

Interaksjon av Coenzym Q₁₀ på lipidmonolag

Effekt av ulike konsentrasjoner Coenzym Q₁₀ på lipidmonolag
studert ved Langmuir monolagsteknikk

Torill Regine Sandvik Nilsen



Kjemisk institutt
Universitetet i Bergen

2013

Sammendrag

Biologiske membraner er bygd opp som et bilag bestående av lipider, proteiner og karbohydrater. Coenzym Q₁₀ (CoQ₁₀) utgjør den største fysiologiske formen av ubiquinoner hos dyr og mennesker. Denne forbindelsen har lipidlignende egenskaper og inngår i samtlige av kroppens membraner. CoQ₁₀ er kjent for å ha en viktig rolle i elektrontransportkjeden i cellemembraner samt i membranen som omslutter cellens mitokondrie. CoQ₁₀ utgjør også en viktig antioksidant i biologiske membraner. I denne studien blir det undersøkt hvilken effekt ulike konsentrasjoner av CoQ₁₀ har på ulike lipidmonolag.

Langmuir monolagsteknikk er benyttet til å undersøke CoQ₁₀s interaksjon med lipidmonolag bestående av henholdsvis POPS, DPPC, TLEPB og DEPC. POPS, DPPC og TLEPB er alle biologiske lipider, mens DEPC er et ikke- biologisk glyserofosfolipid. De fleste biologiske glyserofosfolipider har to mettede fettsyrer eller en mettet og en umettet fettsyre i henholdsvis posisjon *sn*-1 og *sn*-2. DEPC avviker fra de biologiske glyserofosfolipidene ved at dette lipidet inneholder to umettede fettsyrer. Langmuir monolagsteknikk tar utgangspunkt i ett av de to lipidmonolagene som sammen utgjør bilaget i biologiske membraner.

Denne studien viser en konsentrasjonsavhengig interkalering av CoQ₁₀ i lipidmonolag av POPS, DPPC, TLEPB og DEPC, hvor CoQ₁₀ påvirker pakkingen av monolagenes lipider. Lokaliseringen av CoQ₁₀ i lipidmonolagene er også funnet å være avhengig av lipidenes struktur. Resultatene fremkommet i denne studien gir grunn til å anta to alternative lokaliseringer av CoQ₁₀ i lipidmonolag; vertikal interkalering av CoQ₁₀ mellom lipidene samt en horisontal organisering over monolagets lipider. Sistnevnte er avhengig av CoQ₁₀-konsentrasjon samt lipidsammensetning i monolaget.

Forord

Denne oppgaven er utført ved kjemisk institutt ved Universitetet i Bergen, som en del av Integrert lektorutdanning med master i naturvitenskap eller matematikk. Arbeidet med oppgaven er utført høsten 2013. Det eksperimentelle arbeidet har funnet sted ved Høgskolen i Bergen, Avdeling for ingeniørutdanning.

En stor takk rettes til Willy Nerdal og Signe Steinkopf for en interessant og spennende oppgave. En ekstra takk går til Signe for hennes engasjement, gode veiledning og konstruktive tilbakemeldinger gjennom arbeidet med oppgaven.

En takk rettes også til Høgskolen i Bergen, Institutt for bio- og kjemiingeniørfag for lån av laboratorium og utstyr slik at oppgaven kunne gjennomføres. Takk også til de ansatte ved instituttet for måten jeg ble mottatt og ivaretatt den tiden jeg var der.

Bergen, desember 2013

Torill Regine Sandvik Nilsen

Innhold

1 INNLEDNING	6
1.1 BAKGRUNN FOR OPPGAVEN	6
1.2 PROBLEMSTILLING	7
2 TEORI	8
2.1 BIOLOGISKE MEMBRANER.....	8
2.1.1 Lipider i biologiske membraner.....	9
2.1.2 Lipid polymorfisme	13
2.1.3 Biologiske membraner- oppbygging og fysikalske egenskaper	15
2.2 BESKRIVELSE AV POPS, DPPC, TLEPB OG DEPC	19
2.2.1 POPS.....	19
2.2.2 DPPC	19
2.2.3 TLEPB	20
2.2.4 DEPC	20
2.3 UBIQUINONER.....	21
2.3.1 Coenzym Q ₁₀	21
2.4 LANGMUIR MONOLAGSTEKNIKK	23
2.4.1 Prinsipp og metode	24
2.4.2 Faseoverganger	26
3 MATERIAL OG METODE	28
3.1 LANGMUIR- INSTRUMENTET.....	28
3.2 TILLAGING AV LØSNINGER	29
3.2.1 HEPESBUFFER.....	29
3.2.2 Lipider og CoQ ₁₀	29
3.3 EKSPERIMENTELL UTFØRELSE.....	31
3.4 REAGENSER	32
4 RESULTATER.....	34
4.1 RESULTATER AV RENE LIPIDLØSNINGER.....	35
4.2 RESULTATER AV POPS I BLANDING MED COQ ₁₀	37
4.3 RESULTATER AV DPPC I BLANDING MED COQ ₁₀	40
4.4 RESULTATER AV TLEPB I BLANDING MED COQ ₁₀	42
4.5 RESULTATER AV DEPC I BLANDING MED COQ ₁₀	44

5 DISKUSJON	46
5.1 SAMMENLIGNING AV RENE LIPIDLØSNINGER	47
5.2 SAMMENLIGNING AV POPS I BLANDING MED COQ ₁₀	50
5.3 SAMMENLIGNING AV DPPC I BLANDING MED COQ ₁₀	53
5.4 SAMMENLIGNING AV TLEPB I BLANDING MED COQ ₁₀	56
5.5 SAMMENLIGNING AV DEPC I BLANDING MED COQ ₁₀	58
6 KONKLUSJON	61
7 VIDERE ARBEID	63
8 FORKORTELSER.....	64
9 REFERANSER.....	65
10 VEDLEGG	71

1 Innledning

I denne oppgaven er det undersøkt hvilken effekt ulike konsentrasjoner av CoQ₁₀ har på monolag av ulike lipider. I det eksperimentelle arbeidet er Langmuir monolagsteknikk benyttet, et modellsystem som tar utgangspunkt i ett av de to lipidmonolagene som sammen utgjør et lipidbilag.

CoQ₁₀ er en lipidlignende, fettløselig forbindelse kjent for å ha en viktig rolle i elektrontransportkjeden i biologiske membraner. CoQ₁₀ er i tillegg kjent for å ha antioksiderende egenskaper. Lipidene benyttet i det eksperimentelle arbeidet er 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (POPS), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), totalt lipidekstrakt fra grisehjerne (TLEPB) og 1,2-dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DEPC). POPS, DPPC og TLEPB er biologiske lipider, mens DEPC er et ikke- biologisk lipid.

1.1 Bakgrunn for oppgaven

CoQ₁₀ er bygd opp av et redoks- aktivt benzoquinon- ringsystem og en hydrofob sidekjede bestående av 50 karbonatomer som sammen utgjør ti isopren- enheter. Sidekjedens hydrofobe egenskaper fremmer interaksjoner mellom sidekjeden og molekyler med lav grad av polaritet. CoQ₁₀ antas dermed hovedsakelig å være lokalisert i den hydrofobe delen av biologiske membraner.

CoQ₁₀ er kjent for å ha en viktig rolle i elektrontransportkjeden i biologiske membraner, og er også kjent som en lipid- løselig antioksidant. Videre antas forbindelsen å være involvert i sykdommer som Huntingtons sykdom, Parkinsons sykdom og amyotrofisk lateralsklerose [1,2,3]. Økt kunnskap om CoQ₁₀s lokalisering og mekanisme i elektrontransportprosesser i biologiske membraner er følgelig av interesse. Flere studier av CoQ₁₀s egenskaper er utført, blant annet undersøkelser basert på CoQ₁₀s termodynamiske egenskaper i ulike modellsystemer [4]. En viktig faktor forblir imidlertid fortsatt uklar, nemlig CoQ₁₀s lokalisering i biologiske membraner. Flere studier av CoQ₁₀s organisering i lipidbilag er gjennomført, og resultatene fra disse er utvetydige.

I denne studien ble det undersøkt hvilken effekt ulike konsentrasjoner av CoQ₁₀ har på monolag av glyserofosfolipidene POPS, DPPC og DEPC samt TLEPB. Naturlig forekommende bilag i humane celler har komplekse lipidsammensetninger. Med unntak av det ikke- biologiske lipidet DEPC, finnes samtlige av de beskrevne lipidene i animalske cellemembraner. Målet med studien er å få større kunnskap om de interaksjoner som finner sted mellom CoQ₁₀ og lipider i biologiske membraner, samt bidra til å øke forståelsen av CoQ₁₀s lokalisering i lipidbilag.

1.2 Problemstilling

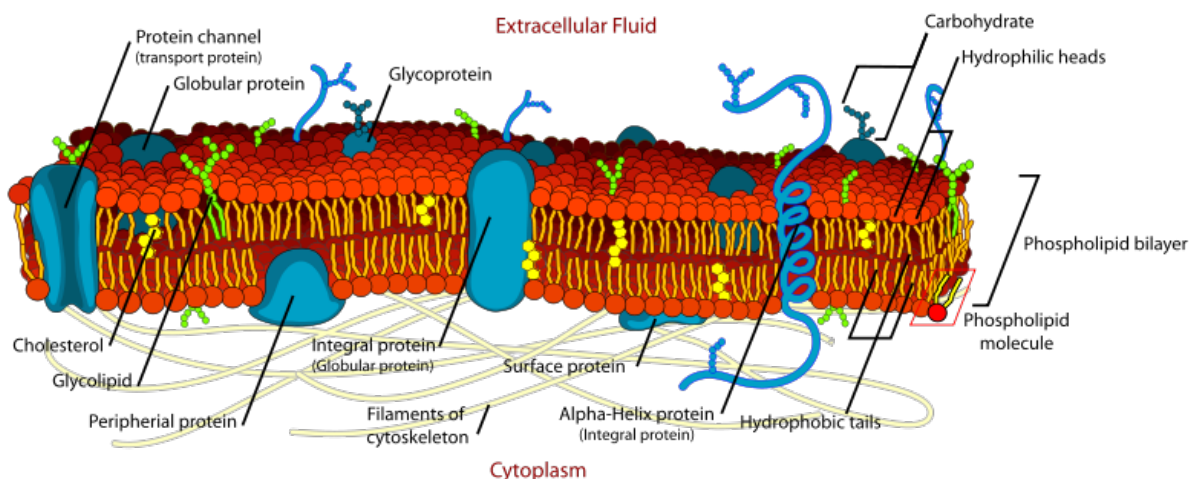
Problemstillingen i denne oppgaven er å undersøke effekten ulike konsentrasjoner av CoQ₁₀ har på monolag av lipidene POPS, DPPC, TLEPB og DEPC. Det blir i tillegg undersøkt om effekten av CoQ₁₀ er ulik på monolag av biologiske lipider og ikke- biologiske lipider.

Tidligere studier av CoQ₁₀s interkalering i monolag og bilag av DPPC er kjent. Konsentrasjonen av CoQ₁₀ benyttet i disse studiene er dog høyere enn konsentrasjonsforholdene undersøkt i denne studien. Studier av CoQ₁₀s interkalering i monolag av POPS, TLEPB og DEPC er til nå ikke kjent. I denne studien er følgende konsentrasjonsforhold av CoQ₁₀ undersøkt; 0, 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. To av disse konsentrasjonsforholdene er innenfor det biologiske konsentrasjonsområdet på 1-3 mol% CoQ₁₀. De eksperimentelle forsøkene ble utført ved romtemperatur og pH 7,40.

2 Teori

2.1 Biologiske membraner

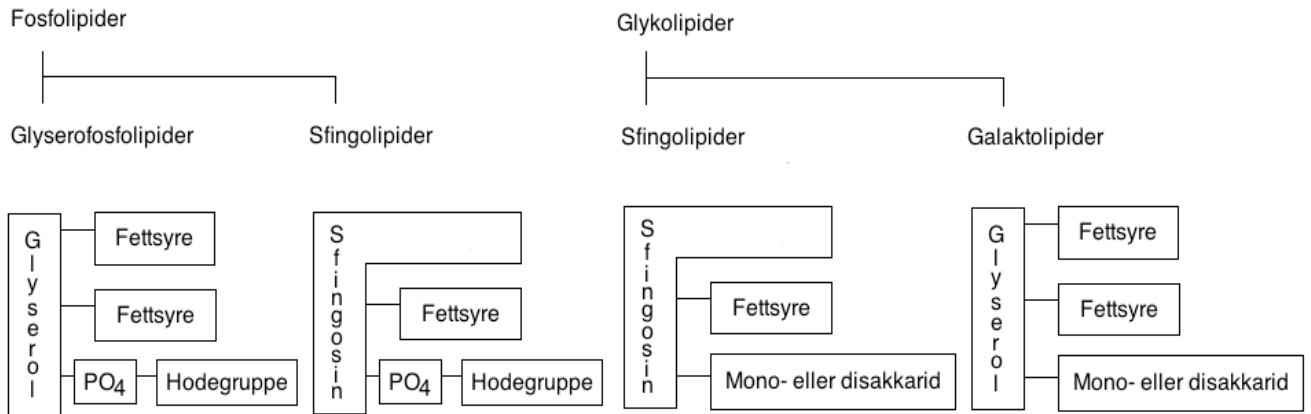
En celle er den strukturelle og funksjonelle grunnenheten hos alle levende organismer. Celler kan vokse, reprodusere ved celledeling, de har metabolisme samt at de kan respondere på stimuli. Hos mennesker og dyr består kroppen av milliarder av celler. Mangfoldet av cellyper er stort, og hver av dem har unike egenskaper. Samtlige celler har likevel til felles at de er omsluttet av en biologisk membran. Biologiske membraner skiller cellenes indre og ytre rom. De regulerer også cellenes intracellulære miljø ved å slippe nærings- og avfallsstoffer henholdsvis inn og ut av cellen. Membraner omslutter også cellens organeller fra cytoplasma. Biologiske membraner er satt sammen av ulike lipider (glyserofosfolipider, glykolipider og steroider) samt proteiner og karbohydrater [5, 6]. Glyserofosfolipider utgjør størst andel av lipidene i biologiske membraner. Lipider har amfifile egenskaper, hvilket betyr at de har en polar hodegruppe og upolare hydrokarbonkjeder. I et vandig miljø vil de polare hodegruppene orientere seg mot andre polare molekyler, mens lipidenes upolare grupper vil interagere med hverandre. På grunn av den hydrofobe effekten, vil lipidene spontant danne et dobbeltsjikt- et bilag [7]. I bilaget vil de hydrofobe kjedene orienteres mot hverandre og danne et hydrofobt sjikt, mens de polare hodegruppene vil vende ut mot cellens vandige indre og ytre rom [5]. Lipidbilaget gir membranen dens grunnleggende struktur og fungerer som en permeabilitetsbarriere. Membranproteinene er sentrale for de fleste av membranens funksjoner [6].



Figur 2.1.1: Skjematisk tegning av en biologisk membran med lipiddbilag, proteiner og karbohydrater [8].

2.1.1 Lipider i biologiske membraner

Lipider utgjør en stor og variert gruppe av biologiske molekyler. Felles for dem alle er imidlertid deres amfifile egenskaper, hvilket vil si at de har en asymmetrisk struktur med en polar del og en upolar del. Lipider er viktige strukturelle komponenter i biologiske membraner, og kan deles inn i følgende klasser; glyserofosfolipid, glykolipid og kolesterol.

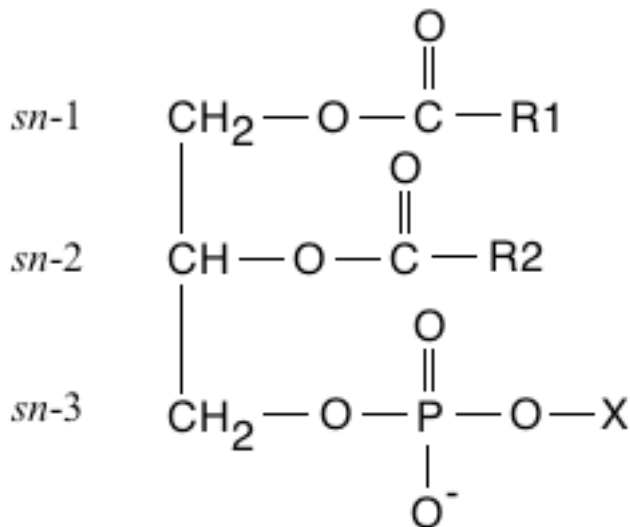


Figur 2.1.1.1: Oversikt over et utvalg lipider som finnes i biologiske membraner; fosfolipider og glykolipider. Figuren viser også skjematiske strukturer for de ulike lipidene.

Glyserofosfolipid

Glyserofosfolipider, heretter kalt fosfolipider, har et glyserolmolekyl som rygggrad. Bundet til glyserolmolekylet er to fettsyurer samt en polar hodegruppe. Fettsyrene utgjør lipidets hydrofobe haler. Glyserol (propan-1,2,3-triol) er et prokiralt molekyl, slik at binding av ulike grupper til molekylets sentrale karbonatom vil gi et kiralt molekyl. Stereokjemien til fosfolipidene angis ved hjelp av stereospesifikk nummerering (*sn*). Fischer-prosjeksjon kan brukes til å presentere glyserolmolekylet. Når hydroksylgruppen bundet til glyserolmolekylets prokirale karbonatom er orientert mot venstre, nummereres karbonatomene 1, 2 og 3 fra henholdsvis topp til bunn [9].

Fosfolipiders polare hodegruppe er forankret, via en fosfodiesterbinding, til glyserolmolekylet i posisjon *sn*-3. Lipidenes langkjedete fettsyrer er forankret gjennom esterbindinger i posisjonene *sn*-1 og *sn*-2. En stor andel fosfolipider inneholder en mettet og en umettet fettsyre i henholdsvis posisjon *sn*-1 og *sn*-2. Fettsyrene, både mettede og umettede, inneholder vanligvis mellom 12 og 22 karbonatomer. Umettede fettsyrer har som regel *cis* konfigurasjon, og dobbeltbindingene i flerumettede fettsyrer skiller ofte av en metylgruppe [9].

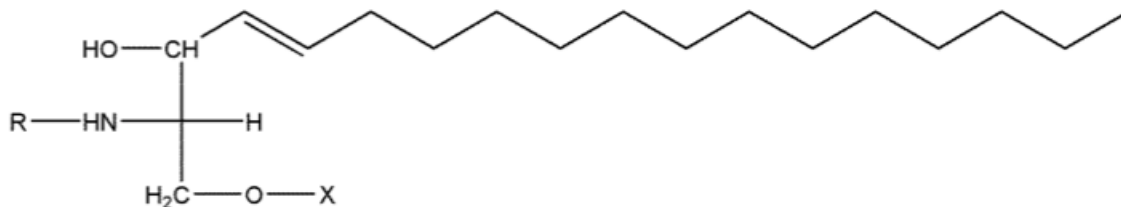


Figur 2.1.1.2: Generell strukturformel av et fosfolipid med et glyserolmolekyl som ryggrad. Molekylets acylkjeder og hodegruppe er merket henholdsvis R1, R2 og X. Stereospesifikk nummerering er vist i figuren.

Fosfolipider i eukaryote cellemembraner inneholder ofte en blanding av ulike fettsyrer. Disse fettsyrene kan ha stor variasjon med hensyn til kjedens lengde, grad av metning samt karbon-karbon dobbeltbindingens posisjon på kjeden. I tillegg til variasjon blant fettsyrene, kan fosfolipider bindes til ulike hodegrupper, eksempelvis fosfatidylcholine (PC), fosfatidyletanolamin (PE) og fosfatidylserin (PS). Fosfolipider klassifiseres etter hodegruppen bundet til glyserolmolekylet. En gitt celletype kan inneholde opptil flere hundre klasser fosfolipider [10]. Fosfolipidene utgjør omtrent 70% av det totale lipidinnholdet i animalske celler, hvor PC har størst forekomst etterfulgt av PE. Disse lipidene utgjør henholdsvis 40- 50% og 20- 45% av fosfolipidene. Fosfatidylinositol (PI), PS og fosfatidinsyre (PA) finnes i mindre mengder [11].

Sfingolipid

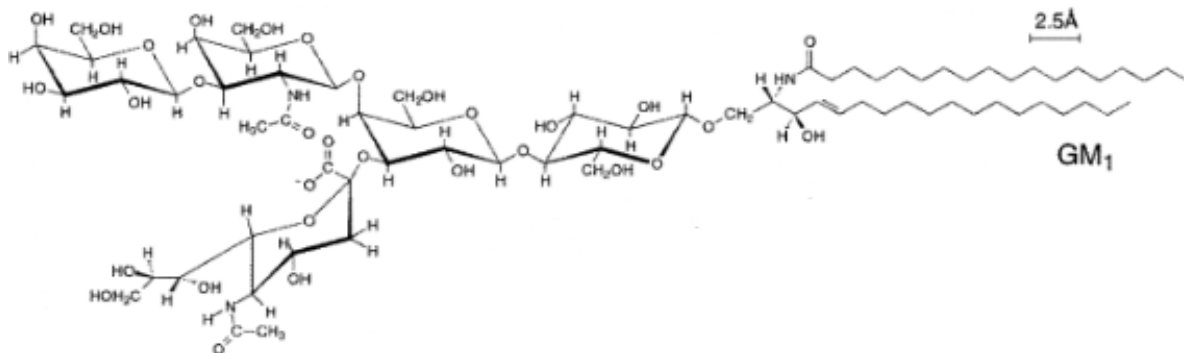
Sfingolipider er en kompleks gruppe av lipider bygget opp rundt en langkjedet aminoalkohol som ryggrad i molekylet. Flere typer aminoalkoholer finnes blant sfingolipidene, hvor sfingosin utgjør den vanligste. Sfingosin er en aminoalkohol med en umettet hydrokarbonkjede. Hos sfingolipidene er sfingosin bundet til en langkjedet acylkjede og en polar hodegruppe. Lengden på den amid- bundne acylkjeden kan variere fra vev til vev. Denne acylkjeden kan være mettet eller umettet. Sfingolipider inngår som en viktig del av cellemembraner i eukaryote celler [12].



Figur 2.1.1.3: Generell strukturformel for sfingolipid. Molekylets hydrofobe acylkjede og hydrofile hodegruppe er merket henholdsvis R og X [13].

