

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Přírodovědecká fakulta**  
Katedra genetiky a mikrobiologie



**Membránově aktivní látky a regulace membránové  
fluidity u *Bacillus subtilis***

**Kateřina Schrommová**

Diplomová práce

Praha 2008

Vedoucí diplomové práce : **doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením vedoucího diplomové práce.

*Katka Gebremmariá*  
.....

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří se přímo či nepřímo podíleli na vzniku této práce.

V první řadě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Ivu Konopáskovi, CSc. za jeho odborné vedení, četné podnětné připomínky a hlavně za přátelský a laskavý přístup.

Mé velké díky patří Mgr. Janě Beranové za její ochotu vždy pomoci nejen s experimentální prací, za mnoho času, který mi věnovala, a především jí děkuji za její přátelství.

Dále děkuji RNDr. Radku Fišerovi za pomoc s fluorescenčními měřeními, za poskytnutí dat, které byly s jeho svolením použity v této práci, a hlavně za jeho přínosné nápady.

Poděkování si zaslouží prof. Kazimierz Strzałka za to, že mi umožnil studijní pobyt na Katedře fyziologie rostlin a biochemie Jagelonské univerzity v Krakově (Polsko). Dr. Malgorzata Jemioła Rzeminska Ph.D. mi pomáhala se zvládnutím metody diferenciální skenovací kalorimetrie, děkuji jí nejen za praktickou pomoc, ale také za její vlídný přístup.

Ráda bych také poděkovala laborantce Bc. Marii Frýzové a celému kolektivu naší laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji své rodině a příteli Pavlovi za pochopení a neutuchající podporu během celého mého studia.

Tato diplomová práce vznikala v letech 2006 až 2008 v rámci grantových projektů:  
Výzkumné centrum LC 06066 Centrum environmentální mikrobiologie (2006-2010)  
Výzkumný záměr MSM0021620858: Signalizace a molekulární mechanizmy buněčné  
odpovědi (2007-2013).

## **Abstract**

### **Membrane active compounds and membrane fluidity regulation in *Bacillus subtilis***

In *Bacillus subtilis* there are two main mechanisms for maintenance of the optimal membrane fluidity after cold shock. The long term adaptation consists in the synthesis of low-melting fluidizing anteiso-branched fatty acids. The short-term adaptation employs desaturation of fatty acids in existing membrane phospholipids. The fatty acid desaturase Des synthesis is induced after cold shock being regulated by the two-component system DesK/DesR. DesK component acts as the sensor of the membrane fluidity (AGUILAR et al. 1998) and triggers Des synthesis after sufficient membrane fluidity change, which might be caused not only by decrease in temperature but also by other physical and chemical factors.

The temperature effect on signalisation via DesK was mimicked *in vivo* by fluidizing and rigidifying agents. The same compounds were used *in vitro* (isolated bacterial membranes and lipids) in order to quantify their effect on the key membrane parameters. Membrane fluidity, proportion of gel- to liquid crystalline phase parameters the phase transition were measured by fluorescence spectroscopy (membrane fluorescence probes DPH and Laurdan) and differential scanning calorimetry.

Using this approach it was possible to compare the changes of membrane parameters measured by spectroscopic and calorimetric methods with sensing of membrane fluidity by membrane protein DesK. It was concluded that fluorescence anisotropy of DPH was the method most appropriate for the description of the membrane changes sensed by DesK.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, cold shock, cold shock proteins, two-component system, sensor of membrane fluidity, membrane active compounds, fluorescence polarization methods, differential scanning calorimetry

**Klíčová slova:** *Bacillus subtilis*, chladový šok, proteiny chladového šoku, dvoukomponentový systém, senzor membránové fluidity, membránově aktivní látky, fluorescenční metody, diferenciální skenovací kalorimetrie

# OBSAH

Obsah.....	6
Seznam zkratk .....	8
<b>1 Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2 Literární přehled</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1. Chladový šok u <i>Bacillus subtilis</i></b> .....	<b>11</b>
2.1.1. Fyzikální působení chladového šoku .....	12
2.1.2. Odpověď bakteriální buňky na chladový šok .....	13
2.1.2.1. Proteiny chladového šoku (CSP) .....	14
2.1.2.1.1. Funkce proteinů chladového šoku (CSP) .....	16
2.1.2.2. Translace po chladovém šoku .....	17
2.1.2.3. Fluidita membrány po chladovém šoku .....	22
2.1.2.4. Topologie DNA v závislosti na teplotě .....	22
2.1.2.5. Metabolismus po chladovém šoku .....	23
2.1.2.6. Konformace proteinů po chladovém šoku .....	24
2.1.3. Souhrn .....	24
<b>2.2. Regulace membránové fluidity u <i>Bacillus subtilis</i></b> .....	<b>25</b>
2.2.1. Dlouhodobá adaptace membrány <i>Bacillus subtilis</i> .....	26
2.2.2. Krátkodobá adaptace membrány <i>Bacillus subtilis</i> .....	30
2.2.2.1. Role desaturázy Des <i>Bacillus subtilis</i> po chladovém šoku .....	33
2.2.2.2. Topologie desaturázy Des .....	33
2.2.2.3. Regulace desaturázy Des .....	35
2.2.2.3.1. Dvoukomponentové systémy u bakterií .....	35
2.2.2.3.2. Dvoukomponentový systém DesK/DesR .....	36
<b>2.3. Membránově aktivní látky</b> .....	<b>41</b>
2.3.1. Fluidita membrány .....	41
2.3.2. Metody pro měření membránové fluidity .....	41
2.3.3. Membránově aktivní látky a jejich působení na membránu .....	42
2.3.4. Adaptace membrány na přidavek membránově aktivní látky .....	43
2.3.5. Membránově aktivní látky s fluidizačním účinkem .....	44
2.3.5.1. Zabudovávání alkoholů do fosfolipidové dvojvrstvy .....	45
2.3.5.2. Účinek alkoholů na uspořádanost membrány .....	46
2.3.6. Membránově aktivní látky s rigidizujícím účinkem .....	49
<b>3 Materiály a metody</b> .....	<b>53</b>
3.1. Mikroorganismus .....	53
3.2. Chemikálie .....	54
3.3. Přístroje .....	55
3.4. Kultivační média .....	55
3.4.1. Sporulační agar .....	55
3.4.2. Komplexní kultivační médium KM1 .....	56
3.5. Sterilizace .....	56
3.6. Příprava sporových konzerv .....	57
3.7. Kultivace bakterií, růstová křivka .....	57
3.8. Stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidázy .....	58
3.9. Izolace membrán .....	61
3.10. Stanovení koncentrace proteinů .....	62
3.11. Izolace fosfolipidů .....	65

3.12.	Měření anizotropie fluorescence DPH.....	66
3.12.1.	Měření ustálené anizotropie fluorescence DPH.....	73
3.13.	Měření generalizované polarizace Laurdanu .....	74
3.14.	Diferenciální skenovací kalorimetrie .....	80
3.15.	Cholesteryl-hemisukcinát.....	84
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>85</b>
<b>4.1.</b>	<b>Růstová charakteristika <i>Bacillus subtilis</i> M19.....</b>	<b>85</b>
4.1.1.	Růst <i>Bacillus subtilis</i> M19 v různých stálých teplotách.....	86
4.1.2.	Růst <i>Bacillus subtilis</i> M19 po náhlém snížení kultivační teploty .....	87
<b>4.2.</b>	<b>Aktivita promotoru genu <i>des</i> .....</b>	<b>90</b>
4.2.1.	Aktivita promotoru genu <i>des</i> po teplotních skocích .....	90
4.2.2.	Aktivita promotoru genu <i>des</i> v závislosti na teplotě kultivace při stálé teplotě kultivace .....	96
<b>4.3.</b>	<b>Protokol pro testování membránově aktivních látek.....</b>	<b>99</b>
4.3.1.	Teplotní podmínky.....	99
4.3.2.	Měření anizotropie fluorescence DPH .....	102
<b>4.4.</b>	<b>Membránově aktivní látky s fluidizačním účinkem: alkoholová řada... 105</b>	
4.4.1.	Ethanol .....	107
4.4.2.	Propanol .....	109
4.4.3.	Butanol .....	110
4.4.4.	Benzylalkohol .....	112
4.4.5.	Oktanol.....	114
<b>4.5.</b>	<b>Membránově aktivní látky s rigidizačním účinkem .....</b>	<b>115</b>
4.5.1.	Dimethylsulfoxid .....	117
4.5.2.	Cholesteryl-hemisukcinát.....	120
4.5.3.	Kyselina palmitová.....	121
4.5.4.	Hlinité ionty .....	122
<b>4.6.</b>	<b>Měření generalizované polarizace Laurdanu.....</b>	<b>124</b>
4.6.1.	Fázový přechod lipidů a generalizovaná polarizace Laurdanu .....	124
4.6.2.	Měření posunu teplotní závislosti generalizované polarizace Laurdanu izolovaných bakteriálních membrán vlivem alkoholů .....	126
<b>4.7.</b>	<b>Diferenciální skenovací kalorimetrie.....</b>	<b>127</b>
4.7.1.	Fázový přechod izolovaných bakteriálních lipidů .....	127
4.7.2.	Vliv alkoholů na fázový přechod lipidů.....	128
4.7.3.	Vyhodnocení termogramů pomocí programu Fityk.....	131
<b>5</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>Souhrn.....</b>	<b>147</b>
	<b>Seznam citované literatury.....</b>	<b>149</b>



# SEZNAM ZKRATEK

<b>BA</b>	benzylalkohol
<b>BCA</b>	bicinchoninová kyselina
<b>BSA</b>	hovězí sérumalbumin
<b>BT</b>	butanol
<b>c</b>	generační doba
<b>CAP</b>	chladově aklimatizační proteiny
<b>CIP</b>	chladově indukované proteiny
<b>C<sub>p</sub></b>	molární tepelná kapacita
<b>CSP</b>	proteiny chladového šoku
<b>DMPC</b>	dimyristoylfosfatidylcholin
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DPH</b>	1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien
<b>DPPC</b>	dipalmitoylfosfatidylcholin
<b>DSC</b>	diferenciální skenovací kalorimetrie
<b>EDTA</b>	ethylen-diamin-tetraoctová kyselina
<b>ET</b>	ethanol
<b>G</b>	G faktor
<b>GFP</b>	zelený fluorescenční protein
<b>GP</b>	generalizovaná polarizace
<b>I<sub>  </sub></b>	intenzita polarizované fluorescence měřená rovnoběžně se směrem excitace
<b>I<sub>⊥</sub></b>	intenzita polarizované fluorescence měřená kolmo ke směru excitace
<b>I<sub>0</sub></b>	celková intenzita fluorescence
<b>I<sub>B</sub></b>	intenzita fluorescence měřená v kratších vlnových délkách
<b>I<sub>R</sub></b>	intenzita fluorescence měřená v delších vlnových délkách
<b>I<sub>VH</sub></b>	aktuální intenzita pro vertikálně polarizovanou excitaci a horizontálně polarizovanou emisi
<b>I<sub>VV</sub></b>	aktuální intenzita pro vertikálně polarizovanou excitaci a vertikálně polarizovanou emisi
<b>Laurdan</b>	2-dimethyl-6-lauroylnaftalen
<b>logP</b>	partiční koeficient
<b>MU</b>	Millerovy jednotky
<b>OD<sub>450nm</sub></b>	optická densita měřená při vlnové délce 450nm
<b>ONP</b>	o-nitrofenol
<b>ONPG</b>	o-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid
<b>OT</b>	oktanol
<b>P</b>	polarizace fluorescence
<b>P<sub>des</sub></b>	promotor genu <i>des</i>
<b>PMFS</b>	fenyl-methyl-sulfonylfluorid
<b>PR</b>	propanol
<b>r</b>	anizotropie fluorescence
<b>r<sub>0</sub></b>	limitní anizotropie
<b>SD</b>	Shine-Dalgarnova sekvence
<b>S<sub>H</sub></b>	citlivost emisního kanálu pro horizontálně polarizované světlo
<b>SPC</b>	sojový fosfatidylcholin
<b>S<sub>V</sub></b>	citlivost emisního kanálu pro vertikálně polarizované světlo
<b>T</b>	doba zdvojení
<b>T<sub>k</sub></b>	teplota kultivace
<b>T<sub>m</sub></b>	teplota fázového přechodu
<b>Tris</b>	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>T<sub>w</sub></b>	inflexní bod DSC termogramu

# 1 Úvod

Každá bakteriální buňka se musí vyrovnávat s proměnlivostí vnějšího prostředí, aby mohla úspěšně přežívat a množit se. Jedním z nejvýznamnějších faktorů, kterému volně žijící bakterie musí čelit, je vliv teplotní změny. Poikilotermní organizmy, k nimž prokaryotní organizmy patří, nejsou schopny regulovat teplotu svého vnitřního prostředí a jsou proto izotermální s okolím. Negativnímu vlivu teploty se bakterie brání prostřednictvím nejrůznějších fyziologických adaptací, které se odehrávají na buněčné nebo molekulární úrovni.

Grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* je mikroorganismus, který se v přírodě běžně vyskytuje ve svrchních vrstvách půdy, tedy v prostředí, v němž lze očekávat časté výkyvy teplot. Tato bakterie musí mít řadu adaptačních mechanismů, které jí umožní vypořádat se s fluktuacemi teplot. Mikroorganismus *Bacillus subtilis* se tak stal modelovým organismem pro studium odpovědi na náhlou změnu vnější teploty. Na našem pracovišti je dlouhodobě studována odpověď *Bacillus subtilis* na náhlé snížení teploty, chladový šok, na úrovni membrány (SVOBODOVÁ 1984; SVOBODOVA a SVOBODA 1988; KONOPASEK et al. 2000; BERANOVA et al. 2008).

Bakteriální membrána je jednou z hlavních buněčných komponent, jejíž struktura a funkce jsou po náhlém snížení kultivační teploty výrazně narušeny. V nízké teplotě dochází ke změně fyzikálního stavu membrány v závislosti na jejím složení. Po chladovém šoku je udržena optimální fluidita membrány prostřednictvím inkorporace takových mastných kyselin, které zvyšují neuspořádanost membrány (nenasycené, větvené či cyklické mastné kyseliny).

U *Bacillus subtilis* jsou dva mechanismy adaptace membrány na nízkou teplotu – krátkodobá a dlouhodobá adaptace. Dlouhodobá adaptace spočívá ve změně poměru anteizo- a izo- větvených mastných kyselin (KLEIN et al. 1999). Krátkodobá adaptace zahrnuje zavedení dvojnásobné vazby membránovým enzymem desaturázou mastných kyselin Des do řetězce mastné kyseliny připojené k fosfolipidu. Expres desaturázy je regulována na transkripční úrovni pomocí dvoukomponentového systému, který je složen z histidinkinázy DesK a regulátoru DesR (AGUILAR et al. 2001).

Tato práce si kládla za cíl rozšířit poznatky o vnímání změn membránové fluidity senzorem DesK. Prvním úkolem bylo zjistit, jak velká teplotní změna vyvolá změnu signalizace, tedy jaká je mez citlivosti proteinu DesK ke změnám teploty.

Za tímto účelem byly sledovány změny signalizace proteinu DesK po různě velkých chladových šocích a v průběhu kultivace v různých kultivačních teplotách.

Fluidita membrány může být modulována nejenom teplotou, ale také přidavkem membránově aktivní látky. Bylo proto zkoumáno, zda látky s fluidizačním a rigidizačním účinkem mohou ovlivnit signalizaci senzoru DesK, tedy zda mohou potlačit nebo naopak indukovat expresi genu *des*, který kóduje desaturázu Des. Pro testování účinku membránově aktivních látek bylo nutné najít optimální experimentální uspořádání, které by bylo k tomuto účelu vhodné.

Ve spojitosti se sledováním vlivu membránově aktivních látek na úrovni změn aktivity promotoru genu *des*, byl monitorován stav membrány po působení membránově aktivní látky prostřednictvím fyzikálních charakteristik odrážejících uspořádanost membrány a pohyblivost jejích komponent za pomoci různých biofyzikálních metod. Pro studium fyzikálního stavu membrány byly využity tyto techniky: anizotropie fluorescence DPH, generalizovaná polarizace Laurdanu a diferenciální skenovací kalorimetrie. Každá z těchto technik zachycuje jiný fyzikální parametr, který vypovídá o fluiditě membrány.

Cílem této diplomové práce bylo porovnáním vlivu membránově aktivních látek na aktivitu promotoru genu *des* s jejich účinkem na membránu zjistit, jaké změny fyzikálních parametrů membrány senzor membránové fluidity DesK vnímá a reaguje na ně změnou signalizace.

## **2 Literární přehled**

### **2.1. Chladový šok u *Bacillus subtilis***

Bakterie jsou proslulé svou schopností kolonizovat nejrůznější prostředí a přizpůsobovat se měnícím se životním podmínkám. *Bacillus subtilis* je běžná půdní bakterie, která obývá horní vrstvy půdy. Tato volně žijící bakterie se musí neustále vyrovnávat s proměnlivostí půdního prostředí. Je totiž stále vystavena změnám teploty, vlhkosti, pH, ale také se musí vypořádat se změnami v dostupnosti živin a konkurencí jiných bakteriálních druhů. Bakterie *Bacillus subtilis* proto musí čelit stresům nejrůznějšího charakteru a intenzity, navíc v daný okamžik může na bakteriální buňku působit i několik rozdílných stresorů najednou (WIPAT a HARWOOD 1999).

Jedním z nejdůležitějších fyzikálních parametrů prostředí, který bakterie vnímají a který podstatně ovlivňuje jejich růst, je teplota a její změna. Ze stresových faktorů je právě teplotní šok v současnosti faktorem nejstudovanějším. Větší část prací, dosud publikovaných na toto téma, se zabývá přenosem bakterií z optimální do vyšší teploty kultivace. Po náhlém zvýšení teploty dochází hlavně k narušení konformace proteinů, DNA a RNA a k následné expresi proteinů HSP (z angl. „heat shock proteins“) (SCHUMANN 2007).

Teplotní šok opačným směrem, chladový šok, je intenzivněji studován během posledních dvaceti let. Odpověď bakteriální buňky na chladový šok (CSR, z angl. „cold shock response“) je definována jako souhrn všech buněčných reakcí, které jsou nezbytné pro zajištění dostatečné adaptace buňky na náhlé snížení kultivační teploty (WEBER a MARAHIEL 2003). Na tomto místě je však nutno poznamenat, že téměř veškeré poznatky týkající se odpovědi bakterií na chladový šok byly získány za určitých experimentálních podmínek. V naprosté většině případů byla odpověď bakterií na chladový šok sledována u exponenciálně rostoucí kultury v tekutém médiu, i když mimo laboratorní podmínky stráví bakterie největší část svého života ve stacionární fázi (KJELLEBERG et al. 1993). Jak bylo uvedeno výše, na bakteriální buňku v přírodě většinou působí několik stresů najednou (BEALES 2004), ale při studiu odpovědi na změny vnějších podmínek, je bakteriální kultura vystavena pouze vlivu jednoho stresového faktoru. Dále bylo zjištěno, že odpověď Gram-negativní bakterie

*Escherichia coli* se liší v závislosti na tom, zda buňky volně plavou v kultivačním médiu, či jsou zachyceny v gelu (PERROT et al. 2001). Přestože tedy při studiu odpovědi bakterií na chladový šok je využíváno takové experimentální uspořádání, které je velmi odlišné od podmínek panujících v přirozeném prostředí bakterií, a pozorovanou odpověď na chladový šok je vždy nutno spojovat s definovanými experimentálními podmínkami, bylo získáno velké množství poznatků, které umožňují nahlédnout do procesů odehrávajících se v bakteriální buňce po náhlém přenosu rostoucí kultury do nižší kultivační teploty.

### 2.1.1. Fyzikální působení chladového šoku

Působení chladového šoku na bakteriální buňku lze popsat jako náhlé snížení molekulové dynamiky, které vede ke snížení difúzních rychlostí a konformačním změnám makromolekulárních struktur (WEBER a MARAHIEL 2003). Tyto chladově indukované konformační změny mohou narušit složitou a velmi dobře vyladěnou síť enzymatických reakcí, membránovou integritu a procesy na membránu vázané (transport, buněčné dělení) a v neposlední řadě také procesy závislé na správné konformaci nukleových kyselin (replikaci, transkripci, translaci, kondenzaci nukleoidu).

Vliv teploty na rychlost chemických reakcí popisuje Arrheniova rovnice:

$$K=Ae^{-E_a/RT},$$

kde  $K$  je rychlost reakce,  $A$  konstanta (frekvenční faktor),  $E_a$  aktivační energie,  $R$  univerzální plynová konstanta a  $T$  teplota. Snížení teploty vede k exponenciálnímu poklesu reakčních rychlostí, který závisí na hodnotě aktivační energie dané reakce. Chladový šok tedy působí na většinu buněčných procesů přímo tím, že snižuje rychlost biochemických reakcí.

Aktivita enzymů je často optimalizována pro určitou teplotu, enzymy jsou proto funkční jen v poměrně úzkém teplotním rozmezí (FELLER 2007). Po chladovém šoku jsou některé enzymy nefunkční, což vede k porušení rovnováhy mezi jednotlivými metabolickými reakcemi. Bakteriální buňka se s tímto problémem vyrovnává tak, že pozmění genovou expresi ve prospěch zvýšení koncentrace enzymů, které jsou po chladovém šoku v relativním nedostatku, nebo syntetizuje zcela nové enzymy (BUDDE et al. 2006). Kromě udržení metabolických drah ve funkčním stavu se bakteriální buňka musí vyrovnat i s výše zmíněnými konformačními změnami makromolekul.

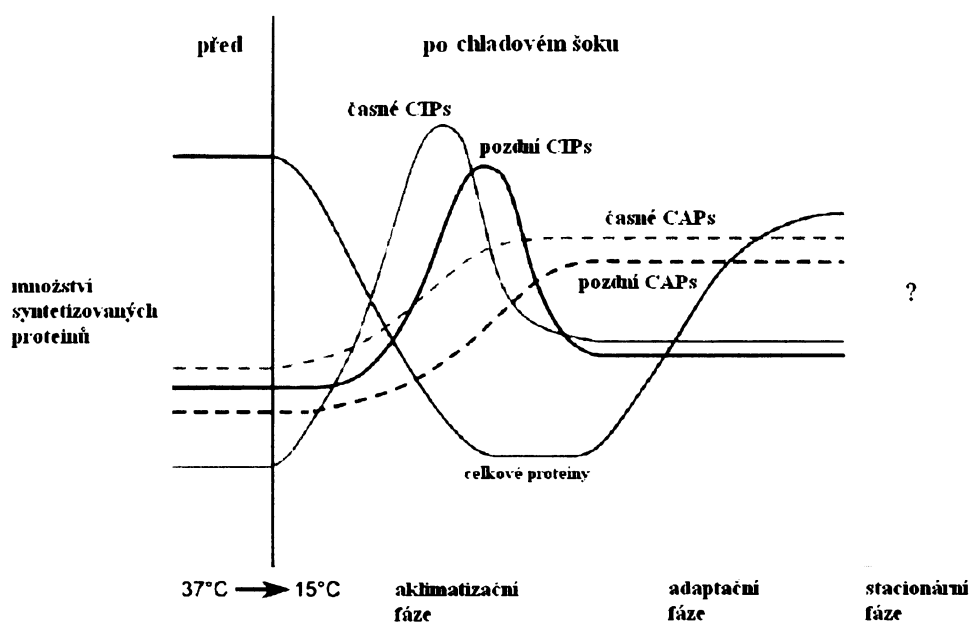
### 2.1.2. Odpověď bakteriální buňky na chladový šok

Po chladovém šoku musí bakteriální buňka, aby přežila, rychle rozpoznat náhlé snížení teploty, aktivovat příslušné dráhy signální transdukce, které vedou k syntéze adaptivních proteinů, které nahradí nebo modifikují chladovým šokem poškozené buněčné komponenty.

Odpověď bakteriální buňky na chladový šok lze rozdělit do tří fází (Obr. 1) (HORN et al. 2007). Bezprostředně po přenosu exponenciálně rostoucí kultury do nižší teploty vstupuje buňka do aklimatizační fáze, které trvá i několik hodin, během kterých se výrazně zpomalí růstová rychlost a dochází ke změně exprese mnoha proteinů. Po aklimatizační fázi následuje fáze adaptační, kdy bakteriální kultura roste s kratší dobou zdvojení a jsou exprimovány jiné proteiny než v předchozí fázi. Buňky jsou již adaptované na nižší kultivační teplotu. Následuje stacionární fáze, ve které opět dochází k přeprogramování exprese proteinů. Tato fáze nebyla doposud systematicky studována, přestože, jak bylo uvedeno výše, je to stav, ve kterém se bakterie v přírodě vyskytují nejčastěji (KJELLEBERG et al. 1993).

Po chladovém šoku, v průběhu aklimatizační fáze, dochází ke snížení exprese většiny proteinů, které se nacházely v buňce před přenosem do nižší kultivační teploty, naopak jiné proteiny jsou exprimovány do vysokých hladin (Obr. 1) (JONES et al. 1987). Mezi proteiny, jejichž hladina je během aklimatizační fáze vysoká, patří chladově indukované proteiny (CIP, z angl. „cold induced proteins“) a chladově aklimatizační proteiny (CAP, z angl. „cold acclimatization proteins“). Zatímco CIP jsou indukovány pouze přechodně, CAP jsou přítomny v poměrně vysokých koncentracích i v chladově adaptovaných buňkách. Podle toho, v jakém časovém okamžiku se objeví v buňce, lze CIP i CAP rozdělit na časné a pozdní (Obr. 1) (WEBER a MARAHIEL 2003).

Další skupinou proteinů, které se vyskytují v buňce po náhlém přenosu kultury do nižší teploty, jsou proteiny chladového šoku (CSP, z angl. „cold shock proteins“) . CSP patří mezi CIP i mezi CAP, hrají tedy důležitou roli v přizpůsobení buňky na náhlé snížení vnější teploty, jsou však také důležité pro přežití buňky v optimální teplotě kultivace (GRAUMANN et al. 1997).

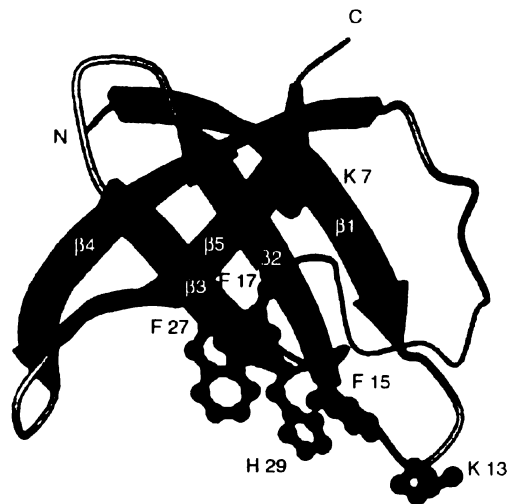


**Obr. 1** Odpověď bakteriální buňky na chladový šok ( $37^{\circ}\text{C} \rightarrow 15^{\circ}\text{C}$ ). V aklimatizační fázi klesá syntéza celkových proteinů a zvyšuje se exprese chladově indukovaných proteinů (CIP) a chladově aklimatizačních proteinů (CAP). K obnovení translace celkových proteinů dochází v průběhu adaptační fáze (upraveno podle WEBER a MARAHIEL 2003).

### 2.1.2.1. Proteiny chladového šoku (CSP)

Proteiny chladového šoku (CSP) představují rodinu malých (asi 70 aminokyselin), nukleové kyseliny vázajících proteinů, které byly objeveny u většiny psychrofilních, mezofilních a termofilních bakterií (PANOFF et al. 1998; HEBRAUD a POTIER 1999; CAVICCHIOLI et al. 2000). Nacházejí se také u evolučně starých rodů hypertermofilních bakterií *Thermotoga* a *Aquifex* (GRAUMANN a MARAHIEL 1998), což naznačuje jejich velmi dávný původ. CSP obsahují tzv. doménu chladového šoku (CSD, z angl. „cold shock domain“), která je konzervována od bakterií až po člověka. Tato doména nese RNP1 a RNP2 motivy, které jsou zodpovědné za vazbu nukleových kyselin (ERMOLENKO a MAKHATADZE 2002). Bylo zjištěno, že proteiny s CSD (prokaryotní i eukaryotní) mají nejen společného předka, ale také stejný mechanismus vazby na nukleové kyseliny (MAX et al. 2007).

CSP z různých organismů sdílejí podobnou strukturu. CSP tvoří tzv.  $\beta$ -soudek, který se skládá z pěti antiparalelních  $\beta$ -listů (Obr. 2). Na svém povrchu CSP vystavují bazické a aromatické aminokyselinové zbytky, které jsou součástí RNP motivů a jsou zapojeny do vazby jednořetězcových nukleových kyselin (Obr. 3) (SCHRODER et al. 1995).

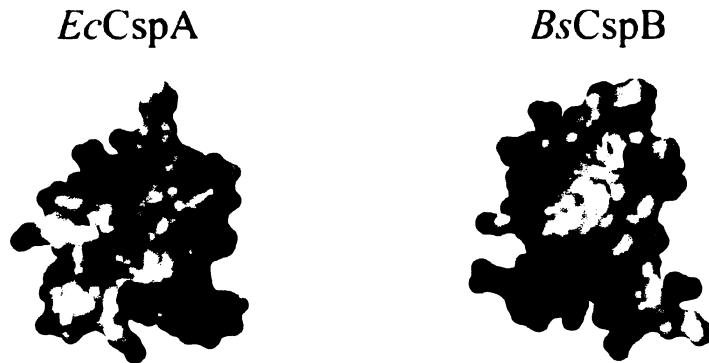


**Obr. 2** Trojrozměrná struktura proteinu chladového šoku CspB z *Bacillus subtilis*. Pět antiparalelních  $\beta$ -listů tvoří soudek. Červeně a modře jsou vyznačeny aromatické aminokyseliny, které jsou zapojeny do vazby nukleových kyselin (převzato z GRAUMANN a MARAHIEL 1996).

CSP se v bakteriálním genomu většinou vyskytují ve více genových kopiích a jsou regulovány různým způsobem. U *Bacillus subtilis* byly identifikovány tři CSP: CspB (WILLIMSKY et al. 1992), CspC a CspD (GRAUMANN et al. 1996). Z experimentů, kdy byl zkoumán fenotyp delečního mutantu *Bacillus subtilis*  $\Delta cpsB/\Delta cpsC/\Delta cpsD$ , bylo zjištěno, že delece všech tří CSP je pro bakteriální buňku letální i v optimální kultivační teplotě. Přestože se jednotlivé CSP mohou díky své strukturní podobnosti vzájemně zastupovat (GRAUMANN et al. 1996), poškození jen jednoho genu pro CSP vede k významnému fyziologickému poškození buňky. Z toho vyplývá, že CSP hrají nejen roli v adaptaci buňky po chladovém šoku, ale podílejí se také na jiných buněčných procesech. CspB a CspD byly identifikovány jako hlavní proteiny, které jsou indukovány ve stacionární fázi růstu (GRAUMANN et al. 1997).



CSP *Bacillus subtilis* vykazují nízkou termodynamickou stabilitu a vysokou frekvenci rozpadu nativní konformace, jsou proto snadno štěpeny proteázami *in vitro*. V živých buňkách však nedochází k jejich významné degradaci. CSP jsou v buňce stabilizovány pravděpodobně vazbou na mRNA v optimální teplotě kultivace i za podmínek chladového šoku (SCHINDLER et al. 1999).



**Obr. 3** Trojrozměrný model proteinů CspA z *Escherichia coli* a CspB z *Bacillus subtilis* zachycuje rozmístění aminokyselin na povrchu proteinu. Bazické aminokyseliny jsou označeny modře, kyselé červeně a hydrofobní bíle (převzato z HORN et al. 2007).

### 2.1.2.1.1. Funkce proteinů chladového šoku (CSP)

Po chladovém šoku stejně jako po přechodu do stacionární fáze růstu dochází k rychlé inaktivaci ribozomálních funkcí (WADA 1998). Nefunkční ribozomy by mohly být jedním ze signálů, které spouští expresi CSP. Bylo ukázáno, že translační iniciační faktor IF1 z *Escherichia coli*, který je strukturně podobný CSP, je schopen zmírnit poruchy růstu i sporulace deleční mutanty *Bacillus subtilis*  $\Delta cspB/\Delta cspC$  (WEBER et al. 2001c). CSP mají tedy alespoň částečně obdobnou funkci jako IF1, který působí přímo v oblasti malé ribozomální podjednotky (CARTER et al. 2001). Homolog IF1 proteinu nebyl u grampozitivních bakterií nalezen, proto by zde roli hlavního nebo alespoň alternativního translačního iniciačního faktoru mohly hrát CSP. Pomocí fúze GFP s C-koncem CspB *Bacillus subtilis* bylo prokázáno, že CspB opravdu kolokalizuje

s ribozomy v závislosti na aktivní transkripci, kdy se CSP váží na nově syntetizovanou mRNA a spřahují tak transkripci a translaci (WEBER et al. 2001b).

Protein IF1 se *in vivo* váže na mRNA, což může souviset s interakcemi odehrávajícími se během iniciace translace nebo IF1 působí také jako RNA chaperon. Vzhledem ke strukturální podobnosti mezi IF1 a CspB (SCHINDELIN et al. 1993; SETTE et al. 1997) a již dříve získaným poznatkům, že IF1 narušuje dvouřetězcovou strukturu nukleových kyselin (SCHLEICH et al. 1980), by CSP mohly fungovat také jako RNA chaperony (viz kapitola).

CSP mohou fungovat jako transkripční aktivátory a regulovat tak odpověď na chladový šok na transkripční úrovni. CspB, hlavní CSP bakterie *Bacillus subtilis*, se preferenčně váže do ATTGG boxu, který se nachází v regulační oblasti některých CSP, a aktivuje transkripci těchto genů tím, že stabilizuje vazbu RNA-polymerázy (GRAUMANN a MARAHIEL 1994). CspB je schopen se vázat do tzv., Y-boxu, cis elementu v promotorové oblasti savčího genu (kóduje MHC II), který je rozpoznáván Y-box proteiny a který se podílí na regulaci transkripce (MATSUMOTO a WOLFFE 1998). Toto pozorování společně s faktem, že CSP sdílí s Y-box proteiny vysokou sekvenční homologii, svědčí o starém a evolučně konzervovaném mechanismu regulace transkripce (ERMOLENKO a MAKHATADZE 2002).

Hlavní CSP bakterie *Escherichia coli* CspA se váže do promotorové oblasti genů *h-ns* a *gyrA* a spouští jejich transkripci (JONES et al. 1992; BRANDI et al. 1994). Model popisující roli CSP v transkripci je následující: v okamžiku chladového šoku se CSP, které jsou konstitutivně exprimovány a jsou přítomny v buňce i v optimální teplotě kultivace, váží do promotorové oblasti genů, které jsou chladově indukovány. Během aklimatizační fáze stoupá koncentrace CSP v buňce a jsou proto obsazena i CSP vazebná místa s nižší afinitou - promotor je tak zcela zakryt CSP a je nedostupný pro RNA-polymerázu (HORN et al. 2007).

CSP dále zastávají funkci transkripčních antiterminátorů, váží se na jednořetězcovou molekulu DNA a rozplétají stabilní sekundární struktury, které brání transkripci (PHADTARE 2004).

### 2.1.2.2. Translace po chladovém šoku

Narušení translačního aparátu po chladovém šoku je hlavní překážkou pro obnovení růstu bakteriální kultury. Vyplývá to z pozorování, že po přidavku antibiotik,

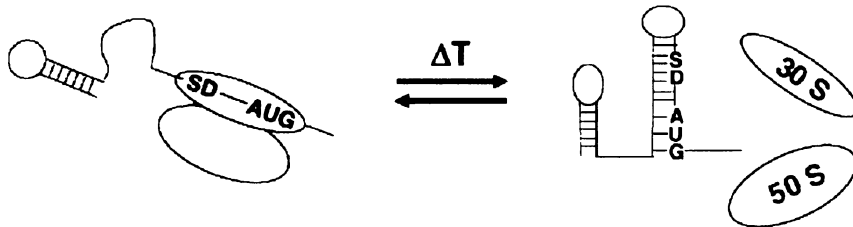
kteřé inhibují translaci (např. chloramfenikolu, který blokuje peptidyltransferázovou reakci), jsou exprimovány CSP i v optimální kultivační teplotě (JIANG et al. 1993).

Po chladovém šoku se rozpadají polyzomy a zároveň se v buňce akumulují subjednotky a 30S, 50S a 70S ribozomální partikule. Iniciace translace je narušena, proto obnovení funkce translačního aparátu je důležitým krokem pro přežití buňky (JONES a INOUYE 1996). Jak ukázaly některé studie translačního profilu bakteriální buňky, po chladovém šoku jsou exprimovány geny, které kódují ribozomální proteiny, translační faktory nebo proteiny, které asociují s ribozomy a napomáhají tak správnému fungování ribozomu nebo jeho složení v nízké teplotě (BUDDE et al. 2006). Jedním z proteinů, který je chladově indukován a napomáhá správnému sestavení ribozomu u *Escherichia coli*, je protein RbfA. Nadprodukce tohoto proteinu u *Escherichia coli* vede k rychlejší adaptaci na nízkou teplotu (JONES et al. 1996).

Prostřednictvím své citlivosti ke snížení vnější teploty by ribozom mohl hrát roli v percepci přicházejícího chladového šoku. Jako reakci na hladovění na aminokyseliny, kdy na ribozomální A-místo přicházejí nenabitě tRNA, spouští bakteriální buňka tzv. stringentní odpověď (WENDRICH et al. 2002). Součástí této odpovědi je syntéza alarmonu ppGpp, který se váže na RNA-polymerázu a pozměňuje tak její afinitu k promotorům různých genů. Alarmon ppGpp umožňuje měnit expresi mnoha genů najednou, je proto vhodnou signální molekulou pro odstartování komplexní odpovědi bakteriální buňky na chladový šok. Chloramfenikol stejně jako nízká teplota způsobí, že A-místo ribozomu je obsazeno tRNA, s navázanou aminokyselinou, ale elongace neprobíhá (VANBOGELEN a NEIDHARDT 1990). Tím se snižuje pravděpodobnost, že A-místo bude obsazeno nenabitou tRNA a v důsledku toho syntéza ppGpp klesá. Deleční mutant *Escherichia coli* *ΔrelA/ΔspoT*, který nebyl schopen syntetizovat ppGpp, měl po chladovém šoku zvýšenou produkci CIP a rychleji se adaptoval na nižší teplotu kultivace (JONES et al. 1992). Studie zabývající se transkripčním profilem chladově adaptované bakterie *Bacillus subtilis* prokázala, že odpověď na chladový šok je „obrácená stringentní odpověď“ - jinými slovy, že po chladovém šoku jsou indukovány geny, které jsou při stringentní odpovědi inhibovány a naopak (BECKERING et al. 2002; EYMANN et al. 2002).

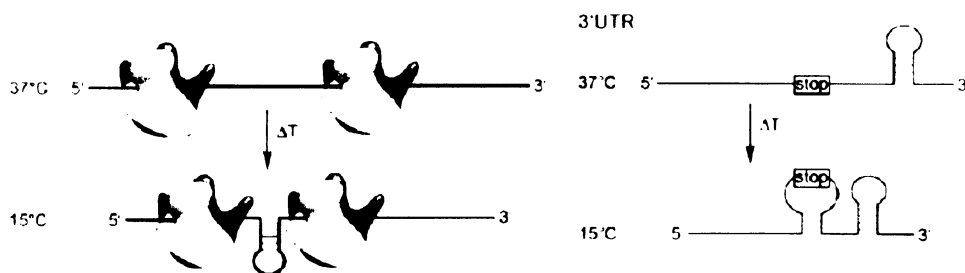
Translace po chladovém šoku nemusí být blokována pouze díky citlivosti ribozomu k náhlému snížení teploty, ale předpokládá se také vliv molekul mRNA. Po náhlém snížení teploty dochází ke zpomalení transkripce. Než se objeví ribozom vazebné místo (Shine-Dalgarnova sekvence, SD) na molekule mRNA, mohou se

v 5'UTR oblasti zformovat jiné sekundární struktury než ty, které vznikají při optimální teplotě kultivace. Tyto sekundární struktury mohou zpomalit či úplně zabránit nasednutí ribozomu a tím spuštění translace (Obr. 4) (NARBERHAUS et al. 2006).



**Obr. 4** Vznik sekundárních struktur v 5'UTR oblasti mRNA v nízké teplotě: Shine-Dalgarnova sekvence je nedostupná pro ribozom (převzato z NARBERHAUS et al. 2006).

Podobně jako rychlost transkripce se po chladovém šoku snižuje i rychlost translace, což je způsobeno vznikem sekundárních struktur na molekulách mRNA, které jsou již překládány. Pokud se tyto sekundární struktury objeví mezi ribozomy či v 3'UTR (Obr. 5) mohou ovlivnit translační elongaci a terminaci (WEBER a MARAHIEL 2003).



**Obr. 5** Translační elongace (vlevo) a terminace (vpravo) je narušena vznikem vlásenek (převzato z WEBER a MARAHIEL 2003).

Ribozom pak zůstává na molekule mRNA, množství volné malé ribozomální podjednotky, která je zodpovědná za iniciaci translace, klesá. Buňka se vyrovnává se vznikem sekundárních struktur na molekulách mRNA dvěma způsoby. Prvním je

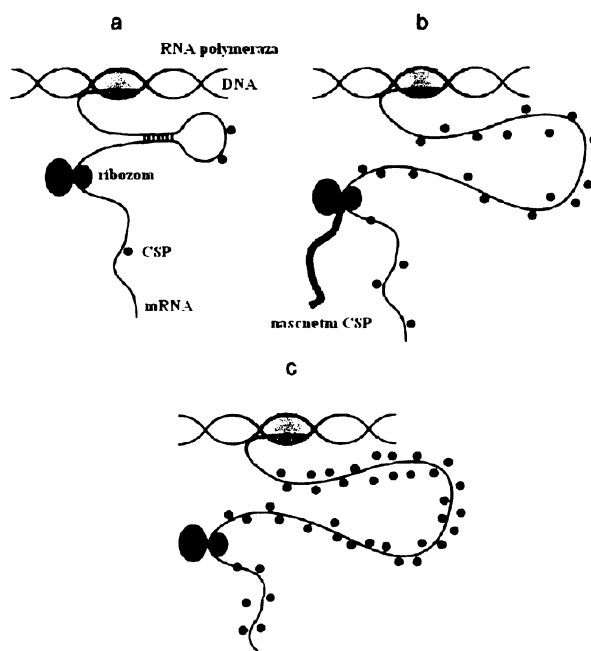
kooperativní vazba CSP na nascentní mRNA transkript, která zabraňuje vytvoření sekundárních struktur (GRAUMANN et al. 1997). Druhý mechanismus odstranění sekundárních struktur na mRNA zahrnuje RNA-helikázy, které rozrušují již vzniklé sekundární struktury a které chrání mRNA před degradací zprostředkovanou RNázami, které preferenčně štěpí dsRNA (JONES et al. 1996). V buňkách *Bacillus subtilis* vystavených působení nízkých teplot byla prokázána zvýšená hladina proteinu, který je homologní k CsdA z *Escherichia coli* a který se řadí do rodiny DEAD-box RNA-helikáz, které rozplétají dvouřetězcovou RNA (BECKERING et al. 2002). Experimenty provedené za pomoci techniky FRET (z angl. „fluorescence energy transfer“) ukázaly, že RNA-helikázy CshA a CshB a CspB z *Bacillus subtilis* spolu interagují (HUNGER et al. 2006). Toto pozorování naznačuje, že RNA-helikázy a CSP, alespoň v případě *Bacillus subtilis*, spolupracují v rozplétání sekundárních struktur mRNA. Předpokládá se, že RNA-helikázy indukují vznik jednořetězcové oblasti, do které se pak váží CSP a zabraňují vytvoření dalších nežádoucích sekundárních struktur.

CSP mohou chránit před degradací svou vlastní mRNA. V optimální teplotě kultivace je hladina CspA mRNA z *Escherichia coli* nízká, i když transkripce genu *cspA* probíhá (BRANDI et al. 1996), což způsobeno přítomností sekundárních struktur na této mRNA a následně jejím štěpením enzymem RNázouE (HANKINS et al. 2007). Po chladovém šoku se CspA váže do dlouhé 5'UTR oblasti své vlastní mRNA (BAE et al. 1997), do tzv. chladového boxu („cold box“), a chrání ji před degradací. Exprese genu *cspA* je tak kontrolována na posttranskripční úrovni tím, že je zvýšena stabilita mRNA CSP po náhlém snížení kultivační teploty (GUALERZI et al. 2003).

U *Bacillus subtilis* byl identifikován kromě výše uvedeného také odlišný mechanismus, který zesílil translaci mRNA proteinu CspB. Transkript CspB obsahuje tzv. „downstream box“, který interaguje s rRNA a stabilizuje tak vazbu ribozomu na Shine-Dalgarnovu sekvenci (LA TEANA et al. 2000).

CSP ovlivňují translaci v závislosti na své koncentraci. V nízkých koncentracích CSP zesilují translaci po chladovém šoku. Bezprostředně po chladovém šoku je translace většiny proteinů inhibována kvůli vzniku sekundárních struktur na jejich mRNA a nespecifické vazbě CSP, jejichž afinita k mRNA stoupá po chladovém šoku (Obr. 6a)(LOPEZ et al. 1999). V průběhu aklimatizační fáze hladina CSP v buňce stoupá díky pozitivní zpětné vazbě, kdy se CSP váží na svou vlastní mRNA a stabilizují ji. Exprese ostatních proteinů je zastavena kvůli nespecifickým interakcím s CSP (Obr. 6b). Na konci aklimatizační fáze je hladina CSP v buňce tak vysoká, že reprimují

translaci své vlastní mRNA. Množství CSP v bučce klesá a je obnovena translace ostatních proteinů (Obr. 6c) (HORN et al. 2007).



**Obr. 6** Regulace translace v průběhu aklimatizační fáze. V nízkých koncentracích proteiny chladového šoku (CSP) stimuluji translaci (b) a ve vysokých koncentracích translaci naopak inhibují (c) (převzato z HORN et al. 2007).

Je zajímavé, že narušení ribozomálních funkcí po chladovém šoku nemusí být pouze důsledek poškození molekul nízkou teplotou. Nelze totiž vyloučit, že blokování translačního aparátu je součástí adaptivní odpovědi bakteriální buňky na chladový šok. Jak bylo uvedeno výše (kapitola 2.1.1), náhlý pokles teploty naruší dobře regulovanou síť enzymatických reakcí. Cílem bakteriální buňky po chladovém šoku je tedy rychlé nastolení nové rovnováhy mezi jednotlivými metabolickými drahami. Zastavení translace většiny proteinů po chladovém šoku znamená uvolnění translačního aparátu pro syntézu proteinů, které buňce umožní se adaptovat na nízkou kultivační teplotu (HORN et al. 2007). Toto potvrzuje i nalezení chladově indukovaného proteinu pY u *Escherichia coli*, který stabilizuje 70S ribozomální partikule a brání jejich disociaci. S jeho vymizením na konci aklimatizační fáze je obnovena translace většinových proteinů (AGAFONOV et al. 1999).

### 2.1.2.3. Fluidita membrány po chladovém šoku

Udržení správné funkce membrány je nezbytné pro přežití každé bakterie. Po chladovém šoku se mění fyzikální stav membrány, fosfolipidová dvojvrstva se nachází pod fázovým přechodem, je proto příliš rigidní a jsou narušeny procesy, které jsou na membránu vázány (transport, buněčné dělení) (LOS a MURATA 2004).

Membrána je díky změně svého fázového stavu v závislosti na teplotě vhodným senzorem pro vnímání vnější teploty. Změna fluidity navíc může regulovat aktivitu membránových proteinů a tím přenést informaci o působení stresu dovnitř do buňky (SHIGAPOVA et al. 2005; TANI a JUDELSON 2006).

Jako odpověď na rigidizaci membrány bakteriální buňka syntetizuje mastné kyseliny s nižším bodem tání a inkorporuje je do fosfolipidů. Tento adaptivní proces bývá označován jako homeoviskózní adaptace (SINENSKY 1974). Principem této adaptace je především zmenšit van der Wallsovy interakce mezi přilehlými řetězci mastných kyselin, které jsou součástí fosfolipidů. Bakteriální buňka toho dosáhne pomocí mastných kyselin s kratším řetězcem, větvených mastných kyselin nebo nenasycených mastných kyselin (FELLER 2007), často je také pozorována změna v zastoupení jednotlivých druhů lipidů či změna v poměrném zastoupení lipidů a membránových proteinů (GUSCHINA a HARWOOD 2006).

U *Bacillus subtilis* byl identifikován senzor membránové fluidity DesK, který registruje změnu fyzikálního stavu membrány. Po chladovém šoku, kdy je membrána rigidní, aktivuje tento senzor signální dráhu, která reguluje expresi genu *des*. Produkt genu *des* se účastní obnovení správné fluidity membrány (AGUILAR et al. 2001). Regulace membránové fluidity u *Bacillus subtilis* bude podrobně pojednána v kapitole 2.2.

### 2.1.2.4. Topologie DNA v závislosti na teplotě

U bakteriálních buněk, které byly vystaveny působení chladového šoku, byla pozorována kondenzace nukleoidu (WEBER et al. 2001b). Toto pozorování je vysvětlováno jako důsledek několika procesů, které zahrnují změnu konformace molekuly DNA v závislosti na vnější teplotě, změnu aktivity proteinů, které se podílejí na tvorbě struktury DNA (DNA-gyráza, histon-like proteiny), a narušení syntézy membránově vázaných proteinů (WEBER a MARAHIEL 2003).

Konformace samotné molekuly DNA se mění vlivem změn vnější teploty. Po chladovém šoku se na DNA vytváří negativní nadobrátky. Tato pozměněná struktura DNA ovlivňuje dostupnost promotorových oblastí pro RNA-polymerázu a tím přispívá ke změně genové exprese po chladovém šoku (MIZUSHIMA et al. 1997).

Změna konformace DNA po chladovém šoku není zapříčiněna pouze změnou fyzikálních vlastností DNA, ale podílejí se na ní také DNA vazebné proteiny, které stabilizují strukturu DNA. Bylo zjištěno, že po přidavku inhibitoru DNA-gyrázy se po chladovém šoku na DNA *Escherichia coli* neobjeví negativní nadobrátky (MIZUSHIMA et al. 1997). Předpokládá se, že DNA-gyráza společně s histon-like proteiny (HU proteiny) zavádí negativní nadobrátky do molekuly DNA, aby byly usnadněny procesy, které vyžadují lokální rozpletení DNA (replikace a transkripce). Role histon-like proteinů v kondenzaci nukleoidu byla potvrzena zjištěním, že H-NS protein je jedním z hlavních CIP u *Escherichia coli* (LA TEANA et al. 1991). Jak bylo uvedeno výše, je exprese genu *h-ns* pozitivně regulována CspA. Protein H-NS negativně ovlivňuje transkripci genu *cspA* (BRANDI et al. 1999), což vypovídá o komplexní a dobře regulované odpovědi bakterií na chladový šok.

Ke kondenzaci nukleoidu po chladovém šoku přispívá narušení translace proteinů, které jsou zabudovávány do membrány již během translace a které prostřednictvím spřažení transkripce a translace rozvolňují strukturu DNA (WEBER et al. 2001b).

### 2.1.2.5. Metabolismus po chladovém šoku

Metabolismus bakteriální buňky po chladovém šoku není zatím znám do všech detailů. Je však zřejmé, že snížená rychlost difúze molekul, konformační změny buněčných komponent a snížení afinity enzymů k substrátu, jak bylo ukázáno na příkladě utilizace zdrojů dusíku (REAY et al. 1999), vedou k výraznému poškození složité sítě metabolických reakcí. V optimální kultivační teplotě je bakteriální metabolismus nastaven na rychlý příjem a zpracování živin, aby byl zajištěn rychlý růst a dělení buňky. Po chladovém šoku, kdy je najednou rychlost enzymatických reakcí významně zpomalena se v buňce nachází relativní nadbytek živin. Po chladovém šoku se také snižuje rychlost růstu bakteriální kultury, což je spojeno s menší potřebou přeměny metabolitů a transportu dalších živin do buňky (WEBER a MARAHIEL 2003). Bakteriální buňky by tedy po chladovém šoku měla omezit expresi příslušných



enzymů a naopak exprimovat proteiny, které regulují klíčové reakce metabolických drah. Transkripční profil bakterie *Bacillus subtilis* opravdu potvrdil, že hladina mRNA, která kóduje enzymy účastníci se glykolýzy, citrátového cyklu, biosyntézy aminokyselin, nukleových kyselin a kofaktorů, je snížena, zatímco koncentrace mRNA, která nese informaci o proteinech, které se podílí na obnově membránové fluidity, translace a transportu, je vyšší oproti kultuře rostoucí v optimální kultivační teplotě (BECKERING et al. 2002; KAAAN et al. 2002).

### 2.1.2.6. Konformace proteinů po chladovém šoku

Správná konformace proteinů může být po chladovém šoku, podobně jako po náhlém zvýšení teploty, narušena. Pro složení proteinu do funkční konformace musí být v některých případech překonána energetická bariéra mezi intermediární a konečnou konformací. Tato energetická bariéra může představovat v nízké teplotě limitující krok ve skládání proteinů a složení proteinu do funkčního stavu vyžaduje asistenci chaperonů (FELLER 2007). U kultury *Bacillus subtilis*, která byla vystavena působení chladovému šoku byly nalezeny proteiny peptidylprolyl izomeráza PPIB (GRAUMANN et al. 1996) a tzv. „trigger“ faktor TF, které katalyzují cis/trans izomeraci peptidové vazby prolinových zbytků a napomáhají tak proteinům zaujmout požadovanou funkční konformaci (PHADTARE 2004).

