

Veronika Kralj-Iglič¹, Aleš Iglič², Henry Hägerstrand³, Malgorzata Bobrowska-Hägerstrand⁴

Hipoteza o nanostrukturah celičnih in fosfolipidnih membran kot infrastrukturi celice

*Hypothesis on Nanostructures of Cell and Phospholipid
Membranes as Cell Infrastructure*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: eritrocitna membrana – ultrastruktura, lipidni dvosloj, fosfolipidi, membrane umetne, modeli teoretični

Predstavljamo eksperimente, ki so privedli do nastanka hipoteze o prikritih membranskih nanostrukturah kot infrastrukturi celice in teoretične osnove te hipoteze.

ABSTRACT

KEY WORDS: erythrocyte membrane – ultrastructure, lipid bilayers, phospholipids, membranes artificial, models theoretical

Experiments and theoretical studies are presented that have led to the hypothesis of a sub-jacent pool of membranous nanostructures representing cell infrastructure.

¹ Izr. prof. dr. Veronika Kralj-Iglič, univ. dipl. inž. fiz., Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biofiziko, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana, Slovenija.

² Izr. prof. dr. Aleš Iglič, univ. dipl. inž. fiz., Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za fiziko, Tržaška 25, 1000 Ljubljana, Slovenija.

³ Doc. dr. Henry Hägerstrand, univ. dipl. biol., Åbo Akademi University, Department of Biology, Biocity, Åbo/Turku, Finska.

⁴ Mag. Malgorzata Bobrowska - Hägerstrand, univ. dipl. inž. fiz., Åbo Akademi University, Department of Biology, Biocity, Åbo/Turku, Finska.

UVOD

Celična membrana je pomemben gradnik celice. Razumevanje soodvisnosti procesov, ki potekajo v celicah, se zdi nemogoče brez razumevanja delovanja celičnih membran. Zato so bile celične membrane predmet mnogih raziskav. Pred približno tridesetimi leti sta Singer in Nicholson izdelala hipotezo tekočega mozaika (45). V okviru te hipoteze membrano obravnavamo kot lipidno dvojno plast, v kateri so porazdeljene ostale molekule, predvsem proteini in glikolipidi. Membranski gradniki se v okviru omejitev, ki jih predstavlja citoskelet, lahko lateralno gibljejo po membrani. V lateralni smeri ni reda dolgega dosega, zato lahko membrano opišemo kot dvodimenzionalno tekočino. Številni eksperimenti in teoretične študije zadnjih tridesetih let so podprle hipotezo tekočega mozaika, ki je tako postala standardni model za opis membran v celici. Uspešnost modela je določena s tem, da se njegove splošne ugotovitve skladajo z eksperimenti, pa tudi v tem, da je mogoče model nadgraditi z vključitvijo novih znanj. Tako je bilo mogoče model tekočega mozaika nadgraditi z upoštevanjem rezultatov eksperimentov, ki so pokazali, da se določene membranske sestavine organizirajo v dinamične funkcionalne enote (membranske rafte), ki plavajo v membrani in delujejo kot platforme za vezavo proteinov (44).

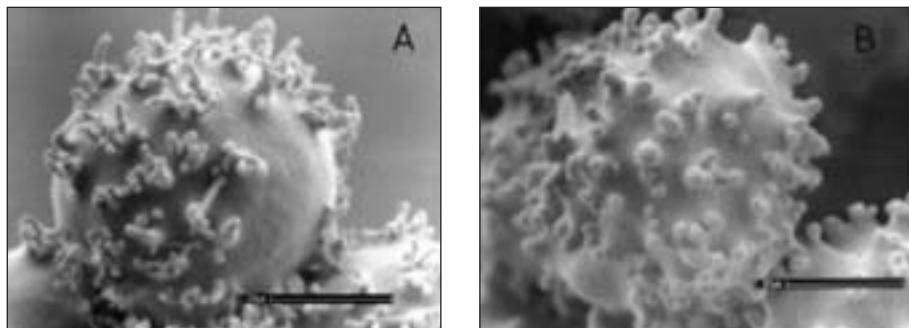
Rezultati eksperimentalnega in teoretičnega dela sodelavcev naše skupine, ki vključuje raziskovalce iz Finske, Poljske, Nemčije in Slovenije, zadnjih dvajsetih let kažejo, da celične in umetne membrane lahko tvorijo nanostrukture, kot so na primer nanotube, pore in ozki

vratovi. Hipoteza o prikritih membranskih nanostrukturah, ki je izšla iz tega dela, predpostavlja, da membranske nanostrukture v povezavi z manj ukrivljenimi deli membrane omogočajo prenos snovi in informacij med predelki v celici in tako tvorijo infrastrukturo celice. Razlaga stabilnosti membranskih nanostruktur implicira nadgradnjo modela tekočega mozaika z vključitvijo orientacijskega urejanja membranskih sestavin v nanostrukturah.

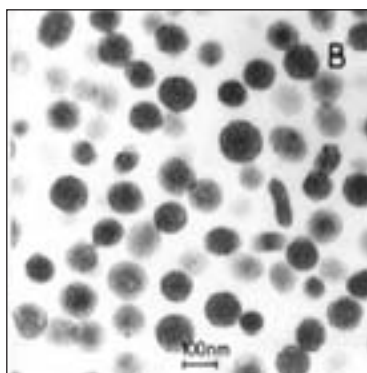
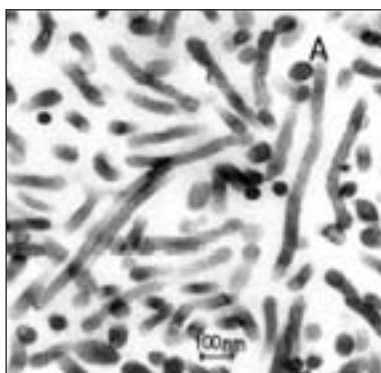
MEMBRANSKE MIKRO- IN NANOSTRUKTURE ERITROCITOV SESALCEV

Zreli eritrociti sesalcev so primeren sistem za študij lastnosti membran; ker nimajo jedra, citoskelet pa tvori dvodimenzionalno mrežo, ki se na citoplazemski strani prilaga lipidni dvojni plasti, je oblika celice določena predvsem z lastnostmi membrane (lipidne dvojne plasti in citoskeletne mreže). Dogajanja, povezana z membrano, se tako odražajo v obliki celice, ki jo lahko opazujemo pod mikroskopom.

Opazili so (7, 43), da spreminjanje pogojev v zunanji raztopini eritrocitov, kot na primer dodajanje različnih snovi, lahko spremeni obliko eritrocita, ki je pri normalnih *in vitro* pogojih diskocitna. Hipoteza sklopljenih plasti razloži ta pojav z vgrajevanjem dodanih molekul v membrano (8, 20, 43), pri čemer je pomembna afiniteta zunanje oziroma notranje plasti membrane za to vrsto molekul, pa tudi lastnosti zunanje in notranje raztopine. Sprememba razlike površin zunanje in notra-



Slika 1. Brstenje membrane eritrocita po dodatku ehinocitogenih detergentov (A) $40\ \mu\text{M}$ dodecilmaltosida oziroma (B) $40\ \mu\text{M}$ dodecylvitergenta v suspenzijo eritrocitov. Presevani elektronski mikroskop Cambridge Instruments S360. Črtica je dolga $2\ \mu\text{m}$.

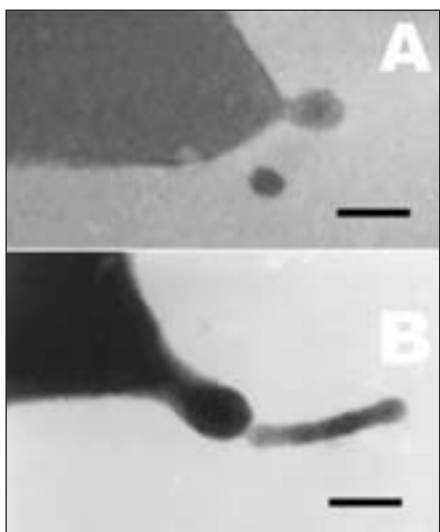


Slika 2. Populacija tubastih (A) in kroglastih (B) nanoeksovezikov membrane eritrocita. Tubasti vezikli so nastali po centrifugiranju suspenzije eritrocitov z dodanim dodecilmaltosidom, kroglasti vezikli so nastali po centrifugiranju suspenzije eritrocitov z dodanim dodeciltvitergentom. Transmisijski elektronski mikroskop JOEL 100SX.