Ceramider er N- acylerte sfingosinbaser som mangler hodegrupper. Disse forbindelsene fungerer som en felles strukturell enhet for alle sfingolipider. Sfingolipidene kan deles inn i enkle og mer komplekse sfingolipider. Enkle sfingolipider utgjør tidlige produkter i sfingolipidsyntesen, og omfatter molekyler som sfingosinbaser og ceramider. Komplekse sfingolipider dannes ved addisjon av hodegrupper til ceramider i molekylets 1- hydrokso- posisjon, og inkluderer blant andre sfingomyelin og glykosfingolipider. Sfingomyelin er et sentralt lipid i plasmamembraner hos animalske celler, og har PC eller PE bundet som hodegruppe i 1- hydrokso- posisjon [14]. På grunn av molekylets hodegruppe, klassifiseres sfingomyelin som et fosfolipid. Glykosfingolipider har en eller flere sukkerenheter bundet i 1- hydrokso- posisjon. Cerebrosider, som er bundet til en sukkerenhet, er et eksempel på et glykosfingolipid. Gangliosider er de mest komplekse glykosfingolipidene, og inneholder minst tre sukkerenheter og en eller flere sialinsyre- enheter. Syren gir lipidet en negativ ladning under fysiologiske forhold. Gangliosider finnes hovedsakelig i membranens ytre monolag, hvor de har en sentral rolle i cellulære funksjoner som cellegjenkjenning, signaloverføring samt vevsutvikling [15]. Som følge av store hodegrupper hos gangliosidene,

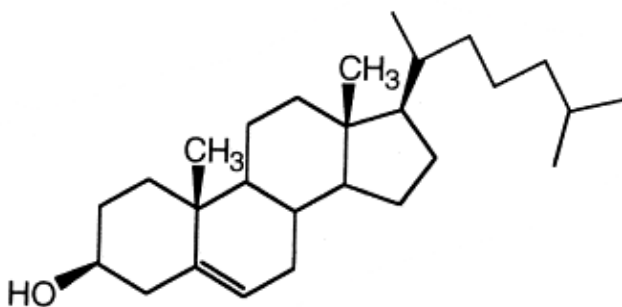
kan disse forbindelsene også bidra til å kamouflere mindre molekyler i membranen, for eksempel kolesterol.



Figur 2.1.1.4: Strukturformel for et gangliosid. Figuren viser gangliosidet galactosyl-N-acetylgalactosaminyln(N-acetyl-neuraminyl)galactosylglucosylceramide (GM1) [15].

Steroider


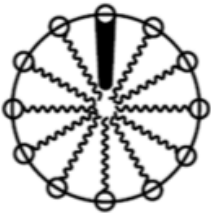

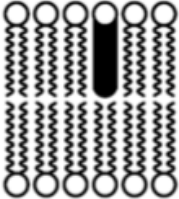

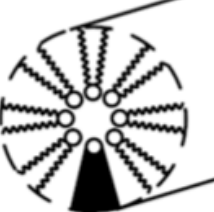
En steroid er en strukturell enhet i de fleste eukaryote cellemembraner. Steroidene er bygget opp av et tilnærmet planart og rigid ringsystem bestående av fire ringer, hvorav tre av ringene har seks karbonatomer og en har fem karbonatomer. Flere ulike steroider finnes, hvor de forskjellige steroidene har ulike funksjonelle grupper bundet til ringsystemet. Kolesterol er den vanligste steroiden i animalske celler, og finnes i varierende konsentrasjon i ulike vevstyper. Kolesterol er bygd opp av steroidenes ringsystem samt en polar hodegruppe og en alkylkjede. Andelen av kolesterol er høyere i plasmamembraner enn i membraner som omslutter cellens organeller. Det er også antatt at kolesterol har en asymmetrisk fordeling mellom bilagets to monolag [16]. Kolesterolmolekylet har amfifatiske egenskaper hvor hydroksylgruppen utgjør den hydrofile hodegruppen og ringsystemet samt alkylkjeden utgjør den hydrofobe delen. Kolesterol har flere funksjoner i eukaryote celler, hvor de viktigste er å redusere permeabiliteten samt å øke stabiliteten i membranens bilag [17].



Figur 2.1.1.5: Strukturformel for kolesterol [16].

2.1.2 Lipid polymorfisme

Som følge av lipidenes amfifile egenskaper vil de spontant danne aggregater når de kommer i kontakt med vann. Lipidene innrettes da slik at den hydrofile delen er i kontakt med vann, mens de hydrofobe delene vil interagere med hydrofobe komponenter hos andre molekyler [7]. Aggregatene blir holdt sammen av ikke- kovalente krefter, eksempelvis van der Waals krefter og hydrofobe interaksjoner. Aggregatdannelse er energetisk favorisert, da det bidrar til å redusere kontaktflaten mellom lipidenes hydrofobe grupper og vann. Avhengig av størrelsen på det enkelte lipids hydrofile og hydrofobe grupper, kan lipidene inngå i ulike former for aggregater. Alternative innordninger er eksempelvis miceller, lammellær fase og heksagonal fase. Miceller er sfæriske partikler med en solvatisert overflate og en hydrofob kjerne [7]. Micelledannelse favoriseres av lipider der hodegruppens areal er større enn tverrsnittet av halene. Disse lipidene omtales som kjegleformet. Hos de fleste membranlipider er imidlertid hodegruppens areal i lignende størrelse med tverrsnittet av lipidets to haler. Membranlipider beskrives derfor som sylindrerformet. Sylindrerformete lipider har større halegrupper enn kjegleformete lipider, og vil således ikke få plass i en micelle. Sylindrerformete lipider danner imidlertid andre former for aggregater; bilag og vesikler. Et bilag er en lammellær fase bestående av to monolag av lipider. I bilaget vil lipidenes polare grupper orienteres mot bilagets overflate hvor de interagerer med vann, mens de hydrofobe gruppene vil rettes mot midten av bilaget og danne et sentralt, hydrofobt sjikt. I flate bilag vil hydrofobe grupper langs bilagets kanter eksponeres for vann. For å unngå dette, vil bilagene kurves og danne en vesikkel. Vesikkeldannelse resulterer i at det blir dannet en lukket struktur som inneholder en vandig løsning [7]. Dannelse av bilag og vesikler er avhengig av lipidtype, forholdet mellom lipidene, hydrering, temperatur samt trykk og ionestyrke. Øvrige former for aggregatstrukturer er inverterte miceller eller invertert heksagonal aggregatstruktur laget av lipider med invertert kjegleform, for eksempel PE. I disse aggregatene er lipidenes hodegrupper orientert inn mot sentrum, mens halegruppene vender utover hvor de er i kontakt med halegrupper i nabosylindren. En siste aggregatstruktur er kubisk fase, hvor lipidene danner et komplekst, tredimensjonalt gitter. Forekomst av ulike lipidfaser i membranbilag er vist å kunne ha betydning for membraners struktur og funksjoner [18].

Lipidtype	Molekyl form	Aggregat dannet
Monoacylfosfolipid Detergenter	 Kjegle	 Micelle
Fosfatidylcholin Sfingomyelin Fosfatidylserin Fosfatidylinositol Fosfatidylglyserol Fosfatidylsyre Difosfatidylglyserol Di-sukker diacylglyserol	 Sylinder	 Bilag
Umettet pasfatidyletanolamin Fosfatidylsyre + Ca ²⁺ Di fosfatidylglyserol + Ca ²⁺ Monosukker diacylglyserol	 Invertert kjegle	 Invertert micelle eller heksagonal (H _{II})

Figur 2.1.2.1: Figuren viser et utvalg aggregater som dannes når lipider kommer i kontakt med vann; micelle, bilag og invertert micelle. Disse aggregatene dannes av molekyler med henholdsvis kjegle,- sylinder- og invertert kjegleform, som vist i figuren. Representanter for de ulike molekylformene er presentert til venstre i figuren [19].

2.1.3 Biologiske membraner- oppbygging og fysikalske egenskaper

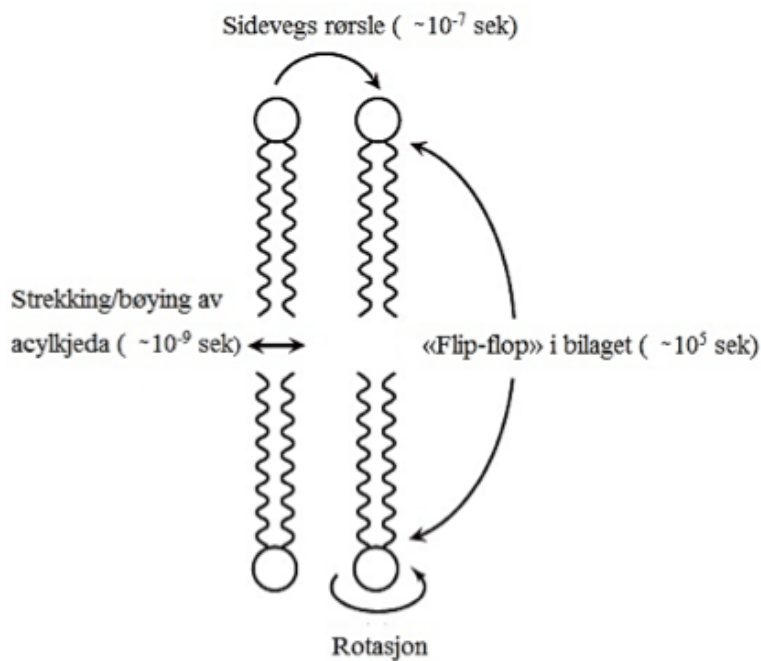
Det finnes flere typer biologiske membraner; plasmamembraner som skiller en celled indre og ytre miljø, samt membraner som omslutter cellens organeller. Oppbygningen av biologiske membraner avhenger av organismen membranen finnes i, vevstype, organ og celletype det gjelder samt hvilken av cellens organeller membranen omslutter. De fleste membraner har imidlertid en total tykkelse på 30- 40 Å, hvor den hydrofobe kjernen utgjør 25- 30 Å. Membraners eksakte tykkelse varierer avhengig av acylkjedenes lengde og metning. Innføring av en dobbeltbinding i en acylkjede gir en knekk i karbonkjeden. Som følge av dette kan acylkjedene orienteres ulikt. Interaksjon med andre molekyler i membranen kan også bidra til å påvirke membranens tykkelse. For eksempel kan lipidenes hodegrupper, med deres ulike størrelser, ha ulik avstand til membranens senter avhengig av interaksjon med hodegruppene hos nabolipidene [7].

Naturlig forekommende lipidbilag består av en blanding av ulike lipider. Bilagene beskrives ofte som asymmetriske, da bilagets to monolag sjelden har identisk lipidsammensetning. Glykospingolipider finnes for eksempel hovedsakelig i membranens ytre monolag. Lipider som inneholder cholin i hodegruppen (sfingomyelin og PC) er også å finne i det ytre monolaget, mens PS vanligvis finnes i membranens indre monolag [7].

Lipider er den strukturelle hovedkomponenten i biologiske membraner. Membraner inneholder imidlertid også en rekke proteiner. Membranproteiner er avgjørende for de fleste av membranens funksjoner. Hos en gjennomsnittlig plasmamembran utgjør proteinene mellom 40- 60% av den totale massen [20]. Det må imidlertid tas i betraktning at lipidmolekylene er små sammenlignet med proteinmolekylene, og at det som følge av dette vil være langt flere lipider enn proteiner i membranen. Membranproteiner blir delt inn i to grupper avhengig av deres interaksjon med den hydrofobe kjernen i lipidbilaget; integrerte proteiner og perifere proteiner. Integrerte proteiner, også kalt transmembrane proteiner, har segmenter av hydrofob karakter og kan trenge gjennom hele lipidbilaget. Proteinene eksponeres dermed for både bilagets hydrofobe sjikt samt dets vandige miljø på begge sider av membranen. Hydrofob interaksjon fører til at integrerte membranproteiner er sterkt knyttet til lipidbilaget. Sterk interaksjon mellom lipider og proteiner i en membran kan resultere i at en endring i membranstrukturen påvirker proteinenes struktur. Perifere proteiner er løst

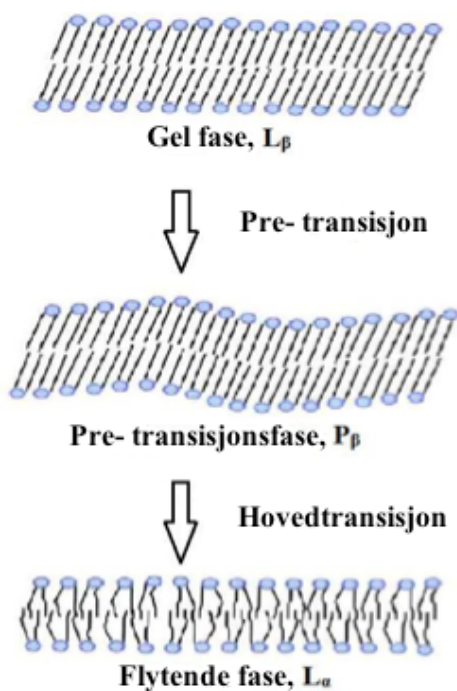
bundet til bilaget gjennom interaksjoner med lipidenes hodegrupper eller integrerte membranproteiner [7].

Lipidbilag kan være vanskelige å beskrive presist, da de ikke har noen statisk struktur. Singer og Nicholson presenterte i 1972 den flytende mosaikk modellen, en modell som danner grunnlaget for dagens forståelse av membraners oppbygning og funksjoner. Den hydrofobe kjernen beskrives her som delvis flytende, tilsvarende en todimensjonal orientert viskøs løsning [5]. Lipidbilagets dynamiske struktur kan relateres til de ikke-kovalente bindingene mellom individuelle lipider og mellom lipider og proteiner i bilaget. Lipider kan raskt forflyttes fra et sted i bilaget til et annet, de kan rotere rundt sin egen akse samt at de kan bytte plass med lipid i det motstående monolaget innen et bilag ("flip-flop").



Figur 2.1.3.1: Alternative bevegelsesmønstre for lipider i bilag. Tiden hver enkelt bevegelse bruker er vist i parentes [19].

Biologiske membraners fluiditet kan beskrives ved hjelp av smeltepunktet, også kalt transisjonstemperaturen T_m . Ved denne temperaturen går lipidene fra å være i en gel fase (L_β), som er en ordnet krystallinsk fase, til en væskefase (L_α) [7]. Denne transisjonen skjer via en pre- transisjonsfase, P_β , som er en væske- ordnet fase. Ved L_β er lipidenes acylkjeder pakket sammen ved hjelp av van der Waals bindinger, og de blir sagt å ha all- *trans*- konfigurasjon. Ved L_α kan metyl- gruppene i acylkjedene rotere fritt rundt, og lipidene har *gauche*- konfigurasjon. Overgangen fra L_β til L_α resulterer i at lipidene tar større plass i bilaget, samt at tykkelsen på bilaget reduseres.



Figur 2.1.3.2: Skisse av faseovergang fra gelfase (L_β) (all- *trans*- konfigurasjon), via pre- transisjonsfase (P_β), til væskefase (L_α) (*gauche*- konfigurasjon) [21].

Alle lipider har en unik transisjonstemperatur, T_m , hvor de gjennomgår faseovergang fra L_β , via P_β , til L_α [22]. Transisjonstemperaturen til en acylkjede avhenger både av dens lengde og metningsgrad. For en mettet acylkjede vil transisjonstemperaturen øke med økende kjedelengde. Dette skyldes at det trengs mer energi (høyere temperatur) for å bryte van der Waals interaksjonene som finner sted mellom lengre acylkjeder. Kortere acylkjeder smelter ved lavere temperaturer, da overflaten tilgjengelig til å ta del i van der Waals interaksjoner er mindre [7]. Det er også vist at introduksjon av dobbeltbindinger i lipidets *sn*-2 posisjon kan påvirke lipidets transisjonstemperatur. Denne effekten har imidlertid vist seg å være avhengig

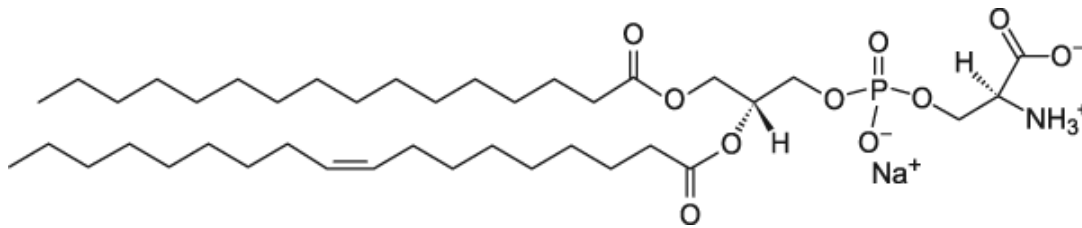
av *cis*- bindingens posisjon i acylkjeden. Innføring av dobbeltbindinger resulterer i mindre effektiv pakking av acylkjedene i bilaget. Denne effekten forsterkes ved innføring av ytterligere en dobbeltbinding, men reduseres ved innføring av en tredje dobbeltbinding til acylkjeden [10]. Generelt kan det sies at lengre acylkjeder har en tendens til å være mindre mobile og mer krystallinske enn kortere kjeder, og at mettede kjeder er mindre mobile enn umettede kjeder. Siden en flytende biologisk membran er viktig for en rekke metabolske prosesser, bestreber enhver organisme å opprettholde en konstant membranfluiditet ved å justere lipidsammensetningen i bilaget. Membranene hos de fleste organismer har flytende struktur over et bredt temperaturområde. Dette skyldes delvis at membranene består av et mangfold av lipider, og gjennomgår dermed ikke en markert overgang mellom L_{β} , og L_{α} . Tilstedeværelse av kolesterol vil i tillegg bidra til opprettholdelse av en konstant membranfluiditet over et bredt temperaturområde. Sistnevnte skjer ved hjelp av følgende to mekanismer; kolesterol reduserer membranfluiditeten lokalt ved at molekylets rigide og plane ringsystem hindrer bevegelse av nærliggende acylkjeder, samt at det øker membranfluiditeten lokalt ved å gå inn mellom lipidene og hindre deres tette pakking [7].

2.2 Beskrivelse av POPS, DPPC, TLEPB og DEPC

Under er det gitt en beskrivelse av TLEPB og de ulike fosfolipidene benyttet i det eksperimentelle arbeidet; POPS, DPPC, og DEPC. Samtlige av fosfolipidene hører til under gruppen glyserofosfolipider, men har ulike halegrupper og/eller hodegrupper.

2.2.1 POPS

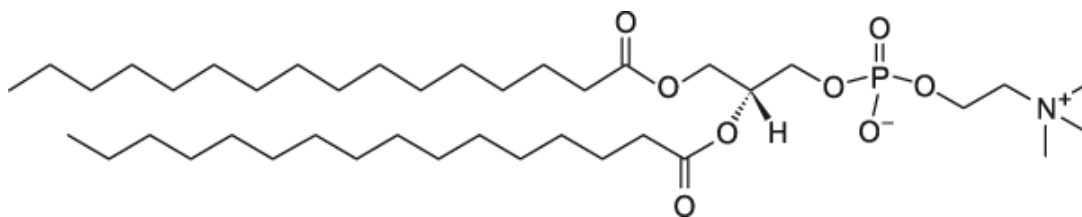
1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (POPS) har hodegruppen serin bundet til fosfatgruppen i posisjon *sn*-3 på glyserolmolekylet, og omtales som fosfatidylserin (PS) [11]. Acylkjeden i posisjon *sn*-1 er palmitinsyre, en mettet fettsyre bestående av 16 karbonatomer (16:0) [23]. Acylkjeden i posisjon *sn*-2 er oleinsyre og består av 18 karbonatomer og har en dobbeltbinding ved karbonatom 9 (18:1) [24]. POPS har nettoladning -1 ved pH 7,4. Molekylær masse er 783,988 g/mol [25]. Molekylets struktur er vist i figur 2.2.1.1.



Figur 2.2.1.1: Strukturformel av POPS [25].

2.2.2 DPPC

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) har en cholingruppe bundet til fosfatgruppen i posisjon *sn*-3 på glyserolmolekylet, og klassifiseres som fosfatidylcholin (PC). Acylkjedene i posisjon *sn*-1 og *sn*-2 er begge mettet palmitinsyre, og består av 16 karbonatomer (16:0/16:0) [23]. DPPC har nettoladning 0 ved pH 7,4. Molekylær masse er 734,039 g/mol [26]. Molekylets struktur er vist i figur 2.2.2.1.



Figur 2.2.2.1: Strukturformel av DPPC [26].

2.2.3 TLEPB

Brain Total Lipid Extract (TLEPB) fra grisehjerne består av en blanding av ulike lipider.

Sammensetningen av ekstraktet er:

- Fosfatidyletanolamin (PE), 16,7 %
- Fosfatidylserin (PS), 10,6 %
- Fosfatidylcholin (PC), 9,6 %
- Fosfatidinsyre (PA), 2,8 %
- Fosfatidylinositol (PI), 1,6 % [27]

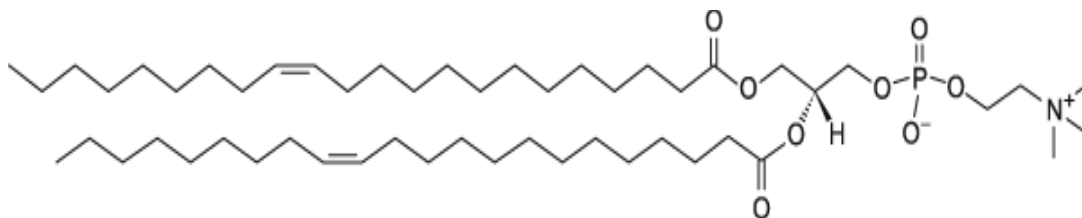
De resterende 58,7 % består av andre lipider som:

- Kolesterol, ca. 20 %
- Sfingomyelin, ca. 10 %
- Gangliosid, ca. 20 %
- Ceramid, mindre enn 10 % [28]

Gjennomsnittlig molekylær masse for TLEPB er bestemt til å være 827,00 g/mol [28]

2.2.4 DEPC

1,2-dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DEPC) har en cholingruppe bundet til fosfatgruppen i posisjon *sn*-3 på glyserolmolekylet, og klassifiseres som fosfatidylcholin (PC). Acylkjedene i posisjon *sn*-1 og *sn*-2 består begge av 22 karbonatomer, og har begge en dobbeltbinding ved karbonatom 13 (22:1/22:1) [29]. DEPC har nettoladning 0 ved pH 7,4. Molekylær masse er 898,326 g/mol [30]. Molekylets struktur er vist i figur 2.2.4.1.