Po chladovém šoku je narušena konformace nejen nově syntetizovaných proteinů, ale také proteinů, které jsou v okamžiku chladového šoku přítomny v buňce, není proto překvapivé, že po náhlém snížení teploty jsou indukovány i proteiny tepelného šoku HSP (z angl. „heat shock protein“). HSP stabilizují správnou konformaci proteinů za různých stresových podmínek a působí tak jako molekulové chaperony. U bakterie *Escherichia coli* byl po chladovém šoku identifikován protein Hsc66, homolog proteinu HSP70 (CHATTOPADHYAY 2006).

### 2.1.3. Souhrn

Chladový šok vyvolá mnoho změn v bakteriální fyziologii, klesá fluidita membrány, sekundární struktury nukleových kyselin jsou stabilizovány, snižuje se efektivita transkripce a translace, jsou poškozeny ribozomy. Bakteriální buňka po

chládovém šoku přestává růst. Během tohoto období zastavení růstu je translace většiny proteinů zastavena a naopak je zesílena exprese proteinů, které buňce pomáhají adaptovat se na nové teplotní podmínky.

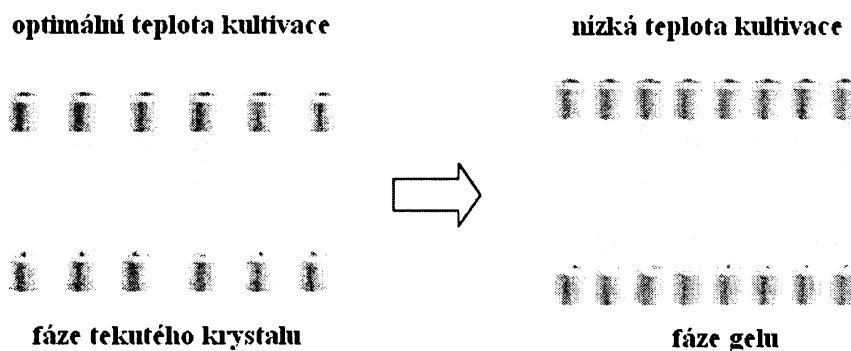
Esenciální pro přežití chládového šoku je pro bakteriální buňku včas rozpoznat změnu vnější teploty, aby na ni mohla adekvátně reagovat. Bakteriální buňka vnímá pokles teploty právě prostřednictvím takových molekul, které vlivem snížené teploty mění své fyzikálně-chemické vlastnosti. Jako senzory nízké kultivační teploty tedy slouží právě DNA, RNA, ribozomy, cytoplazmatické i membránové proteiny a fosfolipidová dvojvrstva (ERIKSSON et al. 2002).

## **2.2. Regulace membránové fluidity u *Bacillus subtilis***

Cytoplazmatická membrána je selektivní bariéra mezi bakteriální buňkou a jejím vnějším prostředím. Je známo, že membrána plní své funkce v závislosti na svém fyzikálním stavu, který je určován nejen složením fosfolipidové dvojvrstvy, ale také vnějšími podmínkami, zejména teplotou (MANSILLA et al. 2004). V optimální teplotě kultivace je membrána velmi fluidní (ve fázi tekutého krystalu) a dobře plní své funkce. V nízké teplotě však membránové lipidy přechází z fáze tekutého krystalu do fáze gelu (Obr. 7), membrána příliš tuhá (rigidní) a její nízkou tekutostí je inhibován transport pomocí membránových proteinů a také biosyntetické dráhy, které jsou na membránu vázány (LOS a MURATA 2004). Snahou bakterií je tedy zachovat si membránu i v nízké teplotě nebo po chládovém šoku dostatečně tekutou, aby procesy na ní závislé mohly dostatečně rychle probíhat.

Teplotní adaptace na úrovni membrány byly sledovány u grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* (SVOBODOVA a SVOBODA 1988; KANEDA 1991; SUUTARI a LAAKSO 1992; AGUILAR et al. 1998). Bylo zjištěno, že teplota kultivace ovlivňuje složení membrán, především spektrum mastných kyselin v membránových fosfolipidech. V nízké teplotě se zvyšuje podíl mastných kyselin, které posunují fázový přechod do nižších teplot (WEBER a MARAHIEL 2002) - především větvených a nenasycených mastných kyselin. U *Bacillus subtilis* se tedy uplatňují dva hlavní mechanismy, které zvyšují fluiditu membrány po chládovém šoku: dlouhodobá

adaptace, která zahrnuje syntézu větvených mastných kyselin, a krátkodobá adaptace, která spočívá v rychlé desaturaci mastných kyselin, které jsou součástí membránových fosfolipidů.



**Obr. 7** Změna fázového stavu membrány v závislosti na teplotě (převzato z LOS a MURATA 2004).

### 2.2.1. Dlouhodobá adaptace membrány *Bacillus subtilis*

Pro rod *Bacillus* je typický vysoký obsah větvených mastných kyselin v membránových fosfolipidech. U *Bacillus subtilis* více než 80% mastných kyselin vázaných v glycerolipidech tvoří izo- a anteizo- větvené mastné kyseliny (Obr. 8) z nichž jsou nejvíce zastoupeny izo-C<sub>15:0</sub>, anteizo-C<sub>15:0</sub>, izo-C<sub>17:0</sub> a anteizo-C<sub>17:0</sub>, nevětvené mastné kyseliny zaujímají pouze 10% z celkového obsahu mastných kyselin (KANEDA 1991).



**Obr. 8** Izo- a anteizo- větvená mastná kyselina. U izo- větvené mastné kyseliny se methylová skupina nachází na druhé pozici od konce, u anteizo- větvené na třetí pozici od konce (převzato z DENICH et al. 2003).

Po chladovém šoku (přenos rostoucí kultury z optimální teploty kultivace 37°C do 15°C) se u *Bacillus subtilis* JH642 mění složení mastných kyselin. Zastoupení izo-C<sub>15:0</sub> a izo-C<sub>17:0</sub> větvených mastných kyselin klesá (ze 44% na 11% z celkových mastných kyselin) a obsah odpovídajících anteizo- větvených kyselin narůstá (z 35% na 76%). Obdobná změna poměrného zastoupení izo- a anteizo- větvených mastných kyselin byla pozorována i pro kmen *Marburg 168* (KLEIN et al. 1999).

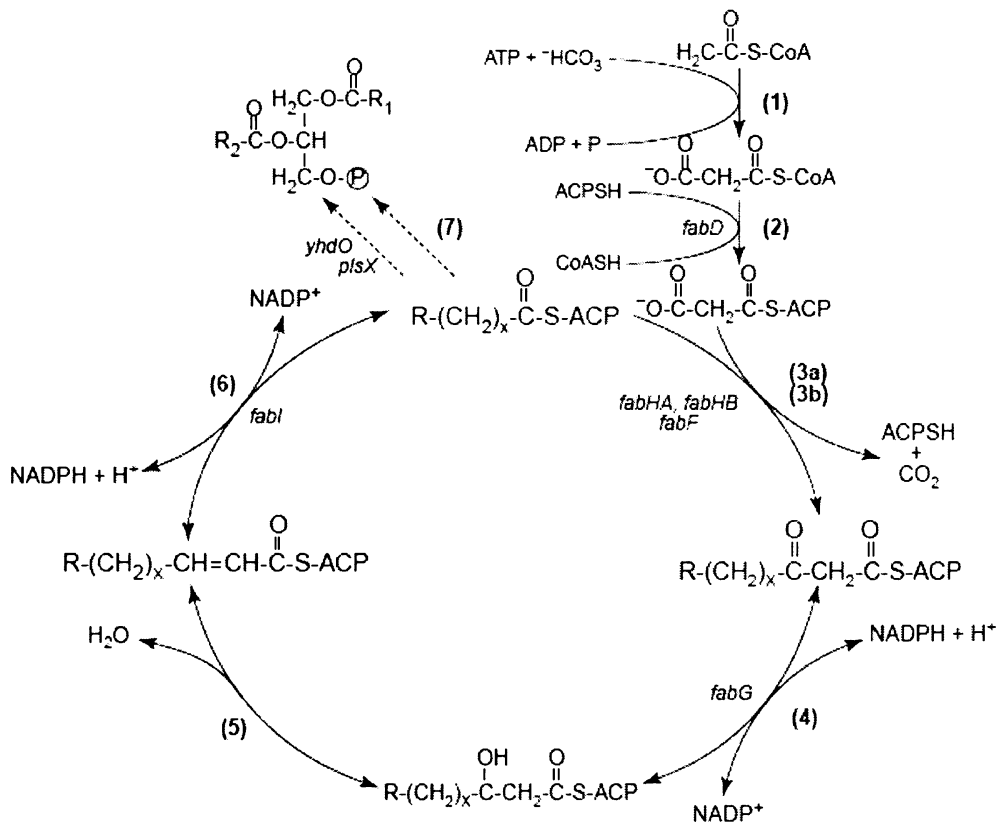
Změna poměrného zastoupení izo- a anteizo- větvených mastných kyselin je adaptace bakteriální buňky na pokles vnější teploty. Izo- větvené mají stejnou teplotu fázového přechodu jako rovné nasycené mastné kyseliny (KANEDA 1991). Anteizo- větvené mastné kyseliny mají nižší teplotu fázového přechodu než stejně dlouhé izo- větvené (LEWIS a MCELHANEY 1985), jsou schopny více narušit uspořádanost fosfolipidové dvojvrstvy, tím fluidizují membránu po chladovém šoku (DENICH et al. 2003).

Větvené mastné kyseliny vznikají pouze v situaci, kdy je buňka schopná růst a syntetizovat mastné kyseliny. Vznik izo- a anteizo- větvených mastných kyselin je závislý na *de novo* syntéze mastných kyselin (SUUTARI a LAAKSO 1994), pozice větvení se po ukončení syntézy nemůže měnit, je totiž určena typem prekurzoru (RUSSELL 1997).

Mastné kyseliny v bakteriální buňce jsou produktem syntetázy mastných kyselin typu II, která zahrnuje několik enzymů, které katalyzují vždy pouze jeden krok v syntéze mastných kyselin (Obr. 9) (LU et al. 2004). Intermediáty syntézy mastných kyselin jsou kovalentně připojeny k ACP („acyl carrier protein“), který je přenáší od jednoho enzymu k druhému.

Prekurzory pro syntézu větvených mastných kyselin jsou větvené aminokyseliny valin a leucin pro izo- větvené a izoleucin pro anteizo- větvené mastné kyseliny (Obr. 10) (KANEDA 1991). To ukazuje na spřažení metabolismu aminokyselin a mastných kyselin (KROUMOVA et al. 1994).

Zvýšená syntéza anteizo- větvených mastných kyselin v nízké teplotě se odehrává prostřednictvím regulace substrátové specifity kondenzujícího enzymu FabH, který katalyzuje první krok v elongaci mastných kyselin (CHOI et al. 2000). Přesný mechanismus, který určuje specifitu enzymu FabH není znám, roli by mohla hrát sama teplota nebo dostupnost prekurzorů pro syntézu mastných kyselin (MANSILLA et al. 2004).

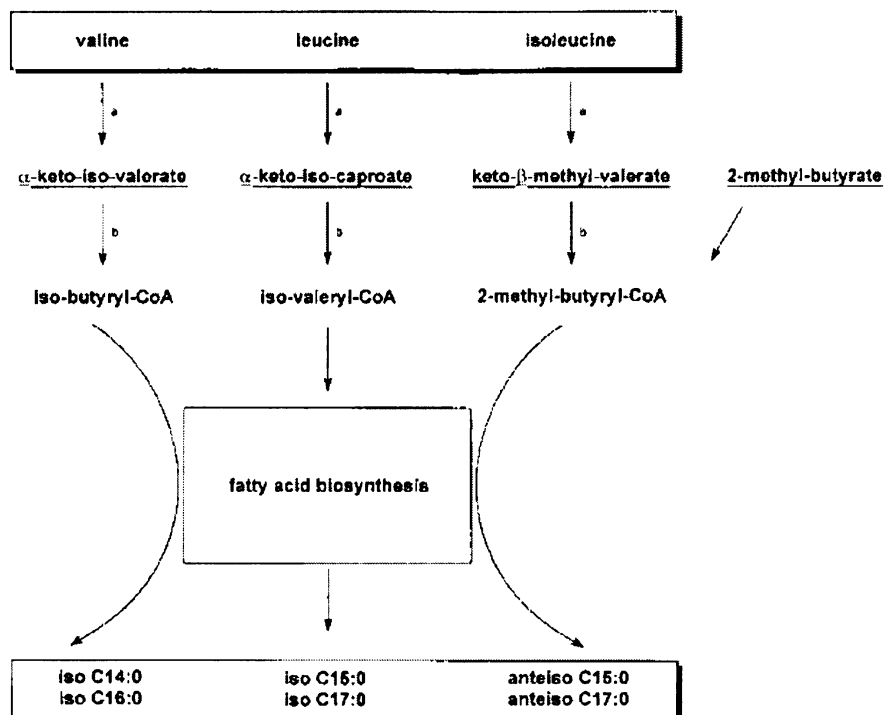


**Obr. 9** Syntéza mastných kyselin v bakteriích. Cyklus prodlužování mastné kyseliny je iniciován kondenzací acyl-CoA a malonyl-ACP. Tento krok je katalyzován kondenzujícím enzymem FabH (3a). Další krok je redukce  $\beta$ -ketoesteru  $\beta$ -ketoacylreduktázou (4).  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP je poté dehydratován  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP dehydrázou na trans-nenasycený acyl-ACP (5), který je redukován enoyl reduktázou, a vzniká acyl-ACP, který je o dva uhlíky delší než původní acyl-ACP. Další cyklus elongace je katalyzován kondenzujícím enzymem FabF (3b). Konečný produkt syntézy mastných kyselin je transacylován na glycerol fosfát za vzniku fosfatidové kyseliny, která je dále využita k syntéze fosfolipidů (7). Malonyl-CoA vzniká z acetyl-CoA (acetyl-CoA karboxyláza), pak je přenesen na ACP. R-koncová skupina (rovná či větvená mastná kyselina), ACP – „acyl carrier protein“ (převzato z SCHUJMAN a DE MENDOZA 2005).

Role anteizo- větvených mastných kyselin v adaptaci na nízkou kultivační teplotu byla ukázána na *Bacillus subtilis* JH642. Tento kmen má sníženou schopnost syntézy izoleucinu, která se projeví po chladovém šoku, je-li bakteriální kultura pěstována na minimálním médiu bez přidavku izoleucinu. V těchto podmínkách buňky nerostou a po 18 hodinách lyzují, do prostředí se uvolňuje izoleucin, který pak mohou

využít ostatní dosud přežívající bakterie (KLEIN et al. 1999). Je-li však před chladovým šokem přidán do minimálního média izoleucin nebo jeho deriváty (keto- $\beta$ -methyl-valerát a 2-methyl-butyryát, Obr. 10), přežívá kmen *JH642* bez potíží (KLEIN et al. 1999).

*Bacillus subtilis 168* naproti tomu nevyžadoval pro přežití chladového šoku při kultivaci na minimálním médiu přídavek izoleucinu. Složení mastných kyselin po náhlém snížení vnější teploty bylo u obou kmenů stejné, i když kmen *JH642* byl kultivován s přídavkem a kmen *168* bez přídavku izoleucinu. V obou případech byl zvýšen obsah anteizo- větvených na úkor izo- větvených mastných kyselin (KLEIN et al. 1999). Anteizo- větvené mastné kyseliny jsou důležité v dlouhodobé adaptaci na nízkou teplotu a jejich syntéza vyžaduje přítomnost dostatečného množství izoleucinu jako prekurzoru.



**Obr. 10** Biosyntéza větvených mastných kyselin. Prekurzory pro vznik větvených mastných kyselin jsou větvené aminokyseliny valin, leucin a izoleucin (převzato z KLEIN et al. 1999).

### 2.2.2. Krátkodobá adaptace membrány *Bacillus subtilis*

Krátkodobá adaptace *Bacillus subtilis* na náhlý pokles kultivační teploty spočívá v desaturaci mastných kyselin. Změna poměru nasycených a nenasyčených mastných kyselin je nejčastěji využívaný mechanismus k ovlivnění membránové fluidity (DENICH et al. 2003). U bakterií byl tento způsob adaptace na nízkou teplotu kromě rodu *Bacillus* identifikován u sinic a pseudomonád (MANSILLA a DE MENDOZA 2005; CRONAN 2006; ZHU et al. 2006). Desaturáza mastných kyselin vyžadující kyslík byla také objevena u eukaryot (SPERLING et al. 2003).

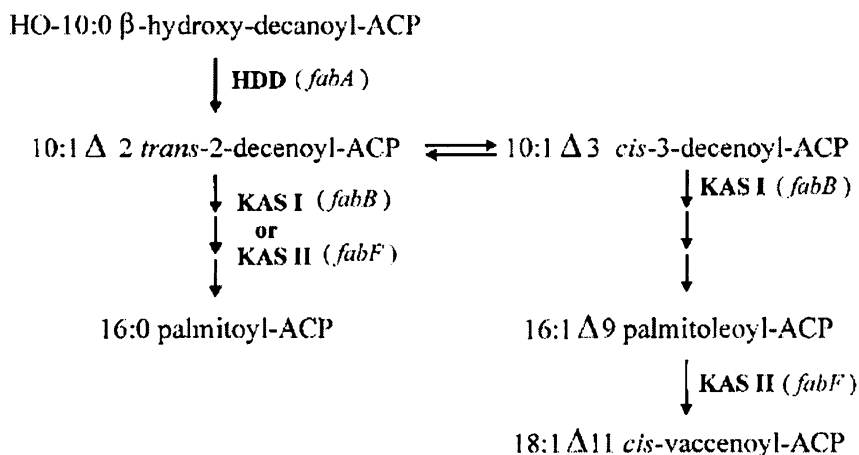
Zavedení dvojné vazby v konformaci cis (Obr. 11) do řetězce mastné kyseliny připojené na membránový fosfolipid vyvolá ohyb, díky kterému řetězec mastné kyseliny zaujímá více prostoru, který mu následně umožní větší pohyblivost (GRUNER et al. 1985). Zvýšená mobilita řetězců naruší jejich vzájemné van der Waalsovy interakce, což vede k destabilizaci membrány a k poklesu teploty fázového přechodu (HAZEL a WILLIAMS 1990). Dvojná vazba v pozici cis má větší efekt na uspořádanost membrány než dvojná vazba v pozici trans (GUSCHINA a HARWOOD 2006).



**Obr. 11** Nenasycená mastná kyselina s dvojnou vazbou v pozici cis.  
(převzato z DENICH et al. 2003).

Desaturace mastných kyselin může probíhat za anaerobních i aerobních podmínek (RUSSELL 1990). Vznik nenasyčených mastných kyselin bez přístupu kyslíku byl pozorován u anaerobních a fakultativně aerobních bakterií. Dobře byl tento proces prostudován na modelovém organismu *Escherichia coli* (Obr. 12). Nenasycené mastné kyseliny vznikají pouze v závislosti na *de novo* syntéze mastných kyselin, buňky musí růst a dělit se (DENICH et al. 2003). U *Escherichia coli* je dvojná vazba zavedena

do desetiuhlíkatého intermediátu biosyntézy mastných kyselin, který je dlouhý 10 uhlíků (MANSILLA et al. 2004).



**Obr. 12** Biosyntéza nenasycených mastných kyselin v *Escherichia coli*. Enzym  $\beta$ -hydroxydekanoyl-ACP dehydráza (HDD) katalyzuje klíčový krok v syntéze nenasycených mastných kyselin, zatímco  $\beta$ -ketoacyl-ACP syntáza I (KAS I) je vyžadována v elongaci nenasycených acyl-ACP intermediátů. Enzym  $\beta$ -ketoacyl-ACP syntáza II (KAS II) se účastní syntézy nasycených mastných kyselin a také prodlužuje 16:1  $\Delta^9$  palmitoleoyl-ACP. Enzym KAS II je regulován v závislosti na teplotě: v nižší teplotě vykazuje vyšší aktivitu (převzato z AGUILAR et al. 1998).

Aerobní desaturace mastných kyselin vyžaduje membránově vázané enzymy (desaturázy). U organismů, které provádí aerobní desaturaci, jsou syntetizovány pouze nasycené mastné kyseliny. Zavedení dvojně vazby je postsyntetická modifikace (RUSSELL 1997). Desaturáza odnímá vodíkové atomy již existující mastné kyselině a přenáší je na molekulu kyslíku, tato reakce vyžaduje funkční elektrontransportní řetězec (Obr. 13) (DENICH et al. 2003).

Desaturace mastných kyselin je regulována membránovou fluiditou. Regulace se odehrává na úrovni aktivity desaturázového enzymu, kdy fluidita membrány ovlivňuje konformaci enzymu a tím i jeho aktivitu, nebo na úrovni transkripce, která je stimulována změnami vnějšího prostředí (RUSSELL 1997).





### 2.2.2.1. Role desaturázy Des *Bacillus subtilis* po chladovém šoku

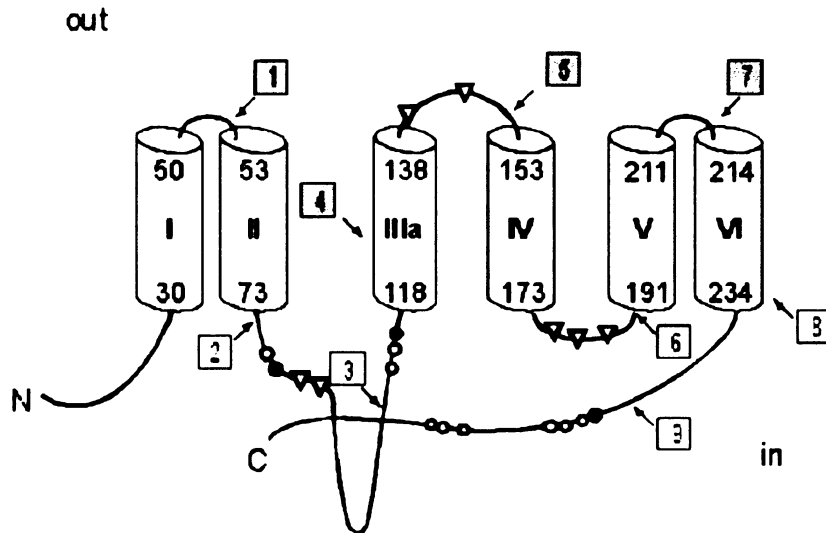
Pro zjištění role desaturázy Des po chladovém šoku byl připraven mutant *Bacillus subtilis* JH642, který měl deletován gen *des*, proto po chladovém šoku nesyntetizoval nenasycené mastné kyseliny. Tento mutant rostl na komplexním médiu po chladovém šoku stejně jako divoký kmen, ale po přechodu rostoucí kultury do stacionární fáze nebyl schopen sporulovat (AGUILAR et al. 1998). Při kultivaci na minimálním médiu bez přídavku izoleucinu bylo po chladovém šoku pozorováno výrazné snížení optické denzity, mutant po chladovém šoku nebyl schopen růst. Nenasycené mastné kyseliny tedy mohou zastoupit větvené mastné kyseliny v adaptaci membrány na náhlé snížení teploty (WEBER et al. 2001a). Nenasycené mastné kyseliny byly detekovány také v optimální teplotě kultivace, když byl *Bacillus subtilis* JH642 kultivován na minimálním médiu bez izoleucinu (nevznikaly větvené mastné kyseliny). Regulace desaturázy Des je tedy závislá spíše na membránové fluiditě než na vnější teplotě (WEBER et al. 2001a).

### 2.2.2.2. Topologie desaturázy Des

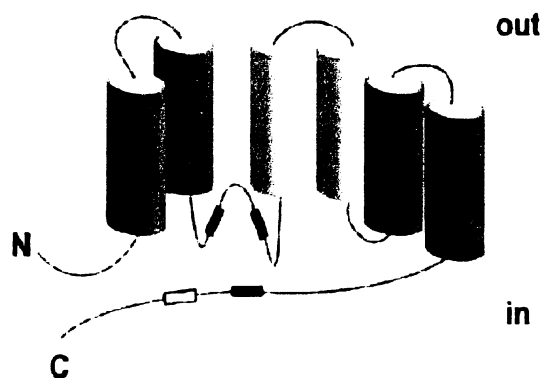
Přesná 3D struktura desaturázy Des není dosud známa, je to dáno obecně obtížnou purifikací a krystalizací membránově vázaných proteinů (WERTEN et al. 2002). Dobrou představu o topologii Des poskytla kombinace různých fúzí s reportérovým genem *phoA* a místně specifická mutagenese. Různě dlouhé fragmenty Des byly spojeny svým N-koncem s alkalickou fosfatázou ( $\Delta 5$ -Des-PhoA), která je aktivní pouze v periplazmovém prostoru a jejíž aktivita byla testována v *Escherichia coli* (DIAZ et al. 2002). Na základě těchto výsledků byl navržen model topologie Des (Obr. 14).

Desaturáza Des je tvořena šesti transmembránovými doménami a jednou doménou asociovanou s membránou, která pravděpodobně udržuje katalytické místo v blízkosti membrány. Des má oproti jiným desaturázám dvě transmembránové domény navíc (Obr. 15), tyto domény hrají asi roli desaturaci mastných kyselin, které jsou součástí membránových fosfolipidů (DIAZ et al. 2002). Des má tři konsenzus motivy, které obsahují histidinové zbytky a které jsou esenciální pro fungování Des (SHANKLIN et al. 1994), hrají roli ve vazbě železa (AGUILAR et al. 1998). Čtvrtý

objevený konsenzus motiv (AGUILAR et al. 1998) není součástí aktivního místa, ale je důležitý pro správné složení proteinu Des (DIAZ et al. 2002).



**Obr. 14** Topologický model desaturázy Des z *Bacillus subtilis*. N a C konec proteinu Des míří do cytozolu. Bílý váleček označuje membránou pronikající segment, který nebyl identifikován na základě predikce hydrofobních transmembránových úseků. Šedé čtverečky označují vysokou aktivitu enzymu PhoA a bílé čtverečky jeho nízkou aktivitu. Černá kolečka znamenají substituce histidinů, které znamenaly ztrátu aktivity, trojúhelníčky jsou lyzinové zbytky (převzato z DIAZ et al. 2002).



**Obr. 15** Model topologie desaturázy Des z *Bacillus subtilis*. Světle jsou vyznačeny transmembránové domény, které jsou důležité při desaturaci mastných kyselin, které jsou součástí membránových fosfolipidů. Červeně jsou znázorněny konzervované histidinové domény, bíle pak čtvrtá neesenční histidinová doména (převzato z MANSILLA a DE MENDOZA 2005).

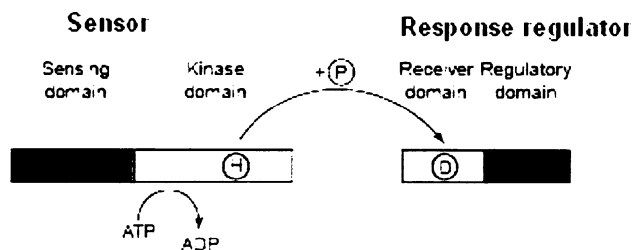
### 2.2.2.3. Regulace desaturázy Des

Po náhlém přenesení rostoucí kultury z optimální teploty kultivace (37°C) do nízké teploty (20°C) dochází k expresi genu *des* a v buňce je syntetizována vysoká hladina *des* mRNA. Tato mRNA se však nenachází v buňkách, které byly kultivovány ve 37°C (AGUILAR et al. 1999). Hlavní mechanismus regulace buněčné hladiny *des* mRNA tedy spočívá v teplotně zprostředkované kontrole transkripce (AGUILAR et al. 1999) a ne ve stabilizaci přítomné mRNA, jak je tomu u jiných chladově indukovaných proteinů, např. CspA u *Escherichia coli* (HANKINS et al. 2007).

U bakterií hraje klíčovou roli v přijímání a přenosu signálu dvoukomponentový systém - dráha signální transdukce, která spojuje vnější podnět se specifickou adaptivní odpovědí (WEST a STOCK 2001). V genomu *Bacillus subtilis* bylo identifikováno 34 histidinkináz, které obsahují ATP vazebné místo s konzervovaným histidinem, a 36 regulátorů, které mají konzervovanou aspartátovou doménu (PARKINSON a KOFOID 1992; FABRET et al. 1999). Exprese genu *des* je regulována dvoukomponentovým systémem DesK/DesR (AGUILAR et al. 2001). Operon *desKR* je v genomu *Bacillus subtilis* lokalizován v bezprostřední blízkosti genu pro desaturázu (*des*) (KUNST et al. 1997). Cílenou mutagenézí bylo zjištěno, že tento operon je nepostradatelný pro chladově indukovanou expresi genu *des* (AGUILAR et al. 2001).

#### 2.2.2.3.1. Dvoukomponentové systémy u bakterií

Dvoukomponentový systém se skládá ze dvou hlavních částí, senzoru a regulátoru (Obr. 16) (HOCH 2000).



**Obr. 16** Základní schéma přenosu fosfátu: H značí histidin, D aspartát, P fosfát (převzato z BIJLSMA a GROISMAN 2003).

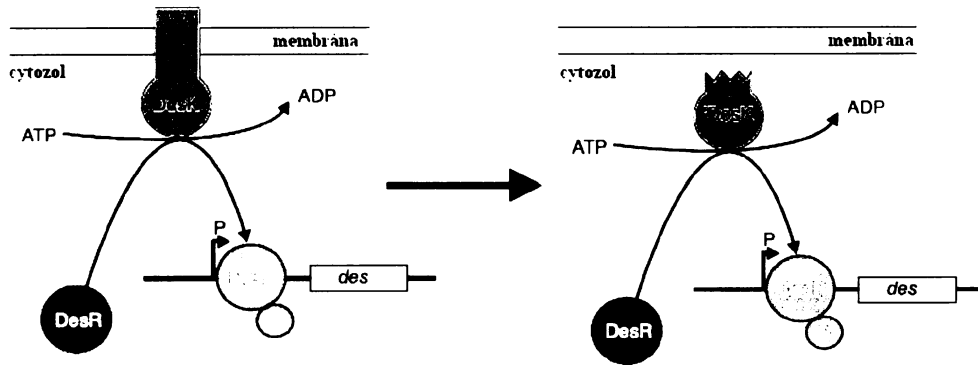
Senzor představuje histidinkináza, která je umístěna v membráně, nebo je alespoň s membránou asociována (DUTTA et al. 1999; KHORCHID a IKURA 2006). Tvoří ji detekční doména a kinázová doména. Detekční doména zprostředkuje kontakt histidinkinázy s vnějším prostředím, odpovídá na signál, který přichází z okolí bakterie. Po rozpoznání spouštěcího signálu změní svou konformaci, tím aktivuje do cytoplazmy orientovanou kinázovou doménu. Ta se na úkor jedné makroergní vazby z ATP autofosforyluje na histidinovém zbytku za vytvoření energeticky bohaté fosforylované skupiny. Ta je reakcí katalyzovanou cytoplazmatickým regulátorem přenesena na aspartátový zbytek, který je součástí přijímací domény regulátoru. Vazba fosfátu na přijímací doménu zapříčiní konformační změnu regulátoru. Se změnou konformace se mění i aktivita regulační domény regulátoru (BIJLSMA a GROISMAN 2003). Regulátor vystupuje většinou jako transkripční aktivátor či represor a právě konformační změna ovlivňuje schopnost regulátoru se vázat na DNA a ovlivňovat transkripci (HOCH a VARUGHESE 2001).

### 2.2.2.3.2. Dvoukomponentový systém DesK/DesR

#### Histidinkináza DesK

Histidinkináza DesK je membránově vázaný protein, který je dlouhý 370 aminokyselin. N-koncovou část proteinu (1. až 151. aminokyselinový zbytek) tvoří čtyři transmembránové helixy. Dlouhá C-koncová část (152. až 370. aminokyselinový zbytek) je orientována do cytoplazmy (MANSILLA et al. 2003).

Na C-konci proteinu DesK se nachází konzervovaný histidin v pozici 188, který je po přijetí signálu autofosforylován v přítomnosti  $Mg^{2+}$ -ATP (CYBULSKI et al. 2002). C-koncový fragment proteinu DesK bez transmembránové domény (DesKC) má *in vitro* kinázovou i fosfatázovou aktivitu (ALBANESI et al. 2004). DesKC však *in vivo* nefunguje jako fosfatáza, zkrácený protein je pravděpodobně uzamčen ve stavu, který upřednostňuje kinázovou aktivitu (Obr. 17). Desaturáza je proto konstitutivně exprimována bez ohledu na teplotní podmínky či přidavek fluidizujících nenasyčených mastných kyselin (ALBANESI et al. 2004), které slouží jako signální molekuly negativně regulující transkripci genu *des* (AGUILAR et al. 2001).



**Obr. 17** Model fungování zkráceného proteinu DesK. Protein DesK bez své transmembránové domény (DesKC) není schopen přijímat signály přicházející z vnějšího prostředí a *in vivo* u něj dominuje kinázová aktivita (upraveno podle HUNGER et al. 2004).

Roli transmembránové domény proteinu DesK v percepci změny vnější teploty potvrzují také experimenty, ve kterých byl DesKC exprimován *in trans* pod xylózou aktivovaným promotorem a které také ukázaly, že gen *des* je konstitutivně transkribován ve všech sledovaných teplotních podmínkách (HUNGER et al. 2004). Kmen *Bacillus subtilis*, který konstitutivně exprimoval DesKC, přežíval lépe po chladovém šoku při kultivaci na minimálním médiu bez izoleucinu než divoký kmen *JH642* (HUNGER et al. 2004).

Ve skutečnosti senzor DesK nevnímá teplotu, ale fluiditu membrány (CYBULSKI et al. 2002; MANSILLA et al. 2005). U *Bacillus subtilis* *JH642* lze množství větvených mastných kyselin regulovat exogenně dodaným izoleucinem. Nedostatek izoleucinu způsobí snížení obsahu fluidizujících větvených mastných kyselin v bakteriální membráně a následně pak transkripci genu *des* i za izotermálních podmínek (CYBULSKI et al. 2002). Senzor DesK reaguje na snížení membránové fluidity vyvolané jak poklesem vnější teploty, tak i změnou v zastoupení větvených mastných kyselin (CYBULSKI et al. 2002).

Transmembránová doména senzoru DesK je důležitá pro vnímání změn membránové fluidity a regulaci přepínání mezi kinázovou a fosfatázovou aktivitou cytoplazmatické domény (ALBANESI et al. 2004). Jak senzor DesK registruje změny fluidity zůstává zatím neobjasněno. Předpokládá se, že by se zde mohly uplatňovat konformační změny transmembránové domény v závislosti na fluiditě membrány, které by vedly k přepínání mezi kinázovou a fosfatázovou aktivitou (MANSILLA a DE MENDOZA 2005).

**Regulátor DesR**

Regulátor DesR patří do NarL rodiny regulátorů (FABRET et al. 1999). Na N-konci proteinu DesR se nachází regulační doména, která bývá také označována jako přijímací doména (Obr. 16) (WEST a STOCK 2001). N-koncová doména nese konzervovaný aspartát v pozici 54, který je fosforylován histidinkinázou DesK a který je nezbytný pro aktivitu DesR (ALBANESI et al. 2004). C-konec proteinu je zodpovědný za vazbu regulátoru na DNA. NarL rodina regulátorů má v DNA vazebné doméně helix-turn-helix motiv, který je typický pro transkripční faktory (FABRET et al. 1999).

Nefosforylovaný regulátor DesR je v neaktivní formě. V roztoku DesR dimerizuje prostřednictvím svých C-konců, N-koncové domény jsou pak vůči sobě natočeny tak, že se vlivem sterických zábran nemohou vázat na DNA. Po fosforylaci regulátoru DesR histidinkinázou DesK dochází ke konformačním změnám, které uvolní DNA vazebné oblasti regulátoru (CYBULSKI et al. 2004).

Fosforylovaný protein DesR (DesR-P) se váže do DNA do oblasti promotoru genu *des*, do pozice -28 až -77 vzhledem k počátku transkripce. V této symetrické oblasti se nachází dvě invertované repetice (5'-TCAT-3') oddělené 9 nukleotidy, které jsou nepostradatelné pro správnou funkci promotoru (AGUILAR et al. 2001). V oblasti promotoru genu *des* jsou dvě sekvenčně nepodobná vazebná místa pro DesR-P. Oblast A je primární místo vazby dimeru DesR-P, které je obsazeno i v nízkých koncentracích DesR-P. Samotná oblast B nemůže regulátor vázat. Teprve po obsazení oblasti A dimerem DesR-P je kooperativně navázán další dimer DesR-P do oblasti B a dochází k posunu rovnováhy k tetramerní formě DesR-P, která je aktivní a spouští transkripci genu *des* tím, že stabilizuje vazbu RNA-polymerázy na promotoru (NECHAEV et al. 2000; MANSILLA a DE MENDOZA 2005).

Za vypnutí transkripce je zodpovědná fosfatázová aktivita, která defosforyluje regulátor, v buňce je pak více neaktivní formy regulátoru. U většiny regulátorů nesou tuto aktivitu samy regulátory (ZAPF et al. 1998). U dvoukomponentového systému DesK/DesR je však hladina fosforylovaného proteinu DesR regulována histidinkinázou DesK, která nese kinázovou i fosfatázovou aktivitu (AGUILAR et al. 2001; ALBANESI et al. 2004).

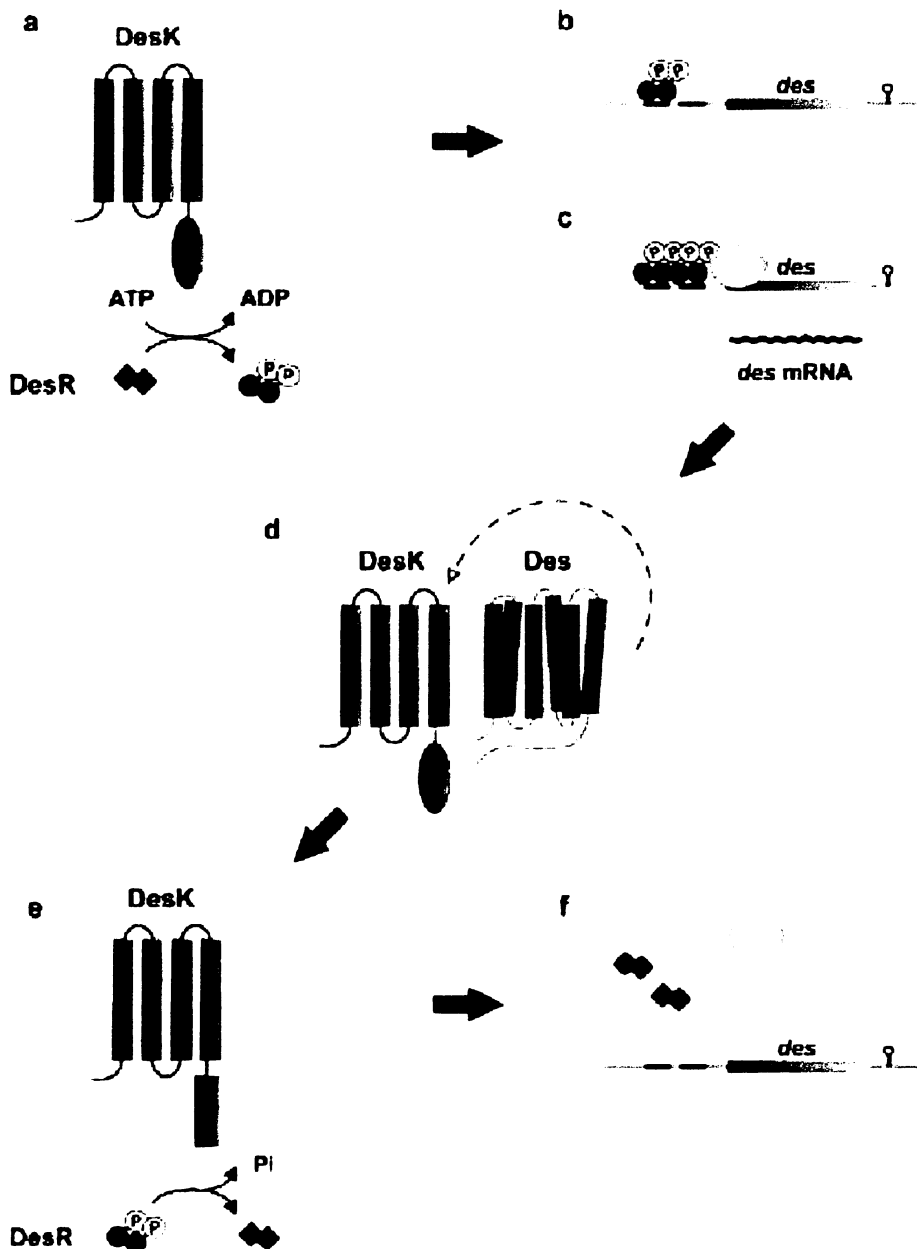
### Model regulace exprese desaturázy Des dvoukomponentovým systémem DesK/DesR

Dvoukomponentový systém DesK/DesR nehraje roli v globální regulaci odpovědi na chladový šok. Bylo prokázáno, že DesK/DesR se podílí na pouze regulaci transkripce desaturázy Des (BECKERING et al. 2002).

Histidinkináza DesK a regulátor DesR dvoukomponentového systému DesK/DesR jsou v bakteriální buňce exprimovány konstitutivně, jejich transkripce na rozdíl od transkripce desaturázy není ovlivněná přidávkem izoleucinu při kultivaci na minimálním médiu v optimální teplotě (CYBULSKI et al. 2002). Regulační signální dráha DesK/DesR je aktivována chladovým šokem nebo nízkým podílem nízko tajících větvených mastných kyselin. Senzor membránové fluidity DesK zaujímá různé signální stavy v závislosti na změnách fluidity membrány. Po chladovém šoku, kdy je membrána v uspořádaném stavu (rigidní), převládá kinázová aktivita histidinkinázy DesK. DesK je autofosforylován na konzervovaném histidinu a následně je fosfát přenesen na aspartát regulátoru DesR. Fosforylovaný DesR se váže do oblasti promotoru genu *des*, což umožní tetramerizaci DesR-P. Tetramer DesR-P specificky interaguje s RNA-polymerázou, stabilizuje její vazbu na promotor a transkripce genu *des* je spuštěna. Produkt genu *des*,  $\Delta 5$ -Des, zavádí cis dvojné vazby do řetězců mastných kyselin, které jsou připojeny k membránovým fosfolipidům. Tyto nově syntetizované nenasycené mastné kyseliny zvýší fluiditu membrány. To ovlivní senzor DesK, u kterého převládá fosfatázová aktivita, DesR-P je defosforylován a není schopen vázat se na promotor genu *des*, exprese desaturázy je vypnuta. Transkripce genu *des* je tak regulována přímo hladinou fosforylovaného regulátoru DesR v buňce (Obr. 18) (MANSILLA a DE MENDOZA 2005).

Znalost regulace transkripce desaturázy *Bacillus subtilis* našla již své praktické uplatnění. Promotor genu *des* byl využit pro produkci rekombinantních proteinů v nízké teplotě. Exprese heterologních proteinů v nízké teplotě má tu výhodu, že se netvoří agregáty proteinů, které mohou snižovat životaschopnost produkčního mikroorganismu. S použitím chladově indukovaného promotoru také odpadá nutnost použití drahých induktorů jako je IPTG. Je-li gen kódující požadovaný protein připojený k promotoru genu *des*, začne jeho exprese 30 minut po chladovém šoku a pokračuje asi 5 hodin (LE a SCHUMANN 2007).





**Obr. 18** Model signální dráhy vedoucí k optimalizaci membránové fluidity v *Bacillus subtilis*. DesK zaujímá různé signalizační stavy jako dopověď na změnu fluidity membrány. Kinázová aktivita DesK dominuje při zvýšení uspořádanosti membrány (např. po chladovém šoku). DesK fosforyluje DesR (a), který se tak může vázat ve formě dimeru na promotor genu *des* (b). Kooperativní vazba DesR-P umožní interakci s RNA-polymerázou a je aktivována transkripce genu *des* (c). Desaturáza Des zavádí dvojnou vazbu do mastných kyselin připojených k membránovým fosfolipidům (d). Nenasycené mastné kyseliny sníží fluiditu membrány a u DesK převáží fosfatázová aktivita (e). DesR je defosforylován a transkripce genu *des* ustává (f) (převzato z MANSILLA a DE MENDOZA 2005).

## 2.3. Membránově aktivní látky

### 2.3.1. Fluidita membrány

Pojem membránová fluidita se v současnosti používá pro popis celkové uspořádanosti a míry pohyblivosti membránových komponent. K celkové membránové fluiditě přispívá volný pohyb lipidů, laterální a rotační difúze molekul, zastoupení mastných kyselin, fázový přechod lipidů, hydratace lipidů a interakce mezi jednotlivými membránovými doménami (rafty) (KIM et al. 1993; HAYASHI a MAEDA 2006). Každý z těchto parametrů, který má vztah k pohyblivosti či uspořádanosti membránových komponent, lze zachytit pomocí jiné měřicí techniky, avšak získané výsledky jsou často interpretovány jako změny celkové fluidity membrány. Zvýšení fluidity (fluidizace) je chápáno jako „ztekucení“ membrány, tedy snížení uspořádanosti a zvýšení zrychlení pohybu membránových komponent. Snížení fluidity (rigidizace) znamená naopak zvýšení uspořádanosti a zpomalení pohybu membránových komponent.

### 2.3.2. Metody pro měření membránové fluidity

V dnešní době existuje celá řada metodických přístupů a technik, které umožňují sledování vlastností biologických membrán. Metody používané pro charakterizaci různých parametrů membrány lze rozdělit na metody přímé, které zachycují určitý fyzikální parametr přímo, nezprostředkovaně, a metody nepřímé, které využívají fluorescenční sondy, jejichž chování odráží fyzikální stav membrány. K přímým metodám patří např. diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a diferenciální teplotní analýza (DTA), které umožňují stanovit teplotu fázového přechodu, respektive hodnotu laterálního tlaku na lipidových monovrstvách. K nepřímým metodám se řadí např. spektroskopické techniky jako je nukleární magnetická rezonance (NMR) a elektronová spinová rezonance (ESR), metody fluorescenční spektroskopie (např. měření ustálené či časově rozlišené anizotropie fluorescence) či metoda FRAP (z ang. „fluorescence recovery after photobleaching“), která umožňuje sledovat laterální difúzi v membránách (DENICH et al. 2003; MARGUET et al. 2006).

### 2.3.3. Membránově aktivní látky a jejich působení na membránu

Po přidavku některých chemických látek v závislosti na jejich koncentraci a chemické struktuře dochází u bakterií ke zpomalení či zastavení růstu nebo odumírání bakteriální kultury. Membrána je první buněčná komponenta, která přichází do styku s toxickým působením chemické látky, která může nespecificky narušit strukturu a tím i funkci bakteriální membrány (DIEFENBACH et al. 1992).

Každá třída chemikálií interaguje s membránou jinak, liší se ve způsobu a míře narušení struktury a funkce membrány (WEBER a DE BONT 1996). Toxicita membránově aktivní látky je často spojena s její schopností zabudovávat se do fosfolipidové dvojvrstvy (SIKKEMA et al. 1995). Hydrofobní látky snadno pronikají do membrány a akumulují se především v hydrofobním jádře membrány, mezi monovrstvami, kde jsou asociovány a řetězci mastných kyselin (SMEJTEK et al. 1989). Molekuly polárnějších membránově aktivních látek se zabudovávají do oblasti polárních hlaviček fosfolipidů (HEIPIEPER et al. 1994). Hydrofobní i méně polární látky, přestože působí v jiných částech membrány, mohou narušit uspořádanost membrány. Jejich účinné koncentrace (koncentrace, které vyvolají stejnou změnu uspořádanosti membrány) se však liší v rozmezí i několika řádů. Hydrofobní látky se ochotně zabudovávají do membrány, proto jejich koncentrace v prostředí nemusí být příliš vysoká, aby bylo možno pozorovat ovlivnění membránové fluidity. Naopak polární látky se v prostředí musí vyskytovat ve vysokých koncentracích, aby se alespoň jejich část inkorporovala do oblasti membrány a byla pozorována změna fluidity (DONATO et al. 1997).

Hydrofobicitu (lipofilicitu) membránově aktivní látky lze kvantifikovat pomocí tzv. partičního koeficientu (P). Partiční koeficient je definován jako poměr koncentrací zkoumané látky ve vodné a organické fázi směsi nemísitelných rozpouštědel v rovnováze. Prvním rozpouštědlem je voda a druhým hydrofobním rozpouštědlem je ve většině případů oktanol. Partiční koeficient tedy vyjadřuje míru hydrofobicity dané látky. Často bývá uváděn v logaritmické podobě (logP):

$$\log P = \log([\text{rozpuštěná látka}]_{\text{oktanol}} / [\text{rozpuštěná látka}]_{\text{voda}}),$$

kde hranaté závorky značí koncentraci rozpuštěné látky ve vodné či oktanolové fázi. Hodnoty logP mezi 1 až 5 jsou typické pro aromatické alkoholy, lipofilní a aromatické látky, hodnoty logP menší než 1 vypovídají o hydrofilním charakteru látky (MCKARNS et al. 1997).

Zabudovávání membránově aktivní látky není určeno pouze hodnotou partičního koeficientu, ale závisí také na fyzikálních parametrech prostředí (např. na teplotě), molekulové struktuře a velikosti dané látky a v neposlední řadě na vlastnostech membrány (LEO et al. 1976). Složení membrány může výrazně ovlivnit inkorporaci látky do membrány (ANTUNES-MADEIRA a MADEIRA 1989). Membránově aktivní látka nemusí být v membráně rozložena homogenně: v membráně se často tvoří koncentrační gradienty díky preferenčnímu zabudování membránově aktivní látky do určitého typu membránových domén nebo díky gradientu polarity mezi polární oblastí membrány a jejím hydrofobním jádrem (ANTUNES-MADEIRA a MADEIRA 1989; SIKKEMA et al. 1995). V přirozených biologických membránách se interakci s membránově aktivní látkou mohou účastnit i membránové proteiny (ANTUNES-MADEIRA a MADEIRA 1989; SIKKEMA et al. 1995).

### **2.3.4. Adaptace membrány na přídavek membránově aktivní látky**

Bakteriální buňka je schopná registrovat změny fluidity vyvolané změnami vnější teploty a reagovat na tyto změny fluidity změnou složení membrány (zastoupení jednotlivých typů mastných kyselin) a tím udržet membránu optimálně fluidní pro zachování všech jejích funkcí (kapitola 2.1.2.3).

Adaptace membrány bakteriální buňky na přídavek membránově aktivní látky spočívá stejně jako v případě reakce na změnu vnější teploty ve změně složení membrány. Změna zastoupení mastných kyselin v závislosti na přídavcích různých alkoholů byla pozorována např. u *Escherichia coli* (INGRAM 1976), *Oenococcus oeni* (CHU-KY et al. 2005), *Bacillus subtilis* (KONOPASEK et al. 2000).

Přídavek membránově aktivních látek tedy může napodobovat změny vnější teploty. Látky, které membránu rigidizují, vyvolávají stejnou odpověď jako náhlý pokles kultivační teploty. Na působení látky s fluidizačním účinkem odpovídá bakteriální buňka stejným způsobem jako na zvýšení vnější teploty (DONATO et al. 2000; DENICH et al. 2003). Tato adaptivní odpověď umožňuje bakteriální buňce nejen přežít toxické působení membránově aktivní látky, ale také získat toleranci ke zvyšujícím se koncentracím dané látky (KEWELOH et al. 1991).

Je zajímavé, že účinky membránově aktivních látek se mohou vzájemně kompenzovat. Odpověď buňky na ztuhnutí membrány vyvolané látkou s rigidizačním

účinkem lze potlačit přidavkem látky, která naopak membránu ztekucuje (ZHANG et al. 2000). Bylo prokázáno, že se mohou mezi sebou kombinovat účinky nejen membránově aktivních látek s opačným vlivem na fluiditu membrány, ale také účinky teplotního šoku a membránově aktivní látky. U *Oenococcus oeni* bylo pozorováno lepší přežívání buněk po kombinaci chladového a ethanolového stresu než v případě samotného ethanolového stresu (CHU-KY et al. 2005). Toto pozorování může být vysvětleno tak, že po chladovém šoku dohází ke ztuhnutí membrány, které je kompenzováno fluidizačním účinkem ethanolu.

### **2.3.5. Membránově aktivní látky s fluidizačním účinkem**

Látky s fluidizačním účinkem mohou působit jak v hydrofobním jádře tak u povrchu membrány. Nárůst koncentrace hydrofobní látky v membráně způsobí rozrušení vodíkových můstků a dipól-dipólových interakcí mezi řetězci mastných kyselin fosfolipidů a tím sníží uspořádanost membrány, respektive zvýší její fluiditu (ANTUNES-MADEIRA et al. 1995). Molekuly polárnější membránově aktivních látek se zabudovávají do oblasti polárních hlaviček fosfolipidů, v důsledku působení těchto látek dochází ke zvětšení objemu membrány a tím k rozvolnění interakcí mezi jednotlivými komponentami membrány (HEIPIEPER et al. 1994).

Běžně používanými fluidizačními činidly jsou alkoholy, které přímo interagují s membránou a zvyšují její fluiditu (INGRAM 1976). V případě alkoholů také platí korelace mezi jejich hydrofobicitou a toxicitou (KABELITZ et al. 2003) – toxicita roste s rostoucím partičním koeficientem (logP). Hodnoty logP pro vybrané alkoholy, které byly použity v této práci jsou v tabulce Tab. 1. Bylo zjištěno, že prodloužení alifatického alkoholu o jednu CH<sub>2</sub> skupinu sníží koncentraci potřebnou k dosažení stejného efektu na membránu zhruba třikrát (LY a LONGO 2004).

Alkoholy ovlivňují membránu prostřednictvím změn některých jejích fyzikálních vlastností. Bylo prokázáno, že alkoholy zvětšují prostor připadající na jednu molekulu fosfolipidu (LY a LONGO 2004), čímž zvýší laterální pohyblivost molekul v membráně (CHEN et al. 1996). Dále pak mají alkoholy vliv na teplotu fázového přechodu (T<sub>m</sub>), kterou snižují (ROWE 1985), a na permeabilitu membrány, která je po působení alkoholů vyšší (WESTH et al. 2001).

