Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie

Mgr. Kateřina Vaňousová

Fluidizace membrány alkoholy inhibuje signalizaci DesK-DesR u *Bacillus subtilis*

Membrane fluidization by alcohols inhibits DesK-DesR signalling in *Bacillus subtilis*

Typ závěrečné práce

Rigorózní práce

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
Praha, 2018

Charles University
Faculty of Science

Study programme: Biology
Branch of study: Microbiology

Mgr. Kateřina Vaňousová

Membrane fluidization by alcohols inhibits DesK-DesR signalling in *Bacillus subtilis*

Fluidizace membrány alkoholy inhibuje signalizaci DesK-DesR u *Bacillus subtilis*

Type of thesis

Rigorosum thesis

Faculty of Science Charles University
Prague, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 20.března 2018 ……

Mgr. Kateřina Vaňousová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří se podíleli na vzniku publikace, především panu doc. RNDr. Ivu Konopáskovi, CSc. Můj dík patří také rodině, která mi byla velkou oporou.

Abstract

After cold shock, the *Bacillus subtilis* desaturase Des introduces double bonds into the fatty acids of existing membrane phospholipids. The synthesis of Des is regulated exclusively by the two-component system DesK/DesR; DesK serves as a sensor of the state of the membrane and triggers Des synthesis after a decrease in membrane fluidity. The aim of our work is to investigate the biophysical changes in the membrane that are able to affect the DesK signalling state. Using linear alcohols (ethanol, propanol, butanol, hexanol, octanol) and benzyl alcohol, we were able to suppress Des synthesis after a temperature downshift. The changes in the biophysical properties of the membrane caused by alcohol addition were followed using membrane fluorescent probes and differential scanning calorimetry.

We found that the membrane fluidization induced by alcohols was reflected in an increased hydration at the lipid-water interface. This is associated with a decrease in DesK activity. The addition of alcohol mimics a temperature increase, which can be measured isothermically by fluorescence anisotropy. The effect of alcohols on the membrane periphery is in line with the concept of the mechanism by which two hydrophilic motifs located at opposite ends of the transmembrane region of DesK, which work as a molecular caliper, sense temperature-dependent variations in membrane properties.

Key words

Membrane fluidity
Two-component system
Membrane-active compounds
Alcohols
Bacillus subtilis
Cold shock

Abstrakt

Po chladovém šoku zavádí desaturáza Des u *Bacillus subtilis* dvojné vazby do řetězců mastných kyselin, které jsou součástí membránových fosfolipidů. Syntéza Des je regulována dvoukomponentovým systémem DesK/DesR. DesK slouží jako senzor stavu membrány a spouští syntézu Des po poklesu fluidity membrány. Cílem této práce je zkoumat biofyzikální změny v membráně, které jsou schopny ovlivnit signalizaci DesK. S využitím lineárních alkoholů (etanolu, propanolu, butanolu, hexanolu, oktanolu) a benzyl alkoholu bylo možné potlačit syntézu Des po náhlém snížení teploty. Změny biofyzikálnch vlastností membrány způsobené přídavkem alkoholu byly sledovány pomocí membránových fluorescentních sond a diferenciální skenovací kalorimetrie.

Bylo zjištěno, že fluidizace membrány vyvolaná alkoholy byla doprovázena zvýšenou hydratací na rozhraní mezi lipidy a polárním vnějším prostředím. To je spojeno s poklesem aktivity DesK. Přídavek alkoholů napodobuje nárůst teploty, který může být měřen izotermálně pomocí anizotropie fluorescence. Účinek alkoholů na periferii membrány je v souladu s konceptem mechanizmu, kdy dva hydrofilní motivy umístěné na opačných koncích transmembránové oblasti DesK, které fungují jako molekulární měřítko, vnímají teplotně závislé změny membránových vlastností.