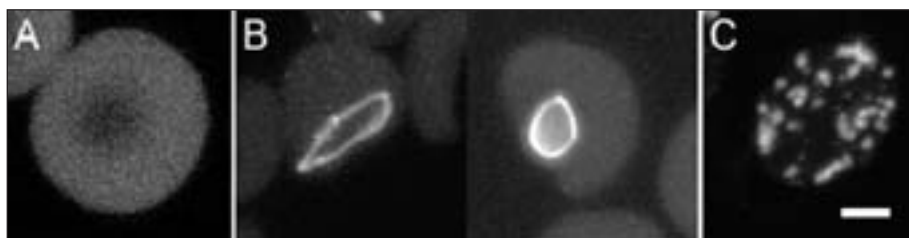
nje plasti membrane povzroči spremembo oblike eritrocita. Če se površina zunanje plasti poveča glede na površino notranje, se celica naguba navzven (nastane ehinocit), če se površina zunanje plasti zmanjša glede na površino notranje, se celica naguba navznoter (nastane stomatocit).

Detergenti so amfifilne molekule, sestavljene iz glave in ogljikovodikovega repa. Ker

se vgrajujejo v eritrocitovo membrano, povzročijo spremembo oblike eritrocita (26). Pri določenih pogojih pri tem nastanejo nanostrukture, kot so brsti in hčerinski vezikli, ki nastanejo iz matične eritrocitove membrane (13, 14). Pri eksperimentih (podroben opis eksperimentov je v 13–15) je bila odvzeta venska kri avtorjev. Eritrociti so bili trikrat izprani v pufru s pH = 7,4. Koncentracije detergentov so bile pod vrednostmi, ki povzročajo hemolizo po 60-minutni inkubaciji. Vezikli so bili izolirani s centrifugiranjem. Rezultati eksperimentov so pokazali, da vgrajevanje ehinocitogenih detergentov privede do brstenja membrane na vrhu ehinocitovih izrastkov (14, 31, 35), nazadnje pa do nastanka nanoeksovezikov (14, 16, 31). Analiza izoliranih nanoeksovezikov je pokazala (15), da v njih ni elementov membranskega skeleta. Brsti (sliki 1 in 3) in izolirani nanoeksovezikli (slika 2) se lahko razlikujejo po obliki (14, 16, 31). Pri dodajanju nekaterih vrst detergentov so imeli nanoeksovezikli obliko kroglic, pri dodajanju drugih vrst detergentov pa tubasto obliko. Ustrezne oblike so nakazane že v procesu brstenja (sliki 1 in 3). Tubasti nanoeksovezikli so nastali po brstenju, pri katerem so imeli izrastki podolgovato tubasto obliko, medtem ko so kroglasti nanoeksovezikli nastali po brstenju, pri katerem so bili izrastki krajši in širši. Na slikah 1–3 vidimo, da so brsti in nanoeksovezikli v vsaj eni dimenziji zelo majhni – reda velikosti nekaj deset nanometrov. Zato jih ni mogoče opazovati pod optičnim mikroskopom. Če v suspenzijo eritrocitov



Slika 3. (A). Kroglasti brst na vrhu izrastka človeškega ehinocita. Suspenziji eritrocitov je bila dodana raztopina dodeciltvitergenta s koncentracijo 263 μM . (B). Tubasti brst na vrhu izrastka človeškega ehinocita. Suspenziji eritrocitov je bila dodana 100 μM raztopina dimernega surfaktanta dioktilidiquas. Povzeto po (31). Transmisijski elektronski mikroskop JOEL 100SX. Črtica je dolga 100 nm.



Slika 4. (A). Človeški eritrocit pri normalnih in vitro pogojih. (B). Stomatocita s torocitnima endoveziklo po inkubaciji v 44 μM raztopini oktaetilenglikoladodeciletra (C12E8). (C). Stomatocit z majhnimi kroglastimi endovezikli po inkubaciji v 100 μM raztopini klorpromazina. Suspendija eritrocitov je bila inkubirana 60 min pri temperaturi 37 $^{\circ}\text{C}$ v prisotnosti FITC-dekstrana. Povzeto po (17). Leica konfokalni laserski presevalni mikroskop z Adobe in Corel-Draw programsko opremo. Črtica je dolga 1 μm .

dodamo detergente, ki povzročajo stomatocitozo (manjšajo površino zunanje plasti glede na površino notranje), pride do brstenja membrane navznoter (v citoplazemsko stran). Nastanejo lahko majhni okrogli endovezikli (slika 4C), tubasti endovezikli ali pa nekoliko večji ploščati vezikli z ravnim centralnim delom – tako imenovani torocitni endovezikli (sliki 4B, 5) (4, 14, 17), odvisno od vrste dodanega detergenta.

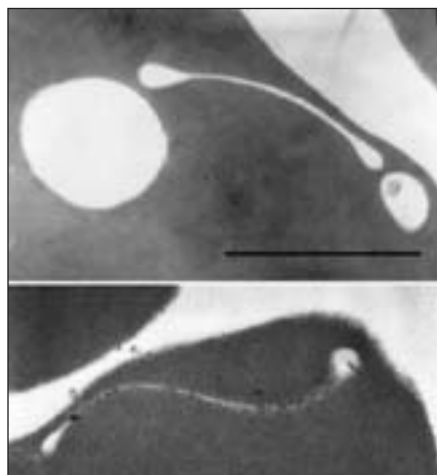
MEMBRANSKE MIKRO- IN NANOSTRUKTURE FOSFOLIPIDNIH MEHURČKOV

Da bi bil energijski neugoden stik med vodnimi molekulami in ogljikovodikovimi repi fosfolipidnih molekul kar se da majhen, se fosfolipidne molekule v vodni raztopini uredijo v zaključene dvoplastne strukture – mehurčke. Membrano mehurčkov tvori fosfolipidna dvojna plast. V procesu elektroformacije nastanejo orjaški fosfolipidni mehurčki (1), ki imajo tipične polmere reda 10 μm .

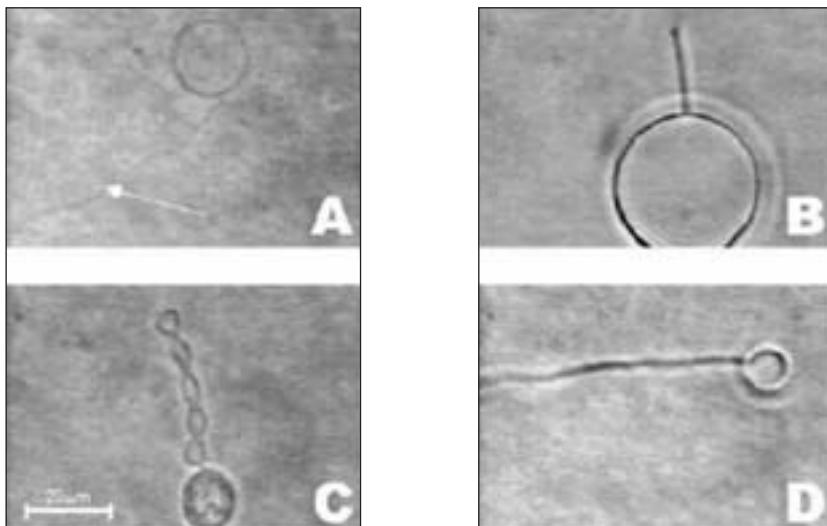
Pri eksperimentih (podrobno opisanih v 33) namažemo v kloroform raztopljene fosfolipidne molekule na vzporedni platinasti žički, ki sta oddaljeni za nekaj milimetrov. Ko kloroform izhlapi, elektrodi zalijemo z vodno raztopino in na žički priključimo izmenično električno napetost. Po določenem času amplitudo in frekvenco napetosti postopoma zmanjšamo na ničelno vrednost. Mehurčke, ki se kot grozd naberejo na elektrodah, izplaknemo iz celice za elektroformacijo in jih nato opazujemo pod optičnim mikroskopom s faznim kontrastom. Če so v membrano vgrajene molekule fluorescenčnih označevalcev ali pa če so v notranji raztopini mehurčka fluo-

rescenčne molekule, lahko mehurčke opazujemo tudi pod fluorescenčnim mikroskopom.

