigi, toliau buvo dirbama su membranomis, kuriose Chol kiekis buvo kontroliuojamas MβCD – Chol komplekso pagalba (cholesterolio kiekio membranoje priklausomybė nuo MβCD – Chol komplekso koncentracijos aprašyta *III skyriuje, 2 dalyje*). Patogumo dėlei, šioje darbo dalyje cholesterolio kiekiai membranoje bus nurodomi ne absoliučiais dydžiais, o kaip “mažą” ($\Delta\alpha_{Chol} = 130 - 180 \text{ m}^\circ$), “vidutinį” ($\Delta\alpha_{Chol} = 190 - 250 \text{ m}^\circ$) ir “didelį” ($\Delta\alpha_{Chol} = 270 - 320 \text{ m}^\circ$) cholesterolio kiekį turinčios membranos. Taigi, skirtingą Chol kiekį turinčios membranos buvo paveiktos 10 nM koncentracijos VLY tirpalu. Ir iš 47 paveiksle pateiktų duomenų galima pastebėti, kaip stipriai kinta baltymo poveikis ant skirtingų membranų – kuo didesnis cholesterolio kiekis, tuo labiau fazės minimumas judėjo link didesnių dažnių pusės ir didėjo pačios membranos elektrinis laidumas.



47 pav. EIS Bode diagramos. tBLM fazės ir laidumo kitimo priklausomybė nuo 10 nM koncentracijos VLY sąveikos, esant skirtingiems cholesterolio kiekiams membranoje. Duomenys pateikti pašalinus tirpalo varžą ir parazitinę talpą. Baltymo inkubacijos laikas – 30 min.

Taigi, pasitelkiant šiuos ir PLY skyriaus duomenis galima jau išskirti pirmą požymį, kuris rodo skirtingą PLY ir VLY toksinų elgseną tBLM sistemoje: šiems baltymams reikalingas skirtingas cholesterolio kiekis membranoje, kad prasidėtų porų susidarymas. Pneumoliziniui detektuoti pakanka ~ 80 m° cholesterolio membranoje, kai VLY atveju, membranos pažeidama pradeda stebėti esant dvigubai daugiau cholesterolio tBLM sistemoje (~ 150 m°). Antras požymis – jei PLY atveju nėra priklausomybės tarp baltymo ir cholesterolio kiekio (46 pav.), tai EIS eksperimentuose su VLY toksinais stebima ryški priklausomybė – kuo daugiau cholesterolio, tuo didesnis baltymo poveikis imituojančiam lipidiniam dvisluoksniui. Kas lemia tokį skirtingą abiejų baltymų (PLY ir VLY) veikimo mechanizmą, sunku paaiškinti. Galima daryti tik prielaidą, kad pneumolizinas sąveikauja su membrana ir formuoja poras, kai membranoje esantis cholesterolis sukuria tam tikras palankias sąlygas (domenų susidarymas ar membranos būseną). VLY atveju, jau yra reikalingos ne tik tam

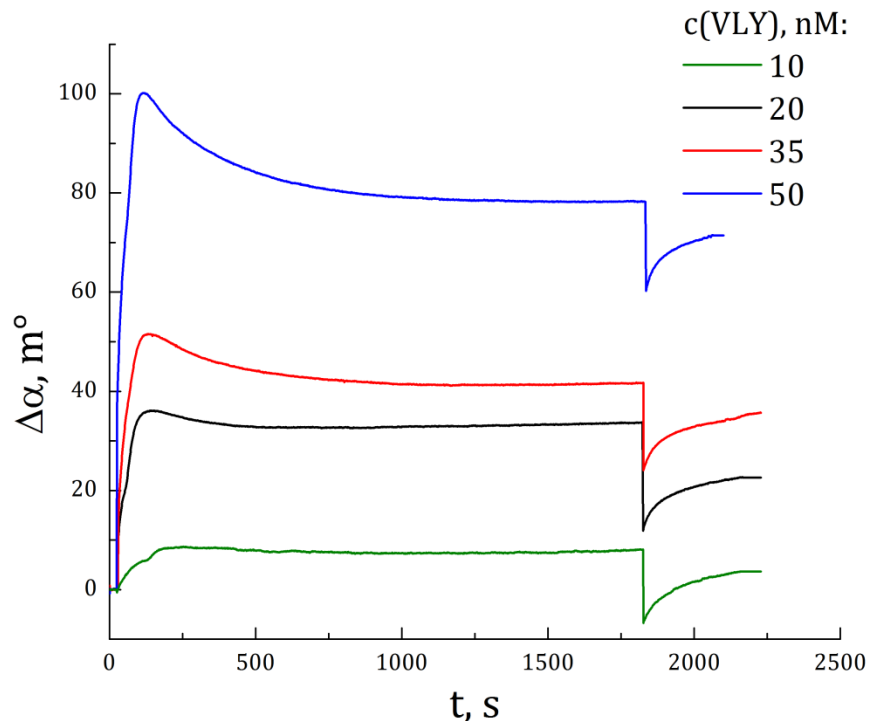
tikros sąlygos, kurios pasiekiamos esant 150 m° ar daugiau cholesterolio, bet ir pats cholesterolis, kuris tiesiogiai sąveikauja su toksinu.



48 pav. VLY adsorbcijos priklausomybės nuo toksino koncentracijos tirpale ir cholesterolio kiekio membranoje tBLM modelyje pagal SPR.

Iš tolimesnių VLY sąveikos su membrana eksperimentų, panaudojant tą pačią 10 nM baltymo koncentraciją ir SPR tyrimo metodiką, galima pastebėti, kad didinant cholesterolio kiekį membranoje, toksino kiekis labai nežymiai keičiasi (48 pav. žali taškai), kas visiškai nederą su EIS duomenimis (47 pav.). Esant dideliame cholesterolio kiekiui, registruojamas netgi mažesnis baltymo kiekis, nei esant mažai cholesterolio koncentracijai. Tas pats efektas stebimas ir padidinus VLY koncentraciją tirpale (20 nM ir 35 nM) (48 pav. atitinkamai mėlyni ir žali taškai): membranoje, kurioje yra vidutinis kiekis cholesterolio, registruojamas didesnis baltymo kiekis nei membranose, kuriose yra didelė cholesterolio koncentracija. Tik jau esant VLY 50 nM koncentracijai, stebima tendencija – kuo daugiau cholesterolio membranoje, tuo daugiau baltymo adsorbuojasi prie lipidinio paviršiaus.