**Tab. 1** Partiční koeficienty (logP) vybraných alkoholů.

Alkohol	logP
ethanol (C <sub>2</sub> )	-0,31
propanol (C <sub>3</sub> )	0,25
butanol (C <sub>4</sub> )	0,88
benzylalkohol (C <sub>7</sub> )	1,10
oktanol (C <sub>8</sub> )	2,97

Účinkem alkoholů na membránu se do dnešního dne zabývalo mnoho prací. Bylo sledováno zabudování alkoholu do fosfolipidové dvojvrstvy, ovlivnění fyzikálních vlastností membrány a také adaptivní odpověď buňky na přidavek alkoholu do kultivačního média. Dosažené výsledky se však v mnoha případech neshodují, což je pravděpodobně dáno rozdílným přístupem jednotlivých autorů k řešení dané problematiky. Je nutné tedy vždy přihlížet k tomu, jaký mikroorganismus byl vybrán, jaký modelový systém byl využit (intaktní buňky, izolované bakteriální membrány či membrány umělé) a jakou metodou byl zkoumán efekt alkoholů.

#### 2.3.5.1. Zabudování alkoholů do fosfolipidové dvojvrstvy

Zabudování alkoholu do membrány souvisí s jeho partičním koeficientem a tedy s jeho délkou (REDDY et al. 1995). Delší alkoholy jsou rychleji adsorbovány na membránu a permeabilita membrány je pro tyto alkoholy větší (LY a LONGO 2004). Jak bylo uvedeno výše, existuje v membráně gradient polarity, polarita klesá směrem od povrchu do hydrofobního jádra membrány. Lokalizace alkoholu v membráně by proto mohla souviset s hydrofobicitou daného alkoholu. Čím by byl alkohol delší (větší logP), tím hlouběji by se zabudovával do membrány.

Práce ROWEHO a spolupracovníků (1987) naznačuje, že krátké i dlouhé alkoholy jsou prostřednictvím své OH skupiny kotveny k polárním hlavičkám fosfolipidů. Průnik alkoholu do hlubších vrstev membrány pak závisí na délce řetězce alkoholu (HO a STUBBS 1997). Zachycení delších alkoholů (C<sub>4</sub> až C<sub>9</sub>) pomocí jejich OH skupiny k polárním hlavičkám fosfolipidů pozoroval také SHIRLEY a spolupracovníci (1987).

Lokalizaci krátkých alkoholů ( $C_2$  až  $C_4$ ) do oblasti polárních hlaviček fosfolipidů potvrdila práce WEBERA a DE BONTA (1996). Efektivita zabudování krátkých alkoholů polární oblasti membrány je opět závislá na počtu uhlíků – snadněji se zabudují alkoholy s delším řetězcem (MITCHELL a LITMAN 2000). Zcela jiné umístění alkoholů v membráně pozorovali ZAVOICO a spolupracovníci (1985): alkoholy s malým počtem uhlíků ( $C_1$  až  $C_4$ ) byly v hydrofobním jádře membrány a delší alkoholy ( $C_5$  až  $C_{10}$ ) byly zakotveny k polárním hlavičkám fosfolipidů a působily tedy v polární oblasti. Toto pozorování bylo později zopakováno – butanol se nacházel v centru membrány a oktanol u povrchu membrány (WAN et al. 2002).

### 2.3.5.2. Účinek alkoholů na uspořádanost membrány

Působení krátkých alkoholů ( $C_1$  až  $C_4$ ) na membránu zvýší zastoupení nenasycených mastných kyselin v membráně, přídavek delších alkoholů ( $C_5$  až  $C_{10}$ ) naopak vyvolá zvýšenou syntézu nasycených mastných kyselin (INGRAM 1976; KABELITZ et al. 2003). Změna poměru nasycených a nenasycených mastných kyselin po přidavku různě dlouhých alkoholů je vysvětlována tak, že krátké alkoholy se interkalují mezi řetězce mastných kyselin a tím omezují jejich pohyb, způsobují tedy rigidizaci membrány. Naopak delší alkoholy jsou zakotveny v oblasti polárních hlaviček fosfolipidů, zvětšují tak prostor připadající na jednu molekulu fosfolipidu a membrána je více fluidní (SHIRLEY et al. 1987).

Sledování změn membránové fluidity po přidavku různých alkoholů pomocí membránové sondy DPH však ukázalo, že krátké i dlouhé alkoholy shodně zvyšují neuspořádanost membrány (HO a STUBBS 1997). Proč tedy bakteriální buňka jako odpověď na fluidizaci membrány vlivem působení krátkých alkoholů syntetizuje nenasycené mastné kyseliny? Možným vysvětlením je použití vyšších koncentrací krátkých alkoholů k testování jejich účinku. Krátké alkoholy se pak mohou vyskytovat ve vyšších koncentracích i v cytoplazmě, kde mohou ovlivňovat aktivitu enzymů. Zvýšení zastoupení nenasycených mastných kyselin v důsledku přidavku krátkých alkoholů, může být proto způsobeno inhibicí enzymu biosyntézy mastných kyselin (HDD), jak to bylo ukázáno v případě bakterií s anaerobní dráhou syntézy mastných kyselin *Escherichia coli* a *Pseudomonas putida* (MAGNUSON et al. 1993; KEWELOH a HEIPIEPER 1996).

Nelze však ani vyloučit možnost odlišného mechanismu interakce dlouhých a krátkých alkoholů. U bakterie *Acinetobacter calcoaceticus* byla pozorována stejná

adaptivní odpověď buňky (zvýšená syntéza nenasycených mastných kyselin) po působení krátkého alkoholu jako u *Escherichia coli* a *Pseudomonas putida*, přestože tato bakterie syntetizuje nenasycené mastné kyseliny aerobní cestou a má tedy zcela jiné enzymy (KABELITZ et al. 2003). Přestože tedy krátké i dlouhé alkoholy fluidizují membránu, liší se např. v ovlivnění obsahu molekul vody v membráně. Krátké alkoholy (C<sub>1</sub> až C<sub>3</sub>) zvyšují obsah vody v membráně, zatímco dlouhé alkoholy (C<sub>4</sub> až C<sub>8</sub>) obsah vody snižují (HO a STUBBS 1997). To je v souladu s pozorováním, že krátké alkoholy způsobují hydrataci (bobtnání) membrány v oblasti polárních hlaviček (WEBER a DE BONT 1996).

Je zřejmé, že interakce alkoholů s membránou není triviální. Kromě vlastností samotných alkoholů zde hraje roli také buněčná stěna, složení membrány a interakce alkoholů s membránovými proteiny. Při sledování vlivu alkoholu na živou buňku se uplatňuje role buněčné stěny, která může ztížit či úplně zabránit přístupu membránově aktivní látky k membráně (SIKKEMA et al. 1995).

Bylo prokázáno, že efekt alkoholů závisí na složení membrány (ALMEIDA et al. 1986). Alkohol není v přirozené membráně, pro kterou je typická laterální heterogenita, rozložen rovnoměrně vlivem preferenčního zabudování do oblastí membrány s určitým složením či fyzikálním stavem (do mikrodomén membrány). Bylo zjištěno, že alkoholy mohou dokonce indukovat vznik mikrodomén (SHEN et al. 1999). Důležitý je také poměr lipidů a proteinů v membráně, který ovlivňuje membránovou fluiditu. Změnou poměru lipidů a proteinů může bakteriální buňka reagovat na přítomnost alkoholu v membráně (DA SILVEIRA et al. 2003).

V membráně se nachází mnoho proteinů (ATPázy, transportní proteiny, oxidoreduktázy, signální proteiny), jejichž funkce může být alkoholem ovlivněna přímo či zprostředkovaně přes interakci s fosfolipidy. Alkohol může působit na protein přímo tím, že se naváže na jeho hydrofobní část (SIKKEMA et al. 1995). Recentní studie odhalila, že alkohol může indukovat změnu konformace proteinu (OTZEN et al. 2007). Častěji však alkoholy ovlivňují funkci membránových proteinů prostřednictvím změn mechanických vlastností membrány (MITCHELL a LITMAN 2000). Každý protein usazený v membráně je těsně obalen několika typy lipidů. Integrované lipidy mohou vyplňovat vnitřek membránového proteinu a bezprostředně s ním interagují, nacházejí se v prohlubních a žlábkách proteinu. Další vrstvou lipidů jsou anulární lipidy, které také těsně obepínají protein, ale zároveň si zachovávají dvojvrstevnou strukturu (LEE 2003). Tyto lipidy hrají roli při integraci proteinu do membrány, jeho sestavení, změnách



konformace a mají vliv také na funkci proteinů. Jsou nezbytné pro zachování bariérové funkce membrány např. při konformačních změnách proteinu. Neustále dochází k rychlé výměně mezi anulárními lipidy a lipidy, které je obklopují (PALSDOTTIR a HUNTE 2004). Anulární lipidy tedy mohou hrát důležitou roli v přenosu informací mezi lipidovou složkou membrány a signálním proteinem. Anulární lipidy mohou být také ovlivněny přidavkem membránově aktivní látky (LEE 2003).

Dostupné literární zdroje obsahují velké množství studií, které se zabývaly působením alkoholů na fluiditu membrány nejen bakteriálních buněk. V následujících odstavcích bude uvedeno jen několik příkladů využití alkoholů jako membránově aktivních látek. Byly vybrány alkoholy, které byly testovány v této diplomové práci.

### **Ethanol**

Kultura *Escherichia coli* po přidavku ethanolu přestává růst, obnovení růstu buněk musí předcházet změna složení membrány (INGRAM 1976). Ethanol v závislosti na své koncentraci (DA SILVEIRA et al. 2003) fluidizuje membránu bakterie *Oenococcus oeni*, která na zvýšenou fluiditu membrány odpovídá cis-trans izomerací svých mononasyčených mastných kyselin, které mají nižší bod tání (CHU-KY et al. 2005). U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se nachází tzv. HOG dráha, která je asociována s membránou a je aktivována po chladovém šoku. Ethanol aktivaci této dráhy v nízké teplotě inhibuje, protože díky svým fluidizačním účinkům udrží membránu optimálně fluidní i po snížení vnější teploty.

### **Propanol**

Účinky propanolu byly sledovány na lyzozomu, kde měřítkem fluidity byla permeabilita membrány pro protony. Propanol zvyšoval propustnost membrány pro protony, tedy fluidizoval membránu (WAN et al. 2002). Ve studii WANA (2002) bylo pozorováno působení propanolu spíše blíže hydrofobnímu jádru membrány.

### **Butanol**

Efekt butanolu byl testován na produkčním organismu *Clostridium acetobutylicum*. Byl objeven mutant, který lépe přežíval tepelný i butanolový šok. Bylo zjištěno, že tento mutant si udržoval stejnou fluiditu i za podmínek zvýšené teploty či působení butanolu díky zvýšené syntéze nasycených mastných kyselin (SHIRLEY et al. 1987).

### **Benzylalkohol**

Benzylalkohol je amfifilní molekula s cyklickou strukturou, která se snadno zabudovává do hydrofobního jádra membrány, preferenčně se váže do mikrodomén ve

fluidním stavu (SHIGAPOVA et al. 2005). V buňkách *Escherichia coli* prostřednictvím fluidizace membrány vyvolává odpověď buňky na tepelný šok i v optimální teplotě kultivace (SHIGAPOVA et al. 2005). Benzylalkohol také zvyšuje permeabilitu lyzozomu pro protony (ZHANG et al. 2000). Bylo ukázáno, že benzylalkohol fluidizuje také eukaryotní membrány. U oomycety *Phytophthora infestans*, u které se zoospory vyvíjejí pouze v teplotě pod 15°C, benzylalkohol inhiboval tvorbu těchto zoospor i v nízké teplotě (TANI a JUDELSON 2006). Benzylalkohol ovlivňoval membránu rostlinných buněk, aktivace chladově indukované MAP kinázové dráhy byla v nízké teplotě inhibována přidavkem benzylalkoholu (SANGWAN et al. 2001; SANGWAN et al. 2002).

### **Oktanol**

Oktanol zvyšoval permeabilitu lyzozomů pro protony, tedy fluidizoval lyzozomální membrány. Působení oktanolu bylo lokalizováno spíše u povrchu membrány (WAN et al. 2002). Bylo zjištěno, že oktanol prostřednictvím membránové fluidity ovlivňoval membránové proteiny eukaryotních buněk (BARHOUMI et al. 1995).

### **2.3.6. Membránově aktivní látky s rigidizujícím účinkem**

Membránově aktivní látky mohou na membránu působit oběma směry, tedy kromě výše uvedeného fluidizačního účinku mohou způsobovat rigidizaci membrány. Nejčastěji používaným rigidizačním činidlem je dimethylsulfoxid a cholesteryl-hemisukcinát. V této diplomové práci bylo kromě těchto nejznámějších rigidizačních činidel otestováno působení hliníkových iontů a kyseliny palmitové.

#### **Dimethylsulfoxid**

Dimethylsulfoxid (DMSO) je často využíván k ochraně enzymů a buněk v nízkých teplotách díky svým kryoprotektivním vlastnostem. Bylo zjištěno, že DMSO nejenom snižuje nepříznivý dopad nízkých teplot na buňku, ale má také celou řadu dalších účinků - může indukovat fúzi či diferenciaci buněk a zvyšovat permeabilitu membrány (SANDVIG et al. 1984; SUM a DE PABLO 2003; TANI a JUDELSON 2006).

Interakce DMSO s membránou a jeho lokalizace v membráně byla sledována na umělých membránách z DPPC. DMSO interaguje s povrchem membrány, vytlačuje molekuly vody a tím povrch membrány dehydratuje. DMSO pak může vytvářet síť

vodíkových můstků místo vody a stabilizovat tak membránu, což vede ke zvýšení teploty fázového přechodu (GORDELIY et al. 1998). Kromě působení na povrchu membrány mohou molekuly DMSO pronikat hlouběji do membrány, především do oblasti těsně pod polárními hlavičkami fosfolipidů, kde ovlivňují uspořádanost mastných kyselin. Jen malá část (asi 10%) molekul DMSO se dostane až na druhou stranu membrány (LEEKUMJORN a SUM 2006). DMSO jako alkoholy mění konformaci a aktivitu membránových proteinů pomocí ovlivnění stavu membrány (FOURCADE et al. 1980; GORVEL et al. 1984). Stejně jako alkoholy není DMSO rozložen v membráně rovnoměrně, několik prací potvrdilo, že se DMSO preferenčně zabudovává do určitých mikrodomén membrány (IP a COOPER 1980; MURATA a LOS 1997; ORVAR et al. 2000).

Bylo ukázáno, že DMSO snižuje fluiditu membrány bakterie *Escherichia coli*. Tato bakterie stejně jako po přidavku alkoholů odpovídá na narušení fluidity organickými rozpouštědly, ke kterým patří i DMSO, změnou složení membrány. Reakcí bakteriální buňky na rigidizaci membrány je adaptivní syntéza nenasyčených mastných kyselin (INGRAM 1976).

Efekt DMSO na rigidizaci membrány byl pozorován i u eukaryotních organismů. Chladově indukovaná dráha HOG („high osmolarity glycerol“) u *Saccharomyces cerevisiae* byla aktivována po působení DMSO v optimální růstové teplotě (HAYASHI a MAEDA 2006; PANADERO et al. 2006). Obdobně byly v optimální teplotě aktivovány MAP kinázové dráhy rostlin, které jsou bez přidavku DMSO funkční pouze v nízké teplotě (SANGWAN et al. 2001). Z toho vyplývá, že membránově aktivní látky s rigidizačním účinkem mohou imitovat snížení teploty a vyvolat v buňce adaptivní odpověď na chladový šok.

Z literatury je znám případ, kdy DMSO působil v závislosti na koncentraci. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* vysoké koncentrace vyvolávaly stejnou odpověď jako chladový šok a nižší koncentrace DMSO měly stejný účinek pouze v kombinaci s mírným chladovým šokem (HAYASHI a MAEDA 2006).

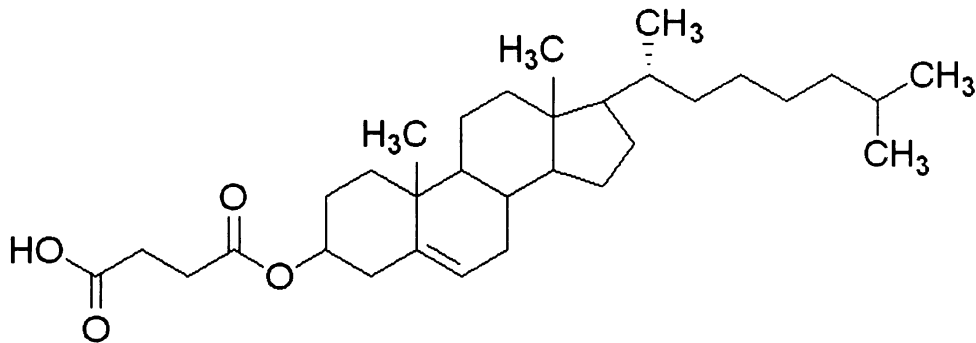
DMSO je schopen potlačit aktivaci tepelně indukované MAP kinázové dráhy rostlin ve vysoké teplotě (SANGWAN et al. 2002). V podmínkách vysoké vnější teploty, kdy je membrána příliš fluidní a ztrácí bariérové funkce, může buňce pomoci překonat tento nepříznivý stav přidavkem rigidizačního činidla, které upraví fluiditu na optimální hladinu. Je to podobná situace jako v případě ethanolu, který zlepšil přežívání chladového šoku bakterií *Oenococcus oeni*.



**Cholesteryl-hemisukcinát**

Cholesteryl-hemisukcinát (Obr. 19) je hydrofilní derivát cholesterolu, který má také rigidizační účinky na membránu. Na rozdíl od cholesterolu, který se zabudovává do hydrofobního jádra membrány, se cholesteryl-hemisukcinát nachází v blízkosti polárních hlaviček fosfolipidů (WAN et al. 2002).

Účinky cholesteryl-hemisukcinátu na membránovou fluiditu byly testovány měřením permeability lyzozomů pro protony, která stoupá s rostoucí fluiditou membrány a je tak měřítkem fluidity membrány. Po přidavku cholesteryl-hemisukcinátu byla propustnost lyzozomální membrány pro protony snížena jako důsledek rigidizace membrány (ZHANG et al. 2000; WAN et al. 2002).



Obr. 19 Struktura cholesteryl-hemisukcinátu.

Cholesteryl-hemisukcinát prostřednictvím snížení membránové fluidity ovlivňuje aktivitu membránových proteinů a některé vlastnosti buněk. Aktivita transportéru glukózy v lidských erythrocytech je citlivá k změnám membránové fluidity a tedy i přidavkům cholesteryl-hemisukcinátu (YULI et al. 1981). Membrána polymorfonukleárních buněk u novorozence je fluidnější než u dospělého a má také nižší schopnost chemotaxe. Přídavek cholesteryl-hemisukcinátu k buňkám novorozence rigidizuje jejich membránu a chemotaxe se zvýší (WOLACH et al. 1992).

**Hlinité ionty**

Změna fyzikálního stavu membrány může být způsobena přítomností iontů (DENICH et al. 2003), např. vápník přímo interaguje s polárními hlavičkami fosfolipidů a stabilizuje je (LUXO et al. 1998).

Hlinité ionty ( $Al^{3+}$ ) také interagují s fosfolipidy a způsobují změny fyzikálního stavu membrány, agregaci a fúzi lipozomů, laterální fázovou separaci, vznik klastrů s negativně nabitými fosfolipidy a rigidizaci membrány (VERSTRAETEN et al. 1997).

Rigidizační účinek hlinitých iontů byl ověřen na lipozomech z dimyristoylfosfatidylcholinu a dimyristoylfosfatidylserinu. Hlinité ionty již ve velmi nízkých koncentracích zvyšovaly teplotu fázového přechodu a stimulovaly oxidaci lipidů, která je výraznější při menší uspořádanosti membrány (VERSTRAETEN a OTEIZA 2000).

### **Kyselina palmitová**

Změna zastoupení mastných kyselin v membráně je jednou z hlavních adaptací bakteriální buňky na změnu fluidity membrány vyvolanou vnější teplotou či přidavkem membránově aktivní látky. Nenasycené mastné kyseliny hrají důležitou roli v regulaci odpovědi bakteriální buňky na chladový šok (kapitola 2.2.2). Přídavek nenasycených mastných kyselin do kultivačního média po chladovém šoku inhibuje expresi genu *des* u *Bacillus subtilis* (AGUILAR et al. 2001). Fluidizující nenasycené mastné kyseliny udrží membránu dostatečně tekutou i v nízké teplotě.

Přítomnost nasycených mastných kyselin v membráně působí naopak ztuhnutí membrány. Přídavek nasycených mastných kyselin do kultivačního média by mohl stejně jako u alkanů delších než dvanáct uhlíků vyvolat zvýšení teploty fázového přechodu (SIKKEMA et al. 1995). Vhodným kandidátem pro rigidizaci membrány by mohla být např. kyselina palmitová ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ ).

## 3 Materiály a metody

### 3.1. Mikroorganismus

Pro experimenty v této práci byl využíván mikroorganismus *Bacillus subtilis*, kmen *M19* (*168 amyE::Pdes-lacZ*), který byl zkonstruován v naší laboratoři (BERANOVA et al. 2008).

Rod *Bacillus* je řazen do 18. skupiny Bergeyova systému – tyčinky a koky tvořící endospory. Patří do skupiny grampozitivních bakterií s nízkým obsahem GC párů. Rod *Bacillus* kromě druhu *Bacillus subtilis* zahrnuje dalších 47 druhů. Bakterie mají tyčinkovitý tvar, někdy mohou tvořit řetízky. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 0,5-2,5 x 1,2-10µm v závislosti na růstových podmínkách. Bakterie rodu *Bacillus* tvoří odolné endospory, které jsou světlolomné, špatně barvitelné a rezistentní k mnoha faktorům, např. k vysoké teplotě, dehydrataci, ozáření (WEBER a MARAHIEL 2002).

*Bacillus subtilis* je tyčinkovitá, mezofilní, fakultativně aerobní bakterie, která se běžně vyskytuje v horních vrstvách půdy. Teplotní optimum této bakterie je 39°C, je schopna růst v teplotním intervalu 11-53°C (WEBER a MARAHIEL 2002). *Bacillus subtilis* je jedním z nejvíce studovaných mikroorganismů, stal se také modelovým organismem pro studium odpovědi na chladový stres (GRAUMANN a MARAHIEL 1999).

*Bacillus subtilis M19* je nenáročný na kultivační podmínky, dobře roste na běžných komplexních médiích při 40°C. Nese rezistenci na chloramfenikol, který byl přidáván do kultivačního média.

Bakteriální kmen byl uchováván ve formě sporových konzerv.

### 3.2. Chemikálie

Seznam chemikálií, které byly použity pro experimenty, jejich výrobců (případně zkratek) je uveden v Tab. 2

**Tab. 2** Přehled použitých chemikálií.

<b>Chemikálie</b>	<b>Zkratka</b>	<b>Výrobce</b>
1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien	DPH	Sigma
2-dimethyl-6-lauroylnaftalen	Laurdan	Sigma
Bactopepton		Oxoid
Beef extract		Difco
Benzylalkohol	BA	Sigma
Butanol	BT	Fluka
Deoxyribonukleáza I	DNáza	Sigma
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma
Ethanol	ET	Penta
Ethylen-diamin-tetraoctová kyselina	EDTA	Lachema
Fenyl-methyl-sulfonylfluorid	PMFS	Serva
Hovězí sérumalbumin	BSA	Pierce
Chloramfenikol	CAM	Sigma
Chloroform		Lachner
Cholesteryl-hemisukcinát	CHS	Sigma
Kyselina palmitová		Sigma
Lysozym		Sigma
Methanol		Lachner
Nutrient agar		Difco
Oktanol	OT	Fluka
o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid	ONPG	Sigma
Poly(n-vinyl 2-pyrrolidon)	PVP	Sigma
Propanol	PR	Fluka
Ribonukleáza A	RNáza	Sigma
Tetrahydrofuran		Fluka
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris	Roth
Triton X100		Sigma
Yeast extract		Oxoid
$\beta$ -mercaptoethanol	BME	Roth

Všechny ostatní použité chemikálie byly chemické čistoty p.a. a od firmy Lachema, není-li uvedeno jinak.

### 3.3. Přístroje

Seznam přístrojů, které byly použity pro experimenty, jejich výrobců a typů je uveden v Tab. 3.

**Tab. 3** Přehled použitých přístrojů.

<b>Přístroj</b>	<b>Typ</b>	<b>Výrobce</b>
Centrifuga	Centra CL3	IEC
Centrifuga	Mikro 22R	Hettich
Centrifuga	Optima L-90K	Beckman
Diferenciální skenovací kalorimetr	CSC Model 6100	Calorimetry Sciences Corporation
Fluorometr	Nano II	Jobin Yvon
Chladič	FluoroMax3	Julabo
Inkubátor	FT 200	Major Science
Membránová vývěva	MD-02-220	Fischer Scientific
pH metr	N 811kt.18/IP20	Radelkis
Pipeta	OP-205/1	Eppendorf
Sonikátor	Multipette Xstream	Hielscher
Spektrofotometr	UP 50H	Beckman
Teploměr	DU 530	Fischer Scientific
Třepačka	Testo 735-2	Grant bio
Třepačka	PS-3D	New Brunswick Scientific
Třepačka	Classic C76	Gallenkamp
Váha analytická	Orbi safe	OHAUS
Vodní lázeň	ExplorerPro	Julabo
Vodní lázeň	ED	Julabo
Vortex	MB	Julabo
	Lab dancer	IKA

### 3.4. Kultivační média

#### 3.4.1. Sporulační agar

##### základ A

NaCl.....	1,00 g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O.....	0,25 g
Nutrient agar (Difco).....	23,00 g
destilovaná H <sub>2</sub> O.....	ad 1000 ml



### roztok B

FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O.....	0,28 g
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O.....	1,98 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O.....	147 g
destilovaná H <sub>2</sub> O.....	ad 1000 ml

Základ A a roztok B byly sterilizovány odděleně. Po částečném zchladnutí (na cca 50°C) byl k 1 litru základu A přidán 1ml roztoku B. Ještě teplé medium bylo nalito do sterilních Petriho misek (cca 20ml media/miska o průměru 9 cm). Po ztuhnutí vysychaly plotny v poloze „dnem vzhůru“ cca 4 dny ve sterilním boxu.

### 3.4.2. Komplexní kultivační médium KM1

A: Bacto beef extract (Difco).....	1,50 g
Bacto yeast extract (Oxoid).....	1,50 g
Bactopepton (Oxoid).....	5,00 g
NaCl.....	3,50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,32 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	3,50 g
destilovaná H <sub>2</sub> O.....	ad 500 ml
před sterilizací upravit pH na 7,0 pomocí 1N KOH či 1M HCl	
B: Glukóza.....	5,00 g
destilovaná H <sub>2</sub> O.....	ad 100 ml

Složky A a B byly sterilizovány odděleně, po vychladnutí slity a doplněny sterilní destilovanou vodou na objem 1000ml. K médiu byl přidán chloramfenikol rozpuštěný v ethanolu na konečnou koncentraci 5µg na 1ml kultivačního média.

## 3.5. Sterilizace

Kultivační média, roztoky, destilovaná voda, plastové jednorázové špičky pro automatické pipety a mikrozkuřavky Eppendorf byly sterilizovány v autoklávu 20 minut při přetlaku vodní páry 0,15 MPa. Laboratorní sklo bylo sterilizováno v horkovzdušné sušárně 1 hodinu při 160°C.

### **3.6. Příprava sporových konzerv**

Kultura narostlá v tekutém komplexním médiu KM1 na optickou densitu ( $OD_{450nm}$ ) asi 0,500 byla použita k zaočkování 20 misek se sporulačním agarem. Na jednu misku bylo napipetováno vždy 0,1 ml tekuté kultury a kultura byla rozetřena sterilní skleněnou hokejkou. Misky byly umístěny dnem vzhůru do termostatu o teplotě 37°C.

Po čtyřdenní kultivaci byly na každou misku napipetovány 3ml sterilní destilované vody a bakteriální biomasa byla resuspendována sterilní skleněnou hokejkou. Suspenze byla přenesena do sterilní centrifugační zkumavky Falcon (50ml), z deseti misek do jedné zkumavky. Suspenze byla stočena při 5000 rpm 10 minut (centrifuga IEC) a 3x promyta 30ml sterilní destilované vody. Sediment byl resuspendován v malém množství sterilní destilované vody, převeden do jedné centrifugační zkumavky a centrifugován při 3200g 15 minut (centrifuga IEC). Pelet byl resuspendován v 15 ml 15% glycerolu, rozdělen po 100ul a 50ul do sterilních plastových mikrozkuvek Eppendorf a uchován v mrazícím boxu při -20°C.

Před použitím byla konzerva zahřívána 15 minut při 70°C, aby došlo k aktivaci bakteriálních spor a zničení případné kontaminace a vegetativních buněk.

### **3.7. Kultivace bakterií, růstová křivka**

Bakterie byly kultivovány aerobně v tekutém komplexním médiu v Erlenmayerových baňkách v třepačkách temperovaných na danou teplotu. Pro zajištění dostatečné aerace byl objem kultivačního média volen tak, aby nepřesáhl 2/10 objemu Erlenmayerovy baňky. Pro kultivaci v jedné stálé teplotě byla využívána vzdušná třepačka Gallenkamp (170rpm). V případech, kdy bylo nutné přenést rostoucí kulturu do nižší kultivační teploty, byla použita vodní třepačka Brunswick (170rpm), která umožňuje rychlejší temperaci kultury po náhlé změně teploty.

Růst bakteriální kultury byl sledován prostřednictvím měření optické density kultury při vlnové délce 450nm ( $OD_{450nm}$ ) na spektrofotometru Beckman DU 530 ve skleněné kyvetě o optické dráze 1 cm. Jako referenční vzorek byla použita destilovaná voda. Od naměřené hodnoty  $OD_{450nm}$  bakteriální kultury byla odečtena hodnota  $OD_{450nm}$  sterilního kultivačního média (blanku).

Sporová konzerva byla aktivována zahřáním na 70°C na dobu 15 minut. Z aktivované konzervy bylo zaočkováno 30 ml sterilního kultivačního média. Pro teplotu kultivace ( $T_k$ ) 40°C, 35°C a 30°C bylo zaočkováno 5 – 10  $\mu$ l sporové suspenze, pro  $T_k$  25°C, 20°C a 15°C bylo použito 50-150  $\mu$ l sporové suspenze. Kultivace probíhala přes noc (12 hodin) ve vzdušné třepačce při příslušné kultivační teplotě.

Druhý den ráno byla narostlá kultura (noční inokulum) použita k zaočkování čerstvého sterilního kultivačního média vytemperovaného na požadovanou teplotu. Kultury rostoucí při vyšších kultivačních teplotách ( $T_k$  25°C – 40°C) přerostly přes noc do stacionární fáze, proto z nich bylo čerstvé kultivační médium zaočkováno na nízkou  $OD_{450nm}$  cca 0,010. Pomaleji rostoucí kultury ( $T_k$  20°C a 15°C) se ráno nacházely v exponenciální fázi růstu, proto z nich bylo možné čerstvé médium zaočkovat na vyšší  $OD_{450nm}$  cca 0,080.

Odběry na stanovení  $OD_{450nm}$  byly prováděny sterilně v časových intervalech 15 minut pro  $T_k$  40°C, 35°C a 30°C, 30 minut pro  $T_k$  25°C a 20°C nebo delších (30 až 120 minut) pro  $T_k$  15°C. Ve stanoveném intervalu bylo odebráno 0,250 ml bakteriální kultury a naředěno 0,5 ml destilované vody (ředěno 3x) a ihned změřena hodnota  $OD_{450nm}$ . Z naměřené hodnoty byla vypočítána korigovaná  $OD_{450nm}$ , do které bylo zahrnuto ředění a odečteno blank kultivačního média. Do grafu byly vynášeny hodnoty dvojkového logaritmu tisícínásobku korigované  $OD_{450nm}$  proti času v minutách. Je-li použit tento způsob vynesení, leží body odpovídající exponenciálnímu růstu kultury na přímce, z jejíž směrnice lze vypočítat generační dobu kultury (dobu zdvojení, T).

V experimentech, kdy docházelo k náhlému snížení kultivační teploty nebo přidání membránově aktivní látky, rostla bakteriální kultura do  $OD_{450nm}$  cca 0,150-0,200 a pak byla přenesena do vodní třepačky vytemperované na nižší kultivační teplotu či byla přidána membránově aktivní látka.

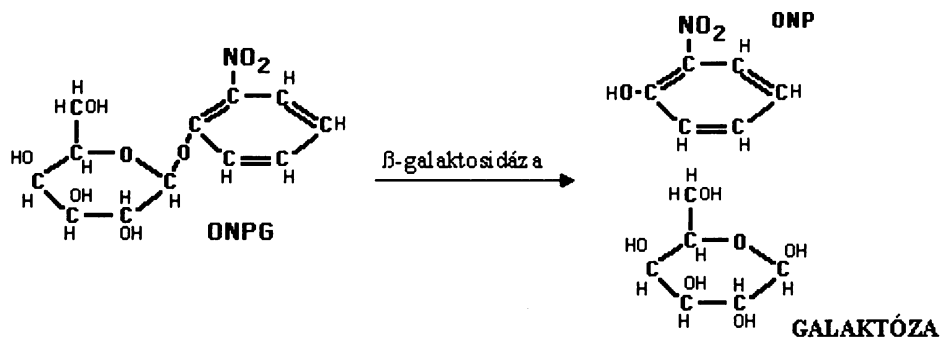
### **3.8. Stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidázy**

#### **Princip**

*Bacillus subtilis* M19 má do *amyE* lokusu vložen promotor pro desaturázu (*Pdes*) fúzovaný s genem *lacZ*, který kóduje  $\beta$ -galaktosidázu (AGUILAR et al. 2001; BERANOVA et al. 2008). Prostřednictvím stanovení aktivity  $\beta$ -galaktosidázy lze sledovat hladinu exprese genu *des*.

## Materiály a metody

Pro určení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity se používá substrát o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (ONPG), který je bezbarvý. Pokud je ve vzorku přítomna  $\beta$ -galaktosidáza, je ONPG štěpen na galaktózu a o-nitrofenol (ONP) (Obr. 20). Produkt reakce ONP je žlutě zbarven a jeho množství lze stanovit kolorimetricky (MILLER 1972).



Obr. 20 Schéma  $\beta$ -galaktosidázové reakce.

### Použité roztoky

#### Z-pufr

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O.....	60mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O.....	40mM
KCl.....	10mM
MgSO <sub>4</sub> .....	100mM
$\beta$ - mercaptoethanol.....	50mM

$\beta$ - mercaptoethanol byl k Z-pufu přidán až těsně před stanovením  $\beta$ -galaktosidázové aktivity.

#### Další roztoky

Lysozym.....	10mg/ml
Triton X100.....	10% (v/v)
ONPG.....	4,5mg/ml
NaCO <sub>3</sub> .....	127mg/ml

Roztok lysozymu a ONPG (o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid) byl připraven vždy čerstvý před každým stanovením  $\beta$ -galaktosidázové aktivity.

### Postup:

Vzorky na stanovení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity byly odebírány během růstu bakteriální kultury. Když bakteriální kultura dosáhla  $OD_{450nm}$  cca 0,150 – 0,200, byl proveden první odběr 1 ml bakteriální suspenze. Další odběry probíhaly v časových intervalech 15 minut pro  $T_k$  40°C, 35°C a 30°C a 30 minut pro  $T_k$  25°C a 20°C a delších pro  $T_k$  15°C. Pokud byla kultura přenesena do nižší kultivační teploty nebo byla přidávána membránově aktivní látka, byl první odběr proveden ještě před teplotní skokem či před přidáním membránově aktivní látky (kontrolní vzorek). Vzorek byl napipetován do mikrozkušavky Eppendorf o objemu 1,5ml a centrifugován 10 minut při 23900g (centrifuga Hettich). Supernatant byl odstraněn pomocí skleněné Pasterovy pipety a sediment byl okamžitě zmrazen v tekutém dusíku. Vzorky byly skladovány v mrazícím boxu při -20°C.

Pro stanovení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity byly vzorky resuspendovány v 1 ml Z-puftru, dobře promíchány na vortexu a u všech vzorků byla změřena  $OD_{525nm}$ . Z každého vzorku bylo převedeno 100-250 $\mu$ l do čisté polystyrenové zkumavky o objemu 5ml. Každý vzorek byl stanovován v triplicátech. Vzorky byly naředěny Z-pufrem tak, aby celkový objem ve zkumavce činil 730 $\mu$ l. Ke každému vzorku bylo přidáno 10 $\mu$ l lysozymu (10mg/ml), vzorky byly důkladně promíchány a inkubovány ve vodní lázni vytemperované na 37°C po dobu 30 minut. Poté bylo ke vzorkům přidáno 10 $\mu$ l 10%(v/v) Tritonu X100 a 100 $\mu$ l ONPG (4,5mg/ml). Vzorky byly opět promíchány a inkubovány 15minut při 28°C. Reakce byla zastavena přidáním 150 $\mu$ l 1,2M  $NaCO_3$ . Pro každý vzorek byla změřena absorbance při 420nm.

$\beta$ -galaktosidázová aktivita v Millerových jednotkách byla vypočítána podle vztahu 1, kde t je doba, po kterou probíhala reakce v minutách, V je objem vzorku v ml (0,150-0,250ml) a O.D. optická denzita měřená při 420 a 525nm.

$$MU = \frac{1000 \times O.D. 420nm}{t \text{ (min)} \times V \text{ (ml)} \times O.D. 525nm} \quad (1)$$

### 3.9. Izolace membrán

Pro izolaci membrán byla využita enzymová metoda (BISSCHOP a KONINGS 1976), kdy v konečné fázi dochází k tvorbě membránových váčků s proteiny orientovanými stejným směrem jako v buňce.

#### Použité roztoky a chemikálie:

Zásobní roztoky: A) 0,2M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

B) 0,2M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Pufry: fosfátový pufr 50mM pH 8,0

- 94,7ml A a 5,3ml B, doplnit destilovanou vodou na 400ml

Tris-HCl pufr 50mM pH 7,0

150mM K<sup>+</sup>EDTA

500mM MgSO<sub>4</sub>

#### Roztok deoxyribonukleázy:

- 1 mg deoxyribonukleázy I (Sigma) rozpustit v 1 ml roztoku, který obsahuje 50% glycerolu (w/v), 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) a 1 mM MgCl<sub>2</sub>, uchovávat při -20°C

#### Roztok ribonukleázy:

- 1 mg ribonukleázy (Sigma) rozpustit v 1 ml roztoku, který obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) a 15 mM NaCl, povařit 15 minut při 100 °C, uchovávat při -20 °C

#### Roztok PMFS:

- 100 mM roztok fenylmethylsulfonylfluoridu (Serva) v izopropanolu

#### Lysozym (Sigma)

- lysozym přidat ve formě prášku na konečnou koncentraci 300µg na 1ml suspenze

#### Postup:

- 1) Kultivovat bakterie při 40°C a 170rpm v Erlenmayerově baňce o objemu 2l se 400ml komplexního kultivačního média. Růst bakterií ukončit v exponenciální fázi (OD<sub>450nm</sub> cca 0,500) filtrací pomocí vodní vývěvy (filtry Pragopor č.5, průměr 0,6µm, Pragochema). Filtrát 3x promýt 5ml 50mM fosfátovým pufrem pH 8,0 o stejné teplotě, ve které probíhala kultivace (40°C), buňky nesmí na filtru vyschnout.

- 2) Biomasu zachycenou na filtru pomocí sklíčka a skleněné tyčinky přenést do kádinky a resuspendovat v 5ml stejného pufru s 50 $\mu$ l 100mM PMFS. Doplnit pufr na objem 10ml.
- 3) Přidat lysozym, deoxyribonukleázu I a ribonukleázu na konečnou koncentraci 300, 10 a 10  $\mu$ l/ml. Intenzivně promíchat.
- 4) Přidat 500mM roztok MgSO<sub>4</sub> na finální koncentraci 10mM.
- 5) Inkubovat při teplotě shodné s teplotou kultivace (40°C), tvorbu protoplastů pozorovat pod mikroskopem. Při 40°C dojde ke kompletní přeměně buněk v protoplasty za 20-30 minut. Protoplasty nechat popraskat.
- 6) Přidat K<sup>+</sup>EDTA na konečnou koncentraci 15mM, inkubovat 1 minutu při 40°C.
- 7) Přidat 500mM MgSO<sub>4</sub> na finální koncentraci 10mM.
- 8) Centrifugace při 25000g po dobu 60 minut při 4°C na centrifuze Beckman (vychlazený rotor SW 41, vakuum).
- 9) Sediment promýt 50mM Tris-HCl pufrům pH 7,0. Centrifugovat při 3000 rpm 2 minuty při 4°C. Resuspendovat v cca 1ml stejného pufru a rozplnit do plastových mikrozkušavek Eppendorf po 50-100 $\mu$ l.
- 10) Vzorke uchovávat při -78°C v hlubokomrazícím boxu.

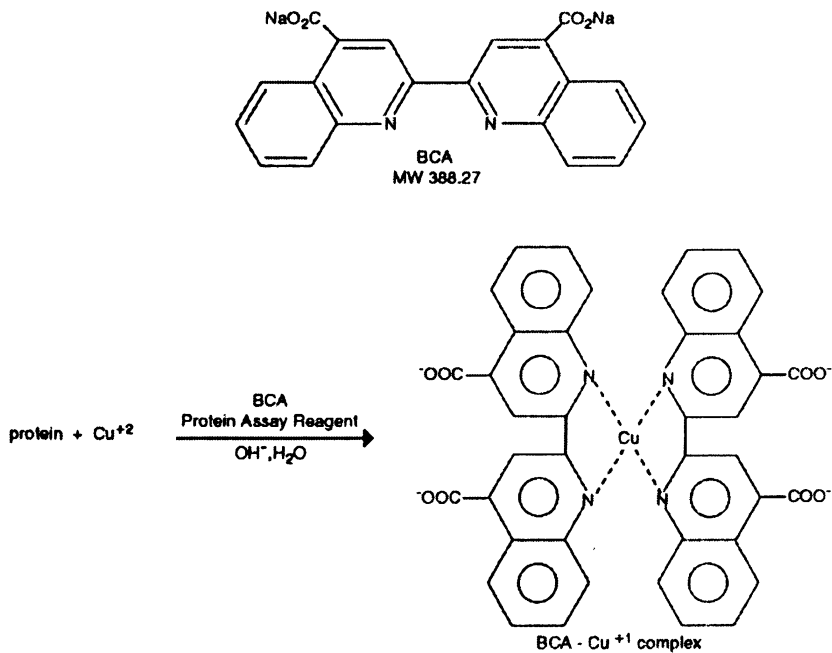
U vzorků membrán byla stanovena koncentrace proteinů (viz kapitola 3.10) a vzorky byly použity pro další experimenty.

### **3.10. Stanovení koncentrace proteinů**

Pro stanovení koncentrace ve vzorcích izolovaných membrán byla použita sada BCA Protein Assay Reagent (Pierce), která využívá metodu stanovení koncentrace proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA, bicinchoninic acid). Postup stanovení odpovídal dodanému manuálu (Instructions, BCA Protein Assay Reagent).

Principem této metody je schopnost proteinů v alkalickém prostředí redukovat měďnaté ionty (Cu<sup>2+</sup>) na měďné ionty (Cu<sup>+</sup>), které specificky reagují s BCA za vzniku barevného komplexu (Obr. 21). Komplex je tvořen jedním iontem Cu<sup>+</sup> a

dvěmi molekulami BCA, je rozpustný ve vodě a vykazuje vysokou absorpenci při 562nm. Koncentraci proteinů ve vodném rozpouštědle lze kvantifikovat spektrofotometricky. Koncentrace proteinů se odečítá ze standardní kalibrační křivky. Metodou je možno stanovit koncentrace proteinů v rozmezí 20-2000 $\mu$ g/ml.



**Obr. 21** Struktura BCA (nahore) a schéma reakce (dole).

**Použitě roztoky:**

**Roztok A (Pierce):**

- 1% (w/v) BCA
- 2% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O
- 0,16% (w/v) vřnan sodný
- 0,4% (w/v) NaOH
- 0,95% NaHCO<sub>3</sub>

**Roztok B:**

- 4% (w/v) CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O

Roztoky A i B jsou dlouhodobě stález při laboratorní teplotě.

**Pracovní roztok**

- 100 objemů roztoku A + 2 objemy roztoku B
- (připraven vždy čerstvý před stanovením)



### Standard – hovězí sérumalbumin (Albumin standard , Pierce)

BSA (bovine serum albumin, hovězí sérumalbumin), 2mg/ml roztoku

0,9% NaCl

0,05% azid sodný

### **Postup stanovení:**

1 objem stanovovaného vzorku byl smíchán s 20 objemy pracovního roztoku a inkubován 30 minut při 37°C. Po zchlazení na laboratorní teplotu byla u vzorků změřena absorbance při 562nm (spektrofotometr Beckman DU 530, skleněná kyveta 1cm). Jako referenční vzorek byl použit vzorek bez proteinů (jenom s destilovanou vodou), který byl ošetřen stejně jako ostatní vzorky.

### Kalibrační přímka

Kalibrační přímka byla sestrojena s použitím standardního roztoku BSA (Albumin standard) podle Tab. 4

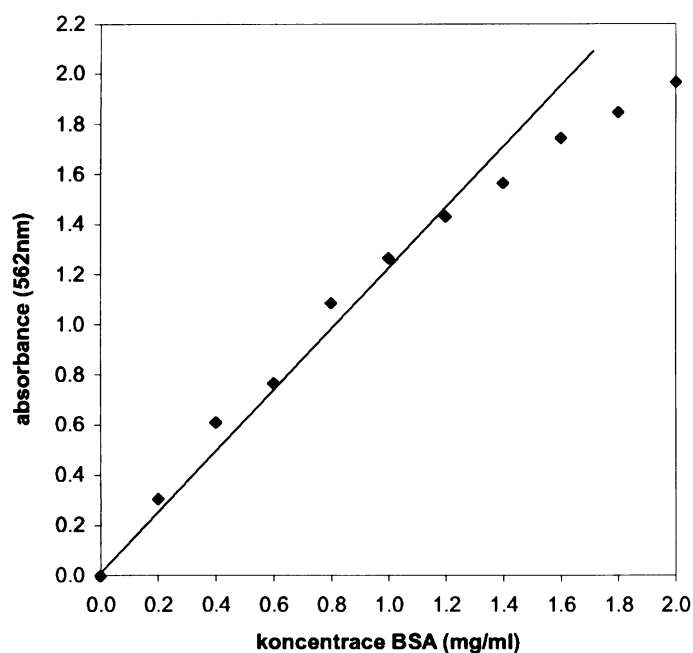
Tab. 4 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinů.

číslo zkumavky	1	2	3	4	5	6
BSA standard 2mg/ml (μl)	0	10	20	30	40	50
dest. H <sub>2</sub> O (μl)	50	40	30	20	10	0
koncentrace proteinu (mg/ml)	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2

Hodnoty absorbance pro příslušné koncentrace standardního roztoku BSA byly vyneseny do grafu (Obr. 22). Byla vypočítána směrnice kalibrační přímky, která poté byla využita pro výpočet koncentrace proteinů v analyzovaných vzorcích.

### **Stanovení koncentrace proteinů ve vzorku izolovaných membrán**

Vzorek izolovaných membrán byl naředěn destilovanou vodou tak, aby výsledná koncentrace proteinů ležela v intervalu vymezeném kalibrační křivkou (obvyklé ředění bylo 1:10) a byl analyzován stejným způsobem jako standardní roztok BSA. Pro každý vzorek byla provedena alespoň tři paralelní měření. Z hodnot naměřené absorbance a ze směrnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace proteinů v původním vzorku.



**Obr. 22** Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinů. Závislost absorbance na koncentraci proteinů je lineární do koncentrace proteinů 1,2 mg/ml.

### 3.11. Izolace fosfolipidů

Extrakce fosfolipidů byla provedena pomocí jednofázové extrakční směsi chloroform : metanol : fosfátový pufr. Byly získány dvě fáze: spodní chloroformová, která obsahovala fosfolipidy, a horní vodná fáze, do které byly extrahovány ve vodě rozpustné složky bakteriální buňky (proteiny, DNA, uhlovodíky atd.).

#### **Použité roztoky:**

Zásobní roztoky: A) 0,2M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

B) 0,2M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

Fosfátový pufr 60mM pH 7,4

- 19ml roztoku A a 81ml roztoku B, 233ml destilované vody

Chloroform a methanol byly před izolací destilovány

### **Postup:**

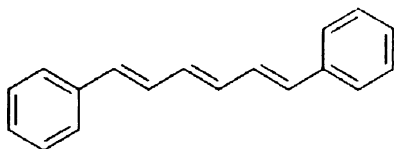
- 1) Kultivovat bakterie při 40°C a 170rpm v Erlenmayerově baňce o objemu 2l se 400ml komplexního kultivačního média. Růst bakterií ukončit v exponenciální fázi ( $OD_{450\text{ nm}}$  cca 0,500) filtrací pomocí vodní vývěvy (filtry Pragopor č.5, průměr 0,6 $\mu\text{m}$ , Pragochema). Filtrát 3x promýt 10ml 60mM fosfátovým pufrem pH 7,4 o stejné teplotě, ve které probíhala kultivace (40°C), buňky nesmí na filtru vyschnout.
- 2) Biomasu zachycenou na filtru pomocí sklíčka a skleněné tyčinky přenést do kádinky a resuspendovat v 1ml stejného pufru (podle potřeby i více). Bakteriální suspenzi napipetovat do teflonové centrifugační zkumavky a přidat 7,5ml metanolu a 3,75ml chloroformu. Vortexovat 1 minutu.
- 3) Extrahovat 2 hodiny v centrifugační zkumavce na třepačce Grant bio (20rpm) při pokojové teplotě.
- 4) Centrifugovat 10 minut při 4°C a při 3200g (centrifuga IEC).
- 5) Supernatant přenést pomocí skleněné Pasteurovy pipety do čisté teflonové centrifugační zkumavky.
- 6) Přidat 3,75ml chloroformu a 3,75ml destilované vody. Vortexovat 1 minutu.
- 7) Nechat stát 12 hodin při 4°C (v lednici).
- 8) Po 12 hodinách centrifugovat 10 minut při 4°C a při 4000rpm (centrifuga IEC).
- 9) Pasteurovou pipetou odebrat horní fázi.
- 10) Spodní chloroformovou část obsahující fosfolipidy odpařit pod proudem dusíku na menší objem, přenést do čisté zvážené skleněné zkumavky s teflonovým víčkem a odpařit úplně pod proudem dusíku (asi 20 minut) a zvážit.
- 11) Uchovávat v exsikátoru v mrazícím boxu při -20°C.

### **3.12. Měření anizotropie fluorescence DPH**

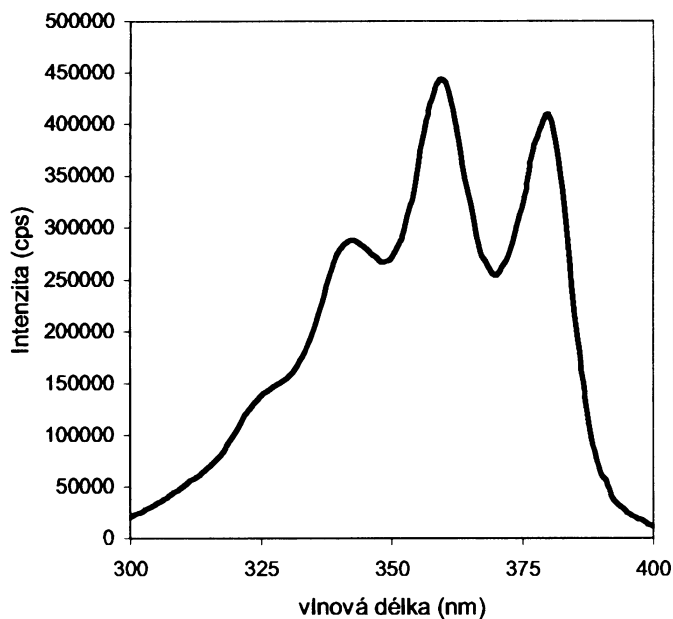
Měření anizotropie fluorescence je biofyzikální metoda, která patří k metodám fluorescenční spektroskopie. Anizotropie fluorescence je veličina závislá na rotační difúzi molekul, proto je měření anizotropie fluorescence využíváno např. pro kvantifikaci denaturace proteinů, stanovení rotačních rychlostí proteinů a s použitím membránově vázané fluorescenční sondy i k zjišťování biofyzikálních vlastností membrán. Měření

anizotropie fluorescence je dobře popsáno ve standardní příručce o metodách fluorescenční spektroskopie od LAKOWICZE (2006).

