

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



Magdaléna Švecová

Funkční membránové mikrodomény v cytoplazmatické membráně bakterií

Functional membrane microdomains in the bacterial cytoplasmic membrane

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Gabriela Mikušová, Ph.D.

Praha, 2019

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, 28.4.2019

.....

Magdaléna Švecová

Poděkování

Velké poděkování patří vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Gabriele Mikušové, PhD. za nesmírnou trpělivost, ochotu a pomoc při psaní. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří mě podporovali a dávali mi cenné rady.

Abstrakt

Funkční membránové mikrodomény jsou strukturní heterogenity v cytoplazmatické membráně bakterií, které dosahují velikosti až několika desítek nanometrů. Svým lipidovým a proteinovým složením i fluiditou se liší od zbytku membrány a do velké míry tak odpovídají eukaryotickým lipidovým raftům. Membránové mikrodomény obsahují strukturní homology eukaryotického flotilinu a také hopanoidy a karotenoidy jako funkční analogy cholesterolu v lipidových raftech eukaryot. V membránových mikrodoménách bakterií jsou lokalizovány proteiny účastníci se buněčného transportu, signalizace, sekrece, tvorby biofilmu nebo sporulace. Funkční membránové mikrodomény bakterií jsou specifickým místem pro vstup některých antibiotik do buňky. Rozrušení funkčních membránových mikrodomén můžeme navíc považovat za nový mechanismus boje proti bakteriálním infekcím způsobených patogeny rezistentními ke stávajícím antibiotikům. V nepřítomnosti membránových domén totiž dochází ke ztrátě aktivity proteinů, které pro svou funkci vyžadují prostředí mikrodomén, což může vést k inhibici růstu bakteriální buňky.

Klíčová slova: Funkční membránové mikrodomény, cytoplazmatická membrána bakterií, kardiolipin, hopanoidy, flotiliny, rezistence bakterií k antibiotikům

Abstract

Functional membrane microdomains are structural heterogeneities in bacterial cytoplasmic membrane with up to few tens of nanometers in size. Same as in the case of eukaryotic lipid rafts the lipid and protein composition and fluidity of bacterial membrane microdomains differ from the rest of the membrane. Membrane microdomains contain the structural analogues of eukaryotic flotilin as well as hopanoids and carotenoids as functional analogues of cholesterol in eukaryotic lipid rafts. In functional membrane microdomains there are located proteins associated with membrane trafficking, signaling, secretion, biofilm formation, and sporulation. Functional membrane microdomains are specific sites for the entry of certain antibiotics into cells. What is more, disassembly of functional membrane microdomains might be regarded as a possible novel mechanism of bacterial infections suppression that is caused by antibiotic resistant bacterial pathogens. In the absence of membrane domains proteins which require for their functions the membrane domain localization lose their activity. This may result in inhibition of bacterial cell growth.

Key words: Functional membrane microdomains, bacterial cytoplasmic membrane, cardiolipin, hopanoids, flotilins, antibiotic resistance

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Vývoj pohledů na podobu buněčné membrány.....	9
2.1	Model buněčné membrány jako fluidní mozaiky.....	9
2.2	Membránové mikrodomény ve struktuře buněčných membrán.....	9
3	Membránové mikrodomény bakterií.....	12
3.1	Lipidové složení bakteriálních membránových mikrodomén.....	12
3.2	Bakteriální proteiny strukturně homologní s eukaryotickými flotiliny.....	16
4	Funkce vázané na proteiny lokalizované v membránových mikrodoménách bakterií	17
5	Membránové mikrodomény jako možná zásahová místa v terapii bakteriálních infekcí	20
5.1	Membránová lipidová terapie.....	21
5.2	Kardiolipinové mikrodomény jako specifická zásahová místa antibiotik.....	21
5.2.1	Mechanismus účinku antibiotika 3',6-dinonyl neamin.....	21
5.2.2	Účinky cyklických hexapeptidů na membránové mikrodomény.....	22
5.2.3	Kardiolipinové mikrodomény jako potenciální zásahové místo nanočástic.....	22
5.3	Význam cholesterolových mikrodomén v terapii infekce způsobené <i>B. burgdorferi</i> 23	
5.4	Rozrušování membránových mikrodomén bakterií pomocí kyseliny zaragozové....	23
5.4.1	Inhibice rezistence <i>S. aureus</i> odstraněním membránových mikrodomén.....	24
6	Závěr.....	26
7	Seznam použité literatury.....	27

Seznam použitých zkratek:

ABC - (ATP binding cassette) Transportér vázající ATP

ATP - Adenosintrifosfát

CFU - (Colony forming unit) Počet živých bakteriálních buněk

diNn - Derivát neomycinu 3',6-dinonyl neamin

DNA - Deoxyribonukleová kyselina

DRM - (Detergent resistant membrane) Membránová frakce rezistentní k působení detergentu

DSM - (Detergent sensitive membrane) Membránová frakce citlivá k působení detergentu

FMM - (Functional membrane microdomains) Funkční membránové mikrodomény

GFP - (Green fluorescent protein) Zelený fluorescenční protein

GPI - Glykosylfosfatidylinositol

LC-MS/MS - Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

MIC - Nejnižší koncentrace antibiotika, která inhibuje růst mikroorganismu

MRSA - *Staphylococcus aureus* rezistentní k meticilinu

NADH - Nikotinamidadenindinukleotid

NT - (Non-treated) Vzorky nevystavené působení určité látky

PHB - Prohibition homology doména

SDS-PAGE - Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného

SPFH - Skupina proteinů, která spojuje stomatiny, prohibitiny, flotiliny a HflK/C proteiny

SZÚ - Státní zdravotní ústav

ZA - Kyselina zaragozová

1 Úvod

Lipidové rafty u eukaryot byly popsány již v roce 1997 (Simons a Ikonen 1997) jako strukturně specifická místa v cytoplazmatické membráně buněk. U bakterií se dlouhou dobu předpokládalo, že obdobné struktury v rámci jejich membrány nemohou existovat. Ovšem nálezy kardiolipinových a konečně i funkčních membránových mikrodomén, které mají velmi podobnou strukturu a složení jako eukaryotické lipidové rafty, v posledních deseti letech pomohl změnit názor ohledně podoby buněčné membrány bakterií. Tyto oblasti, vyznačující se rozdílným chemickým složením, vytvářejí v membráně domény s rozdílnou rigiditou oproti zbytku membrány. Funkční membránové mikrodomény jsou přítomny v membránách Gram pozitivních i Gram negativních bakterií, byly popsány u sinic, ale také u mikroorganismů z domény Archaea.

V posledních letech se navíc ukazuje, že funkční membránové mikrodomény bakterií by se díky svým specifickým vlastnostem mohly využívat jako možné zásahové místo v antimikrobiálních terapiích. Narůstající odolnost bakterií k léčbě stávajícími antibiotiky je globálním problémem. Hlavním důvodem těchto obtíží, vyskytujících se při terapiích bakteriálních infekcí, je nadužívání a nesprávné užívání antibiotik v posledních desítkách let. Z tohoto důvodu se velkou rychlostí zvyšuje poptávka a nutnost hledání nových přístupů k léčbě infekcí způsobených rezistentními kmeny bakterií.

Cílem této bakalářské práce je popis struktury a vlastností funkčních membránových mikrodomén bakterií, jejich specifických rolí v buněčné membráně a potenciální možnosti využití těchto membránových mikrodomén jako zásahového místa v boji proti bakteriálním patogenům.

2 Vývoj pohledů na podobu buněčné membrány

Názory ohledně složení a struktury buněčných membrán prošly od sedmdesátých let minulého století do současnosti značným vývojem. Prvotní návrh membrány jako fluidní mozaiky složené z lipidů a proteinů byl postupně překonán při objevení strukturních heterogenit v membráně. Od devadesátých let 20. století je model membrány obohacen o představu laterálně oddělených mikrodomén. Membránové mikrodomény, nebo-li rafty, jsou společnou vlastností eukaryotických a prokaryotických buněk.

2.1 Model buněčné membrány jako fluidní mozaiky

V roce 1972 Singer a Nicolson (Singer a Nicolson 1972) vyslovili hypotézu o struktuře biologické membrány v podobě tekuté mozaiky. Jejich práce vycházela z modelu membrány tvořené fosfolipidovou dvojvrstvou spolu s proteiny a výzkumu hydrofilních a hydrofóbních interakcí těchto složek. Model fluidní mozaiky popisuje podobu buněčné membrány, kde jsou lipidy a proteiny rovnoměrně rozmístěny po celé membráně. Integrální membránové proteiny, mající globulární charakter, se chemicky chovají podobně jako fosfolipidy, neboť obsahují polární a nepolární část, tedy mají amfipatický charakter. Hydrofóbní části lipidů a proteinů zasahují směrem do středu dvojvrstvy, hydrofilní vyčnívají na povrchu membrány a jsou v kontaktu s vodným prostředím. Časté interakce a volná difuze integrálních proteinů a lipidů přes fosfolipidovou dvojvrstvu dělá z buněčné membrány strukturu dynamického fluidního charakteru (Singer a Nicolson 1972).

