

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie

Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Dominik Pinkas**

Vliv lipidového složení membrány na odolnost vůči surfaktinu

Effect of membrane lipid composition on resistance against surfactin

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Gabriela Seydlová, Ph.D.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

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

V Praze, 14. 08. 2015

.....

Děkuji své školitelce RNDr. Gabriele Seydlové, Ph.D. za vedení této práce, za teoretickou i praktickou pomoc při její realizaci a za trpělivost, kterou při tom prokázala.

Děkuji RNDr. Radovanu Fišerovi, Ph.D. za odbornou pomoc při optimalizaci používaných metod a zpracování dat.

Děkuji Lucii Jánské, bez jejíž podpory a pomoci by nebyly experimenty realizovatelné.

Děkuji celému kolektivu pracovní skupiny Fyziologie bakterií za rady, připomínky a možnost učit se od zkušenějších a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji i všem ostatním, kteří přispěli podporou, radou nebo doporučením.

Tato práce vznikala v letech 2012 – 2015 za přispění grantového projektu GAČR 13-18051P.

## Abstrakt

Surfaktin je antibiotikum produkované některými kmeny *B. subtilis*. Jeho široká škála biologických aktivit, zajímavá jak z hlediska medicínského, potravinářského či environmentálního, je založená na povrchové aktivitě a na interakci s cytoplazmatickými membránami. V těch je surfaktin schopen tvořit iontové kanály, póry a se vzrůstající koncentrací je úplně dezintegrovat detergentním mechanismem. Mechanismus rezistence producenta vůči vlastnímu produktu není zatím zcela objasněný. Tato práce ukazuje, že by se mohla odehrávat na úrovni změny zásahového místa – lipidového složení membrány. Metodou BLM bylo na membránách všech testovaných složení zaznamenáno široké spektrum kanálů s velkým rozdílem vodivosti v rozpětí větším než 2 pS až 2 nS. Měřením úniku karboxyfluoresceinu z lipozómů bylo rozlišeno několik distinktních mechanismů lyze surfaktinem lišících se kooperativitou, rychlostí průběhu i mírou účinnosti. Dále bylo zjištěno, že zejména nárůst koncentrace aniontových fosfolipidů s kónickou geometrií – kardiolipinu a kyseliny fosfatidové vede ke zvýšené odolnosti membrán vůči permeabilizačnímu účinku surfaktinu.

Klíčová slova:

membrána, surfaktin, *Bacillus subtilis*, kardiolipin, černé lipidické membrány, lipozómy

## Abstract

Surfactin is an antibiotic produced by several strains of *B. subtilis*. Its broad range of biological activities is interesting from perspective of medicine, food industry and bioremediation and is based on its surface-active properties and interaction with biological membranes. The latter means mainly forming ion channels, conductive pores and with increasing concentration eventually disrupting membrane structure in detergent-like manner. Mechanism of resistance of producing strain against its own toxic product is not yet fully understood. This work shows that it could be based on surfactin target modification – which means altering membrane lipid composition. We were able to recognize surfactin-formed ion channels or pores with a broad range of conductivities spanning from 2 pS to 2 nS using BLM method. Liposome leakage assay with carboxyfluorescein revealed few distinct mechanisms of lysis, differing in amplitude, rate of lysis and cooperativity. Increased content of anionic lipids with conical shape, namely cardiolipin and phosphatidic acid led to substantial increased membrane resistance to surfactin-induced permeabilization.

Key words:

membrane, surfactin, *Bacillus subtilis*, cardiolipin, black lipid membranes, liposomes

## Obsah

1. Úvod.....	10
2. Literární přehled .....	11
2.1 Struktura biologické membrány .....	11
3.1.1 Membránové fosfolipidy .....	12
2.1.2 Fyzikální vlastnosti lipidických membrán .....	18
2.2 Pórovité látky .....	20
2.2.1 Monomerní póry.....	21
2.2.2 Oligomerní póry.....	22
2.2.3 Povrchově aktivní látky.....	23
2.3 Surfactin.....	24
2.3.1 Struktura a syntéza surfaktinu.....	24
2.3.2 Fyzikální vlastnosti surfaktinu.....	27
2.3.3 Interakce surfaktinu s membránou .....	27
2.3.4 Adaptace <i>B. subtilis</i> na přítomnost surfaktinu .....	30
3. Cíle práce .....	33
4. Materiál a metody .....	34
4.1 Bakteriální kmeny .....	34
4.2 Kultivační půdy .....	34
4.2.1 Živný agar.....	34
4.2.2 Živné médium .....	35
4.2.3 Sporulační agar .....	35
4.3 Sterilizace.....	36
4.4 Příprava spórových konzerv .....	36
4.5 Kultivace bakteriálních kultur .....	36
4.6 Izolace cytoplazmatických membrán .....	37
4.7 Izolace lipidů .....	38
4.8 Stanovení koncentrace fosfátu v suspenzi lipozómů .....	39
4.9 Stanovení koncentrace membránových proteinů.....	41
4.10 Černé lipidické membrány.....	43
4.11 Únik fluorescenční sondy z lipozómů .....	46
4.12 Stanovení ustálené anizotropie fluorescence .....	49

4.13 Seznam použitých fosfolipidů.....	51
5 Výsledky.....	53
5.1 Sledování elektrické vodivosti membrán pomocí metody BLM.....	53
5.1.1 Pórotvorná aktivita surfaktinu rozpuštěného v DMSO .....	53
5.1.2 Pórotvorná aktivita surfaktinu rozpuštěného ve vodném roztoku.....	55
5.1.3 Vliv složení lipidů membrány na velikost a distribuci kanálů tvořených surfaktinem .....	58
5.2 Únik fluorescenční sondy z lipozómů .....	61
5.2.1 Výběr nosičového systému pro testované fosfolipidy .....	61
5.2.2 Vliv jednotlivých fosfolipidových tříd na odolnost lipozómů vůči lyzi surfaktinem .....	65
5.2.3 Lipidy izolované z kultur <i>B. subtilis</i> .....	69
5.2.3.1 Účinnost lyze lipozómů připravených z lipidů izolovaných z <i>B. subtilis</i> deficientním v syntéze kardiolipinu .....	69
5.2.3.2 Účinnost lyze lipozómů vytvořených z lipidů izolovaných z kultur <i>B. subtilis</i> produkujícího surfaktin .....	71
5.2.4 Lipidové směsi napodobující membránu <i>B. subtilis</i> .....	73
5.3 Stanovení ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH.....	75
5.3.1 $r_{ss}$ DPH a TMA-DPH v izolovaných membránách .....	75
5.3.2 $r_{ss}$ DPH a TMA-DPH v izolované lipidické frakci membrán .....	77
6. Diskuze.....	79
7. Souhrn.....	87
8. Seznam použité literatury.....	88

## Seznam zkratek

Asp	kyselina asparagová
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	kyselina bicinchoninová
BLM	černé lipidické membrány
BSA	hovězí sérový albumin
CMC	kritická micelární koncentrace
DPH	1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien
DPhPC	difytanoylfosfatidylcholin
DPhPE	difytanoylfosfatidyletanolamin
DPhPG	difytanoylfosfatidylglycerol
DPPA	kyselina dipalmitoylfosfatidová
DPPE	dipalmitoylfosfatidyletanolamin
DPPG	dipalmitoylfosfatidylglycerol
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
D-Leu	D forma optického izomeru leucinu
Glu	glutamin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
kDa	kilodalton
LC-MS	kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
Leu	leucin
lysyl PG	lysylfosfatidylglycerol
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NRPS	neribozomální proteosyntáza
PA	kyselina fosfatidová
PC	fosfatidylcholin
PCP	peptid přenášející protein
PE	fosfatidyletanolamin
PG	fosfatidylglycerol



PMSF	fenyl-metyl-sulfonylfluorid
PS	fosfatidylserin
$r_{ss}$	ustálená anizotropie fluorescence
TMA-DPH	(1-(4-trimetylammoniumfenyl)-6-fenyl-1,3,5-hexatrien
$T_m$	teplota tání (teplota přechodu z gelové fáze do fáze tekutého krystalu)
TMCL	tetramyristoylkardiolipin
Val	valin

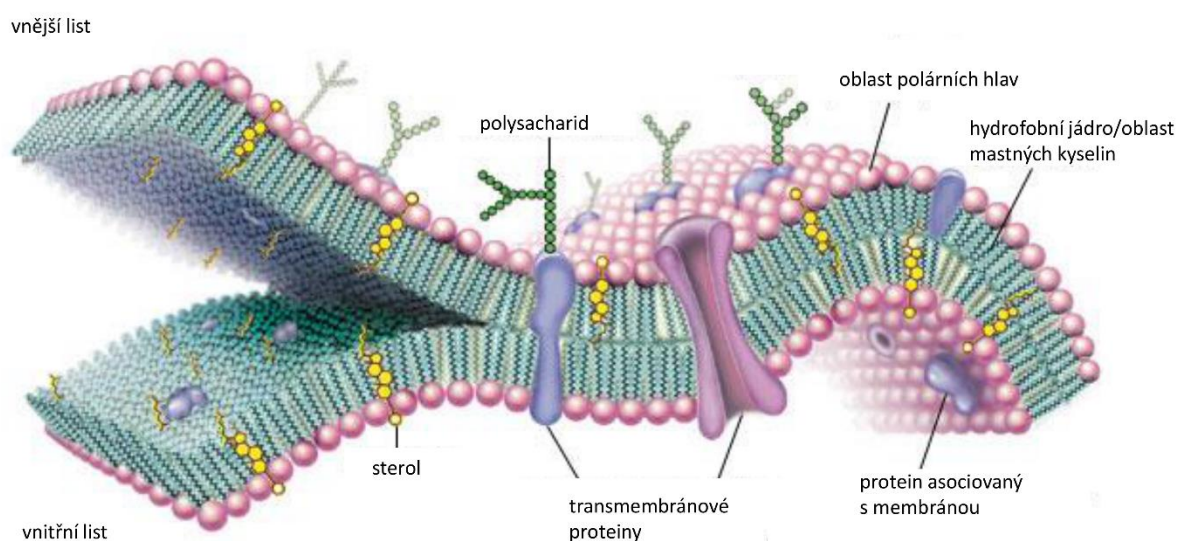
## 1. Úvod

Surfaktin je látka, která je kvůli svým bohatým biologickým účinkům založeným na její interakci s lipidickými membránami předmětem intenzivního výzkumu. Jedna z oblastí výzkumu je podnícena vzestupem rezistencí bakterií vůči stávajícím antibiotikům, jejichž výskyt je ještě umocňován nadužíváním a nesprávným používáním antibiotik v humánní i veterinární medicíně. Je proto nutné hledat nová zásahová místa a nové účinné látky působící i proti multirezistentním patogenům, nejlépe takové, které svou strukturou a mechanismem účinku znesnadňují vývoj rezistence. Případem takových látek by mohly být pórtvorné lipopeptidy, mezi které patří kromě naší laboratoří zkoumaného surfaktinu např. již v klinické praxi používaný daptomycin (Cubicin®). Zásahovým místem těchto látek je cytoplazmatická membrána, esenciální buněčná struktura, která tvoří polopropustnou bariéru ohraničující buňku a zároveň poskytuje optimální prostředí pro membránové proteiny. Vzhledem k nepostradatelnosti a ke komplexnosti jak funkce tak složení membrány se předpokládá, že by měl vznik rezistence proti látce narušující membránu být obtížnější než například jedna bodová mutace, která změní aktivní místo konkrétního enzymu blokováného konvenčním antibiotikem. K posouzení náročnosti vzniku takovéto rezistence může přispět poznání mechanismu, který vůči vlastnímu toxickému produktu uplatňuje sám producent. Tento mechanismus na úrovni zásahového místa surfaktinu, tj. lipidové složky cytoplazmatické membrány, se v předkládané práci pokusíme alespoň částečně objasnit.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Struktura biologické membrány

Základem biologických membrán je lipidová dvojvrstva, ve které jsou jednotlivé molekuly lipidů laterálně pohyblivé v rámci svého listu (Singer and Nicolson 1972). Tato struktura je zcela esenciální pro samotnou definici života – odděluje vnitřní prostředí od vnějšího. Jsou to právě membránové lipidy, které zajišťují energetickou i materiální izolaci vnitřního prostředí buňky. Membránové nebo s membránou asociované proteiny naproti tomu zajišťují selektivní propustnost, energetický metabolismus, signální a enzymatické funkce (Obr. 2.1). Tyto dvě složky membrány není možné funkčně oddělit. Proteiny fungují mimo jiné jako určité lešení pro lipidy, upravují jejich mobilitu a uspořádání, lipidy zase vytvářejí optimální prostředí pro aktivitu proteinů správnou fluiditou, nábojem a geometrií, případně se dokonce podílí na struktuře proteinu (Jensen and Mouritsen 2004; Janmey and Kinnunen 2006; Brown 2012).