Neatitikimą tarp **SPR** ir **EIS** duomenų, bei prieštaringą baltymo kiekio priklausomybę nuo cholesterolio (pagal **SPR** duomenis) galima būtų paaiškinti remiantis lipidų struktūros pakitimais. Įprastai laikomasi teorijos, kad membrana, sudaryta vien tik iš **DOPC** lipidų, yra skysta ir netvarki (L_D fazinė būseną). Kai šioje membranoje atsiranda cholesterolio, ji tampa tvarkingesnė ir kietesnė, nes cholesterolis užpildo tarpus tarp **DOPC** molekulių. Kol galiausiai didelis cholesterolio kiekis membranoje suspaudžia **DOPC** molekulę iki mažiausio įmanomo skerspjūvio ploto, kur nebeįmanoma papildomai įnešti medžiagos. Taigi, nagrinėjant toliau **VLY** atvejį, toksinas, norėdamas suformuoti porą membranoje, dėl vietos stokos pradeda išstuminti iš membranos lipodus. Ką konkrečiai baltymas išstumia iš membranos – **DOPC** ar cholesterolį – iš šių matavimų sunku pasakyti, bet pats spėjimas dėl lipidų pasišalinimo iš membranos leidžia interpretuoti anksčiau aprašytus eksperimentinius rezultatus: **EIS** rodo didelį pažaidos mastą, bet **SPR** negali tiksliai užregistruoti baltymo dėl medžiagų mainų. Be to, “lipidų išstūmimo” hipotezė paaiškina **SPR** sensogramose matomą **SPR** kampo kitimą (kuris geriausiai pastebimas, kai membranoje yra vidutinis cholesterolio lygis), kai po **VLY** injektavimo **SPR** kampas per trumpą laiką pasiekia maksimumą, o po to prasideda lėtas jo mažėjimas (ties 150 sekunde) (49 pav.).



49 pav. SPR sensogramos. VLY adsorbicija ant tBLM sistemos su vidutiniu cholesterolio lygiu.

Pagrindo, numanomam lipidui išstūmimui, gali duoti ir teoriniai paskaičiavimai. Tarkim, kad yra lipidinis monosluoksnis, sudarytas iš **Chol** ir **DOPC** molekulių. Šiame darbe nustatyta, kad nepriklausomai nuo Chol kiekio **DOPC** molekulių skaičius ant mišrių savitvarkių monosluoksnių yra pastovus dydis, kur jų 1 cm^2 plote bus $1,39 \cdot 10^{14}$, nes viena **DOPC** molekulė užima $72,5 \text{ \AA}^2$ ^{77b} (kai membranoje nėra **Chol**). Yra žinoma, kad cholesterolis įsiterpia tarp **DOPC** molekulių, mažindamas pačio **DOPC** lipido užimamą plotą, kuris kraštutiniu atveju (maksimaliai įnešus **Chol**) gali siekti tik 43 \AA^2 . Tai teoriškai $0,59 \text{ cm}^2$ ($43 \text{ \AA}^2 / 72,5 \text{ \AA}^2 \cdot 1 \text{ cm}^2 = 0,59 \text{ cm}^2$) paviršiaus užpildys **DOPC**, likusį paviršiaus plotą užims cholesterolis. Kadangi $A_{Chol} = 40 \text{ \AA}^2$ ^{115b}, tai jo šioje membranoje bus $1 \cdot 10^{14}$ molekulių (65 ng/cm^2), kurie atitinka 260 m° ($S_{Chol} = 0,25 \text{ ng/cm}^2 \cdot \text{m}^\circ$). Viso šio maksimaliai susipakavusio lipidinio monosluoksnio (**DOPC** + **Chol**) $\Delta\alpha_{Lipidų} = 555 \text{ m}^\circ$ arba $2,39 \cdot 10^{14}$ molekulių/ cm^2 . Jei perskaičiuoti parametrus vienai molekulei, tai $A_{Lipidų} \approx 42 \text{ \AA}^2$ ($1 \text{ cm}^2 / 2,39 \cdot 10^{14}$ molekulių/ cm^2) ir $S_{Lipidų} = 2,32 \text{ f}^\circ$ ($555 \text{ m}^\circ / 2,39 \cdot 10^{14}$ molekulių).

insertuotuoju VLY baltymu į šią membraną. Toliau skaičiavimai bus atliekami dviem dydžiams: $\Delta\alpha_{pora}$, kuris yra priklausomas nuo toksino porą sudarančių monomerų skaičiaus, ir $\Delta\alpha_{lipidai}$, parodantis, kiek lipidų turi būti išstumta iš membranos, kad vietoj jų galėtų susiformuoti pora. Prieš tęsiant toliau skaičiavimus, reikėtų paminėti, kad nėra tiksliai nustatyta šio baltymo porą sudarančių monomerų skaičius, bei pats poros dydis. Tad buvo apskaičiuoti keli variantai (5 lentelė), keičiant tiek monomerų skaičių, tiek ir poros dydį, remiantis šiuo pavyzdžiu: tarkim, kad porą sudaro 40 monomerų ir jos skersmuo – 30 nm. Vienas baltymo monomeras **SPR** kampą pakeistų 111° , tai tada viena pilnai susiformavusi pora – $\Delta\alpha_{pora} = 4440^\circ$. Šios poros diametras – 30 nm, tai $A = 707 \text{ nm}^2$ ir turėtų išstumti 1689 molekules lipidų. Ir tokiu atveju **SPR** kampas dėl lipidų išstūmimo turėtų sumažėti 3920° . Tai bendrai **SPR** kampas turėtų padidėti tik 520 femto laipsniais ($4440 - 3920 = 520^\circ$).

5 lentelė. Skaičiavimo duomenys.

VLY monomerų sk.	$\Delta\alpha_{VLY}, f^\circ$	VLY poros dydis, nm	$\Delta\alpha_{Lipidų}, f^\circ$
30	3340	30	3920
35	3900	35	5340
40	4460	40	6970
45	5020	45	8830
50	5580	50	10900

Taigi, iš 5 lentelės duomenų galima pastebėti, kad bendram **SPR** kampo kitimui didelę reikšmę turi ne porą sudarančių monomerų skaičius, o pačios poros dydis: kuo pora didesnė, tuo daugiau lipidų ji privalo išstumti.

3. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

Šiame darbe buvo nustatytas pagrindinis skirtumas tarp pneumolizino ir vaginolizino: **PLY** sąveika su **tBLM** inicijuojama, kai membranoje, pagal **SPR**, cholesterolio kiekis viršija 80 m° ir kurio padidėjimas nekeičia pačio baltymo veikimo; **VLY** atveju, toksinas sąveikauja su lipidiniu paviršiumi tik tada, kai membranoje $\Delta\alpha_{Chol} > 150 \text{ m}^\circ$, kurio didinimas kartu sustiprina ir baltymo veikimą.

Nustatyta, kad baltymo detekcijai **EIS** metodu didelį vaidmenį vaidina **tBLM** modelį sudarantis inkarinio junginio kiekis, kurio didinimas mažina porų kiekio nustatymą: 33% daugiau porų galima detektuoti ant **dHC18**(30%) savitvarkio monosluoksnio nei **dHC18**(40%).

Cholesterolio kiekio didinimas membranoje didina ir **VLY** poveikį. Bet buvo išsiaiškinta, kad **VLY** poveikis yra gerai “matomas” **EIS** metodu, bet visiškai “nematomas” **SPR** metodu. Manoma, jog šie efektai susiję su lipido išstūmimu formuojantis pilnoms **VLY** poroms membranoje.