Ker fosfolipidna dvojna plast tvori osnovo celične membrane, imajo fosfolipidni mehurčki in celične membrane nekatere skupne lastnosti. Obstoj stabilnih nanostruktur iz eritrocitove membrane tako nakazuje tudi možnost obstoja stabilnih nanostruktur iz fosfolipidne membrane. Pri eksperimentu z orjaškimi mehurčki, ki so imeli v membrano vgrajene fluorescenčne označevalce in so nastali z elektroformacijo (36), so z laserjem zadušili svetlobo, ki je izhajala iz fluorescenčnih označevalcev na izbranem mestu v grozdu fosfolipidnih mehurčkov. Izkazalo se je, da so mehurčki na tem mestu čez nekaj minut spet svetili. Fluorescenčni označevalci so se iz membran sosednjih

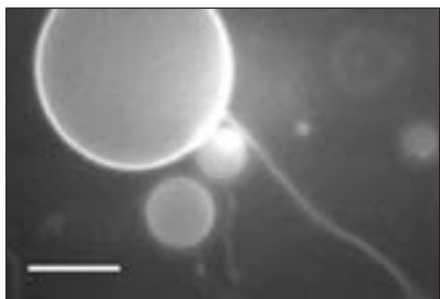


Slika 5. Torocitni endovezikli v notranjosti človeških eritrocitov. Torocitni endovezikli so nastali po inkubaciji eritrocitov v 44 μM raztopini oktaetilenglikoladodeciletra (C12E8). Povzeto po (4). Transmisijski elektronski mikroskop JOEL 100SX. Črtica je dolga 1 μm .



Slika 6. Različni orjaški fosfolipidni mehurčki iz palmitoileoilfosfatidilholina (POPC) v čisti vodi. (A). Mehurček z dolgim tankim izrastkom. (B). Mehurček s krajšim tubastim izrastkom. (C). Mehurček z unduliranim izrastkom; v globularnem delu vidimo multilamelarno strukturo. (D). Mehurček z dolgim tubastim izrastkom; fokus je na izrastku, ki ni v isti ravnini kot mehurček. Povzeto po (34). Invertni optični mikroskop Zeiss IM 35 s faznim kontrastom.

mehurčkov preselili na membrane mehurčkov, ki niso svetili. Čas, ki so ga za to potrebovali, je bil prekratek, da bi do tega lahko prišlo s prehajanjem molekul v zunanjo raztopino in iz nje (36). Da bi razložili opaženi pojav, so predpostavili, da se fluorescenčni označevalci premaknejo na sosednje mehurčke po tankih tubastih strukturah, ki povezujejo mehurčke v mrežo. Te povezave naj bi bile tako tanke, da jih ni bilo mogoče videti pod optičnim mikroskopom, in tako krhke, da jih ni bilo mogoče

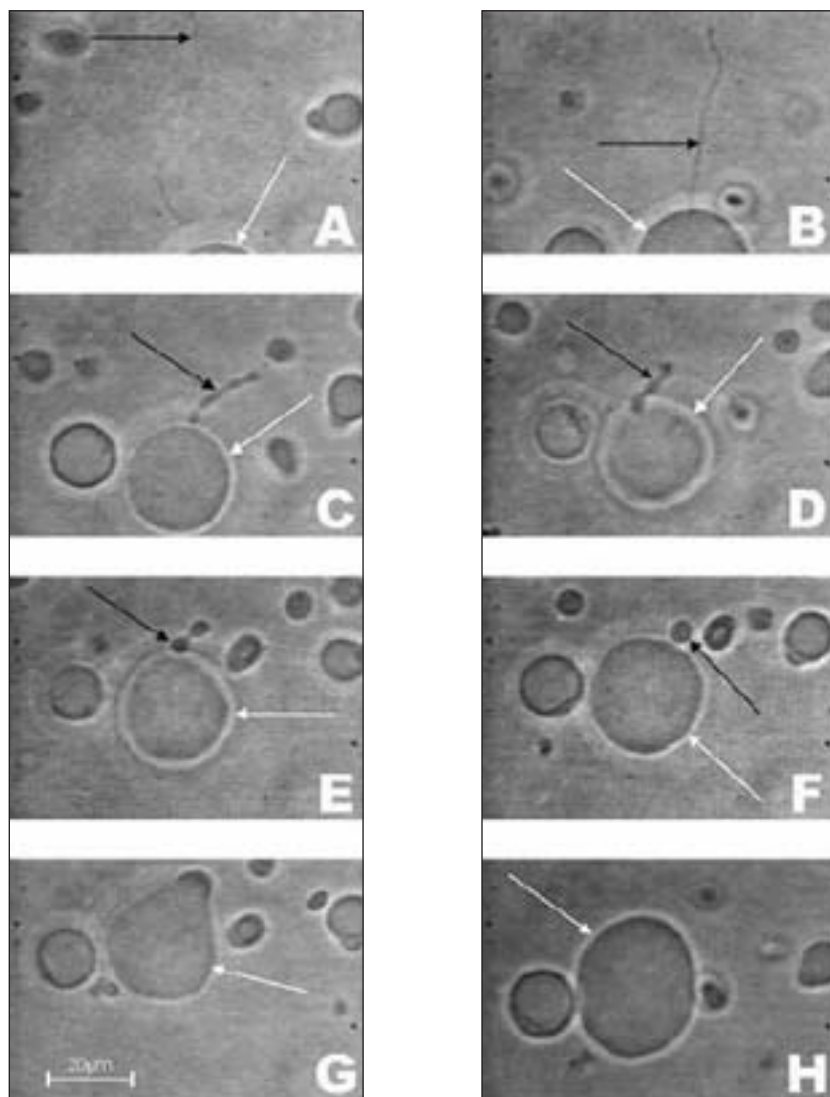


Slika 7. Orjaški fosfolipidni mehurček iz palmitoileoilfosfatidilholina (POPC) in 1,5% fluorescenčnega označevalca NBD-PC. Na sliki je viden del tubastega izrastka. Izrastek smo opazili približno 45 minut po elektroformaciji. Povzeto po (33). Invertni optični mikroskop IMT-2, Olympus, Japonska, z nastavkom za odbito fluorescenčno svetlobo IMT2-RFL. Črtica je dolga 20 μm .

ohraniti v postopkih, ki so nujni za opazovanje pod elektronskim mikroskopom (36).

Takoj po elektroformaciji ima večina mehurčkov videz krogle. Premeri kroglastih mehurčkov so različni, med nekaj mikrometri in nekaj deset mikrometri. Fluktuacij membrane ne opazimo. Če se v raztopini, ki vsebuje mehurčke, pogoji s časom spreminjajo, se s časom lahko spreminja tudi oblika mehurčkov. Ob ohlajanju vzorca čez nekaj časa (nekaj ur) opazimo, da imajo mehurčki različne oblike, membrane pa bolj ali manj fluktuirajo. V skladu z eksperimentom, ki je nakazal obstoj membranskih nanostruktur (36), razliko v videzu populacije lahko razložimo s transformacijo ostankov mreže nanotub, ki so vezani na posamezne mehurčke (33). Na ta način lahko razložimo heterogeno sestavo populacije mehurčkov in njihovo dinamiko.