**Obr. 2.1 Struktura biologické membrány**

Upraveno z *Encyclopaedia Britannica* <http://www.britannica.com/science/membrane-biology>

Lipidová dvojvrstva není homogenní, a to ani ve vertikálním (rozdílné složení obou listů), ani laterálním (membránové rafty a mikrodomény) směru. U savčích buněk se například ve vnějším listu nenachází žádné záporně nabitě fosfolipidy, protože takové buňky jsou imunitním systémem rozpoznávány jako poškozené či apoptotické buňky nebo cizí tělesa a

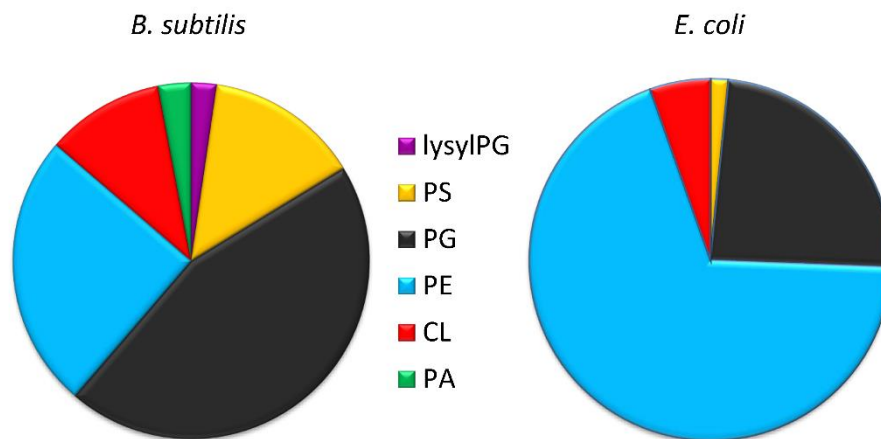
eliminovány. Této asymetrie je docíleno aktivním přesouváním lipidů mezi oběma listy pomocí specifických enzymů flipáz a flopáz (Beveris et al. 1999). Díky tomuto rozdílu mezi zdravými těly vlastními buňkami a bakteriemi, jejichž membrány často nesou negativní náboj, mohou antimikrobiální peptidy a lipopeptidy cílící cytoplazmatickou membránu snadno diskriminovat mezi membránou savčí buňky a membránou bakterií. I v rámci každého listu existují nehomogenity. Kvůli omezené vzájemné mísitelnosti fosfolipidů s různými polárními hlavami i mastnými kyselinami mohou samovolně vznikat segregované domény obohacené o konkrétní fosfolipid. Transmembránové proteiny kolem sebe rekrutují lipidy, které svojí délkou odpovídají konkrétní šířce hydrofobní oblasti proteinu, kladně nabitě proteiny přitahují záporně nabitě lipidy, které neutralizují jejich náboj, v místech ohybu membrány (póly buňky, dělicí septa) se zvyšuje podíl kónických lipidů (Jensen and Mouritsen 2004; Epanand and Epanand 2009).

### 3.1.1 Membránové fosfolipidy

Nejhojněji zastoupenou formou membránových lipidů jsou glycerofosfolipidy. Tyto molekuly se skládají z glycerolu, na jehož dvou hydroxylových skupinách jsou esterovou vazbou navázány mastné kyseliny a na třetí zbytek kyseliny fosforečné nesoucí další případné substituenty (glycerol, etanolamin atd.). Fosfátová „hlavička“ tvoří hydrofilní část molekuly, zatímco mastné kyseliny představují hydrofobní „ocásek“. Ve vodném prostředí fosfolipidy samovolně tvoří micely (lipidy tvaru obráceného kuželu – velká hlava, malý ocásek), planární dvojrstevné struktury (válcovité lipidy) nebo hexagonální případně trubcovité struktury (kónické lipidy).

Zastoupení jednotlivých typů membránových fosfolipidů, které se liší tvarem, nábojem i geometrií, hraje zásadní roli ve funkci membrány a v adaptaci membrány na výkyvy vnějšího prostředí v globálním (celá membrána) měřítku, ale i lokálním měřítku v odpovědi na stres (ohyby, lokální porušení integrity atd.). Složení lipidů se také velmi liší mezi jednotlivými bakteriálními druhy, a to co se týče typů polárních hlav i délky a typu mastných kyselin. Na Obr. 2.2 je graf porovnávající fosfolipidové složení membrán dvou modelových bakterií – *B. subtilis* a *E. coli*.

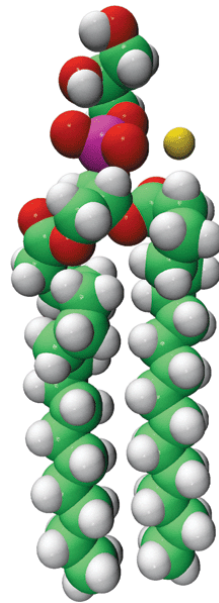
Bakterie se na rozdíl od vyšších organismů musí potýkat s daleko větším rozsahem změn podmínek vnějšího prostředí (teplota, salinita, osmolarita, pH) a přesto zachovat integritu membrány i její schopnost poskytovat optimální podmínky pro funkci membránových proteinů. Proto i jejich nástroje pro adaptaci membrány na vnější podmínky musí být verzatilnější (Ingram 1976; Suutari and Laakso 1994; Brown et al. 1997).



**Obr. 2.2 Relativní zastoupení fosfolipidů v membránách *B. subtilis* a *E. coli***

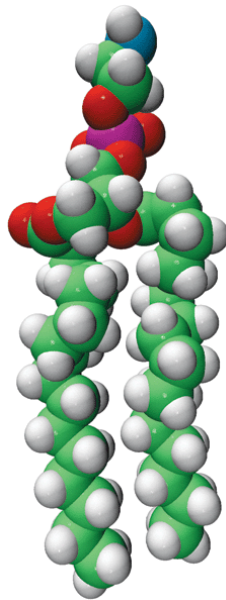
Graf ukazuje zastoupení jednotlivých typů polárních hlav fosfolipidů v membránách exponenciálně rostoucích kultur *B. subtilis* (vlevo) a *E. coli* (vpravo). (Seydlová and Svobodová 2008, G. Seydlová, nepublikovaná data)

**Fosfatidylglycerol** je majoritním fosfolipidem *Bacillus subtilis*, je to fosfolipid válcovitého tvaru nesoucí negativní náboj (Obr. 2.3). Slouží také jako prekurzor pro syntézu kardiolipinu. Byla prokázána role fosfatidylglycerolu při regulaci iniciace replikace (Boeneman and Crooke 2005). Přítomnost fosfatidylglycerolu v membráně je esenciální například pro fungování SecA dependentní transportní dráhy (Kusters et al. 1994) a klíčová pro transport elektronů při fotosyntéze (Wada and Murata 2007). V neposlední řadě interakce s fosfatidylglycerolem spouští oligomerizaci lipopeptidového antibiotika daptomycinu, která je esenciální pro jeho antimikrobiální působení (Muraih et al. 2012).



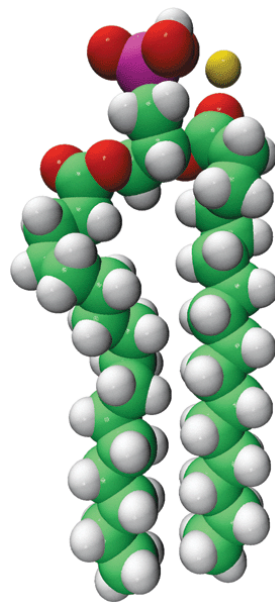
**Obr. 2.3 Dipalmitoylfosfatidylglycerol – DPPG**  
Převzato z [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)

**Fosfatidyletanolamin** je kónický fosfolipid nesoucí jeden kladný a jeden záporný náboj (Obr. 2.4), ochotně tvoří hexagonální fázi, je nejvíce zastoupeným lipidem v bakteriálních membránách, kde svým obojakým charakterem snižuje hustotu jejich negativního náboje. Účastní se tvorby septa při dělení bakteriální buňky, kde je jeho přesun do vnějšího listu membrány nezbytný pro rozpad FtsZ prstence a dokončení dělení (Emoto and Umeda 2001). Dalším na fosfatidyletanolaminu závislým procesem je balení membránové laktóza-permeázy do správné funkční konformace, fosfatidyletanolamin zde funguje jako lipidický chaperon (Bogdanov and Dowhan 1999).



**Obr. 2.4 Dipalmitoylfosfatidyletanolamin – DPPE**  
*Převzato z [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)*

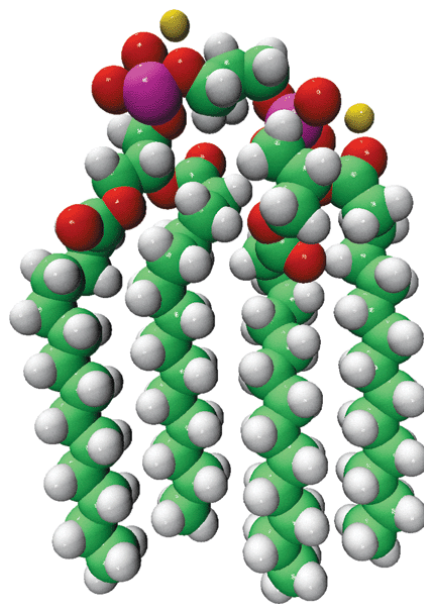
**Kyselina fosfatidová** je kónický lipid s jedním negativním nábojem (Obr. 2.5). Nese nejmenší polární hlavu – fosfát bez dalšího substituentu, slouží mj. jako prekurzor pro syntézu dalších fosfolipidů (Athenstaedt and Daum 1999). Má velkou preferenci pro tvorbu tzv. hexagonální fáze – struktury, ve které lipidy tvoří „trubičky“ s polárními hlavami uvnitř a alifatickými řetězci směřujícími ven. Její koncentrace v membráně výrazně stoupá při vystavení exponenciálně rostoucích buněk *B. subtilis* působení subletální koncentrace surfaktinu (Sklenářová 2014). Jejím negativním nábojem může buňka regulovat celkový negativní náboj membrány, který je esenciální pro fungování buňky (Janmey and Kinnunen 2006).