IŠVADOS

- 1) Sukurtas lipidinių dvisluoksnių prijungimo prie paviršiaus metodas, besiremiantis daugiasluoksnių liposomų suliejimu.
- 2) Nustatytas paviršiaus plazmonų rezonanso metodo jautrumas inkariniam junginiui, lipidui ir cholesteroliui, kurie atitinkamai lygūs: $S_{\text{ink. j.}} = 0,51 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$; $S_{\text{lipidų}} = 0,62 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$; $S_{\text{chol}} = 0,25 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{m}^\circ)$
- 3) Nustatytas inkarinių junginių užimamas plotas vidiniame prikabintos membranos sluoksnyje, kai tarp jų yra įsiterpusios nesotaus fosfatidilcholino molekulės: $A_{\text{WC14}} = 78 \text{ \AA}^2$; $A_{\text{dHC18}} = 105 \text{ \AA}^2$
- 4) A) Nustatyta, kad cholesterolio/nesotaus fosfatidilcholino santykis prikabintos membranos modelyje siekia tik 0,2, kai daugiasluoksnėse liposomose šis santykis yra 0,4.
B) Nustatyta, kad įkraunamo cholesterolio kiekis atvirkščiai proporcingas ciklodekstrino ir cholesterolio komplekso koncentracijai tirpale.
- 5) A) Buvo parodyta, kad membranos pažaidos masto detektavimas elektrocheminio impedanso spektroskopijos metodu priklauso nuo inkarinio junginio paviršinio tankio, kai paviršiaus plazmonų rezonanso metodu galima detektuoti neribotą kiekį baltymo. Paviršiaus plazmonų rezonanso metodas netinkamas tirti nuo cholesterolio priklausomų toksinų sąveiką tankiose membranose.
B) Buvo parodyta, kad pneumolizino sąveika su membrana prasideda, kai membranoje yra 15% cholesterolio, vaginolizino – 30% cholesterolio.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

1. Rakovska, B., Ragaliauskas, T., Mickevicius, M., Jankunec, M., Niaura, G., Vanderah, D. J., & Valincius, G. (2015). ***Structure and Function of the Membrane Anchoring Self-Assembled Monolayers***. *Langmuir*, 31(2), 846-857.
2. Ragaliauskas, T., Mickevicius, M., Budvytyte, R., Niaura, G., Carbonnier, B., & Valincius, G. (2014). ***Adsorption of β -amyloid oligomers on octadecanethiol monolayers***. *Journal of colloid and interface science*, 425, 159-167.
3. Mindaugas Mickevicius, Tadas Ragaliauskas, Bozena Rakovska, Tadas Penkauskas, David J. Vanderah, Frank Heinrich and Gintaras Valincius. ***Fast formation of low-defect-density tethered bilayers by fusion of multilamellar vesicles***. *BBA – Biomembranes (submitted)*.

PATENTAI

Mindaugas Mickevicius, Tadas Ragaliauskas, David J. Vanderah and Gintaras Valincius. ***Paviršiuje imobilizuotų fosfolipidinių bisluoksnių membranų (tBLM) gavimo būdas***. Paraiškos numeris: 2015 080. Pareiškėjas: Vilniaus universitetas. Teisinis statusas: application published.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Welford K. *Surface plasmon-polaritons and their uses*. *Opt Quantum Electron*. 1991;23(1):1-27. doi: [10.1007/BF00619516](https://doi.org/10.1007/BF00619516).
2. Kooyman RPH, Kolkman H, Van Gent J, Greve J. *Surface plasmon resonance immunosensors: sensitivity considerations*. *Anal Chim Acta*. 1988;213:35-45. doi: [10.1016/S0003-2670\(00\)81337-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)81337-9).
3. Pattnaik P. *Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2005;126(2):79-92. doi: [10.1385/ABAB:126:2:079](https://doi.org/10.1385/ABAB:126:2:079).
4. 4a. 4b. Stenberg E, Persson B, Roos H, Urbaniczky C. *Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins*. *J Colloid Interface Sci*. 1991;143(2):513-526. doi: [10.1016/0021-9797\(91\)90284-F](https://doi.org/10.1016/0021-9797(91)90284-F).
5. Beusink JB, Lokate AMC, Besselink GAJ, Pruijn GJM, Schasfoort RBM. *Angle-scanning SPR imaging for detection of biomolecular interactions on microarrays*. *Biosens Bioelectron*. 2008;23(6):839-844. doi: [10.1016/j.bios.2007.08.025](https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.08.025).
6. McIntyre JDE, Aspnes DE. *Differential reflection spectroscopy of very thin surface films*. *Surf Sci*. 1971;24(2):417-434. doi: [10.1016/0039-6028\(71\)90272-X](https://doi.org/10.1016/0039-6028(71)90272-X).
7. Orazem M, Tribollet B. *Electrochemical Impedance Spectroscopy*. John Wiley & Sons; 2008.
8. Chen H, Heng CK, Puiu PD, et al. *Detection of Saccharomyces cerevisiae immobilized on self-assembled monolayer (SAM) of alkanethiolate using electrochemical impedance spectroscopy*. *Anal Chim Acta*. 2005;554(1-2):52-59. doi: [10.1016/j.aca.2005.08.086](https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.08.086).
9. Hollaender J. *Rapid assessment of food/package interactions by electrochemical impedance spectroscopy (EIS)*. *Food Addit Contam*. 2009;14(6-7):617-626. doi: [10.1080/02652039709374574](https://doi.org/10.1080/02652039709374574).
10. Maalouf R, Fournier-Wirth C, Coste J, et al. *Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: comparison to surface plasmon resonance*. *Anal Chem*. 2007;79(13):4879-4886. doi: [10.1021/ac070085n](https://doi.org/10.1021/ac070085n).