Klíčová slova

Membránová fluidita

Dvoukomponentový systém

Membránově aktivní látky

Alkoholy

Bacillus subtilis

Chladový šok

Obsah

1. Úvod 8
1.1 Chladový šok u *Bacillus subtilis* 8
1.2 Regulace membránové fluidity 10
1.2.1 Dlouhodobá adaptace 10
1.2.2 Krátkodobá adaptace 11
1.3 Teplotní senzory 12
1.3.1 Tloušťka membrány a aktivita membránových proteinů 13
1.3.2 Senzor DesK a membránově aktivní látky 13
2. Cíl práce 14
3. Seznam citované literatury 15
4. Publikace 18

1. Úvod

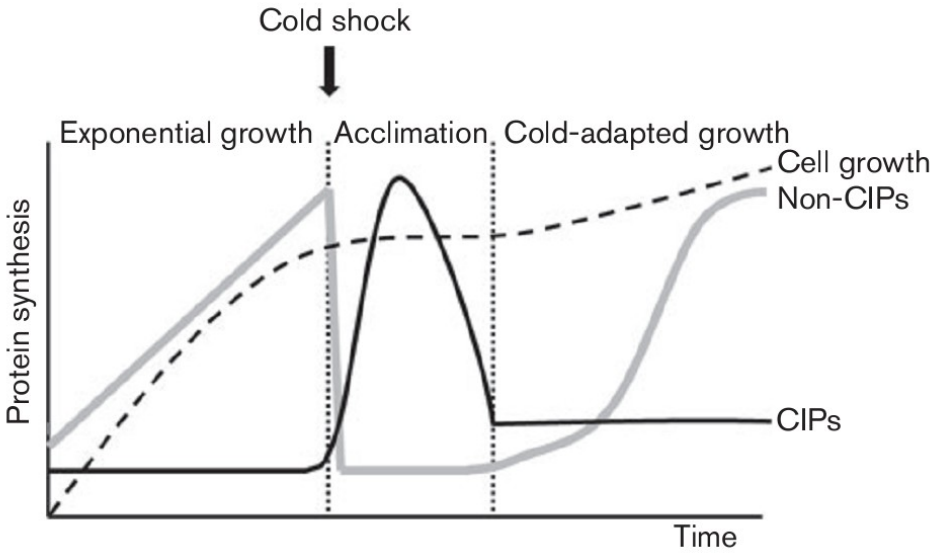
Mikroorganizmy musí neustále čelit změnám odehrávajícím se v jejich bezprostředním okolí, aby mohly úspěšně růst a množit se. Každá bakteriální buňka je nucena přizpůsobit se proměnlivosti vnějšího prostředí, např. dostupnosti živin, kyslíku, osmotickému stresu, změnám pH, vlhkosti a konkurencí jiných bakteriálních druhů. V jednom okamžiku může na bakteriální buňku působit i několik různých stresů najednou (WIPAT a HARWOOD 1999). Jedním z nejvýznamnějších faktorů ovlivňující výrazným způsobem fyziologii bakteriální buňky je změna teploty prostředí. Bakterie se řadí mezi poikilotermní organizmy, které nedokáží regulovat svou vnitřní teplotu, a jsou tak izotermální se svým okolím. Bakterie však mají své teplotní optimum, při kterém dosahují nejvyšší růstové rychlosti, a teplotní rozmezí, za jehož hranicemi již růst možný není. Bakteriální buňka se negativnímu vlivu výkyvu vnější teploty brání pomocí různých adaptačních mechanizmů, které se odehrávají na buněčné i molekulární úrovni.

Grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* je běžný půdní mikroorganismus obývající svrchní vrstvy půdy, kde dochází k častým fluktuacím teploty. U této bakterie lze proto najít řadu adaptačních mechanizmů, které ji předurčují roli zajímavého modelového organizmu. Tato rigorózní práce navazuje na výzkum Laboratoře fyziologie bakterií, která je součástí Katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, a která se mimo jiné zabývá studiem adaptacemi membrány *Bacillus subtilis* po chladovém šoku (SVOBODOVÁ 1984; SVOBODOVA a SVOBODA 1988; KONOPASEK et al. 2000; BERANOVA et al. 2008, BERANOVA et al. 2010).