**Obr. 2.5 Kyselina dipalmitoylfosfatidová – DPPA**  
Převzato z [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)

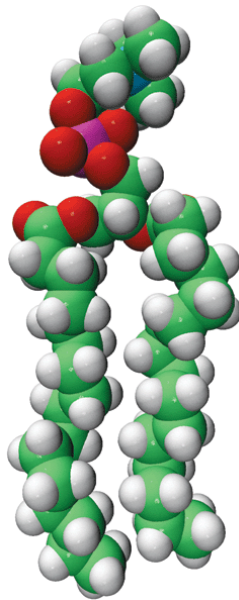


**Kardiolipin** je velký kónický fosfolipid vznikající kondenzací dvou molekul fosfatidylglycerolu (Obr. 2.6). Nese dva negativní náboje a čtyři mastné kyseliny. Významně rigidizuje membránu, ale z jeho fázového diagramu je možné odečíst více fázových přechodů, hlavní při 40 °C a další při 23 a 10 °C (platí pro tetramyristoylkardiolipin). To znamená, že kardiolipin sám o sobě netvoří dobře definovanou tekutou a gelovou fázi jako jednodušší lipidy (Zander et al. 2012). Kardiolipin má silnou preferenci pro tvorbu hexagonální fáze, toto chování je závislé na koncentraci a typu přítomných dvojmocných kationtů (Ortiz et al. 1999). Název kardiolipin dostal podle toho, že byl poprvé objeven v lipidovém izolátu z hovězích srdcí (Pangborn 1942). Jeho obsah v bakteriálních membránách zpravidla roste například při osmotickém stresu (Romantsov et al. 2009) nebo v případě *B. subtilis* při vystavení působení surfaktinu (Seydlova et al. 2013). Je také důležitým faktorem v odolnosti *B. subtilis* vůči vysoké salinitě (Lopez et al. 2006).



**Obr. 2.6 Tetramyristoylkardiolipin**  
Převzato z [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)

**Fosfatidylcholin** je válcovitý fosfolipid nesoucí jeden kladný a jeden záporný náboj (Obr. 2.7). Je bohatě zastoupený v eukaryotních membránách, v bakteriích se však prakticky nevyskytuje. Je hlavní složkou plicního surfaktantu (Creuwels et al. 1997). V této práci je používán jako nosičový lipid pro tvorbu modelových membrán.



**Obr. 2.7 Dipalmitoylfosfatidylcholin**  
Převzato z [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)

### 2.1.2 Fyzikální vlastnosti lipidických membrán

Fosfolipidová dvojvrstva je velmi účinný elektrický izolant. Tato vlastnost je stěžejní pro udržení transmembránového elektrochemického potenciálu, který je primární formou buněčné energie. V případě otevření iontového kanálu, případně narušení membrány pórotvornou látkou tato vodivost narůstá o několik řádů (Mueller et al. 1962).

Aby si membrána zachovala bariérovou funkci a poskytovala vhodné prostředí membránovým proteinům, musí být lipidy pohyblivé. Pohyblivost je dána tekutostí membrány neboli fluiditou a je závislá na složení membrány a teplotě. Pro každý lipid je charakteristická teplota, kdy přechází z gelové do fluidní fáze (teplota fázového přechodu,  $T_m$ ). Optimální podmínky jsou takové, ve kterých je membrána nad teplotou fázového přechodu a je zachována její plasticita, schopnost reagovat na mechanický stres, a pohyblivost membránových proteinů. V případě změny teploty musí buňka reagovat změnou složení

membrány. Na fluiditu má vliv zastoupení jednotlivých typů polárních hlav a zejména typ a délka mastných kyselin. Příklady  $T_m$  v závislosti na konkrétním typu polární hlavičky a mastných kyselinách fosfolipidu jsou uvedeny v Tab. 2.1, resp. Tab. 2.2.

**Tab. 2.1 Teploty fázového přechodu podle typu polární hlavy**

Fosfolipidová hlava *	PG	PE	PA	PC
Teplota fázového přechodu (°C)	41	63	65	41

\* esterifikovaná dvěma palmitovými mastnými kyselinami  
(Silvius 1982) podle Avanti Polar Lipids

**Tab. 2.2 Teploty fázového přechodu fosfatidylglycerolu podle typu mastné kyseliny**

Mastná kyselina*	14:0	16:0	18:0	18:1
Teplota fázového přechodu (°C)	23	41	55	-18

\* První číslo udává počet uhlíkových atomů, druhé počet dvojných vazeb  
(Silvius 1982) podle Avanti Polar Lipids

Z Tab. 2.2 je možné vyčíst, že rostoucí délka alifatického řetězce mastné kyseliny zvyšuje teplotu přechodu mezi fluidní a gelovou fází – rigidizační efekt. Přítomnost dvojných vazeb ale teplotu fázového přechodu výrazně snižuje. Na rigidizaci membrány způsobenou snížením teploty je možné reagovat upravením de novo syntézy mastných kyselin (*E. coli*) nebo využití aktivity enzymů zvaných desaturázy (*B. subtilis*), které do řetězců mastných kyselin stávajících membránových lipidů zavádějí dvojně vazby, čímž membránu fluidizují a adaptují ji na nové podmínky (Phadtare 2004). Jinou variantou modifikace mastných kyselin, která taktéž vede ke fluidizaci membrány, i když výrazně slabší než v případě nenasycených alifatických řetězců, jsou větvené iso- a anteiso- řetězce, které se hojně vyskytují například v membránách *B. subtilis* (Kaneda 1977).

V neposlední řadě jsou významným faktorem fyzikálních vlastností membrán její mechanické vlastnosti. Různé fosfolipidy mají preferenci pro různé zakřivení membrány. Kónické lipidy (malá hlavička) mají tendenci svůj list ohýbat konvexně, lipidy s tvarem obráceného kónusu (velká hlavička) naopak konkávně, lipidy válcovité geometrie tvoří planární dvojvrstvu. Vzhledem k nezbytnému zakřivení buněčné membrány ohraničující

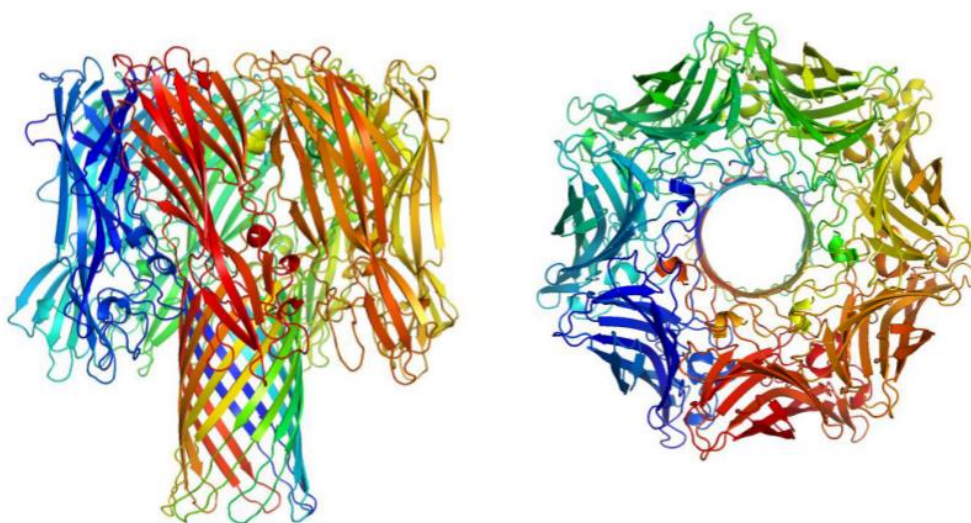
přibližně kulovitý prostor může být asymetrické rozložení fosfolipidů v obou listech membrány energeticky výhodnější, než by bylo homogenní. Na základě různé geometrie, náboje a vzájemné mísitelnosti také lipidy v membránách vytvářejí mikrodomény se složením a vlastnostmi odlišnými od okolní membrány. Tyto domény také obsahují konkrétní membránové proteiny, nebo se samovolně tvoří kolem specifických proteinů s afinitou ke konkrétním fosfolipidům (Jensen and Mouritsen 2004). Pnutí způsobené snahou lipidů ohýbat membránu nebo rozdílem osmolarity vnitřního a vnějšího prostředí může mít zásadní vliv na funkci proteinů, jak bylo demonstrováno například na mechanosenzitivním kanálu MscL z *E. coli* (Perozo et al. 2002). I zakřivení membrány způsobené kulovitostí buňky má velký regulační potenciál. Například konvexnost membrány na pólech hraje zásadní roli při lokalizaci proteinu buněčného dělení DivIVA (Ramamurthi and Losick 2009). Naopak membrána endospory je jedinou konkávní membránou uvnitř buňky a je díky tomu rozpoznávána proteinem SpoVM (Ramamurthi et al. 2009).

## 2.2 Pórotvorné látky

Vzhledem k naprosté nepostradatelnosti membrány coby bariéry a centra mnoha enzymatických a signalizačních drah je tato struktura zjevným cílem látek interferujících se životaschopností buňky. Patří sem látky eukaryotního původu určené proti vlastním poškozeným buňkám, nebo proti mikroorganismům, ale i látky produkované mikroorganismy určené k efektivnímu napadení hostitele (toxiny), nebo k vnitro- a mezidruhovému boji, či látky uměle vytvořené člověkem pomocí metod organické syntézy. Většinou se jedná o různě velké molekuly (od dipeptidu bacilylinu až po více než 100 kDa veliké kolicíny) peptidické či proteinové povahy, ale patří sem i glykolipidy, glykopeptidy, polyketidy či lipopeptidy. Pro účely této práce jsou tyto rozmanité látky rozděleny podle struktury pórů, které vytvářejí, na monomerní, které jsou schopné samostatně vytvořit vodivý pór za účasti pouze jedné molekuly, oligomerní, které pór tvoří z pevně nebo přibližně daného počtu podjednotek, a nakonec povrchově aktivní látky, jejichž mechanismus účinku je komplexnější a obtížněji popsatelný.

### 2.2.1 Monomerní póry

Monomerní pórtovorné látky jsou výhradně velké proteiny, které po zabudování do membrány vytvoří vodivý kanál skrz vlastní strukturu, ze všech stran ohraničený touto jednou molekulou. Příkladem může být alfa-toxin (Obr. 2.8) *Staphylococcus aureus*, jinak nazývaný alfa-hemolyzin, který je hlavním cytotoxickým agens této bakterie (Bhakdi and Tranum-Jensen 1991). Alfa-toxin vytváří jeden ostře ohraničený  $\beta$ -barelový pór, který je z vnějšku hydrofobní tak, aby měl afinitu k membráně, a uvnitř hydrofilní, aby byl propustný pro ve vodě rozpustné ionty. Průměr tohoto póru je v nejužším bodě 14 Å (Song et al. 1996). Vodivost všech kanálů vytvořených touto látkou za stejných podmínek bude s malou odchylkou stejná, protože  $\beta$ -barelová struktura umožní jen omezenou variabilitu. Na základě této uniformity byly dokonce navrženy nové analytické metody – jsou založené na snížení vodivosti póru blokováním procházející molekulou, které může pro danou molekulu být specifické. Příkladem je řetězec DNA, jehož sekvence se dá určit ze záznamu vodivosti pořízeného při jeho průchodu pórem (Howorka et al. 2001).