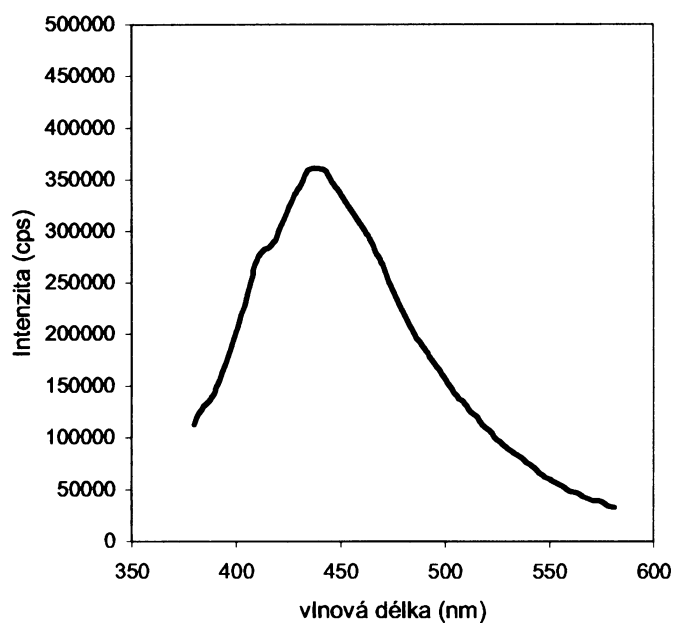
Při zjišťování biofyzikálních vlastností membrán se s výhodou využívají fluorescenční sondy, které různým způsobem interagují s membránou a které prostřednictvím měřitelných změn svých fyzikálních vlastností odrážejí charakter a dynamiku membránových komponent. Při studiu biofyzikálních vlastností membrán je nejčastěji využívána sonda 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH). Hydrofobní sonda DPH se zabudovává do membrán mezi řetězce mastných kyselin, převážně kolmo k rovině membrány (Obr. 23). Absorpční maximum DPH v membránách je 355nm a emisní maximum 425nm. Příklad absorpčního a emisního spektra je na Obr. 24 a Obr. 25 (data poskytl Radovan Fišer). DPH má vysoký extinkční koeficient ( $80000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), což umožňuje měření i velmi zředěných vzorků (o koncentraci  $10^{-7}$  a méně). Další výhodnou vlastností DPH pro jeho využití při měření anizotropie fluorescence je, že v polární rozpouštědlech tvoří mikroagregáty, které nefluoreskují. Intenzita fluorescence se však zvýší po zabudování do membrán až tisíckrát (HERMAN et al. 1994). Charakter doby života (dohasínání fluorescence) DPH je ovlivněn okolím sondy. V izotropním prostředí (např. DPH v izotropním rozpouštědle) je pokles fluorescence monoexponenciální. Pokud se DPH zabuduje do membrán, je dohasínání fluorescence složitější – multiexponenciální pokles (PARASASSI et al. 1984).



**Obr. 23** Struktura DPH (vlevo) a DPH zabudované v membráně (vpravo).



**Obr. 24** Příklad excitačního spektra DPH. Excitační spektrum DPH v DMPC (dimyristoylfosfatidylcholinu). DMPC o koncentraci  $50\mu\text{g/ml}$  ve  $150\text{mM}$  NaCl roztoku pH 7,4. Měřeno v  $10^\circ\text{C}$ . Maximum absorpce je při vlnové délce  $360\text{nm}$ . Data poskytl Radovan Fišer.



**Obr. 25** Příklad emisního spektra DPH. Emisní spektrum DPH v DMPC (dimyristoylfosfatidylcholinu). DMPC o koncentraci  $50\mu\text{g/ml}$  ve  $150\text{mM}$  NaCl roztoku pH 7,4. Maximum emisního spektra leží v tomto případě v  $440\text{nm}$ . Data poskytl Radovan Fišer.

Měření anizotropie fluorescence je založeno na tom, že po excitaci fluorescenční sondy polarizovaným světlem je emisní záření sondy také polarizováno. K depolarizaci může dojít např. vlivem rotační difúze fluoroforu, tedy pootočením sondy v době mezi absorpcí a emisí fotonu.

Jednoduché schéma měření anizotropie fluorescence je na Obr. 26. Vzorek je excitován vertikálně polarizovaným světlem, jehož vektor intenzity elektrického pole ( $E$ ) je rovnoběžný s osou  $z$  a pohybuje se ve směru osy  $y$ . Intenzita emise je měřena se zařazeným emisním polarizátorem ve dvou směrech. Je-li emisní polarizátor orientován paralelně ( $\parallel$ ) k vektoru intenzity elektrického pole vertikálně polarizovaného excitačního záření, lze naměřit intenzitu  $I_{\parallel}$ . Podobně je-li emisní polarizátor orientován kolmo ( $\perp$ ), lze získat intenzitu  $I_{\perp}$ . Míru depolarizace emise vzhledem k excitaci popisují veličiny polarizace ( $P$ ) a anizotropie fluorescence ( $r$ ). Jsou definovány následujícími vztahy:

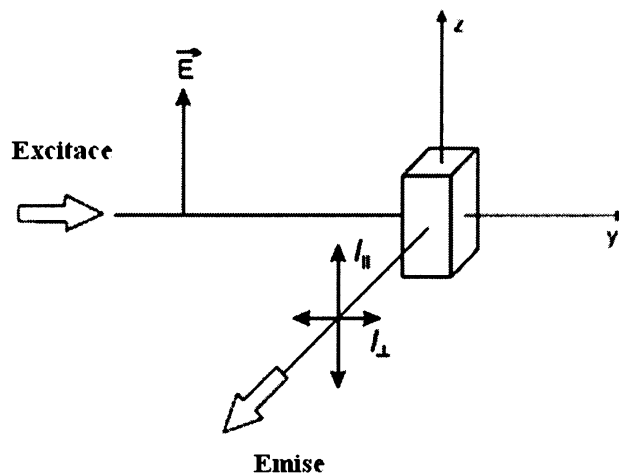
$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (2) \quad r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (3) \quad I_0 = I_{\parallel} + 2I_{\perp} \quad (4)$$

kde  $I_{\parallel}$  a  $I_{\perp}$  jsou intenzity vertikálně a horizontálně polarizované emise a  $I_0$  je celková intenzita fluorescence. Obě veličiny lze na sebe vzájemně převádět podle vztahu:

$$r = \frac{2P}{3 - P} \quad (5)$$

V současnosti se však v praxi více používá anizotropie fluorescence, která je vhodnější pro popis složitějších situací (přítomnost více populací fluorescenčních sond ve vzorku apod.).

Pro přírodní nebo nepolarizované světlo  $I_{\parallel} = I_{\perp}$ , tedy  $r = 0$ . Pro zcela polarizované světlo  $I_{\perp} = 0$ , pak  $r = 1$ . I v případě, kdy se sonda během doby života excitovaného stavu neotáčí (např. sonda v zamrzlém v rozpouštědle), je hodnota anizotropie fluorescence snižována tzv. fotoselekcí a velikostí úhlu svíraného excitačním a emisním dipólem. Při excitaci sondy vertikálně polarizovaným světlem jsou excitovány nejen ty sondy, jejichž excitační dipól je paralelní s osou  $z$  (Obr. 26), ale i sondy s excitačním dipólem, který svírá s osou  $z$  určitý úhel (fotoselekce). Emisní záření sond s excitačním dipólem odchýleným od osy  $z$  přispívá k naměření intenzity  $I_{\perp}$ , tím ke snížení anizotropie fluorescence.



Obr. 26 Schéma měření anizotropie fluorescence.

Pravděpodobnost absorpce excitačního záření sondou je rovna  $\cos^2\theta$ , kde  $\theta$  je úhel, který je mezi excitačním dipólem sondy a osou z. U některých sond nejsou excitační a emisní dipóly rovnoběžné, ale svírají mezi sebou nenulový úhel. Anizotropie fluorescence roztoku zředěné sondy v zamrzlém rozpouštědle, kde je pokles anizotropie dán pouze fotoselekcí a posunem excitačního a emisního dipólu, je popsána vztahem:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left( \frac{3 \cos^2 \phi - 1}{2} \right) \quad (6)$$

kde  $r_0$  je tzv. limitní anizotropie,  $\theta$  úhel mezi excitačním a emisním dipólem. Pro zcela paralelní dipóly, tedy  $\theta = 0$ , je limitní anizotropie  $r_0 = 0,4$ . Pro DPH byla naměřena nejvyšší hodnota  $r_0 = 0,39$ , což odpovídá úhlu mezi dipóly  $7,4^\circ$  (dipóly téměř paralelní).

Pro měření anizotropie fluorescence se většinou využívá jednokanálová metoda („L-format“ metoda), kdy se v jednom emisním kanálu snímá nejprve intenzita  $I_{\parallel}$  a pak intenzita  $I_{\perp}$ . Vlivem rozdílné propustnosti emisního monochromátoru pro vertikálně a horizontálně polarizované světlo se mění i citlivost emisního kanálu pro vertikálně a horizontálně polarizované světlo.

Získané intenzity  $I_{\parallel}$  a  $I_{\perp}$  musí být korigovány. Jsou-li  $I_{VV}$  a  $I_{HV}$  aktuálně naměřené intenzity ( $I_{VV}$  pro vertikálně polarizovanou excitaci a vertikálně

polarizovanou emisi a  $I_{HV}$  pro horizontálně polarizovanou excitaci a vertikálně polarizovanou emisi) a  $S_V$  a  $S_H$  označují citlivost emisního kanálu pro vertikálně a horizontálně polarizované světlo, platí vztah:

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V I_{\parallel}}{S_H I_{\perp}} = G \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} \quad (7)$$

kde  $G$  je tzv.  $G$  faktor.  $G$  faktor ( $S_V/S_H$ ) udává kolikrát účinněji propouští emisní monochromátor vertikálně polarizované světlo oproti horizontálně polarizovanému světlu.  $G$  faktor lze snadno naměřit, pokud je vzorek excitován horizontálně polarizovaným světlem (schéma měření na Obr. 27). V tomto uspořádání jsou obě intenzity naměřené s polarizátorem orientovaným ve vertikálně i horizontálně kolmé na horizontálně polarizovanou excitaci. Rozdíl v naměřených intenzitách  $I_{HV}$  a  $I_{HH}$  ( $I_{HV}$  pro horizontálně polarizovanou excitaci a vertikálně polarizovanou emisi a  $I_{HH}$  pro horizontálně polarizovanou excitaci i emisi) je dán pouze citlivostí emisního kanálu.  $G$  faktor je vypočítán podle:

$$\frac{I_{HV}}{I_{HH}} = \frac{S_V I_{\perp}}{S_H I_{\perp}} = G \quad (8)$$

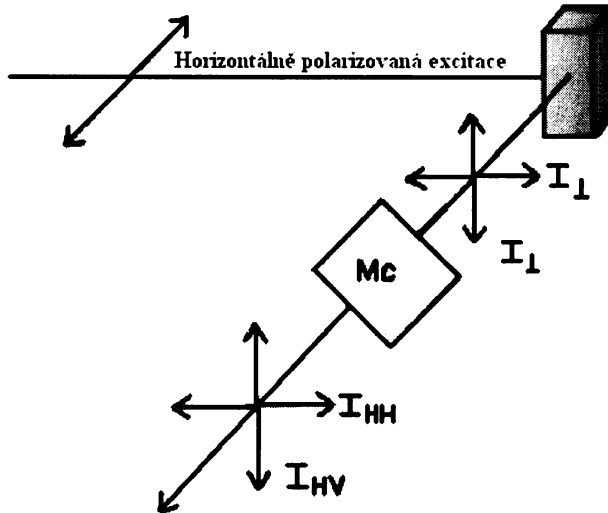
Anizotropie fluorescence je pak vyjádřena vztahem:

$$r = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + 2G I_{VH}} \quad (9).$$

Vnitřní depolarizace fluorescence (snížení hodnoty anizotropie vlivem fotoselekce a vzájemného pootočení excitačního a emisního dipólu) byla pojednána výše pro případ, kdy je sonda nehybná (např. zamrzlá v rozpouštědle). Pokud se molekula fluoroforu nachází v neviskózním rozpouštědle za pokojové teploty, může dojít k další depolarizaci vlivem rotační difúze či nezářivého přenosu energie mezi molekulami fluoroforu. Nezářivý přenos energie se odehrává pouze v koncentrovaném roztoku, kde jsou molekuly dostatečně blízko. Depolarizaci fluorescence vlivem



nezářivého přenosu energie se lze vyhnout dostatečným naředěním roztoku sondy. Pro fluorescenční měření se používají koncentrace sondy řádově  $10^{-6}M$ .



Obr. 27 Uspořádání při měření G faktoru. Mc – monochromátor.

Hlavní příčinou depolarizace fluorescence je rotační difúze. Během doby života excitovaného stavu sondy (mezi přijetím a vyzářením fotonu) se molekula fluoroforu může potočit, tím se změní poloha emisního dipólu a dojde ke snížení anizotropie. Míra a rychlost rotačního pohybu molekuly sondy závisí na vlastnostech okolního prostředí. Depolarizaci fluorescence vlivem rotační difúze popisuje Perrinova rovnice:

$$r = \frac{r_0}{\left(1 + \frac{\tau}{\Theta}\right)} \quad (10)$$

kde  $r_0$  je limitní anizotropie,  $\tau$  doba života excitovaného stavu sondy,  $\Theta$  rotační korelační čas. Vztah platí pro kulovitou sondu v izotropním prostředí. Rotační korelační čas je závislý na viskozitě prostředí podle vztahu:

$$\Theta = \frac{\eta V}{RT} \quad (11)$$

kde  $\eta$  je viskozita,  $V$  objem rotující molekuly,  $T$  teplota a  $R$  univerzální plynová konstanta. V rozpouštědle s malou viskozitou je rotační korelační čas nízký a naměřená anizotropie  $r$  je nižší než limitní anizotropie  $r_0$ .

Změna anizotropie odráží změnu vlastností prostředí okolo molekuly sondy. Tato závislost anizotropie na viskozitě prostředí se využívá při měření fluidity membrány. Tekutá (fluidní) membrána představuje málo viskózní prostředí, anizotropie je nízká. Tuhá membrána (rigidní) odpovídá velmi viskóznímu prostředí, ve kterém je anizotropie vysoká.

### 3.12.1. Měření ustálené anizotropie fluorescence DPH

#### Příprava vzorků izolovaných cytoplazmatických membrán a jejich značení

Vzorky izolovaných membrán byly naředěny 50mM Tris-HCl pufrům pH 7,0 na finální koncentraci 10 $\mu$ g proteinů na 1ml pufru. Poté byl pomocí mikrostříkačky Hamilton přidán roztok sondy DPH v acetonu (zásobní roztok o koncentraci 10<sup>-3</sup>M) na finální koncentraci 10<sup>-6</sup>M a vzorky byly vortexovány. Značení probíhalo ve skleněných zkumavkách ve vodní lázni temperované na 37°C po dobu 30 minut.

#### Měření

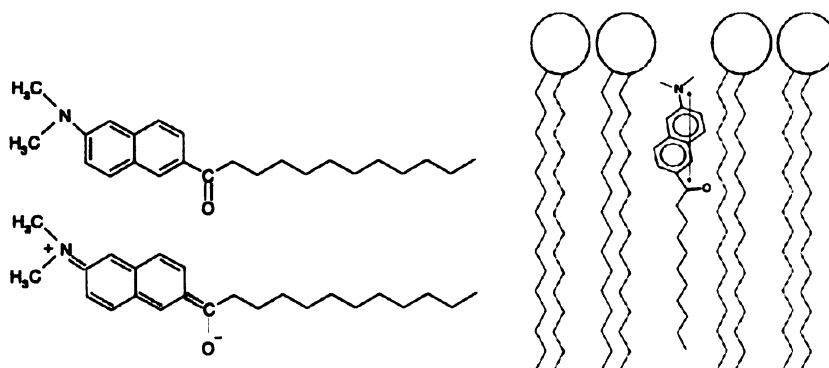
Měření probíhalo na spektrofluorometru Jobin Yvon FluoroMax3. Pro měření byly použity křemenné kyvety o rozměrech 1 x 1cm, objem vzorku v kyvetě byl 2,5ml. Vzorky byly míchány pouze před začátkem měření. Kyvetový prostor byl temperován pomocí průtokového termostatu (MB, Julabo). Teplota byla měřena digitálním teploměrem (Testo 735-2), který snímal teplotu každých 20s. Vlnová délka excitace byla 360nm a vlnová délka emisního záření 425nm. Excitační i emisní štěrby byly nastaveny na 4,2nm. Integrační čas činil 3s pro intenzitu  $I_{\parallel}$  a 3s pro intenzitu  $I_{\perp}$  (celkem tedy 6s pro měření jedné hodnoty anizotropie). Snímání intenzit probíhalo v intervalu 20s. G faktor byl nastaven jako fixní na 1,078. Spektrofluorometr FluoroMax3 a digitální teploměr Testo 735-2 byly ovládány pomocí počítačových softwarů DataMax a Testo Comfort-Software X35. Pro export dat ze softwaru DataMax byl používán program GRAMSCNV. Program DataMax umožňuje přímo při měření sledovat hodnotu anizotropie. Výstupem z programu DataMax je závislost anizotropie na čase. Program Testo Comfort-Software X35 poskytuje záznam teploty v čase. Synchronizace teploty a hodnot anizotropie byla provedena pomocí zaznamenaných časů v programu Excel.

Membránově aktivní látky byly ke vzorkům značených membrán přidávány až po ustálení anizotropie na konstantní hodnotě ve 40°C (nebo 20°C), vzorky byly míchány po celou dobu měření.

### 3.13. Měření generalizované polarizace Laurdanu

Měření generalizované polarizace je další metoda fluorescenční spektroskopie, která slouží k popisu biofyzikálních vlastností membrán. Měření generalizované polarizace se využívá pro charakterizaci biofyzikálních vlastností membrán, např. rozlišení fáze gelu a fáze tekutého krystalu u fosfolipidů, viskozity, polarity, transmembránového laterálního tlaku (ZHANG et al. 2006).

Při měření generalizované polarizace se používají fluorescenční sondy, které jsou citlivé k polaritě prostředí, jako je sonda Prodan (2-dimethylamino-6-propionylnaftalen) a její deriváty. Mezi deriváty Prodanu patří také hydrofobní sonda Laurdan (2-dimethylamino-6-lauroylnaftalen), která má dlouhý alifatický uhlíkatý řetězec (Obr. 28). Tato část Laurdanu slouží jako kotva, která umožňuje zabudování Laurdanu do fosfolipidové dvojvrstvy tak, že část zodpovědná za fluorescenci je lokalizována v blízkosti polárních hlaviček fosfolipidů (Obr. 28).



**Obr. 28** Struktura sondy Laurdan (vlevo) a lokalizace sondy v membráně (vpravo). Struktura vlevo dole zachycuje rozložení náboje v excitované sondě.

Sondy citlivé k polaritě rozpouštědla jsou navrženy tak, aby dipólový moment sondy v excitovaném stavu byl větší než u neexcitované sondy. V molekule Laurdanu slouží amino skupina jako donor a karbonylová skupina jako akceptor elektronu. Po excitaci se vlivem přeskupení náboje v molekule sondy vytvoří silný dipólový moment (Obr. 28).

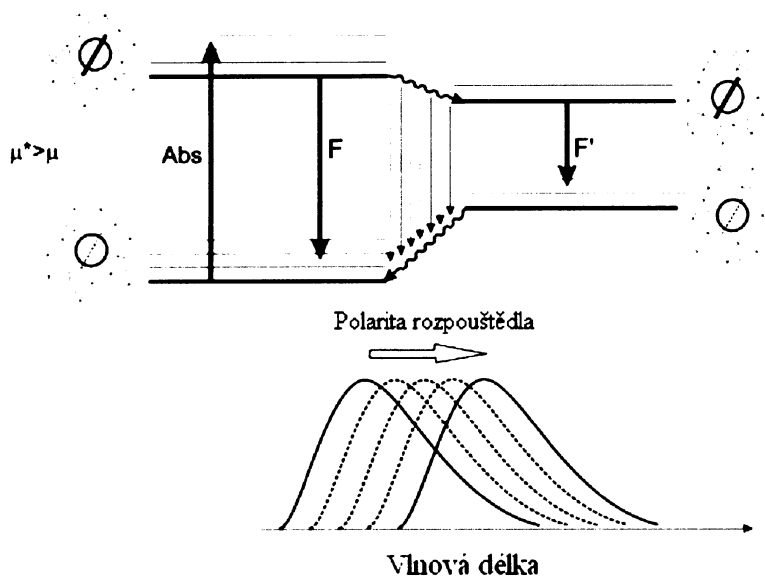
Sonda Laurdan je díky vzniku silného dipólového momentu po excitaci citlivá k relaxaci rozpouštědla. Relaxace rozpouštědla označuje jev, kdy je v polárnějším prostředí maximum emisního spektra posunuto do delších vlnových délek (tzv. červený posun). V polárním rozpouštědle dochází k reorganizaci polárních molekul rozpouštědla kolem excitované sondy, to vede ke snížení energie systému (Obr. 29). Pokles energie systému se projeví emisí při delších vlnových délkách.

Sonda Laurdan se používá především ke stanovení podílu fáze gelu a fáze tekutého krystalu ve fosfolipidové dvojvrstvě. Pokud jsou membrány ve vodném rozpouštědle, pak jsou za relaxaci rozpouštědla zodpovědné molekuly vody, které pronikají mezi polární hlavičky membránových fosfolipidů. Relaxaci rozpouštědla však neovlivňují molekuly vody, které hydratují povrch membrány (DE VEQUI-SUPLICY et al. 2006). Pronikání molekul vody do membrány je závislé na tom, jak dobře jsou molekuly fosfolipidů v membráně uspořádány, tedy na tom, jak těsně vedle sebe se nachází polární hlavičky fosfolipidů (HARRIS et al. 2002). Ve fázi gelu jsou fosfolipidy v uspořádaném stavu, polární hlavičky fosfolipidů nedovolují molekulám vody pronikat k molekule Laurdanu a emise se odehrává v kratších vlnových délkách. Ve fázi tekutého krystalu se molekuly vody dostávají do blízkosti molekuly Laurdanu a dochází k posunu emisního maxima do delších vlnových délek (Obr. 30).

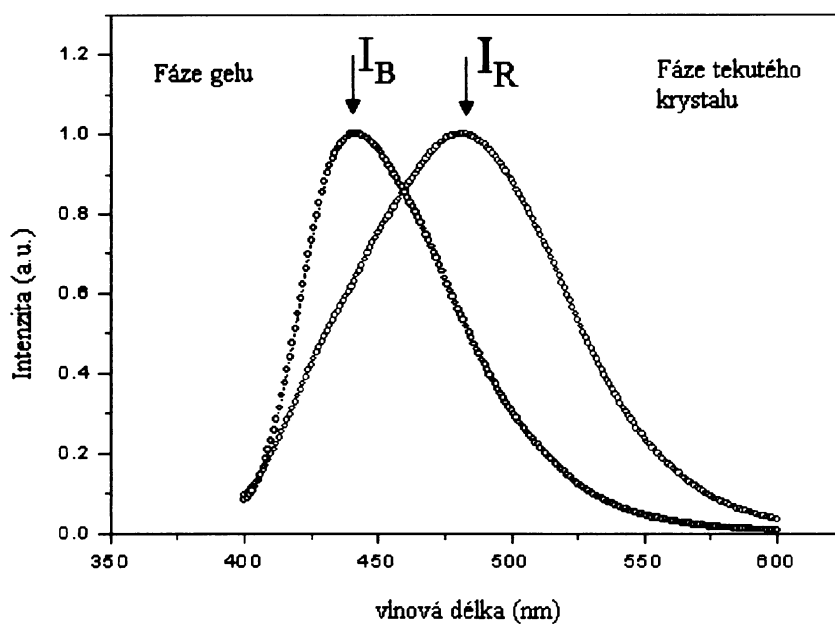
Posun maxima emisního spektra Laurdanu způsobený dipól-dipólovými interakcemi mezi molekulami vody a molekulou Laurdanu ve fosfolipidové dvojvrstvě lze popsat pomocí generalizované polarizace (GP). Generalizovaná polarizace je definována podobně jako polarizace fluorescence:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \quad (12)$$

kde  $I_B$  je intenzita fluorescence v kratších vlnových délkách a  $I_R$  je intenzita fluorescence v delších vlnových délkách (Obr. 30). Generalizovaná polarizace může nabývat hodnot od -1 (sonda Laurdan ve vodném prostředí) do 1 (sonda Laurdan není vystavena působení molekul vody). Generalizovaná polarizace klesá, když se zvýší průnik molekul vody do lipidové dvojvrstvy, více molekul vody se dostává do membrány v případě, že fosfolipidy jsou méně uspořádané. Měřením generalizované polarizace tedy lze zachytit změny ve fázi membrány.



**Obr. 29** Relaxace rozpouštědla. Po absorpci fotonu (Abs) má sonda Laurdan větší dipólový moment ( $\mu^*$ ). S polaritou rozpouštědla roste vlnová délka emise ( $F'$ ).



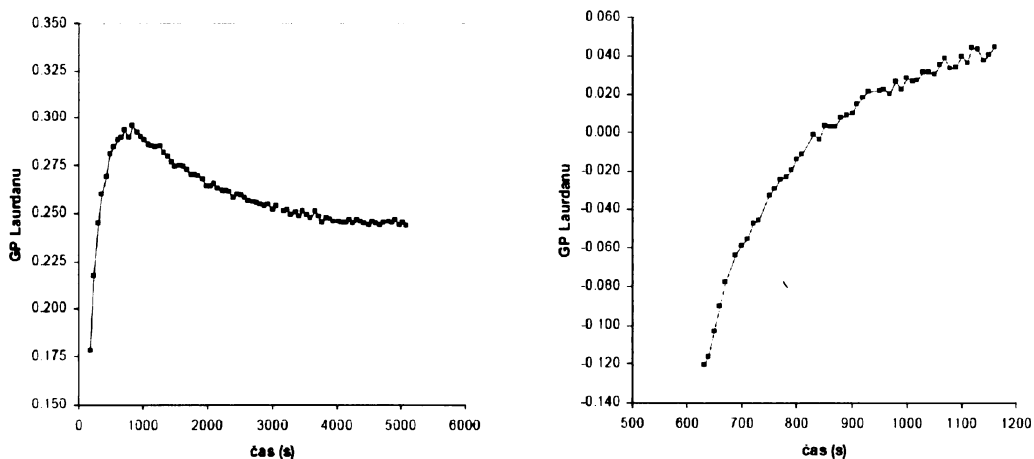
**Obr. 30** Posun maxima emisního spektra Laurdanu do delších vlnových délek vlivem relaxace rozpouštědla a měření generalizované polarizace.  $I_B$  a  $I_R$  jsou intenzity naměřené při kratších (435nm) a delších (490nm) vlnových délkách.

**Příprava vzorků izolovaných cytoplazmatických membrán a jejich značení**

Vzorky izolovaných membrán byly naředěny 50mM Tris-HCl pufrém pH 7,0 na finální koncentraci 10 $\mu$ g proteinů na 1ml pufru. Pak byl přidán roztok sondy Laurdanu v dimethylsulfoxidu (zásobní roztok o koncentraci 10<sup>-3</sup>M) na finální koncentraci 10<sup>-6</sup>M. Značení probíhalo v křemenných kyvetách v kyvetovém prostoru temperovaném na 40°C, vzorek byl míchán. Kinetika zabudovávání Laurdanu do membrán byla sledována (Obr. 31). Ustálení hodnot generalizované polarizace trvalo 1hodinu a 20 minut. Teprve po ustálení hodnot generalizované polarizace byly provedeny dalších experimenty.

**Příprava vzorků izolovaných lipidů a jejich značení**

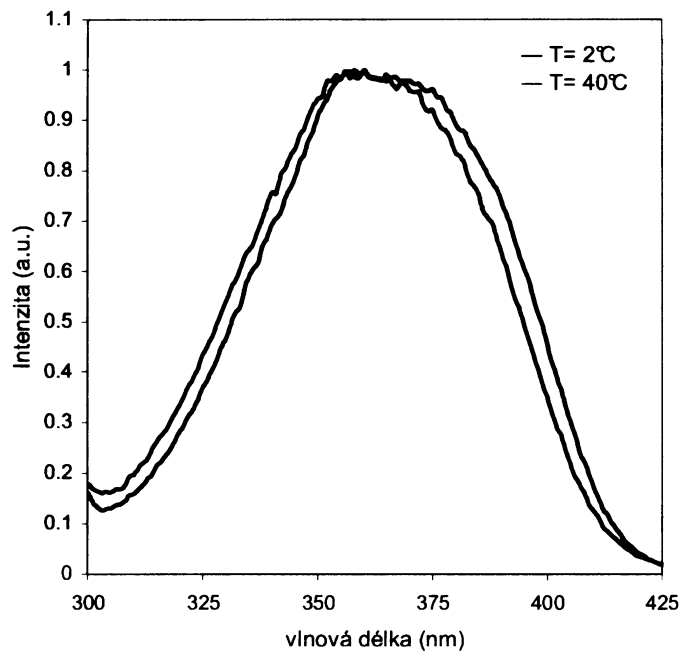
Vzorek izolovaných bakteriálních lipidů byl rozpuštěn v chloroformu a převeden do skleněné zábrusové zkumavky. Vzorek lipidů byl odpařen pod proudem dusíku tak, aby na stěnách zkumavky vznikl lipidový film. Poté byl přidán 50mM Tris-HCl pufr pH 7,0 tak, aby konečná koncentrace lipidů byla 10 $\mu$ l na 1ml pufru. Mnohvrstvé lipozomy byly připraveny intenzivním vortexováním vzorku po dobu několika minut. Pro přípravu jednovrstvných váčku bylo použito zařízení LipozoFast (Aventin USA). Suspenze mnohvrstvných lipozomů byla po 0,5ml protlačena (10x) přes polykarbonátový filtr (průměr pórů 400nm). Ke vzorku jednovrstvných lipidových váčků byla přidána sonda Laurdan na konečnou koncentraci 10<sup>-6</sup>M. Značení probíhalo ve skleněných zkumavkách umístěných ve vodní lázni temperované na 40°C po dobu 1 hodiny a 20 minut (Obr. 31).



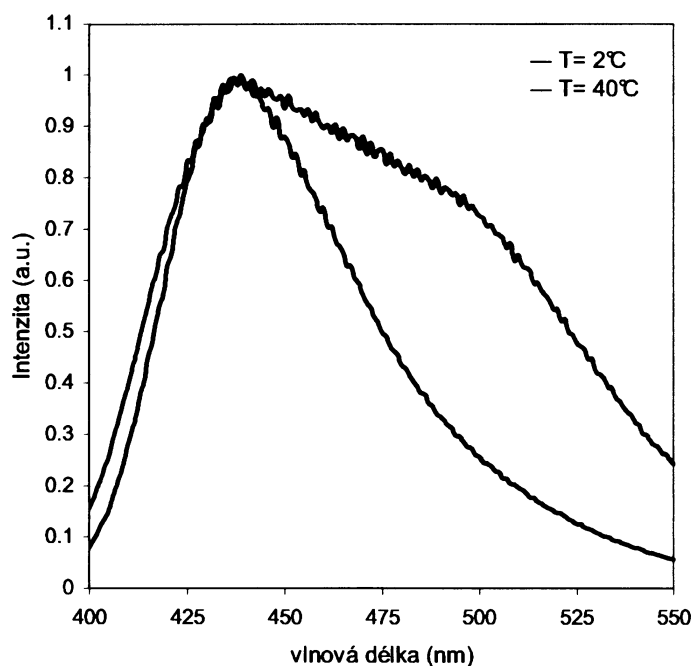
**Obr. 31** Značení izolovaných bakteriálních membrán (vlevo) a lipidů (vpravo) sondou Laurdan. GP – generalizovaná polarizace.

### Měření generalizované polarizace Laurdanu

Měření probíhala na spektrofluorometru Jobin Yvon FluoroMax3. Pro měření byly použity křemenné kyvety o rozměrech 1 x 1cm, objem vzorku v kyvetě byl 2,5ml. Kyvetový prostor byl temperován pomocí průtokového termostatu. Teplota byla měřena digitálním teploměrem Testo, který snímal teplotu každých 10s. Generalizovaná polarizace Laurdanu byla měřena bez použití polarizátorů. Vlnová délka excitace byla 365nm. Intenzita emisního záření byla snímána při vlnových délkách 435nm a 510nm. Excitační a emisní spektra měřená při teplotách 2°C a 40°C jsou na Obr. 32 a Obr. 33 (data poskytl Radovan Fišer). Excitační štěrbiny byly nastaveny 1,5nm a emisní štěrbiny na 3nm. Integrační čas činil 3s. Snímání se opakovalo po 10s. Hodnota generalizované polarizace byla vypočítána podle vztahu (12). Použitý počítačový software byl stejný jako v případě měření anizotropie fluorescence.



**Obr. 32** Excitační spektrum Laurdanu měřené při teplotách 2°C a 40°C. Absorpční maximum leží ve vlnové délce 365nm. T-teplota ve °C. Data poskytl Radovan Fišer.



**Obr. 33** Emisní spektra Laurdanu měřené při teplotách 2°C a 40°C. Emisní maximum měřené při teplotě 2°C leží v 435nm, při teplotě 40°C v 510nm. T-teplota ve °C. Data poskytl Radovan Fišer.

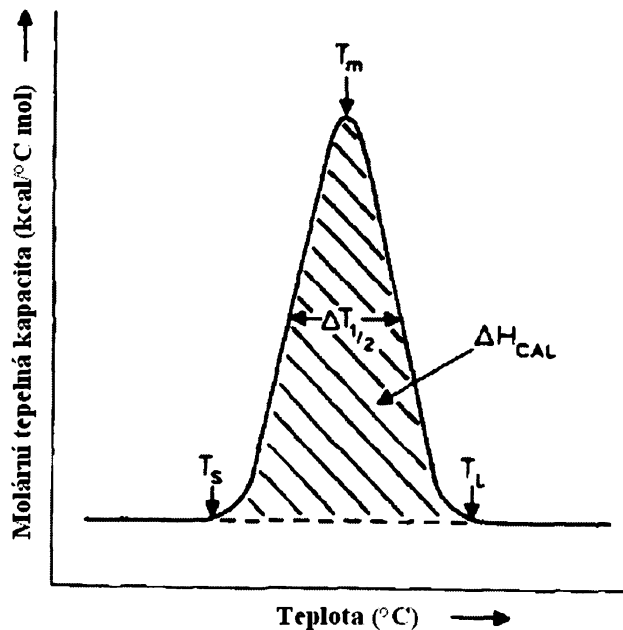


### 3.14. Diferenciální skenovací kalorimetrie

Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) je relativně jednoduchá a přímá fyzikální metoda, která umožňuje charakterizovat termodynamické chování makromolekul. DSC se využívá při studiu stability a teplotní denaturace proteinů, fázových přechodů lipidů, interakcí membránových proteinů s lipidy, denaturačních procesů nukleových kyselin a také k popisu vlastností celých buněk a tkání (SHNYROV et al. 1997). Princip měření je dobře vysvětlen v práci MCELHANEYHO (1986).

Při DSC měření se srovnává termodynamické chování zkoumaného vzorku a referenčního vzorku v určitém teplotním rozsahu. Sledovaným vzorkem mohou být např. lipozomy v pufru. Jako referenční vzorek se používá roztok (např. samotný pufr), který v daném teplotním intervalu neprodělává fázový přechod. Oba vzorky jsou zahřívány stejným množstvím tepla a stejnou rychlostí. Teplota obou vzorků stoupá lineárně v čase a rozdíl teplot mezi oběma vzorky je blízký nule. Při určité teplotě dojde u vzorku lipidů k teplotně indukovanému fázovému přechodu (z fáze gelu do fáze tekutého krystalu). Část tepla, kterým je vzorek lipidů zahříván, je tedy spotřebována na fázový přechod. U referenčního vzorku je všechno teplo využito pouze k zahřívání vzorku. Kontrolní systém diferenciálního skenovacího kalorimetru rozpozná teplotní rozdíl mezi oběma vzorky a dodá více tepla vzorku lipidů tak, aby teplotní rozdíl mezi vzorky byl opět blízký nule. Výsledkem je rozdíl ve spotřebovaném množství tepla mezi vzorkem lipidů a referenčním vzorkem. Výstupem při DSC měření je rozdíl molárních tepelných kapacit obou vzorků jako funkce teploty vzorku.

Příklad DSC termogramu je na Obr. 34. Z termogramu lze odečíst několik parametrů, které popisují fázový přechod: teplotu fázového přechodu  $T_m$ , pološířku fázového přechodu  $\Delta T_{1/2}$ , teplotu počátku a konce fázového přechodu  $T_S$  a  $T_L$  a změnu entalpie pro fázový přechod  $\Delta H_{CAL}$ . Teplota fázového přechodu  $T_m$  je teplota, při které molární tepelná kapacita dosáhne svého maxima. Pološířka fázového přechodu  $\Delta T_{1/2}$  je definována jako šířka v polovině výšky křivky. Změna entalpie  $\Delta H_{CAL}$  pro fázový přechod je rovna obsahu plochy pod křivkou. Tvar křivky fázového přechodu závisí na obsahu lipidů ve vzorku. Pokud se ve vzorku nachází pouze jeden typ lipidů, je pološířka fázového přechodu  $\Delta T_{1/2}$  velmi malá – až  $0,1^\circ\text{C}$ . Pro směs několika typů lipidů, např. pro biologické membrány, může  $\Delta T_{1/2}$  nabývat hodnot  $10\text{-}15^\circ\text{C}$ .



**Obr. 34** Příklad DSC termogramu. Schéma přechodu lipidů z fáze gelu do fáze tekutého krystalu.  $T_m$  je teplota fázového přechodu,  $\Delta T_{1/2}$  pološířka fázového přechodu,  $T_S$  počátek a  $T_L$  konec fázového přechodu a  $\Delta H_{CAL}$  změna entalpie pro fázový přechod (převzato z (MCELHANEY 1986)).

### Příprava vzorků pro DSC měření

Jednovrstevné lipozomy byly připraveny stejným způsobem jako pro měření generalizované polarizace Laurdanu (kapitola 3.13). Konečná koncentrace lipidů byla 1mg lipidů na 1ml pufru (50mM Tris-HCl pH 7,0). Nepoužité lipozomy byly skladovány v chladničce při 4°C maximálně 1den. Před vlastním měření byly vzorky temperovány na pokojovou teplotu. Vzorky s přidavkem membránově aktivní látky byly temperovány ve vodní lázni při 40°C po dobu 10minut. Poté se vzorky nechaly temperovat na pokojovou teplotu a byly použity pro měření.

### Diferenciální skenovací kalorimetr

Měření byla prováděna na diferenciálním skenovacím kalorimetru CSC Model 6100 Nano (Calorimetry Sciences Corporation, USA). Schéma přístroje je znázorněno

na Obr. 35. Podrobný popis tohoto typu přístroje podává ve své práci PRIVALOV a spolupracovníci (1995).

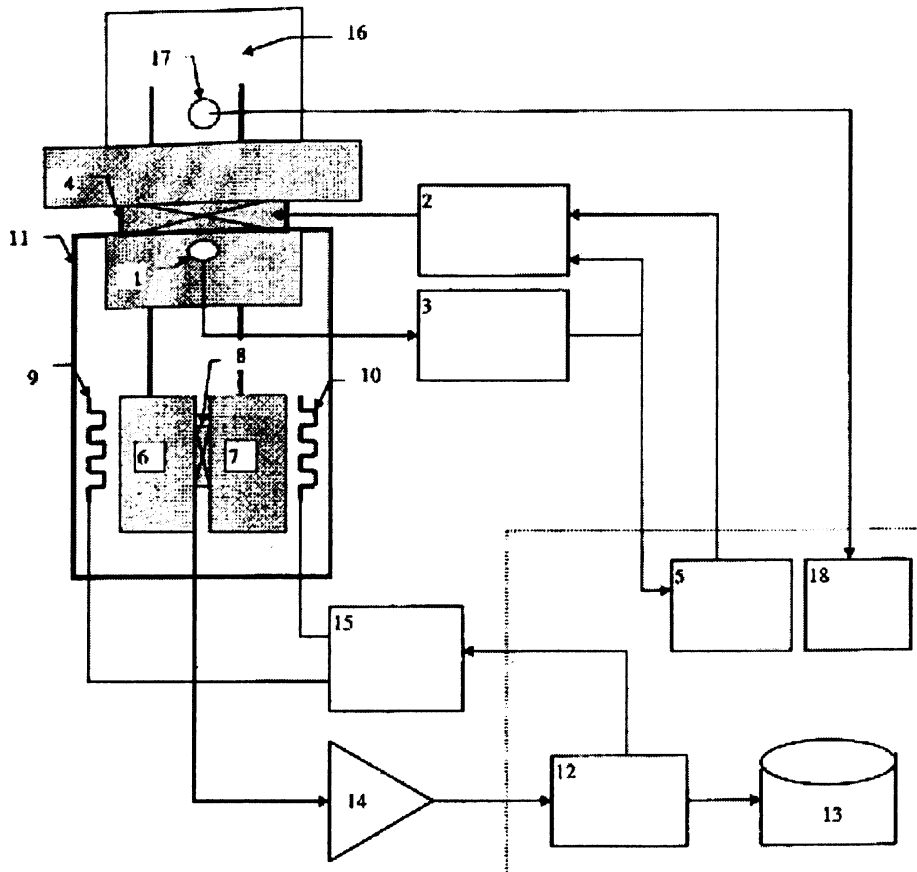
Měřicí cely jsou zahřívány a chlazeny prostřednictvím pasivního toku energie z pláště, to zajišťuje konstantní rychlost ohřevu či chlazení obou měřících cel. Teplotní rozdíl mezi celami je měřen polovodičovou termoelektrickou baterií a je udržován blízký nule pomocí topných těles. Měření probíhá pod tlakem 3atm, aby se během zahřívání vzorku netvořily bubliny, které znemožňují stanovení absolutní molární tepelné kapacity.

Není technicky možné vyrobit dvě identické měřicí cely, proto je nutné před vlastním měřením naplnit obě cely pouze pufrém a rozdíl mezi celami změřit (referenční křivka, „baseline“) v celém sledovaném teplotním rozsahu. Získaná křivka není obvykle lineární nebo blízká nule. Přístroj při dalším měření automaticky kompenzuje rozdíly mezi celami. Křivka získaná pro dané rozpouštědlo (referenční křivka) může být odečtena od křivky naměřené pro studovanou látku rozpuštěnou v daném rozpouštědle. Výsledná křivka pak zachycuje změnu molární tepelné kapacity studované látky, např. lipidů, ve sledovaném teplotním rozsahu.

### Měření DSC

Před vlastním měřením byly ze vzorku odstraněny rozpuštěné plyny pomocí vakuové vývěvy. Vzorková cela byla naplněna mikropipetou na objem 400 $\mu$ l suspenzí jednovrstevných lipozomů v 50mM Tris-HCl pufru o pH 7,0. Referenční cela byla naplněna 400 $\mu$ l stejného pufru. Obě cely byly uzavřeny, po ustálení výstupních hodnot byl nastaven tlak 3atm a bylo spuštěno měření. Sledovaný teplotní rozsah byl 2-55 $^{\circ}$ C. Měření probíhalo ve směru ohřívání i chlazení rychlostí 1 $^{\circ}$ C za minutu. Před začátkem chlazení i ohřívání setrvaly vzorky 10minut ve výchozí teplotě. Měření referenční křivky probíhalo stejným způsobem. Odečet referenční křivky a vyhodnocení získaných dat bylo provedeno pomocí softwaru CpCalc, který dodal výrobce diferenciálního skenovacího kalorimetru (Calorimetry Sciences Corporation, USA).

Při výměně vzorků (např. nové lipidy s jinou membránově aktivní látkou) bylo nutné vymýt obě cely alespoň 300ml destilované vody. Po každém čištění cel byla znovu naměřena referenční křivka, která byla použita pro vyhodnocování následně naměřených křivek pro vzorky lipidů.



**Obr. 35** Schéma diferenciálního skenovacího kalorimetru.

1-platinový teploměr, 2-teplotní kontrolní jednotka, 3-obvod měřící teplotu, 4-Peltierovy články, 5-převod analogového signálu na digitální, 6 a 7-měřící cely, 8-polovodičový termosenzor, 9 a 10 topná tělesa, 11-plášť, 12-zpětnovazební kontrolní algoritmus, 13-výstupní soubor, 14-amplifikace signálu, 15-napěťový kompenzační můstek, 16-manostat, 17-tlakový senzor, 18-měření tlaku. Komponenty ve čtverci představují součásti softwaru (převzato z PRIVALOV et al. 1995).

### 3.15. Cholesteryl-hemisukcinát

Cholesteryl-hemisukcinát (CHS) je špatně rozpustný ve vodném prostředí. Byl proto připraven zásobní roztok CHS v tetrahydrofuranu, který byl dále ředěn fosfátovým pufrům.

#### Fosfátový pufr:

NaCl.....8g  
 KCl.....0,2g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O.....2,68g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,24g  
 destilovaná H<sub>2</sub>O.....ad 800ml

Bylo upraveno pH na 7,4 pomocí HCl, doplněno destilovanou vodou do 1000ml. Fosfátový pufr byl skladován při pokojové teplotě.

#### Zásobní roztok CHS:

- 250mg CHS na 1ml tetrahydrofuranu

Zásobní roztok CHS byl zředěn v poměru 1:500 fosfátovým pufrům s 3,5% poly(n-vinyl 2-pyrrolidonu) a 2% hovězím sérumalbuminem. Roztok byl sonikován po dobu 30s (sonikátor Hielscher).

## 4 Výsledky

Tato práce se zabývá senzorem membránové fluidity DesK, který je součástí dvoukomponentového systému DesK/DesR. Systém DesK/DesR registruje snížení fluidity membrány vlivem poklesu vnější teploty. Jako odpověď spouští transkripci genu *des*, který kóduje desaturázu mastných kyselin. Desaturáza zavádí dvojnou vazbu do řetězců mastných kyselin membránových fosfolipidů, tím membránu opět ztekucuje.

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda lze pomocí membránově aktivních látek pozměnit fluiditu membrány tak, aby na tuto změnu reagoval senzor DesK změnou signalizace.

První experimenty byly zaměřeny na hledání podmínek, ve kterých je exprimován gen *des*. Zkoumány byly situace, kdy bakteriální kultura rostla při různých stálých teplotách, dále pak situace po náhlém snížení kultivační teploty. Na základě těchto výsledků byly vybrány podmínky, při kterých by se dal sledovat vliv membránově aktivních látek na aktivitu promotoru genu *des*. Byl vypracován a optimalizován protokol pro testování těchto látek a bylo zkoumáno působení některých vybraných látek jak s rigidizujícím, tak fluidizujícím účinkem.

Vliv membránově aktivních látek na aktivitu promotoru genu *des* byl porovnán s účinkem těchto látek na změny fluidity membrány, které byly měřeny *in vitro* pomocí různých biofyzikálních metod – měření anizotropie fluorescence DPH, generalizované polarizace Laurdanu a diferenciální skenovací kalorimetrie. Každá z těchto metod zachycuje jiný fyzikální parametr membrány, který popisuje stav membrány – její fluiditu a fázový stav.

Porovnáním aktivity promotoru genu *des* za různých podmínek a sledování membránové fluidity *in vitro* bylo možné určit, jaké vlastnosti a jak velké změny těchto vlastností membrány vyvolají změnu signalizace zprostředkovanou proteinem DesK.

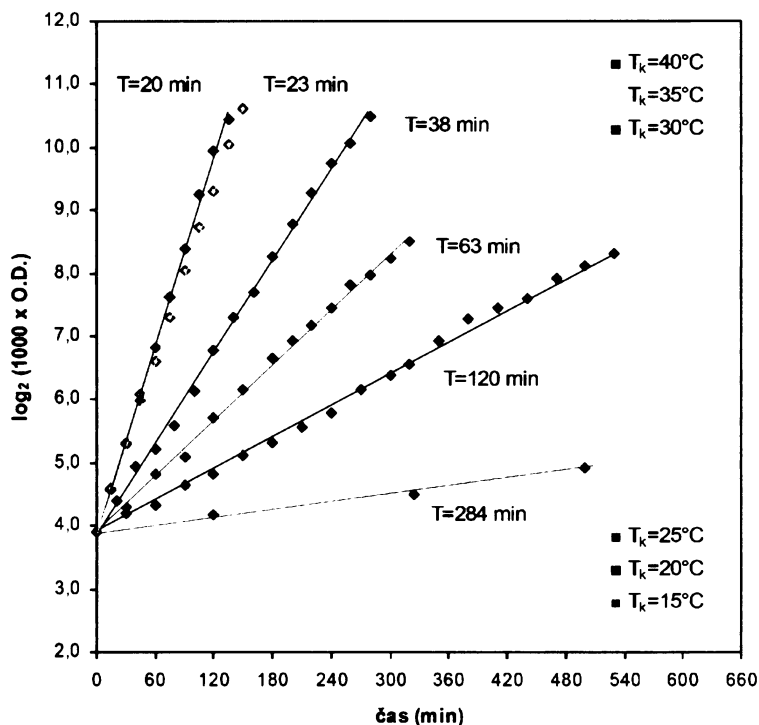
### 4.1. Růstová charakteristika *Bacillus subtilis* M19

Růst kmene *Bacillus subtilis* M19 nebyl zatím v literatuře popsán. Před zahájením vlastních experimentů bylo nutné zmapovat růst tohoto kmene za různých teplotních podmínek. Pro všechny teplotní podmínky byl zjištěn průběh růstové křivky

a stanovena doba zdvojení  $T$  (viz kapitola 3.7). Byly studovány dvě základní situace – vyvážený růst ve stálé teplotě a vliv teplotního skoku na růstovou rychlost.

#### 4.1.1. Růst *Bacillus subtilis* M19 v různých stálých teplotách

Růst *Bacillus subtilis* M19 byl sledován v různých kultivačních teplotách ( $T_k$ ) v teplotním rozsahu 40°C až 15°C. Obr. 36 zachycuje růstové křivky získané kultivací bakterií v  $T_k$  40°C, 35°C, 30°C, 25°C, 20°C a 15°C, kde doby zdvojení činily 20, 23, 38, 63, 120 a 284 minut.

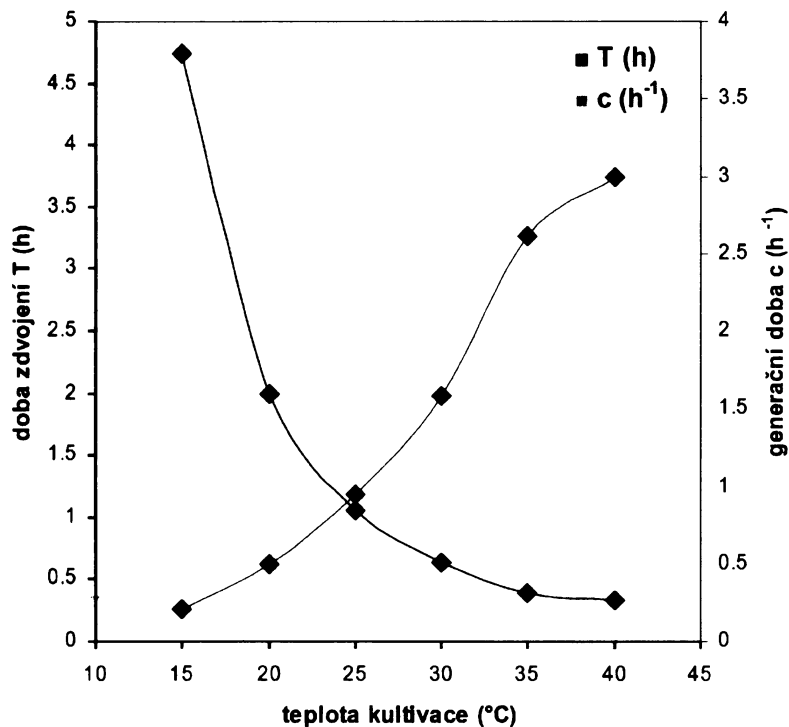


**Obr. 36** Růst *Bacillus subtilis* M19 na komplexním médiu KM1 při různých teplotách kultivace. Výsledné růstové křivky jsou průměrem ze tří nezávislých provedení.  $T$  – doba zdvojení,  $T_k$  – teplota kultivace, O.D.-optická denzita při 450nm.

Doby zdvojení v  $T_k$  40°C a 35°C se příliš nelišily (20 a 23 minut). S dalším snižováním  $T_k$  vždy o 5°C však docházelo přibližně k dvojnásobnému nárůstu doby zdvojení (Obr. 37) - doba zdvojení klesala s rostoucí teplotou zhruba exponenciálně.

Takovýto průběh závislosti doby zdvojení na kultivační teplotě je v souladu s již dříve publikovanými daty. Charakterizací růstu *Bacillus subtilis* 168 se zabývala práce

Svobodové (SVOBODOVÁ 1984). Její výsledky ukazují, že optimální kultivační teplota pro *Bacillus subtilis* 168 je 45°C, kdy roste s dobou zdvojení 14 minut, při kultivaci v nižší teplotě se doba zdvojení zvyšuje také přibližně exponenciálně.



Obr. 37 Závislost doby zdvojení T (levá osa) a generační doby c (pravá osa) na teplotě kultivace.

#### 4.1.2. Růst *Bacillus subtilis* M19 po náhlém snížení kultivační teploty

*Bacillus subtilis* M19 byl kultivován v optimální  $T_k$  (40°C) a po dosažení  $OD_{450nm}$  0,150 (viz kapitola 3.7) byla kultura rychle přenesena do nižší  $T_k$  (35°C, 30°C, 25°C, 20°C nebo 15°C).

Po přenosu kultury z  $T_k$  40°C do  $T_k$  35°C, 30°C a 25°C (Obr. 38), kultura ihned pokračovala v růstu, lag nebyl pozorován. Doba zdvojení se zvýšila z 20 minut pro  $T_k$  40°C na 25 minut po přenosu do  $T_k$  35°C, na 39 minut pro  $T_k$  30°C a na 80 minut pro  $T_k$  25°C.