11. Agarwal P. **Measurement Models for Electrochemical Impedance Spectroscopy.** *J Electrochem Soc.* 1992;139(7):1917. doi: [10.1149/1.2069522](https://doi.org/10.1149/1.2069522).
12. Elliott JT, Meuse CW, Silin VI, et al. **Biomimetic Membranes on Metal Supports.** *Biomol Film Des Funct Appl.* 2003;111:99-162. doi: [10.1201/9780203912362.fmatt](https://doi.org/10.1201/9780203912362.fmatt).
13. Tobergte DR, Curtis S. *Molecular Biology of Membranes - Structure and Function.* Vol 53.; 2013. doi: [10.1017/CBO9781107415324.004](https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004).
14. Kusumi A, Subczynski WK, Pasenkiewicz-Gierula M, Hyde JS, Merkle H. **Spin-label studies on phosphatidylcholine-cholesterol membranes: effects of alkyl chain length and unsaturation in the fluid phase.** *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1986;854(2):307-317. doi: [10.1016/0005-2736\(86\)90124-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90124-0).
15. Rothman J, Lenard J. **Membrane asymmetry.** *Science (80-).* 1977;195(4280):743-753. doi: [10.1126/science.402030](https://doi.org/10.1126/science.402030).
16. Newton AC. **Protein kinase C: Structure, function, and regulation.** *J Biol Chem.* 1995;270(48):28495-28498. doi: [10.1074/jbc.270.48.28495](https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28495).
17. Raynor RL, Zheng B, Kuo JF. **Membrane interactions of amphiphilic polypeptides mastoparan, melittin, polymyxin B, and cardiotoxin: Differential inhibition of protein kinase C, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptosomal membrane Na,K-ATPase, and Na⁺ pump and differen.** *J Biol Chem.* 1991;266(5):2753-2758. [https://dx.doi.org/VL - 266](https://dx.doi.org/VL-266).
18. Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC. **Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system.** *Nature.* 1962;194(4832):979-980. doi: [10.1038/194979a0](https://doi.org/10.1038/194979a0).
19. Bangham AD, Hill MW, Miller NGA. *Methods in Membrane Biology.* (Korn ED, ed.). Boston, MA: Springer US; 1974. doi: [10.1007/978-1-4615-7422-4](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7422-4).
20. Girard P, Pécréaux J, Lenoir G, Falson P, Rigaud J-L, Bassereau P. **A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles.** *Biophys J.* 2004;87(1):419-429. doi: [10.1529/biophysj.104.040360](https://doi.org/10.1529/biophysj.104.040360).
21. Vinson PK, Talmon Y, Walter A. **Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octyl glucoside elucidated by cryo-transmission electron microscopy.** *Biophys J.* 1989;56(4):669-681. doi: [10.1016/S0006-3495\(89\)82714-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82714-6).
22. Popplewell JF, Swann MJ, Freeman NJ, McDonnell C, Ford RC. **Quantifying the effects of melittin on liposomes.** *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2007;1768(1):13-20. doi: [10.1016/j.bbamem.2006.05.016](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.016).
23. Lpez O, Ccera M, Pons R, Azemar N, Maza A De. **Kinetic Studies of Liposome**

- Solubilization by Sodium Dodecyl Sulfate Based on a Dynamic Light Scattering Technique Kinetic Studies of Liposome Solubilization by Sodium Dodecyl Sulfate Based on a Dynamic Light Scattering Technique.* Society. 1998;7463(14):4671-4674. doi: [10.1021/la980219f](https://doi.org/10.1021/la980219f).
24. Lundqvist A, Ocklind G, Haneskog L, Lundahl P. *Freeze-thaw immobilization of liposomes in chromatographic gel beads: evaluation by confocal microscopy and effects of freezing rate.* *J Mol Recognit.* 1998;11(1-6):52-57. doi: [10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199812\)11:1/6<52::AID-JMR389>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199812)11:1/6<52::AID-JMR389>3.0.CO;2-K).
25. Cypionka A, Stein A, Hernandez JM, Hippchen H, Jahn R, Walla PJ. *Discrimination between docking and fusion of liposomes reconstituted with neuronal SNARE-proteins using FCS.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(44):18575-18580. doi: [10.1073/pnas.0906677106](https://doi.org/10.1073/pnas.0906677106).
26. 26a. 26b. Cho N-J, Frank CW, Kasemo B, Höök F. *Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates.* *Nat Protoc.* 2010;5(6):1096-1106. doi: [10.1038/nprot.2010.65](https://doi.org/10.1038/nprot.2010.65).
27. Alves ID, Salgado GFJ, Salamon Z, Brown MF, Tollin G, Hruby VJ. *Phosphatidylethanolamine enhances rhodopsin photoactivation and transducin binding in a solid supported lipid bilayer as determined using plasmon-waveguide resonance spectroscopy.* *Biophys J.* 2005;88(1):198-210. doi: [10.1529/biophysj.104.046722](https://doi.org/10.1529/biophysj.104.046722).
28. Lin W-C, Blanchette CD, Ratto T V, Longo ML. *Lipid asymmetry in DLPC/DSPC-supported lipid bilayers: a combined AFM and fluorescence microscopy study.* *Biophys J.* 2006;90(1):228-237. doi: [10.1529/biophysj.105.067066](https://doi.org/10.1529/biophysj.105.067066).
29. Koenig BW, Krueger S, Orts WJ, et al. *Neutron Reflectivity and Atomic Force Microscopy Studies of a Lipid Bilayer in Water Adsorbed to the Surface of a Silicon Single Crystal.* *Langmuir.* 1996;12(5):1343-1350. doi: [10.1021/la950580r](https://doi.org/10.1021/la950580r).
30. Giess F, Friedrich MG, Heberle J, Naumann RL, Knoll W. *The protein-tethered lipid bilayer: a novel mimic of the biological membrane.* *Biophys J.* 2004;87(5):3213-3220. doi: [10.1529/biophysj.104.046169](https://doi.org/10.1529/biophysj.104.046169).
31. Brian AA, McConnell HM. *Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984;81(October):6159-6163.
32. Tamm LK, McConnell HM. *Supported phospholipid bilayers.* *Biophys J.* 1985;47(1):105-113. doi: [10.1016/S0006-3495\(85\)83882-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83882-0).
33. Lang H, Duschl C, Grätzel M, Vogel H. *Self-assembly of thiolipid molecular layers on gold surfaces: optical and electrochemical characterization.* *Thin Solid Films.*

- 1992;210-211:818-821. doi: [10.1016/0040-6090\(92\)90413-6](https://doi.org/10.1016/0040-6090(92)90413-6).
34. 34a. 34b. Valincius G, Mickevicius M. **Chapter Two – Tethered Phospholipid Bilayer Membranes: An Interpretation of the Electrochemical Impedance Response**. In: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Vol 21. ; 2015:27-61. doi: [10.1016/bs.adplan.2015.01.003](https://doi.org/10.1016/bs.adplan.2015.01.003).
35. 35a. Plant AL. **Supported Hybrid Bilayer Membranes as Rugged Cell Membrane Mimics**. *Langmuir*. 1999;15(15):5128-5135. doi: [10.1021/la981662t](https://doi.org/10.1021/la981662t).
36. Plant a L. **Self-Assembled Phospholipid Alkanethiol Biomimetic Bilayers on Gold**. *Langmuir*. 1993;9(11):2764-2767. doi: [10.1021/La00035a004](https://doi.org/10.1021/La00035a004).
37. 37a. Raguse B, Braach-Maksvytis V, Cornell BA, et al. **Tethered lipid bilayer membranes: formation and ionic reservoir characterization**. *Langmuir*. 1998;14(3):648-659. doi: [10.1021/la9711239](https://doi.org/10.1021/la9711239).
38. Lang H, Duschl C, Vogel H. **A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces**. *Langmuir*. 1994;10(1):197-210. doi: [10.1021/la00013a029](https://doi.org/10.1021/la00013a029).
39. He L, Robertson JWF, Li J, et al. **Tethered bilayer lipid membranes based on monolayers of thiolipids mixed with a complementary dilution molecule 1 Incorporation of channel peptides**. *Langmuir*. 2005;21(25):11666-11672. doi: [10.1021/la051771p](https://doi.org/10.1021/la051771p).
40. Achalkumar AS, Bushby RJ, Evans SD, et al. **Cholesterol-based anchors and tethers for phospholipid bilayers and for model biological membranes**. *Soft Matter*. 2010;6(24):6036. doi: [10.1039/c0sm00030b](https://doi.org/10.1039/c0sm00030b).
41. Atanasov V, Atanasova PP, Vockenroth IK, Knorr N, Köper I. **A molecular toolkit for highly insulating tethered bilayer lipid membranes on various substrates**. *Bioconjug Chem*. 2006;17(3):631-637. doi: [10.1021/bc050328n](https://doi.org/10.1021/bc050328n).
42. Atanasov V, Knorr N, Duran RS, et al. **Membrane on a Chip: A Functional Tethered Lipid Bilayer Membrane on Silicon Oxide Surfaces**. *Biophys J*. 2005;89(3):1780-1788. doi: [10.1529/biophysj.105.061374](https://doi.org/10.1529/biophysj.105.061374).
43. Brink G, Schmitt L, Tampé R, Sackmann E. **Self assembly of covalently anchored phospholipid supported membranes by use of DODA-Suc-NHS-lipids**. *BBA - Biomembr*. 1994;1196(2):227-230. doi: [10.1016/0005-2736\(94\)00218-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)00218-5).
44. Brzozowska M, Oberts BP, Blanchard GJ, Majewski J, Krysinski P. **Design and characterization of novel tether layer for coupling of a bilayer lipid membrane to the surface of gold**. *Langmuir*. 2009;25(16):9337-9345. doi: [10.1021/la900739v](https://doi.org/10.1021/la900739v).
45. Bunjes N, Schmidt EK, Jonczyk A, et al. **Thiopeptide-Supported Lipid Layers on**