1.1 Chladový šok u *Bacillus subtilis*

Po náhlém snížení kultivační teploty (chladovém šoku) dochází k významným změnám ve fyziologii bakteriální buňky – klesá fluidita membrány, sekundární struktury nukleových kyselin jsou stabilizovány, snižuje se efektivita transkripce a translace, jsou poškozeny ribozomy, klesá aktivita enzymů, mění se sekundární struktura proteinů (PHADTARE 2004, NARBERHAUS et al. 2006, FELLER 2007, BARRIA et al. 2013). Po chladovém šoku je růst bakteriální buňky přerušen, translace většiny proteinů je zastavena, a naopak je zvýšena exprese proteinů, které buňce umožňují buňce adaptovat se na nové teplotní podmínky (Obr.1, HORN et al. 2007). Souhrn všech buněčných reakcí, které jsou nezbytné pro zajištění dostatečné adaptace buňky na náhlé snížení kultivační teploty, je nazýván odpověď bakteriální buňky na chladový šok (CSR, z angl. „cold shock response“, WEBER a MARAHIEL 2003). CSR zahrnuje i zvýšenou expresi proteinů

chladového šoku (CSP, z angl. „cold shock proteins“), které pomáhají bakteriální buňce přizpůsobit se náhlému snížení vnější teploty a které se vyskytují i buňkách bakteriální kultury rostoucí v optimální teplotě (GRAUMANN et al. 1997). CSP fungují jako transkripční aktivátory prostřednictvím stabilizace vazby RNA-polymerázy (GRAUMANN a MARAHIEL 1994). CSP dále zastávají funkci transkripčních antiterminátorů, které se váží na jednořetězcovou molekulu DNA a rozplétají stabilní sekundární struktury, které brání transkripci (PHADTARE 2004). CSP ovlivňují také translaci, kolokalizují s ribozomy a v závislosti na aktivní transkripci se váží na nově syntetizovanou mRNA a spřahují tak transkripci atranslaci (WEBER et al. 2001). CSP dokáží v součinosti s DNA gyrázou po chladovém šoku zavádět do molekuly DNA negativní nadobrátky, čímž usnadňují její lokální rozpletení, a tím i replikaci a transkripci (MIZUSHIMA et al. 1997). CSP mohou zástávat roli molekulových chaperonů a stabilizovat správnou konformaci proteinů, která je nezbytná pro jejich správnou funkci (FELLER 2007). CSP v závisloti na své koncentraci mají vliv nejen translaci jiných proteinů, ale také regulují svou vlastní hladinu v buňce (HORN et al. 2007, PHADTARE a SEVERINOV 2010).



Obr.1 Změna exprese proteinů po chladovém šoku.
Po chladovém šoku je růst bakteriální kultury (přerušovaná čára) výrazně zpomalen na několik hodin a nastává aklimatizační fáze („acclimation“), kdy je přechodně snížena syntéza proteinů typických pro exponenciální fázi růstu (non-CIPs, z angl. „non-cold induced proteins“) a do vysokých hladin jsou exprimovány chladově indukované proteiny (CIPs, z angl. „cold-induced proteins“). Po aklimatizační fázi je obnoven růst a proteosyntéza, zatímco chladově indukované proteiny jsou inhibovány (převzato z BARRIA et al. 2013).