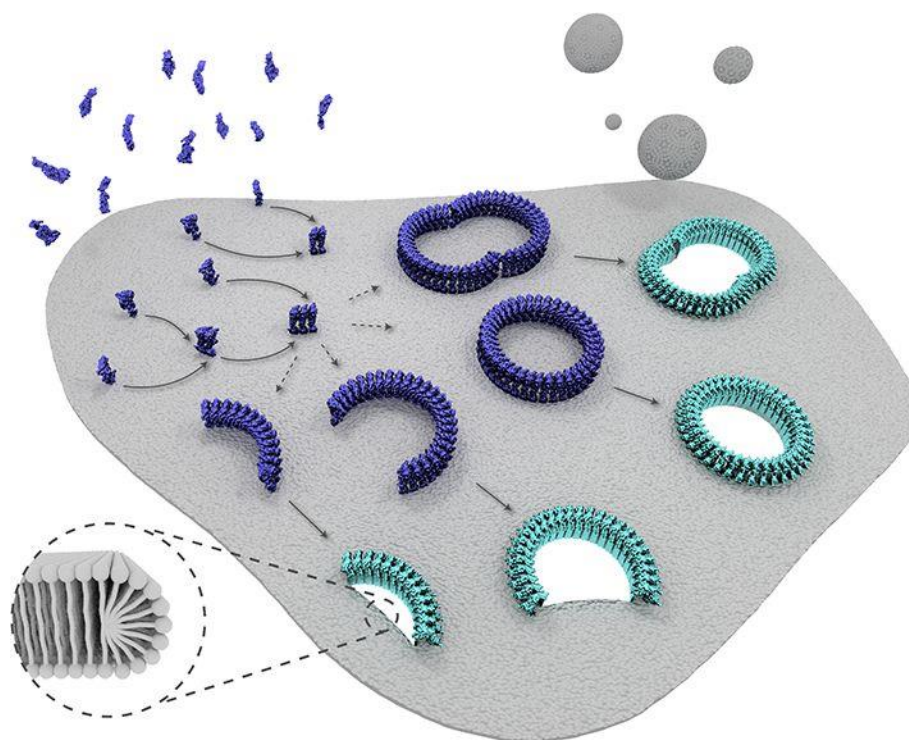


**Obr. 2.8 Alfa-toxin *Staphylococcus aureus***

Vlevo pohled z boku a vpravo pohled shora na 3D strukturu alfa-toxinu. Skrz membránu prochází  $\beta$ -barelový pór. Podle struktury určené (Song et al. 1996).

### 2.2.2 Oligomerní póry

Jiným způsobem tvorby póru je spojení několika molekul zanořených do membrány. Může se dokonce jednat o několik různých proteinů, jako v případě lidského komplementového systému – soustavy sérových proteinů účastnících se humorální imunitní odpovědi. Pokud komplement rozpozná cílovou membránu, inkorporují se do ní postupně jeho součásti a pokud není děj zastaven obrannými mechanismy, vyústí ve vytvoření póru z podjednotky C5b, C8 a neurčitého počtu C9. Velikost takto vzniklého póru závisí na stechiometrii a může značně oscilovat (Esser 1994). Dalším příkladem může být suilysin – cytolyzin produkovaný *Staphylococcus suis*, který tvoří homomultimerní póry. Zajímavé je, že pro vytvoření vodivého póru zřejmě nemusí být kruh ohraničující budoucí pór uzavřený (Obr. 2.9). Takovéto látky budou produkovat velké rozpětí vodivostí v závislosti na typu a uspořádání konkrétního komplexu (Leung et al. 2014).

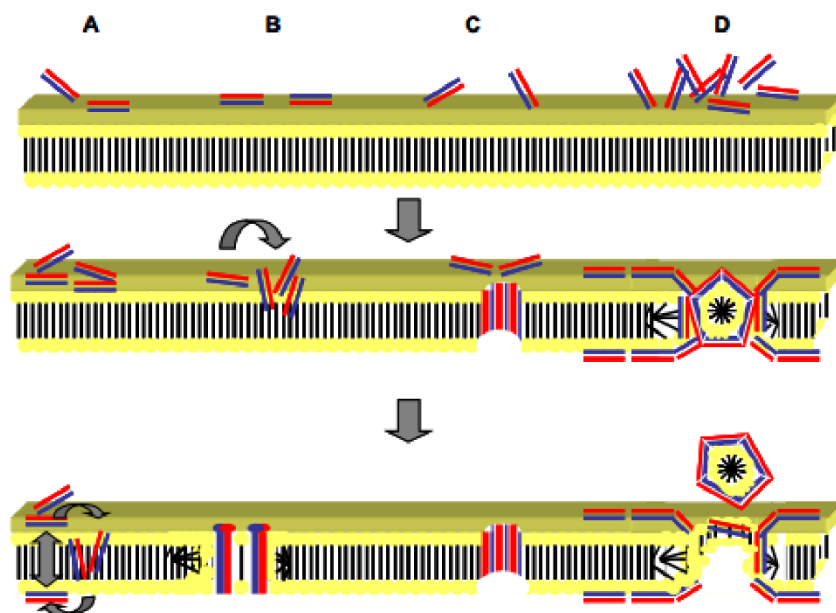


**Obr. 2.9 Póry tvořené suilysinem**

Na obrázku jsou různé varianty perforace membrány suilysinem. V detailu vlevo dole je vidět okraj lipidové dvojvrstvy v neuzavřeném póru. Převzato z (Leung et al. 2014).

### 2.2.3 Povrchově aktivní látky

Poslední skupina, do které je zahrnut i surfaktin produkovaný *B. subtilis*, jímž se tato práce zabývá, je tvořena zejména relativně malými amfipatickými molekulami peptidické i nepeptidické povahy. Ty mohou plnit více funkcí, než jen destruovat membrány. Destrukce membrány dokonce nemusí vždy být původní primární efekt dané molekuly. Například surfaktin u *B. subtilis* hraje roli i v quorum-sensing a motilitě (Debois et al. 2008; Lopez and Kolter 2010). Rhamnolipidy produkované bakteriemi rodu *Pseudomonas* mohou kromě potlačování konkurenčních mikroorganismů sloužit i k solubilizaci hydrofobních živin (Maier and Soberon-Chavez 2000; Abalos et al. 2001). Jsou zkoumány i synteticky připravené pórotvorné látky amfipatického charakteru, jako například lipofosfonoxiny, které vykazují slibné antimikrobiální aktivity a jejich modulární stavba poskytuje prostor pro cílené modifikace (Rejman et al. 2011). Mechanizmy účinku těchto látek jsou rozmanité a póry jimi tvořené jsou dynamické s velkým rozptylem vlastností (Koller and Lohner 2014). Pro různé zástupce této pestré skupiny jsou navrženy různé mechanismy účinku – příklady těch nejběžnějších jsou zobrazeny na Obr. 2.10.



**Obr. 2.10 Navrhované mechanismy permeabilizace membrány**

Mechanismy účinku jsou znázorněny na příkladu alfa-helikálních antimikrobiálních peptidů. (A) „Agregát“, (B) „Toroidní pór“, (C) „Barrel-stave“, (D) „Detergent“. Převzato z (Laverty et al. 2011).

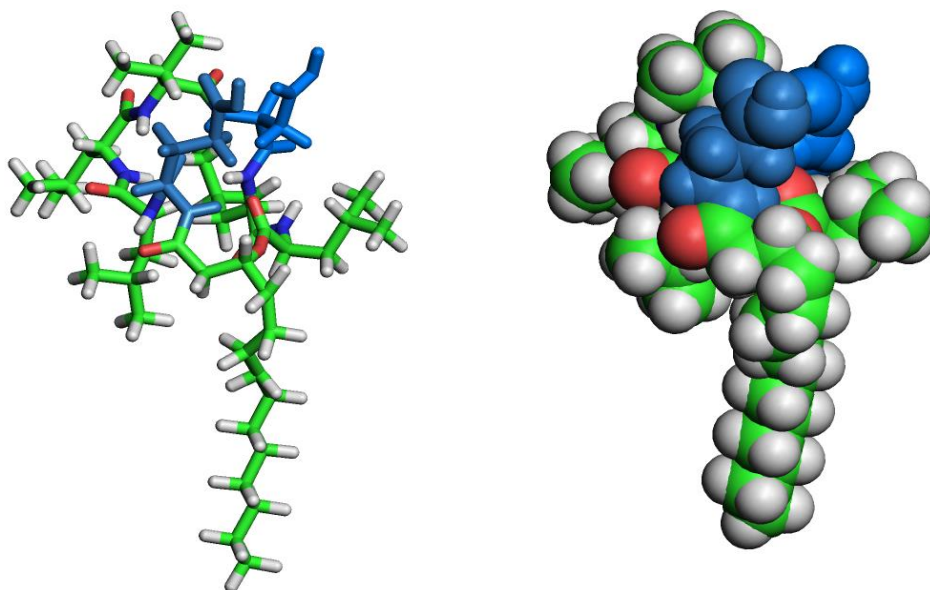
Agregát účinné látky vytvořený v membráně nemusí zaujímat konkrétní definovanou strukturu, aby narušil bariérovou funkci membrány – jeho přítomnost může lipidům lokálně vnutit jinou než dvojvrstevnou strukturu a tím porušit bariérovou funkci membrány. Povrchově aktivní látky s tvarem obráceného kužele mohou vytvořit toroidní pór, ve kterém za účasti fosfolipidů stabilizují hydrofobní okraje dvojvrstvy. Model „barrel stave“ předpokládá, že aktivní molekuly jsou dost velké, aby procházely celou šířkou membrány a vytvořily pór ohraničený pouze takovýmto komplexem obdobně jako u látek tvořících oligomerní póry. Detergentní mechanismus účinku vede k úplné destrukci membránové struktury a k tvorbě smíšených micel (Laverty et al. 2011). Jedna účinná látka může uplatňovat i více různých mechanismů účinku v závislosti na své koncentraci a složení cílové membrány. Vzhledem k tomu, že agregace účinné látky v membráně je do značné míry závislá na mísitelnosti dané látky s membránovými lipidy, může lipidové složení cílové membrány hrát zcela zásadní roli v její účinnosti (Epanand et al. 2007; Nazari et al. 2012; Teixeira et al. 2012).

## 2.3 Surfaktin

### 2.3.1 Struktura a syntéza surfaktinu

Surfaktin je cyklický lipoheptapeptid poprvé izolovaný v roce 1968 jako látka inhibující tvorbu krevních sraženin a lyzující buňky některých bakteriálních kmenů (Arima et al. 1968). O rok později byla sekvenována peptidická část surfaktinu (Glu, Leu, D-Leu, Val, Asp, D-Leu, Leu) (Kakinuma et al. 1969b) a předpovězena jeho struktura coby cyklické molekuly tvořící makrolaktonový kruh (Kakinuma et al. 1969a). Trojrozměrná struktura (Obr. 2.11) byla určena pomocí nukleární magnetické rezonance (Tsan et al. 2007) a je možné na ní rozpoznat hydrofobní část tvořenou mastnou kyselinou a valinovými a leucinovými zbytky, zatímco glutamát a aspartát tvořící hydrofilní doménu.