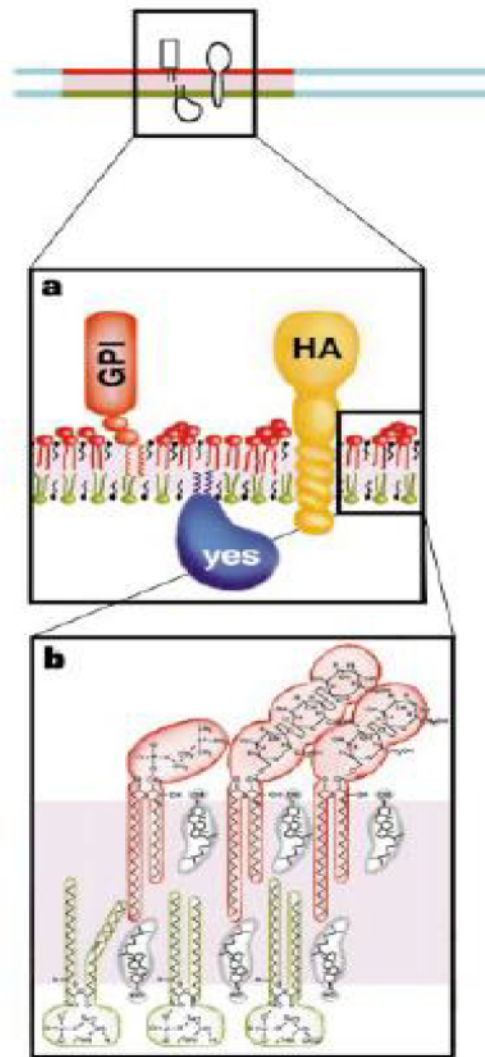
2.2 Membránové mikrodomény ve struktuře buněčných membrán

V osmdesátých letech minulého století se začalo opouštět od teorie fluidní mozaiky, neboť byla prokázána strukturní heterogenita laterálně uložených lipidů a proteinů v biologické membráně. Byly zkoumány typy mastných kyselin, které jsou součástí membránových lipidů. Nasycené mastné kyseliny tvoří rigidnější oblasti, zatímco nenasycené naopak vytvářejí tekutou fázi membrány. Koncept heterogenního rozložení lipidů v membránách dal impuls ke zrodu myšlenky, že membrána obsahuje specifické mikrodomény, které se svými vlastnostmi a složením odlišují od zbytku membrány (Karnovsky et al. 1982).

Mikrodomény byly popsány při studiu kaveol, malých membránových útvarů lahvovitého tvaru o velikosti 50-80 nm tvořených kaveolinem, jež společně s lipidy tvoří mikrodoménové útvary v membráně (Parton 1996). Membránové mikrodomény byly také objeveny při zkoumání funkcí savčích epiteliálních buněk (Kusumi a Sako 1996).

Na konci devadesátých let minulého století Simons a Ikonen (1997) uvedli hypotézu existence tzv. membránových raftů. Membránové rafty jsou laterálně oddělené mikrodomény bohaté na sfingolipidy a proteiny propojené cholesterolem. Tyto rafty se pohybují v prostředí glycerofosfolipidové dvojvrstvy. Membránové rafty mají vliv na mnoho dějů v buňce, například hrají významnou roli při signální transdukcii (Parton 1996) nebo se podílejí na transportu v rámci buňky (Danielsen 1995).

Model struktury lipidových raftů (Obr. 1) předpokládá, že membrána buněk je mozaika složená z lipidových raftů a oblastí okolo nich s rozdílným lipidovým složením (Simons a Ikonen 1997). Model navrhuje přítomnost a ukotvení membránových proteinů v rámci mikrodomén, kde proteiny mohou být kotveny glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvou, nebo se může jednat o periferní či integrální proteiny (Obr. 1A). Dále popisuje asymetrické rozložení druhů lipidů ve vnějším a vnitřním listu lipidové dvojvrstvy raftů. Ve vnějším listu převládá sfingomyelin a glykosfingolipidy, ve vnitřním listu dvojvrstvy jsou obsaženy převážně glycerolipidy. Cholesterol vyplňuje místa mezi lipidy v obou listech dvojvrstvy (Obr. 1B) (Simons a Ikonen 1997).



Obr. 1: Model struktury membránového raftu

Membránové rafty (červené) jsou odděleny od okolních oblastí fosfolipidové dvojvrstvy (modře). Ve vnějším listu membrány převažují nenasycené fosfatidylcholin, které společně s cholesterolem tvoří raft. A) V raftech se nacházejí GPI vazebné proteiny kotvené k vnějšímu listu dvojvrstvy. Proteiny vnitřního listu membrány jsou vázány k lipidům acylovým řetězcem nebo přes transmembránovou doménu proteinů. B) Lipidová dvojvrstva raftů nemá symetrické složení druhů lipidů v obou listech. Ve vnějším listu membrány se nachází sfingomyelin a glykosfingolipidy (červeně) a ve vnitřním listu převládají glycerolipidy, hlavně fosfatidylserin a fosfatidyletanolamin (zeleně). Cholesterol (šedý) zaplňuje prostor mezi jednotlivými sfingolipidy. Cholesterol je přítomen v obou listech membrány (převzato a upraveno ze Simons a Ikonen 1997).

Deborah Brown a Jack Rose (Brown a Rose 1992) zavedli metodu detergentové extrakce k izolaci lipidů a proteinů z biologických membrán. Vychází z principu, kdy hlavní složky membránových raftů, tedy sfingolipidy, cholesterol a GPI vazebné proteiny, nejsou

rozpustné v detergentu Triton X-100 při 4C°, označují se tedy za rezistentní k extrakci detergentem (detergent resistant membrane – DRM), zatímco ostatní složky membrány, tedy fosfolipidy, jsou při extrakci rozpustné v detergentu (detergent sensitive membrane – DSM). Pomocí detergentové extrakce a následnou gradientovou centrifugací se dají izolovat složky membránových mikrodomén, což je jeden ze způsobů, jak lze prokázat jejich možnou přítomnost v membráně.

V roce 2006 byly membránové rafty definovány na symposiu „Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function“: „Membránové rafty jsou malé (10-200 nm), heterogenní, vysoce dynamické domény bohaté na steroly a sfingolipidy, které kompartmentalizují buněčné procesy. Malé rafty mohou být někdy stabilizované vytvářením větších platform díky protein-protein nebo protein-lipidovým interakcím.“ (Pike 2006).

Membránové mikrodomény byly v roce 2009 objeveny také u prokaryotického organismu, *Bacillus subtilis* (López et al. 2009).

3 Membránové mikrodomény bakterií

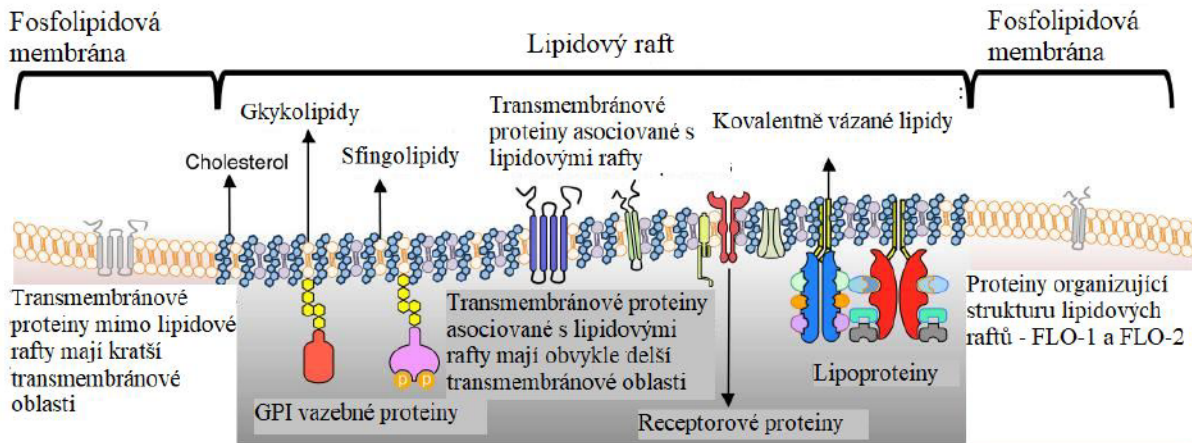
Z důvodu absence cholesterolu v membránách bakterií se předpokládalo, že membránové rafty mohou být přítomny pouze v membránách eukaryotických buněk. Ale v roce 2009 došlo k objevu tzv. funkčních membránových mikrodomén u bakterií během výzkumu biofilmu *B. subtilis* (López et al. 2009). Tato práce se stala odrazovým můstkem pro další výzkumy membránových mikrodomén u prokaryot.

3.1 Lipidové složení bakteriálních membránových mikrodomén

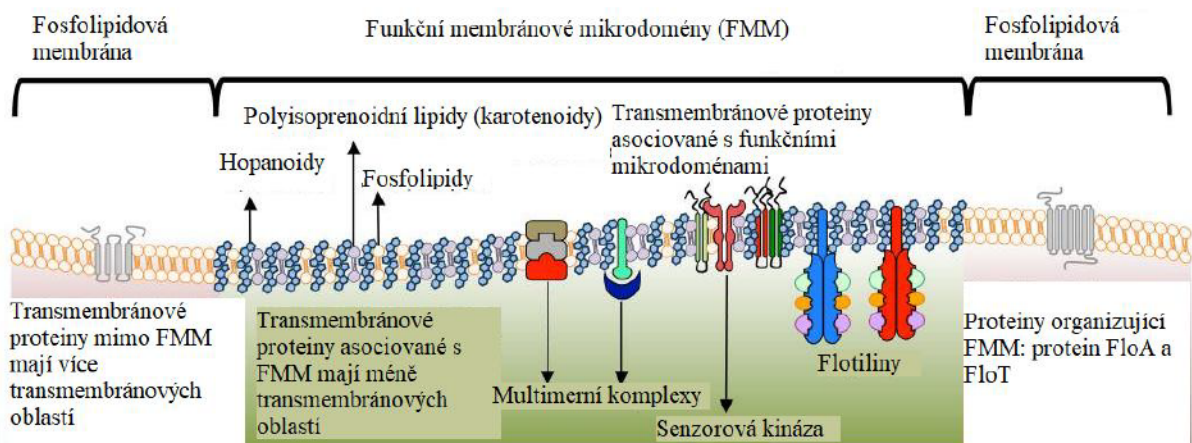
Přítomnost membránových mikrodomén a jejich složení u eukaryot i prokaryot může být pozorováno pomocí analýzy DSM a DRM frakcí, kde jsou lipidy a proteiny obsažené v DRM frakci považovány za součást těchto mikrodomén (Brown a Rose 1992). Membránové mikrodomény bakterií svým složením přibližně odpovídají eukaryotickým membránovým raftům (Obr. 2) stávajících se ze sfingolipidů, cholesterolu a proteinů vázaných na membránové domény. Cholesterol má stabilizační funkci ve struktuře membránových domén (Simons a Ikonen 1997, Pike 2006). U prokaryot tuto funkci přebírají polyisoprenoidní membránové lipidy, podobné eukaryotickému cholesterolu (Rohmer et al. 1979), konkrétně hopanoidy a karotenoidy syntetizované přes dráhy, které zahrnují skvalen syntázu (López a Kolter 2010). Hopanoidy jsou stejně jako cholesterol polycyklické terpenoidy (Obr. 3A), které stabilizují mikrodomény (Ourisson 1987, Sáenz et al. 2015) a snižují fluiditu membrány,

kteřá má tak ve vyšších teplotách více rigidní charakter (Schmidt et al. 1986, Joyeux et al. 2004). Syntéza hopanoidů není závislá na aerobních podmínkách (Härtner et al. 2005).