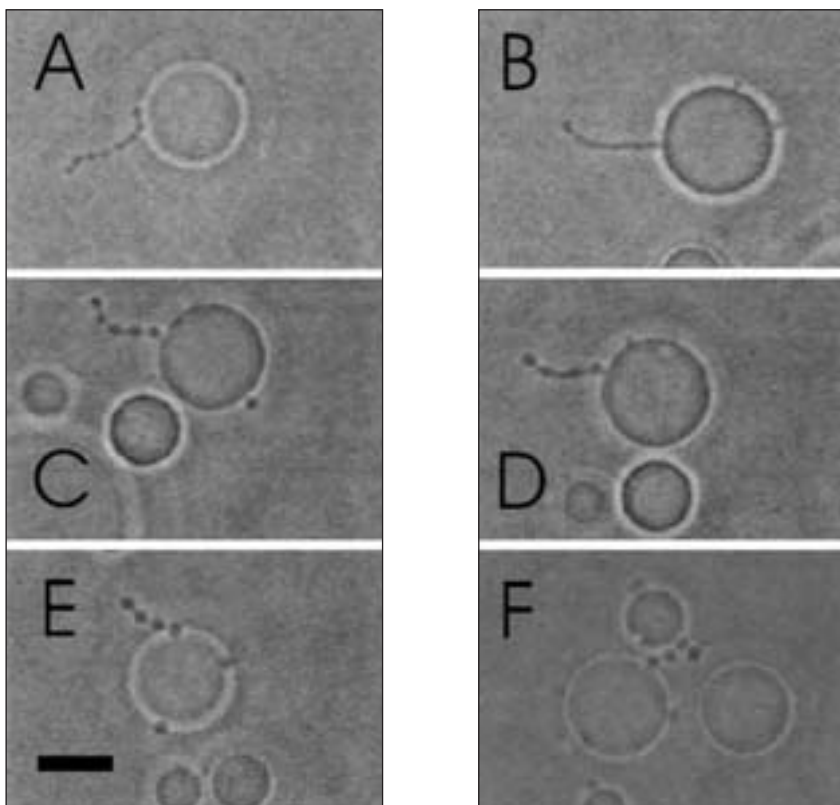
Ko grozd mehurčkov splaknemo iz celice za elektroformacijo, se mreža povezav raztrga, njeni ostanki pa ostanejo pritrjeni na mehurčke v obliki tubastih izrastkov. Ker so tubasti izrastki zelo tanki, jih v začetku ne vidimo pod fazno kontrastnim oziroma pod fluorescenčnim mikroskopom. Zaradi zmanjševanja temperature pride do zmanjševanja razlike med površinama zunanje in notranje



Slika 8. Spontana transformacija orjaškega fosfolipidnega mehurčka iz palmitoileoilfosfatidilholina (POPC) v ekvismolarni raztopini saharoze (znotraj) in glukoze (zunaj). Ustrezni časi po elektroformaciji so (A): 3 h, (B): 3 h 20 min, (C): 4 h, (D): 4 h 2 min, (E): 4 h 4 min 40 s, (F): 4 h 8 min 15 s, (G): 4 h 14 min 25 s in (H): 4 h 14 min 30 s. Tanek tubast izrastek (črna puščica) se s časom krajša in debeli. Ko postane dovolj kratak, opazimo undulacije z vedno ožjimi vratovi. Po tem, ko se odpre zadnji vrat, ki povezuje izrastek z globularnim delom (bela puščica), dobimo ohlapen fluktuirajoč mehurček. Povzeto po (33). Invertni optični mikroskop Zeiss IM 35 s faznim kontrastom.

plasti membrane (29), tako da se izrastki krajšajo in debelijo. Čez nekaj časa postanejo izrastki vidni pod fazno kontrastnim oziroma pod fluorescenčnim mikroskopom kot tanke niti, ki močno fluktuirajo (slika 7). Dolžine niti so različne, lahko pa dosežejo tudi več kot desetkratno velikost premera globularnega

dela mehurčka. Izrastek se s časom debeli in krajša (slika 8) in se na koncu integrira z globularnim delom (slika 8). Iz opazovanega procesa sklepamo, da je bil izrastek v začetku daljši in tanjši od tistega, ki smo ga najprej opazili, kar potrjuje obstoj tubastih nanostruktur iz fosfolipidne membrane (33).



Slika 9. Spontana transformacija orjaškega fosfolipidnega mehurčka iz palmitoiloleoilfosfatidilholina (POPC) v ekvismolarni raztopini saharoze (znotraj) in glukoze (zunaj). Odprta celica za opazovanje je omogočila izhlapevanje zunanje raztopine. Ko so vratovi postali zelo ozki (F), je oblika ostala stabilna do konca opazovanja (še približno dve uri). Povzeto po (24). Invertni optični mikroskop Zeiss IM 35 s faznim kontrastom. Črta je dolga 20 μm .

Izrastek pri integraciji z globularnim delom bolj poveča površino globularnega dela kot njegovo prostornino in tako spremeni razmerje med prostornino in površino globularnega dela. Mehurček postane bolj ohlapen, termične fluktuacije njegove oblike pa se povečajo. Izrastki tako predstavljajo zalogo površine membrane ter določajo končno obliko in dinamiko mehurčkov po integraciji izrastkov. Pri integraciji tubastega izrastka z globularnim delom se s krajšanjem in debelitvijo izrastka pojavijo undulacije izrastka, tako da imajo relativno kratki izrastki videz ogrlice; zдебeline so med seboj povezane z vratovi (sliki 8 in 9). Pri krajšanju izrastka se vratovi širijo in ožajo. Če vratovi postanejo zelo ozki, tako da jih ni mogoče več videti pod fazno kontrastnim mikroskopom, ostane oblika, sestavljena iz velike krogle in niza manjših kroglic, sta-

bilna več ur (24) (slika 9). Ozki vratovi tako predstavljajo še eno stabilno nanostrukturo fosfolipidne membrane.

TEORETIČNI OPIS STABILNIH OBLIK MEMBRANE

Teoretične študije, ki so potekale vzporedno z eksperimenti, so omogočile razumevanje in opis pojavov ter vodenje eksperimentalnega dela. Teoretično delo je izoblikovalo principe, iz katerih izhajajo razlage opazovanih pojavov. Zato je opis teoretičnega dela nujen pri predstavitvi rezultatov našega dela in hipoteze o nanostrukturah celičnih in fosfolipidnih membran kot infrastrukturi celice. Naj opisi s fizikalnimi količinami, simboli in enačbami ne odvrnejo potrpežljivega bralca od nadaljnje branja in naj ne povzročijo

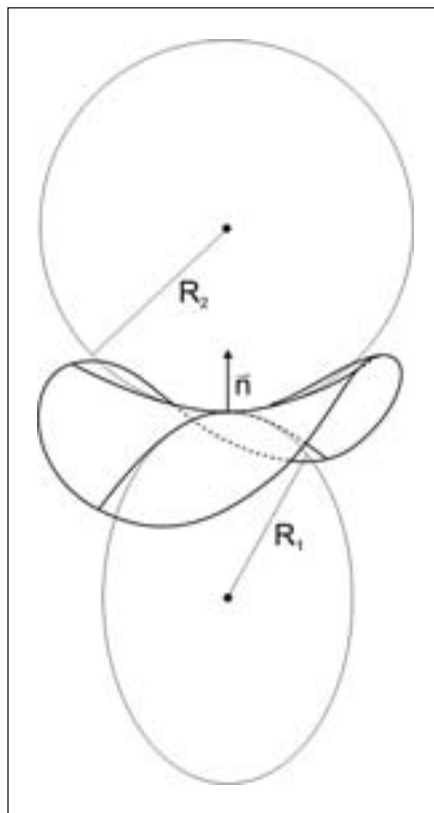
razočaranja, če iz predstavljenega ni mogoče doseči popolnega razumevanja teoretičnega opisa. Zainteresirani lahko najdejo bolj podroben opis v citiranih delih.

Zgoraj opisani eksperimenti so pokazali na obstoj stabilnih nanostruktur: brstov in nanoeksoveziklov iz eritrocitove membrane, torocitnih endoveziklov iz eritrocitove membrane, nanotubastih izrastkov fosfolipidne membrane in ozkih vratov iz fosfolipidne membrane. Membranske nanostrukture so tudi pore, ki lahko nastanejo v membrani, na primer ob elektroporaciji, ko na membrano delujejo z izmeničnim elektromagnetnim poljem (6, 40). Eksperimenti so pokazali (27), da iste molekule, ki povzročajo torocitno endovesikulacijo pri človeških eritrocitih, stabilizirajo pore, nastale pri elektroporaciji celic: citostatik bleomicin, ki poškoduje DNA v jedru, je ob dodatku oktaetilenglikoldodeciletra (C12E8) že pri nižjih frekvencah elektromagnetnega polja zmanjšal število preživelih celic v populaciji, iz česar sledi, da so pore postale stabilne in olajšale dostop bleomicina v celico. Eksperimenti so tudi pokazali, da imajo isti detergenti podobne učinke na eritrocitovo membrano (4, 14, 17, 31), fosfolipidno membrano (2, 37) in celično membrano (27).