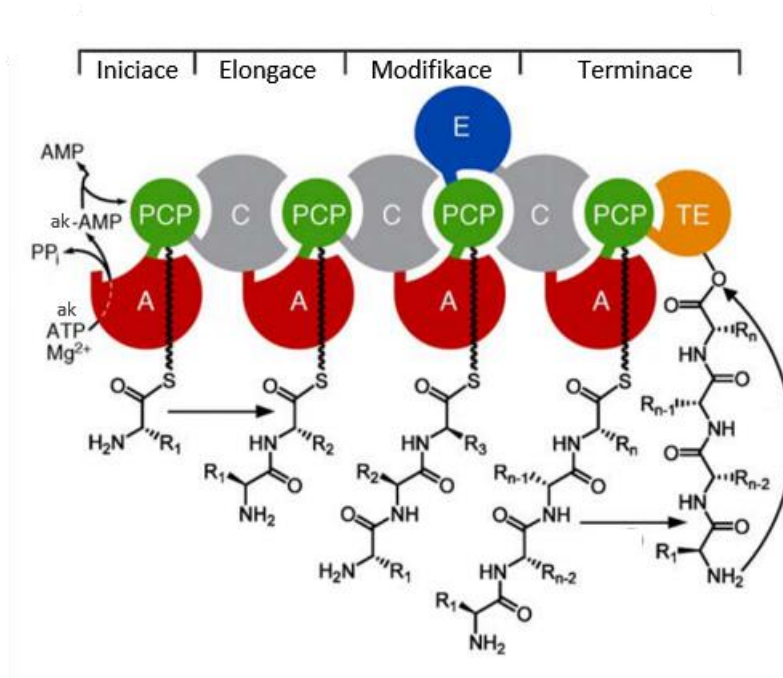




**Obr 2.11 Trojrozměrná struktura surfaktinu**

*Modře je zobrazena hydrofilní doména tvořená glutamátem a aspartátem.*

Surfaktin je produkován neribozomálně. Místo translace na ribozomech podle sekvence mRNA probíhá syntéza bez templátu na velkých (až 10 000 kDa) multienzymatických komplexech známých jako neribozomální proteosyntázy (NRPS), které jsou příbuzné komplexům syntetizujícím mastné kyseliny nebo polyketidy. Jejich stavba je modulární – přenašečové proteiny (peptide carrier protein, PCP) posouvají vznikající produkt mezi jednotlivými katalytickými podjednotkami nebo doménami, které mohou být modifikovány nebo zaměněny. Tento způsob syntézy umožňuje do peptidového řetězce zařazovat i jiné stavební kameny než 20 kánonických L-aminokyselin jako jsou například D-aminokyseliny, nestandardní aminokyseliny nebo i neaminokyselinové molekuly. Na některých podjednotkách mohou probíhat také jiné než kondenzační aktivity vedoucí k modifikacím. Na konci syntetické linky je produkt od přenašeče odstřižen prostou hydrolýzou nebo, jako v případě surfaktinu, je posledním krokem syntézy cyklizace (Obr. 2.12). Tímto způsobem je kromě surfaktinu syntetizováno i mnoho jiných látek, mezi nimi i významná antibiotika, antifungální a antitumorová terapeutika (Walsh 2008; Strieker and Marahiel 2009).



**Obr 2.12 Schéma neribozomální proteosyntézy**

A – adenylní doména (aktivuje daný stavební kámen), PCP – peptid přenášející protein (předává produkt mezi podjednotkami), C – katalytická doména (katalyzuje vlastní kondenzační reakci), TE – thioesterázová doména (jedna z variant ukončovací domény, odštěpí produkt z PCP a cyklizuje ho), E – epimerizační doména (příklad domény modifikující produkt v průběhu syntézy). ATP je adenosintrifosfát a „ak“ znamená aminokyselina. Upraveno z (Strieker and Marahiel 2009).

Surfaktin samotný je syntetizován komplexem tvořeným geny *srfA*, *srfB*, *srfC*, *srfD* sdruženými v *srfA* operonu. *SrfA*, *SrfB* a *SrfC* tvoří multienzymatický komplex a *SrfD* je externí thioesteráza (Steller et al. 2004). Dalším esenciálním genem je *sfp*, mezi nímž a *srfA* operonem je v chromozómu *B. subtilis* několik jiných genů. Protein *Sfp* v syntéze surfaktinu slouží jako PCP (Cosmina et al. 1993). V kmenech *B. subtilis*, které nejsou schopné produkce surfaktinu (např. kmen 168) je sice přítomen intaktní *srfA* operon, nicméně gen *sfp* obsahuje bodovou mutaci, která způsobuje posun čtecího rámce, a celý syntetázový komplex je tedy nefunkční. Pro přípravu kontrolního kmene *B. subtilis* 0164, který je použit v této práci, byl cílenou mutagenézí původní gen *sfp* kmene *B. subtilis* ATCC 21332 nahrazen nefunkční kopií z *B. subtilis* 168 (Seydlova et al. 2013).

### 2.3.2 Fyzikální vlastnosti surfaktinu

Kombinace přítomnosti hydrofobní a hydrofilní domény v molekule řadí surfaktin mezi amfipatické molekuly – molekuly mající afinitu jak k polárním, tak k nepolárním prostředím. To surfaktinu propůjčuje povrchovou aktivitu, schopnost agregovat se na rozhraní dvou fází s různou polaritou. Podle této vlastnosti byl dokonce pojmenován (SurfActin – Surface Active). Surfaktin je při koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  schopný snižovat povrchové napětí na rozhraní voda-vzduch ze 72 na přibližně 30 mN/m. Zvýšení koncentrace surfaktinu dále povrchové napětí nesnižuje, protože při koncentracích vyšších než 10  $\mu\text{mol/l}$  začíná surfaktin v roztoku agregovat a tvořit micely (Ishigami et al. 1995; Razafindralambo et al. 2004). Hodnota CMC (kritické micelární koncentrace – koncentrace, při které se v roztoku dané látky začínají z monomerů tvořit micely) surfaktinu se liší podle pH a složení roztoku. V přítomnosti kationtů, které dokáží neutralizovat záporný náboj nesený hydrofilní doménou a oslabit tak odpudivé síly bránící agregaci, může CMC surfaktinu nabývat hodnot nižších než 10  $\mu\text{mol/l}$ , v roztocích s velmi nízkou iontovou silou ovšem může dosahovat až 300  $\mu\text{mol/l}$  (Maget-Dana and Ptak 1992; Ishigami et al. 1995; Heerklotz and Seelig 2001; Shen et al. 2011). Na pH a složení roztoku závisí i charakter micel a agregátů tvořených surfaktinem. Zatímco při vysokém pH a přítomnosti monovalentních kationtů tvoří surfaktin spíše malé micely, s klesajícím pH a vzrůstajícím obsahem dvojmocných kationtů se tvoří větší, tyčinkovité micely nebo dokonce planární agregáty (Li et al. 2009; Zou et al. 2010; Shen et al. 2011; Arutchelvi et al. 2014).

### 2.3.3 Interakce surfaktinu s membránou

Amfipatické vlastnosti a z nich vyplývající schopnost adsorbovat se na rozhraní fází s různou polaritou umožňuje surfaktinu vkládat se do biologických membrán a narušovat tak jejich bariérovou funkci. Na narušení bariérové funkce membrány jsou založeny jeho bohaté biologické účinky. Patří mezi ně antibakteriální (Beven and Wroblewski 1997; Tabbene et al. 2009; Loiseau et al. 2015), antivirová (Vollenbroich et al. 1997a), antifungální (Vitullo et al. 2012), imunomodulační a imunosupresivní (Kim et al. 1998; Park and Kim 2009) a protirakovinné (Kameda et al. 1974; Cao et al. 2009). Velká část výzkumu se zabývá použitím surfaktinu k antimikrobiální ochraně plodin či potravin (Mo et al. 2013; Fernandes et al. 2014; Tanaka et al. 2015). Minimální inhibiční koncentrace surfaktinu pro některé mikroorganismy jsou shrnuty v Tab. 2.3.

**Tab. 2.3 Minimální inhibiční koncentrace surfaktinu pro některé mikroorganismy**

Mikroorganismus	MIC ( $\mu\text{mol/l}$ )	Literatura
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	12,5	(Beven and Wroblewski 1997)
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	100	
<i>Mycoplasma genitalium</i>	50	
<i>Mycoplasma mycoides</i>	50	
<i>Spiroplasma citri</i>	25	
<i>Spiroplasma melliferum</i>	50	
<i>Salmonella enteritidis</i>	6,25	(Huang et al. 2009)
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	64	(Hwang et al. 2008)
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	12,5	(Vollenbroich et al. 1997b)
<i>Legionella pneumophyla</i>	4	(Loiseau et al. 2015)
<i>Escherichia coli</i>	15-40	(Das et al. 2008)
<i>Micrococcus flavus</i>	200	
<i>Serratia marcescens</i>	30	
<i>Bacillus pumilis</i>	30	
<i>Proteus vulgaris</i>	10	
<i>Citrobacter freundii</i>	30	
<i>Proteus mirabilis</i>	20	
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	50	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	10	
<i>Acetobacter calcoaceticus</i>	40	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	100	
<i>Klebsiella aerogenes</i>	80	
<i>Enterobacter cloacae</i>	20	

U surfaktinu bylo popsáno nebo předpovězeno několik různých mechanismů účinku, které se uplatňují postupně se stoupající koncentrací (viz dále). Koncentrace potřebná pro projevení se daného mechanismu se ale může velmi lišit podle izoformy surfaktinu. Několik autorů porovnávalo různé efekty purifikovaných izoform surfaktinu s odlišnou délkou alifatického řetězce mastné kyseliny. Přírodní izolát surfaktinu z *B. subtilis* obsahuje 13-, 14- a 15-uhlíkatý řetězec. Obecně nejslabší aktivitu jak povrchovou, antimikrobiální, antivirovou i hemolytickou vykazovala 13-uhlíkatá forma, nejsilnější 15-uhlíkatá forma (Kracht et al. 1999; Razafindralambo et al. 2004; Dufour et al. 2005). Dalšími zkoumanými modifikacemi molekuly surfaktinu byla linearizovaná varianta a metylesterifikované varianty. Zatímco antivirová a hemolytická aktivita linearizovaného analogu surfaktinu byla výrazně oslabena, metylesterifikovaný surfaktin (nesoucí pouze jeden záporný náboj) byl výrazně aktivnější. Aktivita dimylesteru (s oběma náboji neutralizovanými) byla zanedbatelná (Dufour et al. 2005).

Na modelových membránách byla popsána tvorba iontových kanálů, pórů (Sheppard et al. 1991; Ostroumova et al. 2010), lokálních selhání integrity a při rostoucí koncentraci dokonce úplná destrukce membrány detergentním mechanismem (Carrillo et al. 2003; Nazari et al. 2012). Povaha kanálů či pórů není zatím příliš popsána, detergentnímu mechanismu účinku surfaktinu však byla věnována poměrně bohatá pozornost. Surfaktin se sice samovolně vkládá do membrány, ale jeho mísitelnost s membránovými lipidy je omezená. Proto surfaktin v membráně agreguje, vytváří mikrodomény, ve kterých je jeho lokální koncentrace výrazně vyšší, než by odpovídalo celkovému poměru surfaktin : lipid v membráně. Popsána byla také agregace na rozhraní mezi membránovými doménami v tekuté a gelové fázi (Deleu et al. 2013). Efekty surfaktinu, které jsou závislé na koncentraci, jako tvorba pórů či lokálních selhání dvojrstvy, díky tomu mohou v těchto oblastech probíhat při podstatně nižší celkové koncentraci surfaktinu, než jaká by byla nutná při homogenním rozprostření po celé membráně. Při překročení určitého hraničního poměru surfaktin : lipid dojde k vytrhávání kusů membrány a tvorbě směsných micel (Nazari et al. 2012). Tato hraniční koncentrace surfaktinu je závislá na složení cílové membrány tak, jako je mísitelnost surfaktinu ovlivněná složením polárních hlav, která klesá v řadě fosfatidylcholin > fosfatidyletanolamin > fosfatidylserin. Roli hraje i délka mastných kyselin membránových lipidů – s rostoucí délkou řetězců mastných kyselin mísitelnost surfaktinu s membránovými lipidy klesá. Nejsilnějšího účinku surfaktin dosahuje, pokud je délka mastných kyselin v membráně stejná jako délka mastné kyseliny surfaktinu (Maget-Dana and Ptak 1995; Bouffieux et al. 2007). Tyto rozdíly v mísitelnosti surfaktinu s lipidy by mohly vysvětlovat pozorované rozdíly v účinnosti surfaktinu na různé buňky s různým složením membrány (viz Tab. 2.3). Bylo také popsáno oslabení účinku surfaktinu přítomností cholesterolu v membráně – ten by mohl vyrovnávat pnutí a stabilizovat dvojrstvu v místech hromadění surfaktinu (Heerklotz and Seelig 2007).