Figur 2.2.4.1: Strukturformel av DEPC [30].

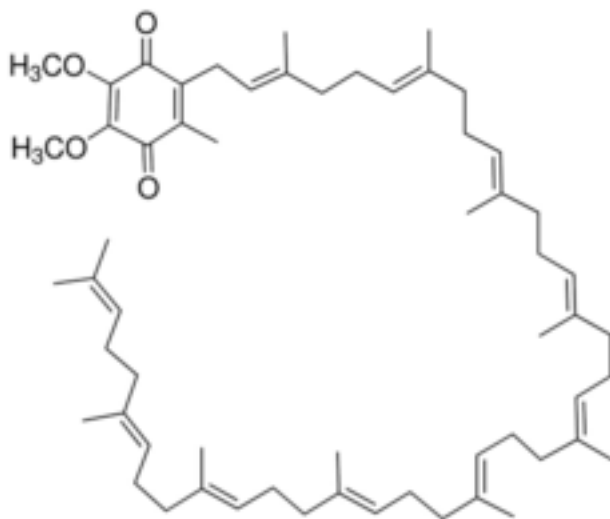
2.3 Ubiquinoner

Ubiquinoner, også kalt Coenzyme Q (CoQ), er små, organiske forbindelser bygd opp av en 2,3-dimethoxy-5-methylbenzoquinon ring med en hydrofob sidekjede bestående av repeterende isopren- enheter bundet i ringstrukturens sjette posisjon. Ubiquinonene (UQ_n) avviker fra hverandre ved lengden på sidekjedene som består av mellom to og ti isopren- enheter. Lengden på sidekjeden er vist ved et nummer angitt etter navnet, eksempelvis ubiquinon 10 (UQ_{10}) med ti isopren- enheter i sidekjeden [31,32]. Molekylene er lipofile samt har kjemiske egenskaper knyttet til deltagelse i reduksjons- og oksidasjonsprosesser. Ubiquinoner er kjent for å fungere som mobile lipofile redoks- komponenter i transmembrane elektrontransportsystemer hos prokaryote og eukaryote organismer.

2.3.1 Coenzym Q_{10}

Ubiquinon 10, også kalt Coenzym Q_{10} (CoQ_{10}), er den største fysiologiske formen av ubiquinoner hos dyr og mennesker. Forbindelsen er lipidlignende, fettløselig og finnes i kroppens celler og membraner. CoQ_{10} ble isolert for første gang i 1957 fra mitokondria i hjertevev hos storfe av F. L. Crane [33]. CoQ_{10} er satt sammen av en 2,3-dimethoxy-5-methylbenzoquinonring samt en sidekjede bestående av 50 karbonatomer som sammen utgjør ti isopren- enheter. Molekylets ringsystem er redoks- aktivt, hvilket betyr at det deltar i reduksjons- og oksidasjonsreaksjoner. Polyisopren sidekjeden har hydrofobe egenskaper, noe som fremmer molekylære interaksjoner mellom sidekjeden og molekyler med lav polaritet [34]. Sistnevnte medfører at CoQ_{10} i all hovedsak finnes i den hydrofobe delen av membranens bilag, hvilket i sin tur øker det redoks- aktive benzoquinon- ringsystemets diffusjonsevne i membranen [35]. Studier av ubiquinoners lokalisering i membranens bilag viser utvetydige resultater. På modellmembraner av DPPC- bilag viser flere studier at CoQ_{10} s polyisoprene domene er plassert i senter av den hydrofobe kjernen parallelt til membranens plan, og ikke parallelt til lipidenes acylkjeder. Metoder benyttet i disse studiene er nøytrondiffraksjon [36], kjernemagnetisk resonans (NMR) [37] og differensiell scanning kalorimetri (DSC) [38, 39]. Andre studier foreslår imidlertid at CoQ_{10} lokaliseres mellom lipidene, parallelt til lipidenes acylkjeder. Blant disse er flere NMR- studier [40, 41, 35]. DPPC er benyttet i samtlige av studiene, med unntak av studiet utført av Wilhelmsen et al. [35], hvor bilag av POPS er benyttet. Det er også gjort undersøkelser av CoQ_{10} s

lokalisering i monolag av DPPC [4]. Det anslås der to alternative lokaliseringer av CoQ₁₀ i monolaget; parallelt til membranens plan og mellom lipidene, parallelt til lipidenes acylkjeder. CoQ₁₀ er kjent for å ha en viktig rolle i elektrontransportkjeden i lipidmembraner og i membranen hos cellens mitokondrie [42]. Det er også kjent at CoQ₁₀, i redusert form, fungerer som en lipid- løselig antioksidant. Denne egenskapen bidrar til at CoQ₁₀ blant annet beskytter mot lipid peroksidering i cellemembranene [43, 44], det forhindrer skader på DNA samt serum low- density lipoprotein (LDL) peroksidering [43]. Videre er det antatt at CoQ₁₀ er involvert i sykdommer som Huntingtons sykdom, Parkinsons sykdom og amyotrofisk lateralsklerose [1, 2, 3].



Figur 2.3.1.1: Strukturformel av CoQ₁₀ [45].

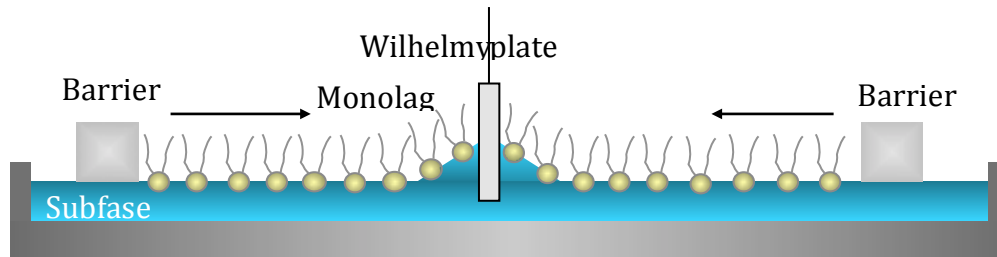
2.4 Langmuir monolagsteknikk

I kontakt med vann danner lipider et tynt, flytende monolag på vannets overflate. Dette skjer ved at lipidenes polare hodegrupper interagerer med vannmolekyler på vannets overflate, mens lipidenes hydrofobe grupper orienteres bort fra det vandige miljøet. Lipiders evne til å danne monolag legger grunnlaget for Langmuir monolagsteknikk, en veletablert metode benyttet til å undersøke overflatemolekylers orientering og pakking i et monolag. Langmuir monolagsteknikk benyttes blant annet som modellsystem av biologiske membraner, for eksempel til studier av medikamenters interkalering blant lipider i en membran [46].

Agnes Pockels var den første til å utføre isotherm- målinger på slutten av 1800- tallet. Resultatet av hennes eksperimenter, en isotherm av stearinsyre, er i den senere tid vist å være korrekt [47]. Pockels publiserte i 1891 en artikkel som fremdeles er sentral for det moderne arbeid med monolag på vandige overflater [48]. Lord Rayleigh videreførte i 1899 Pockels arbeid [49], og interessen for studiene ble etter hvert også vekket hos flere. En av dem var Irving Langmuir, som i 1910-1920- årene benyttet monolagsteknikken til å studere flytende monolag på vandige overflater [50]. I samarbeid med Katherine B. Blodgett videreutviklet Langmuir denne teknikken, og metoden har i den senere tid fått navn etter disse to.

2.4.1 Prinsipp og metode

Et Langmuir- apparat består av et trau, to bevegelige barrierer og en Wilhelmy plate. Til trauet overføres subfase og lipidløsning. Funksjonen til barrierene er å komprimere monolaget, mens Wilhelmyplaten benyttes for å måle overflatetrykket [51].



Figur 2.4.1.1: Skjematisk fremstilling av et Langmuir- apparat [52].

Ved utførelse av Langmuir monolagsteknikk forberedes først en løsning hvor lipidet løses i et spredningsmateriale, ofte kloroform. Ved overføring av lipidløsningen til subfasens vandige overflate, vil løsningen raskt spres utover og dekke det tilgjengelige arealet. Spredningsmaterialet fordampes raskt og etterlater et monolag av lipidmolekyler på subfasens overflate [53]. Spredningsmaterialet har en positiv spredningskoeffisient. Spredningskoeffisienten, S , defineres ved overflatespenningen, γ , til komponentene i systemet, og er gitt i ligning 2.4.1.1.

$$(2.4.1.1) \quad S = \gamma_{GS} - \gamma_{LS} - \gamma_{GL}$$

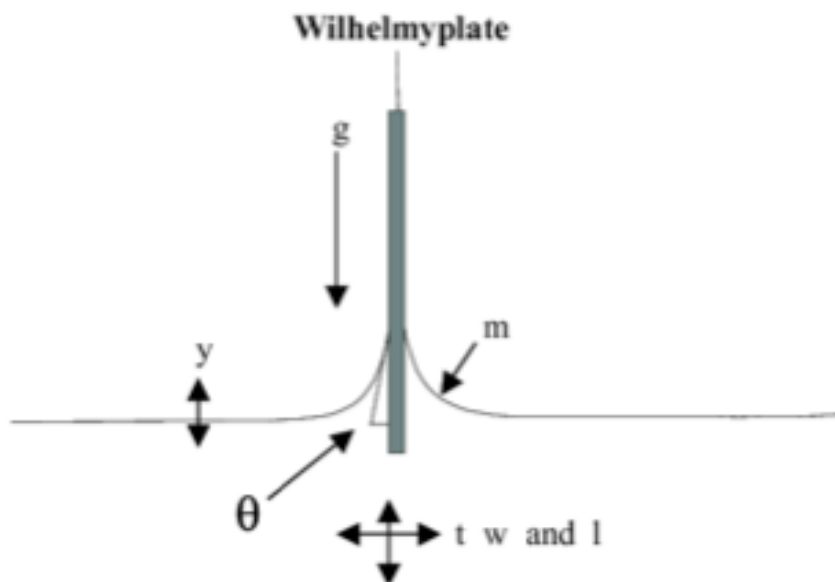
Der γ_{GS} er gass- subfase overflatespenningen, γ_{LS} er løsemiddel- subfase overflatespenningen og γ_{GL} er gass- løsemiddel overflatespenningen. I tilfeller hvor spredningskoeffisienten er positiv, vil løsemiddelet spres på subfasens overflate sammen med lipidmolekylene. Etter at spredningsmateriealet er fordampet, kan de datakontrollerte barrierene brukes til å komprimere monolaget. Etter hvert som barrierene nærmer seg sentrum av trauet, vil pakningstettheten i monolaget øke. Gjennomsnittlig molekylareal, m_{ma} , blir beregnet som tilgjengelig areal, A , dividert på antall molekyler i monolaget, N_M , jamfør ligning 2.4.1.2.

$$(2.4.1.2) \quad m_{ma} = A/N_M$$

Kompresjon av monolaget gir en endring i overflatespenningen. Denne endringen angis ved overflatetrykk, Π , hvilket er differansen mellom overflatespenningen til subfasen, γ_s , og overflatespenningen til subfasen med monolaget, γ_m , jamfør ligning 2.4.1.3.

$$(2.4.1.3) \quad \Pi = \gamma_s - \gamma_m$$

Endring i overflatespenningen måles av en Wilhelmy- plate i sandblåst platina. Sistnevnte henger i en vekt over trauret. Følgende tre krefter vil virke inn på platen når den henger nedsenket i subfasen; gravitasjon, kraften som virker i kontaktflaten mellom væsken og platen som følge av overflatespenningen samt oppdrift. De to førstnevnte kreftene virker nedover, mens oppdriften virker oppover.



Figur 2.4.1.2: Måling av overflatetrykk ved hjelp av Wilhelmy- plate hvor y er overflatespenning, g er gravitasjonskraften, m er massen til det løftende vannet, t er platens tykkelse, w er platens bredde, l er platens lengde og θ er væskens kontaktvinkel [52].

Summen av kreftene som virker på Wilhelmy- platen er vist i ligning 2.4.1.4.

$$(2.4.1.4) \quad F = G + \gamma \cdot 2(l + t) \cdot \cos(\theta) - 0 = mg + \gamma \cdot 2(l + t) \cdot \cos(\theta) - V\rho g$$

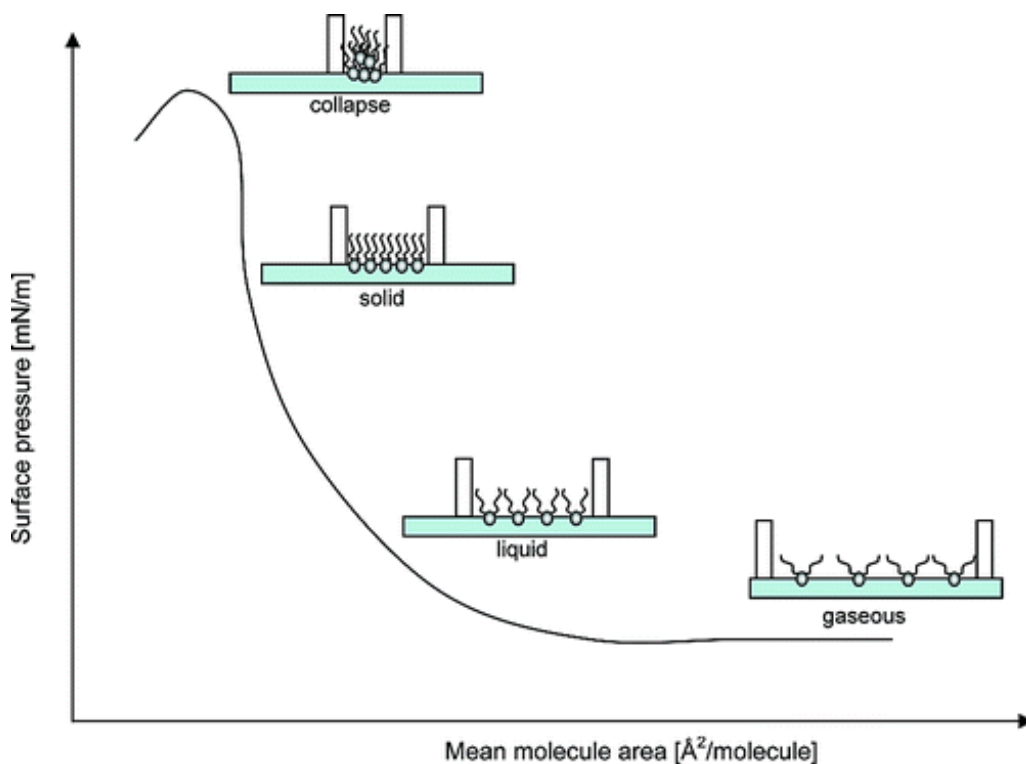
Der m er massen til platen i luft, g er gravitasjonskraften ($= 9,81 \text{ ms}^{-2}$), γ er overflatespenningen, l er platens lengde, t er platens tykkelse, θ er kontaktvinkelen, V er volumet av væskemengden som fortreges av platen og ρ er væskens tetthet. Gravitasjonskraften som virker på platen er konstant i jordas gravitasjonsfelt og blir nullstilt i vekten. Kontaktvinkelen mellom platen og subfasen blir antatt å være 0° og platen fuktes dermed fullstendig når den er nedsunket i subfasen. Overflatetrykket, Π , kan dermed beregnes fra vektmålingene ved hjelp av ligning 2.4.1.5.

$$(2.4.1.5) \quad \Pi = \gamma_s - \gamma_m = \Delta F / (2(l+t))$$

2.4.2 Faseoverganger

Resultatene blir presentert i form av Langmuir isotermer. Isotermene er grafiske fremstillinger av målt overflatetrykk (mN/m) plottet mot gjennomsnittlig molekylareal (mm^2). Isotermene gir informasjon om lipidenes struktur, areal, interaksjoner og faseoverganger [53]. En isoterm kan deles inn i fire monolagsfaser; gassfase (G), ekspandert væskefase (Le), kondensert væskefase (Lc) og fast fase (S). Ved eksperimentets start befinner lipidmolekylene seg i gassfase. I denne fasen har lipidene god plass og interaksjonene mellom molekylene er svake. Ved kompresjon av monolaget reduseres lipidenes tilgjengelige areal (økende overflatetrykk), og lipidene går over i ekspandert væskefase. Acylkjedene kan fortsatt beveges relativt fritt, og de er uordnet som i en todimensjonal væske. Svake interaksjoner finner imidlertid sted mellom acylkjedene. Videre kompresjon av monolaget resulterer i en overgang fra ekspandert væskefase til kondensert væskefase. I denne fasen er interaksjonene mellom acylkjedene sterkere, og hydrokarbonkjedene har ikke lenger noen kontakt med den vandige overflaten. Parallelt med at overflatetrykket øker, vil også det gjennomsnittlige molekylarealet reduseres ytterligere og isotermen får en brattere stigning. Lipidene pakkes tettere sammen og acylkjedene rettes mer opp mot luften. Fra kondensert væskefase går lipidene over i fast fase. I fast fase er lipidenes hodegrupper pakket tett sammen i den vandige overflaten og det er lite plass til kjedene som nå er rettet helt ut. Overflatetrykket øker kraftig i denne delen av

kompresjonsforløpet. Ved et bestemt areal og overflatetrykk vil ikke monolaget lenger kunne motsette seg kompresjonen, og molekylene vil tvinges ut av monolaget. Dette punktet betegnes som monolagets kollapspunkt, og finner sted ved monolagets maksimale overflatetrykk og absolutte minimumsareal [51, 47]. Faktorer som spiller inn på kollapspunktet er størrelsen og ladningen på lipidenes hodegrupper samt acylkjedenes lengde og metningsgrad. En større hodegruppe vil for eksempel gi tidligere kollaps enn en liten hodegruppe. Dette skyldes at større hodegrupper trenger større plass i monolaget enn mindre hodegrupper. Elektrostatiske interaksjoner mellom ioner i subfasen og lipidmolekyler kan virke stabiliserende på monolaget. Desto høyere overflatetrykket er ved kollapspunktet, desto mer stabilt er monolaget.



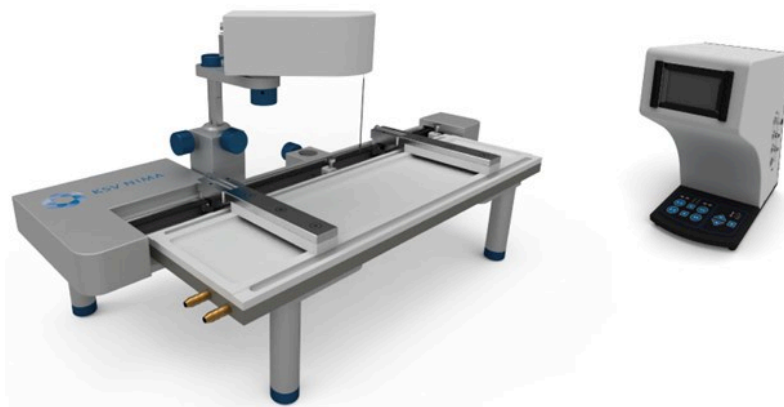
Figur 2.4.2.1: Oversikt over lipidenes ulike faser gjennom kompresjon av et lipidmonolag utført ved Langmuir monolagsteknikk [54].

3 Material og metode

Det praktiske arbeidet med oppgaven har funnet sted ved Høgskolen i Bergen, Avdeling for Ingeniørutdanning. Arbeidet omfattet tillaging av bufferløsning og lipidløsninger med og uten CoQ₁₀. Langmuir monolagsteknikk ble benyttet til å fremstille monolag av lipidene samt isotermer over lipidenes kompresjonsforløp. Metoden ble utført i henhold til prosedyre tilhørende Langmuir- instrumentet [55]. Data innhentet fra de eksperimentelle forsøkene ble overført til Excel for videre behandling.

3.1 Langmuir- instrumentet

Instrumentet benyttet er et Langmuir- instrument levert av KSV NIMA, Helsinki, Finland. Instrumentet er av modellen KSV Minithrough, og består av et trau (75 x 364 x 5 mm) hvor subfasen tilsettes, to bevegelige barrierer som regulerer overflatearealet til subfasen samt en Wilhelmy- plate koblet til en elektronisk vekt som måler overflatetrykket. Overflatene til trauet og barrierene er dekket av polytetrafluoretylen (PTFE) [51]. PTFE er et sterkt hydrofobt materiale som hindrer lekkasje av subfasen når barrierene beveges mot sentrum av trauet. Barrierene beveger seg symmetrisk med en hastighet på 5 mm/minutt. Wilhelmy- platen (10 x 20 mm) er laget av sandblåst platina og er delvis nedsenket i subfasen. På grunn av kapillærkrefter vil subfasen løftes noe opp på Wilhelmy- platen. Platen henger i en vekt som registrerer endringer i overflatetrykket (mN/m), og har et følsomhetsområde mellom 0- 150 mN/m [51]. På laboratoriet er apparatet plassert i et støv- og vibrasjonsisolerende kammer.



Figur 3.1.1: Langmuir instrument [56].

3.2 Tillaging av løsninger

3.2.1 Hepesbuffer

Hepes i pulverform (1,1915 g) ble fortynnet med deionisert vann med ionestyrke 18,2 MΩ/cm (1 L). NaOH og/eller HCl ble benyttet til å innstille pH i løsningen (pH 7,40). Hepesbufferen (5 mM) ble oppbevart ved romtemperatur.

Det henvises til vedlegg 1 for detaljerte beregninger.

3.2.2 Lipider og CoQ₁₀

Stockløsninger (2,0 mg/ml) av POPS, DPPC og CoQ₁₀ ble laget ved å veie inn pulver (5,0 mg) og deretter tilsette kloroform (2,5 ml). Stockløsninger (2,0 mg/ml) av TLEPB og DEPC ble laget ved å veie inn lipidet i pulverform (10,0 mg) og løse det i kloroform (5,0 ml). Grunnen til at det ble laget et dobbelt volum av stockløsningen av TLEPB var et ønske om å benytte den samme stockløsningen ved tillaging av samtlige bruksløsninger av TLEPB. TLEPB består av en samling av ulike lipider, og det vil således være vanskelig å reproducere resultater fra ulike stockløsninger. DEPC ble i motsetning til de øvrige lipidene veid inn fra en ampulle. For å sikre at det ble laget tilstrekkelig stockløsning til samtlige bruksløsninger av dette lipidet, ble det derfor valgt å veie inn en masse på 10 mg av DEPC. Til hvert av lipidene ble det laget seks bruksløsninger (1,0 mg/ml) til de eksperimentelle forsøkene. Disse inneholdt CoQ₁₀ i ulik konsentrasjon; 0, 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Innhold av lipid- stockløsning, CoQ₁₀- stockløsning og kloroform i samtlige bruksløsninger er vist i tabell 3.2.2.1- 3.2.2.4.