A) Membrána eukaryotické buňky



B) Membrána prokaryotické buňky

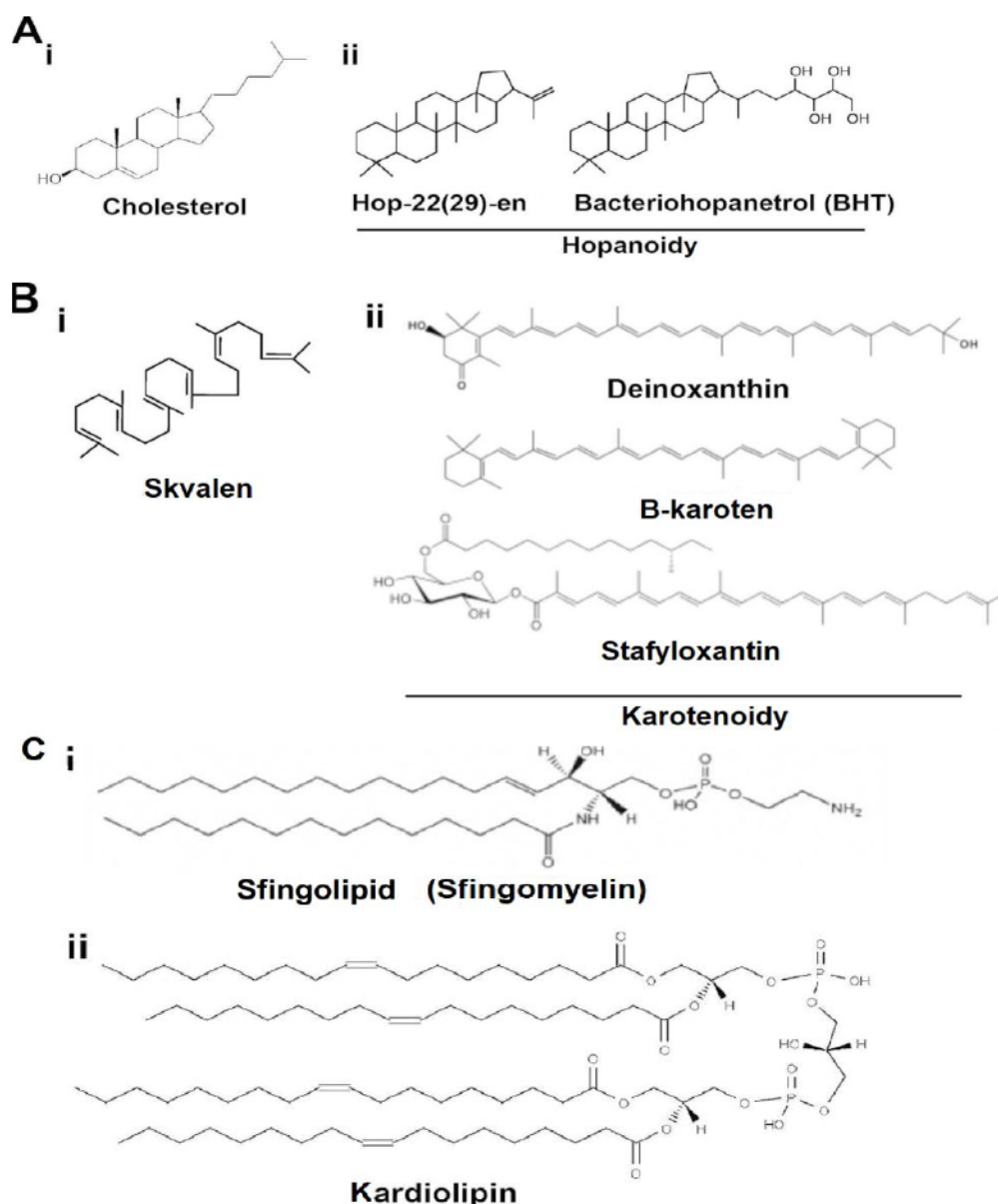


Obr. 2: Strukturální podobnosti a rozdíly mezi lipidovými rafty eukaryot a funkčními membránovými mikrodomény bakterií.

Schéma molekulární organizace lipidových raftů (A) a funkčních membránových mikrodomén (FMM) (B). Architektura těchto dvou typů membránových mikrodomén vykazuje řadu podobností a několik strukturálních rozdílů. Například vazba proteinů s lipidovými rafty se liší od vazby v membránových mikrodoménách prokaryot. Většina proteinů FMM je povahy multimerních komplexů, zatímco lipidové rafty mohou obsahovat monomerní proteiny. Lipidové rafty jsou složeny z cholesterolu a sfingolipidů a FMM jsou pravděpodobně obohaceny o farnesol, hopanoidy a jiné polyisoprenoidní lipidy (převzato a upraveno z López a Koch 2017).

Karotenoidy jsou necyklické polyisoprenoidní lipidy, které svou strukturou připomínají sfingolipidy (Obr. 3B), významné jsou především jako pigmenty (Hammond a White 1970). Karotenoidy pomáhají strukturně stabilizovat mikrodomény a také, stejně jako hopanoidy, zvyšují rigiditu membrány (Rottem a Markowitz 1979).

Specifickým lipidem tvořící membránové mikrodomény bakterií je kardiolipin. Kardiolipin je aniontový fosfolipid se dvěma zápornými náboji, který se nachází typicky v membránách bakterií. Kardiolipin se shlukuje v mikrodomény vyskytující se především na pólech buňky a v oblasti septa dělicích se buněk (Mileykovskaya a Dowhan 2000). Kardiolipin svou strukturou připomíná sfingolipidy eukaryotických lipidových raftů (Obr. 3C) (Bramkamp a López 2015).



Obr. 3: Struktura lipidů obsažených v eukaryotických lipidových raftech a bakteriálních membránových mikrodoménách.

(A) Polycyklické terpenoidy. (i) Molekulární struktura cholesterolu, jež je hlavní složkou eukaryotických lipidových raftů. (ii) Cholesterol není přítomen v bakteriálních membránách, nicméně bakteriální mikrodomény obsahují další polycyklické terpenoidy, označované jako hopanoidy, které jsou strukturně podobné cholesterolu. (B) Necyklické terpenoidy. (i) Molekulární struktura skvalenu, jež je prekurzorem polycyklických i necyklických terpenoidů. (ii) Příkladem necyklických terpenoidů jsou karotenoidy, které jsou v bakteriálních buňkách hojně obsaženy. Například staphyloxanthin je zodpovědný za zlaté zbarvení bakterie *Staphylococcus aureus*. (C) Molekulární struktura sfingolipidů (i) a kardiolipinu (ii). Sfingolipidy jsou membránové lipidy na bázi sfingosinu, které zvyšují rigiditu lipidových raftů eukaryotických buněk (převzato a upraveno z Bramkamp a López 2015).

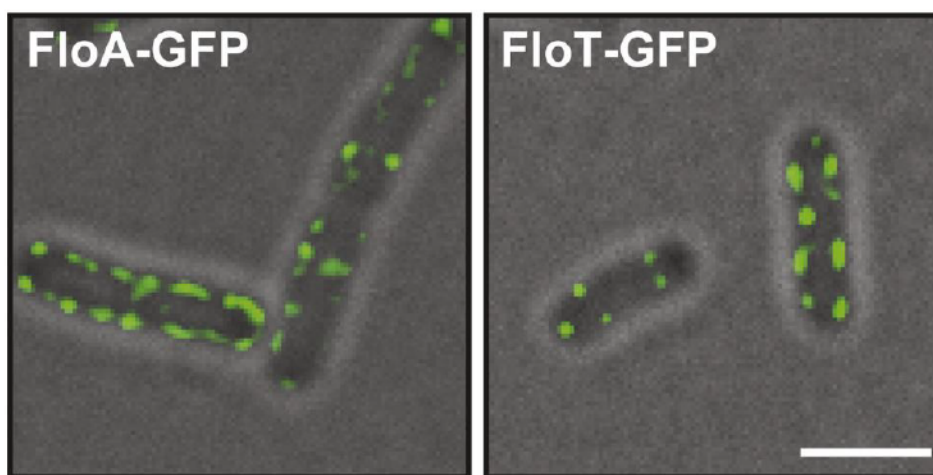
Cholesterol, který je hlavní složkou eukaryotických lipidových raftů, se v membráně bakterií obvykle nevyskytuje, nicméně bakterie *Borrelia burgdorferi* je v tomto ohledu výjimkou. *B. burgdorferi*, patřící mezi spirochéty, je významným lidským patogenem, neboť je původcem onemocnění přenášeného klíšťaty (rod *Ixodes*) - lymeská borelióza (Burgdorfer et al. 1982). V roce 2010 (Larocca et al. 2010) byly ve vnější membráně *B. burgdorferi* popsány membránové mikrodomény složené z cholesterolových glykolipidů. *B. burgdorferi* nemá biosyntetický aparát pro syntézu cholesterolu, ale získává ho z kultivačního média nebo v přirozených podmínkách z buněk hostitele. Tato bakterie má schopnost přebírat cholesterol přímo z plazmatické membrány eukaryotických buněk výměnou za své bakteriální lipidy (Crowley et al. 2013). Nález cholesterolových membránových mikrodomén je další důležitý milník ve studiu prokaryotické membrány (Larocca et al. 2010).