Izkazalo se je, da teoretični opis, ki v skladu z modelom tekočega mozaika opisuje membrano kot lateralno izotropno elastično telo (5, 8, 9, 18, 19, 38, 42, 46), ne more pojasniti valjaste in torocitne oblike brstov oziroma veziklov pri eritrocitih in oblik fosfolipidnih mehurčkov z nanotubastimi izrastki. Da bi pojasnili te pojave, smo izdelali opis membrane, ki temelji na lastnostih membranskih gradnikov. Stabilnost vseh navedenih membranskih nanostruktur je mogoče opisati z enotno teorijo, če v model vključimo preprost mehanizem – orientacijsko urejanje molekul na močno anizotropno ukrivljenih delih membrane.

TEORETIČNI OPIS MEMBRANE V OKVIRU MODELA IZOTROPNE ELASTIČNOSTI

Ravnovesno obliko membranske strukture lahko teoretično opišemo tako, da poiščemo minimum proste energije membrane pri določenih pogojih. Obliko povežemo z energijo



Slika 10. Glavni smeri in krivinska polmera, ki določata glavni ukrivljenosti.

tako, da upoštevamo njeno odvisnost od lokalne ukrivljenosti membrane. Ker je membrana zelo tanka (fosfolipidna dvojna plast je debela približno 5 nm), jo opisujemo kot dvodimenzionalno ploskev, pri čemer uporabljamo formalizem diferencialne geometrije v prostoru. V okviru tega opisa lahko v izbrani točki na krivulji določimo krog, ki se prilega krivulji. Recipročna vrednost polmera tega kroga (R) je ukrivljenost krivulje v tej točki (C): $C = 1/R$. V izbrani točki na ploskvi lahko pripišemo ploskvi normalo, to je vektor \mathbf{n} , ki ima smer pravokotno na tangentno ravnino in se ploskve dotika v tej točki (slika 10). Če presečemo ploskev z ravnino, ki gre skozi njeno normalo, presečišče tvori krivuljo, ki ji pravimo normalni presek. Skozi neko normalo v izbrani točki lahko ploskev presečemo na mnogo načinov in tako dobimo mnogo različnih normalnih presekov. Ker je normalni presek krivulja, lahko določimo njeno ukriv-

ljenost. Med vsemi mogočimi normalnimi preseki obstaja tisti, ki ima najmanjšo ukrivljenost, in tisti, ki ima največjo ukrivljenost. Ti ukrivljenosti označimo s $C_1 = 1/R_1$ in $C_2 = 1/R_2$ in ju poimenujemo glavni ukrivljenosti (slika 10). Ustreznima smerema, pod katerima smo z ravnino presekali ploskev, pravimo glavni smeri. Glavni smeri sta med seboj pravokotni. Iz glavnih ukrivljenosti lahko oblikujemo količine, ki so pomembne pri opisu ploskev. Taki količini sta srednja ukrivljenost H ,

$$H = \frac{(C_1 + C_2)}{2},$$

in povprečna srednja ukrivljenost, ki podaja nagubanost ploskve,

$$\langle H \rangle = \frac{1}{A} \int_A H dA.$$

Integriramo po površini membrane A . Povprečna srednja ukrivljenost membrane je povezana z razliko površin zunanje in notranje plasti membrane ΔA . Ta je za tanko membrano $\Delta A = 2hA\langle H \rangle$, kjer h podaja efektivno debelino membrane.

V okviru teoretičnega opisa, ki v skladu z modelom tekočega mozaika obravnava posamezno plast membrane kot lateralno izotropno elastično ploščo, je ravnovesna oblika zaključene membrane določena z minimumom elastične energije, sestavljene iz dveh prispevkov: prispevka lokalnega upogibanja membrane (5, 19), ki je odvisen od srednje ukrivljenosti membrane H , in prispevka nelokalnega upogibanja membrane (8, 9, 20), ki je odvisen od povprečne srednje ukrivljenosti membrane $\langle H \rangle$. V izrazu za nelokalni prispevek k energiji membrane je zastopano relativno raztezanje obeh plasti membrane in spontana ukrivljenost posameznih plasti membrane; ustrezni parametri, ki opisujejo ta dva prispevka so med drugim odvisni od števila molekul v posamezni plasti membrane, njihove oblike in medsebojnih interakcij (8, 9, 18, 20, 38, 39, 42, 46).

Pri opazovanju procesa, pri katerem se molekule detergenta vgrajujejo v eritrocitovo membrano, ugotovimo, da se v procesu spreminja razlika površin zunanje in notranje plasti membrane ΔA oziroma povprečna srednja ukrivljenost membrane $\langle H \rangle$. Če se proces nadaljuje, bo sistem sčasoma dosegel

obliko, ki ima pri dani prostornini in površini ekstremen (največji ali najmanjši) možen $\langle H \rangle$.

Oblike z ekstremnim $\langle H \rangle$ lahko izračunamo; ugotovimo, da so sestavljene iz delov krogel z največ dvema različnima polmeroma (47), valjev (21) in torusov (22) oziroma njihovih ustreznih kombinacij. Oblika, sestavljena iz valja in polkrogelnih zaključkov z enakim polmerom, ima manjši $\langle H \rangle$ kot oblika z enako prostornino in površino, sestavljena iz kroglic, med seboj povezanih z infinitezimalno ozkimi vratovi; valjasta oblika ustreza minimumu, krogličasta pa maksimumu $\langle H \rangle$ v razredu podolgovatih oblik (31).

Če opisujemo vgrajevanje ehinocitogenih detergentov (tistih, ki večajo $\langle H \rangle$) v eritrocitovo membrano, se proces nadaljuje, dokler ni dosežena oblika, sestavljena iz krogel. Zgoraj opisani model torej dobro razloži procese, ki privedejo do nastanka kroglastih nanoeeksoveziklov, ne more pa opisati procesov, ki privedejo do nastanka tubastih nanoeeksoveziklov. Podobno lahko v okviru tega modela dobro razložimo nastanek kroglastih endoveziklov, ne moremo pa razložiti nastanka torocitnih endoveziklov in pojasniti, v katerih primerih pride do nastanka takih struktur.

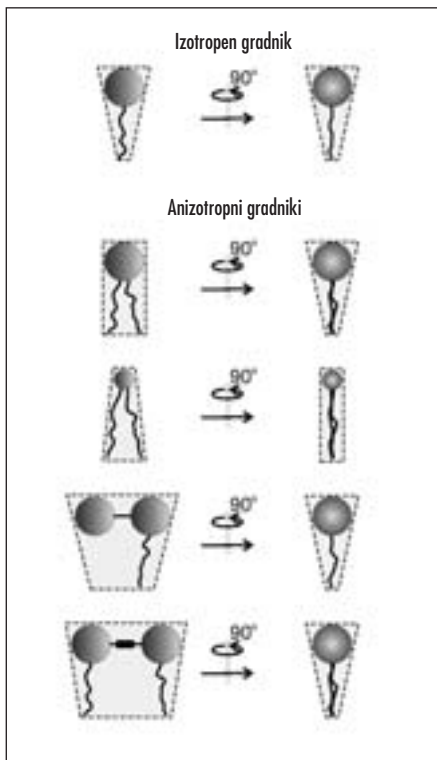
ORIENTACIJSKO UREJANJE MOLEKUL NA MOČNO ANIZOTROPNO UKRIVLJENIH DELIH KOT MEHANIZEM STABILNOSTI MEMBRANSKIH NANOSTRUKTUR

Povprečna ukrivljenost ne more razlikovati med kroglastimi in podolgovatimi oblikami, saj pri določanju vsote glavnih ukrivljenosti ni pomembno, koliko prinese posamezna glavna ukrivljenost. Da bi upoštevali vrednost vsake izmed glavnih ukrivljenosti, v opis vključimo še dve količini, ki podajata razliko med glavnima ukrivljenostma membrane v izbrani točki. Označimo ju s \hat{C} in D ;

$$\hat{C} = \frac{(C_1 - C_2)}{2}, \quad D = |\hat{C}|.$$

Količina D se imenuje deviator ukrivljenosti.