1.2 Regulace membránové fluidity

Cytoplazmatická membrána představuje selektivní bariéru mezi vnitřním prostředím bakteriální buňky a jejím vnějším okolím, jsou na ni navázány nejrůznější biosyntetické dráhy, transport pomocí membránových proteinů, buněčné dělení a další buněčné procesy. Správné fungování membrány je proto klíčové pro přežití bakteriální buňky. Membrána však plní optimálně své funkce v závislosti na svém fyzikálním stavu, který je definován složením fosfolipidové dvojvrstvy, ale také vnějšími podmínkami, především teplotou (MANSILLA et al. 2004). V optimální teplotě kultivace se membrána nachází ve fázi tekutého krystalu, je velmi fluidní a všechny její funkce jsou zachovány. V nízké teplotě kultivace (pod teplotou fázového přechodu) se membrána nachází ve fázi gelu, je rigidní a procesy, které jsou na ní navázány, jsou narušeny (LOS a MURATA 2004). Snahou bakteriální buňky tedy je zachovat si dostatečně tekutou membránu i po chladovém šoku. Po náhlém snížení kultivační teploty, kdy je membrána příliš rigidní, syntetizuje bakteriální buňka mastné kyselin s nižším bodem tání a inkorporuje je do fosfolipidů, které jsou součástí membrány. Tomuto adaptivnímu procesu se říká homeoviskózní adaptace (SINENSKY 1974), jejím cílem je zmenšit van der Wallsovy interakce mezi přilehlými řetězci mastných kyselin, které jsou součástí fosfolipidů. Po chladovém šoku tak bakteriální buňka produkuje mastné kyseliny s kratším řetězcem, větvené mastné kyseliny nebo nenasycené mastné kyseliny (FELLER 2007). V některých případech je zvýšení fluidity dosaženo změnou v zastoupení jednotlivých druhů lipidů nebo změnou v poměrném zastoupení lipidů a membránových proteinů (GUSCHINA a HARWOOD 2006).

U *Bacillus subtilis* se uplatňují dva hlavní mechanizmy, které optimalizují fluiditu membrány po chladovém šoku: dlouhodobá adaptace, která zahrnuje syntézu větvených mastných kyselin, a krátkodobá adaptace, která spočívá v rychlé desaturaci mastných kyselin, které jsou součástí membránových fosfolipidů.

1.2.1 Dlouhodobá adaptace

Rod Bacillus je charakteristický vysokým obsahem větvených mastných kyselin v membránových fosfolipidech. Více než 80% mastných kyselin vázaných ve fosfolipidech u *Bacillus subtilis* tvoří izo- a anteizo- větvené mastné kyseliny (KANEDA 1991). Po chladovém šoku dochází ke změně poměrného zastoupení izo- a anteizo- větvených mastných kyselin ve prospěch anteizo- větvených (KLEIN et al. 1999). Anteizo- větvené

mastné kyseliny mají totiž nižší teplotu fázového přechodu než stejně dlouhé izo- větvené, jsou tak schopny více narušit uspořádanost fosfolipidové dvojvrstvy (DENICH et al. 2003).