3.2 Bakteriální proteiny strukturně homologní s eukaryotickými flotiliny

Flotilin je hlavním proteinem membránových raftů eukaryot a jeho přítomnost v DRM frakci je většinou považována za důkaz existence membránových mikrodomén v buňce (Bickel et al. 1997). Flotiliny řídí oligomerizaci eukaryotických lipidových raftů a působí jako jejich organizátoři (Volonté et al. 1999). Flotiliny a jim podobné proteiny jsou řazeny do skupiny proteinů tzv. „SPFH“ rodiny (skupina proteinů, jež spojuje stomatiny, prohibitiny, flotiliny a HflK/C proteiny), jejichž společnou vlastností je přítomnost PHB (prohibition homology) domény, která pravděpodobně ovlivňuje funkci těchto proteinů, avšak její vlastnosti nejsou dosud známy (Tavernarakis et al. 1999, Bach a Bramkamp 2015). U bakterií byly proteiny podobné flotilinu poprvé nalezeny v membráně *Bacillus halodurans* v roce 2005 (Zhang et al. 2005). Eukaryotické flotiliny a bakteriální flotilinové proteiny mají velmi podobnou stavbu, neboť se shodují v obsahu 39 % aminokyselin (López a Kolter 2010). Flotilinové proteiny jsou vázány na bakteriální membránu pomocí vlásenkové smyčky do lipidové dvojvrstvy. Proteiny podobné flotilinu mají u různých rodů bakterií velmi podobné složení a vlastnosti a geny kódující tyto proteiny jsou zpravidla umístěny v operonu na druhém místě v sousedství NfeD proteinu (kódující proteiny podobné stomatinu) (Green et al. 2009). Flotilinové proteiny se nacházejí jak u Gram pozitivních, tak u Gram negativních bakterií.

U Gram pozitivní bakterie *B. subtilis* byly popsány dva takové proteiny (Obr. 4) - FloA (dříve označován jako YqfA) a protein FloT (původně označován jako YuaG), který byl takto přejmenován díky své strukturní podobě s lidským flotilinem I. FloT byl prvním popsaným bakteriálním flotilinovým proteinem, jenž se nachází v nepravidelně rozmístěných

oblastech membránových mikrodomén. Zástupce Gram negativních bakterií *Escherichia coli* disponuje proteinem YqiK, který je homologní s FloT (López a Kolter 2010). Flotilinu podobné proteiny byly také nalezeny u *Halobacterium salinarum*, extrémofilního zástupce domény Archaea (Corcelli et al. 2002). Flotilinové proteiny bakterií mají významnou strukturní funkci, neboť jejich narušení způsobuje ztrátu mikrodomén, poruchy ve sporulaci (Donovan a Bramkamp 2009), inhibici tvorby biofilmu a sekrece proteáz (López a Kolter 2010). Flotilinové proteiny dále interagují s dalšími proteiny mikrodomén, které se účastní esenciálních buněčných procesů, jako je transport látek, signalizace (Bach a Bramkamp 2013) nebo přežívání uvnitř hostitele (Zhang et al. 2009) (viz kapitola 4).



Obr. 4: Rozmístění proteinů FloA a FloT v membráně *B. subtilis*.

Snímky z fluorescenčního mikroskopu ukazují buňky *B. subtilis*, které mají proteiny FloT a FloA označeny pomocí translační fúze s fluorescenční sondou GFP (green fluorescent protein). Velikost měřítka je 2 μm (převzato a upraveno z López 2015).

4 Funkce vázané na proteiny lokalizované v membránových mikrodoménách bakterií

Bach a Bramkamp (2013) izolovali proteiny asociované s mikrodoménovým proteinem FloT v DRM frakci z membrány buněk *B. subtilis* nadměrně produkujících FloT. Následně analyzovali proteiny pomocí SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného) a identifikovali pomocí LC-MS/MS (kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií). Byly popsány proteiny účastnící se

metabolismu buněčné stěny, signalizace a mezibuněčné komunikace, proteiny účastníci se sekrece, energetického metabolismu a transportní proteiny. Tyto proteiny jsou tedy s velkou pravděpodobností součástí bakteriálních membránových mikrodomén (Bach a Bramkamp 2013).

Významnou součástí DRM frakce je FtsH proteáza, která je funkčně vázaná s proteiny FloT a FloA a pomáhá v diferenciaci buněk *B. subtilis* produkujících extracelulární matrix biofilmu (Yepes et al. 2012). FtsH proteáza štěpí regulátory fosfatáz fosforylující transkripční regulátor Spo0A, který spouští signální kaskády vedoucí k tvorbě biofilmu (LeDeaux et al. 1995, Le a Schumann 2009). FtsH proteáza také inhibuje tvorbu dělicího aparátu na septech buněk *B. subtilis* (Mielich-Süss et al. 2013). V DRM frakci byl dále popsán protein extracelulární matrix TasA, který je vázán v buněčné stěně prostřednictvím proteinu TapA (TasA - anchoring/assembly protein), dříve označovaného také jako YqxM (Romero et al. 2011). Tyto proteiny udržují vnitřní stavbu matrix biofilmu pomocí škrobových vláken, které produkují (Romero et al. 2010). Další protein asociovaný s FloT byl PBP5, penicilin vazebný protein s nízkou molekulární hmotností, jež napomáhá svou endopeptidázovou aktivitou správnému zesíťování peptidoglykanu (Todd et al. 1985, Atrih et al. 1999).

Histidinová sensorová kináza KinC, popsaná u *B. subtilis*, je dalším z proteinů spojených s bakteriálními membránovými mikrodoménami. Funkce kinázy KinC spočívá ve fosforylaci a tedy aktivaci transkripčního regulátoru Spo0A (LeDeaux et al. 1995). KinC je funkčně spojena s flotilinovými proteiny FloT a FloA, neboť buňky, jež byly mutovány v genech pro syntézu FloT a FloA, nedokázaly vytvářet biofilm. Předpokládá se tedy, že nepřítomnost proteinů FloT a FloA zabrání správnému umístění KinC v membránové mikrodoméně a tím znemožní její aktivitu (López a Kolter 2010). Také byla popsána histidinová sensorová kináza PhoR, jako protein funkčně závislý na FloA, nikoliv na FloT. Protein PhoR je kináza, jež napomáhá výstavbě a organizaci buněčné stěny, kde je zapotřebí pro syntézu kyseliny teichuronové (Müller et al. 1997, Schneider et al. 2015).

V DRM frakci byly dále nalezeny transportní proteiny jako např. FluD, FtsX, GltT, MntA, MntB, RbsB, OppA, OppD, OppF, OpuAC, YclQ, YfiY, YhfQ (Bach a Bramkamp 2013, Schneider et al. 2015). Protein OppA se účastní transportu oligopeptidů, kde funguje jako výchozí receptor (Perego et al. 1991). Protein FtsX tvoří část membránového transportéru podobného s eukaryotickým ABC (ATP binding cassette) transportérem (Gill et al. 1986), který se nachází v oblasti dělicího septa bakteriální buňky (Schmidt et al. 2004). Součástí membránových mikrodomén jsou zřejmě také transportní proteiny Sec dráhy, neboť v DRM frakci byly nalezeny translokázy SecD, SecE, SecY a signální peptidáza SppA (Bach

a Bramkamp 2013). Mikrodomény tvořené Sec translokázou byly také nalezeny v membráně *Streptococcus mutans* (Hu et al. 2008). Proteiny YclQ, YfiY, YhfQ a FhuD mají společnou vlastnost, kterou je podílení se na vylučování sideroforů, tj. látek, které jsou schopné navázat a přenášet ionty železa (Schneider et al. 2015).

Protein TagU zodpovídá za tvar buňky, neboť je asociovaný s cytoskeletárním proteinem MreB. Má funkci ve výstavbě buněčné stěny *B. subtilis*, kam dodává polymery derivátů kyseliny teichoové (Kawai et al. 2011), stejně jako protein GtaB, který je rovněž asociovaný s bakteriálními flotilinovými proteiny (Bach a Bramkamp 2013). Ve frakci proteinů asociovaných s FloA byl nalezen membránový protein MreC (Schneider et al. 2015), který interaguje s ostatními proteiny divízi, jehož je sám součástí. Jeho role spočívá v udržování tvaru buňky (Kruse et al. 2005).