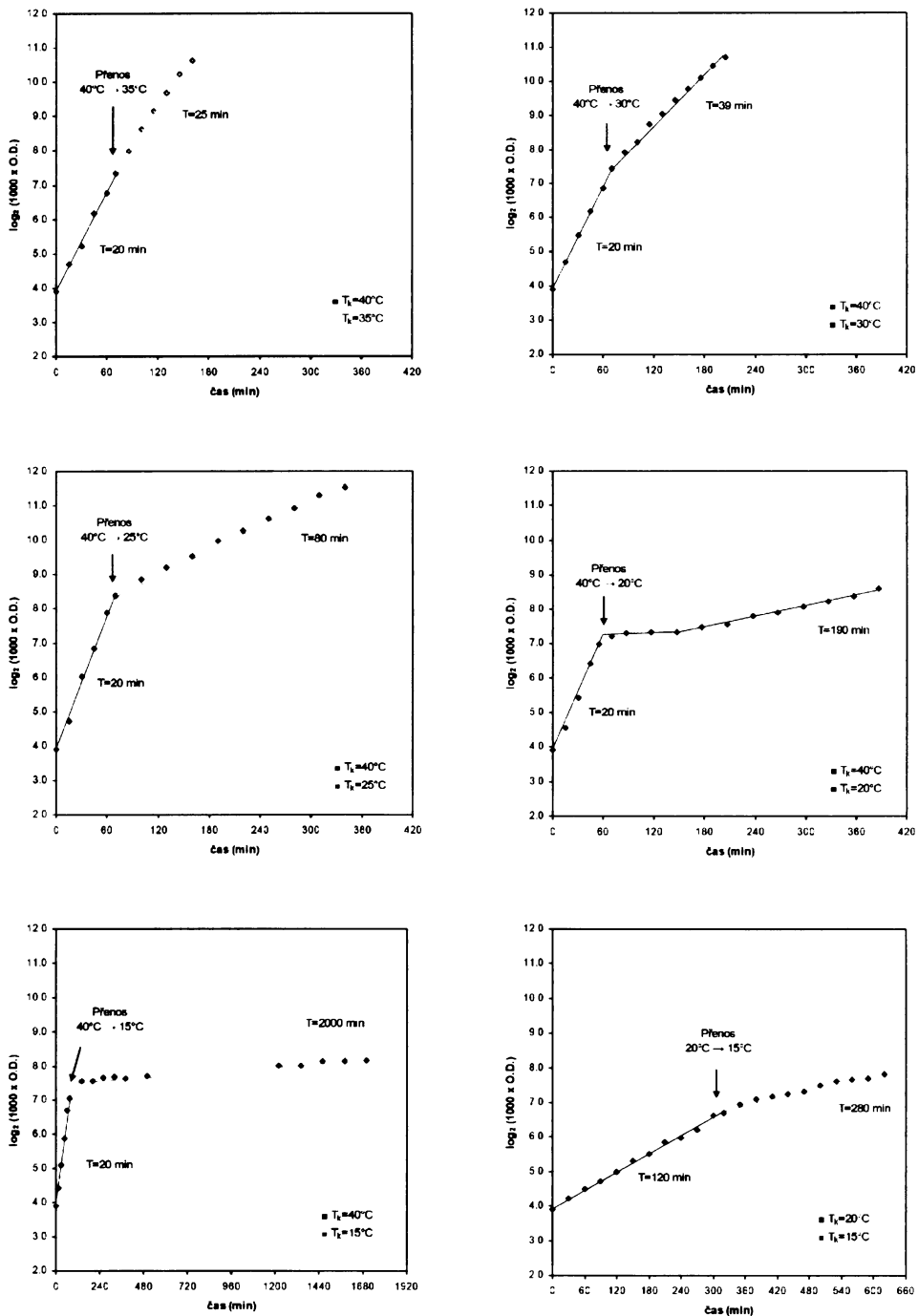


V případě, kdy rozdíl kultivačních teplot činil 20°C (přenos z  $T_k$  40°C do  $T_k$  20°C), byl zaznamenán růstový lag v délce asi 70minut (Obr. 38). Teprve poté byl obnoven růst. Doba zdvojení byla prodloužena na 190 minut, tedy mnohem významněji než v předešlých teplotních skocích.

Po přenosu z  $T_k$  40°C do  $T_k$  15°C (Obr. 38) došlo k zastavení růstu na několik hodin. Potom kultura pokračovala v růstu, ovšem s velmi dlouhou dobou zdvojení (2000 minut).

Byla zkoumána také situace, kdy bakterie byly kultivovány v  $T_k$  20°C a posléze přeneseny do  $T_k$  15°C (Obr. 38). V  $T_k$  15°C kultura ihned pokračovala v růstu s dobou zdvojení 280 minut, růstový lag nenastal.

Porovnáme-li růst bakteriální kultury v nízké teplotě ( $T_k$  15°C) s růstem kultury po chladovém šoku (přenos kultury z  $T_k$  40°C do  $T_k$  15°C) je zřejmé, že na celkovou bakteriální fyziologii, jejímž měřítkem může být růstová rychlost, má větší vliv náhlé snížení kultivační teploty než sama nízká teplota. Z růstových křivek získaných sledováním růstu bakterií po teplotních skocích z  $T_k$  40°C do  $T_k$  15°C a z  $T_k$  20°C do  $T_k$  15°C vyplývá, že bakteriální buňka je citlivější k rozdílu mezi  $T_k$  před šokem a po šoku než k absolutní nízké teplotě, do které je přenesena z vyšší teploty. Při dlouhodobé kultivaci v nízké teplotě  $T_k$  20°C jsou bakteriální buňky chladově adaptované a další snížení kultivační teploty ( $T_k$  15°C) nemá na jejich fyziologie tak výrazný vliv.



**Obr. 38** Růstové křivky *Bacillus subtilis* M19 při přenosu mezi různými teplotami kultivace ( $T_k$ ). Přenos kultury byl proveden při  $\text{OD}_{450\text{nm}}$  asi 0,150, na obrázcích je vyznačen šipkou. T – doba zdvojení v minutách před a po chladovém šoku. Grafy ukazují průměr za tři nezávislé provedení.

## 4.2. Aktivita promotoru genu *des*

Senzor membránové fluidity DesK vnímá změny fluidity vyvolané poklesem vnější teploty. Jako odpověď na sníženou fluiditu membrány je indukována exprese genu *des*, který kóduje desaturázu mastných kyselin. Aktivita promotoru genu *des* (*Pdes*) byla sledována pomocí reportérového genu *lacZ*, respektive stanovením aktivity  $\beta$ -galaktosidázy (viz kapitola 3.8). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy vypovídá o tom, za jakých teplotních podmínek je *Pdes* aktivní, tedy o tom, na jakou změnu fluidity vyvolanou změnou vnější teploty reaguje DesK. Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy byla stanovována ve dvou základních situacích: po přenosu rostoucí kultury do nižší kultivační teploty a v různých stálých teplotách.

### 4.2.1. Aktivita promotoru genu *des* po teplotních skocích

Prvním úkolem bylo zjistit, jak velká teplotní změna je potřebná k indukci exprese  $\beta$ -galaktosidázy. Dále pak ověřit, zda velikost exprese  $\beta$ -galaktosidázy závisí na velikosti teplotní změny, jak naznačují již publikované výsledky (CYBULSKI et al. 2002).

Za tímto účelem byly provedeny experimenty, při nichž kultura *Bacillus subtilis M19* rostla za optimální  $T_k$  40°C a po dosažení určité  $OD_{450nm}$  (kapitola 3.7) byla přenesena do nižší  $T_k$  (do 35°C, 30°C, 25°C, 20°C nebo do 15°C). Po přenosu do nižší  $T_k$  byly odebírány vzorky pro stanovení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity (v Millerových jednotkách - MU, kapitola 3.8). Maximální hodnoty MU a průběh závislosti  $\beta$ -galaktosidázové aktivity na čase jsou zachyceny na Obr. 39

Po přenosu bakteriální kultury z optimální  $T_k$  40°C do nižší  $T_k$  35°C, 30°C, 25°C a 20°C byl pozorován obdobný průběh  $\beta$ -galaktosidázové aktivity v čase. Aktivita nejprve stoupala, až dosáhla svého maxima a poté postupně klesala. To odpovídá již publikovaným výsledkům, *des* mRNA se v buňce po chladovém šoku objeví pouze přechodně (AGUILAR et al. 1999). Chladový šok 40-15°C, tedy teplotní rozdíl 25°C, je pro bakteriální buňku pravděpodobně příliš velký. Kultura pro přenosu do 15°C nerostla několik hodin (Obr. 36), po obnovení růstu byla doba zdvojení 2000 minut.  $\beta$ -galaktosidázová aktivita byla oproti očekávání velmi nízká i 25 hodin po chladovém šoku. Stejně jako v případě přenosu kultury z  $T_k$  40°C do  $T_k$  15°C se i po chladovém

šoku 40-20°C objevil růstový lag, který vypovídá o větším efektu chladového šoku na buňku, a zároveň snížení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity.

Nejvyšší  $\beta$ -galaktosidázová aktivita byla zjištěna pro chladový šok z  $T_k$  40°C do  $T_k$  25°C, která činila 478 MU dvě hodiny po přenosu kultury do nižší  $T_k$ . Pro chladové šoky z  $T_k$  40°C do  $T_k$  30°C a do  $T_k$  20°C byla naměřena podobná maxima  $\beta$ -galaktosidázové aktivity 256 MU (jednu hodinu po přenosu 40-30°C) a 259 MU (čtyři hodiny po přenosu 40-20°C).

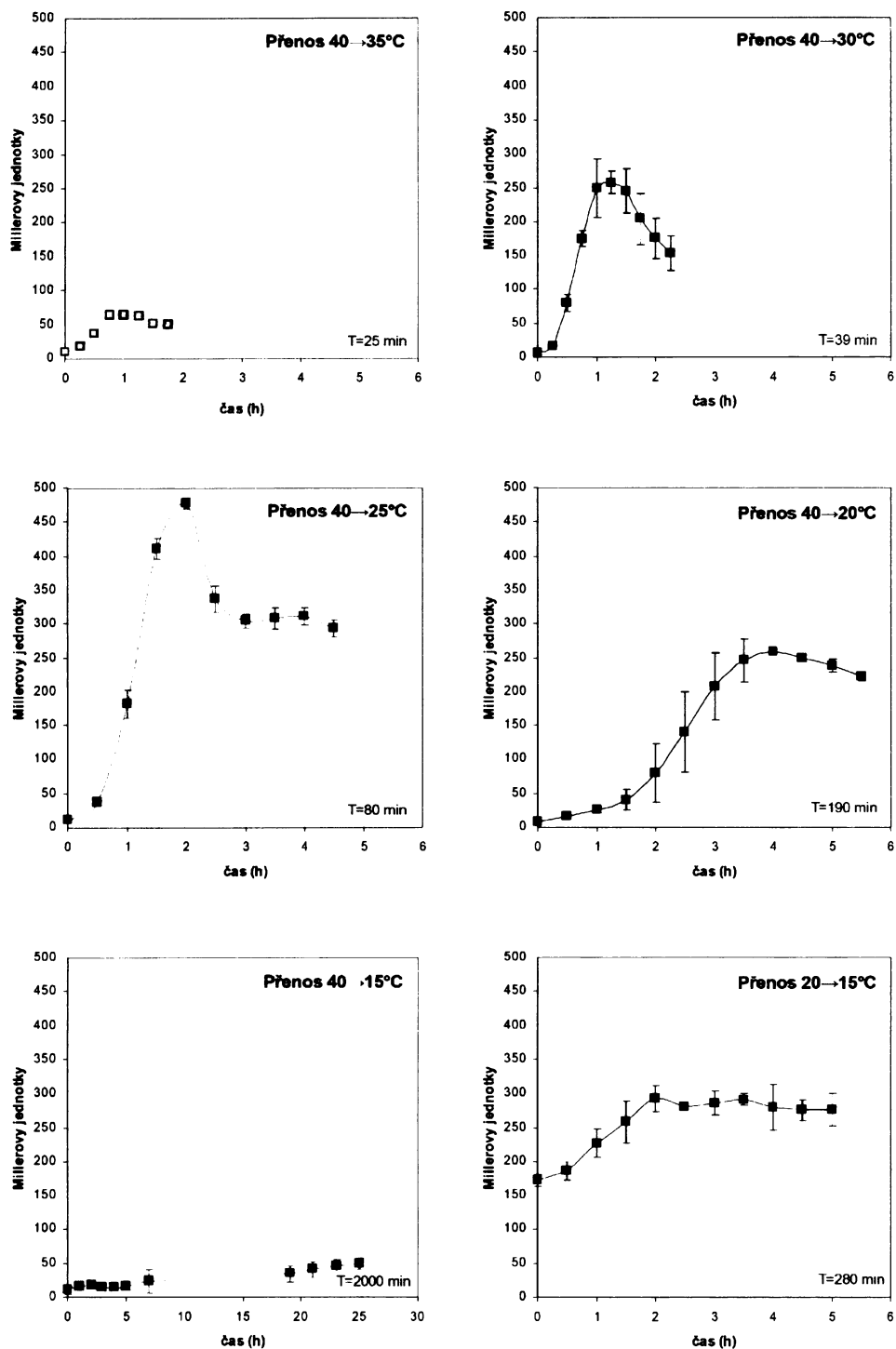
Bakteriální kultura po přenosu do různých nižších teplot rostla s odlišnými dobami zdvojení (kapitola 4.1.2), proto jsou maxima  $\beta$ -galaktosidázové aktivity vzájemně posunuta v čase (Obr. 39). Hodnoty MU pro jednotlivé chladové šoky byly proto vyneseny proti optické denzitě, aby byl eliminován rozdíl v růstových rychlostech (Obr. 40). Pro názornost byly výsledky ještě ukázány v souhrnných grafech na Obr. 41, které lépe popisují efekty jednotlivých tepelných přenosů a umožňují snadněji porovnávat aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po různých teplotních skocích. Z grafu na Obr. 41, který zachycuje aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po chladových šocích v závislosti na čase, je vidět, že nástup  $\beta$ -galaktosidázové aktivity je u jednotlivých šoků vzájemně posunut. Při větším teplotním skoku se více opoždí nárůst  $\beta$ -galaktosidázové aktivity. Ve sledovaném časovém rozmezí (6 hodin po chladovém šoku) se aktivita  $\beta$ -galaktosidázy v případě chladového šoku 40-15°C vůbec nezvýšila. Po vynesení aktivity  $\beta$ -galaktosidázy v závislosti na  $OD_{450nm}$  (Obr. 41 vpravo) je vidět, že aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po přenosu z  $T_k$  40°C do  $T_k$  30°C, 25°C a 20°C narůstá v závislosti na optické denzitě se stejnou směrnicí. Posun aktivity  $\beta$ -galaktosidázy na Obr. 41 vlevo je tedy opravdu zapříčiněn rozdílnou dobou zdvojení po různě velkých teplotních přenosech. Je zajímavé, že aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po nejmenším a největším chladovém šoku (40-35°C a 40-15°C) narůstala stejným způsobem. To by bylo možné vysvětlit tím, že chladový šok 40-35°C není buňkou vnímán jako příliš velký teplotní skok, proto je dostačující celkově menší a opožděná aktivita  $\beta$ -galaktosidázy. Naproti tomu chladový šok 40-15°C je pro buňku příliš velký a buňka nemusí mít dostačující kapacitu pro výraznější transkripci z *Pdes*.

Jak ukazuje souhrnný graf na obrázku Obr. 41 maximum  $\beta$ -galaktosidázové aktivity bylo dosaženo kolem  $OD_{450nm}$  asi 0,500. Proto byla aktivita  $\beta$ -galaktosidázy pro jednotlivé chladové šoky v této optické denzitě vybrána k porovnání dosažených maxim  $\beta$ -galaktosidázové aktivity pro všechny chladové šoky a vynesena do grafu na Obr. 42. Zde je dobře vidět, že se s větším chladovým šokem (větším rozdílem mezi optimální

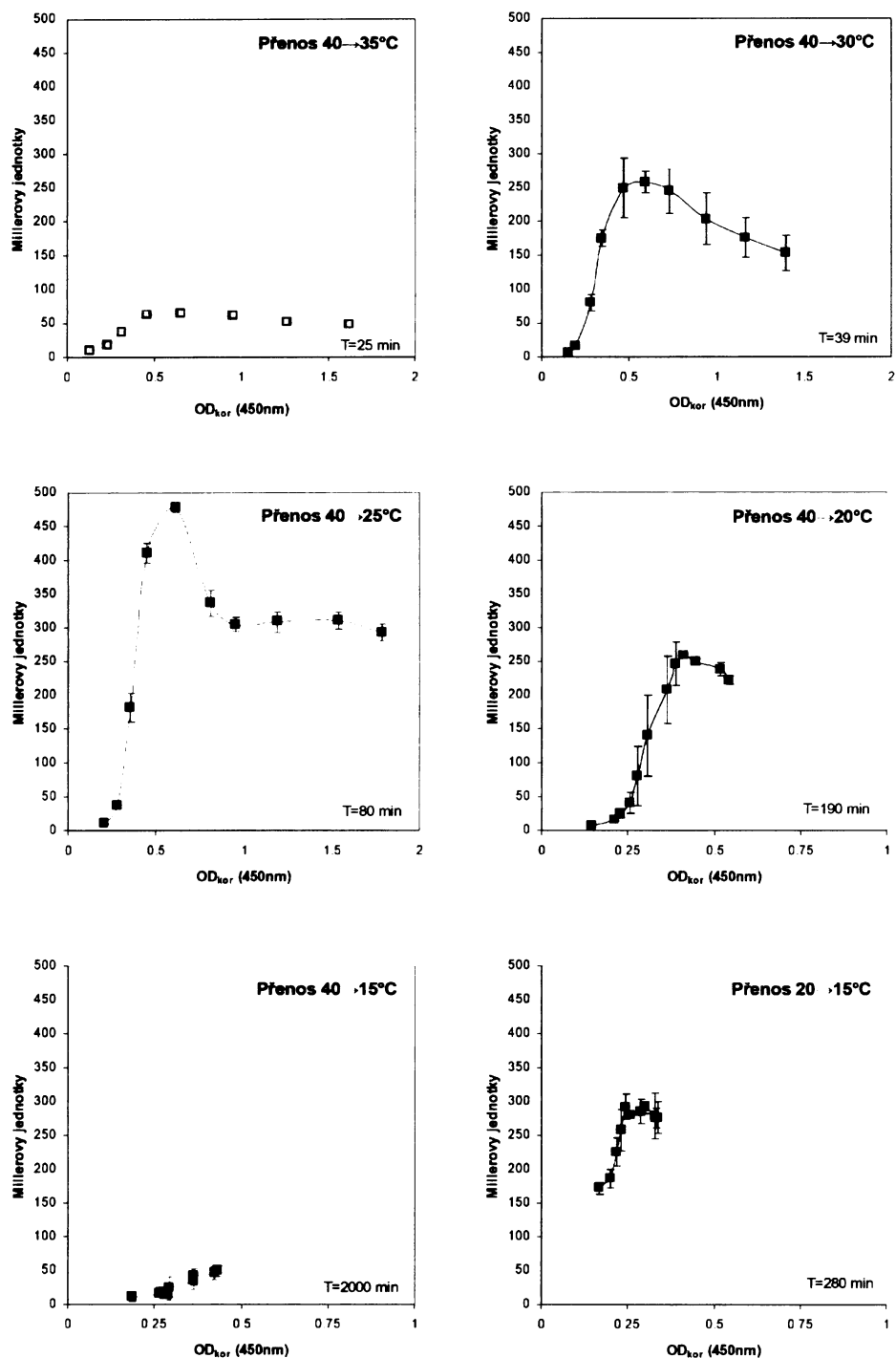
teplotou kultivace a nižší  $T_k$ ) zvyšuje aktivita  $\beta$ -galaktosidázy, ale pouze do teplotního rozdílu  $15^\circ\text{C}$ . Při větších teplotních skocích byl naopak pozorován menší nárůst  $\beta$ -galaktosidázové aktivity.

Další otázkou bylo, zda pro senzor membránové fluidity DesK je důležitá změna membránové fluidity vyvolaná snížením teploty nebo zda vnímá určitou fluiditu membrány za daných teplotních podmínek.

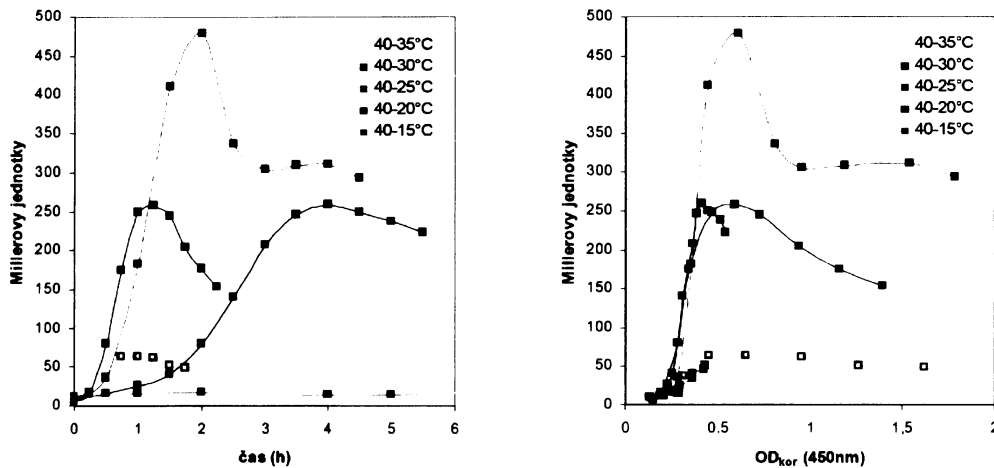
Byl proto proveden experiment, kdy byla bakteriální kultura pěstována v  $T_k 20^\circ\text{C}$  a ve stejné optické densitě jako u předchozích teplotních skoků byla přenesena do  $T_k 15^\circ\text{C}$ . Po přenosu do nižší  $T_k$  nebyl pozorován růstový lag, bakteriální kultura ihned pokračovala v růstu s dobou zdvojení typickou pro  $T_k 15^\circ\text{C}$  (Obr. 38). Hodnota  $\beta$ -galaktosidázové aktivity bezprostředně po chladovém šoku byla poměrně vysoká (172 MU) oproti přenosům kultury z  $T_k 40^\circ\text{C}$  do nižších  $T_k$  (Obr. 39 a Obr. 40). Toto pozorování svědčí o tom, že při kultivaci v  $T_k 20^\circ\text{C}$  (před chladovým šokem) je v bakteriální buňce nenulová aktivita promotoru *Pdes*. Tato aktivita po přenosu do  $T_k 15^\circ\text{C}$  dále narůstala až k hodnotám kolem 290 MU. Z porovnání doby zdvojení a  $\beta$ -galaktosidázové aktivity naměřené po chladovém šoku  $40-15^\circ\text{C}$  a  $20-15^\circ\text{C}$  vyplývá, že pokud jsou buňky preadaptovány kultivací v nižší teplotě, s následným přenosem do nižší kultivační teploty se lépe vyrovnávají.



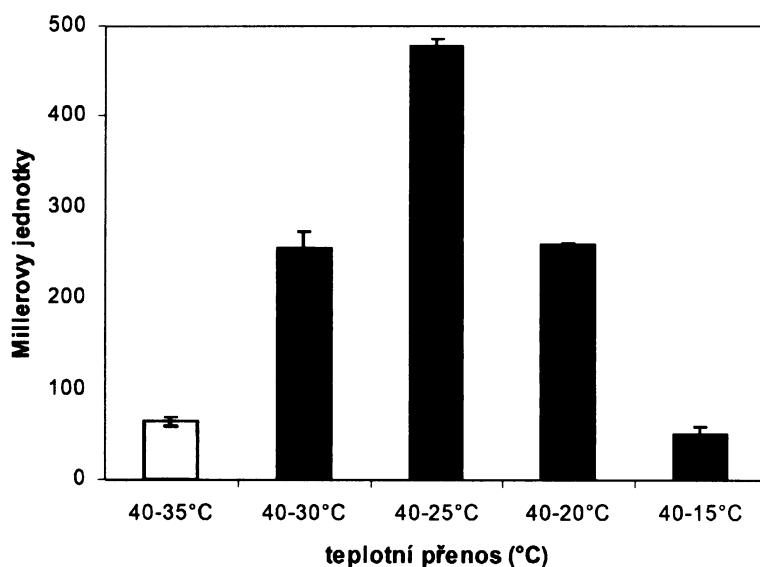
**Obr. 39** Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po přenosu bakteriální kultury *Bacillus subtilis* M19 z vyšší do nižší kultivační teploty ( $T_k$ ). Přenos z  $T_k$  40°C do  $T_k$  35°C je v grafu označen 40→35°C, stejným způsobem jsou označeny ostatní chladové šoky. T (min) - doba zdvojení v minutách. Graf ukazuje průměr ze tří nezávislých provedení. Šok byl proveden po dosažení  $OD_{450nm}$  asi 0,150, pokusy byly ukončeny po dosažení maximální hodnoty aktivity (kromě systému 40 → 15°C, kde probíhal velmi pomalý růst (Obr. 36).



**Obr. 40** Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po přenosu bakteriální kultury *Bacillus subtilis* M19 z vyšší do nižší kultivační teploty ( $T_k$ ) vynesena v závislosti na  $OD_{450nm}$ . Přenos z  $T_k$  40°C do  $T_k$  35°C je v grafu označen 40→35°C, stejným způsobem jsou označeny ostatní chladové šoky. T (min)- doba zdvojení v minutách. Graf ukazuje průměr ze tří nezávislých provedení. Šok byl proveden po dosažení  $OD_{450nm}$  asi 0,150, pokusy byly ukončeny po dosažení maximální hodnoty aktivity (kromě systému 40 → 15°C, kde probíhal velmi pomalý růst (Obr. 36). V případě přenosu 20 → 15°C byla zjištěna vyšší aktivita  $\beta$ -galaktosidázy i před přenosem do nižší  $T_k$ , tedy ve stále  $T_k$  20°C. což potvrdily následující experimenty (Obr. 43).



**Obr. 41** Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po přenosu bakteriální kultury *Bacillus subtilis* M19 z vyšší do nižší kultivační teploty ( $T_k$ ). Přenos z  $T_k$  40°C do  $T_k$  35°C je v grafu označen 40 - 35°C, stejným způsobem jsou označeny ostatní chladové šoky. Graf ukazuje průměr ze tří nezávislých provedení a shrnuje výsledky z předešlých obrázků (Obr. 40 a Obr. 41). Na grafu vlevo je vidět časový posun nárůstu  $\beta$ -galaktosidázové aktivity po chladových šocích. Tento posun je způsoben rozdílnou růstovou rychlostí bakteriální kultury po různě velkém teplotním skoku. Vliv růstové rychlosti je odstraněn vynesemím  $\beta$ -galaktosidázové aktivity proti  $OD_{450nm}$  – graf vpravo.



**Obr. 42** Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy při  $OD_{450nm}$  0,500 po přenosu bakteriální kultury *Bacillus subtilis* M19 z vyšší do nižší kultivační teploty. Přenos z  $T_k$  40°C do  $T_k$  35°C je v grafu označen 40 - 35°C, stejným způsobem jsou označeny ostatní chladové šoky. Graf ukazuje průměr ze tří nezávislých provedení. Každý sloupec zachycuje aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po daném chladovém šoku v  $OD_{450nm}$  0,500.



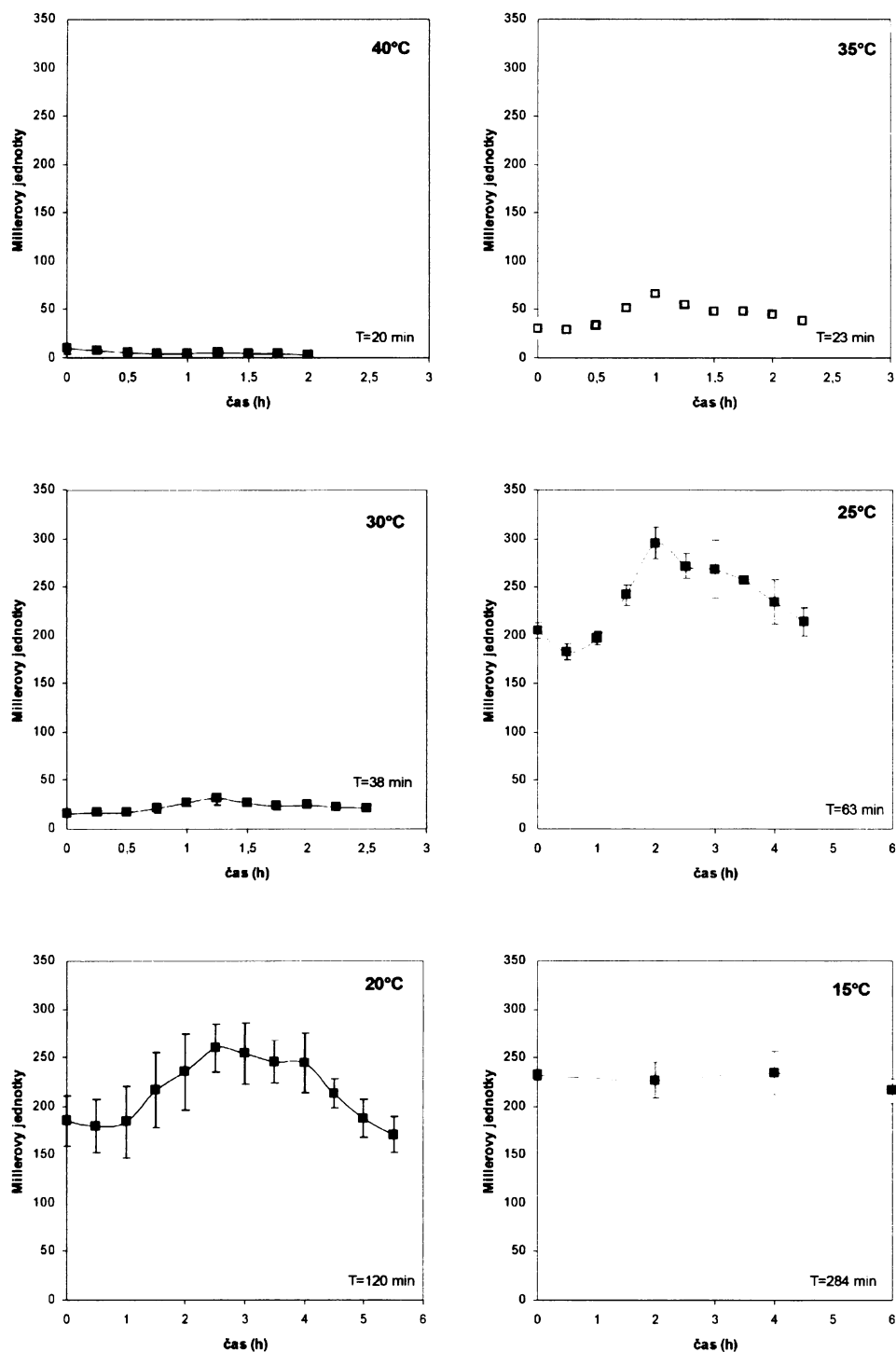
#### 4.2.2. Aktivita promotoru genu *des* v závislosti na teplotě kultivace při stálé teplotě kultivace

Předchozí experimenty (Obr. 39 chladový šok 20-15°C) ukázaly, že i ve stálé nízké teplotě probíhá transkripce z *Pdes*. Pro ověření těchto předběžných výsledků byla provedena série experimentů, kdy byla stanovována  $\beta$ -galaktosidázová aktivita v různých stálých  $T_k$ . Cílem bylo odpovědět na otázku, zda při přenosu do nižší teploty kultivace nedochází pouze k vyrovnání aktivit *Pdes* charakteristických pro jednotlivé teploty kultivace.

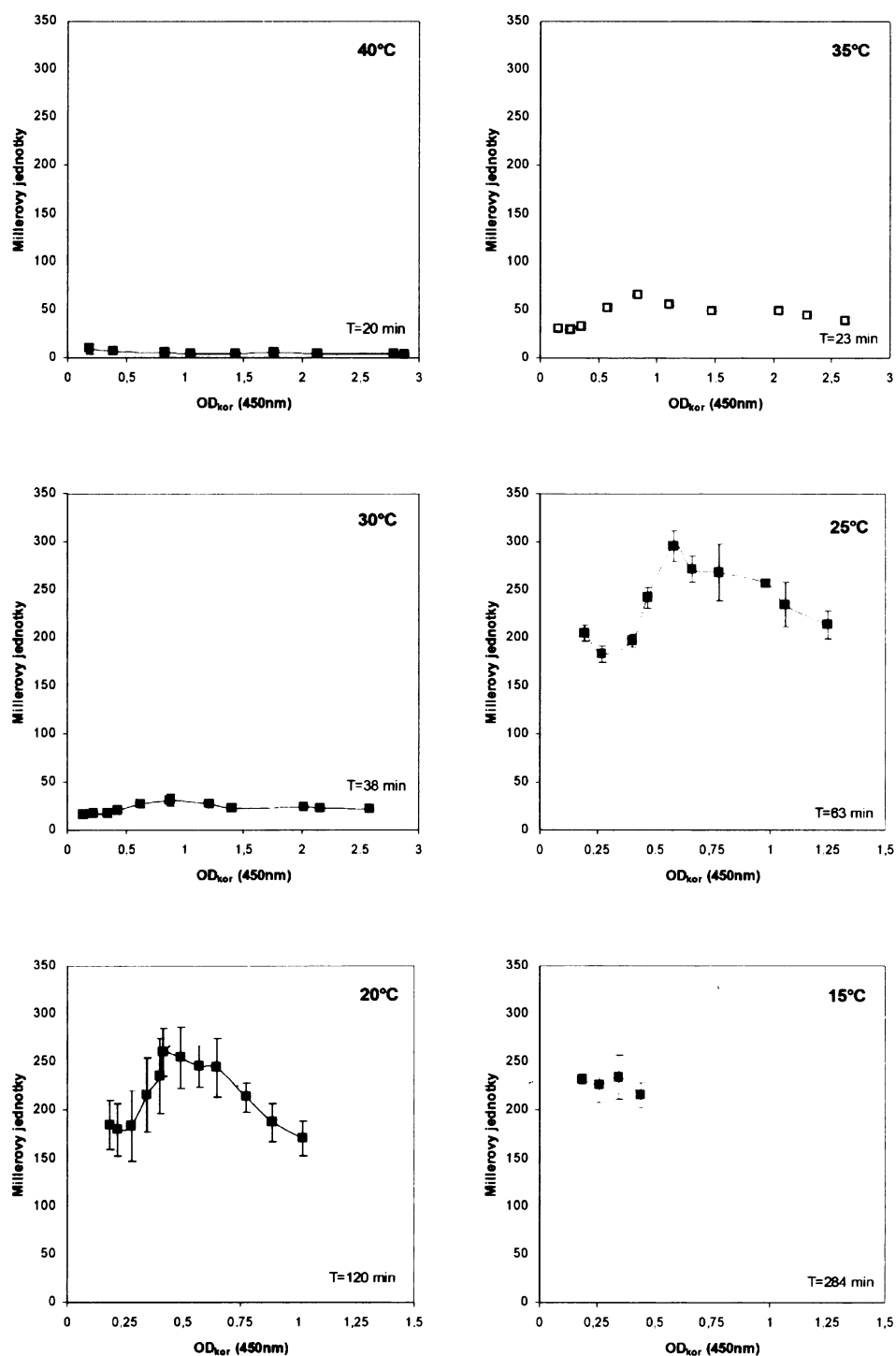
Bakteriální kultura byla pěstována po celou dobu ve stejné  $T_k$  a po dosažení určité optické denzity byly odebírány vzorky na stanovení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity. Aktivita *Pdes* byla sledována v teplotním rozsahu 40°C až 15°C v intervalu 5°C (Obr. 43). V uvedených teplotách rostla bakteriální kultura s různou dobou zdvojení (kapitola 4.1.1), proto byla  $\beta$ -galaktosidázová aktivita sledována různě dlouhý čas (Obr. 43) a opět vynesena proti  $OD_{450nm}$  (Obr. 44).

Z výsledků na obrázcích (Obr. 43 a Obr. 44) je vidět, že  $\beta$ -galaktosidázová aktivita dosahuje v  $T_k$  40°C, 35°C a 30°C pouze nízkých hodnot do 50 MU. V nižších  $T_k$  25°C, 20°C a 15°C  $\beta$ -galaktosidázová aktivita stoupá až k hodnotám kolem 250MU. Průběh  $\beta$ -galaktosidázové aktivity v čase nebyl zatím objasněn. Na otázku, proč aktivita  $\beta$ -galaktosidázy v čase stoupá i ve stálé kultivační teplotě, kdy by měla být konstantní, nebyla nalezena odpověď. Nárůst  $\beta$ -galaktosidázové aktivity v čase nesouvisí asi ani s optickou denzitou, protože v každé teplotě je dosaženo maxima  $\beta$ -galaktosidázové aktivity v jiné optické denzitě (Obr. 44). Ani v dostupné literatuře se dosud nikdo nezabýval průběhem  $\beta$ -galaktosidázové aktivity v čase, nebylo proto možné dosažené výsledky porovnat s již publikovanými.

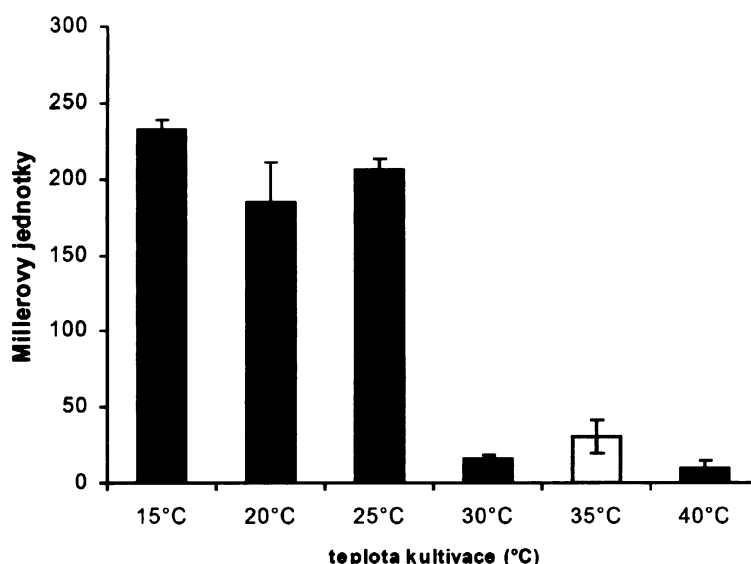
Pro srovnání  $\beta$ -galaktosidázové aktivity v různých stálých teplotách, byly vybrány vždy první naměřené hodnoty (hodnoty v čase měření 0 hodin) a vyneseny do grafu (Obr. 45). Obrázek ukazuje, že jsou zde dvě skupiny teplot: nízké teploty ( $T_k$  15°C, 20°C a 25°C), kdy je  $\beta$ -galaktosidázová aktivita srovnatelně velká, a vysoké teploty ( $T_k$  30°C, 35°C a 40°C), kdy je  $\beta$ -galaktosidázová aktivita srovnatelně nízká. Zajímavý je také ostrý přechod mezi  $T_k$  30°C a  $T_k$  25°C. Tyto výsledky naznačují, že bakteriální buňka ve stálé kultivační teplotě rozlišuje pouze dva stavy membrány: rigidní nebo fluidní membránu, přičemž v  $T_k$  30°C je ještě membránová fluidita dostatečná a v  $T_k$  25°C už buňka pociťuje sníženou fluiditu a reaguje na ni zvýšenou transkripcí z *Pdes*.



**Obr. 43** Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy při kultivaci *Bacillus subtilis* M19 v různých stálých teplotách. Teplota kultivace je vyznačena v každém grafu v pravém horním rohu. T (min) - doba zdvojení v minutách. Graf ukazuje průměr ze tří nezávislých provedení. Odběry na stanovení aktivity  $\beta$ -galaktosidázy byly zahájeny při  $OD_{450nm}$  asi 0,150, pokusy byly ukončeny po dosažení maximální hodnoty aktivity.



**Obr. 44** Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy při kultivaci *Bacillus subtilis* M19 v různých stálých teplotách vynesená proti  $OD_{450nm}$ . Teplota kultivace je vyznačena v každém grafu v pravém horním rohu. T (min) - doba zdvojení v minutách. Graf ukazuje průměr ze tří nezávislých provedení. Odběry na stanovení aktivity  $\beta$ -galaktosidázy byly zahájeny při  $OD_{450nm}$  asi 0,150, pokusy byly ukončeny po dosažení maximální hodnoty aktivity.



**Obr. 45** Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy při kultivaci *Bacillus subtilis* M19 v různých stálých teplotách. Graf ukazuje průměr ze tří nezávislých provedení a shrnuje výsledky zachycené na Obr. 43 a Obr. 44. Každý sloupec představuje hodnotu  $\beta$ -galaktosidázové aktivity naměřenou při prvním odběru na její stanovení, tedy v  $OD_{450nm}$  asi 0,150.

### 4.3. Protokol pro testování membránově aktivních látek

Membránově aktivní látky jsou látky, které ovlivňují fluiditu membrány, mohou způsobovat ztekucení (fluidizaci) nebo naopak ztuhnutí (rigidizaci) membrány. Účinek membránově aktivních látek byl sledován *in vivo* – vliv na dobu zdvojení a aktivitu promotoru genu desaturázy, *in vitro* byla pozorována změna fluidity izolovaných bakteriálních membrán pomocí měření anizotropie fluorescence DPH (kapitola 3.12.1).

Pro nalezení optimálních podmínek pro testování membránově aktivních látek byl zvolen benzylalkohol. Benzylalkohol je známé fluidizační činidlo, jehož účinky na membránu byly prokázány (KONOPASEK et al. 2000).

#### 4.3.1. Teplotní podmínky

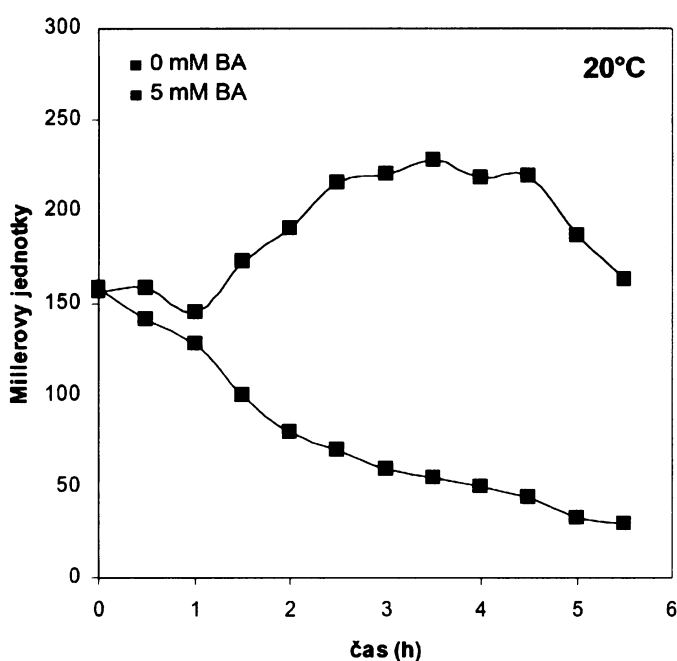
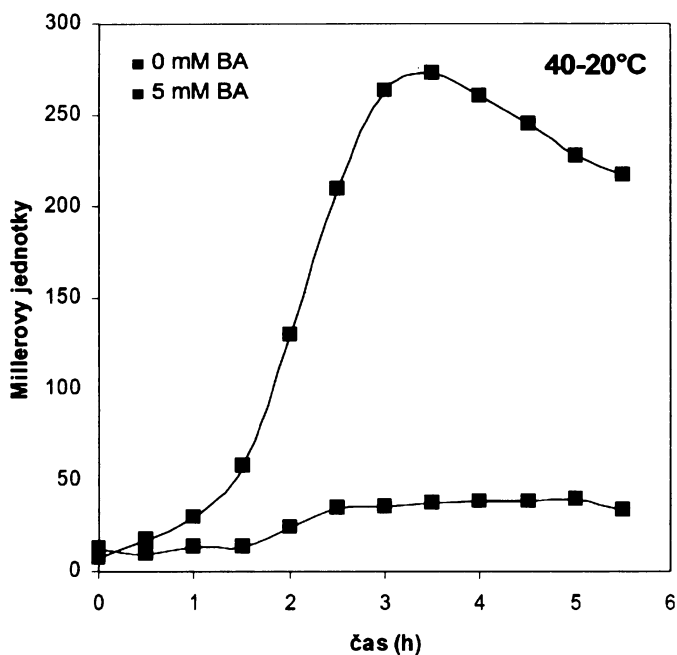
Benzylalkohol jako fluidizační látka by měl v podmínkách, kdy dochází k transkripci z *Pdes*, snižovat fluiditu membrány a tím i expresi genu *des*. Na našem pracovišti se dlouhodobě zabýváme charakterizací odpovědi *Bacillus subtilis*

na chladový šok 40-20°C, proto byl právě tento teplotní pokles vybrán pro otestování vlivu benzylalkoholu na fluiditu membrány a na změnu signalizace proteinem DesK.

Byl proveden experiment, kdy byl 5mM benzylalkohol přidán k rostoucí kultuře těsně před chladovým šokem 40-20°C. Byla porovnána aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C s přidavkem benzylalkoholu a bez benzylalkoholu (Obr. 46 nahoře). Benzylalkohol o koncentraci 5mM snížil aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy velmi výrazně, to znamená, že benzylalkohol snižuje membránovou fluiditu takovým mechanismem, který je schopen zaznamenat senzor membránové fluidity DesK a reagovat na to sníženou transkripcí z *Pdes*.

Další experiment zahrnoval kultivaci bakterií za stálé  $T_k$  20°C. Když bakteriální kultura dosáhla  $OD_{450nm}$  0,150, byl přidán 5mM benzylalkohol a byly odebrány vzorky na stanovení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity. Aktivita v porovnání s kontrolním vzorkem bez přidavku benzylalkoholu klesala (Obr. 46) - to znamená, že transkripce z *Pdes* byla vypnuta a již nasyntetizovaná  $\beta$ -galaktosidáza byla vyředována v rostoucích buňkách. Benzylalkohol je schopen nejenom zabránit expresi genu *des* po chladovém šoku, ale také už probíhající transkripci ve stálé  $T_k$  20°C zastavit.

Vzhledem k nejasnostem v průběhu  $\beta$ -galaktosidázové aktivity v čase ve stálé  $T_k$  20°C (kapitola 4.2.2), byl zvolen pro další testování membránově aktivních látek chladový šok 40-20°C, který umožňuje lepší porovnání účinku těchto látek na aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy.



**Obr. 46** Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy v různých teplotních podmínkách po působení 5mM benzylalkoholu. Graf nahoře: aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C bez přidavku (modře) a s přidavkem benzylalkoholu (červeně). Benzylalkohol byl přidán těsně před chladovým šokem, v  $OD_{450nm}$  asi 0,150. Graf dole: aktivita  $\beta$ -galaktosidázy ve stálé teplotě kultivace 20°C bez přidavku (modře) a s přidavkem benzylalkoholu (červeně). Benzylalkohol byl přidán v  $OD_{450nm}$  asi 0,150.

#### 4.3.2. Měření anizotropie fluorescence DPH

Účinek membránově aktivních látek *in vitro* byl testován pomocí měření anizotropie fluorescence DPH (kapitola 3.12.1). K izolovaným bakteriálním membránám resuspendovaným v Tris-HCl pufru byl postupně přidáván benzylalkohol na konečnou koncentraci 2mM, 5mM a 10mM při teplotě měření 20°C a 40°C. Po každém přidavku byla změřena anizotropie DPH (Obr. 47 nahoře). Při teplotě měření 20°C byla výchozí anizotropie samotných membrán bez benzylalkoholu 0,250. Se zvyšující se koncentrací benzylalkoholu anizotropie klesala až k hodnotě 0,147. Při měření v teplotě 40°C byla výchozí anizotropie 0,177 a s přidavky benzylalkoholu klesala k hodnotě 0,108. Snižující se hodnota anizotropie fluorescence DPH za stálé teploty vypovídá o fluidizaci membrány vyvolané působením benzylalkoholu.

Přestože předchozí výsledky poskytují informaci o rozdílu hodnoty anizotropie fluorescence mezi 40°C a 20°C a také o změně hodnoty anizotropie po přidavcích benzylalkoholu, není možné spojit tyto změny hodnot anizotropie (změny fluidity) s odpovídající změnou teploty. Pro odhad, jak velký vzestup teploty je imitován přidavkem benzylalkoholu, je nutné změřit teplotní závislost anizotropie DPH v izolovaných bakteriálních membránách a teplotní závislost anizotropie DPH v membránách s přidavkem benzylalkoholu. Ze vzájemného posunu těchto teplotních závislostí anizotropie DPH v membránách lze na ose y (anizotropie DPH) při dané teplotě měření odečíst, jak velkou změnu anizotropie DPH (změnu fluidity) způsobí přidavek benzylalkoholu, a na ose x (teplota, °C) lze zjistit, jak velké teplotní změně odpovídá tato změna fluidity (Obr. 47)

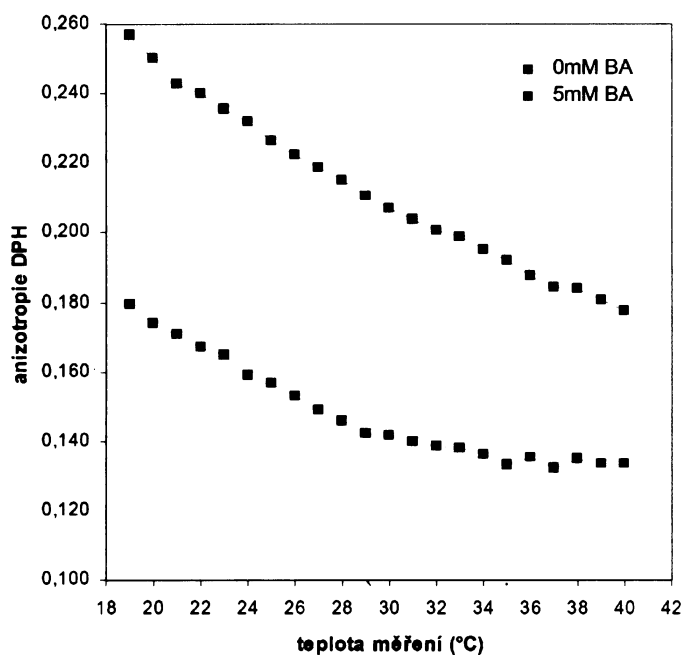
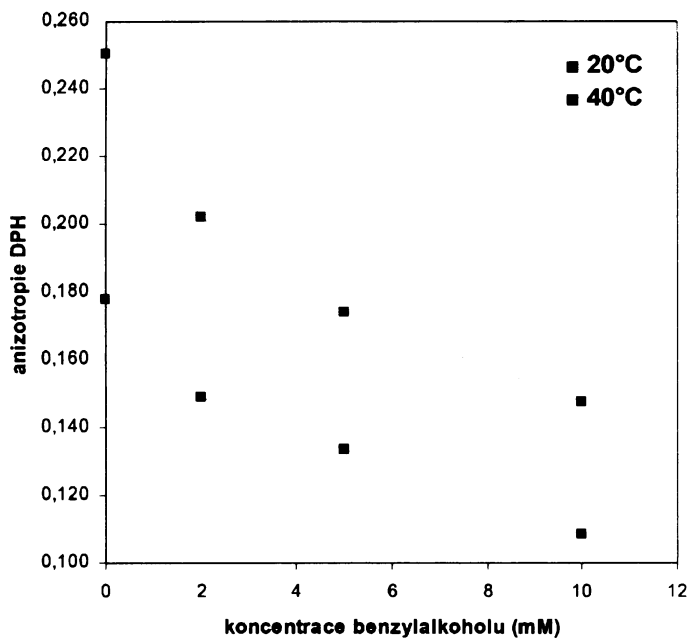
Byly proto naměřeny teplotní závislosti anizotropie DPH. Kontrolním vzorkem byly samotné izolované membrány v pufru, vzorek byl vytemperován na 40°C a poté pomalu ochlazován na 20°C, přitom byla měřena anizotropie DPH. K dalšímu vzorku membrán byl přidán benzylalkohol v konečné koncentraci 5mM, vzorek byl dále zpracován jako vzorek kontrolní. Naměřené teplotní závislosti zachycuje Obr. 47. Z obrázku je patrné, že s klesající teplotou roste hodnota anizotropie DPH, tedy klesá fluidita membrány. U vzorku membrán s přidavkem 5mM benzylalkoholu je teplotní závislost výrazně posunuta směrem k nižším hodnotám anizotropie DPH, to svědčí o zvýšené fluiditě takto ošetřených membrán. Je také vidět, že teplotní závislosti nejsou úplně rovnoběžné, efekt benzylalkoholu na fluiditu membrány byl větší v nižších teplotách. Posun teplotních závislostí (teplotní rozdíl odpovídající stejné hodnotě

## Výsledky

anizotropie u srovnávaných membrán) je možné určit jako rozdíl teplot, které odpovídají stejným hodnotám anizotropie DPH vybraných z jedné a druhé křivky. V tomto případě činil teplotní posun asi 20°C.

Pro další experimenty bylo tedy zvoleno měření anizotropie fluorescence v celém teplotním rozsahu 40°C až 20°C C jako měření s vyšší vypovídací hodnotou a porovnáván posun teplotní závislosti anizotropie DPH vzorku samotných membrán a vzorku membrán po působení membránově aktivní látky.





**Obr. 47** Vliv benzylalkoholu na anizotropii fluorescence DPH izolovaných bakteriálních membrán. Graf nahoře: anizotropie DPH byla měřena ve stálé teplotě 20°C (modře) a 40°C (červeně). Po ustálení hodnot anizotropie DPH byl postupně přidáván benzylalkohol na konečné koncentrace 2mM, 5mM a 10mM. Graf dole: anizotropie DPH byla měřena v závislosti na teplotě. Benzylalkohol o koncentraci 5mM byl k membránám přidán ve 40°C a po ustálení hodnot anizotropie DPH byla naměřena teplotní závislost anizotropie DPH (červeně). Teplotní závislost anizotropie DPH samotných bakteriálních membrán je znázorněna modře.