- Solid Substrates*. *Langmuir*. 1997;13(23):6188-6194. doi: [10.1021/la970317l](https://doi.org/10.1021/la970317l).
46. Schiller SM, Naumann R, Lovejoy K, Kunz H, Knoll W. **Archaea analogue thiolipids for tethered bilayer lipid membranes on ultrasmooth gold surfaces**. *Angew Chemie - Int Ed*. 2003;42(2):208-211. doi: [10.1002/anie.200390080](https://doi.org/10.1002/anie.200390080).
47. Théato P, Zentel R. **Formation of lipid bilayers on a new amphiphilic polymer support**. *Langmuir*. 2000;16(4):1801-1805. doi: [10.1021/la990292l](https://doi.org/10.1021/la990292l).
48. Wagner ML, Tamm LK. **Tethered Polymer-Supported Planar Lipid Bilayers for Reconstitution of Integral Membrane Proteins: Silane-Polyethyleneglycol-Lipid as a Cushion and Covalent Linker**. *Biophys J*. 2000;79(3):1400-1414. doi: [10.1016/S0006-3495\(00\)76392-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76392-2).
49. Vockenroth IK, Atanasova PP, Jenkins ATA, Köper I. **Incorporation of α -Hemolysin in Different Tethered Bilayer Lipid Membrane Architectures**. *Langmuir*. 2008;24(2):496-502. doi: [10.1021/la7030279](https://doi.org/10.1021/la7030279).
50. McConnell HM, Watts TH, Weis RM, Brian AA. **Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system**. *BBA - Rev Biomembr*. 1986;864(1):95-106. doi: [10.1016/0304-4157\(86\)90016-X](https://doi.org/10.1016/0304-4157(86)90016-X).
51. 51a. Basit H, Van der Heyden A, Gondran C, Nysten B, Dumy P, Labbé P. **Tethered bilayer lipid membranes on mixed self-assembled monolayers of a novel anchoring thiol: impact of the anchoring thiol density on bilayer formation**. *Langmuir*. 2011;27(23):14317-14328. hdoi: [10.1021/la202847r](https://doi.org/10.1021/la202847r).
52. Vockenroth IK, Rossi C, Shah MR, Köper I. **Formation of tethered bilayer lipid membranes probed by various surface sensitive techniques**. *Biointerphases*. 2009;4(2):19-26. doi: [10.1116/1.3122019](https://doi.org/10.1116/1.3122019).
53. Cranfield CG, Cornell BA, Grage SL, et al. **Transient potential gradients and impedance measures of tethered bilayer lipid membranes: pore-forming peptide insertion and the effect of electroporation**. *Biophys J*. 2014;106(1):182-189. doi: [10.1016/j.bpj.2013.11.1121](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.1121).
54. 54a. Junghans A, Köper I. **Structural analysis of tethered bilayer lipid membranes**. *Langmuir*. 2010;26(13):11035-11040. doi: [10.1021/la100342k](https://doi.org/10.1021/la100342k).
55. Reimhult E, Höök F, Kasemo B. **Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: Influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure**. *Langmuir*. 2003;19(5):1681-1691. doi: [10.1021/la0263920](https://doi.org/10.1021/la0263920).
56. Papahadjopoulos D, Miller N. **Phospholipid model membranes I Structural characteristics of hydrated liquid crystals**. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1967;135(4):624-638. doi: [10.1016/0005-2736\(67\)90094-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(67)90094-6).

57. Papahadjopoulos D, Watkins JC. **Phospholipid model membranes II Permeability properties of hydrated liquid crystals**. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1967;135(4):639-652. doi: [10.1016/0005-2736\(67\)90095-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(67)90095-8).
58. Saunders L, Perrin J, Gammack D. **Ultrasonic Irradiation of Some Phospholipid Sols**. *J Pharm Pharmacol.* 1962;14(1):567-572. doi: [10.1111/j.2042-7158.1962.tb11141.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1962.tb11141.x).
59. Cornell BA, Braach-Maksvytis VL, King LG, et al. **A biosensor that uses ion-channel switches**. *Nature.* 1997;387(6633):580-583. doi: [10.1038/42432](https://doi.org/10.1038/42432).
60. Budvytyte R, Valincius G, Niaura G, et al. **Structure and properties of tethered bilayer lipid membranes with unsaturated anchor molecules**. *Langmuir.* 2013;29(27):8645-8656. doi: [10.1021/la401132c](https://doi.org/10.1021/la401132c).
61. 61a. 61b. McGillivray DJ, Valincius G, Vanderah DJ, et al. **Molecular-scale structural and functional characterization of sparsely tethered bilayer lipid membranes**. *Biointerphases.* 2007;2(1):21-33. doi: [10.1116/1.2709308](https://doi.org/10.1116/1.2709308).
62. Vockenroth IK, Ohm C, Robertson JWF, McGillivray DJ, Lösche M, Köper I. **Stable insulating tethered bilayer lipid membranes**. *Biointerphases.* 2008;3(2):FA68. doi: [10.1116/1.2912097](https://doi.org/10.1116/1.2912097).
63. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. **Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids**. *J Mol Biol.* 1965;13(1):238-252. doi: [10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6).
64. Shek PN, Yungt, B Y K NZS. **Comparison between multilamellar and unilamellar liposomes in enhancing antibody formation**. *Immunology.* 1983;49(1):37-44.
65. Faure C, Belamie E. **Using multilamellar vesicles to incorporate glucose oxidase into a polypyrrole film**. In: *Trends in Colloid and Interface Science XV*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2001:42-47. doi: [10.1007/3-540-45725-9_10](https://doi.org/10.1007/3-540-45725-9_10).
66. Lichtenberg D, Markello T. **Structural Characteristics of Phospholipid Multilamellar Liposomes**. *J Pharm Sci.* 1984;73(1):122-125. doi: [10.1002/jps.2600730134](https://doi.org/10.1002/jps.2600730134).
67. Hope MJ, Bally MB, Mayer LD, Janoff AS, Cullis PR. **Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles**. *Chem Phys Lipids.* 1986;40(2-4):89-107. doi: [10.1016/0009-3084\(86\)90065-4](https://doi.org/10.1016/0009-3084(86)90065-4).
68. Cooper MA, Try AC, Carroll J, Ellar DJ, Williams DH. **Surface plasmon resonance analysis at a supported lipid monolayer**. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1998;1373(1):101-111. doi: [10.1016/S0005-2736\(98\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00091-1).
69. Keller CA, Glasmästar K, Zhdanov VP, Kasemo B. **Formation of supported**