Det henvises til vedlegg 1 for detaljerte beregninger.

Tabell 3.2.2.1: Innhold av POPS- stockløsning, CoQ₁₀- stockløsning og kloroform i bruksløsninger for POPS.

Bruksløsning (mol%CoQ ₁₀)	POPS-stockløsning (µL)	CoQ ₁₀ -stockløsning (µL)	Kloroform (µL)
0	500,0	0,0	500,0
0,5	500,0	3,0	497,0
1	500,0	5,5	494,5
2	500,0	11,0	489,0
5	500,0	28,0	472,0
10	500,0	55,0	445,0

Tabell 3.2.2.2: Innhold av DPPC- stockløsning, CoQ₁₀- stockløsning og kloroform i bruksløsninger for DPPC.

Bruksløsning (mol%CoQ ₁₀)	DPPC-stockløsning (µL)	CoQ ₁₀ -stockløsning (µL)	Kloroform (µL)
0	500,0	0,0	500,0
0,5	500,0	3,0	497,0
1	500,0	6,0	494,0
2	500,0	12,0	488,0
5	500,0	30,0	470,0
10	500,0	59,0	441,0

Tabell 3.2.2.3: Innhold av TLEPB- stockløsning, CoQ₁₀- stockløsning og kloroform i bruksløsninger for TLEPB.

Bruksløsning (mol%CoQ ₁₀)	TLEPB-stockløsning (µL)	CoQ ₁₀ -stockløsning (µL)	Kloroform (µL)
0	500,0	0,0	500,0
0,5	500,0	3,0	497,0
1	500,0	5,0	495,0
2	500,0	10,0	490,0
5	500,0	26,0	474,0
10	500,0	52,0	448,0

Tabell 3.2.2.4: Innhold av DEPC- stockløsning, CoQ₁₀- stockløsning og kloroform i bruksløsninger for DEPC.

Bruksløsning (mol%CoQ ₁₀)	DEPC-stockløsning (µL)	CoQ ₁₀ -stockløsning (µL)	Kloroform (µL)
0 %	500,0	0,0	500,0
0,5 %	500,0	2,0	498,0
1 %	500,0	5,0	495,0
2 %	500,0	10,0	490,0
5 %	500,0	24,0	476,0
10 %	500,0	48,0	452,0

3.3 Eksperimentell utførelse

I forkant av hvert forsøk ble trauret og barrierene vasket vekselvis tre ganger med deionisert vann og etanol. Trau og barrierer ble plassert i instrumentet, og overflødig vann ble fjernet fra barrierenes bakside for å hindre eventuelle forurensinger. Trauret ble tilsatt buffer. Barrierene ble komprimert og overflødig buffer, støv og luftbobler ble fjernet ved hjelp av vakuumsuger. Barrierene ble dekomprimert og Wilhelmy- platen ble vasket vekselvis med vann og etanol henholdsvis tre og to ganger og hengt på vekten. En Hamiltonsprøyte ble skylt tre ganger med kloroform og en gang med lipidløsning før den ble fylt med lipidløsning (POPS, TLEPB og DEPC: 25 μL , DPPC: 22 μL). Et volum på 22 μL av lipidløsning av DPPC ble benyttet for å sikre observasjon av samtlige faser i isothermenes kompresjonsforløp. Barrierene og vekten ble nullstilt, og prøven ble applisert dråpevis på overflaten av bufferen. Hamiltonsprøyten ble etter applisering vasket tre ganger med kloroform. For at kloroform i lipidløsningen skulle få tid til å fordampe, ble eksperimentet startet etter fem minutter. Eksperimentet ble stoppet da kollapsunktet var nådd, hvilket tok mellom 25 og 35 minutter. Eksperimentene ble utført ved romtemperatur, og ble gjennomført for bruksløsningene i tabell 3.2.2.1- 3.2.2.4. Da metoden var svært ømfintlige for støv, luftbobler og andre forstyrrelser i overflaten, ble forsøkene repetert inntil en hadde reproduisert isothermene i tre like paralleller.

Tabell 3.3.1: Utstyrliste for Langmuir forsøkene.

Utstyr	Type	Spesifikasjon	Produsent
Langmuir instrument	KSV Minithrough	Dimensjoner: 75x364x5 mm	KSV NIMA
Vekt	XS204	Usikkerhet: $\pm 0,0001$ g	Mettler Toledo
pH- meter	SevenEasy	pH 0-14, 0-100 C	Mettler Toledo
Automatpipette	Finnpipette	1-10 μL , 10-100 μL og 100-1000 μL	Thermo electron corporation
Hamilton sprøyte	Microliter		Hamilton Co.

3.4 Reagenser

Lipider

POPS (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine)

Molekylvekt: 784,0 g/mol

Avanti Polar Lipids, Inc, Alabaster, Alabama, USA

DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)

Molekylvekt: 734,0 g/mol

Avanti Polar Lipids, Inc, Alabaster, Alabama, USA

TLEPB (Brain Total Lipid Extract)

Molekylvekt: 827,0 g/mol

Avanti Polar Lipids, Inc, Alabaster, Alabama, USA

DEPC (1,2-dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)

Molekylvekt: 898,34 g/mol

Avanti Polar Lipids, Inc, Alabaster, Alabama, USA

Coenzym Q₁₀

Coenzym Q₁₀

Molekylvekt: 863,34 g/mol

Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Løsninger og kjemikalier

Hepes (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid (C₈H₁₈N₂O₄S)), 99% Min

Molekylvekt: 238,3 g/mol

Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA

Kloroform (CHCl₃)

Molekylvekt: 119,4 g/mol

Helseskadelig

Fisher Scientific, Kougborough, Leicestershire, UK

Absolutt alkohol, etanol (CH₃CH₂OH) med 2% Metylisobutylketon

Molekylvekt: 46,07 g/mol

A/S Vinmonopolet, Oslo, Norway

Deionisert vann

PURELAB Option- R

ELGA

NaOH

Molekylvekt: 40,0 g/mol

Riedel de Haën

4 Resultater

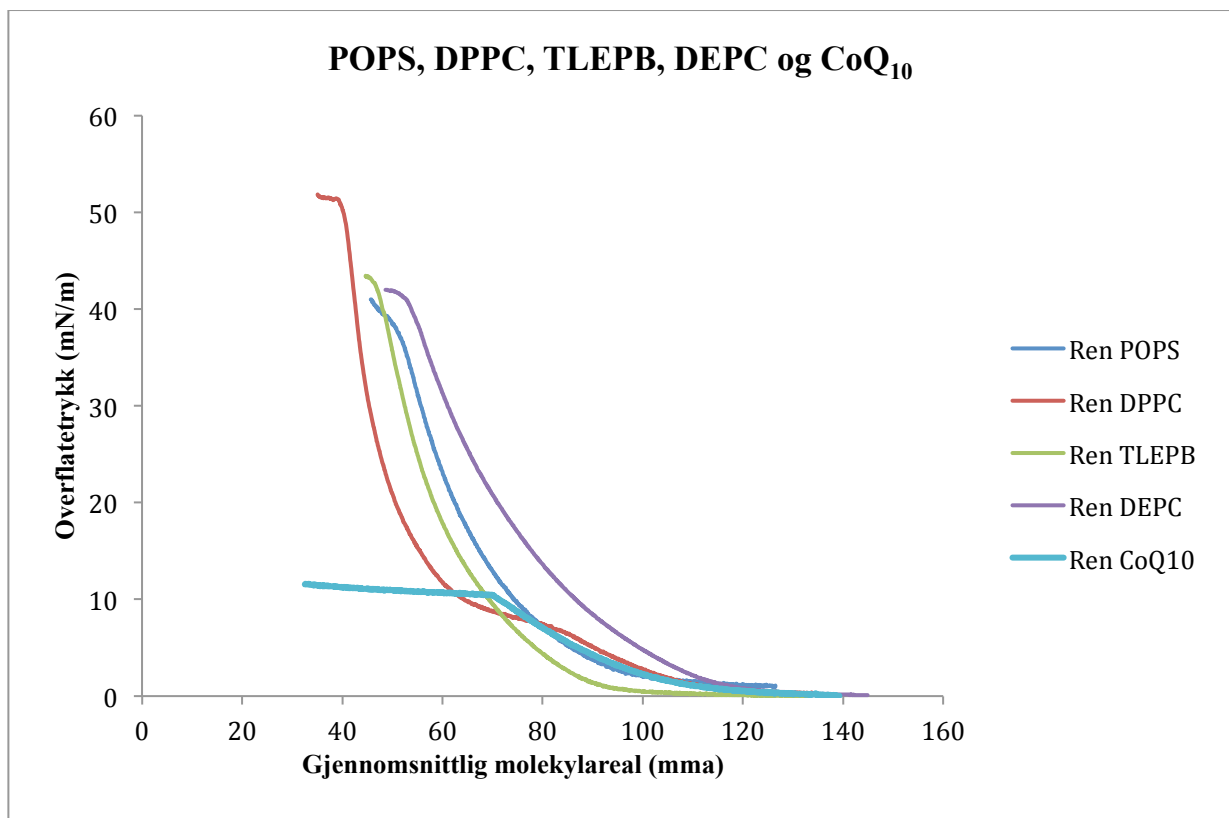
Resultatene blir presentert som Langmuir isotermer. En Langmuir isoterm er en grafisk fremstilling av målt overflatetrykk (mN/m) plottet mot lipidenes gjennomsnittlige molekylareal (mma), og gir et bilde av det enkelte monolags kompresjonsforløp. Med unntak av løsningen bestående av ren CoQ₁₀, ble det utført tre parallelle målinger av hver lipidløsning. Resultatene som fremkommer under dette avsnittet er beregnet fra gjennomsnittet av disse tre målingene. Til videre behandling av resultatene tas det utgangspunkt i de registrerte mma- verdier ved monolagets lift- off (1,0 mN/m), ved overflatetrykk 20 mN/m, ved cellemembranens overflatetrykk, 30 mN/m og ved kollapsunkt. Overflatetrykk ved kollapsunktet er også registrert.

I det eksperimentelle arbeidet ble det benyttet fire lipider; POPS, DPPC, TLEPB og DEPC. For hvert av lipidene ble det laget seks lipidløsninger, hvorav disse inneholdt CoQ₁₀ i ulik konsentrasjon; 0, 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Det er beregnet prosentvis avvik mellom resultatet av målingene med og uten CoQ₁₀ samt standardavvik for de tre parallelle målingene. I tillegg til lipidløsningene er det analysert en løsning bestående av ren CoQ₁₀.

Data for isotermene er vist i tabell 4.1.1- 4.5.1.

4.1 Resultater av rene lipidløsninger

For hvert av lipidene POPS, DPPC, TLEPB og DEPC ble det analysert en lipidløsning uten tilsatt CoQ₁₀. Resultatene fra disse analysene gir grunnlag for sammenligning av lipidløsningene tilsatt CoQ₁₀. Analyseresultatene fra de rene lipidløsningene blir også sammenlignet med hverandre. I tillegg er det analysert en løsning bestående av ren CoQ₁₀. Isothermer og data for ren CoQ₁₀ samt rene lipidløsningene er vist i figur 4.1.1 og tabell 4.1.1.



Figur 4.1.1: Isothermer som viser målt overflatetrykk (mN/m) plottet mot gjennomsnittlig molekylareal (mma) for ren CoQ₁₀ (turkis) samt rene lipidløsninger av POPS (blå), DPPC (rød), TLEPB (grønn) og DEPC (lilla).

Av figur 4.1.1 og tabell 4.1.1 fremkommer det at CoQ₁₀ danner monolag alene. Dette monolaget har lift- off ved 111,7 mma, og kollapser ved et overflatetrykk på 10,2 mN/m. TLEPB har lavest mma ved lift- off (92,8 mma) av samtlige lipidløsninger. DPPC, DEPC og POPS har lift- off ved henholdsvis 112,4 mma, 117,9 mma og 126,5 mma. Av lipidløsningene viser DPPC høyest overflatetrykk ved kollapsunktet (50,2 mN/m), etterfulgt av henholdsvis TLEPB (42,7 mN/m), DEPC (38,4 mN/m) og POPS (33,8 mN/m). Foruten om ved lift- off, viser DEPC høyest mma gjennom alle faser, etterfulgt av POPS, TLEPB og DPPC, hvor

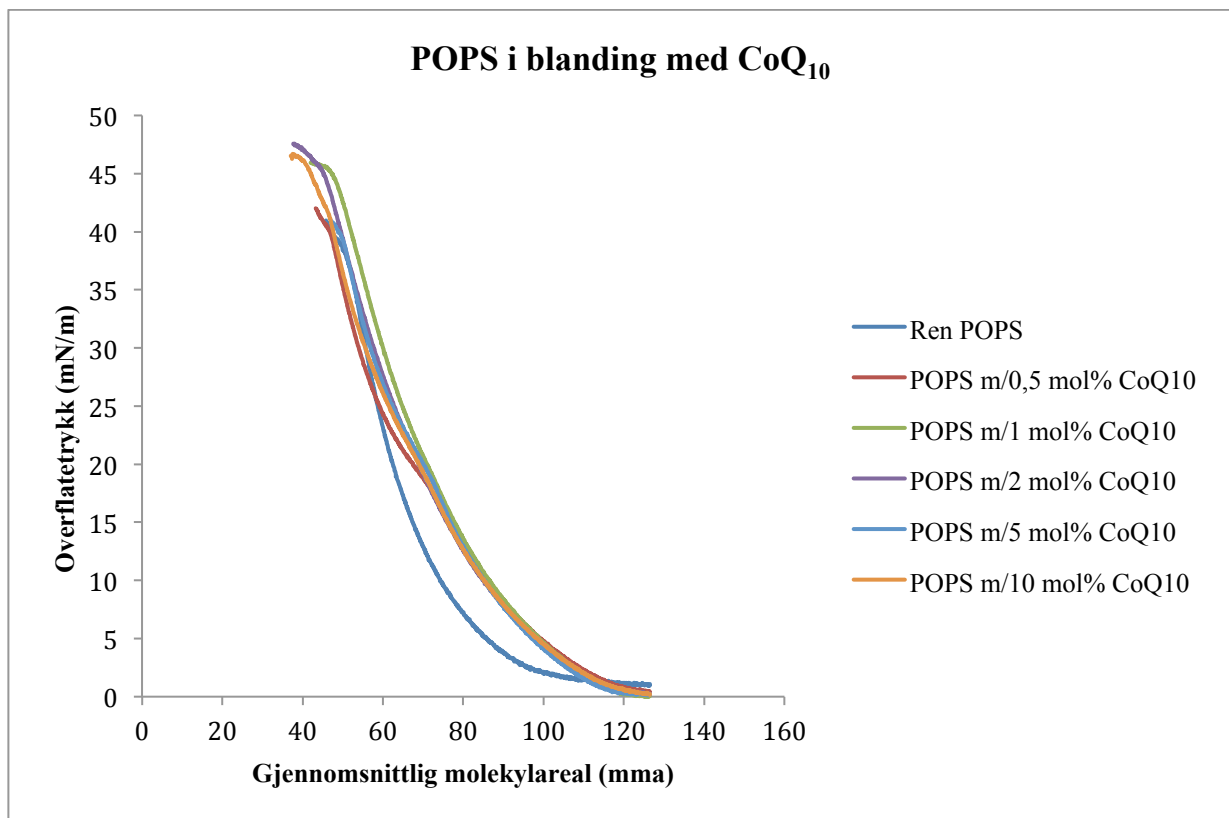
DPPC har lavest. Frem til kollapsunkt, opptar CoQ₁₀ tilnærmet samme mma som POPS. Det er registrert et platå i DPPC sitt kompresjonsforløp ved 5 til 10 mN/m og fra 65 til 85 mma.

Tabell 4.1.1: Oversikt over mma ved lift- off (mN/m = 1,0), overflatetrykk 20 og 30 mN/m og kollapsunkt for lipidene POPS, DPPC, TLEPB og DEPC uten tilsatt CoQ₁₀. Overflatetrykk ved lipidenes kollapsunkt er også vist. Verdiene er beregnet ut i fra gjennomsnitt av tre parallelle isotermer. Standardavvik for disse parallellene er vist i tabellen. Tabellen viser også mma ved lift- off og kollapsunktet for ren CoQ₁₀. Overflatetrykk ved kollapsunktet for CoQ₁₀ er også vist. Standardavvik for ren CoQ₁₀ er ikke vist, da kun en parallell ble analysert av denne løsningen.

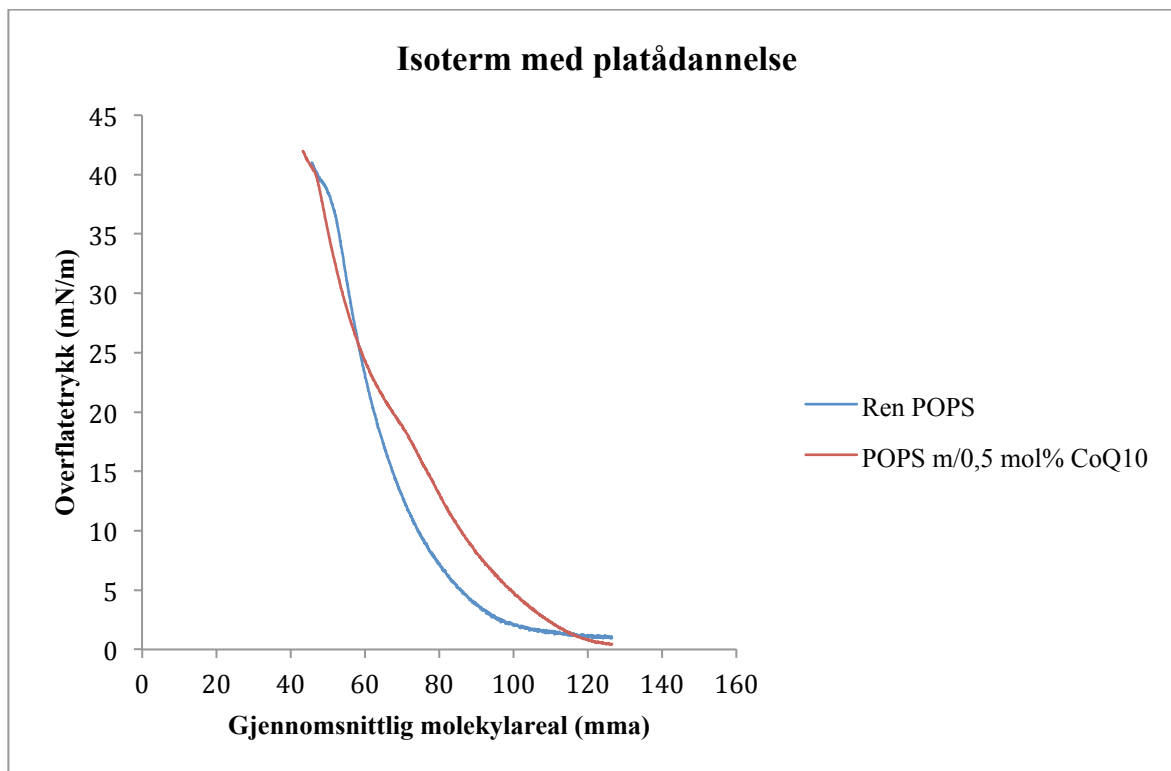
	Lift-off (mN/m = 1)	mN/m = 20	mN/m = 30	Kollapsunkt	
	mma ± SD	mma ± SD	mma ± SD	mN/m ± SD	mma ± SD
POPS	126,5 ± 0,1	62,5 ± 0,1	55,7 ± 0,1	33,8 ± 1,2	53,8 ± 0,1
DPPC	112,4 ± 0,2	50,6 ± 0,3	45,3 ± 0,3	50,2 ± 3,2	40,0 ± 0,3
TLEPB	92,8 ± 0,0	58,3 ± 0,1	52,4 ± 0,1	42,7 ± 0,7	46,4 ± 0,2
DEPC	117,9 ± 0,0	71,0 ± 0,2	61,0 ± 0,2	38,4 ± 1,7	55,1 ± 0,2
CoQ₁₀	111,7	-	-	10,2	70,8

4.2 Resultater av POPS i blanding med CoQ₁₀

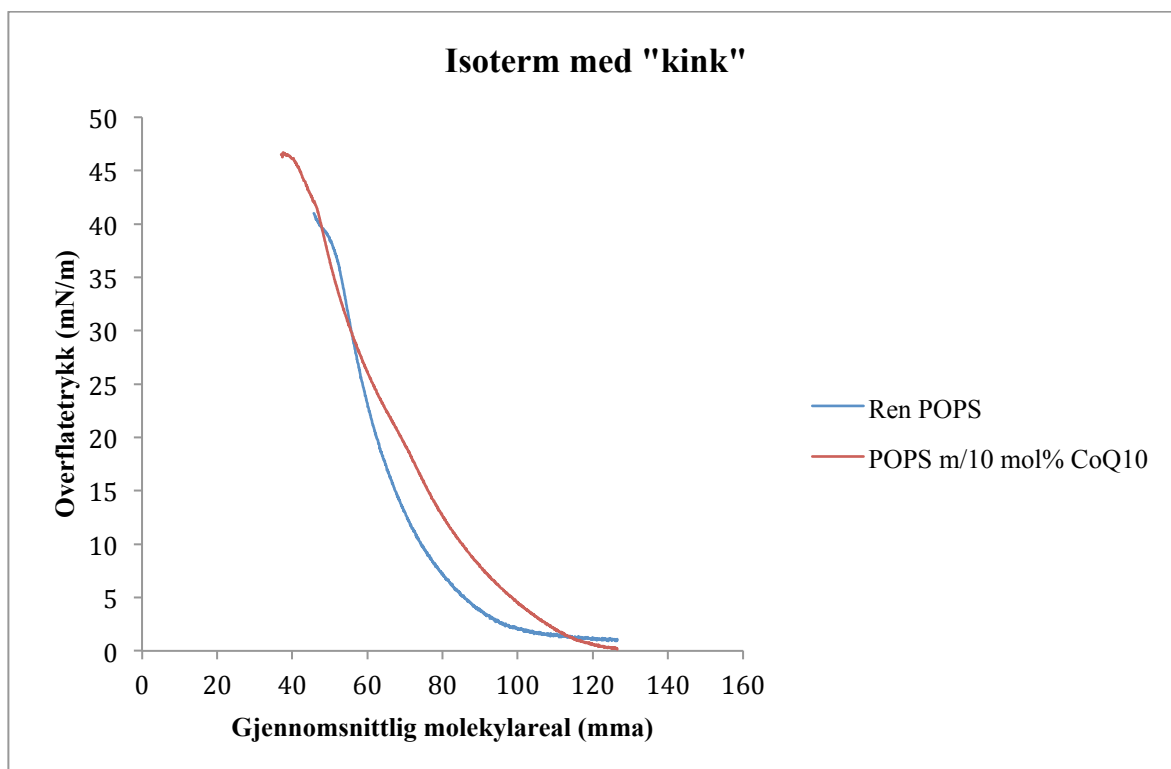
POPS ble analysert i blanding med CoQ₁₀ i følgende konsentrasjonsforhold; 0, 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Isothermer og data for disse lipidløsningene er vist i figur 4.2.1a og tabell 4.2.1. Figur 4.2.1b og figur 4.2.1c viser isotermer med henholdsvis platå og ”kink”.