#### **4.4. Membránově aktivní látky s fluidizačním účinkem: alkoholová řada**

V předchozím experimentu bylo prokázáno, že 5mM benzylalkohol ovlivňuje membránovou fluiditu takovým způsobem, který vnímá senzor membránové fluidity DesK - DesK reaguje na snížení fluidity membrány sníženou transkripcí z *Pdes* (kapitola 4.3.1). Účinky benzylalkoholu na růst bakteriální kultury *Bacillus subtilis* a na fluiditu izolovaných bakteriálních membrán byly již dříve studovány v naší laboratoři (KONOPASEK et al. 2000). Benzylalkohol zkracoval délku růstového lagu po přenosu rostoucí bakteriální kultury z  $T_k$  40°C do 20°C a fluidizoval izolované bakteriální membrány. V této dřívější práci byl také sledován vliv ethanolu. Bylo zjištěno, že ethanol prodlužoval délku růstového lagu po chladovém šoku a mírně ztekuoval izolované bakteriální membrány. Přídavek ethanolu těsně před chladovým šokem zvýšil zastoupení větvených mastných kyselin na úkor nenasycených mastných kyselin (KONOPASEK et al. 2000). I když působení ethanolu na membránu je komplexní proces, který zahrnuje mimo jiné ovlivnění aktivity některých membránově vázaných proteinů (ALMEIDA et al. 1986), snížení obsahu nenasycených mastných kyselin po chladovém šoku vlivem přídavku ethanolu by mohlo vypovídat o vypnutí transkripce genu *des*.

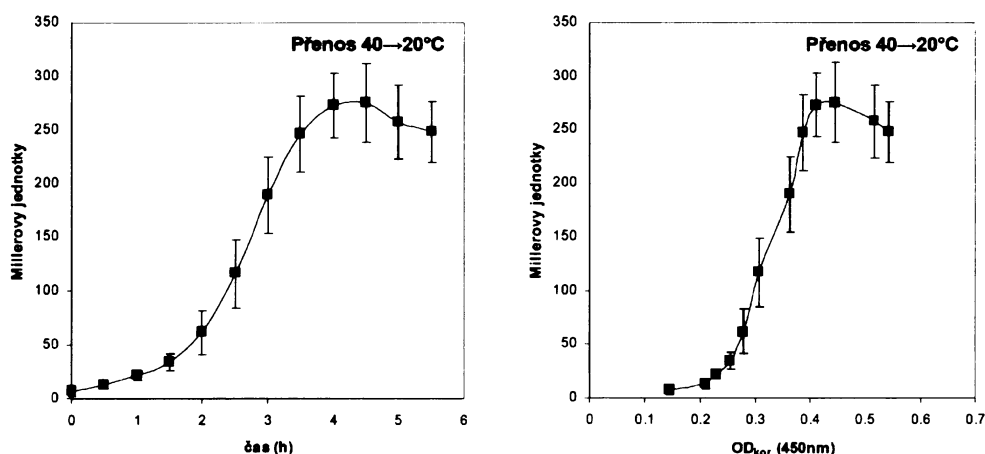
Zatímco benzylalkohol, který patří mezi vyšší alkoholy, narušuje membránovou strukturu v oblasti hydrofobního jádra membrány (INGRAM 1976), v případě ethanolu bylo dokázáno, že se váže do oblasti polárních hlaviček fosfolipidů (BARRY a GAWRISCH 1994). Odlišnost v působení těchto dvou alkoholů je dána jejich různou polaritou. U alkoholů byl prokázán účinek na membránovou fluiditu v závislosti na jejich délce (HO a STUBBS 1997). Podle počtu uhlíků působí alkoholy v různé hloubce membrány. Předpokládala jsem, že senzor membránové fluidity DesK by mohl být citlivý ke změnám fluidity v různé hloubce membrány vyvolané alkoholy s jiným počtem uhlíků a tuto hypotézu jsem testovala v mé práci.

Byly otestovány alkoholy s různě dlouhým uhlíkatým řetězcem: ethanol, propanol, butanol, benzylalkohol a oktanol. Vzhledem k tomu, že délka řetězce určuje nejen místo působení alkoholu v membráně, ale také jak ochotně se bude daný alkohol vázat do membrány, lišily se účinné koncentrace jednotlivých alkoholů i o několik řádů.

Účinek alkoholů byl testován podle výše uvedeného protokolu (kapitola 4.3). Bakteriální kultura byla pěstována v  $T_k$  40°C, dvě minuty před přenosem do  $T_k$  20°C

byl přidán alkohol a po chladovém šoku byly odebírány vzorky na stanovení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity. Byla sledována také změna doby zdvojení po chladovém šoku. Membránová fluidita byla měřena na izolovaných bakteriálních membránách pomocí anizotropie fluorescence DPH v teplotním intervalu  $40^{\circ}\text{C}$  až  $20^{\circ}\text{C}$ .

Při každém sledování vlivu různých koncentrací určitého alkoholu na aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy byla stanovena aktivita v kontrolním vzorku. Kontrolním vzorkem byla rostoucí bakteriální kultura, která byla přenesena z  $T_k$   $40^{\circ}\text{C}$  do  $T_k$   $20^{\circ}\text{C}$ , ale před chladovým šokem nebyl přidán alkohol. V následujících kapitolách je porovnávána  $\beta$ -galaktosidázová aktivita po přidavku alkoholu s kontrolou, která byla naměřena ve stejný den. Proto se aktivita  $\beta$ -galaktosidázy kontrolních vzorků liší v rámci grafů, které shrnují působení několika koncentrací jednoho alkoholu. Průměrná  $\beta$ -galaktosidázová aktivita kontrolních vzorků je vynesena do grafu na Obr. 48. Pokud se  $\beta$ -galaktosidázová aktivita vzorků, ke kterým byl přidán alkohol, pohybovala v rozmezí směrodatných odchylek průměrné  $\beta$ -galaktosidázové aktivity kontrolních vzorků, byla tato aktivita považována za neovlivněnou alkoholem.



**Obr. 48** Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku  $40\text{-}20^{\circ}\text{C}$ . Graf zachycuje průměr z 15 nezávislých provedení.

Alkoholy jako látky s fluidizačním účinkem by měly po chladovém šoku snižovat aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy, působí totiž proti rigidizaci membrány vyvolané náhlým poklesem teploty. Předpokládala jsem tento obecný mechanismus působení alkoholů: po chladovém šoku, kterému předcházel přidavek alkoholu, by membránový protein DesK měl zaznamenat menší ztuhnutí membrány a transkripce z promotoru genu *des* by se měla snížit. Fluidita izolovaných bakteriálních membrán by se měla po

přídavku alkoholů zvýšit a hodnoty anizotropie fluorescence DPH by se měly snížit oproti kontrole bez alkoholu. Je přitom zapotřebí z hlediska tohoto efektu zároveň uvažovat jen takové koncentrace alkoholů, které zároveň jen zanedbatelně ovlivňují růstovou rychlost. U koncentrací, které ovlivňují růstovou rychlost, je nebezpečí, že je pokles transkripce genu *des* vyvolán nespecifickým účinkem alkoholu na transkripci nebo proteosyntézu.

### 4.4.1. Ethanol

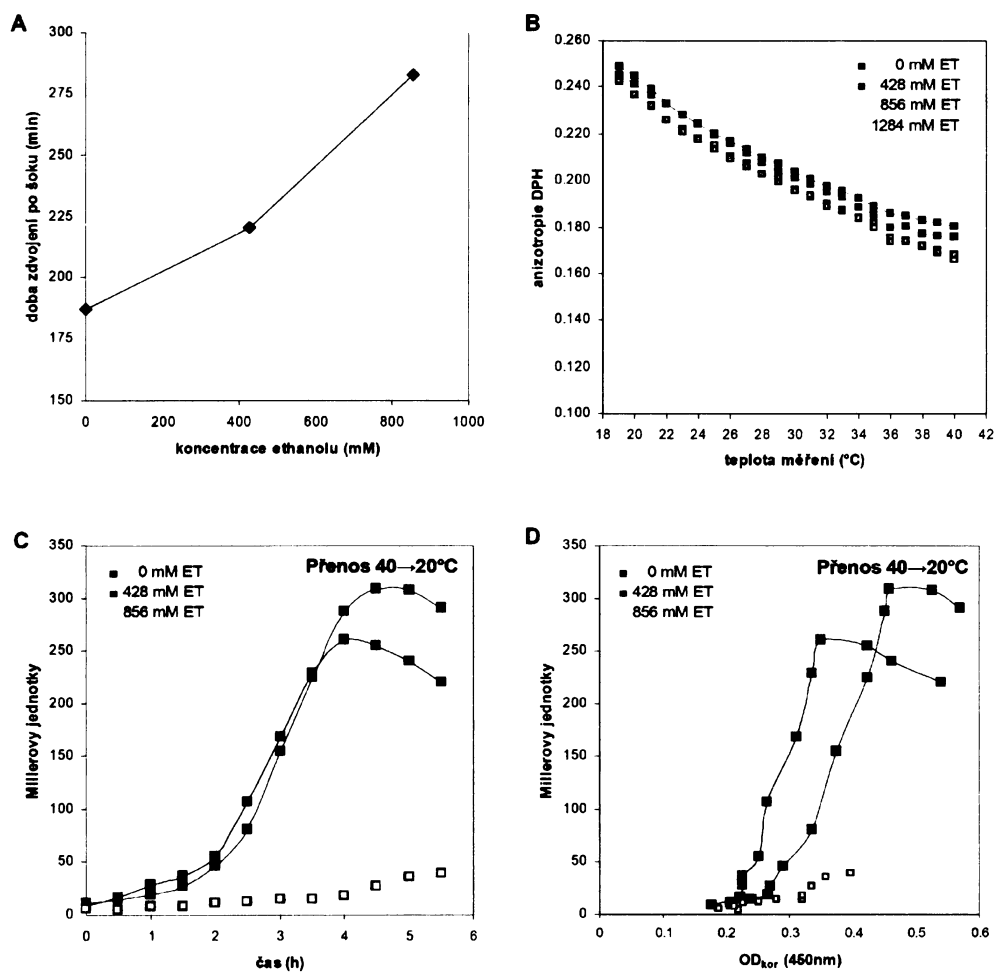
Ethanol je krátká polární molekula, která je dobře mísitelná s vodou, proto se do fosfolipidové dvojvrstvy váže jen omezeně. V oblasti membrány zůstává v blízkosti polárních hlaviček fosfolipidů a neproniká hlouběji do membrány (BARRY a GAWRISCH 1994). Účinné koncentrace, které ovlivňovaly membránovou fluiditu tak, aby byla snížena transkripce z promotoru genu *des*, byly vysoké a výrazně působily na růst bakteriální kultury.

Koncentrace ethanolu 428mM a 856mM (2,5% a 5%) zvýšily dobu zdvojení po chladovém šoku 40-20°C ze 187 minut na 220 a 283 minut (Obr. 49A). Membránová fluidita měřená jako pokles anizotropie fluorescence DPH byla zvýšena vysokou koncentrací ethanolu (856mM) pouze mírně a další zvýšení koncentrace ethanolu (1284mM) nevedlo k dalšímu snížení anizotropie (Obr. 49B). Posun teplotní závislosti anizotropie DPH způsobený 856mM ethanolem činil pouze 2°C (změna anizotropie DPH vyvolaná přídavkem 856mM ethanolu odpovídala takové změně, která by byla způsobena změnou teploty pouze o 2°C).

Pro koncentrace ethanolu 428mM a 856mM byl otestován vliv těchto koncentrací na aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy, která odráží aktivitu přepisu promotoru genu *des*. Nižší koncentrace 428mM nezpůsobila snížení aktivity  $\beta$ -galaktosidázy. Vyšší koncentrace 856mM velmi výrazně snížila aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy (Obr. 49C a Obr. 49D).

Ethanol fluidizuje membrány bakteriálních buněk po chladovém šoku a snižuje tak aktivitu promotoru genu *des*. Na izolovaných membránách však byla naměřena jen malá změna fluidity. To je možné vysvětlit tak, že ethanol působí v oblasti polárních hlaviček fosfolipidů, zatímco hydrofobní sonda DPH se zabudovává spíše do hlubších vrstev membrány (kapitola 3.12). Sonda DPH tak nezachytí změny fluidity vyvolané ethanolem.

Nelze však zcela vyloučit ani možnost inhibičního působení ethanolu na celkovou fyziologii bakteriální buňky včetně inhibice transkripce. Vysoká koncentrace (856mM), která snižuje aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy, zároveň zvyšuje dobu zdvojení téměř o 50% a pravděpodobně narušuje bakteriální buňku nejen na úrovni membrány. Snižování exprese genu *des* může být proto vyvoláno omezením buněčného metabolismu včetně transkripce.



**Obr. 49** Vliv ethanolu (ET) na dobu zdvojení po chladovém šoku 40-20°C (A). Posun teplotních závislostí anizotropie DPH po působení ethanolu (B). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C bez přídavku a s přídavkem ethanolu v závislosti na čase (C). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C bez přídavku a s přídavkem ethanolu v závislosti na OD<sub>450nm</sub> (D).

#### 4.4.2. Propanol

Propanol je krátká polární molekula, která se dobře rozpouští ve vodě. V membráně zůstává v blízkosti polárních hlaviček fosfolipidů, neproniká příliš hluboko do nitra membrány (KIM et al. 1993).

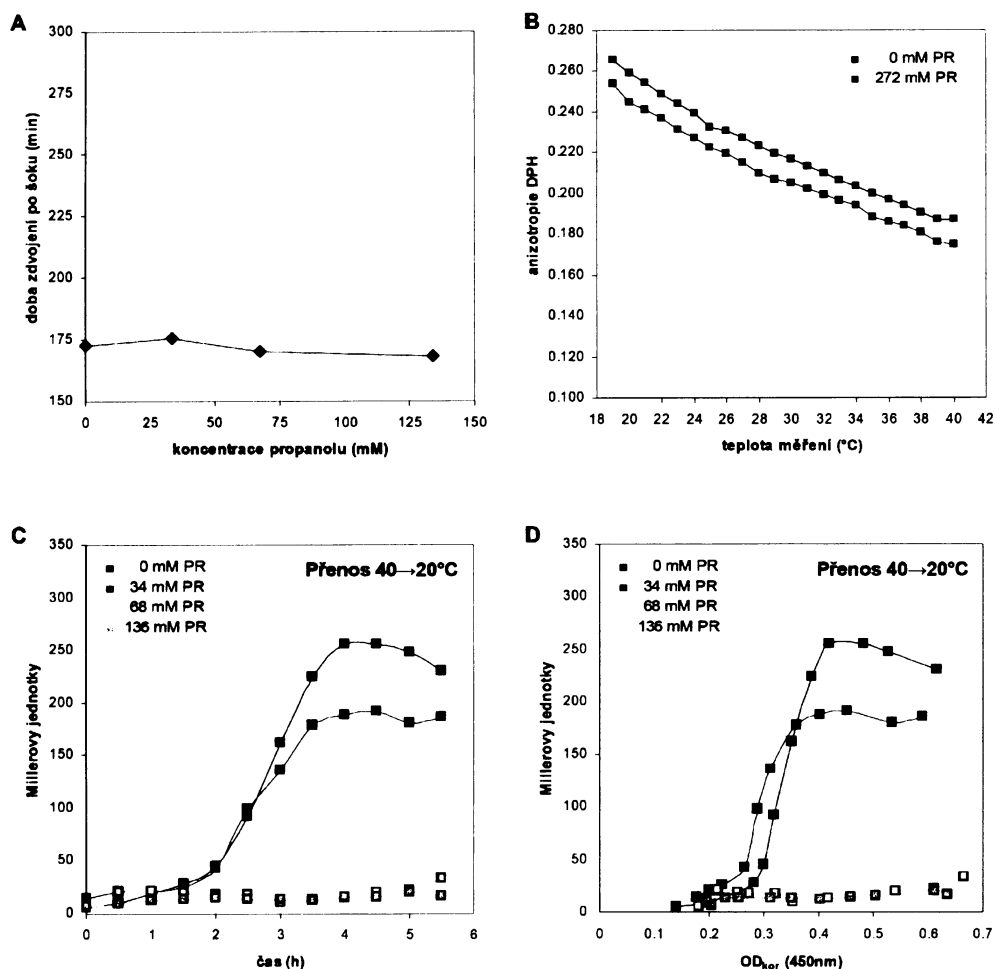
Testované koncentrace propanolu (34mM, 68mM a 136mM) neovlivňovaly dobu zdvojení po chladovém šoku 40-20°C (Obr. 50A). Pro měření anizotropie fluorescence DPH byl vybrán dvojnásobek koncentrace, která ještě nezvyšovala dobu zdvojení. Koncentrace propanolu 272mM vyvolala jen malý posun teplotní závislosti (Obr. 50B). Fluidizace izolovaných membrán propanolem odpovídala zvýšení teploty o 3°C.

Přestože propanol nezpůsobil prodloužení doby zdvojení a fluiditu membrány měřenou pomocí anizotropie fluorescence DPH zvyšoval pouze nepatrně, již koncentrace 34mM mírně snížila aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy a koncentrace 68mM zastavila transkripci z promotoru genu *des* úplně (Obr. 50C a Obr. 50D).

Rozpor mezi malým vlivem vysoké koncentrace (272mM) propanolu na fluiditu izolovaných membrán a výrazným účinkem nižších koncentrací (34mM a 68mM) na aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy, lze vysvětlit stejným způsobem jako v případě působení ethanolu. Propanol ovlivňuje uspořádání membrány spíše v její horní vrstvě v blízkosti polárních hlaviček fosfolipidů, zatímco sonda DPH monitoruje změny v uspořádání hydrofobního jádra membrány.

Protože koncentrace propanolu účinně snižující aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy nezpůsobují nárůst doby zdvojení bakteriální kultury po chladovém šoku, lze vliv propanolu na snížení transkripce z promotoru genu *des* po chladovém šoku interpretovat jako přímý účinek na membránovou fluiditu, který vnímá senzor DesK.

Koncentrace propanolu, které účinně snižovaly aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C, byly přibližně desetkrát nižší než účinné koncentrace ethanolu.



**Obr. 50** Vliv propanolu (PR) na dobu zdvojení po chladovém šoku 40-20°C (A). Posun teplotních závislostí anizotropie DPH po působení propanolu (B). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C bez přídavku a s přídavkem propanolu v závislosti na čase (C). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C bez přídavku a s přídavkem propanolu v závislosti na OD<sub>450nm</sub> (D).

#### 4.4.3. Butanol

Butanol se řadí mezi krátké alkoholy. Je méně polární než alkoholy s kratším řetězcem a s vodou je omezeně mísitelný – přibližně do koncentrace 1M (LY a LONGO 2004). Měl by se tedy do membrány zabudovávat efektivněji než propanol. Protože s délkou uhlíkatého řetězce alkoholu roste jeho účinnost narušování mechanických vlastností membrány (LY a LONGO 2004), měly by být koncentrace snižující aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy nižší než u propanolu. Překvapivě byly ale účinné koncentrace butanolu asi dvakrát větší než u propanolu.

Koncentrace butanolu 100mM a 125mM zvýšily dobu zdvojení po chladovém šoku 40-20°C poměrně málo (194 a 196 minut oproti kontrole, která rostla s dobou zdvojení 180 minut). Koncentrace 150mM měla větší dopad na dobu zdvojení po chladovém šoku (228 minut, Obr. 51A).

Měření vlivu butanolu na fluiditu izolovaných bakteriálních membrán pomocí anizotropie fluorescence DPH odhalilo, že se zvyšující se koncentrací butanolu se zvětšuje posun teplotních závislostí (Obr. 51B). Koncentrace butanolu 100mM způsobila zvýšení fluidity, které by odpovídalo zvýšení teploty o 5°C, koncentrace 125mM o 7°C a koncentrace 150mM o 8°C. Působení butanolu v hlubších vrstvách membrány registruje sonda DPH a na fluidizaci membrány butanolem reaguje změnou svých fyzikálních vlastností.

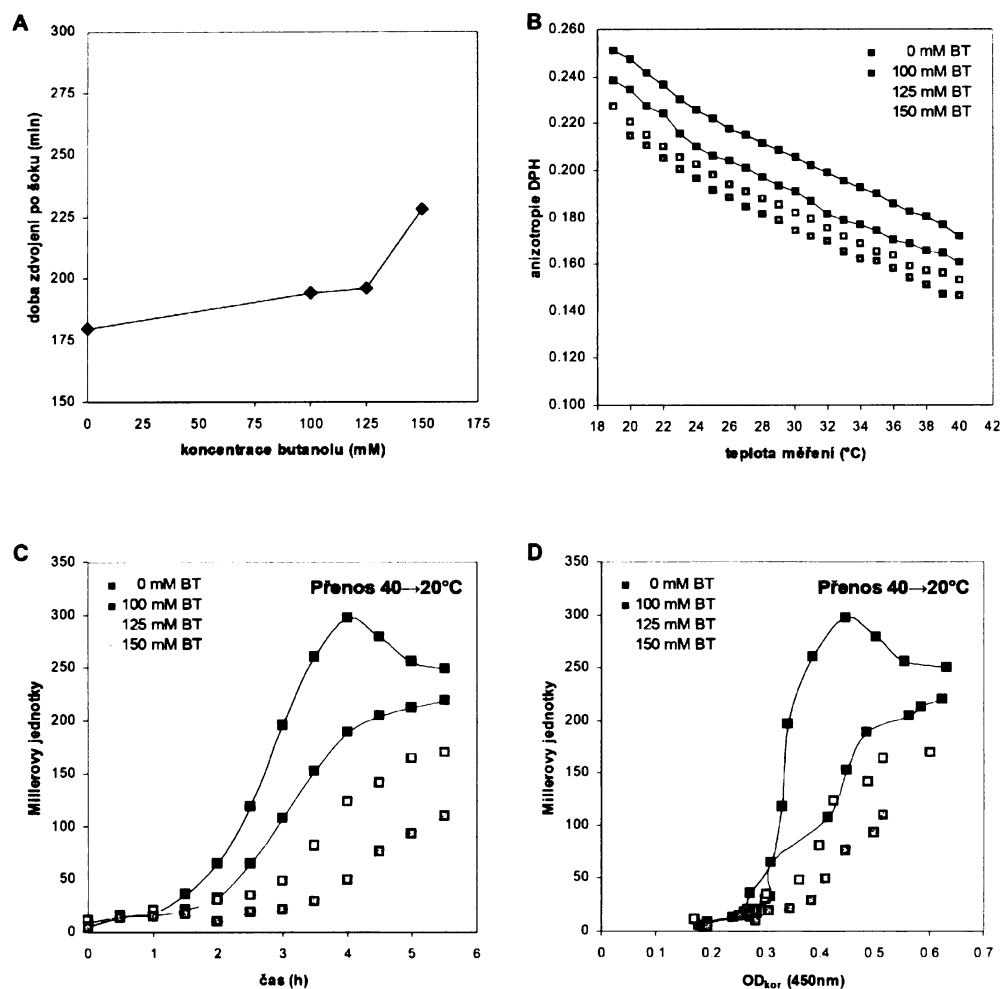
S rostoucí koncentrací butanolu docházelo k postupnému snižování aktivity  $\beta$ -galaktosidázy (Obr. 51C a Obr. 51D). Koncentrace 125mM snížila aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy zhruba o polovinu a zároveň posunula teplotní závislost anizotropie DPH o 7°C, to by znamenalo, že buňka vnímá působení butanolu na membránu jako zvýšení teploty, na které odpovídá sníženou transkripcí z promotoru *Pdes*.

Stejně jako ethanol by butanol také mohl ovlivňovat celkovou fyziologii bakteriální buňky a tím i nespecificky inhibovat transkripci. Snížení aktivity  $\beta$ -galaktosidázy by pak bylo dáno tímto inhibičním vlivem butanolu, přestože koncentrace 100mM a 125mM neměly výrazný vliv na dobu zdvojení po chladovém šoku. Možnost nespecifického toxického působení butanolu na bakteriální buňku však naznačují experimenty, kdy byl vliv butanolu na dobu zdvojení testován v  $T_k$  40°C (Tab. 5). V  $T_k$  40°C koncentrace 100mM (nejnižší koncentrace, která snížila aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku) způsobila zvýšení doby zdvojení o 50%, což vypovídá o výrazném poškození bakteriální buňky.

**Tab. 5** Doby zdvojení *Bacillus subtilis* M19 v  $T_k$  40°C v závislosti na koncentraci butanolu.

koncentrace butanolu (mM)	doba zdvojení T (min)
0	20
50	23
100	30
200	neroste





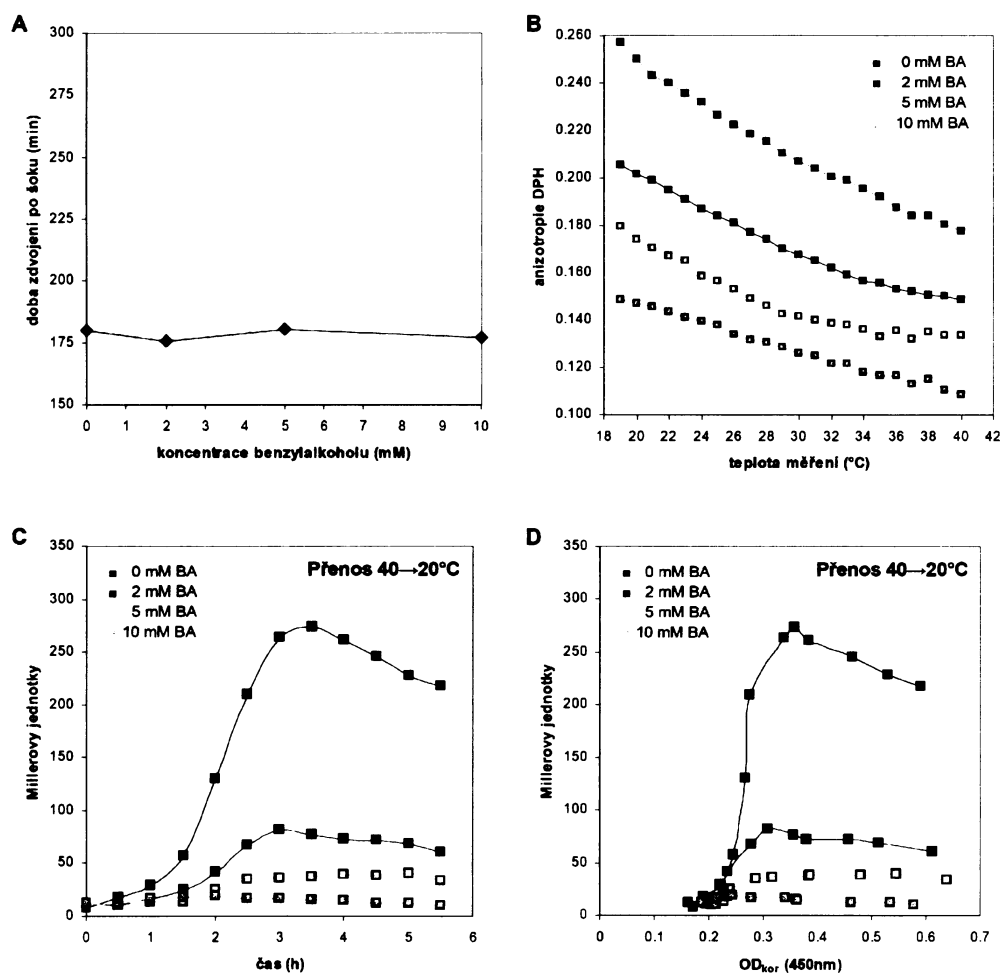
**Obr. 51** Vliv butanolu (BT) na dobu zdvojení po chladovém šoku 40-20°C (A). Posun teplotních závislostí anizotropie DPH po působení butanolu (B). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C bez přidavku a s přidavkem butanolu v závislosti na čase (C). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C bez přidavku a s přidavkem butanolu v závislosti na OD<sub>450nm</sub> (D).

#### 4.4.4. Benzylalkohol

Benzylalkohol má sedm uhlíků dlouhý řetězec, ale od ostatních použitých alkoholů se liší svou strukturou: je to planární cyklická molekula. Benzylalkohol je hydrofobní, dobře se zabudovává do membrány a působí v oblasti hydrofobního jádra membrány (HO a STUBBS 1997). Koncentrace, které účinně snižovaly aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C, byly nízké v řádu několika mM.

Koncentrace benzylalkoholu 2mM, 5mM a 10mM neměly téměř žádný vliv na dobu zdvojení po chladovém šoku 40-20°C (Obr. 52A). Při měření anizotropie

fluorescence DPH byly pro tyto koncentrace zjištěny velké posuny teplotních závislostí (Obr. 52B). Již nejmenší koncentrace benzylalkoholu 2mM způsobila změnu fluidity, která by odpovídala zvýšení teploty o 12°C. Pro koncentraci 5mM to byl posun asi o 20°C a pro nejvyšší použitou koncentraci 10mM byl posun teplotní závislosti tak velký, že se pro měřený teplotní rozsah (40°C až 20°C) nedal určit. Benzylalkohol působí hluboko v membráně, tedy ve stejné oblasti, kterou monitoruje sonda DPH, proto měření anizotropie fluorescence citlivě odhalilo koncentračně závislé fluidizační účinky benzylalkoholu.



**Obr. 52** Vliv benzylalkoholu (BA) na dobu zdvojení po chladovém šoku 40-20°C (A). Posun teplotních závislostí anizotropie DPH po působení benzylalkoholu (B). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C bez přidavku a s přidavkem benzylalkoholu v závislosti na čase (C). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C bez přidavku a s přidavkem benzylalkoholu v závislosti na  $OD_{450nm}$  (D).

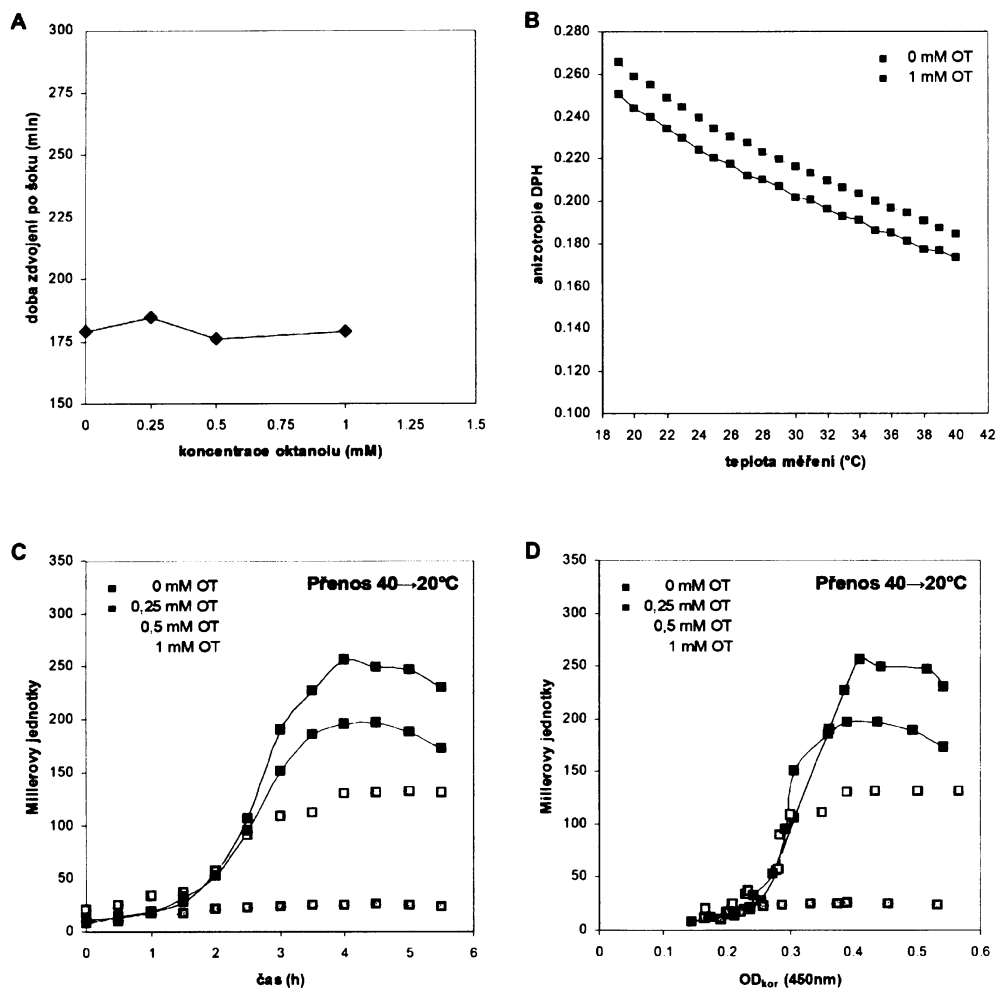
Koncentrace benzylalkoholu 2mM způsobila velké snížení aktivity  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C (Obr. 52C a Obr. 52D). Vyšší koncentrace (5mM a 10mM) zastavily transkripci z promotoru *Pdes* téměř úplně. To je v souladu s výsledky získanými pomocí měření anizotropie fluorescence DPH. Koncentrace 5mM a 10mM zvyšují fluiditu membrány po chladovém šoku natolik, že bakteriální buňka necítí vliv teplotního skoku na fluiditu membrány.

### 4.4.5. Oktanol

Oktanol je tvořen řetězcem osmi uhlíků. Partiční koeficient oktanolu je velmi vysoký ( $\log P=2,97$ ) (LY a LONGO 2004), proto se oktanol velice ochotně váže do membrány. Oktanol byl alkohol s nejdelším uhlíkovým řetězcem použitý v této práci, k ovlivnění membránové fluidity proto postačily nejnižší koncentrace ze všech alkoholů. Koncentrace, které účinně snižovaly aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C, nepřekročily 1mM.

Testované koncentrace oktanolu (0,25mM, 0,5mM a 1mM) neprodložovaly dobu zdvojení po chladovém šoku 40-20°C (Obr. 53A). Anizotropie fluorescence DPH zaznamenala pouze malý posun teplotní závislosti v přítomnosti 1mM oktanolu oproti kontrole. Teplotní posun činil jen 4°C (Obr. 53B).

Aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C snižovaly koncentrace 0,25mM a 0,5mM. Vyšší koncentrace oktanolu (1mM) vypnula transkripci z *Pdes* úplně (Obr. 53C a Obr. 53D). Ze stanovení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity po chladovém šoku v přítomnosti oktanolu vyplývá, že oktanol fluidizuje membránu dostatečně. Možným vysvětlením, proč sonda DPH nezachytila ztekucení membrány po přidavku oktanolu, je, že oktanol je kotven svou OH skupinou k polárnímu povrchu membrány (WAN et al. 2002). Oktanol by pak působil spíše v horních vrstvách membrány, jejíž změnu uspořádanosti DPH necítí.



**Obr. 53** Vliv oktanolu (OT) na dobu zdvojení po chladovém šoku 40-20°C (A). Posun teplotních závislostí anizotropie DPH po působení oktanolu (B). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C bez přidavku a s přidavkem oktanolu v závislosti na čase (C). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C bez přidavku a s přidavkem oktanolu v závislosti na OD<sub>450nm</sub> (D).

## 4.5. Membránově aktivní látky s rigidizačním účinkem

Při testování látek s fluidizačním účinkem bylo prokázáno, že tyto látky jsou schopny způsobit takové ztekucení membrány po chladovém šoku, na které reaguje senzor membránové fluidity DesK změnou signalizace, a v konečném důsledku je snížena transkripce z promotoru genu *des* (kapitola 4.4). Dalším cílem bylo ověřit, zda mohou membránově aktivní látky působit i opačným směrem, tedy zda mohou za

izotermálních podmínek vyvolat takové ztuhnutí membrány, které by registroval senzor DesK a spustil by expresi genu *des*.

Pro sledování účinku membránově aktivních látek na rigidizaci membrány byly vybrány na základě dosud publikovaných literárních údajů dimethylsulfoxid (DMSO), cholesteryl-hemisukcinát (CHS), kyselina palmitová a hlinité ionty.

Dimethylsulfoxid a cholesteryl-hemisukcinát jsou běžně používaná rigidizační činidla. Jejich rigidizační účinky byly prokázány nejen na úrovni membrány pomocí měření anizotropie fluorescence DPH (YULI et al. 1981; GORVEL et al. 1984), ale byla popsána také odpověď buněk na rigidizaci membrány způsobenou DMSO (PANADERO et al. 2006) a CHS (WOLACH et al. 1992) prostřednictvím ovlivnění membránově vázaných proteinů.

Je známo, že přidavek nenasycených mastných kyselin těsně před přenosem rostoucí kultury *Bacillus subtilis* do nižší kultivační teploty sníží expresi genu *des* po chladovém šoku (AGUILAR et al. 2001). Přidavek nasycených mastných kyselin by mohl naopak indukovat expresi genu *des* za optimální teploty kultivace. Pro ověření tohoto předpokladu byla zvolena nenasycená mastná kyselina palmitová, která by se mohla zabudovat do membrány a způsobit její rigidizaci.

Pomocí měření generalizované polarizace Laurdanu bylo zjištěno, že hlinité ionty rigidizují lipozomy složené z dimyristoylfosfatidylcholinu a dimyristoylfosfatidylserinu a posunují jejich teplotu fázového přechodu do vyšších hodnot (VERSTRAETEN a OTEIZA 2000).

Stejně jako při testování membránově aktivních látek s fluidizačním účinkem, byl i v případě rigidizačních látek sledován jejich vliv na dobu zdvojení a posun teplotních závislostí anizotropie fluorescence DPH. Bakteriální kultura *Bacillus subtilis* byla pěstována v optimální teplotě 40°C (není-li uvedeno jinak), po dosažení určité optické denzity ( $OD_{450nm}$ ) bylo přidáno rigidizační činidlo a byly odebírány vzorky na stanovení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity.

DMSO, CHS, kyselina palmitová a hlinité ionty by měly jako látky s předpokládaným rigidizačním účinkem zvyšovat hodnoty anizotropie fluorescence DPH a indukovat transkripci z promotoru *Pdes*, tedy zvýšit aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy v optimální teplotě kultivace (bez přenosu do nižší teploty).

#### 4.5.1. Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) je látka dobře mísitelná s vodou. Bylo zjištěno, že na membránu působí v oblasti polárních hlaviček fosfolipidů (GORDELIY et al. 1998) a zvyšuje teplotu fázového přechodu umělých lipozomů.

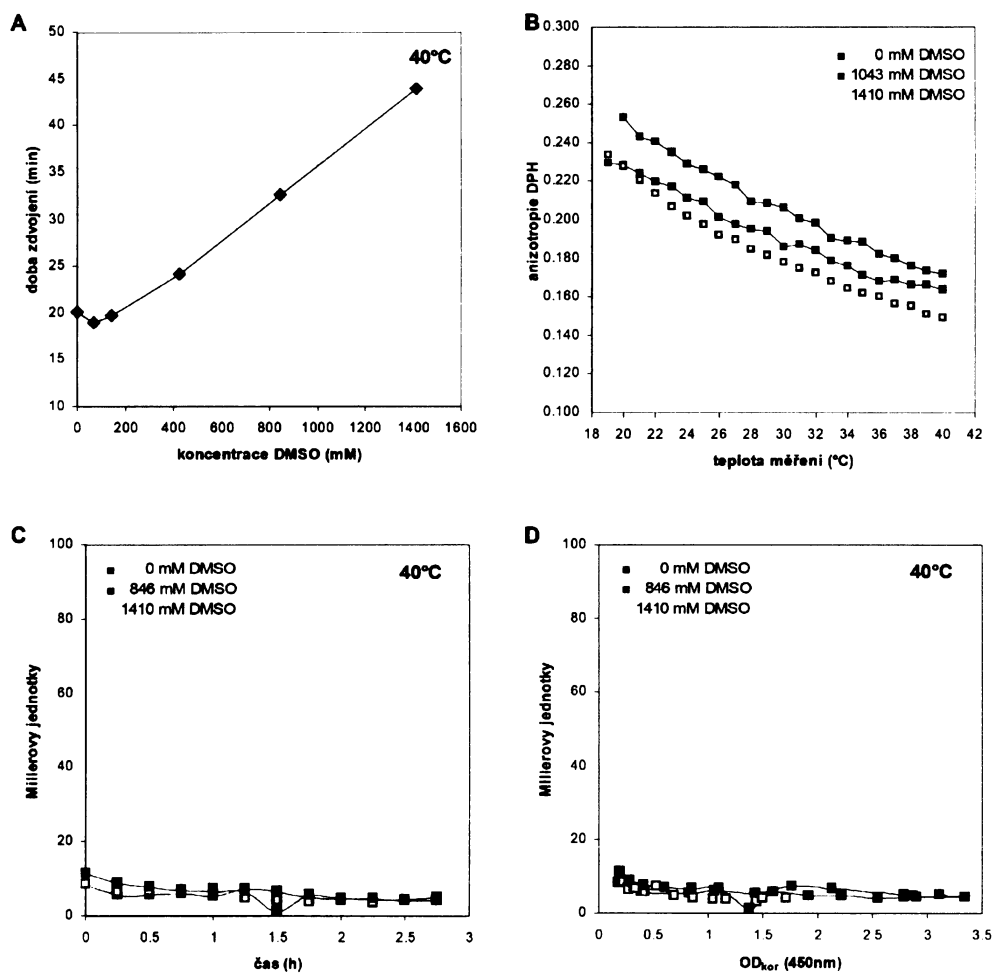
Vliv DMSO na dobu zdvojení byl sledován při  $T_k$  40°C s koncentracemi: 70,5mM, 141mM, 423mM, 846mM a 1410mM. Prodloužení doby zdvojení po působení DMSO se výrazněji projevilo od koncentrace 423mM (3%). Nejvyšší použitá koncentrace DMSO (1410mM, 10%) dobu zdvojení více jak zdvojnásobila (Obr. 54A). Pro měření anizotropie fluorescence DPH byly zvoleny koncentrace, které již výrazně ovlivňovaly růst: 1043mM (7,5%) a 1410mM (10%). Tyto koncentrace způsobily posun teplotních závislostí DPH oproti kontrole o 4°C pro 1043mM a o 7°C pro 1410mM. Tento posun měl ale překvapivě opačný směr. Místo, aby DMSO, který je běžně využíván jako rigidizační činidlo, zvyšoval hodnoty anizotropie DPH, izolované bakteriální membrány *Bacillus subtilis* fluidizoval (Obr. 54B).

Rigidizační účinek DMSO nebyl potvrzen ani pomocí stanovení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity. V  $T_k$  40°C se po přidavku 846mM ani 1410mM DMSO neprojevilo zvýšení aktivity  $\beta$ -galaktosidázy (Obr. 54C a Obr. 54D).

Účinkem DMSO na membránu se zabývala také práce HAYASHIHO a MAEDAHO (2006), kteří zjistili, že DMSO rigidizuje membránu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* pouze v kombinaci s mírným chladovým šokem. Na základě těchto publikovaných dat jsem se rozhodla zjistit, zda se rigidizační efekt DMSO na úrovni změny aktivity promotoru genu *des* neprojeví po vystavení buněk *Bacillus subtilis* mírnému chladovému šoku. Buňky *Bacillus subtilis* odpovídají zvýšenou transkripcí z promotoru *Pdes* již při poklesu teploty o 5°C (kapitola 4.2.1), proto byl tento teplotní posun vybrán k otestování vlivu DMSO na aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy.

Experimentální uspořádání bylo následující: kultura *Bacillus subtilis* rostoucí v  $T_k$  40°C byla přenesena do  $T_k$  35°C, před chladovým šokem byl přidán 1410mM DMSO. Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-35°C byla u kultury, ke které byl před přenosem do nižší kultivační teploty přidán DMSO, mírně zvýšená oproti kontrolní kultivaci bez přidavku DMSO (Obr. 55). Použitá koncentrace DMSO (1410mM) však výrazně prodlužovala dobu zdvojení (více jak o 50%), což se projevilo opožděným nástupem indukce  $\beta$ -galaktosidázy (Obr. 55A) po chladovém šoku 40-35°C u kultury, ke které byl přidán DMSO. Buňky po chladovém šoku s přidavkem DMSO

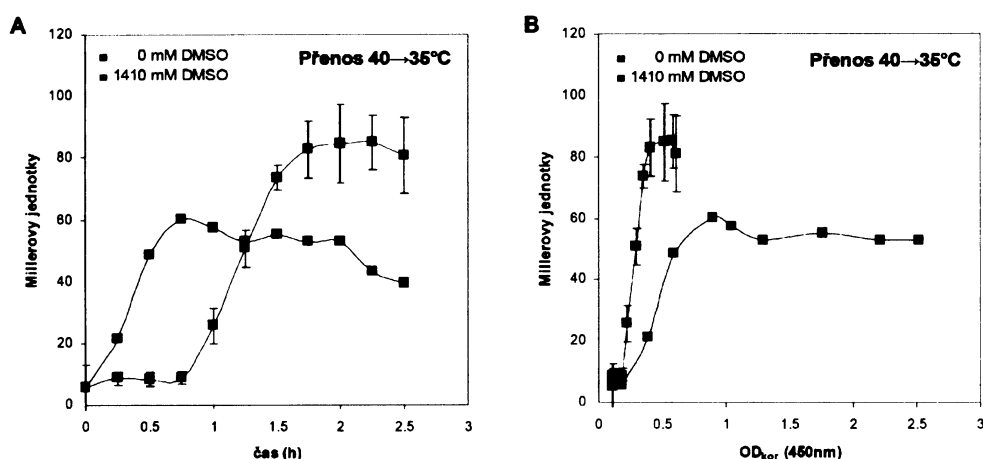
zpočátku nerostly, proto neprobíhala ani transkripce a nebyla exprimována  $\beta$ -galaktosidáza. Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy byla tedy vynesena proti optické denzitě, aby bylo možné porovnat aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku u rostoucí kultury ošetřené DMSO a u rostoucí kultury bez přídavku DMSO.



**Obr. 54** Vliv DMSO na dobu zdvojení ve stálé teplotě kultivace  $T_k$  40°C (A). Posun teplotních závislostí anizotropie DPH po působení DMSO (B). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy ve stálé teplotě kultivace  $T_k$  40°C bez přídavku a s přídavkem DMSO v závislosti na čase (C). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy ve stálé teplotě kultivace  $T_k$  40°C bez přídavku a s přídavkem DMSO v závislosti na  $OD_{450nm}$ . (D).

Z vynesení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity proti optické denzitě (Obr. 55B) je patrné, že kultura, ke které byl před chladovým šokem 40-35°C přidán DMSO aktivovala promotor *Pdes* již v nižší hustotě populace a exprese  $\beta$ -galaktosidázy probíhala do vyšších hladin, což vypovídá o rigidizaci membrány.

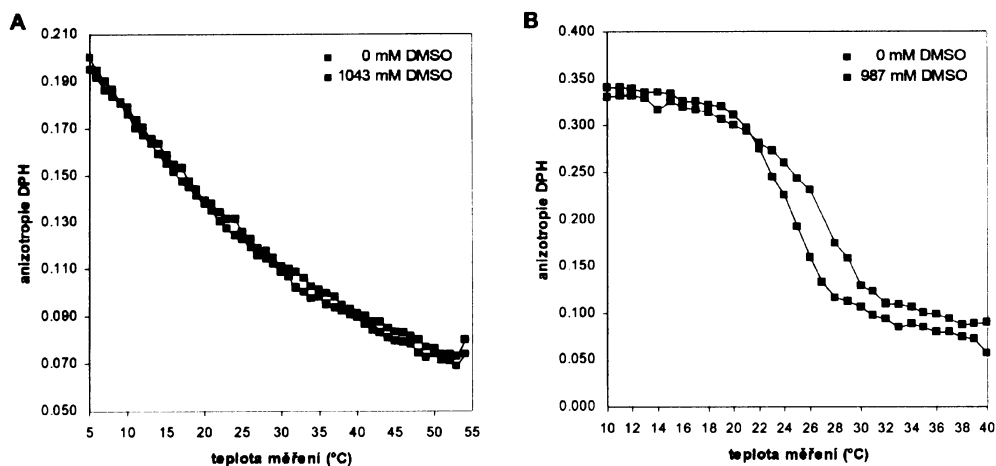
Je zajímavé, že DMSO snižuje anizotropii DPH izolovaných bakteriálních membrán a zároveň ve stejné koncentraci působí u intaktních buněk zvýšení transkripce z promotoru genu *des*.



**Obr. 55** Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-35°C s přidavkem a bez přidavku DMSO v závislosti na čase (A) a na optické denzitě (B). Graf ukazuje průměr ze tří nezávislých provedení.

Efekt DMSO na fluiditu izolovaných bakteriálních membrán měřenou pomocí anizotropie fluorescence DPH byl porovnán s efektem DMSO na unilamelární lipozomy ze sojového fosfatidylcholinu (SPC) a z dimyristoylfosfatidylcholinu (DMPC) (Obr. 56, data poskytl Radovan Fišer). DMSO fluidizoval lipozomy SPC, ale posun teplotní závislosti anizotropie DPH činil pouze 1°C (Obr. 56A). Teplota fázového přechodu lipozomů z DMPC byla zvýšena o 2°C (Obr. 56B). Přestože je DMSO běžně využíván jako rigidizační činidlo (INGRAM 1977; HAYASHI a MAEDA 2006) a jeho účinky na membránovou fluiditu byly potvrzeny měřením anizotropie fluorescence, je zřejmé, že DMSO působí odlišně na různé typy membrán.





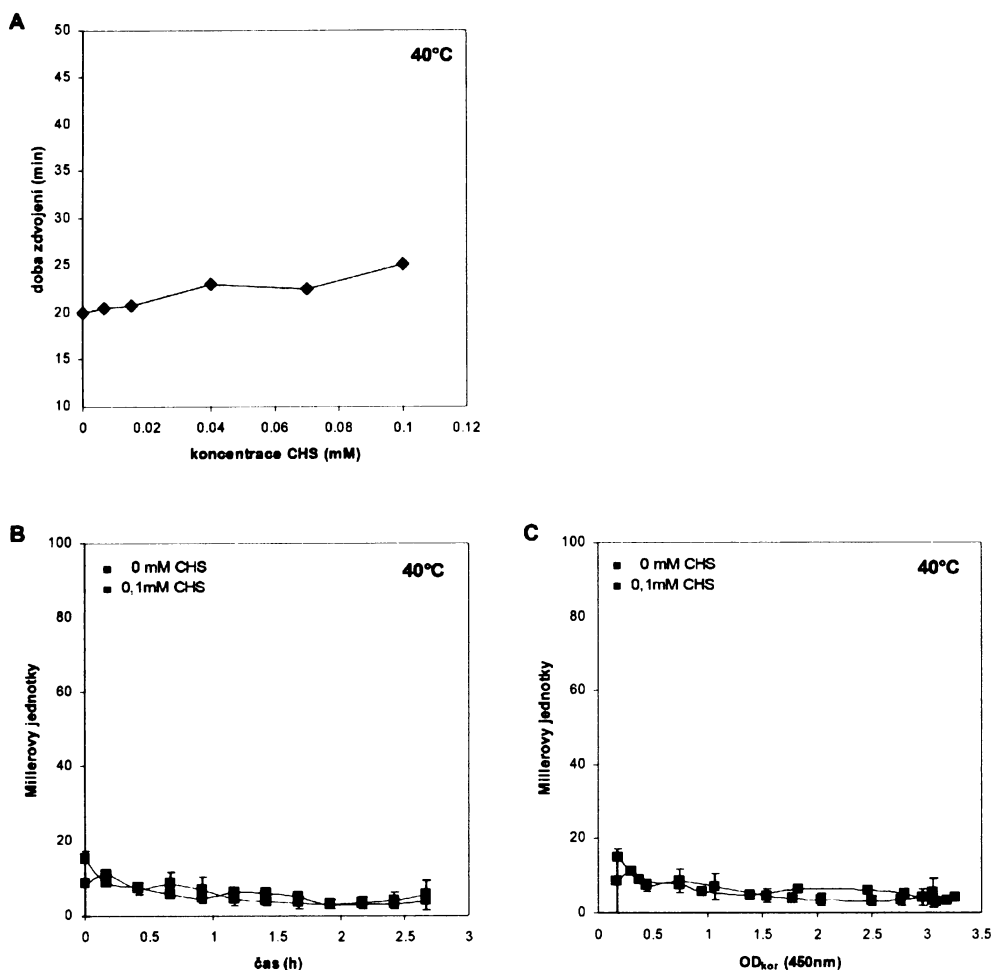
**Obr. 56** Vliv DMSO na anizotropii fluorescenci DPH unilamelárních lipozomů ze sojového fosfatidylcholinu (A) a unilamelárních lipozomů z dimyristoylfosfatidylcholinu (B). Data poskytl Radovan Fišer.

#### 4.5.2. Cholesteryl-hemisukcinát

Cholesteryl-hemisukcinát je poměrně velká molekula, od cholesterolu se odlišuje připojeným hydrofilním řetězcem. CHS je špatně rozpustný ve vodném prostředí, proto byl připraven zásobní roztok CHS v tetrahydrofuranu (kapitola 3.15) a CHS byl přidáván ve formě micel s BSA a PVP. Bylo zjištěno, že CHS ovlivňuje membránovou fluiditu v blízkosti povrchu membrány (WAN et al. 2002).

Účinky 6,5 μM, 15 μM, 40 μM, 70 μM a 100 μM CHS na dobu zdvojení byly testovány v  $T_k$  40°C. Nejvyšší použitá koncentrace CHS (100 μM) prodlužovala dobu zdvojení asi o 25% (Obr. 57A). Měření anizotropie fluorescence nebylo úspěšné. Protože je CHS velmi špatně rozpustný ve vodném prostředí, nepodařilo se získat jeho nezakalený roztok, který je nezbytný pro měření anizotropie fluorescence, ani po sonikaci (kapitola 3.15).

Ve stálé  $T_k$  40°C CHS ani v nejvyšší v koncentraci 100 μM nezvyšoval aktivitu β-galaktosidázy (Obr. 57B a Obr. 57C). Rigidizační účinek CHS se nepodařilo prokázat. Možné vysvětlení je, že v použité koncentraci není CHS schopen dostatečně rigidizovat bakteriální membránu, nebo vzhledem k obtížné rozpustnosti zůstal CHS ve formě micel v roztoku, které nefúzovaly s bakteriální membránou.



**Obr. 57** Vliv CHS na dobu zdvojení ve stálé teplotě kultivace  $T_k$  40°C (A). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy ve stálé teplotě kultivace  $T_k$  40°C bez přídavku a s přídavkem CHS v závislosti na čase (B). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy ve stálé teplotě kultivace  $T_k$  40°C bez přídavku a s přídavkem CHS v závislosti na  $OD_{450nm}$  (C).