- membranes from vesicles. Phys Rev Lett.* 2000;84(23):5443-5446. doi: 10.1103/PhysRevLett.84.5443.
70. Lahiri J, Kalal P, Frutos AG, Jonas SJ, Schaeffler R. **Method for fabricating supported bilayer lipid membranes on gold.** *Langmuir.* 2000;16(20):7805-7810. doi: 10.1021/la000468f.
71. Cubukcu E, Zhang S, Park Y-S, Bartal G, Zhang X. **Split ring resonator sensors for infrared detection of single molecular monolayers.** *Appl Phys Lett.* 2009;95(4):43113. doi: 10.1063/1.3194154.
72. De Feijter JA, Benjamins J, Veer FA. **Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air/water interface.** *Biopolymers.* 1978;17(7):1759-1772. doi: 10.1002/bip.1978.360170711.
73. Milkani E, Khaing AM, Huang F, et al. **Immobilization of acetylcholinesterase in lipid membranes deposited on self-assembled monolayers.** *Langmuir.* 2010;26(24):18884-18892. doi: 10.1021/la103333c.
74. Evans SD, Flynn TM, Ulman A. **Self-Assembled Multilayer Formation on Predefined Templates.** *Langmuir.* 1995;11(10):3811-3814.
75. Siegel G, Malmsten M, Michel F. **A primary lesion model for arteriosclerotic microplaque formation.** *Int J Angiol.* 2000;9(3):129-134.
76. Born M, Wolf E. *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light.* CUP Archive; 2000.
77. 77a. 77b. Tristram-Nagle S, Petrache HI, Nagle JF. **Structure and interactions of fully hydrated dioleoylphosphatidylcholine bilayers.** *Biophys J.* 1998;75(2):917-925. doi: 10.1016/S0006-3495(98)77580-0.
78. 78a. Erbe A, Sigel R. **Tilt angle of lipid acyl chains in unilamellar vesicles determined by ellipsometric light scattering.** *Eur Phys J E Soft Matter.* 2007;22(4):303-309. doi: 10.1140/epje/e2007-00038-5.
79. Wu H-L, Chen P-Y, Chi C-L, Tsao H-K, Sheng Y-J. **Vesicle deposition on hydrophilic solid surfaces.** *Soft Matter.* 2013;9(6):1908-1919. doi: 10.1039/C2SM27450G.
80. Reimhult E, Höök F, Kasemo B. **Vesicle adsorption on SiO₂ and TiO₂: Dependence on vesicle size.** *J Chem Phys.* 2002;117(16):7401-7404. doi: 10.1063/1.1515320.
81. Jing Y, Trefna H, Persson M, et al. **Formation of supported lipid bilayers on silica: relation to lipid phase transition temperature and liposome size.** *Soft Matter.* 2014;10(1):187-195. doi: 10.1039/C3SM50947H.
82. 82a. Tabaei SR, Jackman JA, Kim SO, et al. **Formation of cholesterol-rich supported membranes using solvent-assisted lipid self-assembly.** *Langmuir.*

- 2014;30(44):13345-13352. doi: [10.1021/la5034433](https://doi.org/10.1021/la5034433).
83. Parker A, Miles K, Cheng KH, Huang J. **Lateral distribution of cholesterol in dioleoylphosphatidylcholine lipid bilayers: cholesterol-phospholipid interactions at high cholesterol limit.** *Biophys J.* 2004;86(3):1532-1544. doi: [10.1016/S0006-3495\(04\)74221-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74221-6).
84. Imura T, Yanagishita H, Ohira J, Sakai H, Abe M, Kitamoto D. **Thermodynamically stable vesicle formation from glycolipid biosurfactant sponge phase.** *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2005;43(2):115-121. doi: [10.1016/j.colsurfb.2005.03.015](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.03.015).
85. Lasic DD, Martin FJ. **On the mechanism of vesicle formation.** *J Memb Sci.* 1990;50(2):215-222. doi: [10.1016/S0376-7388\(00\)80317-8](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)80317-8).
86. Ingham JD, Lawson DD. **Refractive index-molecular weight relationships for poly(ethylene oxide).** *J Polym Sci Part A Gen Pap.* 1965;3(7):2707-2710. doi: [10.1002/pol.1965.100030728](https://doi.org/10.1002/pol.1965.100030728).
87. Xu X, Zhu Q. **Evaluation of skin optical clearing enhancement with Azone as a penetration enhancer.** *Opt Commun.* 2007;279(1):223-228. doi: [10.1016/j.optcom.2007.06.055](https://doi.org/10.1016/j.optcom.2007.06.055).
88. Kwak KJ, Valincius G, Liao W-C, et al. **Formation and Finite Element Analysis of Tethered Bilayer Lipid Structures.** *Langmuir.* 2010;26(23):18199-18208. doi: [10.1021/la1021802](https://doi.org/10.1021/la1021802).
89. Rakovska B, Ragaliauskas T, Mickevicius M, et al. **Structure and function of the membrane anchoring self-assembled monolayers.** *Langmuir.* 2015;31(2):846-857. doi: [10.1021/la503715b](https://doi.org/10.1021/la503715b).
90. Chen H, Born E, Mathur SN, Field ' FJ. **Cholesterol and sphingomyelin syntheses are regulated independently in cultured human intestinal cells, CaCo-2: role of membrane cholesterol and sphingomyelin content.** *J Lipid Res.* 1993;34(12):2159-2167.
91. Crane JM, Tamm LK. **Role of cholesterol in the formation and nature of lipid rafts in planar and spherical model membranes.** *Biophys J.* 2004;86(5):2965-2979. doi: [10.1016/S0006-3495\(04\)74347-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74347-7).
92. Korade Z, Kenworthy AK. **Lipid rafts, cholesterol, and the brain.** *Neuropharmacology.* 2008;55(8):1265-1273. doi: [10.1016/j.neuropharm.2008.02.019](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.02.019).
93. Huang J, Feigenson GW. **A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers.** *Biophys J.* 1999;76(4):2142-2157. doi: [10.1016/S0006-3495\(99\)77369-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77369-8).