Ve společné DRM frakci byly dále popsány proteiny účastníci se procesů energetického metabolismu (AcsA, AtpA, AtpB, AtpD, AtpG, Nag, PtsI, QoxA, ResC, ResE, SdhA) a signální molekuly ovlivňující chemotaxi (McpA, McpB, McpC) (Bach a Bramkamp 2013, Schneider et al. 2015). Proteiny elektron transportního řetězce, jež jsou v membráně nepravidelně rozmístěny, jsou lokalizovány ve shlucích, které můžeme označit jako mikrodoménové útvary. V cytoplazmatické membráně *E. coli* bylo sledováno rozmístění komplexů enzymu nitrát reduktázy (Alberge et al. 2015). Snímky z fluorescenčního mikroskopu ukázaly, že tento enzym vytváří v membráně shluky lokalizované zejména na pólech buňky. Můžeme tedy hovořit o nitrát reduktázových mikrodoménách, které jsou oddělené od zbytku membrány. Bylo prokázáno, že schopnost tvořit membránové domény obsahující enzym nitrát reduktázu je závislá na kultivačních podmínkách (tedy anaerobních podmínkách a správné hodnotě pH média) umožňující buňce nitrátovou respiraci. Buňky v aerobních podmínkách nevytvářely shluky tohoto enzymu, ale docházelo k jeho rovnoměrnému rozmístění po membráně buňky. Tvorba mikrodomén navíc vedla ke zvýšení účinnosti dýchacího řetězce, neboť bylo produkováno téměř dvojnásobné množství nitritů oproti kontrolním buňkám, které fermentovaly (Alberge et al. 2015). V DRM frakci proteinů asociovaných s FloT byl dále popsán regulační protein ResE, který napomáhá přizpůsobení se anaerobním podmínkám, kde se podílí na aktivaci nitrátové respirace (Nakano et al. 1996, Schneider et al. 2015).

Enzymy F_0F_1 ATP (adenosin trifosfát) syntáza a sukcinát dehydrogenáza také nejsou v membráně *B. subtilis* rovnoměrně rozmístěny, ale vytvářejí dynamické shluky (Johnson et al. 2004). V membráně *B. subtilis* bylo také pozorováno doménové uspořádání komponent respiračního řetězce jako je NADH dehydrogenáza, cytochrom bd-I komplex a cytochrom

bo3 komplex (Llorente-Garcia et al. 2014). Mikrodoménové útvary enzymů terminální oxidázy komplexu cytochrom bd-I byly rovněž popsány při studiu cytoplazmatické membrány *E. coli* (Lenn et al. 2008). Důležitou roli v rámci bakteriálního respiračního řetězce hraje i fosfolipid kardiolipin, který je součástí krystalové struktury cytochrom C oxidázy (Zhang et al. 2011), formiát dehydrogenázy (Jormakka a To 2002) a sukcinát dehydrogenázy (Yankovskaya et al. 2003).

Při studiu DRM frakce membrány *B. burgdorferi* byly nalezeny proteiny, které mohou být s velkou pravděpodobností také součástí cholesterolových mikrodomén. Kromě proteáz (FtsH a HtrA) byly popsány proteiny účinkující v signální transdukcii vedoucí k chemotaxi a motilitě – např. flagelární proteiny FlaA, FlgE a FlaB. Můžeme se tedy domnívat, že cholesterolové rafty bakterie *B. burgdorferi* jsou důležité pro pohyb buňky. Dále byly objeveny proteiny, které napomáhají přežívání a invazivitě bakterie uvnitř hostitelského organismu. Patří mezi ně membránový protein BB_0323 (Nowalk et al. 2006), který se podílí na udržování integrity vnější membrány (Stewart et al. 2004, Zhang et al. 2009) díky vazbě k peptidoglykanu přes C-terminální doménu proteinu BB_0323 (Kariu et al. 2013). Tento protein je esenciální pro přežití v klíštěti ale také v definitivním teplokrevném hostiteli (Zhang et al. 2009). Může mít tedy potenciálně významnou roli při léčbě lymeské boreliózy. V DRM frakci byly dále popsány povrchové lipoproteiny OspA a OspB, které umožňují přichycení a udržení bakterie uvnitř trávicí soustavy klíštěte (Pal et al. 2000).

Membránové mikrodomény byly popsány také u sinic. Konkrétně u sinice rodu *Synechocystis* se vyskytují mikrodomény, které obsahují proteiny patřící do „SPFH rodiny“ proteinů (Boehm et al. 2009).

5 Membránové mikrodomény jako možná zásahová místa v terapii bakteriálních infekcí

Narůstající rezistence patogenních bakterií k léčbě stávajícími antibiotiky se stává celosvětovým problémem (Hughes et al. 2016). Proto stoupá zájem o nové přístupy v možnostech terapie bakteriálních infekcí. Membránové mikrodomény mohou být využity jako specifická zásahová místa pro účinek nových léčiv. Podstata antimikrobiálního účinku spočívá v rozrušování membránových mikrodomén a tím tedy ztrátě funkcí proteinů, které jsou na ně vázané, což je pro buňku letální.

5.1 Membránová lipidová terapie

Některé deriváty mastných kyselin mají schopnost se vázat na membránové lipidy a dokáží tím reorganizovat proteiny buněčné membrány, tyto účinky se označují jako membránová lipidová terapie (Escribá 2006). Jde o deriváty 2-hydroxy mastných kyselin, jako jsou kyselina arachidonová, linolenová, linolová, eikosapentaneová, eikosahexaenová, dokosahexaenová, stearová a olejová. Membránovou lipidovou terapii je možné využít také při cílení na lipidy obsažené ve funkčních membránových mikrodomén bakterií a tím ovlivňovat funkci proteinů, které jsou v nich vázané (Ibarguren et al. 2013).

5.2 Kardiolipinové mikrodomény jako specifická zásahová místa antibiotik

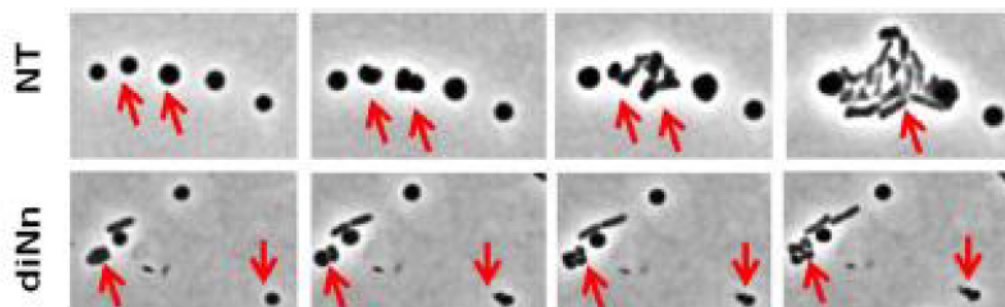
5.2.1 Mechanismus účinku antibiotika 3',6-dinonyl neamin

Antibiotikum neamin (derivát neomycinu) je aminoglykosid, který se váže na 16S RNA a inhibuje syntézu proteinů (Davies a Gilbert 1964). Jeho derivát 3',6-dinonyl neamin (diNn) navíc vazbou na lipopolysacharidy ve vnější membráně bakterií narušuje jejich síťovité propojení a tím výrazně zvyšuje pravděpodobnost průniku antibiotika do buňky (Sautrey et al. 2014). V cytoplazmatické membráně cílí na kardiolipinové mikrodomény a indukuje jejich rozvolnění (El Khoury et al. 2017).

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* způsobuje závažná onemocnění dýchacích cest, tato infekce je jednou z hlavních příčin úmrtí pacientů s cystickou fibrózou (Smith et al. 1996). U buněk *P. aeruginosa* vystavených účinku subinhibiční koncentrace diNn (dávka odpovídající hodnotě 0,75 minimální inhibiční koncentrace – MIC, tj. nejnižší koncentrace antibiotika, která inhibuje růst mikroorganismu) byla prokázána zvýšená permeabilita membrány pro fluorescenční barviva (Swain et al. 2018) a změna rozmístění kardiolipinových mikrodomén v membráně. Další pokusy vedly ke zjištění, že diNn má vliv na délku buněk bakterií, na rozdíl od účinku ostatních antibiotik (colistin -a další aminoglykosidová antibiotika) (El Khoury et al. 2017). Buňky se po vystavení účinkům diNn jeví průměrně o 0,3 μm kratší než buňky neošetřené antibiotikem a došlo k významnému morfologickému narušení struktury buňky (Swain et al. 2018).

Účinek antibiotika diNn na sféropasty odvozené od buněk *P. aeruginosa*, tj. buňky zbavené buněčné stěny (Renner et al. 2013), vedl k tomu, že regenerované buňky nedokázaly znovu nabýt tyčinkovitého tvaru ani v následujících generacích. To je pravděpodobně způsobeno tím, že protein MreB, který napomáhá určovat tyčinkovitý tvar buňky (Wachi et

al. 1987), je funkčně závislý na lokalizaci v kardiolipinových mikrodoménách a při jejich rozrušení je negativně ovlivněna i funkce MreB (Obr. 5) (El Khoury et al. 2017).



Obr. 5: Antibiotikum diNn inhibuje regeneraci tyčinkovitého tvaru *P. aeruginosa*.

Regenerované buňky ze sféroplastů bez aplikovaného diNn (non-treated - NT) nabyly tyčinkovitý tvar po třech cyklech buněčného dělení. Zatímco v přítomnosti diNn nově vzniklé buňky nedokázaly znovu získat tyčinkovitý tvar a také u nich došlo k zástavě buněčného dělení již u druhé generace (El Khoury et al. 2017).

Působením diNn na bakteriální buňku byla také snížena hladina ATP a hodnota pH v buňce, což značí zhoršenou funkci respiračního řetězce a následné snížení růstové rychlosti buněk a jejich odumírání (El Khoury et al. 2017).

5.2.2 Účinky cyklických hexapeptidů na membránové mikrodomény

Cyklické hexapeptidy bohaté na arginin a tryptofan mají bakteriostatické účinky na Gram pozitivní i Gram negativní bakterie (Junkes et al. 2008). Jejich aktivita spočívá pravděpodobně ve vazbě do kardiolipinových membránových mikrodomén, kde kardiolipin zprostředkovává vazbu hexapeptidů k membráně, a následné reorganizaci lipidových mikrodomén. Působením cyklických hexapeptidů dochází ke snížení růstové rychlosti až k celkovému zastavení růstu buněk *B. subtilis* a *E. coli*. Cyklické hexapeptidy nevykazují toxické účinky pro savčí buňky (Scheinflug et al. 2015), proto se nabízí jejich potenciální terapeutické využití také u člověka.