Upoštevam, da je membrana sestavljena iz gradnikov; to so posamezne molekule ali pa skupki molekul. V primeru vgrajenih



Slika 11. Primeri gradnikov; izotropen gradnik in različni anizotropni gradniki. Levo: pogled v eni glavni smeri, desno: pogled v drugi glavni smeri.

detegentov nastanejo membranske inkluzije, ki se lahko lateralno gibljejo po membrani in akumulirajo na mestih, kjer je lokalna ukrivljenost membrane zanje energijsko ugodna. Zamislimo si membrano, ki bi se popolnoma prilegala nekemu gradniku. To pomeni, da se gradniku ne bi bilo treba deformirati, da bi se vključil v membrano. Glavni ukrivljenosti take membrane pravimo lastna glavna ukrivljenost gradnika. Lastno povprečno ukrivljenost in lastni deviator ukrivljenosti označimo s H_m in D_m . Ti dve količini opišeta lastno obliko gradnika in sta karakteristični za določeno vrsto gradnikov.

Če so gradniki izotropni, to je, če sta lastni glavni ukrivljenosti med seboj enaki in je zato njihov D_m enak 0, ali pa če se nahajajo na takem mestu, kjer je deviator ukrivljenosti D enak 0, so vse orientacije energijsko enakovredne. Če pa sta D_m in D različna od 0, imajo različne orientacije gradnika različne

energije (12, 30). Termično gibanje preprečuje, da bi se gradnik ves čas nahajal v energijsko najbolj ugodni orientaciji, to je v orientaciji, ki ima najnižjo energijo, lahko pa rečemo, da gradnik v povprečju vztraja nekoliko več časa v tej orientaciji kot v vseh drugih; pride do orientacijske ureditve gradnikov v polju, ki ga predstavlja deviator ukrivljenosti. Tudi če so vsi gradniki enaki, membrana v realnosti zaradi geometrijskih in drugih omejitev ne more imeti lastnih ukrivljenosti po vsej svoji površini. Da bi tvorili membrano, se morajo gradniki prilagoditi, kar pomeni, da njihova energija na takih mestih naraste. Energijo enega gradnika opišemo z glavnima ukrivljenostma membrane na mestu gradnika, kjer upoštevamo, da sta lastni smeri gradnika zavrteni glede na lastni smeri membrane oziroma da je gradnik zavrt v membrani glede na os, ki gleda pravokotno na ploskev. Orientacija gradnikov se s krajem spreminja. Na mestih, kjer je deviator ukrivljenosti membrane D večji, je orientacijski red anizotropnih gradnikov močnejši, kar je energijsko ugodno. Če seštejemo energije vseh gradnikov, dobimo že znani prispevek lokalnega upogibanja, in nov prispevek, ki je odvisen od deviatorja ukrivljenosti (24, 34).

Ravnovesne oblike, določene z modelom, ki temelji na orientacijskem urejanju gradnikov, lahko nazorno predstavimo v prostoru, ki ga tvorijo tri dimenzije: povprečna srednja ukrivljenost membrane $\langle H \rangle$, povprečni deviator ukrivljenosti $\langle D \rangle$

$$\langle D \rangle = \frac{1}{A} \int_A D dA,$$

in izoperimetrični količnik, ki podaja razmerje med objeto prostornino V in površino A , IQ ,

$$IQ = 36\pi V^2/A^3.$$

Zaradi večje jasnosti obravnavamo brezdimenzijski količnik $\langle h \rangle = Rs \langle H \rangle$ in $\langle d \rangle = Rs \langle D \rangle$, kjer je $Rs = (A/4\pi)^{1/2}$. Izkaže se, da je nabor oblik z ekstremnim povprečnim deviatorjem $\langle d \rangle$ enak naboru oblik z ekstremno povprečno srednjo ukrivljenostjo $\langle h \rangle$ (24). Vendar pa narava ekstrema ni enaka; pri sekvenci, ki opisuje transformacijo valjaste oblike v obliko,

sestavljeno iz kroglic, valjasta oblika ustreza minimumu $\langle h \rangle$ in maksimumu $\langle d \rangle$, medtem ko oblika, sestavljena iz kroglic, ustreza minimumu $\langle d \rangle$ in maksimumu $\langle h \rangle$ (31). Slika 12 prikazuje tridimenzionalni fazni prostor $(IQ, \langle h \rangle, \langle d \rangle)$ in nekaj krivulj, ki ustrezajo oblikam z ekstremnima $\langle h \rangle$ in $\langle d \rangle$.

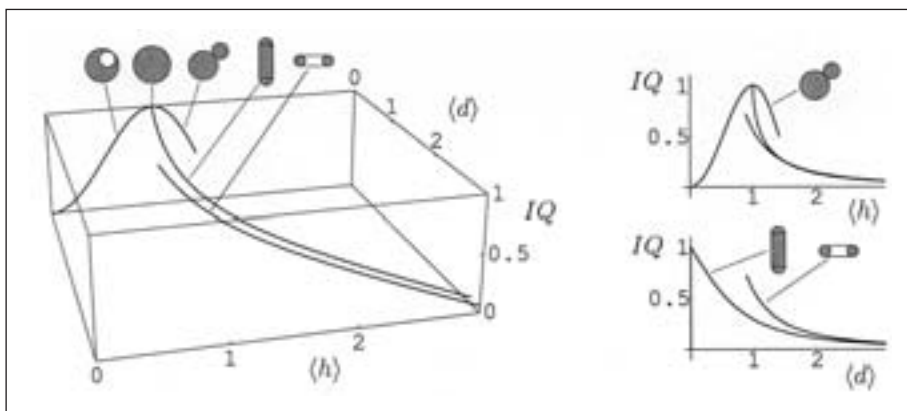
Če opisujemo proces, pri katerem se večja povprečna srednja ukrivljenost v okviru modela izotropne elastičnosti, projiciramo pot oblike v $(IQ, \langle h \rangle, \langle d \rangle)$ prostoru na $(IQ, \langle h \rangle)$ ravnino. Ob vgrajevanju detergentov se $\langle h \rangle$ večja. Ker model pozna le to dimenzijo, je oblika, ki jo sistem doseže, vedno sestavljena iz kroglic. Če opisujemo proces v okviru modela orientacijske ureditve anizotropnih gradnikov, se $\langle h \rangle$ krogle z valjastimi izrastki ves čas večja (širi v dimenziji $\langle h \rangle$), hkrati pa se večja tudi povprečni deviator $\langle d \rangle$; sistem se širi v tretjo dimenzijo. V primeru anizotropnih gradnikov večanje $\langle d \rangle$ oziroma širjenje v tretjo dimenzijo privede proces do ekstremne oblike.

Z upoštevanjem deviatorne elastičnosti membrane, ki izvira iz orientacijskega urejanja membranskih gradnikov, smo nadgradili opis membrane z izotropno elastičnostjo. Tako smo lahko pojasnili obstoj stabilnih tubastih nanoeksoveziklov eritrocitove membrane (31), stabilnih torocitnih endoveziklov eritrocitove membrane (4, 10, 17), stabilnih nanotubastih izrastkov na orjaških fosfolipidnih mehurčkih (34), stabilnih membranskih por (11, 27) in stabilnih oblik veziklov v Golgijevem aparatu (25).

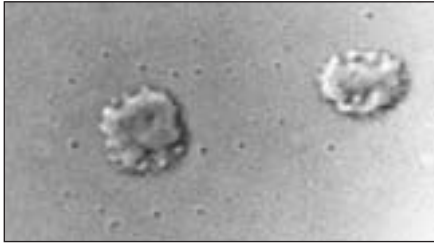
HIPOTEZA O PRIKRITIH MEMBRANSKIH STRUKTURAH KOT MEMBRANSKI INFRASTRUKTURI

Eksperimenti z eritrociti so pokazali, da ob dodatku dibukaina suspenziji eritrocitov pri zelo visokem pH eritrocit razpade na več delov, nastanejo pa lahko tudi okrogli vezikli, ki so s tankimi tubastimi strukturami povezani z materinsko celico in se gibajo sinhrono z njo (slika 13). Tanke tubaste strukture imajo lahko tudi razširjene dele (slika 14).