94. Silvius J. **Thermotropic phase transitions of pure lipids in model membranes and their modifications by membrane proteins.** *Lipid-protein Interact.* 1982;2:239-281. doi: [10.1007/978-1-62703-275-9](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-275-9).
95. 95a. Collier JH, Messersmith PB. **Phospholipid Strategies in Biomineralization and Biomaterials Research.** *Annu Rev Mater Res.* 2001;31(1):237-263. doi: [10.1146/annurev.matsci.31.1.237](https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.31.1.237).
96. Ulrich AS, Sami M, Watts A. **Hydration of DOPC bilayers by differential scanning calorimetry.** *BBA - Biomembr.* 1994;1191(1):225-230. doi: [10.1016/0005-2736\(94\)90253-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90253-4).
97. Lewis BA, Engelman DM. **Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles.** *J Mol Biol.* 1983;166(2):211-217. doi: [10.1016/S0022-2836\(83\)80007-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80007-2).
98. Koynova R, Caffrey M. **Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines.** *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr.* 1998;1376(1):91-145. doi: [10.1016/S0304-4157\(98\)00006-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(98)00006-9).
99. Monteiro N, Martins A, Reis RL, et al. **Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine.** *J R Soc Interface.* 2014;11(101):20140459. doi: [10.1098/rsif.2014.0459](https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0459).
100. Cooper RA. **Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells.** *J Supramol Struct.* 1978;8(4):413-430. doi: [10.1002/jss.400080404](https://doi.org/10.1002/jss.400080404).
101. Song Y, Kenworthy AK, Sanders CR. **Cholesterol as a co-solvent and a ligand for membrane proteins.** *Protein Sci.* 2014;23(1):1-22. doi: [10.1002/pro.2385](https://doi.org/10.1002/pro.2385).
102. Palmer M. **Cholesterol and the activity of bacterial toxins.** *FEMS Microbiol Lett.* 2004;238(2):281-289. doi: [10.1016/j.femsle.2004.07.059](https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.059).
103. Flynn GL, Shah Y, Prakongpan S, Kwan KH, Higuchi WI, Hofmann AF. **Cholesterol solubility in organic solvents.** *J Pharm Sci.* 1979;68(9):1090-1097. doi: [10.1002/jps.2600680908](https://doi.org/10.1002/jps.2600680908).
104. Zhou J, Ritter H. **Cyclodextrin functionalized polymers as drug delivery systems.** *Polym Chem.* 2010;1(10):1552. doi: [10.1039/c0py00219d](https://doi.org/10.1039/c0py00219d).
105. Szejtli J. **Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry.** *Chem Rev.* 1998;98(97):1743-1753. doi: [10.1021/CR970022C](https://doi.org/10.1021/CR970022C).
106. Pitha J, Irie T, Sklar PB, Nye JS. **Drug solubilizers to aid pharmacologists: Amorphous cyclodextrin derivatives.** *Life Sci.* 1988;43(6):493-502. doi: [10.1016/0024-3205\(88\)90150-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(88)90150-6).
107. Yancey PG, Rodriguez W V., Kilsdonk EPC, et al. **Cellular cholesterol efflux**

- mediated by cyclodextrins: Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux.* *J Biol Chem.* 1996;271(27):16026-16034. doi: 10.1074/jbc.271.27.16026.
108. Atger VM, de la Llera Moya M, Stoudt GW, Rodriguez W V, Phillips MC, Rothblat GH. *Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells.* *J Clin Invest.* 1997;99(4):773-780. doi: 10.1172/JCI119223.
109. 109a. Zidovetzki R, Levitan I. *Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies.* *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(6):1311-1324. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.03.026.
110. Visco I, Chiantia S, Schwille P. *Asymmetric supported lipid bilayer formation via methyl- β -cyclodextrin mediated lipid exchange: influence of asymmetry on lipid dynamics and phase behavior.* *Langmuir.* 2014;30(25):7475-7484. doi: 10.1021/la500468r.
111. Cheng H-T, Megha, London E. *Preparation and properties of asymmetric vesicles that mimic cell membranes: effect upon lipid raft formation and transmembrane helix orientation.* *J Biol Chem.* 2009;284(10):6079-6092. doi: 10.1074/jbc.M806077200.
112. de Meyer F, Smit B. *Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(10):3654-3658. doi: 10.1073/pnas.0809959106.
113. May S. *Trans-monolayer coupling of fluid domains in lipid bilayers.* *Soft Matter.* 2009;5(17):3148. doi: 10.1039/b901647c.
114. Needham D, Nunn RS. *Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol.* *Biophys J.* 1990;58(4):997-1009. doi: 10.1016/S0006-3495(90)82444-9.
115. 115a. 115b. Alwarawrah M, Dai J, Huang J. *A molecular view of the cholesterol condensing effect in DOPC lipid bilayers.* *J Phys Chem B.* 2010;114(22):7516-7523. doi: 10.1021/jp101415g.
116. Nishijo J, Moriyama S, Shiota S. *Interactions of cholesterol with cyclodextrins in aqueous solution.* *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2003;51(11):1253-1257. doi: 10.1248/cpb.51.1253.
117. 117a. Higuchi T., Connors KA. *Phase-solubility techniques.* 1965;4(0):212-217.
118. Otero-espinar FJ. *Cyclodextrins in drug delivery systems.* *J Drug Deliv Sci Technol.* 2010;20(4):289-301. doi: 10.1016/S1773-2247(10)50046-7.
119. Todd J, Fishaut M, Kapral F, Welch T. *Toxic-Shock Syndrome Associated With Phage-Group-I Staphylococci.* *Lancet.* 1978;312(8100):1116-1118. doi: 10.1016/S0140-6736(78)92274-2.