Figur 4.2.1a: Isothermer som viser målt overflatetrykk (mN/m) plottet mot gjennomsnittlig molekylareal (mma) for POPS i blanding med CoQ₁₀ i følgende konsentrasjonsforhold; 0 (mørk blå), 0,5 (rød), 1 (grønn), 2 (lilla), 5 (lys blå) og 10 mol% (orange).



Figur 4.2.1b: Isotemer som viser målt overflatetrykk (mN/m) plottet mot gjennomsnittlig molekylareal (m²) for ren POPS (blå) og POPS med 0,5 mol% CoQ₁₀ (rød). Sistnevnte isoterm viser platådannelse ved 17 til 23 mN/m.



Figur 4.2.1c: Isotemer som viser målt overflatetrykk (mN/m) plottet mot gjennomsnittlig molekylareal (m²) for ren POPS (blå) og POPS med 10 mol% CoQ₁₀ (rød). Sistnevnte isoterm viser en "kink" ved 17 mN/m.

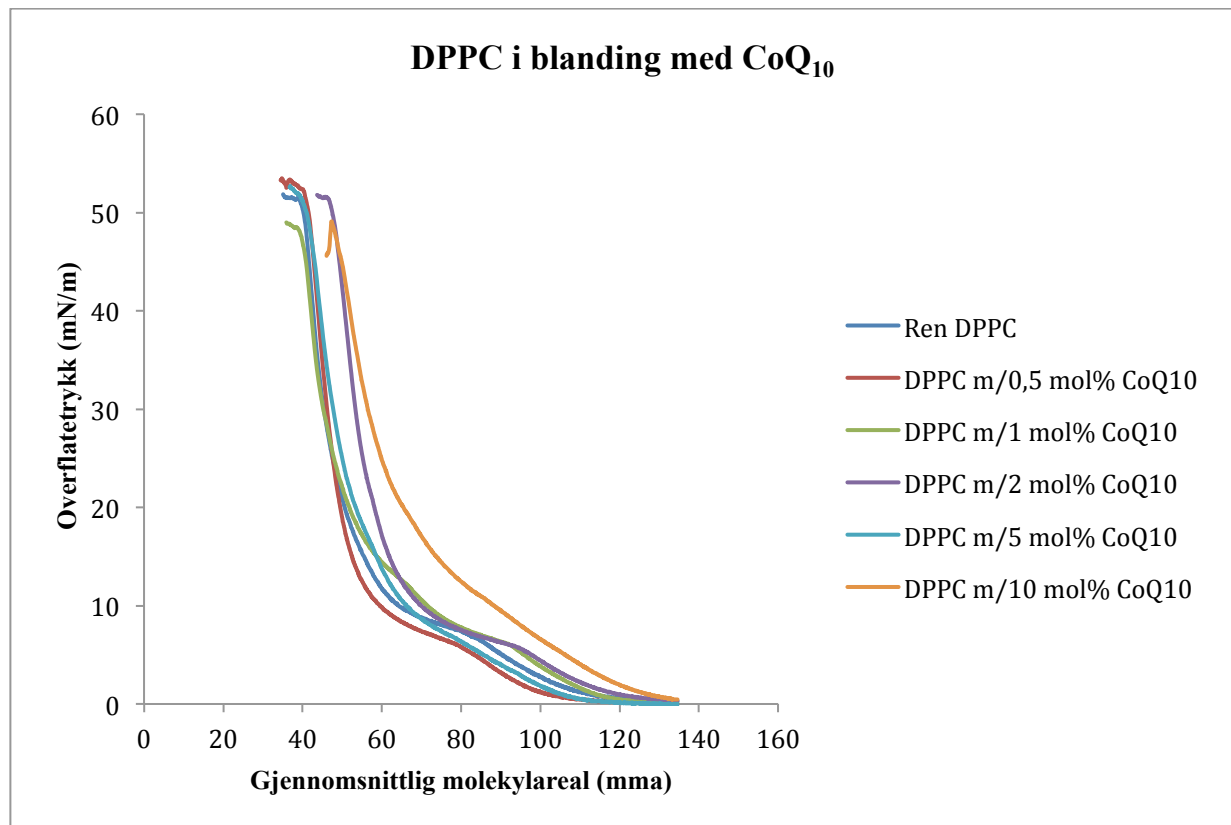
Av figur 4.2.1a og tabell 4.2.1 fremkommer det at ren POPS har lift- off ved høyest mma (126,5 mma), etterfulgt av POPS med CoQ₁₀ i følgende rekkefølge; 0,5 (118,0 mma), 10 (116,4 mma), 2 (115,2 mma), 1 (114,5 mma) og 5 mol% (112,9 mma). Ren POPS viser frem til 60 mma og 25 mN/m lavere mma og annet forløp enn POPS tilsatt CoQ₁₀. Fra dette punktet og frem til kollapspunktet er ren POPS sammenfallende med isotermene til de øvrige lipidblandinger. Ved 17 til 23 mN/m har isoterme med 0,5 mol% CoQ₁₀ et platå, som vist i figur 4.2.1b. Isotermene med 5 og 10 mol% CoQ₁₀ viser begge en ”kink” ved samme overflatetrykk som platået hos 0,5 mol% CoQ₁₀ (figur 4.2.1c). En ”kink” er et punkt med en brå endring i isotermens stigningstall. Ren POPS har kollapspunkt ved lavest overflatetrykk (33,8 mN/m) og høyest mma (53,8 mma). POPS med 5 og 0,5 mol% CoQ₁₀ kollapser ved omtrent samme overflatetrykk (39,2 mN/m og 39,6 mma). POPS med 2 mol% CoQ₁₀ kollapser ved høyest overflatetrykk (44,0 mN/m). POPS med 10 mol% CoQ₁₀ har kollapspunkt ved lavest mma (43,4 mma), etterfulgt av henholdsvis POPS med 2 (46,3 mma), 0,5 (47,1 mma), 5 (50,1 mma) og 1 mol% CoQ₁₀ (50,6 mma).

Tabell 4.2.1: Oversikt over gjennomsnittlig molekylareal ved lift- off (mN/m = 1,0), overflatetrykk 20 og 30 mN/m og kollapspunkt for ren POPS og POPS i blanding med CoQ₁₀ i ulike konsentrasjoner; 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Overflatetrykk ved lipidenes kollapspunkt samt prosentvis avvik mellom isotermene av ren POPS og POPS i blanding med CoQ₁₀ er vist i tabellen. Verdiene er beregnet ut i fra gjennomsnitt av tre parallelle isotermer. Standardavvik for disse parallellene er vist.

	Lift- off (mN/m = 1,0)	mN/m = 20	mN/m = 30	Kollapspunkt	
	mma ± SD	mma ± SD	mma ± SD	mN/m ± SD	mma ± SD
Ren POPS	126,5 ± 0,1	62,5 ± 0,1	55,7 ± 0,1	33,8 ± 1,2	53,8 ± 0,1
POPS m/0,5 mol% CoQ10	118,0 ± 0,0	67,4 ± 0,1	54,0 ± 0,2	39,6 ± 0,3	47,1 ± 0,3
POPS m/1 mol% CoQ10	114,5 ± 0,1	71,0 ± 0,1	59,9 ± 0,1	41,9 ± 2,2	50,6 ± 0,1
POPS m/2 mol% CoQ10	115,2 ± 0,0	68,9 ± 0,0	57,7 ± 0,0	44,0 ± 1,2	46,3 ± 0,0
POPS m/5 mol% CoQ10	112,9 ± 0,1	70,0 ± 0,3	56,9 ± 0,3	39,2 ± 2,2	50,1 ± 0,4
POPS m/10 mol% CoQ10	116,4 ± 0,1	68,9 ± 0,3	55,6 ± 0,3	43,9 ± 0,9	43,4 ± 0,4
Prosentavvik	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0,5 mol% fra ren POPS	-6,7	7,8	-3,1	17,2	-12,5
1 mol% fra ren POPS	-9,5	13,6	7,5	24,0	-5,9
2 mol% fra ren POPS	-8,9	10,2	3,6	30,2	-13,9
5 mol% fra ren POPS	-10,8	12,0	2,2	16,0	-6,9
10 mol% fra ren POPS	-8,0	10,2	-0,2	29,9	-19,3

4.3 Resultater av DPPC i blanding med CoQ₁₀

DPPC ble analysert i blanding med CoQ₁₀ i følgende konsentrasjonsforhold; 0, 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Isothermer og data for disse lipidløsningene er vist i figur 4.3.1 og tabell 4.3.1.



Figur 4.3.1: Isothermer som viser målt overflatetrykk (mN/m) plottet mot gjennomsnittlig molekylareal (mma) for DPPC i blanding med CoQ₁₀ i følgende konsentrasjonsforhold; 0 (mørk blå), 0,5 (rød), 1 (grønn), 2 (lilla), 5 (lys blå) og 10 mol% (orange).

Av figur 4.3.1 og tabell 4.3.1 fremkommer det at lift- off skjer ved økende mma hos DPPC med CoQ₁₀ i følgende rekkefølge; 0,5 (101,9 mma), 5, (105,1 mma), ren DPPC (112,4 mma), 1 (114,0 mma), 2 (119,7 mma) og 10 mol% CoQ₁₀ (127,3 mma). Ved 20 og 30 mN/m samt ved kollapspunkt viser isothermene av ren DPPC og DPPC med 0,5, 1 og 5 mol% CoQ₁₀ små avvik i mma. Isothermene med 2 og 10 mol% CoQ₁₀ viser økt mma gjennom hele kompresjonsforløpet, hvor isothermen med 10 mol% CoQ₁₀ viser størst økning i mma. Plataet i isothermen av ren DPPC er synlig hos DPPC med 0,5, 1 og 2 mol% CoQ₁₀, dog med små variasjoner i overflatetrykk og mma. En mulig "kink" er observert i isothermene av både 5 og 10 mol% CoQ₁₀. Kollapsunkt skjer ved økende overflatetrykk i følgende rekkefølge; 1 (44,3

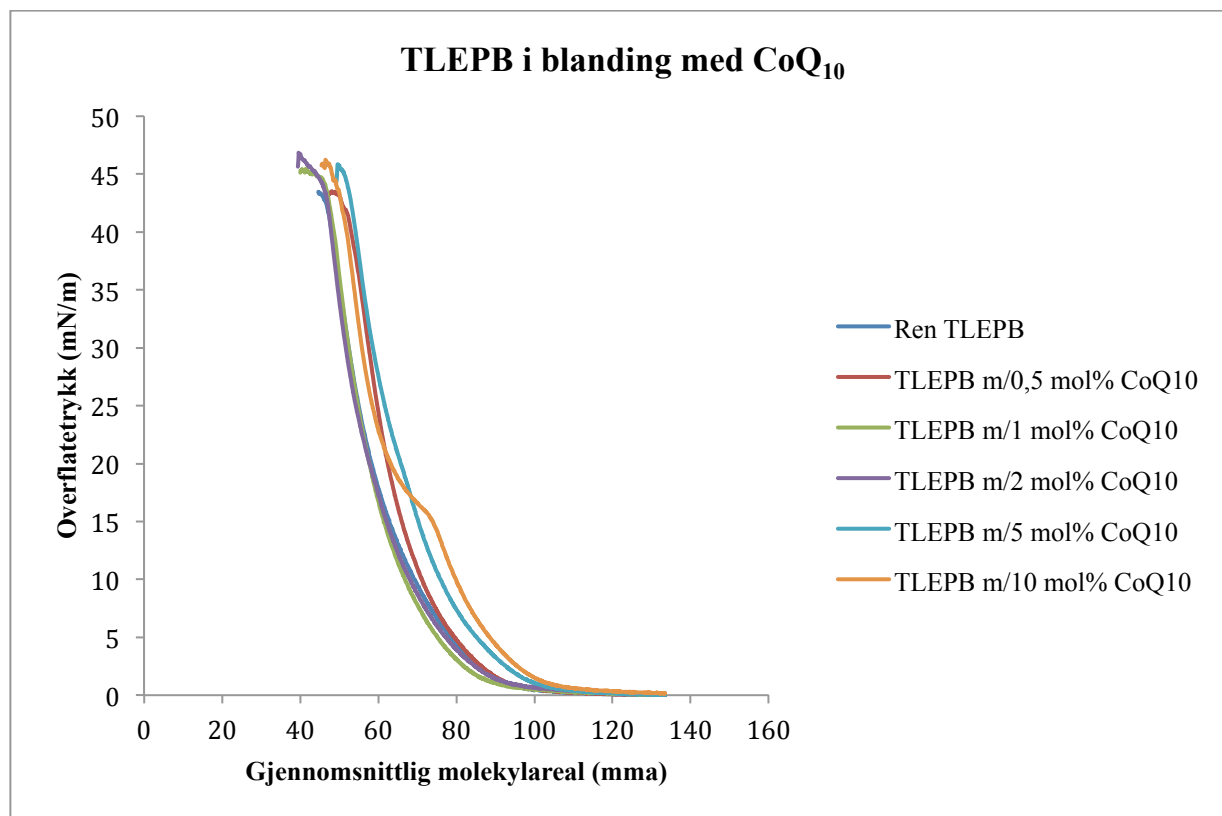
mN/m), 10 (44,6 mN/m), 5 (46,0 mN/m), 2 (47,8 mN/m), 0,5 mol% CoQ₁₀ (49,4 mN/m) og ren DPPC (50,2 mN/m).

Tabell 4.3.1: Oversikt over gjennomsnittlig molekylareal ved lift- off (mN/m = 1,0), overflatetrykk 20 og 30 mN/m og kollapspunkt for ren DPPC og DPPC i blanding med CoQ₁₀ i ulike konsentrasjoner; 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Overflatetrykk ved lipidenes kollapspunkt samt prosentvis avvik mellom isotermene av ren DPPC og DPPC i blanding med CoQ₁₀ er vist i tabellen. Verdiene er beregnet ut i fra gjennomsnitt av tre parallelle isotermer. Standardavvik for disse parallellene er vist.

	Lift- off (mN/m =1,0)	mN/m = 20	mN/m = 30	Kollapspunkt	
	mma ± SD	mma ± SD	mma ± SD	mN/m ± SD	mma ± SD
Ren DPPC	112,4 ± 0,2	50,6 ± 0,3	45,3 ± 0,3	50,2 ± 3,2	40,0 ± 0,3
DPPC m/0,5 mol% CoQ10	101,9 ± 0,5	49,5 ± 1,3	46,2 ± 1,3	49,4 ± 5,0	41,7 ± 1,3
DPPC m/1 mol% CoQ10	114,0 ± 0,1	51,7 ± 0,2	45,2 ± 0,2	44,3 ± 2,5	41,1 ± 0,2
DPPC m/2 mol% CoQ10	119,7 ± 0,0	58,1 ± 0,5	53,3 ± 0,5	47,8 ± 6,3	48,5 ± 0,6
DPPC m/5 mol% CoQ10	105,1 ± 0,1	53,4 ± 0,2	47,7 ± 0,2	46,0 ± 4,4	42,7 ± 0,2
DPPC m/10 mol% CoQ10	127,3 ± 0,0	65,4 ± 0,1	56,4 ± 0,0	44,6 ± 5,4	50,1 ± 0,0
Prosentavvik	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0,5 mol% fra ren DPPC	-9,3	-2,2	2,0	-1,6	4,3
1 mol% fra ren DPPC	1,4	2,2	-0,2	-11,8	2,8
2 mol% fra ren DPPC	6,5	14,8	17,7	-4,8	21,3
5 mol% fra ren DPPC	-6,5	5,5	5,3	-8,4	6,8
10 mol% fra ren DPPC	13,3	29,2	24,5	-11,2	25,3

4.4 Resultater av TLEPB i blanding med CoQ₁₀

TLEPB ble analysert i blanding med CoQ₁₀ i følgende konsentrasjonsforhold; 0, 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Isothermer og data for disse lipidløsningene er vist i figur 4.4.1 og tabell 4.4.1.



Figur 4.4.1: Isothermer som viser målt overflatetrykk (mN/m) plottet mot gjennomsnittlig molekylareal (mma) for TLEPB i blanding med CoQ₁₀ i følgende konsentrasjonsforhold; 0 (mørk blå), 0,5 (rød), 1 (grønn), 2 (lilla), 5 (lys blå) og 10 mol% (orange). *På grunn av spredning i kollapspunktet hos de tre parallelle isotermer for TLEPB i blanding med 10 mol% CoQ₁₀, er siste del av isoterme for TLEPB i dette konsentrasjonsforholdet laget ut fra gjennomsnittsverdiene av to isotermer. Denne handlingen berører imidlertid ikke området for isoterms kollapspunkt, da dette punktet er funnet ut i fra gjennomsnittsverdier fra de tre parallelle isotermer.

Av figur 4.4.1 og tabell 4.4.1 fremkommer det at isoterme av TLEPB med 1 mol% CoQ₁₀ opptar lavere mma ved lift- off enn isoterme av ren TLEPB. De øvrige lipidløsningene viser høyere mma ved lift- off jo større konsentrasjonen av CoQ₁₀ er i løsningen. Med unntak av isoterme med 10 mol% CoQ₁₀, følger samtlige isotermer samme kompresjonsforløp. Isotherme med 10 mol% CoQ₁₀ inneholder et plattformsegment i området 14 til 18 mN/m og 67 til 75 mma. Isotherme av ren TLEPB og TLEPB med 1 og 2 mol% CoQ₁₀ opptar tilnærmet samme mma ved 20 og 30 mN/m samt ved kollapspunkt. Isotherme med 0,5 og 5 og 10 mol%

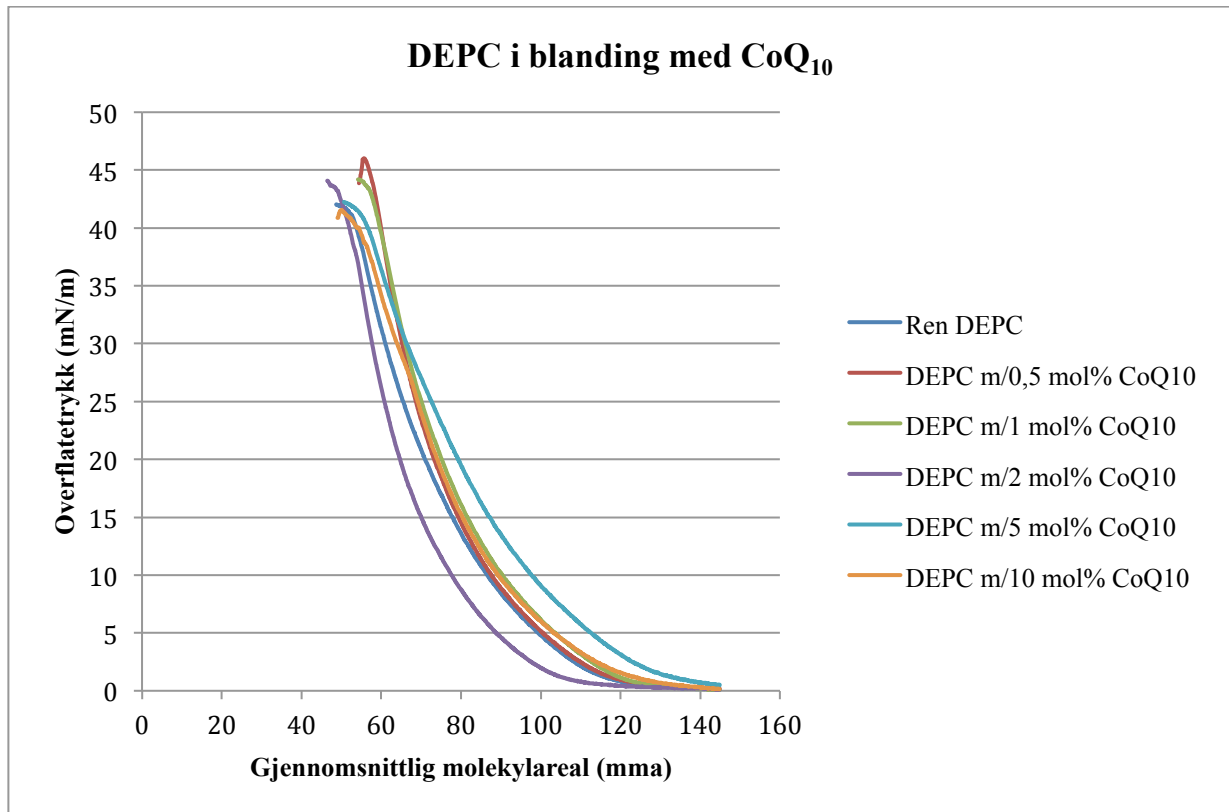
CoQ₁₀ opptar høyere mma gjennom alle faser av kompresjonsforløpet. Isotermene kolliderer ved økende overflatetrykk i følgende rekkefølge; 0,5 (41,7 mN/m), 2 (42,5 mN/m), ren TLEPB (42,7 mN/m), 5 (42,9 mN/m), 10 (43,7 mN/m) og 1 mol% CoQ₁₀ (44,1 mN/m).