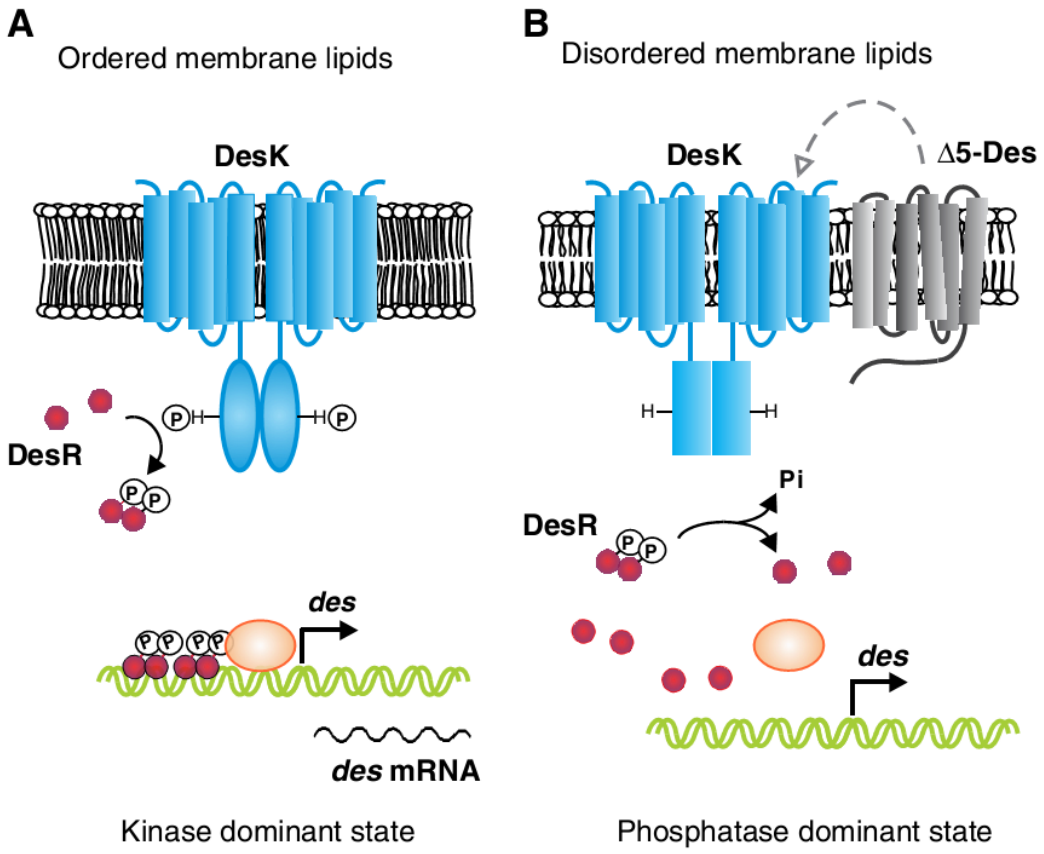
1.2.2 Krátkodobá adaptace

Krátkodobá adaptace spočívá v zavedení dvojné vazby do řetězců mastných kyselin, které jsou součástí fosfolipidové dvojvrstvy, chladově indukovanou desaturázou Δ5-Des (ALTABE et al. 2003). Exprese genu *des*, který kóduje desaturázu Δ5-Des, je regulována dvoukomponentovým systémem DesK/DesR (AGUILAR et al. 2001).

Dvoukomponentový systém (DS) je dráha signální transdukce, která spojuje vnější podmět se specifickou adaptivní odpovědí bakteriální buňky. DS je tvořen senzorem – histidinkinázou, která je umístěná v membráně nebo je alespoň s membránou asociována, a regulátorem, který funguje jako transkripční aktivátor či represor. Senzor se skládá z detekční domény, která v závislosti na signálu přicházejícím z okolí bakteriální buňky mění svou konformaci, a kinázové domény, která se po přijetí signálu autofosforyluje na úkor jedné makroergní vazby z ATP na konzervovaném histidinu. Tato energeticky bohatá fosforylovaná skupina je reakcí katalyzovanou cytoplazmatickým regulátorem přenesena na konzervovaný aspartátový zbytek přijímací domény regulátoru. Po fosforylaci přijímací domény dochází ke změně konformace regulátoru, a tím ke změně schopnosti regulátoru vázat se na DNA a ovlivňovat transkripci (ZSCHIEDRICH et al. 2016).