Dalšími efekty surfaktinu na membránu, které přímo nesouvisí s bezprostředním narušením bariérové funkce, je fluidizace membrány a dezorganizace oblasti mastných kyselin (Carrillo et al. 2003). Vkládání kónického surfaktinu do membrány také způsobuje pnutí nebo ohyby membrány. Pokud je surfaktin přítomen v roztoku pouze na jedné straně membrány, jak je v podmínkách in vivo pravděpodobné, bude jeho vkládáním asymetricky expandovat jeden list membránové dvojrstvy vůči druhému – to způsobí další pnutí a ohýbání membrány. To může vést k přenesení monomerů surfaktinu do druhého listu flip-flop mechanismem, který může

být spojen s přenosem iontu, nebo lokálním vchlípením membrány a jejím selháním, při kterém se dočasně oba listy membrány propojí a část obsahu expandujícího listu se přelije do druhého, čímž se pnutí uvolní, ale v průběhu dojde ke zkratování membránového potenciálu nebo i úniku buněčného obsahu (Heerklotz et al. 2004).

#### 2.3.4 Adaptace *B. subtilis* na přítomnost surfaktinu

Výše popisované děje se mohou odehrávat i v membránách producenta *B. subtilis*, jehož některé kmeny ve stacionární fázi růstu uvolňují do média surfaktin. Koncentrace, které jsou takto dosahovány – 1650 µg/ml v médiu dle Coopera (Cooper et al. 1981; Sklenářová 2014) jsou mnohonásobně vyšší než minimální inhibiční koncentrace pro jiné mikroorganismy (viz Tab. 2.3 v kapitole 2.3.3). Kultura *Bacillus subtilis* ATCC 21332 je však za těchto podmínek stále schopna růstu a produkce surfaktinu. Produkční mikroorganismus jakéhokoli antibiotika je zpravidla vybaven mechanismem rezistence vůči vlastnímu toxickému produktu (Hopwood 2007). U *Bacillus subtilis* nebyla prokázána souvislost rezistence proti surfaktinu s žádným z exportních systémů běžně se uplatňujících v rezistenci k antibiotikům. Zaznamenán byl pouze nárůst exprese transportéru kódovaného genem yerP (Tsuge et al. 2001), jehož absence však nijak výrazně nezvýšila náchylnost *B. subtilis* vůči surfaktinu, ale omezila se jeho schopnost surfaktin do média produkovat. To naznačuje, že zmíněný protein YerP by se (spolu s dalšími dvěma podobnými systémy YexA a KrsE) mohl účastnit sekrece surfaktinu, jejíž mechanismus zatím není detailně objasněn (Li et al. 2015). Rezistence tedy pravděpodobně není způsobena konkrétním proteinem – *B. subtilis* zřejmě musí uplatňovat jiný rezistenční mechanismus. V úvahu připadá změna zásahového místa, tedy cytoplazmatické membrány. Rezistence tohoto typu na úrovni membrány byla již prokázána u jiného lipopeptidového antibiotika – daptomycinu (Mishra et al. 2009).

V naší laboratoři bylo prokázáno, že produkce surfaktinu vede k výrazné změně lipidového složení membrány, a to zejména co se týče zastoupení typů polárních hlav, které vstupují do interakce se surfaktinem v první linii. Z paralelně kultivovaných kultur *B. subtilis* ATCC 21332, který je přirozeným producentem surfaktinu, a *B. subtilis* 0164, který má cílenou mutagenézí přerušen gen *sfp* esenciální pro produkci surfaktinu (viz kapitola 4.1), byly v průběhu 24 h kultivace v tekutém médiu izolovány membrány a stanoveno jejich složení (Tab. 2.4). Produkce

surfaktinu u kmene ATCC 21332 dosahovala za daných podmínek po 20 h ve stacionární fázi množství 87 mg/l.

**Tab. 2.4 Procentuální zastoupení fosfolipidů v závislosti na čase a kmenu**

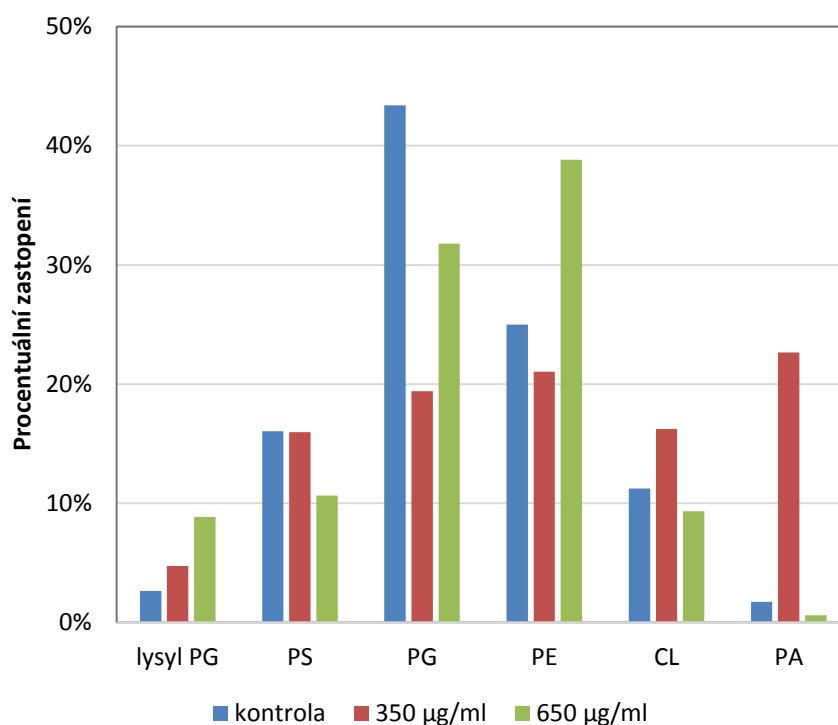
	t <sub>1</sub>		t <sub>0,5</sub>		t <sub>1,5</sub>		t <sub>3</sub>		t <sub>20</sub>	
	SF+	SF-	SF+	SF-	SF+	SF-	SF+	SF-	SF+	SF-
Lysyl PG	3,3	2,8	7,6	5,6	5,3	4,5	3,4	5,5	2,8	1,5
PS	10,8	11,1	13,2	13,3	11,5	11,8	14,0	11,6	13,9	13,5
PG	42,6	43,5	37,2	38,7	39,5	43,3	37,9	36,0	16,1	28,3
PE	25,7	25,1	22,1	21,4	21,7	26,5	22,2	29,9	11,0	16,4
CL	13,4	13,8	12,8	13,3	17,9	13,6	19,7	14,1	21,9	8,4
PA	4,2	3,8	7,2	7,8	4,2	3,2	3,0	2,9	35,6	31,9

V tabulce jsou shrnuta procentuální zastoupení jednotlivých fosfolipidových tříd. Čas t<sub>0</sub> označuje začátek produkce surfaktinu, index udává dobu od začátku jeho produkce v hodinách. Produkční kmen ATCC 21332 je označený jako SF+ a neprodukcí 0164 jako SF- (Seydlova et al. 2013).

Z těchto dat je zřejmé, že produkce surfaktinu vede již po 90 min ke znatelnému nárůstu koncentrace kardiolipinu a postupně dosáhne až 22 % z původních 13 %. Naopak u kmene neprodukcujícího surfaktin obsah kardiolipinu dokonce klesne na přibližně 8 %. Po 20 h stacionární fáze také u obou kultur výrazně vzrostl obsah kyseliny fosfatidové, u producenta surfaktinu větší měrou – na 36 % a u neprodukcujícího mutanta na 32 %, stala se tak nejvíce zastoupeným lipidem membrány. Tyto změny lipidického složení měly za následek znatelnou rigidizaci membrán producenta surfaktinu oproti kontrole. Nárůst koncentrace kardiolipinu a následná rigidizace, případně nárůst negativního náboje membrány tedy pravděpodobně mají vliv na toleranci *B. subtilis* vůči surfaktinu (Seydlova et al. 2013).

V paralelních experimentech byl surfaktin z vnějšku přidáván k exponenciálně rostoucím kulturám *B. subtilis* 168, a to v takové koncentraci, která měřitelně ovlivňuje růst kultury, ale ta má ještě dostatečnou fyziologickou kapacitu, aby na přítomnost pórtočvorné látky mohla reagovat. Stanovení lipidového složení membrán těchto kultur (Obr. 2.13) v kontrastu s daty ze stacionárních kultur neukázalo výrazný rozdíl v zastoupení kardiolipinu. Koncentrace surfaktinu 650 µg/ml ovšem vedla k převrácení poměru fosfatidylglycerolu a fosfatidyletanolaminu a koncentrace 350 µg/ml vedla k výraznému nárůstu obsahu kyseliny fosfatidové na úkor fosfatidylglycerolu. Složení mastných kyselin ovlivnila pouze nižší

z testovaných koncentrací surfaktinu, která vedla k podstatnému nárůstu množství nevětvených mastných kyselin na úkor větvených, což vedlo i k snížení fluidity membrány (Sklenářová 2014).



**Obr. 2.13 Relativní zastoupení fosfolipidů v kulturách vystavených surfaktinu**

Graf popisuje procentuální zastoupení jednotlivých typů fosfolipidů v membránách kultur *B. subtilis* vystavených účinkům různé koncentrace surfaktinu. Jako „kontrola“ jsou označeny lipidy kultur pěstovaných bez přítomnosti surfaktinu (Sklenářová 2014).

Na základě těchto experimentů je tedy možné tvrdit, že adaptace *B. subtilis* na účinek vlastního toxického produktu surfaktinu je provázena výraznou přestavbou cytoplazmatické membrány, a lze i předpokládat, že tato přestavba se podílí na rezistenci *B. subtilis* vůči surfaktinu. Cílem předkládané diplomové práce bylo tuto hypotézu ověřit. Na základě výše popsaných změn lipidického složení membrán *B. subtilis* se tato práce zaměřuje na ty fosfolipidy, jejichž podíl v membráně se v reakci na surfaktin výrazně změnil, tedy fosfatidylglycerol, fosfatidyletanolamin, kardiolipin a kyselina fosfatidová.



### 3. Cíle práce

Tato práce si klade za cíl zmapovat permeabilizační účinky surfaktinu na modelové membrány, závislost aktivity surfaktinu na složení cílové membrány a na základě toho posoudit, zda je změna složení membrány účinným mechanismem rezistence *B. subtilis* proti vlastnímu toxickému produktu, jak naznačuje předchozí výzkum v naší laboratoři. Jednotlivé dílčí cíle jsou shrnuty v následujících bodech:

- Zmapovat pomocí metody černých lipidických membrán pórotvornou aktivitu surfaktinu v experimentálních podmínkách naší laboratoře
- Stanovit vliv složení modelové membrány na tuto aktivitu na úrovni velikosti kanálů
- Zmapovat vliv složení a příspěvek jednotlivých fosfolipidových tříd k odolnosti membrány vůči permeabilizaci surfaktinem pomocí metody měření úniku fluorescenční sondy z lipozómů
- Určit potenciál adaptivních změn lipidického složení membrány pro rezistenci *B. subtilis* vůči surfaktinu
- Sledovat adaptivní změny fluidity membrány *B. subtilis* v reakci na přítomnost surfaktinu

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Bakteriální kmeny

Při vypracování této diplomové práce byly použity následující kmeny *Bacillus subtilis*:

***Bacillus subtilis* ATCC 21332** – divoký kmen (American Type Culture Collection), producent surfaktinu, v práci označován jako SF+

***Bacillus subtilis* 0164** (sfp<sup>0</sup>) – mutantní kmen založený na *B. subtilis* ATCC 21332 s nefunkčním genem sfp esenciálním pro produkci surfaktinu (Seydlova et al. 2013), v této práci označován jako SF-

***Bacillus subtilis* 168** (trp<sub>2</sub>-) – běžný laboratorní kmen neprodukující surfaktin (*Bacillus* Genetic Stock Center), v práci označován jako CL+

***Bacillus subtilis* SDB206** (clsA::pMutin4, ywjE1::spc, ywiE2::neo) – kmen vycházející z *B. subtilis* 168 s přerušenými geny clsA, ywjE1 a ywiE2 esenciálními pro syntézu kardiolipinu (Kawai et al. 2004), v práci označován CL-

Kmeny byly uchovávány v -20 °C v podobě sporových konzerv v 15% glycerolu. Před pokusem byly kmeny dvakrát pasážovány na šikmém agaru (živný agar, 30 °C, 16 h) a uchovávány ve 4 °C po maximální dobu dvou týdnů.