120. Giannella RA, Mann EA. ***E coli heat-stable enterotoxin and guanylyl cyclase C: new functions and unsuspected actions.*** *Trans Am Clin Clim Assoc.* 2003;114:66-67.
121. Parker MW, Feil SC. ***Pore-forming protein toxins: from structure to function.*** *Prog Biophys Mol Biol.* 2005;88(1):91-142. doi: [10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.009](https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.009).
122. Tilley SJ, Saibil HR. ***The mechanism of pore formation by bacterial toxins.*** *Curr Opin Struct Biol.* 2006;16(2):230-236. doi: [10.1016/j.sbi.2006.03.008](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.03.008).
123. Parker MW, Buckley JT, Postma JP, et al. ***Structure of the Aeromonas toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states.*** *Nature.* 1994;367(6460):292-295. doi: [10.1038/367292a0](https://doi.org/10.1038/367292a0).
124. Song L, Hobaugh MR, Shustak C, et al. ***Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore.*** *Science.* 1996;274(5294):1859-1866. doi: [10.1126/science.274.5294.1859](https://doi.org/10.1126/science.274.5294.1859).
125. Geny B, Popoff MR. ***Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells.*** *Biol Cell.* 2006;98(11):667-678. doi: [10.1042/BC20050082](https://doi.org/10.1042/BC20050082).
126. Gouaux E, Hobaugh M, Song L. ***alpha-Hemolysin, gamma-hemolysin, and leukocidin from Staphylococcus aureus: distant in sequence but similar in structure.*** *Protein Sci.* 1997;6(12):2631-2635. doi: [10.1002/pro.5560061216](https://doi.org/10.1002/pro.5560061216).
127. McGillivray DJ, Valincius G, Heinrich F, et al. ***Structure of Functional Staphylococcus aureus alpha-Hemolysin Channels in Tethered Bilayer Lipid Membranes.*** *Biophys J.* 2009;96(4):1547-1553. doi: [10.1016/j.bpj.2008.11.020](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.020).
128. 128a. Leung C, Dudkina N V., Lukoyanova N, et al. ***Stepwise visualization of membrane pore formation by suilysin, a bacterial cholesterol-dependent cytolysin.*** *Elife.* 2014;3:e04247. doi: [10.7554/eLife.04247](https://doi.org/10.7554/eLife.04247).
129. Heuck AP, Tweten RK, Johnson AE. ***Assembly and topography of the prepore complex in cholesterol-dependent cytolysins.*** *J Biol Chem.* 2003;278(33):31218-31225. doi: [10.1074/jbc.M303151200](https://doi.org/10.1074/jbc.M303151200).
130. Tweten RK. ***Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins.*** *Infect Immun.* 2005;73(10):6199-6209. doi: [10.1128/IAI.73.10.6199-6209.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6199-6209.2005).
131. Heuck AP, Moe PC, Johnson BB. ***The cholesterol-dependent cytolysin family of gram-positive bacterial toxins.*** *Subcell Biochem.* 2010;51:551-577. doi: [10.1007/978-90-481-8622-8_20](https://doi.org/10.1007/978-90-481-8622-8_20).
132. Ramachandran R, Heuck AP, Tweten RK, Johnson AE. ***Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin.*** *Nat*

- Struct Biol.* 2002;9(11):823-827. doi: [10.1038/nsb855](https://doi.org/10.1038/nsb855).
133. Soltani CE, Hotze EM, Johnson AE, Tweten RK. **Specific protein-membrane contacts are required for prepore and pore assembly by a cholesterol-dependent cytolysin.** *J Biol Chem.* 2007;282(21):15709-15716. doi: [10.1074/jbc.M701173200](https://doi.org/10.1074/jbc.M701173200).
134. Dang TX, Hotze EM, Rouiller I, Tweten RK, Wilson-Kubalek EM. **Prepore to pore transition of a cholesterol-dependent cytolysin visualized by electron microscopy.** *J Struct Biol.* 2005;150(1):100-108. doi: [10.1016/j.jsb.2005.02.003](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.02.003).
135. Boulnois GJ, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew PW. **Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*.** *Mol Microbiol.* 1991;5(11):2611-2616. doi: [10.1111/j.1365-2958.1991.tb01969.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01969.x).
136. Tilley SJ, Orlova E V., Gilbert RJC, Andrew PW, Saibil HR. **Structural Basis of Pore Formation by the Bacterial Toxin Pneumolysin.** *Cell.* 2005;121(2):247-256. doi: [10.1016/j.cell.2005.02.033](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.033).
137. Eschenbach DA. **History and review of bacterial vaginosis.** *Am J Obstet Gynecol.* 1993;169(2 PART 2):441-445. doi: [10.1016/0002-9378\(93\)90337-I](https://doi.org/10.1016/0002-9378(93)90337-I).
138. Cauci S, Monte R, Ropele M, et al. **Pore-forming and haemolytic properties of the *Gardnerella vaginalis* cytolysin.** *Mol Microbiol.* 1993;9(6):1143-1155. doi: [10.1111/j.1365-2958.1993.tb01244.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01244.x).
139. Gelber SE, Aguilar JL, Lewis KLT, Ratner AJ. **Functional and phylogenetic characterization of Vaginolysin, the human-specific cytolysin from *Gardnerella vaginalis*.** *J Bacteriol.* 2008;190(11):3896-3903. doi: [10.1128/JB.01965-07](https://doi.org/10.1128/JB.01965-07).
140. Marriott HM, Mitchell TJ, Dockrell DH. **(14) Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction.** *Curr Mol Med.* 2008;8(6):497-509. doi: [10.2174/156652408785747924](https://doi.org/10.2174/156652408785747924).
141. Shepard LA, Shatursky O, Johnson AE, Tweten RK. **The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: Formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane ??-hairpins.** *Biochemistry.* 2000;39(33):10284-10293. doi: [10.1021/bi000436r](https://doi.org/10.1021/bi000436r).
142. Mulvihill E, Van Pee K, Mari SA, M??ller DJ, Yildiz ??zkan. **Directly Observing the Lipid-Dependent Self-Assembly and Pore-Forming Mechanism of the Cytolytic Toxin *Listeriolysin O*.** *Nano Lett.* 2015;15(10):6965-6973. doi: [10.1021/acs.nanolett.5b02963](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02963).
143. Lukoyanova N, Hoogenboom BW, Saibil HR. **The membrane attack complex,**

- perforin and cholesterol-dependent cytolysin superfamily of pore-forming proteins.* *J Cell Sci.* 2016;129(11):2125-2133. doi: [10.1242/jcs.182741](https://doi.org/10.1242/jcs.182741).
144. Valincius G, Meškauskas T, Ivanauskas F. **Electrochemical impedance spectroscopy of tethered bilayer membranes.** *Langmuir.* 2012;28(1):977-990. doi: [10.1021/la204054g](https://doi.org/10.1021/la204054g).
145. Bavdek A, Gekara NO, Priselac D, et al. **Sterol and pH interdependence in the binding, oligomerization, and pore formation of listeriolysin O.** *Biochemistry.* 2007;46(14):4425-4437. doi: [10.1021/bi602497g](https://doi.org/10.1021/bi602497g).
146. Rebolj K, Ulrih NP, Maček P, Sepčič K. **Steroid structural requirements for interaction of ostreolysin, a lipid-raft binding cytolysin, with lipid monolayers and bilayers.** *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2006;1758(10):1662-1670. doi: [10.1016/j.bbamem.2006.06.003](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.06.003).
147. Valeva A, Hellmann N, Walev I, et al. **Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore.** *J Biol Chem.* 2006;281(36):26014-26021. doi: [10.1074/jbc.M601960200](https://doi.org/10.1074/jbc.M601960200).
148. Sepčič K, Berne S, Rebolj K, et al. *Ostreolysin, a Pore-Forming Protein from the Oyster Mushroom, Interacts Specifically with Membrane Cholesterol-Rich Lipid Domains.* Vol 575.; 2004. doi: [10.1016/j.febslet.2004.07.093](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.093).
149. Budvytyte R, Pleckaityte M, Zvirbliene A, Vanderah DJ, Valincius G. **Reconstitution of Cholesterol-Dependent Vaginolysin into Tethered Phospholipid Bilayers: Implications for Bioanalysis.** Simon SA, ed. *PLoS One.* 2013;8(12):e82536. doi: [10.1371/journal.pone.0082536](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082536).