Histidinkináza DesK a regulátor DesR jsou v bakteriální buňce exprimovány konstitutivně (CYBULSKI et al. 2002). Senzor DesK zaujímá různé signalizační stavy v závislosti na fluiditě membrány, která může být ovlivněna teplotou nebo zastoupením jednotlivých mastných kyselin. Po chladovém šoku, kdy se membrána nachází v uspořádanějším stavu (je rigidnější), převáží kinázová aktivita senzoru DesK a konzervovaný histidin His 188 kinázové domény je autofosforylován (CYBULSKI et al. 2002). Fosfát je následně přenesen na konzervovaná aspartát Asp 54 přijímací domény regulátoru (ALBANESI et al. 2004). Fosforylace regulátoru vyvolá jeho konformační změnu, díky které se regulátor DesR ve formě dimeru váže do oblasti promotoru genu *des*, kde dojde k tetramerizaci DesR (CYBULSKI et al. 2004). Tetramer DesR specificky interaguje s RNA-polymerázou, stabilizuje její vazbu na promotor a umožňuje tak spuštění transkripce genu *des* (NECHAEV et al. 2000) Produkt tohoto genu - desaturáza Δ5-Des zavádí dvojné vazby do řetězců mastných kyselin, které jsou součástí membránových fosfolipidů. To vede ke zvýšení fluidity, na kterou reaguje senzor DesK změnou své konformace

a následně změnou svého signalizačního stavu. U senzoru DesK převáží fosfatázová aktivita, regulátor DesR je defosforylován a transkripce genu *des* je přerušena (Obr. 2, MANSILLA a DE MENDOZA 2005).



Obr. 2 Schéma regulace exprese desaturázy mastných kyselin u *B.subtilis*
(a) Po zvýšení uspořádanosti membránových lipidů v důsledku chladového šoku převáží kinázová aktivita DesK. DesK se autofosforyluje, fosfátová skupina je přenesena na DesR. Dva fosforylované dimery DesR se váží do oblasti promotoru genu *des* a stabilizují vazbu RNA polymerázy. Desaturáza Δ5-Des je exprimována. (b) Δ5-Des desaturuje řetězce mastných kyselin, které jsou součástí membránových fosfolipidů, to vede ke snížení uspořádanosti membránových lipidů. Převáží fosfatázová aktivita DesK, DesR je defosforylován a transkripce genu *des* je zastavena (převzato z SAITA a MENDOZA 2015).

1.3 Teplotní senzory

Náhlý pokles vnější teploty významným způsobem zasáhne všechny struktury bakteriální buňky – DNA, RNA, ribozomy, membránu, mění se konformace proteinů, klesá rychlost metabolizmu. Adaptace bakteriální buňky na chladový šok je proto velmi komplexní proces a pro přežití bakterie je nezbytné včas rozpoznat změnu vnější teploty, aby na ni mohla adekvátně reagovat. Pokles teploty je vnímán buňkou právě prostřednictvím

takových molekul, které v závislosti na teplotě mění své fyzikálně-chemické vlastnosti. Jako senzory tak mohou sloužit DNA, RNA, ribozomy, cytoplazmatické i membránové proteiny a fosfolipidová dvojvrstva (ERIKSSON et al. 2002).

Změna fyzikálního stavu v závislosti na teplotě činí z membrány vhodný senzor vnější teploty. Změna fyzikálních vlastností membrány vyvolaných změnou teploty (zakřivení, laterální tlak, tloušťka, přechod z fáze gelu do fáze tekutého krystalu) navíc může regulovat aktivitu membránových proteinů a tím přenést informaci o působení stresu dovnitř do buňky (SHIGAPOVA et al. 2005).

1.3.1 Tloušťka membrány a aktivita membránových proteinů

Tloušťka membrány závisí na lipidovém složení membrány, především na délce, nasycenosti mastných kyselin. Tloušťka membrány se mění také s teplotou – s rostoucí teplotou je membrána tenčí. Integrální membránové proteiny obsahují část tvořenou hydrofobními aminokyselinami, která kotví proteiny do membrány. Pokud se vlivem vnějších podmínek změní tloušťka membrány, může dojít k tomu, že hydrofobní část proteinu nemá stejnou velikost jako nepolární část membrány, do které je zanořen, a hydrofobní část proteinu je vystavena polárnímu prostředí (v angl. je tento jev označován jako „hydrophobic mismatch“). U proteinu pak musí dojít ke změně jeho konformace – ohnutím helixu nebo natočením postranních řetězců, aby byl tento energeticky nepříznivý stav kompenzován. Relativně malá změna tloušťky membrány tak může významným způsobem ovlivnit aktivitu proteinu (SAITA a MENDOZA 2015).