### 4.2 Kultivační půdy

#### 4.2.1 Živný agar

##### **Materiál:**

Živný agar (Oxoid) 28 g/l

Živný agar (Oxoid) o koncentraci 28 g/l byl rozpuštěn v destilované vodě a rozplněn po 8 ml do zkumavek s víčkem. Po sterilizaci byly zkumavky uloženy v šikmé poloze do ztuhnutí agaru.

#### 4.2.2 Živné médium

##### **Materiál:**

Lab-Lemco powder (Oxoid) 1,0 g/l

Yeast extract (Oxoid) 2,0 g/l

Bacteriological Pepton (Oxoid) 5,0 g/l

NaCl (Lach - Ner) 5,0 g/l

Všechny složky byly rozpuštěny v dostatečném množství destilované vody. Následně bylo pomocí roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l upraveno pH na hodnotu 7,0. Po úpravě pH byl roztok doplněn do zamýšleného objemu a následně sterilizován.

#### 4.2.3 Sporulační agar

##### **Materiál:**

Složka 1:

Živný agar (Difco) 23g/l

NaCl (Lach-Ner) 18 μmol/l

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (Lach-Ner) 1 μmol/l

Složka 2:

FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (Lachema) 1 μmol/l

MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O (Penta) 10 μmol/l

CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Lachema) 1 μmol/l

Složka 1 byla sterilizována v autoklávu, složka 2 filtrací. Po ochlazení na teplotu přibližně 50 °C byl na 1000 ml složky 1 přidán 1 ml na stejnou teplotu vytemperované složky 2 a vzniklá směs byla asepticky rozlita do Petriho misek a nechána ztuhnout.

### 4.3 Sterilizace

Vodné roztoky byly (pokud není uvedeno jinak) sterilizovány 20 minut při 121 °C v autoklávu v přetlaku vodní páry 0,1 MPa. Laboratorní sklo bylo sterilizováno v horkovzdušné sušárně při 180 °C 60 min, případně při 130 °C 180 min. Pufr pro BLM a složka 2 sporulačního agaru byly sterilizovány filtrací (filtry Milliex® GS s velikostí pórů 0,22 μm, Milipore).

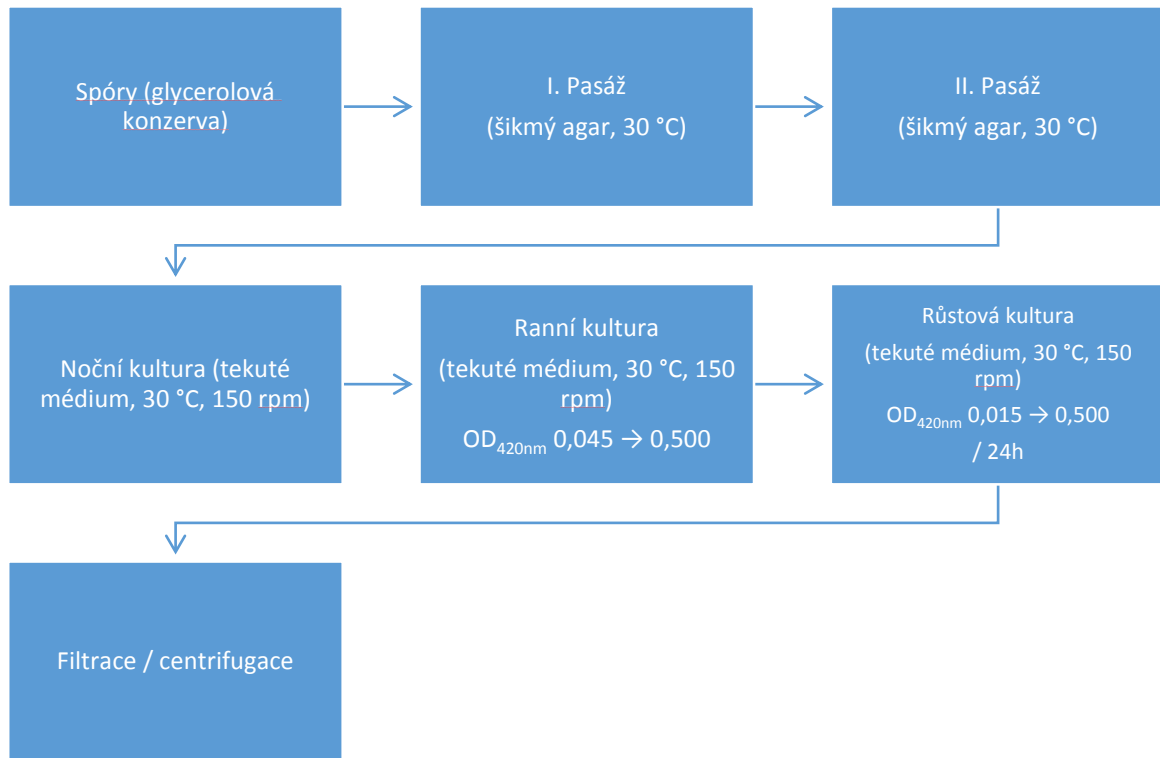
### 4.4 Příprava spórových konzerv

Exponenciálně rostoucí kultura v živném médiu o  $OD_{420nm} \approx 0,500$  byla asepticky zaočkována na 20 misek se sporulačním agarem a 4 dny kultivována dnem vzhůru ve 30 °C. Poté byla narostlá biomasa asepticky opláchnuta sterilní destilovanou vodou a suspenze převedená do 50ml centrifugačních zkumavek Falcon a centrifugována 10 min při 5000 g. Sediment byl ještě třikrát promyt 30 ml sterilní destilované vody a centrifugován stejným způsobem. Po posledním promytí byly pelety resuspendovány v malém množství sterilní destilované vody a převedeny do jedné centrifugační zkumavky a centrifugovány dalších 15 min při 5000 g. Supernatant byl kvantitativně odstraněn a zbylý pelet byl resuspendován v 15 ml 15% glycerolu a suspenze rozplněna do sterilních mikrozkušavek po 100 μl a uložena v -20 °C.

### 4.5 Kultivace bakteriálních kultur

Biomasa ze šikmého agaru (viz kapitola 4.1) byla asepticky zaočkována do 30 ml živného média v Erlenmayerově baňce a ta byla přes noc aerobně kultivována v horkovzdušné třepačce NB-205 (N-BIOTEK) při 30 °C a 150 rpm. Z této noční kultury byla poté zaočkována ranní kultura na  $OD_{420nm} = 0,045$ . Ranní kultura byla za stejných podmínek (30 °C, 150 rpm) kultivována, dokud nedosáhla  $OD_{420nm} = 0,500$ . Z ranní kultury o  $OD_{420nm} = 0,500$  byla zaočkována vlastní růstová kultura na  $OD_{420nm} = 0,015$  a kultivována za stejných podmínek (30 °C, 150 rpm) ve větších objemech kultury (třepačka Gallenkamp, Schoeller Instruments). Pro získání buněk v exponenciální fázi růstu (CL+ a CL-) byla biomasa z růstové kultury po dosažení  $OD_{420nm} = 0,500$  zfiltrována pomocí vodní vývěvy a filtrů Synport č. 5 (velikost pórů 0,6 μm) a ihned zpracována podle protokolu v kapitole 4.7. Pro získání buněk v pozdní stacionární fázi

(SF+ a SF-) byla biomasa z růstové kultury získána centrifugací 15 min, 4500 g a pro oddělení vegetativních buněk od spor zpracována podle protokolu v kapitole 4.6. Schéma kultivace je na Obr. 4.1.



**Obr 4.1 Schéma kultivace**

## 4.6 Izolace cytoplazmatických membrán

### **Materiál:**

Biomasa z 24h kultur *B. subtilis* (viz kapitola 4.5)

K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub> (Roth) 0,2 mol/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> (Fluka) 0,2 mol/l

K<sup>+</sup>EDTA (Sigma-Aldrich) 150 mmol/l

MgSO<sub>4</sub> (Penta) 500 mmol/l

Phenylmethylsulfonylfluorid – PMSF (Serva) 100 mmol/l v izopropanolu

DNáza I (Sigma-Aldrich) – 1 mg DNázy v 50% glycerol (w/v), 10 mmol/l Tris-HCl pH 7,5, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, uchováváno v -20 °C

TRN (Sigma-Aldrich) – 1% RNáza (w/v), 10 mmol/l Tris-HCl pH 7,5, 15 mmol/l NaCl, 15 min 100 °C, uchováváno v -20 °C

Lysozym (Sigma-Aldrich, 100000 U/mg)

Buněčný pufr: 50 mmol/l fosfátový pufr pH 8,0 (94,7 ml 0,2 mol/l  $K_2HPO_3$ , 5,3 ml 0,2 mol/l  $KH_2PO_3$ , doplnit destilovanou vodou do 400 ml)

Membránový pufr: 100 mmol/l fosfátový pufr pH 6,6 (37,5ml 0,2 mol/l  $K_2HPO_3$ , 62,5 ml 0,2 mol/l  $KH_2PO_3$ , doplnit destilovanou vodou do 200 ml)

Biomasa získaná centrifugací ze 100 ml 24h kultury (viz kapitola 4.5) byla dvakrát promyta vytemperovaným buněčným pufrem a následně zmrazena v tekutém dusíku a uložena k pozdějšímu zpracování v - 80 °C, nebo ihned resuspendována v 10 ml buněčného pufru obsahujícího 10 mg/ml lysozymu a 150  $\mu$ l PMSF. Poté bylo přidáno 25  $\mu$ l DNázy a TRN a suspenze byla intenzivně promíchána. Nakonec bylo přidáno 200  $\mu$ l  $MgSO_4$  a suspenze byla inkubována 60 min při 30 °C. Poté byl přidán 1 ml  $K^+EDTA$  a po jedné minutě dalších 200  $\mu$ l  $MgSO_4$ . Nezlyzované buňky a spóry byly odstraněny centrifugací v 50 ml centrifugačních zkumavkách Falcon 10 min při 3000 g a 4 °C. Pelet byl odstraněn a supernatant obsahující buněčné membrány byl ultracentrifugován 25 minut při 25000 g a 4 °C. Získaný pelet membránových váčků byl buď použit k izolaci lipidů (viz kapitola 4.7) nebo resuspendován v membránovém pufru a po stanovení koncentrace proteinů (viz kapitola 4.9) použit k měření ustálené anizotropie fluorescence (viz kapitola 4.12). V případě, že nebyly vzorky zpracovány ihned, byly uloženy v -80 °C.