Tabell 4.4.1: Oversikt over gjennomsnittlig molekylareal ved lift- off (mN/m = 1,0), overflatetrykk 20 og 30 mN/m og kollapsunkt for ren TLEPB og TLEPB i blanding med CoQ₁₀ i ulik konsentrasjon; 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Overflatetrykk ved lipidenes kollapsunkt samt prosentvis avvik mellom isotermene av ren TLEPB og TLEPB i blanding med CoQ₁₀ er vist i tabellen. Verdiene er beregnet ut i fra gjennomsnitt av tre parallelle isotermer. Standardavvik for disse parallellene er vist.

	Lift- off (mN/m = 1,0)	mN/m = 20	mN/m = 30	Kollapsunkt	
	mma ± SD	mma ± SD	mma ± SD	mN/m ± SD	mma ± SD
Ren TLEPB	92,8 ± 0,0	58,3 ± 0,1	52,4 ± 0,1	42,7 ± 0,7	46,4 ± 0,2
TLEPB m/0,5 mol% CoQ10	93,7 ± 0,6	62,4 ± 1,1	57,6 ± 1,2	41,7 ± 2,4	51,9 ± 1,3
TLEPB m/1 mol% CoQ10	90,4 ± 0,6	57,7 ± 0,9	52,4 ± 0,9	44,1 ± 3,4	46,4 ± 0,9
TLEPB m/2 mol% CoQ10	94,0 ± 0,1	57,7 ± 0,6	51,7 ± 0,7	42,5 ± 1,7	47,0 ± 0,7
TLEPB m/5 mol% CoQ10	100,5 ± 0,2	65,7 ± 0,4	58,6 ± 0,4	42,9 ± 1,5	52,8 ± 0,4
TLEPB m/10 mol% CoQ10	103,8 ± 0,2	63,1 ± 0,3	55,8 ± 0,3	43,7 ± 1,4	49,8 ± 0,3
Prosentavvik	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0,5 mol% fra ren TLEPB	1,0	7,0	9,9	-2,3	11,9
1 mol% fra ren TLEPB	-2,6	-1,0	0,0	3,3	0,0
2 mol% fra ren TLEPB	1,3	-1,0	-1,3	-0,5	1,3
5 mol% fra ren TLEPB	8,3	12,7	11,8	0,5	13,8
10 mol% fra ren TLEPB	11,9	8,2	6,5	2,3	7,3

4.5 Resultater av DEPC i blanding med CoQ₁₀

DEPC ble analysert i blanding med CoQ₁₀ i følgende konsentrasjonsforhold; 0, 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Isotermer og data for disse lipidløsningene er vist i figur 4.5.1 og tabell 4.5.1.



Figur 4.5.1: Isotermer som viser målt overflatetrykk (mN/m) plottet mot gjennomsnittlig molekylareal (mma) for DEPC i blanding med CoQ₁₀ i følgende konsentrasjonsforhold; 0 (mørk blå), 0,5 (rød), 1 (grønn), 2 (lilla), 5 (lys blå) og 10 mol% (orange).

Av figur 4.5.1 og tabell 4.5.1 fremkommer det at isotermeren av DEPC med 2 mol% CoQ₁₀ opptar lavere mma enn ren DEPC gjennom hele kompresjonsforløpet. Med unntak av kollapsunktet, viser DEPC med 5 mol% CoQ₁₀ høyest mma gjennom hele isotermerens forløp. Isotermerne med 0,5 og 1 mol% CoQ₁₀ har tilnærmet samme mma ved lift- off, 20 og 30 mN/m samt ved kollapsunktet. Disse isotermerne har også høyest overflatetrykk ved kollapsunktet. Isotermerne av 0,5, 1 og 2 mol% CoQ₁₀ viser endret forløp sammenlignet med de øvrige lipidløsningene. Isotermeren med 10 mol% CoQ₁₀ følger forløpet til isotermerne med 0,5 og 1 mol% CoQ₁₀ frem til 30 mN/m, før den inntar lavere mma. Isotermeren med 10 mol% CoQ₁₀ kolliderer ved tilnærmet samme mma og overflatetrykk som ren DEPC.

Tabell 4.5.1: Oversikt over gjennomsnittlig molekylareal ved lift- off ($mN/m = 1,0$), overflatetrykk 20 og 30 mN/m og kollapsunkt for ren DEPC og DEPC i blanding med CoQ_{10} i ulike konsentrasjoner; 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Overflatetrykk ved lipidenes kollapsunkt samt prosentvis avvik mellom isotermene av ren DEPC og DEPC i blanding med CoQ_{10} er vist i tabellen. Verdiene er beregnet ut i fra gjennomsnitt av tre parallelle isotermer. Standardavvik for disse parallellene er vist.

	Lift- off ($mN/m = 1,0$)	$mN/m = 20$	$mN/m = 30$	Kollapsunkt	
	mma \pm SD	mma \pm SD	mma \pm SD	$mN/m \pm$ SD	mma \pm SD
Ren DEPC	117,9 \pm 0,0	71,0 \pm 0,2	61,0 \pm 0,2	38,4 \pm 1,7	55,1 \pm 0,2
DEPC m/0,5 mol% CoQ_{10}	119,5 \pm 0,2	73,2 \pm 0,4	65,2 \pm 0,4	44,9 \pm 2,0	57,1 \pm 0,4
DEPC m/1 mol% CoQ_{10}	121,2 \pm 0,0	75,1 \pm 0,2	65,9 \pm 0,3	42,7 \pm 1,9	57,7 \pm 0,3
DEPC m/2 mol% CoQ_{10}	106,9 \pm 0,3	64,6 \pm 0,6	57,7 \pm 0,6	41,0 \pm 3,5	51,2 \pm 0,6
DEPC m/5 mol% CoQ_{10}	135,2 \pm 0,0	79,2 \pm 0,3	66,4 \pm 0,4	40,7 \pm 0,6	55,7 \pm 0,4
DEPC m/10 mol% CoQ_{10}	125,4 \pm 0,2	74,0 \pm 0,4	63,9 \pm 0,4	39,7 \pm 2,8	54,8 \pm 0,4
Prosentavvik	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
0,5 mol% fra ren DEPC	1,4	3,1	6,9	16,9	3,6
1 mol% fra ren DEPC	2,8	5,8	8,0	11,2	4,7
2 mol% fra ren DEPC	-9,3	-9,0	-5,4	6,8	-7,1
5 mol% fra ren DEPC	14,7	11,5	8,9	6,0	1,1
10 mol% fra ren DEPC	6,4	4,2	4,8	3,4	-0,5

5 Diskusjon

En Langmuir isoterm beskriver et monolags kompresjonsforløp, og danner grunnlag for studie av interaksjoner mellom lipidene i monolaget. Interaksjonene vil være avhengig av acylkjedenes lengde og metningsgrad samt hodegruppens struktur og ladning. Tilsetning av CoQ₁₀ til en lipidløsning kan endre lipidenes kompresjonsforløp. Denne endringen gjenspeiler interaksjonene som finner sted mellom CoQ₁₀ og lipidmonolaget, og kan indikere hvilke deler av lipidene CoQ₁₀ interagerer med.

Problemstillingen i denne oppgaven har vært å undersøke effekten ulike konsentrasjoner av CoQ₁₀ har på monolag av ulike lipider. Resultatene fremkommet i dette arbeidet vil bidra til å gi et bedre bilde av CoQ₁₀ sin lokalisering i humane cellers membraner, samt hvordan CoQ₁₀ påvirker lipidenes pakking. Til å tolke resultatene blir parametere som lift-off, som er overgangen mellom gass- og væskefase, overflatetrykk ved 20 og 30 mN/m, som er cellens overflatetrykk, samt kollapsunkt sammenlignet for de ulike lipidløsningene. Under dette avsnittet blir det først gitt en drøfting av ren CoQ₁₀, etterfulgt av en sammenligning av rene lipidløsninger. Deretter blir POPS i blanding med CoQ₁₀ omtalt. Videre følger en drøfting av henholdsvis DPPC og TLEPB i blanding med CoQ₁₀, før DEPC i blanding med CoQ₁₀ til slutt diskuteres.

5.1 Sammenligning av rene lipidløsninger

I denne studien er det vist at ren CoQ₁₀ danner monolag med synlig lift- off, gassfase og ekspandert væskefase. Fastfase er ikke vist. Monolaget viser dannelse av multilag ved 10,2 mN/m. Tilsvarende monolagsdannelse av ren CoQ₁₀ er også beskrevet av Hoyo et al. [4].

Resultatene viser at samtlige lipidløsninger med POPS, DPPC, TLEPB og DEPC danner reproducerbare monolag. Lipidene har ulik størrelse på hodegruppene, ulik nettoladning ved pH 7,40 samt ulik grad av acylkjedemetning. DPPC og DEPC har størst hodegruppe og nettoladning 0, mens POPS har minst hodegruppe og nettoladning -1. DPPC har to mettede acylkjeder, POPS har en mettet og en umettet acylkjede i henholdsvis posisjon *sn*-1 og *sn*- 2, mens DEPC har to umettede acylkjeder. TLEPB er et lipidekstrakt satt sammen av ulike lipider med hodegrupper av varierende størrelse og ladning, samt ulik acylkjedelengde og acylkjedemetning. Resultatene viser at TLEPB har lift- off ved lavest mma. Dette kan relateres til lipidsammensetningen i ekstraktet, blant andre store og små molekyler som gangliosider og kolesterol. Tidligere studie av pakking av sfingolipid og kolesterol har vist dannelse av mikrodomener, hvor glykolipidene assosierer lateralt med hverandre gjennom svake karbohydrat-interaksjoner [57]. Glykolipidenes (gangliosidenes) store hodegruppe samt deres hovedsakelig mettede hydrokarbonkjeder danner rom i monolaget som kan fylles av små molekyler som kolesterol. Kolesterol kamufleres på denne måten av gangliosidene. Sistnevnte kan tenkes å være medvirkende til at TLEPB opptar lavere mma ved lift- off enn de øvrige lipidløsningene. TLEPB inneholder i tillegg lipider med små hodegrupper, eksempelvis PE og PA. Isotermen av TLEPB viser ingen plataer, og lipidene er tilsynelatende blandbare. Sistnevnte kan bety at lipidene med små hodegrupper også kan ta plass i rommet som dannes av gangliosidenes hodegrupper [58]. En effektiv pakking som beskrevet her, kan bidra til ytterligere reduksjon av mma ved lift- off for TLEPB. POPS opptar høyest mma ved lift- off, etterfulgt av henholdsvis DEPC og DPPC. At POPS opptar høyest mma kan skyldes serin- hodegruppens størrelse og ladning. I monolag av POPS vil de polare serin- hodegruppene være i subfasen. Det oppstår stabile hydrogenbindinger mellom hodegruppene og vannmolekylenes hydrogenatomer, hvilket vil resultere i dannelse av et hydrogenbindingsnettverk. Det vil i tillegg oppstå interaksjoner mellom den polare hodegruppen og ioner i subfasen, eksempelvis Na⁺. Vannmolekyler og subfasens ioner vil ta plass mellom serin- hodegruppene, noe som resulterer i at POPS opptar høyere mma i monolaget. DEPC og DPPC har lik hodegruppe, slik at variasjon i mma ved lift- off avgjøres

av deres ulike acylkjeder. Dobbelbindingene i acylkjedene hos DEPC gir hindret rotasjon om C=C-bindingene og resulterer i at acylkjedene får en knekk. Knekken medfører at DEPC opptar større areal i monolaget enn DPPC.

Isotermen av DPPC avviker fra de øvrige lipidløsningene ved at den har et platå. Dette platået inntreffer ved 5 til 10 mN/m og 65 til 85 mma. I dette området er stigningen i overflatetrykket lavere enn for resten av isotermløpet. Platået er et resultat av en faseovergang med en sameksistens av ekspandert væskefase (L_e) og kondensert væskefase (L_c) [59]. I L_e-fasen er lipidenes acylkjeder strukturelt uordnet og har hovedsakelig *gauche*-konfigurasjon. I L_c-fasen er acylkjedene i all-*trans*-konfigurasjon, og er sidestilte i forhold til monolagets normal med en vinkel på 25° [59].

Foruten om ved lift-off, opptar DEPC høyest mma gjennom alle faser av kompresjonsforløpet, etterfulgt av henholdsvis POPS, TLEPB og DPPC. Med unntak av TLEPB, antas resultatene å være en effekt av de respektive lipidenes acylkjedelengde og metningsgrad. Begrunnelsen for dette er acylkjedenes økende betydning for lipidenes mma etter hvert som monolaget komprimeres. Parallelt med kompresjon av lipidene, vil arealet tilgjengelig for vannmolekyler og ioner mellom lipidenes hodegrupper reduseres. Som følge av dette vil hydrogenbindingene og de ioniske interaksjonene til subfasen svekkes, og hodegruppens betydning for lipidenes mma blir mindre sentral. POPS opptar høyere mma enn DPPC gjennom hele kompresjonsforløpet, noe som viser at en umettet acylkjede har større effekt på lipidenes mma enn en stor og nøytral hodegruppe. Forskjell i mma mellom DEPC og DPPC har sammenheng med knekken i acylkjedene hos DEPC. En slik knekk fører til en mindre effektiv pakking av lipidene i monolaget. Mettede fosfolipider som DPPC har rette acylkjeder, og kan derfor pakkes tett i monolaget. Tett pakking forsterkes av at lipidene inngår i van der Waals bindinger som bidrar til å holde monolaget sammen. Hos fosfolipider med umettede acylkjeder vil disse van der Waals bindingene imidlertid brytes, dette for å forhindre at molekylene kommer for tett sammen [60]. TLEPB opptar lavere mma enn POPS, men høyere enn DPPC. Sistnevnte skyldes trolig store lipidmolekyler som gangliosider hos TLEPB. En stabilisering av gangliosidenes sukkergrupper gjennom interaksjon mellom karbohydratgruppene og en negativ ladning fra sialinsyren, kan i tillegg bidra til økt mma for TLEPB. Ulik acylkjedelengde og metningsgrad hos lipidene vil også bidra til å øke lipidenes

mma [58]. Gangliosidene evne til å kamuflere mindre molekyler hos TLEPB antas å være årsaken til at lipidekstraktet opptar lavere mma enn POPS.

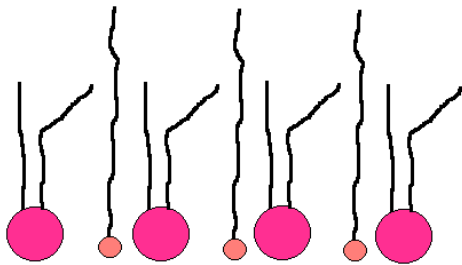
Resultatene viser at DPPC har mest effektivt pakkemønster og høyest stabilitet. Dette anses å være en konsekvens av lipidets to mettede acylkjeder. At TLEPB har høyere stabilitet enn DEPC og POPS skyldes trolig en mer effektiv pakking av lipidene, samt en stabiliserende effekt fra pakkingen av lipidenes acylkjeder. Monolaget av POPS er mindre stabilt enn DEPC, på tross av at DEPC har en umettet acylkjede mer enn POPS. At POPS er minst stabil skyldes trolig dens negativt ladde serin- hodegruppe. Ved høyt overflatetrykk er arealet mellom hodegruppene begrenset, og det dannes få stabiliserende hydrogenbindinger og ioniske interaksjoner med subfasen. Det kan dermed tenkes at de negativt ladde hodegruppene kan frastøte hverandre, noe som vil bidra til å redusere monolagets stabilitet.

Det henvises til tabell 4.1.1 for data for lift- off, 20 og 30 mN/m samt kollapsunkt.

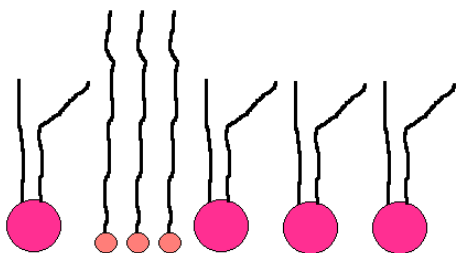
5.2 Sammenligning av POPS i blanding med CoQ₁₀

Resultatene viser at POPS danner reproducerbare monolag med CoQ₁₀ i samtlige av konsentrasjonsforholdene; 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Kompresjonsforløpet hos de enkelte monolagene skiller seg fra hverandre, hvilket betyr at CoQ₁₀ sin organisering i monolaget er konsentrasjonsavhengig. Ren POPS har lift- off ved høyere mma enn lipidløsningene tilsatt CoQ₁₀. Dette indikerer at CoQ₁₀ interkalerer i monolaget av POPS og virker inn på lipidenes pakking i gassfasen og gjør den mer effektiv. Frem til 25 mN/m viser ren POPS lavere mma og et annet forløp enn de øvrige lipidløsningene. Tilsetning av CoQ₁₀ til POPS resulterer dermed i at molekylene opptar større areal i monolaget, og det er grunn til å anta at CoQ₁₀ organiseres mellom lipidene i monolagene. Denne beskrivelsen av CoQ₁₀ sin organisering i monolag av POPS er i overenstemmelse med et tidligere beskrevet studie som fastslår en CoQ₁₀ orientering hvor molekylet er lokalisert mellom lipidene, parallelt med lipidenes acylkjeder [35].

Isotermen av POPS med 0,5 mol% CoQ₁₀ viser et platå i området 17 til 23 mN/m. Platådannelse indikerer ulike pakkeordninger blant molekylene i monolaget, for eksempel domenedannelse som vist i figur 5.2.1b. Platådannelse kan også være et resultat av at molekyler blir presset ut av monolaget.

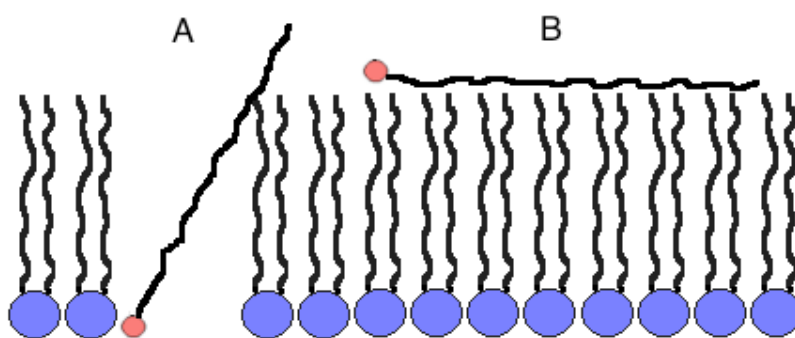


Figur 5.2.1a: Monolag uten domenedannelse. POPS og CoQ₁₀ er vist i henholdsvis rosa og orange farge



Figur 5.2.1b: Monolag med domenedannelse. POPS og CoQ₁₀ er vist i henholdsvis rosa og orange farge

Domenedannelse skjer ved at molekyler i monolaget samles gjennom lateral fase-segregering. I naturlige bilag kan domenedannelse trigges av ekstern stimuli som temperaturendring, endring i ionestyrke eller lateralt trykk samt integrering av et makromolekyl. Interaksjoner involvert i domenedannelse er følgende; krefter mellom molekylenes hodegrupper og krefter mellom halegruppene. Størrelsen på domenene kan variere fra et fåtall molekyler til et betydelig antall molekyler [61]. Plataet observert hos POPS med 0,5 mol% CoQ₁₀ antas imidlertid å skyldes utpressing av CoQ₁₀ fra monolaget. Dette støttes av at isothermen er sammenfallende med isothermen av ren POPS etter 61 mma. Da CoQ₁₀ inneholder en stor hydrofob gruppe, er sannsynligheten for at molekylet går over i subfasen svært liten. Det kan derfor tenkes at CoQ₁₀ som er presset ut av monolaget vil orienteres horisontalt over monolaget, vinkelrett på lipidenes acylkjeder. Denne organiseringen av CoQ₁₀ er også beskrevet av Hoyo et al., som gjennom studie av monolag av DPPC og CoQ₁₀ har vist hvordan utpressede CoQ₁₀-molekyler kan samles over monolagets lipider [4]. Dette er vist i figur 5.2.2. En CoQ₁₀-orientering som beskrevet over, støtter også resultatene fremkommet hos Wilhelmsen et al., som viser at interkalering av CoQ₁₀ gir en endring i acylkjedenes metylgrupper [35]. I fast fase opptar isothermen lavere mma enn ren POPS. Sistnevnte kan skyldes en mer effektiv pakking av lipidene som følge av hydrofobe krefter mellom lipidenes acylkjeder. POPS med 0,5 mol% CoQ₁₀ kollapser ved et marginalt høyere overflatetrykk enn ren POPS. En svak økning i stabilitet hos POPS med 0,5 mol% CoQ₁₀ antas å være et resultat av større areal tilgjengelig for POPS-lipidene etter at CoQ₁₀ er presset ut av monolaget.



Figur 5.2.2: Alternative organiseringer av CoQ₁₀ i lipidmonolag. A) Interkalering av CoQ₁₀ parallelt med monolagets lipider. B) Organisering av CoQ₁₀ horisontalt over monolagets lipider, vinkelrett på lipidenes acylkjeder. CoQ₁₀-molekyler som er blitt presset ut av monolaget kan tenkes å innta posisjonen vist i B. Lipider og CoQ₁₀ er markert med henholdsvis lilla og orange farge.

Isotermene av POPS med 1 og 2 mol% CoQ₁₀ er begge uten platå. Dette kan bety at CoQ₁₀ er organisert vertikalt mellom lipidmolekylene. Denne organiseringen gir en mer effektiv pakking og økt stabilitet i monolaget. Sistnevnte er vist ved at begge isotermene kollapser ved høyere overflatetrykk enn isotermeren for ren POPS. I fast fase opptar isotermeren av 2 mol% CoQ₁₀ lavere mma enn 1 mol% CoQ₁₀. Dette antas å være en effekt av begynnende dimerisering av CoQ₁₀ i monolaget av 2 mol% CoQ₁₀. En dimer tar opp mindre areal i monolaget enn to separate monomere.