1.3.2 Senzor DesK a membránově aktivní látky

Senzor DesK, který je součástí dvoukomponentového systému DesK/DesR, který prostřednictvím exprese desaturázy mastných kyselin reguluje fluiditu membrány u *B. subtilis*, byl v posledních 20 letech intenzivně studován. Bylo zjištěno, že senzor DesK přepíná mezi kinázovou a fosfatázovou aktivitou právě v závislosti na změně tloušťky membrány, která je vyvolána nejenom změnou teploty, ale také změnou složení mastných kyselin v membránových fosfolipidech (CYBULSKI et al. 2010, PORRINI et al. 2014).

Vlastnosti membrány se mohou měnit také s přídavkem membránově aktivních látek, např. alkoholů. Alkoholy ovlivňují membránu prostřednictvím změn některých jejích fyzikálních vlastností. Bylo prokázáno, že alkoholy zvyšují neuspořádanost řetězců mastných kyselin, zvětšují prostor připadající na jednu molekulu (LY a LONGO 2004), což vede k větší laterální pohyblivosti molekul v membráně (CHEN et al. 1996), změně tloušťky a hydratace membrány (GURTOVENKO a ANWAR 2009). Dále pak mají alkoholy vliv

na teplotu fázového přechodu, kterou snižují (ROWE 1985), a na permeabilitu membrány, která je po působení alkoholů vyšší (WESTH et al. 2001). Účinek alkoholů na membránu závisí na délce řetězce, jeho hydrofobicitě, toxicitě a na použité koncentraci – prodloužení alifatického alkoholu o jednu CH_2 skupinu sníží koncentraci potřebnou k dosažení stejného efektu na membránu zhruba třikrát (LY a LONGO 2004). Vzhledem ke komplexnosti bakteriálních membrán a různorodého účinku alkoholů na membránu je zřejmé, že interakce membrány a alkoholů není jednoduchý proces. Alkoholy jsou však schopné do membrány pronikat, ovlivnit její strukturu, a tím i aktivitu membránových proteinů.

2. Cíl práce

Cílem této rigorózní práce bylo přispět k objasnění povahy signálu, který ovlivňuje signalizaci senzoru DesK. Bylo proto zkoumáno, zda mohou membránově aktivní látky s fluidizačním účinkem na membránu ovlivnit signalizaci DesK *in vivo*, tedy zda mohou snížit či úplně potlačit expresi genu *des* po chladovém šoku. V této práci byly jako fluidizační látky použity alkoholy (ethanol, propanol, butanol, hexanol, oktanol a benzyl alkohol), u kterých byl prokázán jejich vliv na uspořádanost lipidů, fluiditu a hydrataci membrány. Dále bylo působení alkoholů na změny fyzikálních parametrů membrány sledováno na úrovni izolovaných membrán a lipidů pomocí různých biofyzikálních metod – anizotropie fluorescence sondy DPH, generalizované polarizace Laurdanu a diferenciální skenovací kalorimetrie. Porovnáním vlivu alkoholů na aktivitu promotoru genu *des* s účinkem alkoholů na fyzikální stav membrány tak bylo možné zjistit, jaké změny fyzikálních parametrů membrány senzor membránové fluidity DesK vnímá a reaguje na ně změnou signalizace.

3. Seznam citované literatury

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.

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.

Altabe, S. G., P. Aguilar, G. M. Caballero and D. de Mendoza (2003). "The Bacillus subtilis acyl lipid desaturase is a delta5 desaturase." J Bacteriol **185**(10): 3228-31.