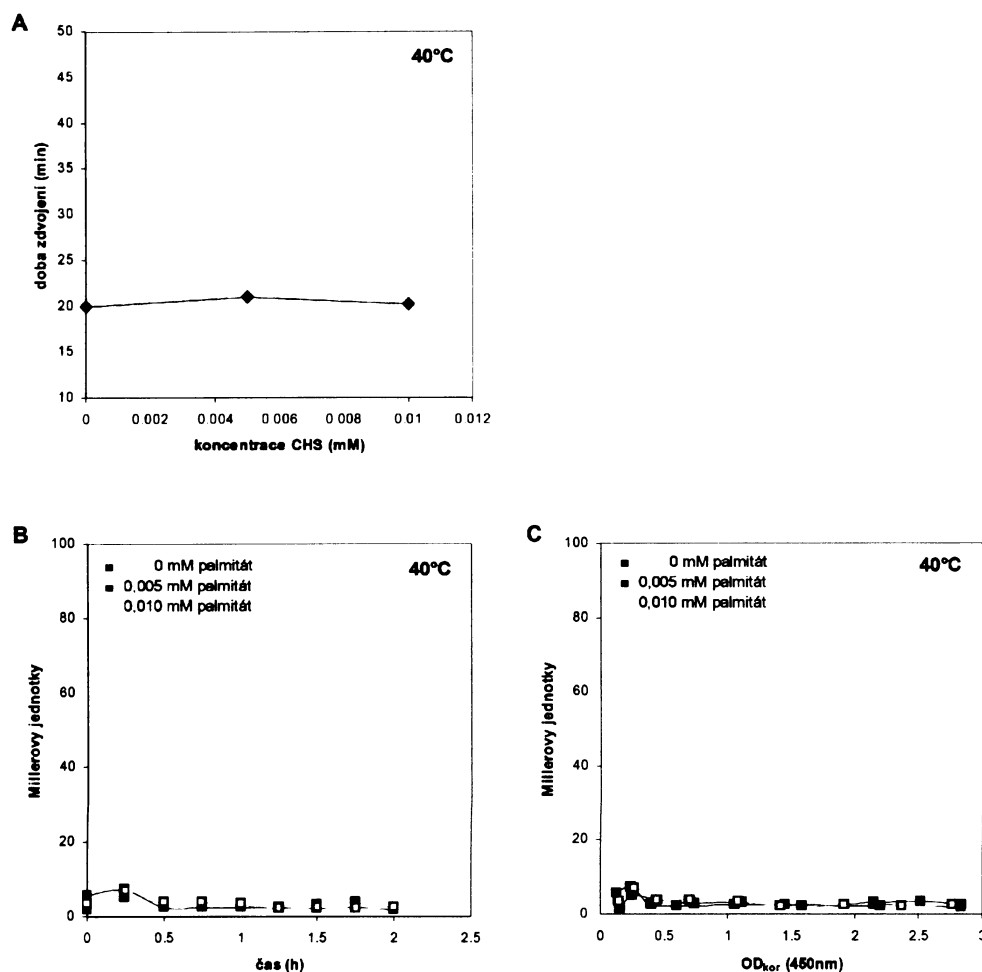
#### 4.5.3. Kyselina palmitová

Kyselina palmitová je nasycená mastná kyselina ( $CH_3(CH_2)_{14}COOH$ ), která má vyšší teplotu fázového přechodu (64°C) ve srovnání s hlavní fluidizující mastnou kyselinou anteizo- $C_{15}$ . Po zabudování kyseliny palmitové do membrány by se tedy mohla zvýšit uspořádanost membrány, která by vyvolala transkripci z promotoru *Pdes*.

Koncentrace 5  $\mu M$  a 10  $\mu M$  neměly vliv na dobu zdvojení v  $T_k$  40°C (Obr. 58A). Anizotropie fluorescence nemohla být naměřena. Kyselina palmitová vytváří ve vodném prostředí micely, do kterých se může zabudovávat sonda DPH. Není pak

možné odlišit příspěvek anizotropie DPH z izolovaných bakteriálních membrán, kyseliny palmitové a membrán s nově navázanou kyselinou palmitovou.

Kyselina palmitová v koncentracích 5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  v  $T_k$  40°C nezvyšovala aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy (Obr. 58B a Obr. 58C).



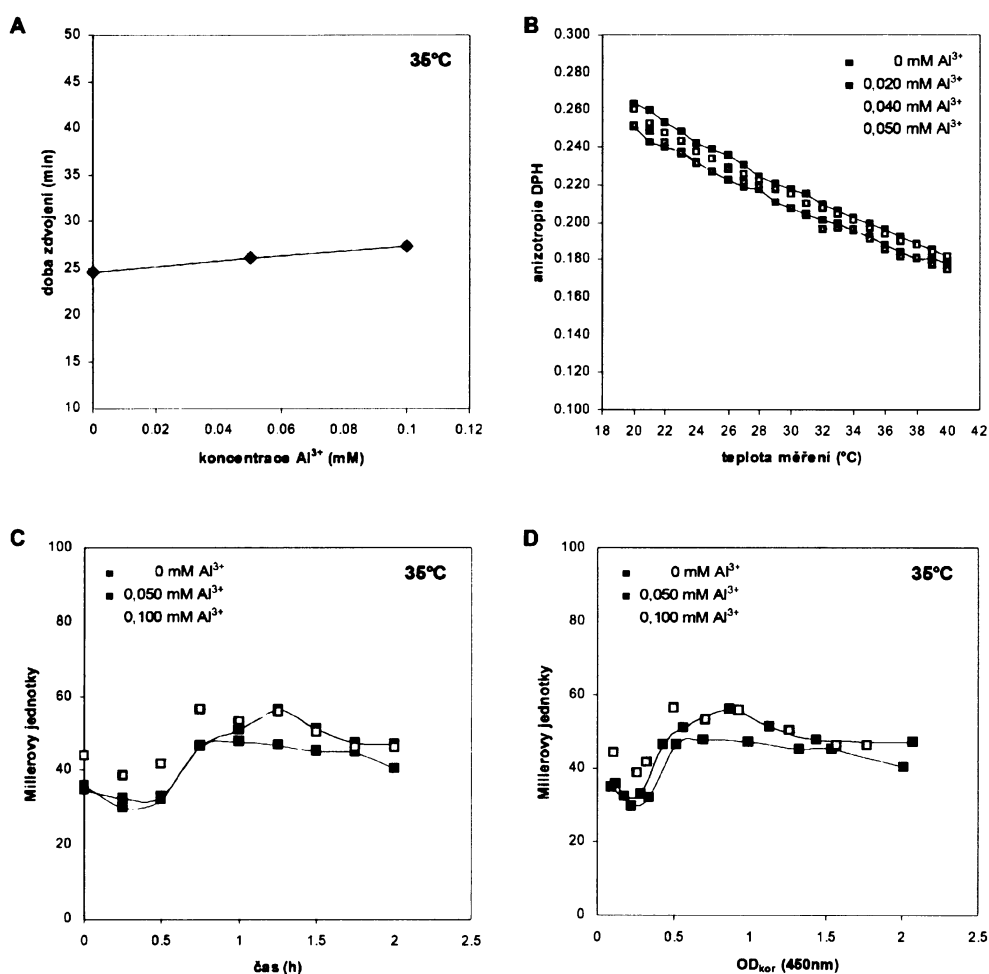
**Obr. 58** Vliv kyseliny palmitové na dobu zdvojení ve stálé teplotě kultivace  $T_k$  40°C (A). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy ve stálé teplotě kultivace  $T_k$  40°C bez přídavku a s přídavkem kyseliny palmitové v závislosti na čase (B). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy ve stálé teplotě kultivace  $T_k$  40°C bez přídavku a s přídavkem kyseliny palmitové v závislosti na  $OD_{450\text{nm}}$  (C).

#### 4.5.4. Hlinité ionty

Hlinité ionty byly aplikovány ve formě  $\text{AlCl}_3$ . Rigidizační účinek hlinitých iontů ( $\text{Al}^{3+}$ ) byl prokázán *in vitro* na lipozomech z fosfatidylcholinu a fosfatidylserinu (VERSTRAETEN et al. 1997).

Hlinité ionty neovlivňovaly dobu zdvojení do koncentrace  $100\mu\text{M}$  v  $T_k$   $35^\circ\text{C}$  (Obr. 59A). Měření anizotropie fluorescence DPH odhalilo rigidizaci izolovaných bakteriálních membrán (Obr. 59B). Posun teplotní závislosti anizotropie DPH po působení hlinitých iontů činil asi  $2^\circ\text{C}$ . Pro měření anizotropie fluorescence DPH byly použity koncentrace  $20\mu\text{M}$ ,  $40\mu\text{M}$  a  $50\mu\text{M}$ . Vyšší koncentrace nebylo možné použít, protože již od koncentrace  $50\mu\text{M}$  docházelo k částečnému vysrážení hlinitých iontů. Zakalený vzorek nemohl být využit k měření anizotropie.

Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy nebyla ovlivněna koncentrací  $50\mu\text{M}$  ani  $100\mu\text{M}$  (Obr. 59C a Obr. 59D).



**Obr. 59** Vliv  $\text{Al}^{3+}$  na dobu zdvojení ve stálé teplotě kultivace  $T_k$   $40^\circ\text{C}$  (A). Posun teplotních závislostí anizotropie DPH po působení  $\text{Al}^{3+}$  (B). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy ve stálé teplotě kultivace  $T_k$   $40^\circ\text{C}$  bez přídavku a s přídavkem  $\text{Al}^{3+}$  v závislosti na čase (C). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy ve stálé teplotě kultivace  $T_k$   $40^\circ\text{C}$  bez přídavku a s přídavkem  $\text{Al}^{3+}$  v závislosti na  $\text{OD}_{450\text{nm}}$  (D).

Změna signalizace proteinem DesK vyžaduje pokles kultivační teploty o 5°C (chladový šok 40-35°C). Membránově aktivní látka s rigidizačním účinkem tedy musí způsobit takové zvýšení anizotropie fluorescence DPH, jaké by bylo vyvoláno snížením teploty o 5°C, aby byla ovlivněna aktivita promotoru genu *des*. Žádné z rigidizačních činidel ale neposunulo teplotní závislosti anizotropie DPH natolik, aby tento posun odpovídal snížení teploty o 5°C. Membránově aktivní látku, která by měla jasný rigidizační účinek na fluiditu membrány *Bacillus subtilis* měřenou pomocí anizotropie DPH se tedy nepodařilo najít.

Testovaná rigidizační činidla použitá v daných koncentracích nezpůsobovala (s výjimkou rigidizačního efektu DMSO po mírném chladovém šoku) tak velké ztužení membrány rostoucí bakteriální kultury, aby na něj bakteriální buňka reagovala výraznou indukci transkripce z *Pdes*.

## 4.6. Měření generalizované polarizace Laurdanu

Měření generalizované polarizace Laurdanu je biofyzikální metoda, která umožňuje stanovit podíl tekuté a tuhé fáze v membráně. Sonda Laurdan je citlivá k polaritě prostředí a monitoruje pronikání vody do fosfolipidové dvojvrstvy (kapitola 3.13). Generalizované polarizace Laurdanu byla měřena na izolovaných bakteriálních lipidech a membránách.

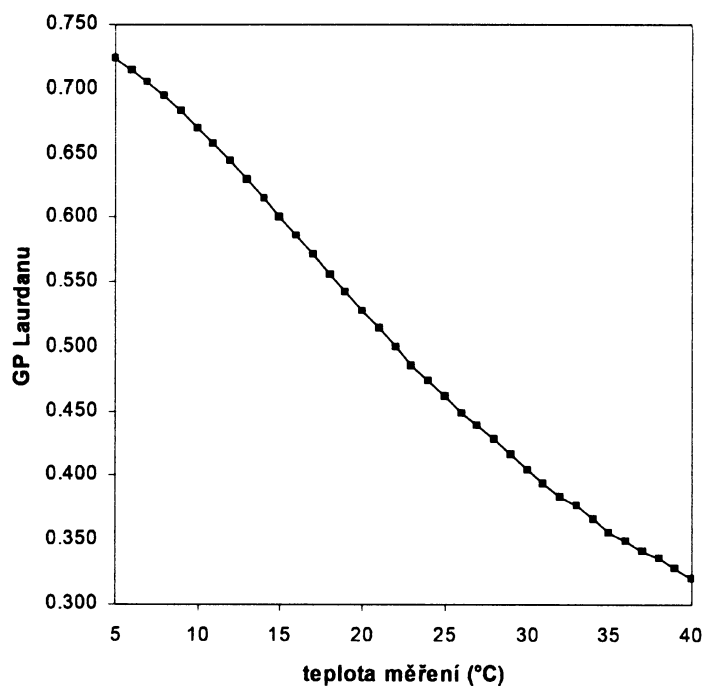
### 4.6.1. Fázový přechod lipidů a generalizovaná polarizace Laurdanu

Fázový přechod by mohl být dalším z fyzikálních parametrů membrány, který by mohl být ovlivněn po působení alkoholů. Fázový přechod lipidů by mohla zachytit generalizovaná polarizace Laurdanu měřená v závislosti na teplotě, jak bylo již dříve ukázáno na lipozomech z umělých fosfolipidů (DE VEQUI-SUPLICY et al. 2006). Bylo by tak možné sledovat vliv alkoholů na posun fázového přechodu lipidů.

Nejprve bylo nutné ověřit, zda měření generalizované polarizace Laurdanu zachytí fázový přechod lipidů, které byly izolovány z kultury *Bacillus subtilis*. Jednovrstevné lipozomy z izolovaných bakteriálních lipidů byly připraveny a označeny sondou Laurdan, jak bylo popsáno v kapitole 3.13. Po ustálení hodnot generalizované

polarizace (GP) byla naměřena závislost GP na teplotě v rozsahu 40°C až 5°C (Obr. 60). Z grafu na Obr.60 je vidět, že hodnoty GP narůstaly s klesající teplotou téměř lineárně a očekávaná sigmoidní křivka, která je charakteristická pro fázový přechod, nebyla zaznamenána.

Měření generalizované polarizace Laurdanu tedy neumožňuje zachytit fázový přechod bakteriálních lipidů. Je to dáno asi tím, že je to velmi komplexní vzorek, který obsahuje mnoho druhů lipidů s různou teplotou fázového přechodu. Není tedy možné metodu měření GP Laurdanu využít jako fluorescenční alternativu k diferenciální skenovací kalorimetrii (DSC). Vliv alkoholů na polohu fázového přechodu byl proto testován pomocí DSC (kapitola 3.14), která zachycuje fázový přechod směsných lipidů velmi přesně.



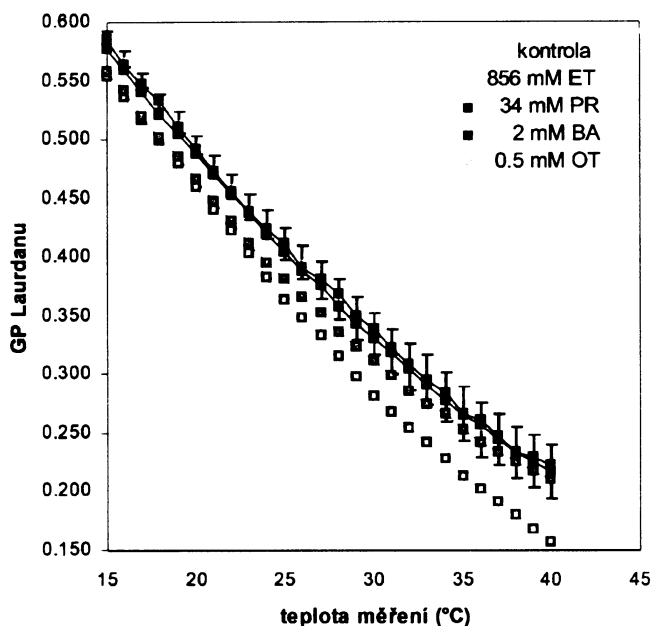
**Obr. 60** Generalizovaná polarizace (GP) Laurdanu měřená na izolovaných bakteriálních lipidech v závislosti na teplotě.

#### 4.6.2. Měření posunu teplotní závislosti generalizované polarizace Laurdanu izolovaných bakteriálních membrán vlivem alkoholů

Přestože měření generalizované polarizace Laurdanu nelze využít pro určení polohy fázového přechodu, může být tato metoda užitečná ke sledování posunu teplotních závislostí GP vlivem alkoholů, obdobně jako to bylo sledováno u anizotropie fluorescence DPH. Sonda Laurdan se na rozdíl od sondy DPH nezabudovává příliš hluboko do fosfolipidové dvojvrstvy, ale zůstává spíše při povrchu membrány (DE VEQUI-SUPLICY et al. 2006). Měření GP Laurdanu by tedy mělo být citlivější ke změnám fluidity membrány vyvolaných těmi alkoholy, které působí v blízkosti povrchu membrány.

Byl proveden experiment, kdy byly k membránám značeným sondou Laurdan (kapitola 3.13) přidávány alkoholy v koncentracích, které snižovaly aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku (kapitola 4.2.1). Po ustálení hodnot GP po přidavku alkoholu ve 40°C byly vzorky pomalu ochlazovány až k 15°C a byla měřena GP. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 61 Modrá datová řada se směrodatnými odchylkami zachycuje závislost GP samotných bakteriálních membrán (kontrola). Je vidět, že 34mM propanol a 2mM benzylalkohol nezpůsobily významný posun teplotní závislosti GP bakteriálních membrán. Přídavek 0,5mM oktanolu vyvolal posun teplotní závislosti asi o 2°C, ale pouze v teplotním intervalu 28°C až 15°C. Nejeffetněji posunoval teplotní závislost GP 856mM ethanol, který fluidizoval membrány v celém sledovaném teplotním rozsahu, ale ve vyšších teplotách byl účinnější. Posun teplotní závislosti po působení 125mM butanolu se nepodařilo naměřit. Po přidavku butanolu ke značeným membránám nedošlo k ustálení hodnot GP ani po 40 minutách.

Dříve publikované výsledky uvádějí, že alkoholy s krátkým řetězcem (ethanol a propanol) způsobují průnik molekul vody do fosfolipidové dvojvrstvy (HO a STUBBS 1997). Sonda Laurdan by tedy měla zaznamenat v případě těchto dvou alkoholů posun teplotní závislosti vlivem zvýšeného obsahu molekul vody v membráně, to však bylo v této práci potvrzeno pouze u ethanolu.



**Obr. 61** Generalizovaná polarizace (GP) Laurdanu měřená na izolovaných bakteriálních membránách v závislosti na teplotě a na přidavku alkoholu. GP Laurdanu samotných bakteriálních membrán (kontrola) představuje průměr ze tří nezávislých měření.

## 4.7. Diferenciální skenovací kalorimetrie

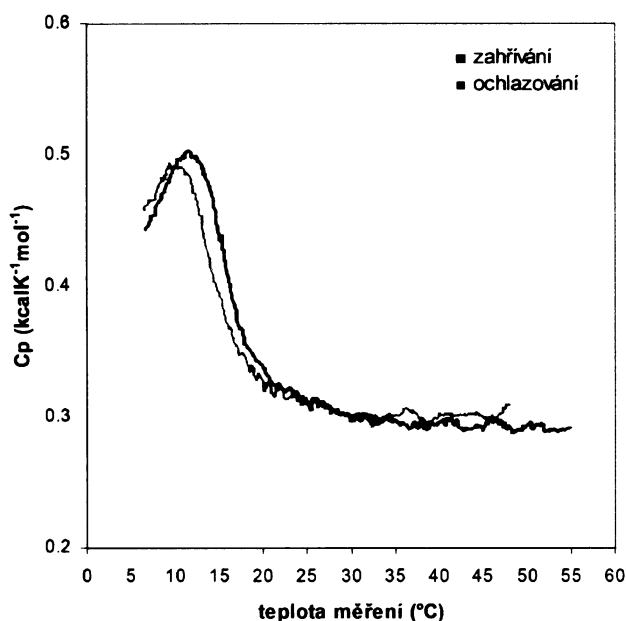
Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) je metoda, která je využívána pro popis tepelných vlastností vzorků lipidů. DSC dokáže zachytit fázový přechod i vzorku směsných bakteriálních lipidů, proto byla tato metoda vybrána pro sledování vlivu alkoholů na teplotu fázového přechodu. Alkoholy jako fluidizační látky, jejichž účinek na bakteriální membránu *Bacillus subtilis* byl prokázán (kapitola 4.4), by mohly posouvat teplotu fázového přechodu do nižších hodnot a udržovat tak membránu v tekutém stavu i nižších teplotách.

### 4.7.1. Fázový přechod izolovaných bakteriálních lipidů

Fázový přechod izolovaných bakteriálních lipidů byl měřen tak, jak bylo popsáno v kapitole 3.14. Měření probíhala v teplotním rozsahu 55°C až 2°C. Tepelné vlastnosti vzorku lipidů byly nejprve sledovány během pomalého ochlazení od 55°C do 2°C, poté během pomalého zahřívání. Termogramy získané zahříváním a



ochlazováním vzorku lipidů jsou na Obr. 62. Teplota fázového přechodu bakteriálních lipidů při zahřívání činila 11,35°C, při ochlazování vzorku lipidů 10,15°C. Tento posun teploty fázového přechodu je dán zpožděnou odezvou kalorimetru. Termogram získaný ochlazováním vzorku lipidů sloužil jako kontrola, že vzorek byl v pořádku, byl měřen pro všechny vzorky. Dále jsou zobrazeny pouze termogramy získané zahříváním vzorku lipidů, kdy kontrolní termogramy získané ochlazováním vzorku byly v pořádku.

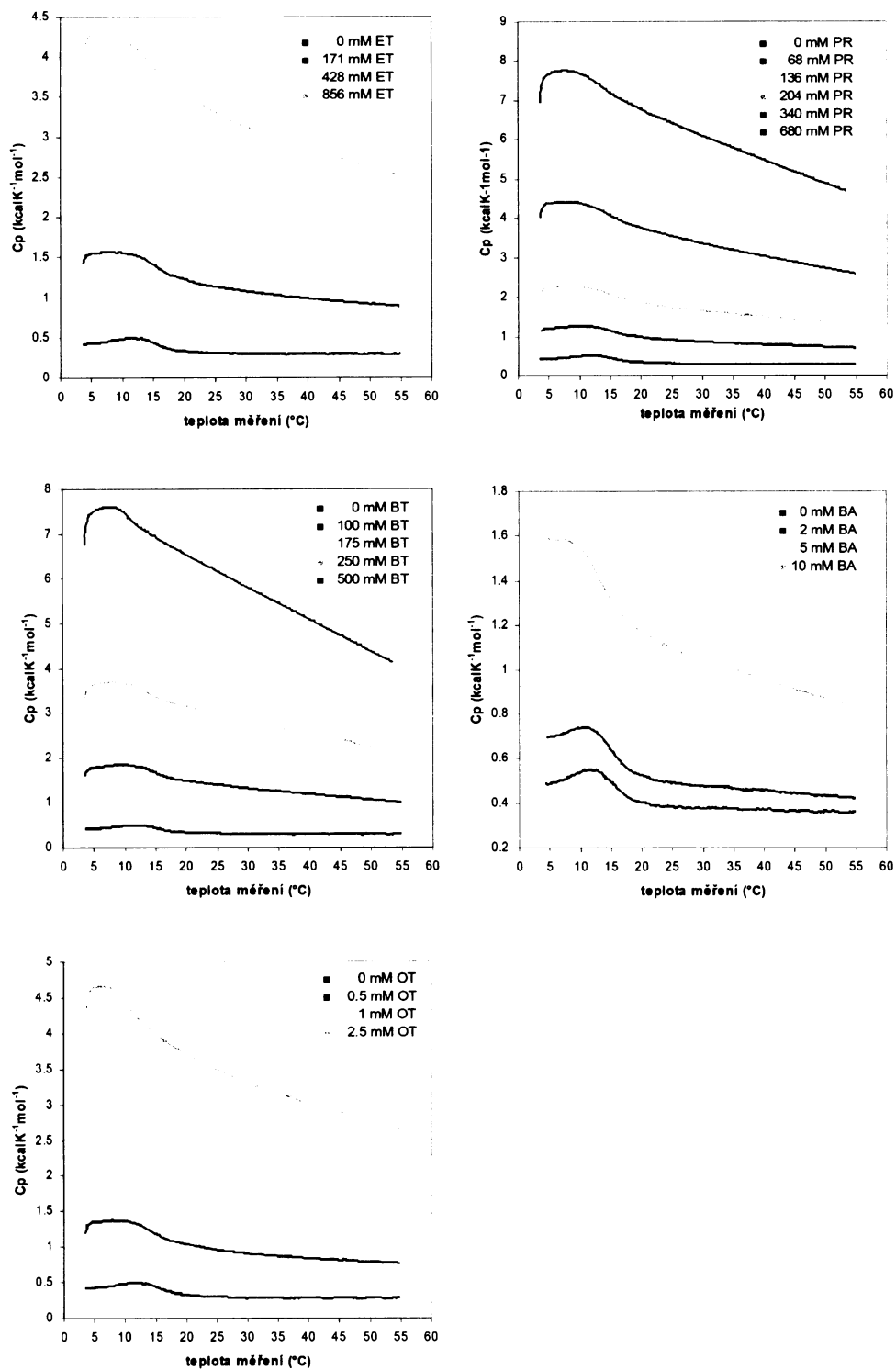


**Obr. 62** Fázový přechod izolovaných bakteriálních lipidů získaný pomocí DSC ve směru ochlazování a zahřívání. Cp-molární tepelná kapacita.

#### 4.7.2. Vliv alkoholů na fázový přechod lipidů

Ovlivnění fázového přechodu lipidů po přidavku různých koncentrací ethanolu, propanolu, butanolu, benzylalkoholu a oktanolu je zachyceno na Obr. 63. Je vidět, že přidavek alkoholů k bakteriálním lipidům vyvolal významné změny průběhu termogramů, které nelze připsat změnám v tepelných vlastnostech lipidů vyvolaných alkoholy. U kontrolních vzorků (lipidy bez přidavku alkoholu) byly hodnoty molární tepelné kapacity  $C_p$  konstantní až do teploty měření asi 25°C, kdy se již začal projevovat fázový přechod (Obr. 62). Po přidavku alkoholu docházelo k lineárnímu

nárůstu hodnot molární tepelné kapacity  $C_p$  již od počátku měření (Obr. 63). Směrnice tohoto lineárního nárůstu se zvyšovala se zvyšující se koncentrací alkoholu. Nárůst hodnot  $C_p$  byl způsoben pravděpodobně tím, že alkoholy absorbovaly také část tepla, kterým byl vzorek zahříván. Dalším artefaktem měření byl strmý pokles hodnot  $C_p$  v teplotě měření menší než  $5^\circ\text{C}$ , kdy se již uplatňoval vliv konce měřicího intervalu. Alkoholy nejenom posunovaly fázový přechod do nižších teplot, ale také fázový přechod rozšiřovaly. Kvůli výše popsanému artefaktu měření nebylo možné získat křivku, která by zachycovala celý fázový přechod.



**Obr. 63** Vliv přidavku různých koncentrací alkoholů na průběh termogramů získaných měření DSC. ET – ethanol, PR – propanol, BT – butanol, BA – benzylalkohol, OT-oktanol,  $C_p$  – molární tepelná kapacita.

### 4.7.3. Vyhodnocení termogramů pomocí programu Fityk

Vyhodnocování jednotlivých termogramů probíhalo v programu Fityk, aby byl odstraněn efekt přítomnosti alkoholu v referenční cele a nedošlo k chybné interpretaci získaných výsledků. Program Fityk je software sloužící k analýze dat a prokládání křivek. Tento program je volně dostupný na internetové adrese <http://www.unipress.waw.pl/fityk>. V této práci byla použita verze 0.8.3.

Vyhodnocení termogramů probíhalo následujícím způsobem:

- 1) Byla načtena data náležící k danému termogramu.
- 2) Bylo odečteno pozadí, které příslušelo teplu absorbovanému alkoholem. Bylo aproximováno, že toto pozadí je lineárně rostoucí v celém sledovaném teplotním rozsahu. Interval 35°C až 25°C byl vybrán pro výpočet směrnice přímky, která tvořila pozadí. Přímka byla odečtena od termogramu.
- 3) Byla vymezena oblast fázového přechodu:  $\pm 5^\circ\text{C}$  od teploty fázového přechodu lipidů bez přídavku alkoholu.
- 4) Oblastí fázového přechodu byla proložena Gaussova křivka podle vztahu:  

$$y = v \cdot \exp(-\ln(2) \cdot ((x-s)/v_s)^2)$$
 kde  $v$  je výška,  $s$  je vrchol a  $v_s$  je výška v polovině šířky Gaussovy křivky.
- 5) Teplota fázového přechodu  $T_m$  byla stanovena jako vrchol Gaussovy křivky.
- 6) Byla provedena 1. derivace oblasti fázového přechodu.
- 7) Křivka získaná v bodě 6 byla opět aproximována Gaussovou křivkou. Vrchol této Gaussovy křivky určoval teplotu v inflexním bodě termogramu  $T_w$ .
- 8) Získané hodnoty  $T_m$  a  $T_w$  byly exportovány z programu Fityk.

Parametry popisující termogramy po odečtení pozadí jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 6). Teplota fázového přechodu je označena  $T_m$  a poloha inflexního bodu  $T_w$ . Rozdíl mezi teplotou fázového přechodu samotných lipidů a teplotou fázového přechodu lipidů s přídavkem alkoholu je popsán jako  $\Delta T_m$  a rozdíl v jejich inflexních bodech jako  $\Delta T_w$ . Rozdíl mezi  $T_w$  a  $T_m$  je parametr, který popisuje šířku fázového přechodu.

Tab. 6 Parametry popisující termogramy získané měřením DSC.

alkohol	koncentrace (mM)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	$T_w$ (°C)	$\Delta T_w$ (°C)	$T_w - T_m$ (°C)
	0	11,35		15,55		4,20
ethanol	171	10,62	0,73	15,24	0,31	4,61
	428	9,52	1,83	15,40	0,15	5,87
	684	9,61	1,75	14,95	0,60	5,34
propanol	68	11,06	0,30	15,12	0,43	4,06
	136	11,27	0,08	14,41	1,13	3,15
	204	10,61	0,75	14,48	1,07	3,87
	340	10,22	1,14	14,34	1,21	4,12
butanol	680	10,58	0,77	13,73	1,81	3,15
	100	10,74	0,61	14,74	0,81	4,00
	175	10,25	1,10	13,75	1,80	3,50
benzylalkohol	250	10,21	1,14	13,59	1,96	3,38
	500	9,33	2,03	11,43	4,12	2,11
	2	11,13	0,23	15,02	0,53	3,89
oktanol	5	10,20	1,15	14,56	0,99	4,36
	10	8,50	2,86	13,57	1,98	5,08
oktanol	0,5	10,32	1,04	14,19	1,36	3,87
	1	9,78	1,57	12,88	2,67	3,10
	2,5	7,56	3,79	11,16	4,39	3,60

### Teplota fázového přechodu $T_m$

Teplota fázového přechodu  $T_m$  se po působení alkoholu v širokém koncentračním rozmezí příliš neměnila (Tab.6). Největší pokles teploty fázového přechodu  $\Delta T_m$  způsobil oktanol v nejvyšší použité koncentraci 2,5mM, kdy  $\Delta T_m$  činilo 3,8°C. Podobně účinný byl benzylalkohol v koncentraci 10mM, který snížil  $T_m$  lipidů o 2,9°C. Naopak nejméně efektivní v posunu  $T_m$  byl propanol, kdy nejvyšší koncentrace vyvolala posun  $T_m$  pouze o 0,8°C. Ethanol a butanol v nejvyšších koncentracích posunuly  $T_m$  pouze asi o 1°C. Koncentrace alkoholů, které účinně snižovaly aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku, způsobovaly posun  $T_m$  pouze v rozmezí 1°C. Posun fázového přechodu do nižších hodnot pravděpodobně nebude to, co buňka vnímá jako fluidizační účinek alkoholů.

### Poloha inflexního bodu $T_w$

Poloha inflexního bodu společně s teplotou fázového přechodu vypovídá o šířce fázového přechodu. Pokud alkoholy příliš neposouvají teplotu fázového přechodu do nižších hodnot, mohly by přesto ovlivňovat jeho šířku.

Ve všech případech došlo k posunu inflexního bodu do nižších teplot (Tab. 6). Tento posun neodpovídal posunu teploty fázového přechodu, i když i zde se zvyšoval s rostoucí koncentrací alkoholu. Parametr  $T_w - T_m$  popisuje šířku fázového přechodu. Z tabulky (Tab.6) vyplývá, že v případě ethanolu a benzylalkoholu došlo k rozšíření šířky fázového přechodu, zatímco u propanolu, butanolu a oktanolu bylo pozorováno spíše zúžení fázového přechodu.

## 5 Diskuze

Tato práce studovala senzor membránové fluidity DesK u *Bacillus subtilis*. Protein DesK je součástí dvoukomponentového systému DesK/DesR, který reguluje expresi desaturázy mastných kyselin Des na transkripční úrovni v závislosti na vnější teplotě. Histidinkináza DesK má kinázovou aktivitu, která vede k fosforylaci regulátoru (transkripčního aktivátoru) DesR a expresi genu *des*, a fosfatázovou aktivitu, která spočívá v defosforylaci regulátoru DesR a vypnutí transkripce genu *des*. Přepínání mezi kinázovou a fosfatázovou aktivitou je regulováno vnější teplotou, která ovlivňuje fluiditu membrány.

Cílem této diplomové práce bylo přispět k objasnění mechanismu, jakým senzor DesK vnímá membránovou fluiditu. Pojem membránová fluidita je však v současnosti používán obecně pro popis celkové charakteristiky membrány. Membránovou fluiditu jako takovou nelze změřit, není jasně definována. Je ale možné pomocí mnoha biofyzikálních metod měřit změny různých fyzikálních parametrů membrány, které souvisí s uspořádaností membrány a které se mění v závislosti na podmínkách, a takto získané výsledky interpretovat jako změny fluidity. V této práci byly pro měření „fluidity“ membrány využity tyto biofyzikální techniky - anizotropie fluorescence DPH, generalizovaná polarizace Laurdanu a diferenciální skenovací kalorimetrie, které zachycují různé fyzikální parametry, které vypovídají o fluiditě membrány.

Pro ovlivnění membránové fluidity byly použity membránově aktivní látky, které působí v různých částech membrány a liší se také v tom, jaký fyzikální parametr membrány ovlivňují. Změny fluidity membrány vyvolané přidavkem membránově aktivní látky, na které reagoval senzor DesK změnou signalizace, byly studovány *in vivo* pomocí sledování změny aktivity promotoru genu *des* a *in vitro* prostřednictvím monitorování změny určitého fyzikálního parametru. Porovnáním vlivu membránově aktivních látek na aktivitu promotoru genu *des* s jejich účinkem na membránu bylo pak možné zjistit, jaké změny fyzikálních parametrů membrány a jak velké jejich změny senzor membránové fluidity DesK vnímá a reaguje na ně změnou signalizace.

### Aktivita promotoru genu *des* po chladovém šoku

Jedním z cílů, které si kladla tato práce, bylo zjistit jaká je mez citlivosti proteinu DesK, tedy jak velký musí být pokles vnější teploty, aby ho protein DesK zaznamenal a reagoval na něj změnou signalizace.

Změna signálního stavu proteinu DesK byla sledována na úrovni aktivity promotoru genu *des*. Za tímto účelem byl použit kmen *Bacillus subtilis* M19, který měl promotor genu *des* fúzovaný s reportérovým genem *lacZ*. Buňky *Bacillus subtilis* M19 byly vystaveny různě velkým poklesům kultivační teploty a po každém chladovém šoku byla stanovována aktivita  $\beta$ -galaktosidázy. Výsledky těchto experimentů jsou shrnuty v grafu na Obr. 42. Pokles optimální kultivační teploty pouze o 5°C (chladový šok 40-35°C) je již schopen indukovat transkripci z promotoru genu *des*. Senzor membránové fluidity DesK tedy vnímá snížení fluidity membrány, které je vyvoláno poklesem vnější teploty jen o 5°C.

Z grafu na Obr.42 je vidět, že po přenosu bakteriální kultury z optimální kultivační teploty  $T_k$  40°C do nižší  $T_k$  35°C, 30°C a 25°C se zvyšuje aktivita  $\beta$ -galaktosidázy v závislosti na rozsahu chladového šoku (v závislosti na rozdílu mezi optimální a nižší teplotou kultivace). To je v souladu s dříve publikovanou prací, kde po přenosu kultury *Bacillus subtilis* JH642 z optimální  $T_k$  37°C do nižší  $T_k$  30°C a 25°C bylo také pozorováno zvyšování aktivity  $\beta$ -galaktosidázy v závislosti na velikosti teplotní změny (CYBULSKI et al. 2002).

Mé výsledky (Obr. 42) dále ukazují, že při snížení teploty o více než 15°C (chladové šoky 40-20°C a 40-15°C) je aktivita  $\beta$ -galaktosidázy nižší než u menších chladových šoků. To odpovídá publikovaným poznatkům. THUY LE a SCHUMANN (2007) také zaznamenali, že aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C představuje pouze 60% hodnoty aktivity  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-25°C a po přenosu kultury *Bacillus subtilis* z  $T_k$  40°C do 15°C je aktivita  $\beta$ -galaktosidázy i po 12 hodinách po šoku velmi nízká. Pokles kultivační teploty o 20°C a 25°C vede k přechodnému zastavení růstu bakteriální kultury, po obnovení růstu je generační doba výrazně prodloužena (Obr. 38). Po takto velkých teplotních skocích je fyziologie bakteriální buňky silně narušena a buňka nemusí mít dostatečnou kapacitu pro aktivaci promotoru genu *des* a syntézu  $\beta$ -galaktosidázy, proto byla pozorována její nižší aktivita. Dalším možným vysvětlením nižší aktivity  $\beta$ -galaktosidázy po větším chladovém šoku je role dlouhodobé adaptace *Bacillus subtilis*, která spočívá ve zvýšení poměru anteizovětvených mastných kyselin, které také snižují uspořádanost membrány. Je známo, že

oba mechanismy vedoucí ke zvýšení fluidity membrány po chladovém šoku, desaturace mastných kyselin a zvýšení zastoupení anteizo- větvených mastných kyselin, se mohou vzájemně zastupovat (AGUILAR et al. 1998; WEBER et al. 2001a). U *Bacillus subtilis* 168, na jehož základě byl zkonstruován kmen *M19* (BERANOVA et al. 2008) použitý v této práci, by se mohly uplatňovat oba tyto mechanismy a vzájemně se doplňovat. Vyplývá to z analýzy mastných kyselin provedené u *Bacillus subtilis* 168 po chladovém šoku 37-15°C, kdy bylo zaznamenáno zvýšené zastoupení nejen nenasycených, ale také anteizo-větvených mastných kyselin oproti situaci v optimální kultivační teplotě (KLEIN et al. 1999; BERANOVA et al. 2008). Společné působení obou mechanismů potvrzují experimenty, při kterých bylo sledováno množství *des* mRNA v buňkách *Bacillus subtilis* JH642 po chladovém šoku 37-20°C. Maximální koncentrace *des* mRNA byla zaznamenána 30minut po přenosu kultury do nižší teploty a pak množství *des* mRNA klesalo (AGUILAR et al. 1999). Nejvíce *des* mRNA se tedy nachází v buňce bezprostředně po přenesení z optimální teploty kultivace do  $T_k$  20°C, kdy bakteriální kultura neroste (kapitola 4.1.2, Obr.38) a biosyntetické dráhy jsou inhibovány. Krátkodobá adaptace *Bacillus subtilis* na snížení membránové fluidity spočívající v desaturaci mastných kyselin, které jsou součástí membránových fosfolipidů, umožňuje bakteriální buňce upravit membránovou fluiditu rychle a nezávisle na *de novo* syntéze mastných kyselin i během růstového lagu. Po obnovení růstu dochází k postupnému vymizení *des* mRNA (AGUILAR et al. 1999). Je to pravděpodobně způsobeno tím, že v rostoucí kultuře jsou syntetizovány větvené mastné kyseliny, jejichž produkce je závislá na funkční biosyntetické dráze vedoucí k mastným kyselinám. Krátkodobá adaptace je nahrazena dlouhodobou adaptací a desaturázy již není potřeba.

Kromě zjištění, jaký nejmenší pokles teploty je vnímán senzorem membránové fluidity DesK, jsem chtěla sledovat, zda je pro senzor DesK důležitější změna membránové fluidity nebo zda registruje určitou fluiditu membrány za daných teplotních podmínek. Porovnala jsem tedy situace, kdy byla rostoucí bakteriální kultura přenesena do  $T_k$  15°C z optimální teploty kultivace  $T_k$  40°C a z nízké  $T_k$  20°C. Po chladovém šoku 40-15°C byl pozorován několikahodinový lag a aktivita  $\beta$ -galaktosidázy byla velmi nízká i 24 hodin po chladovém šoku (Obr. 38 a 39). Po přenosu kultury z  $T_k$  20°C do  $T_k$  15°C bakteriální kultura ihned pokračovala v růstu s dobou zdvojení typickou pro  $T_k$  15°C, aktivita  $\beta$ -galaktosidázy byla v okamžiku chladového šoku poměrně vysoká (172 MU) a poté dále stoupala k hodnotě 290 MU



(Obr. 38 a Obr.39). Srovnáme-li přenos rostoucí kultury do  $T_k$  15°C z vysoké (40°C) a nízké (20°C) teploty kultivace, je zřejmé, že pokud jsou buňky preadaptovány kultivací v nižší teplotě, s následným přenosem do nižší kultivační teploty se lépe vyrovnávají. Buňky přizpůsobené na růst v nízké  $T_k$  20°C zaznamenají pokles teploty o 5°C a reagují na něj zvýšením transkripce z promotoru genu *des*. Z toho vyplývá, že to, co vnímá senzor membránové fluidity DesK, není určitá fluidita membrány typická pro sledovanou teplotu, ale spíše změna fluidity vyvolaná poklesem vnější teploty, což je v souladu se zjištěním, že regulace desaturace mastných kyselin u *Bacillus subtilis* závisí na rozdílu teplot a ne na absolutní teplotě kultivace (GRAU a DE MENDOZA 1993).

### Aktivita promotoru genu *des* ve stálé teplotě kultivace

Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy byla sledována také v průběhu kultivace v různých stálých teplotách, aby bylo možné odpovědět na otázku, zda při přenosu z optimální do nízké teploty kultivace nedochází pouze k dorovnání aktivit promotoru genu *des*, které jsou charakteristické pro jednotlivé teploty kultivace. Výsledky jsou zachyceny v grafu na Obr.45, z kterého je vidět, že pro bakteriální buňku existují dvě skupiny teplot: nízké teploty ( $T_k$  15°C, 20°C a 25°C), ve kterých je srovnatelně vysoká aktivita promotoru genu *des*, a vysoké teploty ( $T_k$  30°C, 35°C a 40°C), ve kterých je aktivita  $\beta$ -galaktosidázy nízká. Pokud je bakteriální buňka vystavena působení různě velkým změnám kultivační teploty dokáže odpovídat stupňovitě – např. teplotní skok o 5°C níže vyvolá menší aktivitu promotoru genu *des* než náhlý pokles teploty o 10°C. Naproti tomu ve stálé kultivační teplotě bakteriální buňka rozlišuje pouze dva stavy membrány – rigidní a fluidní (kapitola 4.2.2), na které odpovídá zapnutím nebo vypnutím transkripce z promotoru genu *des*. Tyto výsledky rovněž naznačují, že senzor membránové fluidity DesK je více citlivý ke změnám membránové fluidity, které jsou vyvolány náhlým poklesem teploty, než k určité hodnotě fluidity typické pro danou stálou teplotu.

### Reportérový gen *lacZ* a kinetika odbourávání jeho produktu $\beta$ -galaktosidázy

Aktivita promotoru genu *des* (*Pdes*) byla sledována pomocí reportérového genu *lacZ*, který byl fúzován s promotorem. O transkripci probíhající z *Pdes* tak vypovídala vyšší aktivita  $\beta$ -galaktosidázy v buňce. Po přenosu rostoucí bakteriální kultury z optimální teploty kultivace 40°C do nižší  $T_k$  35°C, 30°C, 25°C a 20°C byl pozorován

podobný průběh aktivity  $\beta$ -galaktosidázy v čase (Obr.39): aktivita stoupala a po dosažení svého maxima začala postupně klesat. Po chladovém šoku 40-25°C dosáhne aktivita  $\beta$ -galaktosidázy svého maxima 2 hodiny po přenosu do nižší teploty, pak postupně klesá a ve třetí hodině se pokles zastaví. Stejný průběh aktivity po chladovém šoku 40-25°C byl již u *Bacillus subtilis* pozorován (THUY LE a SCHUMANN 2007). Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy po přenosu z  $T_k$  40°C do  $T_k$  20°C začala narůstat až hodinu po šoku a svého maxima dosáhla v čase 4 hodiny po šoku, což bylo zaznamenáno i v práci AGUILAR a spolupracovníků (1998).

Reportérový gen *lacZ* je běžně používán při studiu změn transkripce. Změna aktivity promotoru genu *des* byla sledována pomocí aktivity  $\beta$ -galaktosidázy v mnoha pracích (AGUILAR et al. 1998; AGUILAR et al. 1999; AGUILAR et al. 2001; CYBULSKI et al. 2002; THUY LE a SCHUMANN 2007). Průběh aktivity  $\beta$ -galaktosidázy v čase po definovaném chladovém šoku v rámci jednotlivých prací příliš neliší, lze ho tedy reprodukovat, což potvrzují i mé výsledky. Otázkou však zůstává, nakolik přítomnost  $\beta$ -galaktosidázy v buňce vypovídá o přítomnosti desaturázy Des. Po chladovém šoku hladina *des* mRNA dosáhne maximální hodnoty 30 minut po šoku a po 60 minutách dochází k výraznému snížení koncentrace *des* mRNA v buňce (AGUILAR et al. 1999), ale maximum  $\beta$ -galaktosidázové aktivity se nachází až v čase 4 hodiny po šoku. Obdobně je tomu i při kultivaci *Bacillus subtilis* JH642 na minimálním médiu bez izoleucinu ve 37°C, kdy nejvíce *des* mRNA bylo detekováno ve druhé hodině kultivace, ale maximum  $\beta$ -galaktosidázové aktivity leželo až v šesté hodině kultivace (CYBULSKI et al. 2002). Je zřejmé, že aktivita promotoru, která je sledována jako aktivita  $\beta$ -galaktosidázy, může být zdánlivě posunuta v čase. Přestože bylo prokázáno, že *des* mRNA nemá dlouhou 5'UTR oblast typickou pro chladově indukované proteiny, je možné, že translace *des* mRNA a *lacZ* mRNA neprobíhají se stejnou efektivitou. Stabilita obou enzymů,  $\beta$ -galaktosidázy a desaturázy, se také může velmi lišit. Enzym  $\beta$ -galaktosidáza je jako reportérový gen velmi odolný k degradaci a může tak v buňce zřejmě přetrvat nesrovnatelně déle než desaturáza. Pozvolný pokles aktivity  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku může tedy být dáno jejím spíše postupným vyředováním než její degradací.

Změna signalizace proteinem DesK by mohla být lépe sledována prostřednictvím přímého stanovení obsahu desaturázy v buňce, např. pomocí fúze s GFP či metodou Western blott. Tento přístup by mohl napovědět něco o kinetice

desaturace a metabolickém obratu desaturázy. Přímé sledování enzymu Des by mohlo pomoci objasnit i průběh aktivity  $\beta$ -galaktosidázy v čase za stálé teploty kultivace.

I přes výše zmíněné nevýhody umožnilo sledování aktivity promotoru *Pdes* pomocí aktivity  $\beta$ -galaktosidázy první vhled do regulace desaturace mastných kyselin v závislosti na kultivační teplotě a také na přidavku membránově aktivní látky.

### **Membránově aktivní látky s fluidizačním účinkem: alkoholová řada**

V této práci byly testovány alkoholy jako látky, které mají fluidizační účinek na membránu. Byly vybrány alkoholy s různě dlouhým uhlíkatým řetězcem, u kterých byl předpoklad, že budou na membránu působit odlišným způsobem – ethanol, propanol, butanol, benzylalkohol a oktanol. Všechny vybrané alkoholy byly schopné snížit stupňovitě aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po přenosu rostoucí kultury z optimální  $T_k$  40°C do nízké  $T_k$  20°C v závislosti na koncentraci (Obr.49-53C,D). Všechny použité koncentrace propanolu, benzylalkoholu a oktanolu měly velmi malý či žádný vliv na dobu zdvojení po chladovém šoku 40-20°C (Obr.50, 52, 53A). Lze tedy předpokládat, že účinek těchto alkoholů na aktivitu promotoru *Pdes* je dán jejich působením na membránovou fluiditu a tím na signalizaci proteinem DesK a neuplatňuje se nespecifické ovlivnění transkripce nebo proteosyntézy.

Účinné koncentrace ethanolu 428mM a 856mM (2,5% a 5%), které snižovaly aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C, výrazně prodlužovaly dobu zdvojení po chladovém šoku. Pozorované snížení aktivity promotoru *Pdes* tak může být zapříčiněno nespecifickou inhibicí transkripce či translace. Ethanol jako krátký alkohol s nízkým partičním koeficientem musí být přidán do kultivačního média v poměrně vysoké koncentraci, aby se alespoň část molekul ethanolu zabudovala do membrány a ovlivnila tak její fluiditu. Ethanol se proto může vyskytovat ve větší koncentraci v cytoplazmě bakteriální buňky, kde může působit na aktivitu enzymů včetně desaturázy. Inhibiční vliv ethanolu na membránové enzymy byl prokázán např. v případě adenosintrifosfatázy (INGRAM 1976). Inhibiční působení ethanolu bylo potvrzeno také v případě bakterií s anaerobní dráhou syntézy mastných kyselin *Escherichia coli* a *Pseudomonas putida*, u kterých bylo po přidavku fluidizujícího ethanolu pozorováno zvýšené zastoupení nenasycených mastných kyselin, což bylo způsobeno inhibicí některého z enzymů biosyntézy mastných kyselin (MAGNUSON et al. 1993; KEWELOH a HEIPIEPER 1996; KABELITZ et al. 2003). Dřívější výsledky získané v naší laboratoři také naznačují nespecifickou inhibici desaturázy Des

*Bacillus subtilis*. Bylo porovnáváno složení mastných kyselin po chladovém šoku 40-20°C s přidavkem a bez přidavku ethanolu: v přítomnosti ethanolu se po chladovém šoku sníží množství nenasycených mastných kyselin a zvýší se zastoupení anteizo- větvených mastných kyselin oproti situaci chladového šoku bez ethanolu (KONOPASEK et al. 2000). Tyto výsledky také opět potvrzují schopnost *Bacillus subtilis* zapojovat oba mechanismy adaptace na nízkou fluiditu membrány – je-li blokována desaturáza, uplatní se ve zvýšené míře role anteizo- větvených kyselin. Koncentrace butanolu 100mM a 125mM neovlivňují po chladovém šoku 40-20°C příliš výrazně dobu zdvojení (Obr. 51A), ale snižují aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy. Měření fluidity membrány pomocí anizotropie fluorescence DPH ukázalo snížení uspořádanosti v přítomnosti butanolu (Obr.51B). Po chladovém šoku by tedy 100mM butanol mohl vyvolat pokles aktivity promotoru *Pdes* prostřednictvím jeho působení na fluiditu membrány a ne nespecifickou inhibicí - zvýšení fluidity membrány po působení butanolu bylo prokázáno (SHIRLEY et al. 1987). Při kultivaci v  $T_k$  40°C však přidavek 100mM butanolu způsobí prodloužení doby zdvojení o 50% (Tab. 5), což naznačuje značné poškození fyziologie bakteriální buňky po přidavku butanolu, proto nelze inhibiční působení butanolu na transkripci a translaci vyloučit ani po chladovém šoku. Možným vysvětlením odlišného ovlivnění doby zdvojení v optimální teplotě kultivace  $T_k$  40°C a po přenosu kultury z optimální  $T_k$  40°C do nízké  $T_k$  20°C je kompenzace toxických účinků butanolu jeho působením na membránu v nízké teplotě. Podobný efekt vlivu alkoholu byl pozorován u *Oenococcus oeni*. Bylo zjištěno, že bakterie lépe přežívají kombinaci ethanolového a chladového šoku než jen samotný ethanolový stres (CHU-KY et al. 2005). Autoři této práce předpokládají, že po chladovém šoku, kdy je membrána rigidní, dokáže přidavek ethanolu zvýšit fluiditu membrány a tím bakteriální buňce pomoci lépe překonat náhlé snížení vnější teploty. Fluidizační účinky ethanolu jsou natolik významné pro buňku po chladovém šoku, že je jimi kompenzován toxický vliv ethanolu na jiné procesy v buňce. Podobně by mohl působit také benzylalkohol, který po chladovém šoku 40-20°C zkracuje růstový lag bakteriální kultury *Bacillus subtilis* (KONOPASEK et al. 2000). Domnívám se, že by se podobný mechanismus vlivu alkoholu na dobu zdvojení v optimální teplotě kultivace a po chladovém šoku mohl uplatňovat i v případě působení butanolu na růstovou rychlost *Bacillus subtilis*.

Účinek alkoholů na fluiditu membrány byl sledován měřením anizotropie fluorescence DPH izolovaných bakteriálních membrán. Významný pokles hodnot

anizotropie fluorescence DPH byl zaznamenán pouze po přidavku butanolu a benzylalkoholu.