Isotermene av POPS med 5 og 10 mol% CoQ₁₀ viser begge en "kink". En "kink" kan skyldes at det er dimere av CoQ₁₀ i monolaget, eller at det er domener ved at CoQ₁₀-molekyler er samlet i monolaget. I dette tilfellet er den trolig et resultat av at det finnes dimere av CoQ₁₀ i monolaget, og at disse blir ødelagt ved 17 mN/m. "Kinkene" er synlige ved samme overflatetrykk som platået hos 0,5 mol% CoQ₁₀. I isotermeren av 5 mol% CoQ₁₀ er den synlig ved høyere mma enn hos de øvrige to isotermene. Lavere mma med 0,5 mol% CoQ₁₀ skyldes høyere CoQ₁₀-konsentrasjon i monolaget av 5 mol% CoQ₁₀. At "kinken" med 10 mol% CoQ₁₀ er mindre og opptar lavere mma enn 5 mol% CoQ₁₀, kan skyldes dannelse av større aggregater enn dimere i førstnevnte monolag. Disse vil pakkes mer effektivt som følge av hydrofobe interaksjoner mellom molekylenes halegrupper. Etter "kinken" og frem til kollapsunktet viser isotermene av 5 og 10 mol% CoQ₁₀ reduksjon i mma. Isotermeren for 5 mol% CoQ₁₀ opptar omtrent likt mma som 2 mol% CoQ₁₀, og isotermeren av 10 mol% CoQ₁₀ nærmer seg 0,5 mol% CoQ₁₀. En reduksjon i mma som vist her, skyldes trolig at en del av CoQ₁₀ blir presset ut av monolaget, mens noen av CoQ₁₀-molekylene fortsatt er i monolaget. At begge monolagene kollapser ved høyere overflatetrykk og lavere mma enn ren POPS skyldes trolig mer effektiv pakking av lipidene i monolagene.

Det henvises til tabell 4.2.1 for data for lift-off, 20 og 30 mN/m samt kollapsunkt.

5.3 Sammenligning av DPPC i blanding med CoQ₁₀

Resultatene viser at DPPC danner reproducerbare monolag med CoQ₁₀ i samtlige av konsentrasjonsforholdene; 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Kompresjonsforløpene hos de enkelte monolagene er ulike, noe som kan tyde på at organisering av CoQ₁₀ i monolag av DPPC er konsentrasjonsavhengig.

DPPC inneholder en cholin- hodegruppe med nettoladning 0, samt to mettede acylkjeder. Cholin- hodegruppen er relativt stor, og er derfor den største bidragsyteren til lipidenes π i monolag av DPPC [58]. En eventuell interkalering av CoQ₁₀ mellom lipidenes hodegrupper vil kunne øke π mer enn om interkaleringen skjer mellom lipidenes acylkjeder. Plataået observert i isotermen av ren DPPC markerer en faseovergang med sameksistens av Le- og Lc-faser, hvor lipidenes acylkjeder går fra *gauche* konfigurasjon til all- *trans*- konfigurasjon. En endring i plataået hos isotermene tilsatt CoQ₁₀, kan gi informasjon om CoQ₁₀ sin organisering og interkalering i monolagene. Interkalering av CoQ₁₀ nært lipidenes hodegrupper vil eksempelvis virke mindre forstyrrende på den sameksisterende Lc-Le fasetransisjonen enn en interkalering dypt inn i lipidenes acylkjeder. Sistnevnte vil resultere i et mer kondensert monolag, da CoQ₁₀ i større grad vil tvinge acylkjedene over i all- *trans*- konfigurasjon. En eventuell forlengelse av et plataå kan tenkes å komme av en overgang fra *gauche* konfigurasjon til all- *trans*- konfigurasjon ved et høyere overflatetrykk. CoQ₁₀ interkaleres da nært hodegruppene, og det dannes mer rom for acylkjedene. Dette gir mer plass til acylkjeder med *gauche* konfigurasjon.

Isotermen av DPPC med 0,5 mol% CoQ₁₀ viser tilsvarende plataådannelse som ren DPPC, men ved lavere π . Sistnevnte kan sees i sammenheng med lavere π for hele isotermens forløp frem til 20 mN/m. At plataået observeres, indikerer at CoQ₁₀ interkalerer i monolaget av DPPC mellom hodegruppene. Siden π er redusert, antas det at CoQ₁₀ har en kondenserende effekt på monolaget, ved at hydrofobe interaksjoner mellom CoQ₁₀-molekylene presser lipidenes acylkjeder tettere sammen. Ved 20 og 30 mN/m opptar isotermene av 0,5 mol% CoQ₁₀ og ren DPPC tilnærmet likt π . Fra 30 mN/m og frem til kollapsunktet opptar 0,5 mol% CoQ₁₀ imidlertid marginalt høyere π enn ren DPPC. Dette er trolig en effekt av at CoQ₁₀ går inn mellom lipidene og øker deres π ved dette overflatetrykket. Isotermen kollapse ved tilnærmet likt overflatetrykk som ren DPPC. Tilsetning av CoQ₁₀ fører imidlertid til at monolaget med 0,5 mol% CoQ₁₀ opptar høyere

mma ved dette punktet. Også dette antas å komme av at CoQ₁₀ interkaleres parallelt med lipidene.

Isotermen av 1 mol% CoQ₁₀ viser platådannelse som ren DPPC. I gassfase og væskefase viser isotermen imidlertid en svak parallellforskyvning mot høyere mma. Dette kan skyldes økt konsentrasjon av CoQ₁₀ i monolaget. Plataået i isotermen viser marginalt kortere lengde enn plataået hos ren DPPC, noe som kan skyldes interkalering av CoQ₁₀ mellom lipidene i monolaget. Fra 25 mN/m og frem til kollaps punktet opptar isotermen tilnærmet likt mma som ren DPPC. Reduksjon i mma kan skyldes utpressing av CoQ₁₀ fra monolaget. Som beskrevet av Hoyo et al., vil interaksjoner mellom identiske DPPC molekyler være sterkere enn interaksjoner mellom to ulike molekyler som CoQ₁₀ og DPPC. Økning i overflatetrykket kan dermed resultere i at CoQ₁₀ presses ut av monolaget [4]. Reduksjon av en isotermes mma kan også skyldes dimerisering av CoQ₁₀ i monolaget. Dimerisering gir en mer effektiv pakking av CoQ₁₀ og lipidene, og de opptar mindre areal i monolaget. Sistnevnte antas å være årsaken til reduksjon i mma hos isotermen med 1 mol% CoQ₁₀. Bakgrunnen for dette er lavere overflatetrykk ved kollaps punktet hos denne isotermen sammenlignet med ren DPPC. Destabilisering av monolaget viser at CoQ₁₀ fremdeles er i monolaget.

Plataået hos isotermen for DPPC med 2 mol% CoQ₁₀ samsvarer med plataået hos ren DPPC. Dette kan tyde på en organisering av CoQ₁₀ parallelt med lipidene. At isotermen opptar høyere mma enn ren DPPC gjennom hele isotermens forløp, kan være forårsaket av at den hydrofile delen av CoQ₁₀ innordnes mellom DPPCs hodegrupper mens den hydrofobe delen er innordnet med lipidene. Isotermen kollapser ved lavere overflatetrykk enn isotermene av ren DPPC og 0,5 mol% CoQ₁₀. Dette antas å ha sammenheng med økt konsentrasjon av CoQ₁₀ i monolaget.

Isotermen med 5 mol% CoQ₁₀ viser en "kink" ved 5 mN/m og 84 mma. "Kinken" indikerer at det er dimere av CoQ₁₀ i monolaget, og at enkelte av disse blir ødelagt ved det aktuelle overflatetrykket. Isotermen opptar lavere mma enn isotermen med 2 mol% CoQ₁₀. Dette viser også dimerisering i monolaget. Dimerisering av CoQ₁₀ gir en tettere pakking av CoQ₁₀ og de mellomliggende lipidene. Dimeriseringen vil forstyrre acylkjedenes pakking og redusere deres tilgjengelige areal, slik at det ikke vil være rom for sameksisterende Le- og Lc- faser. Frem til 9 mN/m opptar isotermen lavere mma enn ren DPPC. Også dette antas å skyldes dimerisering av CoQ₁₀. Fra 9 mN/m og frem til kollaps punktet opptar isotermen marginalt

høyere mma enn ren DPPC. Dette skyldes trolig et tettere pakningsmønster hos ren DPPC. På tross av en mer effektiv pakning av lipidene hos 5 mol% CoQ₁₀, er dette monolaget mindre stabilt enn monolaget av 2 mol% CoQ₁₀.

Isotermen av 10 mol% CoQ₁₀ opptar høyest mma av lipidløsningene. Dette indikerer at CoQ₁₀ interkaleres i monolaget. Ved denne konsentrasjonen av CoQ₁₀ er det rimelig å anta at CoQ₁₀ foreligger som dimere eller høyere aggregater i monolaget. Isotermen viser en svak ”kink”, noe som kan være forårsaket av at trykket blir så høyt at aggregatene blir ødelagt. Noen CoQ₁₀-molekyler kan da presses ut av monolaget. Siden denne isotermen har høyest mma også i fast fase, indikerer dette at mange CoQ₁₀-molekyler er pakket i monolaget av DPPC, mest sannsynlig parallelt med acylkjedene. Isotermen kolliderer ved nest lavest overflatetrykk av samtlige lipidløsninger, hvilket indikerer at CoQ₁₀ i høy konsentrasjon reduserer stabiliteten hos monolag av DPPC.

Det henvises til tabell 4.3.1 for data for lift-off, 20 og 30 mN/m samt kollapsunkt.

5.4 Sammenligning av TLEPB i blanding med CoQ₁₀

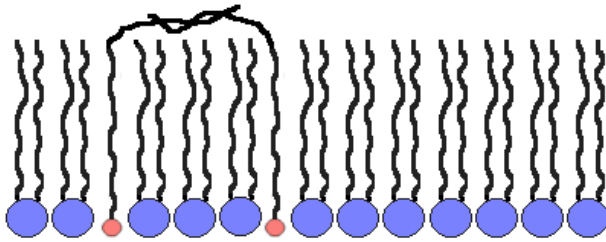
Resultatene viser at TLEPB danner reproduserbare monolag med CoQ₁₀ i samtlige av konsentrasjonsforholdene; 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Kompresjonsforløpene viser at mma endres ved tilsetning av CoQ₁₀, noe som kan tyde på at organisering av CoQ₁₀ i monolag av TLEPB er konsentrasjonsavhengig.

Isotermene av TLEPB med 1 og 2 mol% CoQ₁₀ viser begge likt forløp med isotermen av ren TLEPB. Isotermene opptar tilnærmet likt mma gjennom alle faser av kompresjonsforløpet, og kollapser ved omtrent samme overflatetrykk. Isotermene av TLEPB med 0,5, 5 og 10 mol% CoQ₁₀ viser alle en forskyvning mot høyere mma sammenlignet med ren TLEPB. Tilsetning av CoQ₁₀ i disse konsentrasjonsforholdene fører dermed til at molekylene opptar høyere areal i monolaget. Med bakgrunn i disse resultatene er det grunn til å anta at CoQ₁₀ organiseres mellom lipidene i monolagene. Som den eneste av lipidløsningene, viser isotermen av TLEPB med 10 mol% CoQ₁₀ en platådannelse.

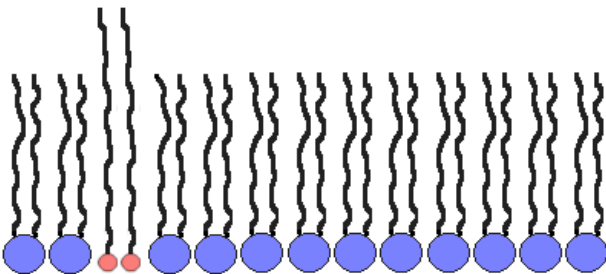
Isotermen av TLEPB med 0,5 mol% CoQ₁₀ viser samme kompresjonsforløp som ren TLEPB, men parallellforskjøvet mot høyere mma. Økt mma skyldes trolig at CoQ₁₀ interkaleres som monomere parallelt med monolagets lipider. Denne interkaleringen fører til at monolagets molekyler opptar høyere areal.

Isotermene av 1 og 2 mol% CoQ₁₀ viser begge lavere mma enn 0,5 mol% CoQ₁₀. Dette kan skyldes dimerisering av CoQ₁₀. Ved økt konsentrasjon av CoQ₁₀ blir avstanden mellom CoQ₁₀-molekylene mindre, og hydrofobe interaksjoner kan oppstå mellom CoQ₁₀s hydrofobe haler. Disse interaksjonene vil stabilisere og holde molekylene sammen i dimere. CoQ₁₀s halegrupper er lengre enn lipidenes acylkjeder, og to alternative former for dimerisering av CoQ₁₀ kan tenkes å skje i monolagene. Den første formen innebærer dimerisering av de hydrofobe halene hos to separate CoQ₁₀-molekyler over monolaget, som vist i figur 5.4.1a. Hydrofobe krefter gjør at de hydrofobe halene orienteres mot hverandre og holdes sammen. Den andre formen for dimerisering innebærer nær kontakt mellom to CoQ₁₀-molekyler, som vist i figur 5.4.1b. Dette kan tenkes å skje som følge av lateral forflytning av CoQ₁₀-molekylens hodegruppe. Mens de hydrofile hodegruppene er forankret i subfasen, vil de hydrofobe halegruppene holdes sammen av hydrofobe krefter. Ved dimerisering av CoQ₁₀,

kan det i tillegg tenkes at CoQ₁₀s halegrupper vil interferere med lipidenes acylkjeder. Dette vil gi en mer effektiv pakking av lipidene.



Figur 5.4.1a: Dimerisering av de hydrofobe halene hos to separate CoQ₁₀- molekyler over lipidmonolaget. De hydrofobe halene orienteres mot hverandre og holdes sammen av hydrofobe krefter. Lipider og CoQ₁₀ er markert med henholdsvis lilla og orange farge.



Figur 5.4.1b: Dimerisering av CoQ₁₀ som følge av lateral forflytning av CoQ₁₀- molekylenes hodegruppe i monolaget. Molekylenes hydrofile hodegrupper er forankret i subfasen, mens de hydrofobe halegruppene holdes sammen av hydrofobe krefter. Lipider og CoQ₁₀ er markert med henholdsvis lilla og orange farge.

Isotermen av TLEPB med 5 mol% CoQ₁₀ viser økt mma gjennom hele kompresjonsforløpet sammenlignet med ren TLEPB og TLEPB med 0,5 mol% CoQ₁₀. Dette antas å være en effekt av økt interkalering av dimere av CoQ₁₀ ved dette konsentrasjonsforholdet. Interkalering av flere dimere vil ta opp større plass i monolaget. I monolag med 10 mol% CoQ₁₀, vil omfanget av aggregering være større enn hos de øvrige lipidløsningene. Plataet observert hos TLEPB med 10 mol% CoQ₁₀ kan være et resultat av domenedannelse med faser bestående av kun CoQ₁₀ og TLPEB- lipider, eller at CoQ₁₀ induserer lateral faseparasjon i TLEPB- lipid. Reduksjon i mma etter endt platå kan bety at CoQ₁₀ blir presset ut av monolaget. Dette kan skje ved at domener ødelegges, og monomere av CoQ₁₀ går ut av monolaget. Frem til plataet opptar isotermen høyest mma av lipidløsningene, mens den ved plataets slutt opptar marginalt lavere mma enn isotermen av 0,5 mol% CoQ₁₀. Sistnevnte skyldes trolig gjenværende CoQ₁₀- monomere i monolaget.

Sammenligning av isotermene for ren TLEPB og TLEPB tilsatt CoQ₁₀ viser små variasjoner i overflatetrykk ved kollapspunkt. Dette betyr at tilsetning av CoQ₁₀ til TLEPB har liten effekt på monolagets stabilitet. De små variasjonene viser imidlertid en svak økning i stabilitet hos TLEPB med 1, 10 og 5 mol% CoQ₁₀, samt en svak destabiliserende effekt hos TLEPB med 0,5 og 2 mol% CoQ₁₀.

Det henvises til tabell 4.4.1 for data for lift- off, 20 og 30 mN/m samt kollapspunkt.

5.5 Sammenligning av DEPC i blanding med CoQ₁₀

Resultatene viser at DEPC danner reproducerbare monolag med CoQ₁₀ i samtlige av konsentrasjonsforholdene; 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol%. Kompresjonsforløpene hos de enkelte monolagene er ulike, noe som betyr at organisering av CoQ₁₀ i monolag av DEPC er konsentrasjonsavhengig. Kompresjonsforløpene indikerer videre en interkalering av CoQ₁₀ vertikalt mellom monolagets lipider. Organiseringen av CoQ₁₀ beskrevet her, er i overensstemmelse med resultatene fremkommet hos blant andre Wilhelmsen et al. [35].

I gass- og væskeekspandert fase viser isotermene av 0,5 og 1 mol% CoQ₁₀ samme kompresjonsforløp som ren DEPC. Økning i overflatetrykket gir imidlertid endret forløp hos disse to isotermene. Dette indikerer interkalering av CoQ₁₀ mellom monolagets lipider, trolig som monomere. DEPC har to umettede acylkjeder samt en stor hodegruppe, og opptar høyt mma i monolaget. I gass- og væskeekspandert fase er avstanden mellom disse lipidene stor, og lipidene kan beveges fritt. CoQ₁₀ kan da ta plass mellom lipidene uten å påvirke deres pakking nevneverdig. Etersom overflatetrykket øker, vil imidlertid arealet tilgjengelig mellom lipidene reduseres. CoQ₁₀ sin effekt på pakkingen av lipidene blir da mer fremtredende. CoQ₁₀ har en stor hydrofob halegruppe. Interkalering av denne halegruppen mellom lipidene, vil gi en lokal påvirkning på de nærliggende lipids acylkjeder. Umettede acylkjeder har en knekk som følge av C=C- dobbeltbindingen. Interaksjon fra CoQ₁₀ vil imidlertid tvinge acylkjedene mer sammen, og de vil rettes ut. Hydrofob effekt mellom halen til CoQ₁₀ og acylkjedene vil gi tettere pakking og ha en stabiliserende effekt i monolaget. Dette kan tenkes å være årsaken til endret forløp hos isotermene ved disse konsentrasjonsforholdene.

Isotermen av 2 mol% CoQ₁₀ viser samme kompresjonsforløp som 0,5 og 1 mol% CoQ₁₀, men ved lavere mma. Isotermen opptar også lavere mma enn ren DEPC. Reduksjon i mma skyldes trolig dimerisering av CoQ₁₀. En dimer opptar mindre areal enn to separate monomere. I tillegg kan hydrofobe interaksjoner mellom halegruppene bidra til ytterligere reduksjon i mma, da de induserer en tettere pakking av lipidenes acylkjeder.

Høyere mma hos 5 og 10 mol% CoQ₁₀ sammenlignet med ren DEPC skyldes trolig at dimere av CoQ₁₀ interkalerer i monolaget. Interkalering av dimere vil øke arealet i monolaget. At isotermen av 5 mol% CoQ₁₀ opptar høyere mma enn isotermen av 10 mol% CoQ₁₀, kan skyldes aggregatdannelse utover dimerisering i sistnevnte monolag. Samlet sett vil disse aggregatene utgjøre en større effekt på lipidenes acylkjedepakking enn hos 5 mol% CoQ₁₀. Høyere konsentrasjon av CoQ₁₀ vil gi kortere avstand mellom CoQ₁₀- molekylene, og flere lipider kommer i kontakt med molekylene. Flere umettede acylkjeder vil da bli presset sammen og acylkjedene endrer orientering. Lipidene vil da oppta lavere areal i monolaget. Tettere kontakt mellom molekylenes hydrofobe halegrupper vil også føre til hydrofobe interaksjoner mellom molekylene, noe som også vil bidra til mer effektiv pakking av lipidene.

Isotermene av DEPC med 0,5 og 1 mol% CoQ₁₀ kollapser begge ved marginalt høyere overflatetrykk enn de øvrige lipidløsningene. Dette skyldes trolig en mer effektiv pakking acylkjedene ved disse konsentrasjonsforholdene. Kun små variasjoner i overflatetrykk er registrert mellom de andre lipidløsningene, hvilket betyr at tilsetning av CoQ₁₀ i disse konsentrasjonsforholdene har liten påvirkning på monolagets stabilitet.

I motsetning til de biologiske fosfolipidene POPS og DPPC, er DEPC et ikke- biologisk fosfolipid. Som beskrevet innledningsvis, inneholder de fleste biologiske fosfolipider to mettede fettsyrer eller en mett og en umett fettsyre i henholdsvis posisjon *sn*-1 og *sn*-2. DEPC avviker fra de biologiske fosfolipidene ved at dette lipidet inneholder to umettede fettsyrer. I kombinasjon med en stor hodegruppe, gjør dette DEPC til et lipid som okkuperer et stort areal i et monolag. Basert på beskrivelsen av DEPC gitt over, er det av interesse å undersøke hvordan dette lipidet fungerer som modellsystem for en biologisk membran, og mer spesifikt hvordan CoQ₁₀ interkaleres i monolag av dette lipidet. Resultatene viser en konsentrasjonsavhengig interkalering av CoQ₁₀ i monolag hos samtlige lipider POPS, DPPC, TLEPB og DEPC. Isotermene av DEPC tilsatt CoQ₁₀ avviker imidlertid fra de biologiske lipidene ved at de mangler platådannelse og "kink". Platå eller "kink" kan gi informasjon om

molekylens pakkemønster i monolaget, og er sentralt for å kunne danne et helhetsbilde av interaksjonene mellom monolagets molekyler. Hos de biologiske lipidene kommer platådannelse og "kink" mest til uttrykk ved høye konsentrasjoner av CoQ₁₀, hvor CoQ₁₀ antas å indusere flere faser/domener. Manglende platådannelse eller "kink" i isotermene av DEPC viser at dette monolaget er annerledes enn monolagene av de biologiske lipidene. I dette monolaget blir ikke domener eller aggregater ødelagt. CoQ₁₀ blir heller ikke presset ut av monolaget. Endringer i lipidmonolaget forårsaket av CoQ₁₀ er blitt kamuflert, og DEPC gir dermed forenklete resultater sammenlignet med de biologiske lipidene. DEPC fremstår således som en mindre god modell for biologiske membransystemer.

Det henvises til tabell 4.5.1 for data for lift- off, 20 og 30 mN/m samt kollapsunkt.

6 Konklusjon

CoQ₁₀ danner monolag med POPS, DPPC, TLEPB og DEPC i samtlige konsentrasjonsforhold; 0,5, 1, 2, 5 og 10 mol% CoQ₁₀. Lipidmonolagene viser ulike kompresjonsforløp avhengig av konsentrasjon av CoQ₁₀ i monolaget. Dette viser at lokalisering av CoQ₁₀ i lipidmonolagene er konsentrasjonsavhengig. Det er også vist at lik CoQ₁₀- konsentrasjon gir ulike kompresjonsforløp hos lipidene. Interkalering av CoQ₁₀ i lipidmonolag er dermed også avhengig av lipidenes hodegrupper og acylkjeder.