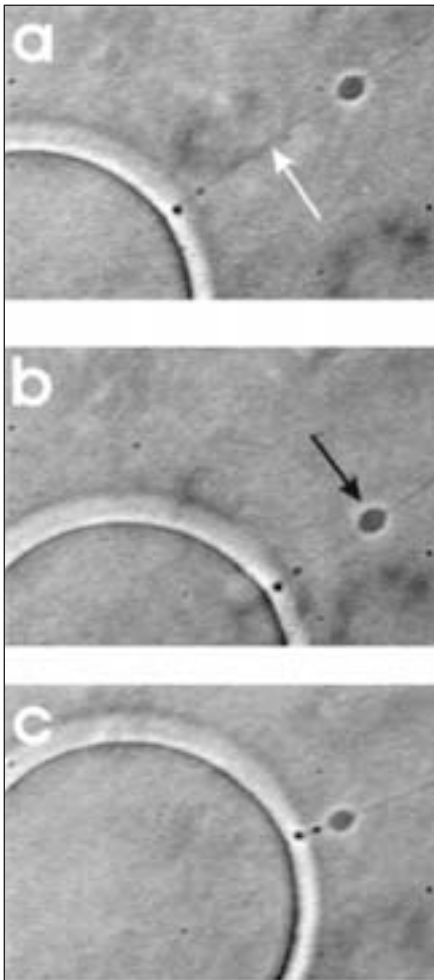
Podoben pojav smo opazili tudi pri fosfolipidnih mehurčkih (slika 15) (23). Orjaški mehurček je imel dolg tanek izrastek z razširjenim delom, ki je kot gondola potoval vzdolž izrastka proti globularnemu delu. Predpostavljamo, da sta ob raztrganju mreže po elektroformaciji ostala dva mehurčka, povezana s tanko tubasto strukturo. Eden od mehurčkov je bil velik, drugi majhen. Manjši mehurček se je prilepil na steklo. V opazovalni celici je vedno prisoten nezaten tok tekočine zaradi konvekcije. Ta tok je ustvaril pritisk na oba mehurčka, ki sta se začela gibati. Zaradi gibanja večjega mehurčka je tuba postala ravna, manjši mehurček pa je začel potovati vzdolž tube. Gibanje gondole smo opazovali od trenutka, ko smo jo zasledili, do njene integracije z večjim mehurčkom približno pol ure kasneje. Ko smo gondolo opazili, je že prepotovala približno pol dolžine tube. V času opazovanja se je počasi pomikala



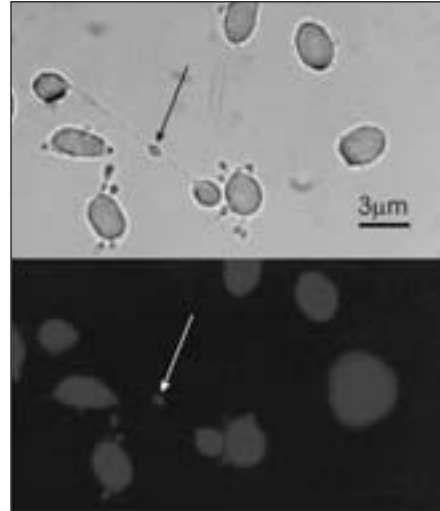
Slika 12. Prostor $(IQ, \langle h \rangle, \langle d \rangle)$. Vrisane so krivulje, ki predstavljajo oblike z ekstremnima $\langle h \rangle$ in $\langle d \rangle$. To so oblike, ki so sestavljene iz krogel, valjev in torusov. Na desni strani sta projekciji na ravnino $(IQ, \langle h \rangle)$ in ravnino $(IQ, \langle d \rangle)$. Povzeto po (24).



Slika 13. Eritrociti, inkubirani (20 min pri sobni temperaturi) pri visokem pH z dodatkom (100 μ M, 10 min) dibukaina. Vezikli se zadržujejo v okolici materinske celice, tubaste strukture niso vidne. Povzeto po (32). Nomarski interferenčni kontrast.

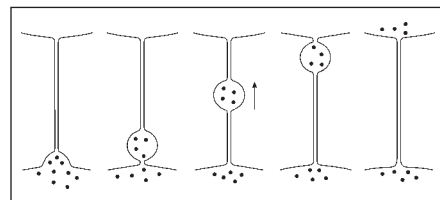


Slika 15. Potovanje gondole (črna puščica) vzdolž tube (bela puščica). Gondola je integralni del fosfolipidne membrane. Povzeto po (23). Invertni optični mikroskop Zeiss IM 35 s faznim kontrastom. Črtica je dolga 10 μ m.



Slika 14. Majhen prolalni vezikel (označen s puščico) na tubasti strukturi, ki povezuje dva globularna dela, nastala po dezintegraciji eritrocita po inkubaciji pri visokem pH \approx 8,5 v suspenziji. Suspenziji eritrocitov je bil dodan dibukain. Povzeto po (23). Zgornja slika: Nomarski kontrast interferenčni mikroskop, spodnja slika: fluorescenčni mikroskop (eritrociti so bili označeni s fluorescenčnimi označevalci DiI).

proti večjemu mehurčku, pri čemer je ohranjala velikost in obliko. Ko je gondola dosegla večji mehurček, je tlak toka okolne raztopine potisnil njeno vsebino skozi vrat v notranjost večjega mehurčka. Poskusi z eritrociti (23, 32) in s fosfolipidnimi mehurčki (23, 28) so pokazali, da tanke tubaste strukture lahko povezujejo z membranami zaključene predelke, gondole na tubastih strukturah pa imajo lahko vlogo transportnih veziklov in tako sodelujejo pri izmenjavi snovi med predelki (23). Shema mehanizma za prenos snovi med predelki s transportnim veziklom, ki potuje vzdolž tanke tube, je prikazana na sliki 16. Zaradi majhnih dimenzij in krhkosti so membranske nanostrukture dolgo ostale pri-



Slika 16. Shema transporta snovi vzdolž tube s transportnim veziklom – gondolo.

krite. Ker predstavljajo zalogo membranske površine in zaradi njihove potencialne vloge pri transportu snovi, pa lahko tvorijo znaten in pomemben del membranskih struktur v celici. Še posebej pomembno vlogo imajo lahko v sistemih, kjer se snov prenaša z vezikli, kot je na primer Golgijev aparat. Eksperimentalna potrditev membranskih nanostruktur v celicah ostaja izziv za prihodnost. Pomemben korak v tej smeri predstavljajo rezultati eksperimentov, ki so pokazali, da se snov med dvema celicama lahko prenaša preko tankih cevastih struktur (41), pri čemer so cevaste povezave in gondole direktno opazovali s fluorescenčnim mikroskopom.

Če bi se napovedi, ki izhajajo iz predstavljenega dela, izkazale za pravilne, bi študij in razumevanje mreže membranskih nanostruktur, ki tvorijo infrastrukturo celice, predstavljala korak naprej proti kontrolirani manipulaciji osnovnih procesov v celicah – korak naprej na poti k zdravljenju bolezni na njenem izhodišču. Še posebej pomembne se zdijo mikro in nanostrukture pri rakastih celicah, pri katerih so opazili spontano vesikulacijo (3).

ZAKLJUČEK

Eksperimentalne in teoretične študije membranskih nanostruktur so privedle do hipoteze o membranskih nanostrukturah kot infrastrukturi celice. Razlaga obstoja stabilnih anizotropnih membranskih nanostruktur zah-

teva nadgraditev modela tekočega mozaika membrane. V nadgrajenem modelu je membrana dvodimenzionalna tekočina, pri kateri na močno anizotropno ukrivljenih delih pride do orientacijskega reda njenih anizotropnih gradnikov. Membrana zavzame tako obliko, gradniki pa zavzamejo tako porazdelitev in orientacijo, da je energija membrane čim manjša. Akumulacija gradnikov na tistih delih membrane, ki imajo energijsko ugodno srednjo ukrivljenost in deviatorno ukrivljenosti za dane molekule, je pomembna tudi pri tvorbi membranskih raftov. Razumevanje infrastrukture celice in ustreznih procesov, ki so povezani z delovanjem celice, bi predstavljalo korak naprej proti kontrolirani manipulaciji bolezni na njenem izhodišču.

Zahvala

Avtorji se zahvaljujemo Åbo Akademi University, ki je ves čas finančno podpirala naše sodelovanje. Zahvaljujemo se tudi sodelavcem, soavtorjem objavljenih del, za njihov prispevek k rezultatom tega dela. Iz vsebine, predstavljene v tem članku, sta bili objavljeni dve pregledni poglavji v monografijah Planar lipid bilayers, urednika T. Tien in A. Ottova - Leitmannova, Elsevier, 2003, in Horizons of World Physics, urednik A. Reimer, Nova Science Publishers, 2004. Originalne publikacije zainteresirani bralci lahko najdejo na domači strani Laboratorija za fiziko Fakultete za elektrotehniko, <http://gap.fe.uni-lj.si>.