5.2.3 Kardiolipinové mikrodomény jako potenciální zásahové místo nanočástic

Další návrh využití kardiolipinových mikrodomén jako místa vstupu léčiva do buňky popisuje dopravování nabitého nanokomplexu obsahující oligonukleotidové kopie DNA, jež vyvazují transkripční faktory, do cytoplasmy *E. coli*. Kladně nabitý obal nanokomplexu je tvořený tzv.

bolaamfily, což jsou povrchově aktivní látky obsahující hydrofobně propojené hydrofilní skupiny (Fuhrhop a Mathieu 1984, Fuhrhop et al. 1986). Díky svému náboji se nanokomplex váže přednostně do záporně nabitých kardiolipinových mikrodomén a vstupuje přes ně do buňky. V cytoplazmě buňky působí přenesený úsek DNA jako kompetitivní inhibitor transkripčních faktorů nutných pro přepis esenciálních genů (Marín-Menéndez et al. 2017).

5.3 Význam cholesterolových mikrodomén v terapii infekce způsobené *B. burgdorferi*

Infekce bakterií *B. burgdorferi* způsobuje závažné onemocnění lymeská borelióza, která je v Evropě velmi rozšířená, data Státního zdravotnického ústavu uvádějí až 4724 případů onemocnění v České republice za rok 2018 (www.szu.cz). Cholesterol a cholesterolové glykolipidy, které v membráně *B. burgdorferi* tvoří mikrodomény, jsou nezbytné pro baktericidní účinky monoklonální protilátky CB2. Protilátka CB2 se váže na povrchový lipoprotein B (také označován jako OspB), který je součástí mikrodomény v membráně *B. burgdorferi* a způsobuje tím narušení vnější membrány bakterie, což má pro buňku letální efekt (Coleman et al. 1992, Larocca et al. 2010).

5.4 Rozrušování membránových mikrodomén bakterií pomocí kyseliny zaragozové

Staphylococcus aureus využívá pro syntézu skvalenu mevalonátovou dráhu (ta je přítomna také u člověka), která může být inhibována statiny (Wilding et al. 2000). Zatímco *B. subtilis* využívá dráhu vycházející z glyceraldehyd-3-fosfátu a pyruvátu (1-deoxy-D-xylulosa 5-fosfát/2-C-methylerythritol 4-fosfátová dráha) (Takahashi et al. 1998) (vyskytující se také u rostlin), která může být inhibována herbicidem clomazonem (Mueller et al. 2000). Obě dráhy se shodují v meziprojektu syntézy v podobě farnesyl pyrofosfátu, z něhož je syntetizován skvalen pomocí enzymu skvalen syntáza. Kyselina zaragozová (ZA) je inhibitorem enzymu skvalen syntázy (Bergstrom et al. 1993) a může tedy způsobit zástavu růstu *B. subtilis* a *S. aureus*, protože inhibuje syntézu polyisoprenoidů odvozených od skvalenu. Nepřítomnost polyisoprenoidů pak způsobuje ztrátu aktivity membránové kinázy KinC, což vede ke ztrátě schopnosti bakterií vytvářet biofilm (viz kapitola 4). Na membránách buněk *B. subtilis* a *S. aureus* bylo po aplikaci kyseliny zaragozové pozorováno rozdílné rozmístění proteinu FloT a byla snížena jeho enzymatická aktivita. Kyselina zaragozová způsobila, že kolonie *S. aureus* ztratily své typicky sytě žluté zbarvení a staly se bezbarvými (López a Kolter 2010), což je způsobeno tím, že karotenoid staphyloxantin, který

dává koloniím tuto barvu a je obsažen v mikrodoménách, je odvozen od skvalenu (Pelz et al. 2005). Také došlo k zastavení biosyntetických drah lipidů probíhajících v membránových mikrodoménách (López a Kolter 2010).

5.4.1 Inhibice rezistence *S. aureus* odstraněním membránových mikrodomén

Protein PBP2a je nízkoafinitní penicilin vazebný protein (Hartman a Tomasz 1984), který pro svoji oligomerizaci a funkci vyžaduje lokalizaci v membránových mikrodoménách bakterií a protein FloA (García-Fernández et al. 2017). PBP2a je zodpovědný za meticilinovou rezistenci *S. aureus* (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA), neboť betalaktamová antibiotika jsou vyvazována proteinem PBP2a jako jeho substrátový analog (Georgopapadakou et al. 1986, Zapun et al. 2008). Rozrušení membránových mikrodomén pomocí statinů vedlo k zabránění vzniku funkčních oligomerů proteinu PBP2a. Tím došlo ke ztrátě jeho aktivity a k následnému snížení míry rezistence MRSA na betalaktamová antibiotika - MIC oxacilinu se snížila až desetkrát (García-Fernández et al. 2017).

In vivo testy na myších infikovaných MRSA prokázaly výrazné terapeutické účinky kyseliny zaragozové. Myši léčené pouze oxacilinem (200 mg/kg/den) měly výrazně vyšší hodnoty CFU (colony forming unit – počet živých bakteriálních buněk ve vzorku) o hodnotě 10^9 CFU/g plicní tkáně. Zatímco vzorky z myší léčených stejnou dávkou oxacilinu a ZA (50 mg/kg/den) vykazovaly počty bakteriálních buněk 10^4 CFU/g. Tyto myši měly také vyšší míru přežití, kdy z celkového počtu nakažených myší přežilo 70 % jedinců, oproti 10 % přeživších myší léčených pouze oxacilinem (García-Fernández et al. 2017).

Kyselina zaragozová může být považována za bakteriostatickou látku, jež zabraňuje tvorbě biofilmu a ovlivňuje rozmístění membránových mikrodomén v membránách. In vivo testy prokázaly její schopnost potlačit rezistenci *S. aureus* k betalaktamovým antibiotikům. Navíc můžeme předpokládat bezpečné použití kyseliny zaragozové u lidí, protože tato kyselina je obsažena v léčivech, které se používají pro léčbu hypercholesterolemie (García-Fernández et al. 2017).

Výše uvedené návrhy přinášejí možnosti, jak lze membránové mikrodomény bakterií využít při léčbě závažných bakteriálních infekcí. Zejména cyklické hexapeptidy (Scheinpflug et al. 2015), které nevykazují toxicitu pro savčí buňky nebo kyselina zaragozová, jež se již jako léčivo používá (López a Kolter 2010), mají silný potenciál se v příštích letech stát možným prostředkem k překonávání rezistence bakterií ke stávajícím antibiotikům také in vivo. Antibiotikum 3',6-dinonyl neamin nabízí novou možnost boje s patogenem, který

způsobuje těžké zdravotní problémy zejména pacientům trpícím cystickou fibrózou (El Khoury et al. 2017).

6 Závěr

Funkční membránové mikrodomény, popsané v posledních deseti letech v rámci domény Bacteria, jsou přítomny u Gram pozitivních i u Gram negativních bakterií, u sinic, ale také u organismů z domény Archaea, jsou do značné míry obdobou eukaryotických lipidových raftů. Lipidové složení funkčních membránových mikrodomén je analogické k chemickému složení eukaryotických raftů, kde prokaryotické hopanoidy nahrazují cholesterolovou složku, kardiolipin je obdobou sfingolipidů a karotenoidy jsou odvozeny od skvalenu stejně jako některé složky raftů. Také proteiny bakteriálních mikrodomén, které organizují výstavbu membránových mikrodomén, vykazují funkční a strukturní shodu s raftovými proteiny flotiliny.

Na funkční membránové mikrodomény jsou vázány funkce spojené s buněčným transportem, signalizací, metabolismem buněčné stěny, udržováním tvaru buňky nebo energetickým metabolismem. Byly popsány také mikrodomény obsahující enzymy respiračního aparátu. Dále jsou v membránových mikrodoménách vázané proteiny související s tvorbou biofilmu, umožňující přežívání v hostitelském organismu a následné propuknutí infekce nebo proteiny, které dokáží vyvažovat penicilinová antibiotika. Tyto vlastnosti můžeme považovat za virulenční faktory bakterií. Zacielením na tato místa v cytoplazmatické membráně bakterií můžeme dosáhnout nového způsobu vstupu antibiotik do bakteriální buňky. Případně je možné narušit membránové mikrodomény a tím zamezit funkci proteinů vázaných do mikrodomén a docílit tak antibiotického efektu. Takový proces je jedním ze způsobů, jak překonat infekci způsobenou (multi)rezistentními patogeny, které se stávají celosvětovým problémem naší společnosti. Zejména kombinace běžných antibiotik se statiny, jako je např. kyselina zaragozová, a dalších látek fungujících jako inhibitory syntézy skvalenu, které mají významné bakteriostatické účinky proti kmenu *S. aureus* rezistentnímu k meticilinu, by se mohla s velkou pravděpodobností stát terapeutickým prostředkem k překonání této infekce. Další podobné antimikrobiální látky nabízejí potenciální využití v léčbě infekcí způsobených patogeny, jako je *P. aeruginosa* nebo *B. burgdorferi*.

V budoucím studiu funkčních membránových mikrodomén by bylo vhodné hledat další proteiny a jejich funkce, které jsou vázány na přítomnost mikrodomén, a prokázat existenci mikrodomén v membráně dalších druhů bakterií.