Anizotropie DPH izolovaných bakteriálních membrán byla po přidání ethanolu ovlivněna jen málo, posun teplotní závislosti pro nejvyšší koncentraci, která byla použita k ovlivnění aktivity  $\beta$ -galaktosidázy činil pouze 2°C. Fluidizační účinky ethanolu však byly již několikrát potvrzeny (ALMEIDA et al. 1986; KIM et al. 1993; SIKKEMA et al. 1995), měření anizotropie fluorescence DPH tedy není metoda vhodná k zachycení účinku ethanolu na membránovou fluiditu. Je to zřejmě způsobeno odlišnou lokalizací sondy DPH a molekul ethanolu v fosfolipidové dvojvrstvě. Sonda DPH se zabudovává do hydrofobního vnitřku membrány a zde také registruje změny pohybu molekul. Ethanol, který se do membrány váže neochotně, zůstává při povrchu membrány (BARRY a GAWRISCH 1994; KONOPASEK et al. 2000). Interpretace výsledků získaných testováním účinků ethanolu na úrovni aktivity promotoru *Pdes* a na úrovni membránové fluidity izolovaných bakteriálních membrán měřenou pomocí anizotropie DPH není triviální. Není totiž jasné, zda snížení aktivity  $\beta$ -galaktosidázy je způsobeno pouze nespecifickým inhibičním účinkem ethanolu na buněčné enzymy nebo zda ethanol fluidizuje bakteriální membránu dostatečně na to, aby senzor DesK zaznamenal snížení uspořádanosti membrány a odpověděl vypnutím transkripce z *Pdes*. Nelze pak jednoznačně vysvětlit, proč po přidavku ethanolu k izolovaným bakteriálním membránám nedošlo k výraznému snížení hodnot anizotropie DPH (zvýšení fluidity membrány): ethanol nefluidizuje bakteriální membrány a snížení aktivity  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku s ethanolem je způsobeno nespecifickou inhibicí buněčných enzymů nebo ethanol bakteriální membrány fluidizuje, ale sonda DPH nezachytí snížení uspořádanosti vlivem ethanolu, neboť se nachází v jiné oblasti membrány než ethanol. Pravděpodobně se ale oba účinky ethanolu kombinují, ethanol může mírně fluidizovat membránu a zároveň nespecificky negativně ovlivňovat enzymy v bakteriální buňce, což se projevuje na úrovni snížené růstové rychlosti.

Propanol nevyvolal příliš velký pokles hodnot anizotropie DPH ani ve čtyřnásobné koncentraci, která téměř úplně zastavila transkripci z promotoru *Pdes*, posun teplotní závislosti anizotropie DPH po přidavku 272mM propanolu činil pouze 3°C (Obr. 50B). Koncentrace propanolu 68mM snížila transkripci z *Pdes* na minimum a zároveň neprodlužovala dobu zdvojení. Z toho vyplývá, že propanol fluidizuje membránu takovým způsobem, který vnímá senzor membránové fluidity DesK, a snížení aktivity  $\beta$ -galaktosidázy není dáno toxickým účinkem propanolu na buněčné

enzymy. Propanol tedy skutečně fluidizuje membránu *Bacillus subtilis*, ale měření anizotropie fluorescence DPH tuto změnu nezaznamená. Propanol se totiž do membrány zabudovává do blízkosti polárních hlaviček fosfolipidů (KIM et al. 1993) a do hlubších vrstev, kde se nachází sonda DPH nepronikne.

Butanol vyvolal posun teplotní závislosti anizotropie DPH izolovaných bakteriálních membrán o 5°C, respektive o 7°C i v koncentracích, které neovlivňovaly dobu zdvojení po chladovém šoku 40-20°C (100mM a 125mM). Tyto koncentrace byly účinné ve snížení transkripce z *Pdes* po chladovém šoku, i když opět nelze určit, zda se na snížení aktivity  $\beta$ -galaktosidázy nepodílel nespecifický inhibiční účinek butanolu. Koncentrace butanolu 100mM a 125mM totiž významně prodlužovaly dobu zdvojení v optimální teplotě kultivace  $T_k$  40°C. Je proto nutné uvažovat i nespecifický účinek butanolu na buněčné enzymy a tedy i na snížení aktivity  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku. Je vidět, že butanol ovlivňuje fluiditu izolovaných bakteriálních membrán takovým způsobem, který je možno zachytit měřením anizotropie fluorescence DPH. Butanol tedy musí působit v blízkosti hydrofobního jádra membrány, tedy v blízkosti sondy DPH, což je v souladu s pozorováními, že butanol se zabudovává do centra membrány (ZAVOICO et al. 1985; WAN et al. 2002).

Přídavek benzylalkoholu způsobil ze všech alkoholů největší pokles hodnot anizotropie fluorescence DPH. Koncentrace benzylalkoholu 2mM, 5mM a 10mM vyvolaly posun teplotní závislosti anizotropie DPH o 12°C, 20°C a více než 20°C. Tyto koncentrace zároveň neměly vliv na dobu zdvojení a snižovaly aktivitu promotoru *Pdes* po chladovém šoku 40-20°C. Benzylalkohol je cyklická planární molekula, která se zabudovává do hydrofobního jádra membrány (SIKKEMA et al. 1995; HO a STUBBS 1997; KONOPASEK et al. 2000; DENICH et al. 2003). Působí tedy v té části membrány, ve které sonda DPH registruje změny fluidity. Benzylalkohol jako jediný alkohol způsoboval takové změny fluidity membrány, které registroval senzor DesK, a zároveň tyto změny fluidity způsobily takový pokles hodnot anizotropie DPH izolovaných bakteriálních membrán, který by odpovídal změně teploty, která může v bakteriální buňce vypnout transkripci z promotoru *Pdes*.

Oktanol v nejvyšší použité koncentraci (1mM) způsobil posun teplotní závislosti anizotropie DPH pouze o 4°C (Obr. 53). Koncentrace 1mM neovlivňovala dobu zdvojení po chladovém šoku 40-20°C a zcela vypnula transkripci z *Pdes*. Oktanol tedy ovlivňuje aktivitu promotoru prostřednictvím svého působení na membránovou fluiditu (neprodukuje dobu zdvojení a snižuje aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy), což potvrzuje i práce

BARHOUMIHO a spolupracovníků (1995). Přesto jeho vliv není odpovídajícím způsobem zachycen pomocí DPH. Oktanol se zřejmě prostřednictvím své OH skupiny kotví k polárnímu povrchu membrány, jak popsal ve své práci Wan (WAN et al. 2002). Stejná interakce OH skupiny s polárními hlavičkami fosfolipidů byla v práci ROWEHO a spolupracovníků (1987) předpokládána i u ostatních alkoholů. Alkoholy by pak působily v různé hloubce membrány v závislosti na délce uhlíkatého řetězce alkoholu (ROWE et al. 1987; HO a STUBBS 1997). Moje výsledky s anizotropií DPH však tento obecný způsob zabudování alkoholů do membrány nepotvrdily – i vliv butanolu na fluiditu membrány byl zachycen sondou DPH a největší efekt vykazoval benzylalkohol s menším počtem uhlíkových atomů než oktanol. Struktura BA s aromatickým jádrem zřejmě umožňuje nejefektivnější fluidizaci v hloubce membrány.

Bakteriální buňka prostřednictvím senzoru DesK vnímá změny fluidity vyvolané přidavkem všech alkoholů, které byly studovány v této práci, i když v případě ethanolu a butanolu nelze vyloučit nespecifický vliv na transkripci a translaci. Měření anizotropie fluorescence DPH však o změnách fluidity způsobené přidavkem alkoholu není univerzálním měřítkem účinnosti jednotlivých alkoholů. Pokles hodnot anizotropie DPH izolovaných bakteriálních membrán odpovídající účinku na indukci  $\beta$ -galaktosidázy byl pozorován pouze po působení butanolu a benzylalkoholu.

Partiční koeficient ( $\log P$ ) rozhoduje o tom, jak ochotně se bude alkohol vázat do membrány a v jaké hloubce membrány se bude nacházet. Partiční koeficient alkoholů roste s délkou uhlíkatého řetězce. Alkoholy s delším uhlíkatým řetězcem se snadněji váží do membrány, proto je zapotřebí jejich nižší koncentrace než u kratších alkoholů k dosažení stejného účinku na membránu. Moje výsledky skutečně potvrdily, že účinná koncentrace alkoholu, tedy taková, která sníží aktivitu promotoru *Pdes* po chladovém šoku, klesá s rostoucí délkou alkoholu. Výjimkou je butanol, který účinně snižoval aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku ve vyšších koncentracích než propanol.

Partiční koeficient měřený jako podíl koncentrací alkoholu mezi oktanolovou a vodnou fází se ukázal jako nevyhovující pro predikci lokalizace alkoholu v membráně. Alkoholy s větším partičním koeficientem (Tab. 5) by se měly zabudovávat spíše do hlubších vrstev membrány (REDDY et al. 1995), kde by jejich přítomnost měla zaznamenat sonda DPH, tento předpoklad se ale neprokázal. Zabudování alkoholů do membrány nemusí totiž záviset pouze na vlastnostech daného alkoholu (jeho partičním koeficientu). Roli v interakci membrány a alkoholu hrají i další faktory, např. složení

membrány, teplota, pH, rychlost metabolismu, které také mohou ovlivnit distribuci alkoholu v membráně (SIKKEMA et al. 1995).

Bakteriální membrána je velmi heterogenní prostředí, ve kterém jednotlivé komponenty nejsou rozmístěny rovnoměrně, ale v tzv. mikrodoménách či raftech (DENICH et al. 2003). Membránově aktivní látky se mohou preferenčně vázat do mikrodomén s určitými fyzikálními vlastnostmi nebo složením (DONATO et al. 2000; LEEKUMJORN a SUM 2006). U benzylalkoholu byla pozorována jeho preferenční vazba do mikrodomén v „hyperfluidním“ stavu (SHIGAPOVA et al. 2005). Změny fyzikálního stavu membrány v určité mikrodoméně mohou mít mnohdy významnější vliv než změna fyzikálního stavu membrány jako celku, protože membránové proteiny (tedy i ty signální) se mohou koncentrovat právě v doménách, které jsou nejvíce ovlivněné působením membránově aktivní látky (DONATO et al. 2000).

DPH nevykazuje preferenci k tekuté nebo tuhé fázi v membráně (BAUMGART et al. 2007), proto fluorescenční měření anizotropie DPH poskytují informace pouze o průměrném chování celé membrány (ANTUNES-MADEIRA a MADEIRA 1989; DONATO et al. 1997). Nezachytí tedy narušení uspořádanosti, které se odehrává jen v určité mikrodoméně, což se také může podílet tom, že anizotropie fluorescence DPH nezaznamená zvýšení fluidity po přidavku alkoholu, i když tento alkohol snižuje aktivitu promotoru *Pdes* po chladovém šoku.

### **Generalizovaná polarizace Laurdanu**

Generalizovaná polarizace (GP) Laurdanu je fluorescenční metoda, která umožňuje měřit podíl tekuté a tuhé fáze v membráně. Sonda Laurdan, která se zabudovává spíše do blízkosti polárního povrchu membrány, je citlivá k polaritě prostředí a monitoruje pronikání vody do membrány (DE VEQUI-SUPLICY et al. 2006).

Měření GP Laurdanu by mělo zachytit ovlivnění fluidity membrány těmi alkoholy, které působí v polární oblasti membrány. Největší efekt na posun teplotní závislosti GP měl opravdu ethanol, který interaguje s membránou v oblasti polárních hlaviček fosfolipidů. Ethanol zvyšoval fluiditu izolovaných bakteriálních membrán měřenou pomocí GP Laurdanu v celém sledovaném teplotním rozsahu. Pozorovaný vliv ethanolu na pronikání molekul vody do fosfolipidové dvojvrstvy odpovídá již publikovaným výsledkům (HO a STUBBS 1997). Je zajímavé, že oktanol, jehož fluidizační účinek na bakteriální membránu nezachytilo měření anizotropie



fluorescence DPH, způsoboval snížení hodnot GP Laurdanu, i když pouze malé a jen v teplotním rozsahu 28°C až 15°C. To by znamenalo, že oktanol, nejdelší alkohol použitý v této práci s nejvyšším partičním koeficientem, ovlivňuje fluiditu membrány *Bacillus subtilis* v oblasti polárních hlaviček fosfolipidů. Posuny teplotních závislostí GP Laurdanu vyvolané alkoholy (ethanolem a oktanolem) však byly velmi malé. Generalizovaná polarizace Laurdanu tedy není vhodným ukazatelem změn membránových parametrů.

Odpověď na otázku, kam se skutečně zabudovávají jednotlivé alkoholy, by přinesla měření s fluorescenčními sondami citlivými k polaritě okolí, které by byly lokalizovány v určité hloubce membrány.

### Diferenciální skenovací kalorimetrie

Teplota fázového přechodu je další fyzikální parametr membrány, který by mohl být vnímán senzorem membránové fluidity DesK. Dřívější výsledky získané v naší laboratoři ukazují, že teplota fázového přechodu izolovaných bakteriálních lipidů izolovaných z kultury rostoucí v optimální  $T_k$  40°C a nízké  $T_k$  20°C se liší o 10,6°C (BERANOVA et al. 2008). Posun teploty fázového přechodu po přidavku alkoholů byl již prokázán (ALMEIDA et al. 1986; KONOPASEK et al. 2000). Alkoholy by tedy mohly snižovat teplotu fázového přechodu bakteriálních lipidů po chladovém šoku, podstatně snižovat podíl pevné fáze v membránách, a tak pomoci buňce lépe se vyrovnat s rigidizací membrány. V mé práci se mi však nepodařilo zjistit výraznější posun teploty fázového přechodu lipidů (koncentrace alkoholů, které snižovaly aktivitu promotoru *Pdes* po chladovém šoku, způsobily posun  $T_m$  pouze o 1°C), proto posun fázového přechodu do nižších hodnot pravděpodobně není parametrem, který buňka vnímá jako fluidizační účinek alkoholů. Dále bylo sledováno, jak alkoholy ovlivní parametry  $T_w$  a  $T_m$ , které popisují šířku fázového přechodu. Alkoholy však významně nepůsobily ani na tento parametr. Šířka fázového přechodu izolovaných bakteriálních lipidů je poměrně velká – fázový přechod probíhá v rozmezí asi 10°C, což je v souladu s pozorovanou šířkou fázového přechodu pro směsný vzorek lipidů (DENICH et al. 2003). Je to dáno tím, že větší heterogenita vzorku vede k nekooperativnímu fázovému přechodu. Řetězce mastných kyselin neprocházejí fázovým přechodem ve stejné teplotě a navíc jednotlivé lipidy spolu mohou interagovat. Výsledkem je širší fázový přechod, tedy širší teplotní rozmezí, kdy vedle sebe koexistují fáze gelu a fáze tekutého krystalu (MCELHANEY 1982; DENICH et al. 2003). Alkoholy tedy nejsou schopny proces

fázového přechodu bakteriálních lipidů nějak výrazně ovlivnit: neposouvají teplotu fázového přechodu, ani nezvětšují jeho šířku. V tak komplexním vzorku, jakým jsou bakteriální lipidy, alkoholy tedy nepředstavují dostatečný impulz k ovlivnění fázového přechodu. Senzor DesK vnímá fluidizační působení alkoholů na úrovni změny jiného fyzikálního parametru než je fázový přechod.

### **Membránově aktivní látky s rigidizačním účinkem**

V této práci byly jako látky s rigidizačním účinkem na membránu testovány dimethylsulfoxid, cholesteryl-hemisukcinát, kyselina palmitová a hlinité ionty, jejichž účinky na zvýšení uspořádanosti membrány byly již dříve popsány v literatuře (VERSTRAETEN a OTEIZA 2000; YANG et al. 2000; PANADERO et al. 2006).

Cholesteryl-hemisukcinát (CHS) v nejvyšší použité koncentraci 100 $\mu$ M prodlužoval dobu zdvojení při kultivaci v optimální  $T_k$  40°C asi o 25%, ale zvýšení aktivity promotoru *Pdes* v této teplotě nevyvolal. Anizotropie fluorescence nemohla být naměřena z technických důvodů, CHS se totiž velmi špatně rozpouští ve vodném prostředí (kapitola 4.5.2). Kyselina palmitová ve všech použitých koncentracích neměla vliv na dobu zdvojení při kultivaci v optimální  $T_k$  40°C a také nezvyšovala aktivitu promotoru *Pdes*. Rigidizace membrány kyselinou palmitovou nemohla být rovněž pomocí měření anizotropie fluorescence DPH zjištěna. Přídavek hlinitých iontů významně neovlivňoval dobu zdvojení v  $T_k$  35°C, hodnoty anizotropie fluorescence zvyšoval jen mírně (největší posun teplotní závislosti činil 2°C) a aktivita promotoru *Pdes* také nebyla vyšší.

Zajímavé byly účinky dimethylsulfoxidu (DMSO). DMSO v koncentracích 846mM a 1410mM velmi prodlužoval dobu zdvojení v  $T_k$  40°C, zároveň však tyto koncentrace nezvýšily aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy v této teplotě. Při měření anizotropie fluorescence DPH izolovaných bakteriálních membrán byl pozorován ne rigidizační, ale fluidizační účinek DMSO (pokles hodnot anizotropie DPH). Po mírném chladovém šoku 40-35°C byla zaznamenána zvýšená aktivita  $\beta$ -galaktosidázy. Přestože je DMSO používán již dlouhou dobu jako běžně jako rigidizační činidlo (INGRAM 1976; HAYASHI a MAEDA 2006), jeho účinky na fluiditu membrány se zjevně mohou lišit v závislosti na složení sledované membrány. Přírodní membrány (např. bakteriální) jsou velmi heterogenní struktury, které mohou interagovat s membránově aktivní látkou jinak než umělé membrány. Membránově aktivní látka se může preferenčně zabudovávat do určité mikrodomény (viz výše) a působit na uspořádanost membrány

jinak než v případě umělých membrán, které se většinou používají pro testování účinku látek na membrány (MARGUET et al. 2006). To potvrzuje i výsledek uvedený v této práci (Obr. 56) – syntetické lipidy, lipozomy složené pouze z dimyristoylfosfatidylcholinu (DMPC), měly v přítomnosti DMSO teplotu fázového přechodu posunutou do vyšší teploty, naproti tomu DMSO vykazoval podobný fluidizační účinek na lipozomy ze sojového fosfatidylcholinu, které nemají přesně definované složení, a na izolované bakteriální membrány. Na tyto komplexnější membrány působil DMSO zvýšení fluidity, která byla měřena pomocí anizotropie fluorescence DPH.

Membránově aktivní látku s dostatečným rigidizačním účinkem se tedy v této práci nepodařilo nalézt. Všechny testované látky nezpůsobily dostatečné zvýšení uspořádanosti membrány (s výjimkou rigidizačního efektu DMSO po mírném chladovém šoku), které by vnímal senzor membránové fluidity DesK a reagoval na tento pokles fluidity membrány změnou signalizace.

Je také možné, že bakteriální buňce jako signál pro expresi chladově indukovaných genů nestačí pouze změna fluidity membrány. Bylo zjištěno, že přidavek inhibitoru gyrázy novobiocinu zabrání indukci exprese genu *des* po chladovém šoku (GRAU et al. 1994; WEBER a MARAHIEL 2002). Gyrázou zprostředkované změny topologie DNA po chladovém šoku jsou důležité pro adaptivní odpověď bakterie *Bacillus subtilis* na chladový šok. Je možné, že bakteriální buňka porovnává fyzikální stav membrány s topologií DNA a jen v případě, že jsou změny struktury obou komponent dostatečné, spustí transkripci chladově indukovaných genů.

## 6 Souhrn

Změna signalizace senzoru membránové fluidity DesK *Bacillus subtilis* byla studována prostřednictvím ovlivnění fluidity bakteriální membrány teplotou a přidavkem membránově aktivní látky.

### 1. Aktivita promotoru genu *des* po teplotních skocích

Po chladovém šoku dochází k nárůstu aktivity  $\beta$ -galaktosidázy. Nejvyšší nárůst aktivity  $\beta$ -galaktosidázy nastává po přenosu kultury z Tk 40°C do Tk 25°C. Pokles kultivační teploty alespoň o 5°C je schopen vyvolat takovou změnu fluidity membrány, na kterou senzor DesK reaguje změnou signalizace.

### 2. Aktivita promotoru genu *des* v závislosti na teplotě kultivace při stálé teplotě kultivace

Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy je v Tk 30°C, 35°C a 40°C srovnatelně nízká a v Tk 15°C, 20°C a 25°C srovnatelně vysoká. Senzor DesK ve stálé kultivační teplotě rozlišuje pouze dva stavy membrány – rigidní a fluidní membránu. V Tk 30°C senzor DesK vnímá membránu jako dostatečně tekutou a v Tk 25°C senzor DesK pociťuje sníženou fluiditu a reaguje na ni zvýšenou transkripcí z *Pdes*.

### 3. Membránově aktivní látky s fluidizačním účinkem: alkoholová řada

Všechny testované alkoholy (ethanol, propanol, butanol, benzylalkohol, oktanol) snižovaly aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku 40-20°C. Významný pokles hodnot anizotropie fluorescence DPH izolovaných bakteriálních membrán byl naproti tomu pozorován pouze po přidavku butanolu a benzylalkoholu. Sonda DPH registruje změnu fluidity membrány vyvolanou jen těmi alkoholy, které se zabudovávají do stejné oblasti membrány jako sonda DPH.

### 4. Membránově aktivní látky s rigidizačním účinkem

Žádná z testovaných membránově aktivních látek s předpokládaným rigidizačním účinkem (dimethylsulfoxid, cholesteryl-hemisukcinát, kyselina palmitová, hlinité ionty) nezvýšily za izotermálních podmínek aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy. Přídavek hlinitých iontů k izolovaným bakteriálním membránám způsobil jen mírnou rigidizaci

membrány. Rigidizační účinky dimethylsulfoxidu byly potvrzeny na lipozomech z DMPC, u izolovaných bakteriálních membrán bylo ale po přidavku dimethylsulfoxidu pozorováno zvýšení fluidity membrán. Je tedy zřejmé, že membránově aktivní látky ovlivňují jednodušší membrány ze syntetických lipidů a přirozené membrány jiným způsobem.

#### **5. Generalizovaná polarizace Laurdanu, alternativní metoda sledování stavu membrány**

Měření generalizované polarizace membránové fluorescenční sondy Laurdanu nezachytí fázový přechod izolovaných bakteriálních lipidů, proto není možné metodu měření generalizované polarizace Laurdanu využít jako fluorescenční alternativu k diferenciální skenovací kalorimetrii. Pokud byl Laurdan použit jako alternativa k měření anizotropie fluorescence DPH, pak pokles teplotní závislosti generalizované polarizace Laurdanu izolovaných bakteriálních membrán způsobily ze všech testovaných alkoholů pouze ethanol a oktanol. Generalizovaná polarizace Laurdanu se neukázala jako vhodné měřítko změn membránových parametrů.

#### **6. Diferenciální skenovací kalorimetrie**

Koncentrace alkoholů, které účinně snižovaly aktivitu  $\beta$ -galaktosidázy po chladovém šoku, způsobovaly posun  $T_m$  pouze v rozmezí  $1^\circ\text{C}$  a výrazně neovlivňovaly šířku fázového přechodu. Posun fázového přechodu do nižších hodnot pravděpodobně tedy není parametrem, který buňka vnímá jako fluidizační účinek alkoholů na membránu.

## SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Agafonov, D. E., V. A. Kolb, I. V. Nazimov and A. S. Spirin (1999). "A protein residing at the subunit interface of the bacterial ribosome." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12345-9.
- Aguilar, P. S., J. E. Cronan, Jr. and D. de Mendoza (1998). "A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase." J Bacteriol **180**(8): 2194-200.
- Aguilar, P. S. and D. de Mendoza (2006). "Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans." Mol Microbiol **62**(6): 1507-14.
- Aguilar, P. S., A. M. Hernandez-Arriaga, L. E. Cybulski, A. C. Erazo and D. de Mendoza (2001). "Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*." Embo J **20**(7): 1681-91.
- Aguilar, P. S., P. Lopez and D. de Mendoza (1999). "Transcriptional control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the  $\Delta 5$  desaturase of *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **181**(22): 7028-33.
- Albanesi, D., M. C. Mansilla and D. de Mendoza (2004). "The membrane fluidity sensor DesK of *Bacillus subtilis* controls the signal decay of its cognate response regulator." J Bacteriol **186**(9): 2655-63.
- Almeida, L. M., W. L. Vaz, J. Stumpel and V. M. Madeira (1986). "Effect of short-chain primary alcohols on fluidity and activity of sarcoplasmic reticulum membranes." Biochemistry **25**(17): 4832-9.
- Altabe, S. G., P. Aguilar, G. M. Caballero and D. de Mendoza (2003). "The *Bacillus subtilis* acyl lipid desaturase is a  $\Delta 5$  desaturase." J Bacteriol **185**(10): 3228-31.
- Antunes-Madeira, M. C. and V. M. Madeira (1989). "Membrane fluidity as affected by the insecticide lindane." Biochim Biophys Acta **982**(1): 161-6.
- Antunes-Madeira, M. C., R. A. Videira, M. L. Kluppel and V. V. Madeira (1995). "Amiodarone effects on membrane organization evaluated by fluorescence polarization." Int J Cardiol **48**(3): 211-8.
- Bae, W., P. G. Jones and M. Inouye (1997). "CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, negatively regulates its own gene expression." J Bacteriol **179**(22): 7081-8.
- Barhoumi, R., H. R. Bailey, R. W. Hutchinson, J. A. Bowen and R. C. Burghardt (1995). "Enhancement of melphalan toxicity by octanol in ovarian adenocarcinoma cell lines: effects of altered cell-cell communication, glutathione levels, and plasma membrane fluidity." Fundam Appl Toxicol **25**(1): 70-9.
- Barry, J. A. and K. Gawrisch (1994). "Direct NMR evidence for ethanol binding to the lipid-water interface of phospholipid bilayers." Biochemistry **33**(26): 8082-8.
- Baumgart, T., G. Hunt, E. R. Farkas, W. W. Webb and G. W. Feigenson (2007). "Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes." Biochim Biophys Acta **1768**(9): 2182-94.
- Beales, N. (2004). "Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **3**(1): 1-20.



- Diefenbach, R., H. J. Heipieper and H. Keweloh (1992). "The Conversion of Cis into Trans Unsaturated Fatty-Acids in Pseudomonas-Putita P8 - Evidence for a Role in the Regulation of Membrane Fluidity." Applied Microbiology and Biotechnology **38**(3): 382-387.
- Donato, M. M., M. C. Antunes-Madeira, A. S. Jurado and V. M. Madeira (1997). "Partition of DDT and DDE into membranes and extracted lipids of Bacillus stearothermophilus." Bull Environ Contam Toxicol **59**(5): 696-701.
- Donato, M. M., A. S. Jurado, M. C. Antunes-Madeira and V. M. Madeira (2000). "Membrane lipid composition of Bacillus stearothermophilus as affected by lipophilic environmental pollutants: an approach to membrane toxicity assessment." Arch Environ Contam Toxicol **39**(2): 145-53.
- Dutta, R., L. Qin and M. Inouye (1999). "Histidine kinases: diversity of domain organization." Molecular Microbiology **34**(4): 633-640.
- Eriksson, S., R. Hurme and M. Rhen (2002). "Low-temperature sensors in bacteria." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1423): 887-93.
- Ermolenko, D. N. and G. I. Makhatadze (2002). "Bacterial cold-shock proteins." Cell Mol Life Sci **59**(11): 1902-13.
- Eymann, C., G. Homuth, C. Scharf and M. Hecker (2002). "Bacillus subtilis functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis." J Bacteriol **184**(9): 2500-20.
- Fabret, C., V. A. Feher and J. A. Hoch (1999). "Two-component signal transduction in Bacillus subtilis: how one organism sees its world." J Bacteriol **181**(7): 1975-83.
- Feller, G. (2007). "Life at low temperatures: is disorder the driving force?" Extremophiles **11**(2): 211-6.
- Fourcade, A., C. Billard and H. Tapiero (1980). "Membrane dynamics of Friend leukaemic cells. I. Changes associated with cell growth." Cell Differ **9**(4): 203-10.
- Gordeliy, V. I., M. A. Kiselev, P. Lesieur, A. V. Pole and J. Teixeira (1998). "Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide/water mixtures." Biophys J **75**(5): 2343-51.
- Gorvel, J. P., C. Mawas, S. Maroux and Z. Mishal (1984). "Flow cytometry is a new method for the characterization of intestinal plasma membrane." Biochem J **221**(2): 453-7.
- Grau, R. and D. de Mendoza (1993). "Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids by growth temperature in Bacillus subtilis." Mol Microbiol **8**(3): 535-42.
- Grau, R., D. Gardiol, G. C. Glikin and D. de Mendoza (1994). "DNA supercoiling and thermal regulation of unsaturated fatty acid synthesis in Bacillus subtilis." Mol Microbiol **11**(5): 933-41.
- Graumann, P. and M. A. Marahiel (1994). "The major cold shock protein of Bacillus subtilis CspB binds with high affinity to the ATTGG- and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides." FEBS Lett **338**(2): 157-60.
- Graumann, P. and M. A. Marahiel (1996). "A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules." Bioessays **18**(4): 309-15.
- Graumann, P., K. Schroder, R. Schmid and M. A. Marahiel (1996). "Cold shock stress-induced proteins in Bacillus subtilis." J Bacteriol **178**(15): 4611-9.
- Graumann, P., T. M. Wendrich, M. H. Weber, K. Schroder and M. A. Marahiel (1997). "A family of cold shock proteins in Bacillus subtilis is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures." Mol Microbiol **25**(4): 741-56.



- Graumann, P. L. and M. A. Marahiel (1998). "A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain." Trends Biochem Sci **23**(8): 286-90.
- Graumann, P. L. and M. A. Marahiel (1999). "Cold shock response in *Bacillus subtilis*." J Mol Microbiol Biotechnol **1**(2): 203-9.
- Gruner, S. M., P. R. Cullis, M. J. Hope and C. P. Tilcock (1985). "Lipid polymorphism: the molecular basis of nonbilayer phases." Annu Rev Biophys Biophys Chem **14**: 211-38.
- Gualerzi, C. O., A. M. Giuliodori and C. L. Pon (2003). "Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes." J Mol Biol **331**(3): 527-39.
- Guschina, I. A. and J. L. Harwood (2006). "Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms." FEBS Lett **580**(23): 5477-83.
- Hankins, J. S., C. Zappavigna, A. Prud'homme-Genereux and G. A. Mackie (2007). "Role of RNA structure and susceptibility to RNase E in regulation of a cold shock mRNA, *cspA* mRNA." J Bacteriol **189**(12): 4353-8.
- Harris, F. M., K. B. Best and J. D. Bell (2002). "Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order." Biochim Biophys Acta **1565**(1): 123-8.
- Hayashi, M. and T. Maeda (2006). "Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Biochemistry **139**(4): 797-803.
- Hazel, J. R. and E. E. Williams (1990). "The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment." Prog Lipid Res **29**(3): 167-227.
- Hebraud, M. and P. Potier (1999). "Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria." J Mol Microbiol Biotechnol **1**(2): 211-9.
- Heipieper, H. J., F. J. Weber, J. Sikkema, H. Keweloh and J. A. M. Debont (1994). "Mechanisms of Resistance of Whole Cells to Toxic Organic-Solvents." Trends in Biotechnology **12**(10): 409-415.
- Herman, P., I. Konopasek, J. Plasek and J. Svobodova (1994). "Time-resolved polarized fluorescence studies of the temperature adaptation in *Bacillus subtilis* using DPH and TMA-DPH fluorescent probes." Biochim Biophys Acta **1190**(1): 1-8.
- Ho, C. and C. D. Stubbs (1997). "Effect of n-alkanols on lipid bilayer hydration." Biochemistry **36**(35): 10630-7.
- Hoch, J. A. (2000). "Two-component and phosphorelay signal transduction." Curr Opin Microbiol **3**(2): 165-70.
- Hoch, J. A. and K. I. Varughese (2001). "Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction." Journal of Bacteriology **183**(17): 4941-4949.
- Horn, G., R. Hofweber, W. Kremer and H. R. Kalbitzer (2007). "Structure and function of bacterial cold shock proteins." Cell Mol Life Sci **64**(12): 1457-70.
- Hunger, K., C. L. Beckering and M. A. Marahiel (2004). "Genetic evidence for the temperature-sensing ability of the membrane domain of the *Bacillus subtilis* histidine kinase DesK." Fems Microbiology Letters **230**(1): 41-46.
- Hunger, K., C. L. Beckering, F. Wiegshoff, P. L. Graumann and M. A. Marahiel (2006). "Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **188**(1): 240-8.
- Chattopadhyay, M. K. (2006). "Mechanism of bacterial adaptation to low temperature." J Biosci **31**(1): 157-65.
- Chen, S. Y., B. Yang, K. Jacobson and K. K. Sulik (1996). "The membrane disordering effect of ethanol on neural crest cells in vitro and the protective role of GM1 ganglioside." Alcohol **13**(6): 589-95.

- Choi, K. H., R. J. Heath and C. O. Rock (2000). "beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis." Journal of Bacteriology **182**(2): 365-370.
- Chu-Ky, S., R. Tourdot-Marechal, P. A. Marechal and J. Guzzo (2005). "Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability." Biochim Biophys Acta **1717**(2): 118-24.
- Ingram, L. O. (1976). "Adaptation of membrane lipids to alcohols." J Bacteriol **125**(2): 670-8.
- Ingram, L. O. (1977). "Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives." Appl Environ Microbiol **33**(5): 1233-6.
- Ip, S. H. and R. A. Cooper (1980). "Decreased membrane fluidity during differentiation of human promyelocytic leukemia cells in culture." Blood **56**(2): 227-32.
- Jiang, W., P. Jones and M. Inouye (1993). "Chloramphenicol induces the transcription of the major cold shock gene of *Escherichia coli*, *cspA*." J Bacteriol **175**(18): 5824-8.
- Jones, P. G., M. Cashel, G. Glaser and F. C. Neidhardt (1992). "Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*." J Bacteriol **174**(12): 3903-14.
- Jones, P. G. and M. Inouye (1996). "RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response." Mol Microbiol **21**(6): 1207-18.
- Jones, P. G., M. Mitta, Y. Kim, W. Jiang and M. Inouye (1996). "Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 76-80.
- Jones, P. G., R. A. VanBogelen and F. C. Neidhardt (1987). "Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*." J Bacteriol **169**(5): 2092-5.
- Kaan, T., G. Homuth, U. Mader, J. Bandow and T. Schweder (2002). "Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response." Microbiology-Sgm **148**: 3441-3455.
- Kabelitz, N., P. M. Santos and H. J. Heipieper (2003). "Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*." FEMS Microbiol Lett **220**(2): 223-7.
- Kaneda, T. (1991). "Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance." Microbiol Rev **55**(2): 288-302.
- Keweloh, H., R. Diefenbach and H. J. Rehm (1991). "Increase of phenol tolerance of *Escherichia coli* by alterations of the fatty acid composition of the membrane lipids." Arch Microbiol **157**(1): 49-53.
- Keweloh, H. and H. J. Heipieper (1996). "Trans unsaturated fatty acids in bacteria." Lipids **31**(2): 129-37.
- Khorchid, A. and M. Ikura (2006). "Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer." Int J Biochem Cell Biol **38**(3): 307-12.
- Kim, Y. H., W. I. Higuchi, J. N. Herron and W. Abraham (1993). "Fluorescence anisotropy studies on the interaction of the short chain n-alkanols with stratum corneum lipid liposomes (SCLL) and distearoylphosphatidylcholine (DSPC)/distearoylphosphatidic acid (DSPA) liposomes." Biochim Biophys Acta **1148**(1): 139-51.
- Kjelleberg, S., N. Albertson, K. Flardh, L. Holmquist, A. Jouper-Jaan, R. Marouga, J. Ostling, B. Svenblad and D. Weichart (1993). "How do non-differentiating bacteria adapt to starvation?" Antonie Van Leeuwenhoek **63**(3-4): 333-41.

- Klein, W., M. H. Weber and M. A. Marahiel (1999). "Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures." *J Bacteriol* **181**(17): 5341-9.
- Konopasek, T., K. Strzalka and J. Svobodova (2000). "Cold shock in *Bacillus subtilis*: different effects of benzyl alcohol and ethanol on the membrane organisation and cell adaptation." *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1464**(1): 18-26.
- Kroumova, A. B., Z. Xie and G. J. Wagner (1994). "A pathway for the biosynthesis of straight and branched, odd- and even-length, medium-chain fatty acids in plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(24): 11437-41.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin and et al. (1997). "The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*." *Nature* **390**(6657): 249-56.
- La Teana, A., A. Brandi, M. Falconi, R. Spurio, C. L. Pon and C. O. Gualerzi (1991). "Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(23): 10907-11.
- La Teana, A., A. Brandi, M. O'Connor, S. Freddi and C. L. Pon (2000). "Translation during cold adaptation does not involve mRNA-rRNA base pairing through the downstream box." *Rna* **6**(10): 1393-402.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science + Business Media, New York.
- Le, A. T. T. and W. Schumann (2007). "A novel cold-inducible expression system for *Bacillus subtilis*." *Protein Expression and Purification* **53**(2): 264-269.
- Lee, A. G. (2003). "Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective." *Biochim Biophys Acta* **1612**(1): 1-40.
- Leekumjorn, S. and A. K. Sum (2006). "Molecular study of the diffusional process of DMSO in double lipid bilayers." *Biochim Biophys Acta* **1758**(11): 1751-8.
- Leo, A., C. Hansch and P. Y. C. Jow (1976). "Dependence of Hydrophobicity of Apolar Molecules on Their Molecular Volume." *Journal of Medicinal Chemistry* **19**(5): 611-615.
- Lewis, R. N. and R. N. McElhaney (1985). "Thermotropic phase behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing iso-branched fatty acids. 1. Differential scanning calorimetric studies." *Biochemistry* **24**(10): 2431-9.
- Lopez, M. M., K. Yutani and G. I. Makhatazde (1999). "Interactions of the major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB with single-stranded DNA templates of different base composition." *J Biol Chem* **274**(47): 33601-8.
- Los, D. A. and N. Murata (2004). "Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals." *Biochim Biophys Acta* **1666**(1-2): 142-57.
- Lu, Y. J., Y. M. Zhang and C. O. Rock (2004). "Product diversity and regulation of type II fatty acid synthases." *Biochem Cell Biol* **82**(1): 145-55.
- Luxo, C., A. S. Jurado and V. M. Madeira (1998). "Lipid composition changes induced by tamoxifen in a bacterial model system." *Biochim Biophys Acta* **1369**(1): 71-84.

- Ly, H. V. and M. L. Longo (2004). "The influence of short-chain alcohols on interfacial tension, mechanical properties, area/molecule, and permeability of fluid lipid bilayers." *Biophys J* **87**(2): 1013-33.
- Magnuson, K., S. Jackowski, C. O. Rock and J. E. Cronan, Jr. (1993). "Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*." *Microbiol Rev* **57**(3): 522-42.
- Mansilla, M. C., P. S. Aguilar, D. Albanesi, L. E. Cybulski, S. Altabe and D. de Mendoza (2003). "Regulation of fatty acid desaturation in *Bacillus subtilis*." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **68**(2): 187-90.
- Mansilla, M. C., D. Albanesi, L. E. Cybulski and D. de Mendoza (2005). "Molecular mechanisms of low temperature sensing bacteria." *Ann Hepatol* **4**(3): 216-7.
- Mansilla, M. C., L. E. Cybulski, D. Albanesi and D. de Mendoza (2004). "Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors." *J Bacteriol* **186**(20): 6681-8.
- Mansilla, M. C. and D. de Mendoza (2005). "The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing." *Arch Microbiol* **183**(4): 229-35.
- Marguet, D., P. F. Lenne, H. Rigneault and H. T. He (2006). "Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order." *Embo J* **25**(15): 3446-57.
- Matsumoto, K. and A. P. Wolffe (1998). "Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation." *Trends Cell Biol* **8**(8): 318-23.
- Max, K. E., M. Zeeb, R. Bienert, J. Balbach and U. Heinemann (2007). "Common mode of DNA binding to cold shock domains. Crystal structure of hexathymidine bound to the domain-swapped form of a major cold shock protein from *Bacillus caldolyticus*." *Febs J* **274**(5): 1265-79.
- McElhaney, R. N. (1982). "The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes." *Chem Phys Lipids* **30**(2-3): 229-59.
- McElhaney, R. N. (1986). "Differential scanning calorimetric studies of lipid-protein interactions in model membrane systems." *Biochim Biophys Acta* **864**(3-4): 361-421.
- McKarns, S. C., C. Hansch, W. S. Caldwell, W. T. Morgan, S. K. Moore and D. J. Doolittle (1997). "Correlation between hydrophobicity of short-chain aliphatic alcohols and their ability to alter plasma membrane integrity." *Fundam Appl Toxicol* **36**(1): 62-70.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Mitchell, D. C. and B. J. Litman (2000). "Effect of ethanol and osmotic stress on receptor conformation. Reduced water activity amplifies the effect of ethanol on metarhodopsin II formation." *J Biol Chem* **275**(8): 5355-60.
- Mizushima, T., K. Kataoka, Y. Ogata, R. Inoue and K. Sekimizu (1997). "Increase in negative supercoiling of plasmid DNA in *Escherichia coli* exposed to cold shock." *Mol Microbiol* **23**(2): 381-6.
- Murata, N. and D. A. Los (1997). "Membrane Fluidity and Temperature Perception." *Plant Physiol* **115**(3): 875-879.
- Narberhaus, F., T. Waldminghaus and S. Chowdhury (2006). "RNA thermometers." *FEMS Microbiol Rev* **30**(1): 3-16.
- Nechaev, S., M. Chlenov and K. Severinov (2000). "Dissection of two hallmarks of the open promoter complex by mutation in an RNA polymerase core subunit." *J Biol Chem* **275**(33): 25516-22.

- Orvar, B. L., V. Sangwan, F. Omann and R. S. Dhindsa (2000). "Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity." Plant J **23**(6): 785-94.
- Otzen, D. E., P. Sehgal and L. W. Nesgaard (2007). "Alternative membrane protein conformations in alcohols." Biochemistry **46**(14): 4348-59.
- Palsdottir, H. and C. Hunte (2004). "Lipids in membrane protein structures." Biochim Biophys Acta **1666**(1-2): 2-18.
- Panadero, J., C. Pallotti, S. Rodriguez-Vargas, F. Randez-Gil and J. A. Prieto (2006). "A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **281**(8): 4638-45.
- Panoff, J. M., B. Thammavongs, M. Gueguen and P. Boutibonnes (1998). "Cold stress responses in mesophilic bacteria." Cryobiology **36**(2): 75-83.
- Parasassi, T., F. Conti, M. Glaser and E. Gratton (1984). "Detection of phospholipid phase separation. A multifrequency phase fluorimetry study of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence." J Biol Chem **259**(22): 14011-7.
- Parkinson, J. S. and E. C. Kofoid (1992). "Communication modules in bacterial signaling proteins." Annu Rev Genet **26**: 71-112.
- Perrot, F., M. Hebraud, R. Charlionet, G. A. Junter and T. Jouenne (2001). "Cell immobilization induces changes in the protein response of *Escherichia coli* K-12 to a cold shock." Electrophoresis **22**(10): 2110-9.
- Phadtare, S. (2004). "Recent developments in bacterial cold-shock response." Curr Issues Mol Biol **6**(2): 125-36.
- Privalov, G., V. Kavina, E. Freire and P. L. Privalov (1995). "Precise scanning calorimeter for studying thermal properties of biological macromolecules in dilute solution." Anal Biochem **232**(1): 79-85.
- Reay, D. S., D. B. Nedwell, J. Priddle and J. C. Ellis-Evans (1999). "Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake: reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria." Appl Environ Microbiol **65**(6): 2577-84.
- Reddy, B. V., N. Boyadjieva and D. K. Sarkar (1995). "Effect of ethanol, propanol, butanol, and catalase enzyme blockers on beta-endorphin secretion from primary cultures of hypothalamic neurons: evidence for a mediatory role of acetaldehyde in ethanol stimulation of beta-endorphin release." Alcohol Clin Exp Res **19**(2): 339-44.
- Rowe, E. S. (1985). "Thermodynamic reversibility of phase transitions. Specific effects of alcohols on phosphatidylcholines." Biochim Biophys Acta **813**(2): 321-30.
- Rowe, E. S., A. Fernandes and R. G. Khalifah (1987). "Alcohol interactions with lipids: a carbon-13 nuclear magnetic resonance study using butanol labeled at C-1." Biochim Biophys Acta **905**(1): 151-61.
- Russell, N. J. (1990). "Cold adaptation of microorganisms." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **326**(1237): 595-608, discussion 608-11.
- Russell, N. J. (1997). "Psychrophilic bacteria--molecular adaptations of membrane lipids." Comp Biochem Physiol A Physiol **118**(3): 489-93.
- Sandvig, K., I. H. Madshus and S. Olsnes (1984). "Dimethyl sulphoxide protects cells against polypeptide toxins and poliovirus." Biochem J **219**(3): 935-40.
- Sangwan, V., I. Foulds, J. Singh and R. S. Dhindsa (2001). "Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca<sup>2+</sup> influx." Plant J **27**(1): 1-12.

- Sangwan, V., B. L. Orvar, J. Beyerly, H. Hirt and R. S. Dhindsa (2002). "Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways." *Plant J* **31**(5): 629-38.
- Sette, M., P. van Tilborg, R. Spurio, R. Kaptein, M. Paci, C. O. Gualerzi and R. Boelens (1997). "The structure of the translational initiation factor IF1 from E.coli contains an oligomer-binding motif." *Embo J* **16**(6): 1436-43.
- Shanklin, J., E. Whittle and B. G. Fox (1994). "Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase." *Biochemistry* **33**(43): 12787-94.
- Shen, Y. M., O. I. Chertihin, R. L. Biltonen and J. J. Sando (1999). "Lipid-dependent activation of protein kinase C-alpha by normal alcohols." *J Biol Chem* **274**(48): 34036-44.
- Shigapova, N., Z. Torok, G. Balogh, P. Goloubinoff, L. Vigh and I. Horvath (2005). "Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in Escherichia coli." *Biochem Biophys Res Commun* **328**(4): 1216-23.
- Shirley, S. G., C. J. Robinson and G. H. Dodd (1987). "The influence of temperature and membrane-fluidity changes on the olfactory adenylate cyclase of the rat." *Biochem J* **245**(2): 613-6.
- Shnyrov, V. L., G. G. Zhadan, C. Cobaleda, A. Sagraera, I. Munoz-Barroso and E. Villar (1997). "A differential scanning calorimetric study of Newcastle disease virus: identification of proteins involved in thermal transitions." *Arch Biochem Biophys* **341**(1): 89-97.
- Schindelin, H., M. A. Marahiel and U. Heinemann (1993). "Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the B. subtilis major cold-shock protein." *Nature* **364**(6433): 164-8.
- Schindler, T., P. L. Graumann, D. Perl, S. Ma, F. X. Schmid and M. A. Marahiel (1999). "The family of cold shock proteins of Bacillus subtilis. Stability and dynamics in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **274**(6): 3407-13.
- Schleich, T., G. L. Verwolf and K. Twombly (1980). "A circular dichroism study of Escherichia coli Initiation Factor-1 binding to polynucleotides." *Biochim Biophys Acta* **609**(2): 313-20.
- Schroder, K., P. Graumann, A. Schnuchel, T. A. Holak and M. A. Marahiel (1995). "Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif." *Mol Microbiol* **16**(4): 699-708.
- Schujman, G. E. and D. de Mendoza (2005). "Transcriptional control of membrane lipid synthesis in bacteria." *Current Opinion in Microbiology* **8**(2): 149-153.
- Schumann, W. (2007). "Thermosensors in eubacteria: role and evolution." *J Biosci* **32**(3): 549-57.
- Sikkema, J., J. A. de Bont and B. Poolman (1995). "Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons." *Microbiol Rev* **59**(2): 201-22.
- Sinensky, M. (1974). "Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in Escherichia coli." *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(2): 522-5.
- Smejtek, P., A. W. Barstad and S. Wang (1989). "Pentachlorophenol-induced change of zeta-potential and gel-to-fluid transition temperature in model lecithin membranes." *Chem Biol Interact* **71**(1): 37-61.

- Sperling, P., P. Ternes, T. K. Zank and E. Heinz (2003). "The evolution of desaturases." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **68**(2): 73-95.
- Sum, A. K. and J. J. de Pablo (2003). "Molecular simulation study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipid bilayers." Biophys J **85**(6): 3636-45.
- Suutari, M. and S. Laakso (1992). "Unsaturated and branched chain-fatty acids in temperature adaptation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium*." Biochim Biophys Acta **1126**(2): 119-24.
- Suutari, M. and S. Laakso (1994). "Microbial fatty acids and thermal adaptation." Crit Rev Microbiol **20**(4): 285-328.
- Svobodová, J. (1984). Teplota a membránová fluidita *Bacillus subtilis* - fyzikální změna a biologická adaptace. Kandidátská disertační práce. PřF UK, Praha.
- Svobodova, J. and P. Svoboda (1988). "Membrane Fluidity in *Bacillus-Subtilis* - Physical Change and Biological Adaptation." Folia Microbiologica **33**(3): 161-169.
- Tani, S. and H. Judelson (2006). "Activation of zoosporegenesis-specific genes in *Phytophthora infestans* involves a 7-nucleotide promoter motif and cold-induced membrane rigidity." Eukaryot Cell **5**(4): 745-52.
- Thuy Le, A. T. and W. Schumann (2007). "A novel cold-inducible expression system for *Bacillus subtilis*." Protein Expr Purif **53**(2): 264-9.
- VanBogelen, R. A. and F. C. Neidhardt (1990). "Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5589-93.
- Verstraeten, S. V., L. V. Nogueira, S. Schreier and P. I. Oteiza (1997). "Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: role in lipid peroxidation." Arch Biochem Biophys **338**(1): 121-7.
- Verstraeten, S. V. and P. I. Oteiza (2000). "Effects of Al(3+) and related metals on membrane phase state and hydration: correlation with lipid oxidation." Arch Biochem Biophys **375**(2): 340-6.
- Wada, A. (1998). "Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes." Genes Cells **3**(4): 203-8.
- Wan, F. Y., Y. N. Wang and G. J. Zhang (2002). "Influence of the physical states of membrane surface area and center area on lysosomal proton permeability." Arch Biochem Biophys **404**(2): 285-92.
- Weber, F. J. and J. A. de Bont (1996). "Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes." Biochim Biophys Acta **1286**(3): 225-45.
- Weber, M. H., W. Klein, L. Muller, U. M. Niess and M. A. Marahiel (2001a). "Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock." Mol Microbiol **39**(5): 1321-9.
- Weber, M. H. and M. A. Marahiel (2002). "Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1423): 895-907.
- Weber, M. H. and M. A. Marahiel (2003). "Bacterial cold shock responses." Sci Prog **86**(Pt 1-2): 9-75.
- Weber, M. H., A. V. Volkov, I. Fricke, M. A. Marahiel and P. L. Graumann (2001b). "Localization of cold shock proteins to cytosolic spaces surrounding nucleoids in *Bacillus subtilis* depends on active transcription." J Bacteriol **183**(21): 6435-43.

- Weber, M. H. W., C. L. Beckering and M. A. Marahiel (2001c). "Complementation of cold shock proteins by translation initiation factor IF1 in vivo." Journal of Bacteriology **183**(24): 7381-7386.
- Wendrich, T. M., G. Blaha, D. N. Wilson, M. A. Marahiel and K. H. Nierhaus (2002). "Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA." Mol Cell **10**(4): 779-88.
- Werten, P. J. L., H. W. Remigy, B. L. de Groot, D. Fotiadis, A. Philippsen, H. Stahlberg, H. Grubmuller and A. Engel (2002). "Progress in the analysis of membrane protein structure and function." Febs Letters **529**(1): 65-72.
- West, A. H. and A. M. Stock (2001). "Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems." Trends in Biochemical Sciences **26**(6): 369-376.
- Westh, P., C. Trandum and Y. Koga (2001). "Binding of small alcohols to a lipid bilayer membrane: does the partitioning coefficient express the net affinity?" Biophys Chem **89**(1): 53-63.
- Willmsky, G., H. Bang, G. Fischer and M. A. Marahiel (1992). "Characterization of cspB, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures." J Bacteriol **174**(20): 6326-35.
- Wipat, A. and C. R. Harwood (1999). "The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium." Fems Microbiology Ecology **28**(1): 1-9.
- Wolach, B., M. Ben Dor, O. Chomsky, R. Gavrieli and M. Shinitzky (1992). "Improved chemotactic ability of neonatal polymorphonuclear cells induced by mild membrane rigidification." J Leukoc Biol **51**(4): 324-8.
- Yang, L., G. J. Zhang, Y. G. Zhong and Y. Z. Zheng (2000). "Influence of membrane fluidity modifiers on lysosomal osmotic sensitivity." Cell Biol Int **24**(10): 699-704.
- Yuli, I., W. Wilbrandt and M. Shinitzky (1981). "Glucose-Transport through Cell-Membranes of Modified Lipid Fluidity." Biochemistry **20**(15): 4250-4256.
- Zapf, J., M. Madhusudan, C. E. Grimshaw, J. A. Hoch, K. I. Varughese and J. M. Whiteley (1998). "A source of response regulator autophosphatase activity: the critical role of a residue adjacent to the Spo0F autophosphorylation active site." Biochemistry **37**(21): 7725-32.
- Zavoico, G. B., L. Chandler and H. Kutchai (1985). "Perturbation of egg phosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar vesicles by n-alkanols. A fluorescent probe study." Biochim Biophys Acta **812**(2): 299-312.
- Zhang, G. J., H. W. Liu, L. Yang, Y. G. Zhong and Y. Z. Zheng (2000). "Influence of membrane physical state on the lysosomal proton permeability." J Membr Biol **175**(1): 53-62.
- Zhang, Y. L., J. A. Frangos and M. Chachisvilis (2006). "Laurdan fluorescence senses mechanical strain in the lipid bilayer membrane." Biochem Biophys Res Commun **347**(3): 838-41.
- Zhu, K., K. H. Choi, H. P. Schweizer, C. O. Rock and Y. M. Zhang (2006). "Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **60**(2): 260-73.