LITERATURA

1. Angelova MI, Soléau S, Méléard Ph, et al. Preparation of giant vesicles by external AC electric field: kinetics and application. *Prog Colloid Polym Sci* 1992; 89: 127–31.
2. Babnik B, Miklavčič D, Kandušar M, et al. Shape transformation and burst of giant POPC unilamellar liposomes modulated by nonionic detergent C₁₂E₈. *Chem Phys Lipids* 2003; 125: 123–38.
3. Black RA, Rausch CT, Kozlosky CJ, et al. A metallo-proteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 1997; 385: 729–33.
4. Bobrowska-Hägerstrand M, Kralj-Iglič V, Iglič A, et al. Torocyte membrane endovesicles induced by octaethyleneglycol dodecylether in human erythrocytes. *Biophys J* 1999; 77: 3356–62.
5. Canham PB. Minimum energy of bending as a possible explanation of biconcave shape of human red blood cell. *J Theor Biol* 1970; 26: 61–81.
6. Chang DC, Chassy BM. In: Saunders JA, Sower AE, eds. *Guide to electroporation and electrofusion*. New York: Academic Press; 1992.
7. Deuticke B. Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocyte induced by amphiphilic agents and change of ionic environment. *Biochim Biophys Acta* 1968; 163: 494–500.
8. Evans E. Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayers. *Biophys J* 1974; 14: 923–31.
9. Evans EA, Skalak R. *Mechanics and Thermodynamics of Biomembranes*. Boca Raton: CRC Press; 1980.
10. Fošnaric M, Nemeč M, Kralj-Iglič V, et al. Possible role of anisotropic membrane inclusions in stability of torocyte red blood cell daughter vesicles. *Coll Surf B* 2003; 26: 243–53.

11. Fošnarič M, Kralj-Iglič V, Bohinc K, et al. Stabilization of pores in lipid bilayers by anisotropic inclusions. *J Phys Chem* 2003; 107: 12519–26.
12. Fournier JB. Nontopological saddle splay and curvature instabilities from anisotropic membrane constituents. *Phys Rev Lett* 1996; 76: 4436–9.
13. Hägerstrand H, Isomaa B. Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1989; 982: 179–86.
14. Hägerstrand H, Isomaa B. Morphological characterization of exovesicles and endovesicles released in human erythrocytes following treatment with amphiphiles. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1109: 117–26.
15. Hägerstrand H, Isomaa B. Lipid and protein composition of exovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1190: 409–15.
16. Hägerstrand H, Kralj-Iglič V, Bobrowska-Hägerstrand M, et al. Membrane skeleton detachment in spherical and cylindrical microexovesicles. *Bull Math Biol* 1999; 61: 1019–30.
17. Hägerstrand H, Kralj-Iglič V, Fošnarič M, et al. Endovesicle formation and membrane perturbation induced by polyoxyethyleneglycolalkylethers in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1665: 191–200.
18. Heinrich V, Svetina S, Žekš B. Nonaxisymmetric vesicle shapes in a generalized bilayer couple model and the transition between oblate and prolate axisymmetric shapes. *Phys Rev E* 1993; 48: 3112–23.
19. Helfrich W. Elastic properties of lipid bilayers - theory and possible experiments. *Z Naturforsch* 1973; 28c: 693–703.
20. Helfrich W. Blocked lipid exchange in bilayers and its possible influence on the shape of vesicles. *Z Naturforsch* 1974; 29c: 510–5.
21. Iglič A, Kralj-Iglič V, Majhenc J. Cylindrical shapes of closed bilayer structures correspond to an extreme area difference between the two monolayers of the bilayer. *J Biomech* 1999; 32: 1343–7.
22. Iglič A, Kralj-Iglič V, Božič B, et al. Torocyte shapes of red blood cell daughter vesicles. *Bioelectrochemistry* 2000; 52: 203–11.
23. Iglič A, Hägerstrand H, Bobrowska-Hägerstrand M, et al. Possible role of phospholipid nanotubes in directed transport of membrane vesicles. *Phys Lett A* 2003; 310: 493–7.
24. Iglič A, Kralj-Iglič V. Effect of anisotropic properties of membrane constituents on stable shape of membrane bilayer structure. In: Ti Tien H, Ottova-Leitmannova A, eds. *Planar Lipid Bilayers (BLMs) and Their Applications*. Amsterdam: Elsevier; 2003.
25. Iglič A, Fošnarič M, Hägerstrand H, et al. Coupling between vesicle shape and the non-homogeneous lateral distribution of membrane constituents in Golgi bodies. *FEBS Lett* 2004; 574: 9–12.
26. Isomaa B, Hägerstrand H. Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1987; 899: 93–103.
27. Kandušer M, Fošnarič M, Šentjurc M, et al. Effect of surfactant polyoxyethylene glycol (C₁₂E₈) on electroporation of cell line DC3F. *Colloids Surf A* 2003; 214: 205–17.
28. Karlsson A, Karlsson R, Karlsson M, et al. Molecular engineering – networks of nanotubes and containers. *Nature* 2001; 409: 150–2.
29. Käs J, Sackmann E. Shape transitions and shape stability of giant phospholipids vesicles in pure water induced by area – to – volume change. *Biophys J* 1991; 60: 825–44.
30. Kralj-Iglič V, Heinrich V, Svetina S, et al. Free energy of closed membrane with anisotropic inclusions. *Eur Phys J B* 1999; 10: 5–8.
31. Kralj-Iglič V, Iglič A, Hägerstrand H, et al. Stable tubular microexovesicles of the erythrocyte membrane induced by dimeric amphiphiles. *Phys Rev E* 2000; 61: 4230–4.
32. Kralj-Iglič V, Hägerstrand H, Bobrowska - Hägerstrand M, et al. Tethers connecting daughter vesicles and parent red blood cell may be formed due to ordering of anisotropic membrane constituents. *Colloids Surf A* 2001; 180: 57–64.
33. Kralj-Iglič V, Gomišček G, Majhenc J, et al. Myelin – like protrusions of giant phospholipid vesicles prepared by electroformation. *Colloids Surf A* 2001; 181: 315–8.
34. Kralj-Iglič V, Iglič A, Gomišček G, et al. Microtubes and nanotubes of a phospholipid bilayer membrane. *J Phys A: Math Gen* 2002; 35: 1533–49.
35. Liu SC, Derick LH, Duquette MA, et al. Separation of the lipid bilayer from the membrane skeleton during discocyte – echinocyte transformation of human erythrocyte ghosts. *Eur J Cell Biol* 1989; 49: 358–65.
36. Mathivet L, Cribier S, Devaux PF. Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophys J* 1996; 70: 1112–21.
37. Mavčič B, Babnik B, Iglič A, et al. Shape transformation of giant phospholipid vesicles at high concentrations of C₁₂E₈. *Bioelectrochemistry* 2004; 63: 183–7.
38. Miao L, Seifert U, Wortis M, et al. Budding transitions of fluid bilayer vesicles: effect of area difference elasticity. *Phys Rev E* 1994; 49: 5389–407.
39. Mukhopadhyay R, Lim HWG, Wortis M. Echinocyte shapes: bending, stretching, and shear determine spicule shape and spacing. *Biophys J* 2002; 82: 1756–72.

40. Neumann E. In: Sowers AE, Jordan CA, eds. Electroporation and electrofusion in cell biology. New York: Plenum Press; 1989.
41. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, et al. Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport. *Science* 2004; 303: 1007–10.
42. Seifert U. Configurations of fluid membranes and vesicles. *Adv Phys* 1997; 46: 13–137.
43. Sheetz MP, Singer SJ. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug – erythrocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 4457–61.
44. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387: 569–72.
45. Singer SJ, Nicholson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175: 720–31.
46. Stokke BT, Mikkelsen A, Elgsaeter A. The human erythrocyte membrane skeleton may be an ionic gel. *Eur Biophys J* 1986; 13: 203–18.
47. Svetina S, Žekš B. Membrane bending energy and shape determination of phospholipid vesicles and red blood cells. *Eur Biophys J* 1989; 17: 101–11.

Prispelo 19. 2. 2005