7 Seznam použité literatury

- Alberge, F., Espinosa, L., Seduk, F., Sylvi, L., Toci, R., Walburger, A. a Magalon, A. 2015. “Dynamic subcellular localization of a respiratory complex controls bacterial respiration.” *ELife* 4: e05357.
- Atrih, A., Bacher, G., Allmaier, G., Williamson, M.P. a Foster, S.J. 1999. “Analysis of peptidoglycan structure from vegetative cells of *Bacillus subtilis* 168 and role of PBP 5 in peptidoglycan maturation.” *J Bacteriol* 181 (13): 3956–66.
- Bach, J.N. a Bramkamp, M. 2013. “Flotillins functionally organize the bacterial membrane.” *Mol Microbiol* 88 (6): 1205–17.
- Bach, J.N. a Bramkamp, M. 2015. “Dissecting the molecular properties of prokaryotic flotillins.” *PLoS ONE* 10 (1): e0116750.
- Bergstrom, J.D., Kurtz, M.M., Rew, D.J., Amend, A.M., Karkas, J.D., Bostedor, R.G., Bansal, V.S., Dufresne, C., VanMiddlesworth, F.L. a Hensens, O.D. 1993. “Zaragozic acids: A family of fungal metabolites that are picomolar competitive inhibitors of squalene synthase.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1): 80–84.
- Bickel, P.E., Scherer, P.E., Schnitzer, J.E., Oh, P., Lisanti, M.P. a Lodish, H.F. 1997. “Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins.” *J Biol Chem* 272 (21): 13793–802.
- Boehm, M., Nield, J., Zhang, P., Aro, E.M., Komenda, J. a Nixon, P.J. 2009. “Structural and mutational analysis of band 7 proteins in the *Cyanobacterium synechocystis* sp. strain PCC 6803.” *J Bacteriol* 191 (20): 6425–35.
- Bramkamp, M. a López, D. 2015. “Exploring the existence of lipid rafts in bacteria.” *Microbiol Mol Biol Rev* 79 (1): 81-100.
- Brown, D.A. a Rose J.K. 1992. “Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface.” *Cell* 68 (3): 533–44.
- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L., Grunwaldt, E. a Davis, J.P. 1982. “Lyme disease—a tick-borne spirochetosis?” *Science* 216 (4552): 1317–19.
- Coleman, J. L., Rogers, R.C. a Benach, J.L. 1992. “Selection of an escape variant of *Borrelia burgdorferi* by use of bactericidal monoclonal antibodies to OspB.” *Infect Immun* 60 (8): 3098–3104.
- Corcelli, A., Lattanzio, V.M.T., Mascolo, G., Papadia, P. a Fanizzi, F. 2002. “Lipid-protein stoichiometries in a crystalline biological membrane: NMR quantitative analysis of the lipid extract of the purple membrane.” *J Lipid Res* 43 (1): 132–40.
- Crowley, J.T., Toledo, A.M., LaRocca, T.J., Coleman, J.L., London, E.L. a Benach, J.L. 2013. “Lipid exchange between *Borrelia burgdorferi* and host cells.” *PLoS Pathogens* 9 (1): e1003109.

- Danielsen, E.M. 1995. "Involvement of detergent-insoluble complexes in the intracellular transport of intestinal brush border enzymes." *Biochemistry* 34 (5): 1596-605.
- Davies, J., Gilbert, W. a Gorini, L. 1964. "Streptomycin, suppression, and the code." *Proc Natl Acad Sci U S A* 51 (5): 883-90.
- Donovan, C. a Bramkamp, M. 2009. "Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue." *Microbiology* 155 (6): 1786-99.
- El Khoury, M., Swain, J., Sautrey, G., Zimmermann, L., Van Der Smissen, P., Décout, J.L. a Mingeot-Leclercq, M.P. 2017. "Targeting bacterial cardiolipin enriched microdomains: An antimicrobial strategy used by amphiphilic aminoglycoside antibiotics." *Sci Rep* 7 (1): 10697.
- Escribá, P.V. 2006. "Membrane-lipid therapy: A new approach in molecular medicine." *Trends Mol Med* 12 (1): 34-43.
- Fuhrhop, J.H. a Mathieu, J. 1984. "Wege zu funktionalen Vesikelmembranen ohne Proteine." *Angew Chem* 96 (2): 124-37.
- Fuhrhop, J.H., David, H.H., Mathieu, J., Liman, U., Winter, H.J. a Boekema, E. 1986. "Bolaamphiphiles and monolayer lipid membranes made from 1,6,19,24-tetraoxa-3,21-cyclohexatriacontadiene-2,5,20,23-tetrone." *J Am Chem Soc* 108 (8): 1785-91.
- García-Fernández, E., Koch, G., Wagner, R.M., Fekete, A., Stengel, S.T., Schneider, J., Mielich-Süss, B., Geibel, S., Markert, S.M., Stigloher, C. a López, D. 2017. "Membrane microdomain disassembly inhibits MRSA antibiotic resistance." *Cell* 171 (6): 1354-67.
- Georgopapadakou, N.H., Dix, B.A. a Mauriz, Y.R. 1986. "Possible physiological functions of penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 29 (2): 333-36.
- Gill, D.R., Hatfull, G.F. a Salmond, G.P.C. 1986. "A new cell division operon in *Escherichia coli*." *Mol Gen Genet* 205 (1): 134-45.
- Green, J.B., Lower, R.P.J. a Young, J.P.V. 2009. "The NfeD protein family and its conserved gene neighbours throughout prokaryotes: Functional implications for stomatin-like proteins." *J Mol Evol* 69 (6): 657-67.
- Hammond, R. K. a White, D.C. 1970. "Carotenoid formation by *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 103 (1): 191-98.
- Hartman, B. J. a Tomasz, A. 1984. "Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 158 (2): 513-16.
- Härtner, T., Straub, K.L. a Kannenberg, E. 2005. "Occurrence of hopanoid lipids in anaerobic *Geobacter* species." *FEMS Microbiol Lett* 243 (1): 59-64.

- Hu, P., Bian, Z., Fan, M., Huang, M. a Zhang, P. 2008. “Sec translocase and sortase A are colocalised in a locus in the cytoplasmic membrane of *Streptococcus mutans*.” *Arch Oral Biol* 53 (2): 150–54.
- Hughes, J.S., Hurford, A., Finley, R.L., Patrick, D.M., Wu, J. a Morris, A.M. 2016. “How to measure the impacts of antibiotic resistance and antibiotic development on empiric therapy: New composite indices.” *BMJ Open* 6 (12): e012040.
- Ibarguren, M., López, D.J., Encinar, J.A., González-Ros, J.M., Busquets, X. a Escribá, P.V. 2013. “Partitioning of liquid-ordered/liquid-disordered membrane microdomains induced by the fluidifying effect of 2-hydroxylated fatty acid derivatives.” *Biochim Biophys Acta* 1828 (11): 2553–63.
- Johnson, A. S., van Horck, S. a Lewis, P.J. 2004. “Dynamic localization of membrane proteins in *Bacillus subtilis*.” *Microbiology* 150 (9): 2815–24.
- Jormakka, M., Tornroth, S., Byrene, B. a Iwata, S. 2002. “Molecular basis of proton motive force generation : Structure of formate dehydrogenase-N.” *Science* 295 (5561): 1863–68.
- Joyeux, C., Fouchard, S., Llopiz, P. a Neunlist, S. 2004. “Influence of the temperature and the growth phase on the hopanoids and fatty acids content of *Frateuria aurantia* (DSMZ 6220).” *FEMS Microbiol Ecol* 47 (3): 371-9.
- Junkes, C., Wessolowski, A., Farnaud, S., Evans, R.W., Good, L., Bienert, M. a Dathe, M. 2008. “The interaction of arginine- and tryptophan-rich cyclic hexapeptides with *Escherichia coli* membranes.” *J Pept Sci* 14 (4): 535–43.
- Kariu, T., Yang, X., Marks, C.B., Zhang, X. a Pal, U. 2013. “Proteolysis of BB0323 results in two polypeptides that impact physiologic and infectious phenotypes in *Borrelia burgdorferi*.” *Mol Microbiol* 88 (3): 510–22.
- Karnovsky, M.J., Kleinfeld, A.M., Hoover, R.L. a Klausner, R.D. 1982. “The concept of lipid domains in membranes.” *J Cell Biol* 94 (1): 1–6.
- Kawai, Y., Marles-Wright, J., Cleverley, R.M., Emmins, R., Ishikawa, S., Kuwano, M., Heinz, N., Bui, N.K., Hoyland, C.N., Ogasawara, N., Lewis, R.J., Vollmer, W., Daniel, R.A. a Errington, J. 2011. “A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins.” *EMBO J* 30 (24): 4931–41.
- Kruse, T., Bork-Jensen, J. a Gerdes, K. 2005. “The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex.” *Mol Microbiol* 55 (1): 78–89.
- Kusumi, A. a Sako, Y. 1996. “Cell surface organization by the membrane skeleton.” *Cell* 8 (4): 566–74.
- Larocca, T.J, Crowley, J.T., Cusack, B.J., Pathak, P., Benach, J., London, E., Garcia-Monco, J.C. a Benach, J.L. 2010. “Cholesterol lipids of *Borrelia burgdorferi* form lipid rafts and are required for the bactericidal mechanism of a complement- independent antibody.” *Cell Host Microbe* 8 (4): 331–42.