Hos samtlige lipider er det vist at tilsetning av CoQ₁₀ til monolaget har påvirkning på lipidenes mma. CoQ₁₀ antas derfor å interkalere vertikalt mellom monolagenes lipider, og påvirke pakkingen av lipidene. Avhengig av konsentrasjonsforhold, antas det at CoQ₁₀ vil interkaleres som monomere, dimere eller større aggregater i monolagene. Dimerisering og/eller aggregatdannelse utover dimerisering skjer trolig hos samtlige lipider i monolag med høy konsentrasjon av CoQ₁₀ (5 og 10 mol%). En ”kink” som følge av at dimere blir ødelagt ved høyt trykk er registrert hos POPS og DPPC i disse konsentrasjonsforholdene. Platådannelse hos TLEPB med 10 mol% CoQ₁₀ er trolig et resultat av domenedannelse etterfulgt av utpressing av CoQ₁₀ fra monolaget. Utpressing av CoQ₁₀ antas også å være tilfelle i monolag av POPS med 0,5 mol% CoQ₁₀. CoQ₁₀- molekyler som forlater monolaget inntar mest sannsynlig en horisontal posisjon i bilagets midtplan, vinkelrett på lipidenes acylkjeder. Resultatene fremkommet i denne studien gir dermed grunn til å anta to alternative lokaliseringer av CoQ₁₀ i lipidmonolag, avhengig av CoQ₁₀- konsentrasjon samt lipidsammensetning i monolaget.

Langmuir monolagsteknikk er en unik metode anvendt på monolag, da den gjennom isothermene viser monolagets faseoverganger. Det faktum at metoden kun tar utgangspunkt i ett av de to monolagene som sammen utgjør et bilag, kan imidlertid anses som en begrensning ved metoden. Tidligere NMR- studier av CoQ₁₀s interkalering i bilag, viser en lokalisering av CoQ₁₀ parallelt med lipidenes acylkjeder. Tilsvarende studier basert på monolagsteknikker viser imidlertid at CoQ₁₀ kan gi en effekt oppå lipidenes acylkjeder. Basert på dette, kan det være rimelig å stille spørsmål om en horisontal lokalisering av CoQ₁₀ i membranens plan kan være en effekt av målemetoden mer enn en biologisk effekt? På nåværende tidspunkt finnes det ikke noe klart svar på dette spørsmålet. I denne oppgaven finnes det dermed størst grunnlag for å anta en vertikal lokalisering av CoQ₁₀ mellom lipidene i biologiske membraner.

Isotermene av det ikke- biologiske lipidet DEPC avviker fra de biologiske lipidene, da disse isotermene mangler platådannelse og ”kink”. Platå og ”kink” kan gi informasjon om molekylenes pakkemønster i monolaget, og er nyttig for å tolke interaksjonene som finner sted mellom molekylene i monolaget. Manglende platådannelse og ”kink” i isotermene av DEPC gjør det vanskelig å tolke interaksjonene som finner sted mellom CoQ₁₀ og lipidene. DEPC gir dermed forenklete resultater sammenlignet med de biologiske lipidene, og fremstår således som en mindre god modell for biologiske membransystemer.

Det er vist at CoQ₁₀ danner monolag alene. Monolaget viser Le fase samt dannelse av multilag ved 10,2 mN/m.

7 Videre arbeid

Langmuir monolagsteknikk tar utgangspunkt i et av de to lipidmonolagene som sammen utgjør et bilag. Metoden tar hensyn både til lipidenes hydrofile hodegruppe samt deres hydrofobe acylkjeder, og er anvendelig som modellsystem av biologiske membraner. Langmuir monolagsteknikk er videre en unik metode anvendt på monolag, ved at den gjennom isothermene synliggjør lipidmonolagets faser direkte.

I liket med alle andre metoder, har også Langmuir monolagsteknikk begrensninger. Metoden tar for eksempel kun utgangspunkt i ett av de to monolagene som sammen utgjør lipidbilaget, og gir dermed ikke et fullstendig bilde av interaksjonene i en biologisk membran. Metoden gir heller ingen svar på hvilke konkrete interaksjoner som finner sted blant monolagets molekyler, samt hvilke deler av molekylene som interagerer. På bakgrunn av dette kunne det vært av interesse å undersøke CoQ₁₀s effekt på lipidene POPS, DPPC, TLEPB og DEPC ved bruk av andre metoder, for eksempel NMR. På denne måten kunne en fått en verifisering av resultatene fremkommet i denne studien samt sett resultatene i et større helhetsperspektiv.

Som en videreføring av denne studien, kunne det også vært interessant å undersøke hvilken effekt vitamin E har på monolag av POPS, DPPC, TLEPB og DEPC. Vitamin E er en fettløselig forbindelse som i likhet med CoQ₁₀ også er inkorporert i biologiske membraner. Denne forbindelsen har i tillegg antioksidierende egenskaper, tilsvarende som CoQ₁₀.

8 Forkortelser

CoQ ₁₀	Coenzym Q ₁₀
POPS	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
TLEPB	Totalt lipidekstrakt fra grisehjerne (eng. Total Lipid Extract from pig brain)
DEPC	1,2-dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
PC	Fosfatidylcholin
PE	Fosfatidyletanolamin
PS	Fosfatidylserin
PI	Fosfatidylinositol
PA	Fosfatidinsyre (eng. phosphatidic acid)
T _m	Transisjonstemperatur
L _β	Gelfase
L _α	Væskefase
P _β	Pre- transisjonsfase
mma	Gjennomsnittlig molekylareal (eng. mean molecular area)
mN/m	milliNewton/meter
G	Gassfase
Le	Ekspandert væskefase
Lc	Kondensert væskefase
S	Fastfase

9 Referanser

1. Barbiroli, B., Frassinetti, C., Marinelli, P., Iotti, S., Lodi, R., Cortelli, P. og Montagna, P., *Coenzyme Q10 improves mitochondrial respiration in patients with mitochondrial cytophties. An in vivo study on brain and skeletal muscle by phosphorous magnetic resonance spectroscopy*. Cellular and Molecular Biology, 1997. **43** (5): 741-749.
2. Koroshetz, W. J., Jenkins, B. G., Rosen, B. R. og Beal, M. F., *Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10*. Annals of Neurology, 1997. **41** (2): 160-165.
3. Shults, C. W., Haas, R. H., Passov, D. og Beal, M. F., *Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parinsonian and nonparkinsonian subjects*. Annals of Neurology, 1997. **42** (2): 261-264.
4. Hoyo, J., Gaus, E., Torrent-Burguès, J. og Sanz, F., *Electrochemical behaviour of mixed LB films of ubiquinone- DPPC*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2012. **669**: 6-13.
5. Singer, S. J. og Nicholson, G. L., *The fluid Mosaic Model of the structure of Cell Membranes*. Science, 1972. **175** (4023): 720-731.
6. Luckham, P., Wood, J., Frogatt, S. og Swart, R., *The Surface Properties of Gangliosides: I. Monolayer Properties*. Journal of Colloid and Interface Science, 1993. **156** (1): 164-172.
7. Pratt, C. W. og Cornely, K., *Essential Biochemistry*. USA: John Wiley & Sons, Inc. 2004. 232-242.
8. Wikipedia. *Cell membrane* [Internett], Wikipedia. Tilgjengelig fra: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cell_membrane_detailed_diagram_edit2.svg> [Lest 18.11.13].
9. Gunstone, F. D., *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. London: Chapman at. Hal. 1996. 1-44.

10. Wang, G., Li, S., Lin, H., Brumbaugh, E. E. og Huang, C., *Effects of Various Numbers and Positions of cisDouble Bonds in the sn- 2 Acyl Chain of Phosphatidylethanolamine on the Chain- melting Temperature*. The Journal of Biological Chemistry, 1999. **274** (18): 12289-12299.
11. Leventis, P. A. og Grinstein, S. *The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes*. Annual Review of Biophysics, 2010. **39**: 407-427.
12. Ramstedt, B. og Slotte, J. P., *Membrane properties of sphingomyelins*. FEBS Lettes, 2002. **531** (1): 33-37.
13. Schaathun, M., *R- Artikain interaksjon med lipidmembraner studert ved Langmuir- Blodgett monolagsteknikk og fast-fase NMR*. 2012. Masteroppgave, Universitetet i Bergen. 8.
14. Barenholz, Y. og Thompson, T. E., *Shingomyelins in bilayers and biological membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Reviews on Biomembranes, 1980. **604**: 129-158.
15. Majewski, J., Kuhl, T. L., Kjaer, K. og Smith, G. S., *Packing of Ganglioside-Phospholipid Monolayers: An X- Ray Diffraction and Reflectivity Study*. Biophysical Journal, 2001. **81** (5): 2707- 2715.
16. Bach, D. og Wachtel, E., *Phospholipid/cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes, 2003. **1610** (2): 187-197.
17. Rawat, S. S., Viard, M., Gallo, S. A., Rein, A., Blumenthal, R. og Puri, A., *Modulation of entry of enveloped viruses by cholesterol and sphingolipids (Review)*. Molecular Membrane Biology, 2003. **20**: 243-254.
18. Cullis, P. R. og Kruijff, B. DE., *Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes*. Biochimica et Biophysica Acta, 1979. **559**: 399-420.
19. Gurr, M. I., Harwood, J. L. og Frayn, K. N., *Lipid Biochemistry*. Oxford: Blackwell Science. 2002. 239.
20. Hupfer, B. og Ringsdorf, H., i: *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*. New York: Plenum. 1985., vol 1. Kap. 3.
21. Barnes, G. T. og Gentle, I. R., *Interfacial Science- An introduction*. New York: Oxford University Press Inc. 2005. 247.

22. Huang, C. og Li, S., *Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behaviour of membrane phospholipids*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Reviews on Biomembranes*, 1999. **1422** (3): 273-307.
23. PubChem. *Palmitic Acid- Compound Summary* [Internett], National Center for Biotechnology Information. Tilgjengelig fra: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=985&loc=ec_rcs> 2004. [Lest 04.10.13].
24. ChemicalBook. *Oleyl alcohol* [Internett], ChemicalBook. Tilgjengelig fra: <http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB1353439_EN.htm> 2008. [Lest 04.10.13].
25. Avanti Polar Lipids, Inc. *POPS* [Internett], Avanti Polar Lipids, Inc. Tilgjengelig fra: <http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=616&Itemid=240&catnumber=840034> [Lest 04.10.13].
26. Avanti Polar Lipids, Inc. *DPPC* [Internett], Avanti Polar Lipids, Inc. Tilgjengelig fra: <http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1784&Itemid=460&catnumber=770355> [Lest 04.10.13].
27. Avanti Polar Lipids, Inc. *Brain Total Lipid Extract* [Internett], Avanti Polar Lipids, Inc. Tilgjengelig fra: <http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=408&Itemid=124&catnumber=131101> [Lest 03.10.13].
28. Jensen, M. og Nerdal, W. *Anticancer cisplatin interactions with bilayers of total lipid extract from pig brain: A ¹³C, ³¹P and ¹⁵N solid-state NMR study*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008. **34** (2-3): 140-148.
29. PubChem. *PC(22:1(13E)/22:1(13E)) - Compound Summary* [Internett], National Center for Biotechnology Information. Tilgjengelig fra: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=24779125&loc=ec_rcs> 2008. [Lest 04.10.13].
30. Avanti Polar Lipids, Inc. *DEPC* [Internett], Avanti Polar Lipids, Inc. Tilgjengelig fra: <http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1788&Itemid=460&catnumber=770398> [Lest 04.10.13].

31. Collins, M. D., *Analysis of isoprenoids quinones*, i: *Methods in Microbiology*. London: Academic Press, Inc. 1985, vol 18. 329-363.
32. Moss, G. P. *IUPAC- IUB Commission on Biochemical Nomenclature*. 1972. vol. 2002.
33. Crane, F. L., Hatefi, Y., Lester, R. L. og Widmer, C., *Isolation of a quinone from beef heart mitochondria*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1957. **25**: 220-221.
34. Ragan, C. I., *The role of phospholipids in the reduction of ubiquinone analogues by the mitochondrial reduced nicotinamide adenine dinucleotide- ubiquinone oxidoreductase complex*. *Biochemical Journal*, 1978. **172** (Del 3): 539-547.
35. Wilhelmsen, C. A., Jensen, M. og Nerdal, W., *Coenzyme-Q₁₀ Promotes Lipid Phases of High Molecular mobility when Interacting with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylserine: a ¹³C and ³¹P Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Study*. *International Review of Biophysical Chemistry*, 2011. **2**: 40-50.
36. Hauss, T., Dante, S., Haines, T. H. og Dencher, N. A., *Localization of coenzyme Q₁₀ in the center of a deuterated lipid membrane by neutron diffraction*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 2005. **1710**: 57-62.
37. Metz, G., Howard, K. P., van Liemt, W. B. S., Prestegard, J. H. og Smith, S. O., *NMR studies of ubiquinone location in oriented Model membranes: Evidence for a single Motionally averaged population*. *Journal of American Chemical Society*, 1995. **117** (1): 564-565.
38. Katzikas, H. og Quinn, P. J., *The interaction of coenzyme Q with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 1981. **133** (2): 230-234.
39. Katzikas, H. og Quinn, P. J., *The distribution of ubiquinone-10 in phospholipid bilayers*. *European Journal of Biochemistry*, 1982. **124** (1): 165-169.
40. Stidham, M. A., McIntosh, T. J. og Siedow, J. N., *On the localization of ubiquinone in phosphatidylcholine bilayers*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1984. **767** (3): 423-431.
41. Ondarroa, M. og Quinn, P. J., *Proton magnetic resonance spectroscopic studies of the interaction of ubiquinone- 10 with phospholipid model membranes*. *European Journal of Biochemistry*, 1986. **155** (2): 353-361.

42. Tutunen, M., Olsson, J. og Dallner, G. *Metabolism and function of coenzyme Q*. Biochimica Biophysica Acta, 2004. **1660** (1-2): 171-199.
43. Ernster, L. og Dallner, G., *Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function*. Biochimica Biophysica Acta, 1995. **1271**: 195-204.
44. Kaufmann, H. P. og Garloff, H., *Pro and antioxidants in fats. II. Naturally occurring antioxidants*. 1- Fette, Seifen, Anstrichmittel, 1961. **63**: 334-344.
45. Sigma- Aldrich. *Coenzyme Q₁₀* [Internett], Sigma- Aldrich Co. Tilgjengelig fra: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9538?lang=en®ion=NO>> [Lest 04.10.13].
46. Steinkopf, S., Schelderup, A. K., Gjerde, H. L., Pfeiffer, J., Thoresen, S., Gjerde, A. U. og Holmsen, H., *The psychotropic drug olanzapine (Zyprexa®) increases the area of acid glycerophospholipid monolayers*. Biophysical Chemistry, 2008. **134** (1-2): 39-46.
47. Kaganer, V. M., Möhwald, H. og Dutta, P., *Structure and phase transitions in Langmuir monolayers*. Reviews of Modern Physics, 1999. **71** (3): 779-819.
48. Pockels, A., Nature, 1891. **43**: 437.
49. Lord Rayleigh, Philos. Mag., 1899. **48**: 321.
50. Langmuir, I., *Pilgrim Trust Lecture. Molecular Layers*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences, 1939. **170** (940): 1-39.
51. KSV NIMA. *KSV NIMA Langmuir and Langmuir-Blodgett Deposition Troughs* [Internett], KSV NIMA. Tilgjengelig fra: <<http://www.ksvnima.com/file/brochures-2/ksvnimalb brochure21-08 2013.pdf>> [Lest 21.10.13].
52. Gjerde, A. U., *Kurshefte HUCEL340, human cellebiologi*. 2006, UiB.
53. KSV NIMA. *Langmuir, Langmuir-Blodgett, Langmuir-Schaefer technique* [Internett], KSV NIMA. Tilgjengelig fra: <<http://www.ksvnima.com/technologies/langmuir-blodgett-langmuir-schaefer-technique>> [Lest 21.10.13].

54. Broniec, A., Gjerde, A. U., Ølmheim, A. B. og Holmsen, H., *Trifluoperazine Causes a Disturbance in Glycerophospholipid Monolayers Containing Phosphatidylserine (PS): Effects of pH, Acyl Unsaturation, and Proportion of PS*. *Langmuir*, 2007. **23** (2): 694-699.
55. User manual. KSV Monolayer Kit. *Basic experiments for KSV Langmuir and Langmuir-Blodgett instruments*. Helsinki, KSV Instruments Ltd. 2010.
56. KSV NIMA. *Langmuir and Langmuir-Blodgett Troughs* [Internett], KSV NIMA. Tilgjengelig fra: <<http://www.ksvnima.com/products/langmuir-and-langmuir-blodgett-troughs#>> [Lest 06.09.13].
57. Simons, K. og Ikonen, E., *Functional rafts in all membranes*. *Nature*, 1997. **387** (6633): 569-572.
58. Steinkopf, S., Hanekam, L., Schaathun, M., Budnjo, A., Haug., B. E. og Nerdal, W., *Interaction of local anaesthetic articaine enantiomers with brain lipids: A Langmuir monolayer study*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012. **47** (2): 394-401.
59. Ma, G. og Allen, H. C., *DPPC Langmuir Monolayer at the Air- Water Interface: Probing the Tail and Head Groups by Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy*. *Langmuir*, 2006. **22** (12): 5341-5349.
60. Zhao, L. og Feng, S., *Effects of lipid chain unsaturation and headgroup type on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembrane*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005. **285** (1): 326-335.
61. Binder, W. H., Barragan, V. og Menger, F. M., *Domains and Rafts in Lipid Membranes*. *Angewandte Chemie (International ed.)*, 2003. **42** (47): 5802-5827.

10 Vedlegg

Vedlegg 1: Beregninger benyttet ved tillaging av reagenser

Vedlegg 1

Beregninger benyttet ved tillaging av reagenser

m = masse

v = volum

c = konsentrasjon

M_w = molekylvekt

$c = n/v$

$n = m/M_w$

Hepesbuffer

$M_w = 238,1 \text{ g/mol}$

$c = 5 \text{ mM} = 5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$

v = 1 liter

Mengde Hepes innveid:

$c = n/v \rightarrow n = c \times v$

$n = 0,005 \text{ mol/L} \times 1,00 \text{ L} = 0,005 \text{ mol}$

$n = m/M_w \rightarrow m = n \times M_w$

$m = 0,005 \text{ mol} \times 238,1 \text{ g/mol} = \underline{1,1915 \text{ g}}$

Lipidløsninger

Stockløsninger

POPS og DPPC

m = 5 mg lipid

v = 2,5 ml kloroform

c = 2 mg/ml

c = 5 mg / 2,5 ml = 2 mg/ml

TLEPB og DEPC

m = 10 mg lipid

v = 5 ml kloroform

c = 2 mg/ml

c = 10 mg / 5 ml = 2 mg/ml

Bruksløsninger

Under vises beregninger for tillaging av følgende bruksløsninger for POPS;

- ren lipidløsning (0 % CoQ₁₀)
- Blanding POPS/CoQ₁₀ med 10 mol% CoQ₁₀

Beregninger for øvrige bruksløsninger benyttet i det eksperimentelle arbeidet er ikke vist under dette avsnittet, men er utført på tilsvarende måte.

Konsentrasjon, bruksløsninger: 1 mg/ml

Totalvolum, bruksløsninger: 1 ml

Ren lipidløsning (0 % CoQ₁₀)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$2 \text{ mg/ml} \times V_1 = 1 \text{ mg/ml} \times 1 \text{ ml}$$

$$V_1 = (1 \text{ mg/ml} \times 1 \text{ ml}) / 2 \text{ mg/ml} = 0,5 \text{ ml} = \underline{500 \mu\text{l}}$$

500 μl stockløsning ble fortynnet med 500 μl kloroform, hvilket gir en konsentrasjon på 1 mg/ml på bruksløsningen.

Blanding POPS/CoQ₁₀ med 10 mol% CoQ₁₀

$$v, \text{ stockløsning} = 0,5 \text{ ml} = 500 \mu\text{l}$$

$$m, \text{ POPS i bruksløsning} = 0,5 \text{ ml} \times 2 \text{ mg/ml} = 1 \text{ mg} = \underline{0,001 \text{ g}}$$

Antall mol POPS i bruksløsningen:

$$M_w, \text{ POPS} = 783,988 \text{ g/mol}$$

$$n, \text{ POPS} = 0,001 \text{ g} / 783,988 \text{ g/mol} = \underline{1,276 \times 10^{-6} \text{ mol}}$$

Antall mol CoQ₁₀ i bruksløsningen:

$$n, \text{ CoQ}_{10} = 1,276 \times 10^{-6} \text{ mol} \times 10\% = \underline{1,276 \times 10^{-7} \text{ mol}}$$

Volum CoQ₁₀- stockløsning som tilsettes bruksløsningen:

$$M_w, \text{CoQ}_{10} = 863,4 \text{ g/mol}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_2 = 1 \text{ ml} = \underline{0,001 \text{ L}}$$

$$C_2 = [\text{CoQ}_{10}]_{\text{mix, slutt}} = 1,276 \times 10^{-7} \text{ mol} / 0,001 \text{ L} = \underline{1,276 \times 10^{-4} \text{ mol/L}}$$

$$C_1 = [\text{CoQ}_{10}]_{\text{stockløsning}} = (0,005 \text{ g} / 863,4 \text{ g/mol}) / 0,0025 \text{ L} = \underline{2,32 \times 10^{-3} \text{ mol/L}}$$

$$V_1 = v, [\text{CoQ}_{10}]_{\text{stockløsning}} = (1,276 \times 10^{-4} \text{ mol/L} \times 0,001 \text{ L}) / 2,32 \times 10^{-3} \text{ mol/L} = 5,5 \times 10^{-5} \text{ L}$$

$$V_1 = 5,5 \times 10^{-5} \text{ L} = 55 \text{ }\mu\text{L}$$

Innhold i bruksløsning med blanding POPS/CoQ₁₀ med 10 % CoQ₁₀:

$$v, \text{POPS- stockløsning} = 500 \text{ }\mu\text{L}$$

$$v, \text{CoQ}_{10}\text{- stockløsning} = 55 \text{ }\mu\text{L}$$

$$v, \text{kloroform} = 445 \text{ }\mu\text{L}$$