Barria, C, M. Malecki and C. M. Arraiano (2013). "Bacterial adaptation to cold." Microbiology **159**(12): 2437–2443.

Beranova, J., M. Jemiola-Rzeminska, D. Elhottova, K. Strzalka and I. Konopasek (2008). "Metabolic control of the membrane fluidity in Bacillus subtilis during cold adaptation." Biochim Biophys Acta **1778**(2): 445-53.

Beranova, J., M.C. Mansilla, D. de Mendoza, D. Elhottova and I. Konopasek (2010). "Differences in cold adaptation of Bacillus subtilis under anaerobic and aerobic conditions. " J.Bacteriol **192**(16): 4164–4171.

Cybulski, L. E., D. Albanesi, M. C. Mansilla, S. Altabe, P. S. Aguilar and D. de Mendoza (2002). "Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the Bacillus subtilis acyl-lipid desaturase." Mol Microbiol **45**(5):1379-88.

Cybulski, L. E., G. del Solar, P. O. Craig, M. Espinosa and D. de Mendoza (2004)."Bacillus subtilis DesR functions as a phosphorylation-activated switch to control membrane lipid fluidity." J Biol Chem **279**(38): 39340-7.

Cybulski, L.E., M. Martin, M.C. Mansilla, A. Fernandez and D.de Mendoza (2010). "Membrane Thickness Cue for Cold Sensing in a Bacterium." Curr Biology **20**(17): 1539–1544.

Denich, T. J., L. A. Beaudette, H. Lee and J. T. Trevors (2003). "Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes." J Microbiol Methods **5**2(2): 149-82.

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.

Feller, G. (2007). "Life at low temperatures: is disorder the driving force?"Extremophiles **11**(2): 211-6.

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., 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.

Gurtovenko, A.A. and J. Anwar (2009). "Interaction of ethanol with biological membranes: the formation of non-bilayer structures within the membrane interior and their significance" J. Phys. Chem. B **113**(7):1983–1992.

Guschina, I. A. and J. L. Harwood (2006). "Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms." FEBS Lett **580**(23): 5477-83.

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.

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.

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.

Kaneda, T. (1991). "Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance." Microbiol Rev **55**(2): 288-302.

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.

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.

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 **8**7(2): 1013-33.

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.

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.

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.

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.

Phadtare, S. (2004). "Recent developments in bacterial cold-shock response." Curr Issues Mol Biol **6**(2): 125-36.

Phadtare, S. and K. Severinov (2010). "RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins." RNA Biology **7**(6): 788-795.

Porrini, L., L.E. Cybulski, S.G. Altabe, M.C. Mansilla and D. de Mendoza (2014). "Cerulenin inhibits unsaturated fatty acids synthesis in Bacillus subtilis by modifying the input signal of DesK thermosensor." Microbiology **3**(2**):**213–224.

Rowe, E. S. (1985). "Thermodynamic reversibility of phase transitions. Specific effects of alcohols on phosphatidylcholines." Biochim Biophys Acta **813**(2): 321-30.

Saita, E.A. and D. de Mendoza (2015). "Thermosensing via transmembrane protein–lipid interactions." Biochim Biophys Acta-Biomembranes **1848**(9):1757-1764.

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.

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.

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.

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 (2001)."Localization of cold shock proteins to cytosolic spaces surrounding nucleoids in Bacillus subtilis depends on active transcription." J Bacteriol **183**(21): 6435-43.

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.

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.

Zschiedrich, C.P., V. Keidel and H. Szurmant (2016). "Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction." J.Molecular Biology **428** (19): 3752-3775.

4. Publikace

Publikace je součástí přílohy.

Vanousova, K., J. Beranova, R. Fiser, M. Jemiola-Rzeminska, P. Matyska Liskova, L. Cybulski, K. Strzalka and I. Konopasek (2018). "Membrane fluidization by alcohols inhibits DesK-DesR signalling in Bacillus subtilis." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1860**(3): 718-727.