- Le, A.T. a Schumann, W. 2009. "The SpoOE phosphatase of *Bacillus subtilis* is a substrate of the FtsH metalloprotease." *Microbiology* 155 (4): 1122–32.
- LeDeaux, J. R., Yu, N. a Grossman, A.D. 1995. "Different roles for KinA, KinB, and KinC in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 177 (3): 861–63.
- Lenn, T., Leake, M.C. a Mullineaux, C.V. 2008. "Clustering and dynamics of cytochrome Bd-I complexes in the *Escherichia coli* plasma membrane in vivo." *Mol Microbiol* 70 (6): 1397–1407.
- Llorente-Garcia, I., Lenn, T., Erhardt, H., Harriman, O.L., Liu, L.N., Robson, A., Chiu, S.W., Matthews, S., Willis, N.J., Bray, C.D., Lee, S.H., Shin, J.Y., Bustamante, C., Liphardt, J., Friedrich, T., Mullineaux, C.W. a Leake, M.C. 2014. "Single-molecule in vivo imaging of bacterial respiratory complexes indicates delocalized oxidative phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* 1837 (6): 811–24.
- López D., Fischbach M.A., Chu F., Losick R. a Kolter R. 2009. "Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (1): 280–85.
- López, D. a Kolter, R. 2010. "Functional microdomains in bacterial membranes." *Genes Dev* 24 (17): 1893-902.
- López, D. 2015. "Molecular composition of functional microdomains in bacterial membranes." *Chem Phys Lipids* 192: 3–11.
- López, D. a Koch, G. 2017. "Exploring functional membrane microdomains in bacteria: An overview." *Curr Opin Microbiol* 36: 76–84.
- Marín-Menéndez, A., Montis, C., Díaz-Calvo, T., Carta, C., Hatzixanthis, K., Morris, C.J., McArthur, M. a Berti, D. 2017. "Antimicrobial nanoplexes meet model bacterial membranes: The key role of cardiolipin." *Sci Rep* 7 (1): 1–13.
- Mielich-Süss, B., Schneider, S. a López, D. 2013. "Overproduction of flotillin influences cell differentiation and shape in *Bacillus subtilis*." *MBio* 4 (6): e00719-13.
- Mileykovskaya, E. a Dowhan, W. 2000. "Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange." *J Bacteriol* 182 (4): 1172–75.
- Mueller, C., Schwender, J., Zeidler, J. a Lichtenthaler, H.K. 2000. "Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis." *Biochem Soc Trans* 28 (6): 792–93.
- Müller, J.P., An, Z., Merad, T., Hancock, I.C. a Harwood, C.R. 1997. "Influence of *Bacillus subtilis* PhoR on cell wall anionic polymers." *Microbiology* 143 (3): 947–56.
- Nakano, M.M., Zuber, P., Glaser, P., Danchin, A. a Hulett, M.F. 1996. "Two-component regulatory proteins ResD-ResE are required for transcriptional activation of Fnr upon oxygen limitation in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 178 (13): 3796–3802.

- Nowalk, A.J., Gilmore, R.D. a Carroll, J.A. 2006. "Serologic proteome analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane-associated proteins." *Infect Immun* 74 (7): 3864–73.
- Ourisson G., Rohmer M., Poralla K. 1987. "Prokaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates." *Annu Rev Microbiol* 41: 301-33.
- Pal, U., De Silva, A.M., Montgomery, R.R., Fish, D., Anguita, J., Anderson, J.F., Lobet, Y. a Fikrig, E. 2000. "Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A." *J Clin Invest* 106 (4): 561–69.
- Parton, R.G. 1996. "Caveolae and caveolins." *Curr Opin Cell Biol* 8 (4): 542–48.
- Pelz, A., Wieland, K.P., Putzbach, K., Hentschel, P., Albert, K. a Götz, F. 2005. "Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*." *J Biol Chem* 280 (37): 32493–98.
- Perego, M., Higgins, C.F., Pearce, S.R., Gallagher, M.P. a Hoch, J.A. 1991. "The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation." *Mol Microbiol* 5 (1): 173–85.
- Pike, L.J. 2006. "Rafts defined: A report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function." *J Lipid Res* 47 (7): 1597-8.
- Renner, L.D., Eswaramoorthy, P., Ramamurthi, K.S. a Weibel, D.B. 2013. "Studying biomolecule localization by engineering bacterial cell wall curvature." *PLoS ONE* 8 (12): e84143.
- Rohmer, M., Bouvier P. a Ourisson, G. 1979. "Molecular evolution of biomembranes: Structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (2): 847-51.
- Romero, D., Aguilar, C., Losick, R. a Kolter, R. 2010. "Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (5): 2230–34.
- Romero, D., Vlamakis, H., Losick, H. a Kolter, R. 2011. "An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms." *Mol Microbiol* 80 (5): 1155–68.
- Rottem, S. a Markowitz, O. 1979. "Carotenoids act as reinforcers of the *Acholeplasma laidlawii* lipid bilayer." *J Bacteriol* 140 (3): 944–48.
- Sáenz, J.P., Grosser, D., Bradley, A.S., Lagny, T.J., Lavrynenko, O., Broda, M. a Simons, K. 2015. "Hopanoids as functional analogues of cholesterol in bacterial membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (38): 11971-6.
- Sautrey, G., Zimmermann, L., Deleu, M., Delbar, A., Souza Machado, L., Jeannot, K., Van Bambeke, F., Buyck, J.M., Decout, J.L. a Mingeot-Leclercq, M.P. 2014. "New amphiphilic neamine derivatives active against resistant *Pseudomonas aeruginosa* and their interactions with lipopolysaccharides." *Antimicrob Agents Chemother* 58 (8): 4420–30.

- Scheinflug, K., Krylova, O., Nikolenko, H., Thurm, C. a Dathe, M. 2015. "Evidence for a novel mechanism of antimicrobial action of a cyclic R-,W-rich hexapeptide." *PLoS ONE* 10 (4): e0125056.
- Schmidt, A., Bringer-Meyer, S., Poralla, K. a Sahm, H. 1986. "Effect of alcohols and temperature on the hopanoid content of *Zymomonas mobilis*." *Appl Microbiol Biotechnol* 25 (1): 32–36.
- Schmidt, K. L., Peterson, N.D., Kustusch, R.J., Wissel, M.C., Graham, B., Phillips, G.J. a Weiss, D.S. 2004. "A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 186 (3): 785–93.
- Schneider, J., Klein, T., Mielich-Stüss, B., Koch, G., Franke, C., Kuipers, O.P., Kovács, A.T., Sauer, M. a López, D. 2015. "Spatio-temporal remodeling of functional membrane microdomains organizes the signaling networks of a bacterium." *PLoS Genetic* 11 (4): e1005140.
- Simons, K. a Ikonen, E. 1997. "Functional rafts in cell membranes." *Nature* 387 (6633): 569–72.
- Singer, S.J. a Nicolson, G.L. 1972. "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* 175 (4023): 720–31.
- Smith, J.J., Travis, S.M., Greenberg, E.P. a Welsh, M.J. 1996. "Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid." *Cell* 85 (2): 229–36.
- Stewart, P.E., Hoff, J., Fischer, E., Krum, J.G. a Rosa, P.A. 2004. "Genome-wide transposon mutagenesis of *Borrelia burgdorferi* for identification of phenotypic mutants." *Appl Environ Microbiol* 70 (10): 5973–79.
- Swain, J., El Khoury, M., Kempf, J., Briée, F., Van Der Smissen, P., Décout, J.L. a Mingeot-Leclercq, M.P. 2018. "Effect of cardiolipin on the antimicrobial activity of a new amphiphilic aminoglycoside derivative on *Pseudomonas aeruginosa*." *PLoS ONE* 13 (8): e0201752.
- Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H. a Seto, H. 1998. "A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (17): 9879–84.
- Tavernarakis, N., Driscoll, M. a Kyripides N.C. 1999. "The SPFH domain: Implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins." *Trends Biochem Sci* 24 (11): 425–27.
- Todd, J.A., Bone, E.J. a Ellar, D.J. 1985. "The sporulation-specific penicillin-binding protein 5a from *Bacillus subtilis* is a Dd-carboxypeptidase in vitro." *Biochem J* 230 (3): 825–28.

- Volonté, D., Galbiati, F., Li, S., Nishiyama, K., Okamoto, T. a Lisanti, M.P. 1999. "Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo." *J Biol Chem* 274 (18): 12702–9.
- Wachi, M., Doi, M., Tamaki, S., Park, W., Nakajima-Iijima, S. a Matsubashi, M. 1987. "Mutant isolation and molecular cloning of Mre genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 169 (11): 4935–40.
- Wilding, E. I., Brown, J.R., Bryant, A.P., Chalker, A.F., Holmes, D.J., Ingraham, K.A., Iordanescu, S., So, C.Y., Rosenberg, M. a Gwynn, M.N. 2000. "Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci." *J Bacteriol* 182 (15): 4319–27.
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tömroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G. a Iwata, S. 2003. "Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation." *Science* 299 (5607): 700–704.
- Yepes, A., Schneider, J., Mielich, B., Koch, G., García-Betancur, J.C., Ramamurthi, K.S., Vlamakis, H. a López, D. 2012. "The biofilm formation defect of a *Bacillus subtilis* flotillin- defective mutant involves the protease FtsH." *Mol Microbiol* 86 (2): 457–71.
- Zapun, A., Contreras-Martel, C. a Vernet, T. 2008. "Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance." *FEMS Microbiol Rev* 32 (2): 361–85.
- Zhang, H.M., Li, Z., Tsudome, M., Ito, S., Takami, H. a Horikoshi, K. 2005. "An alkali-inducible flotillin-like protein from *Bacillus halodurans* C-125." *Protein J* 24 (2): 125–31.
- Zhang, X., Yang, X., Kumar, M. a Pal, U. 2009. "BB0323 function is essential for *Borrelia burgdorferi* virulence and persistence through tick-rodent transmission cycle ." *J Infect Dis* 200(8): 1318-30.
- Zhang, X., Tamot, B., Hiser, C., Reid, G.E., Benning, C. a Ferguson-Miller, S. 2011. "Cardiolipin-deficiency in *Rhodobacter sphaeroides* alters the lipid profile of membranes and of crystallized cytochrome oxidase, but structure and function are maintained." *Biochemistry* 50 (19): 3879–90.

Internetové zdroje:

SZÚ, *Výskyt vybraných infekcí v České republice hlášených v letech 2009-2018*, [online], 2019 [cit. 28.4.2019], Dostupné zde: <http://www.szu.cz/publikace/data/2018/vyskyt-vybranych-infekci-v-ceske-republice-hlasenych-v>