## 4.7 Izolace lipidů

### **Materiál:**

Biomasa *B. subtilis* v exponenciální fázi růstu (viz kapitola 4.5) nebo cytoplazmatické membrány 24h kultur (viz kapitola 4.6)

Hexan (HPLC grade, Sigma-Aldrich):Izopropanol (LC-MS grade, Fluka) 3:2 (v/v)

Chloroform ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich)

Filtry Whatman GF/C 25 mm

Buněčná biomasa nebo cytoplazmatické membrány byly intenzivním mícháním na laboratorním přístroji vortex po dobu alespoň 60 sekund vytřepávány ve 30 ml směsi hexan:izopropanol v teflonových centrifugačních zkumavkách (Oak Ridge) a přes noc extrahovány při 4 °C. Nelipidové složky byly od extraktu odděleny centrifugací (5000 g, 10 min, 4 °C) a extrakt byl následně odpařen při 38 °C na rotační vakuové odparce. Lipidová frakce byla rozpuštěna v 7,5 ml chloroformu a pomocí skleněné filtrační aparatury Whatman přefiltrována přes filtry ze skelných vláken Whatman GF/C 25 mm za účelem odstranění složek nerozpustných v chloroformu. Filtr byl následně ještě promyt 2,5 ml chloroformu a oba filtráty byly spojeny. Chloroform byl opět odpařen na vakuové odparce a lipidy byly buď v chloroformu převedeny do skleněných vialek s teflonovým víčkem (Restek nebo Supelco) a uloženy v -80 °C, nebo ihned zpracovány (viz kapitola 4.11 nebo 4.12).

## 4.8 Stanovení koncentrace fosfátu v suspenzi lipozómů

### **Materiál:**

70% HClO<sub>4</sub> (Penta)

Kyselina askorbová (Lach-Ner) 10% (w/v)

Molybdenan amonný (Lach-Ner) 2,5% (w/v)

Standard – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Roth) 0,2 mmol/l

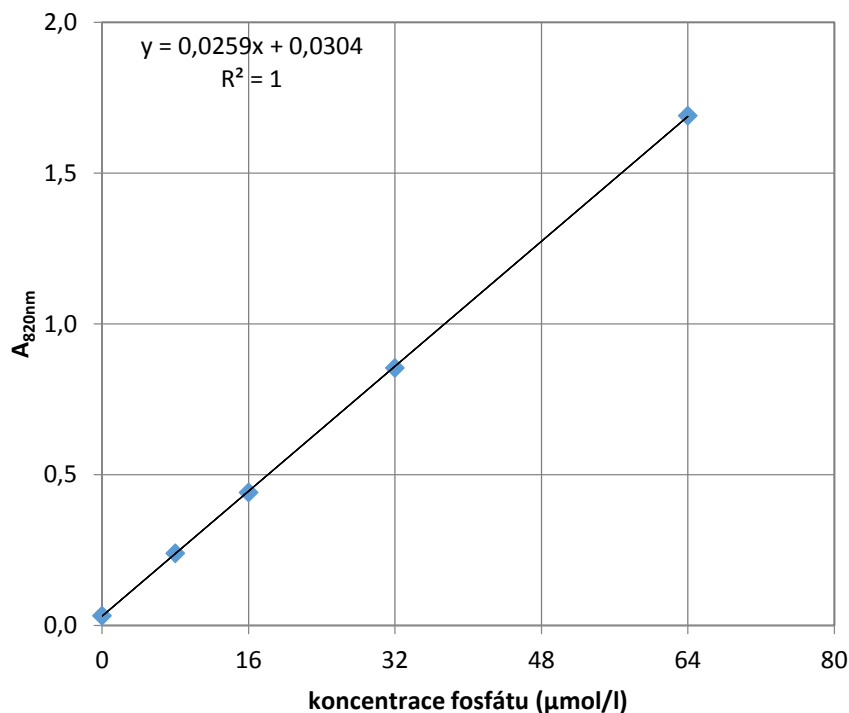
Koncentrace fosfátu byla stanovena kolorimetrickou reakcí, při které vzniká fosfomolybdenová modř. 100 µl suspenze lipozómů bylo v pětkrát destilovanou vodou propláchnuté a vysušené skleněné zkumavce smíseno s 0,5 ml 70% HClO<sub>4</sub> a mineralizováno 60 minut při 180 °C. K mineralizovanému vzorku bylo přidáno 3,4 ml destilované vody a 0,5 ml roztoku molybdenanu amonného. Po důkladném promíchání na laboratorním přístroji vortex bylo přidáno 0,5 ml roztoku kyseliny askorbové a roztok byl opět důkladně promíchán. Poté byl vzorek 5 minut inkubován na vodní lázni při 100 °C.

Po ochlazení na laboratorní teplotu byla měřena absorbance při 820 nm proti vodě. Koncentrace fosfátu ve vzorcích byla poté odečtena z kalibrační přímky získané měřením absorbance roztoků o známé koncentraci fosfátu připravených podle předpisu v Tab. 4.1.

**Tab. 4.1 Kalibrace stanovení koncentrace fosfátu**

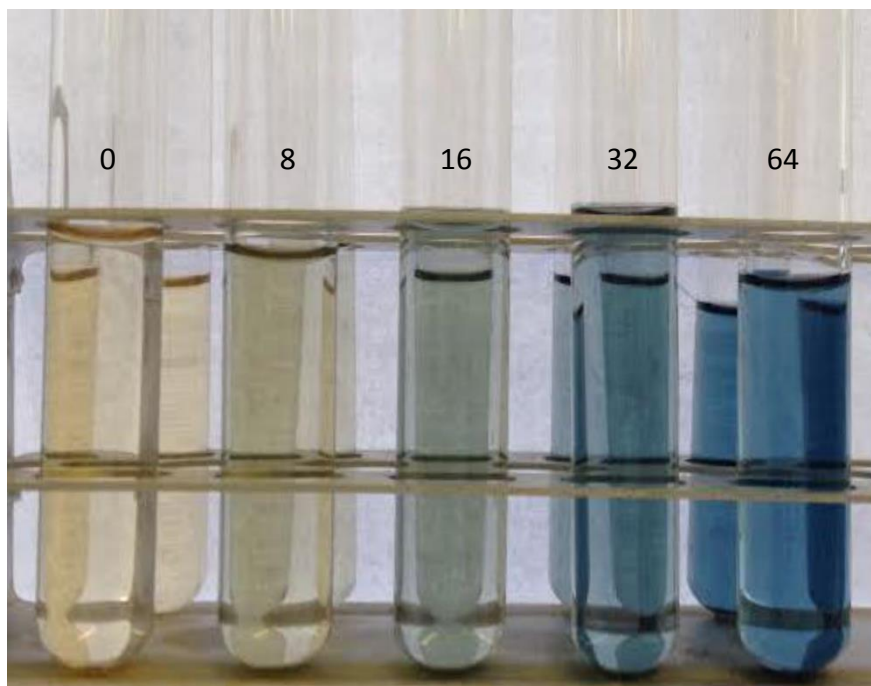
koncentrace fosfátu ( $\mu\text{mol/l}$ )	Zásobní roztok fosfátu (ml)	Destilovaná voda (ml)
0	0	7
8	0,4	6,6
16	0,8	6,2
32	1,6	5,4
64	3,2	3,8

Ke standardům byl přidán 1 ml 70%  $\text{HClO}_4$  a 1 ml roztoku molybdenanu amonného a po důkladném promíchání 1 ml roztoku kyseliny askorbové. Poté byly standardy zahřívány a jejich absorbance měřena stejně jako v případě vzorků. Pro každé stanovení byly připraveny čerstvé roztoky kyseliny askorbové a molybdenanu amonného a vytvořena nová kalibrační přímka, jednotlivé body kalibrační přímky byly stanovovány v duplikátech a použit průměr obou hodnot. Příklad kalibrační přímky a fotografie standardů jsou na Obr. 4.2, resp. 4.3.



**Obr. 4.2 Kalibrační přímka závislosti absorbance na koncentraci fosfátu**





**Obr. 4.3** Roztoky o známé koncentraci fosfátu po proběhnutí barevné reakce  
Na jednotlivých zkumavkách jsou uvedeny koncentrace fosfátu v  $\mu\text{mol/l}$ .

## 4.9 Stanovení koncentrace membránových proteinů

### **Materiál:**

BCA protein assay reagent A (Pierce)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Lachema) 4% (w/v)

Hovězí sérový albumin – BSA (Sigma-Aldrich) 2 mg/ml

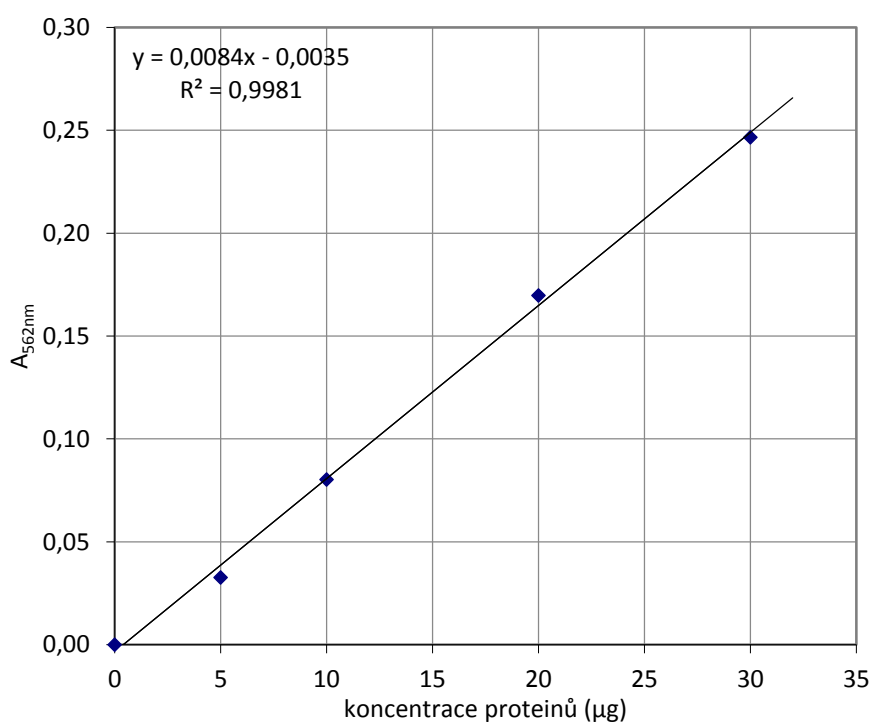
Koncentrace membránových proteinů byla stanovována kolorimetricky pomocí reakce založené na redukci měďnatých iontů s proteiny vedoucí ke vzniku měďných iontů, které dále reagují s kyselinou bicinchoninovou za vzniku barevného produktu.

Do mikrozkušavek typu Eppendorf bylo napipetováno 5  $\mu\text{l}$  suspenze membrán v membránovém pufru a doplněno destilovanou vodou do 50  $\mu\text{l}$ . Následně byla připravena kalibrační řada roztoků BSA o známé koncentraci a opět doplněna destilovanou vodou do objemu 50  $\mu\text{l}$  – dále byly standardy zpracovávány stejným způsobem společně se vzorky. Až poté byl připraven pracovní roztok sestávající se z 50 dílů BCA protein assay reagent A a jednoho dílu roztoku  $\text{CuSO}_4$  a ke každému vzorku byl přidán 1 ml pracovního roztoku. Směs byla inkubována ve vyhříváném bločku při 37 °C po dobu 30 min. Po ochlazení na laboratorní

teplotu byla měřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Kalibrační řada byla připravena podle předpisu v Tab. 4.2, každý bod byl stanoven v triplikátu a použit průměr všech hodnot. Pro každé jednotlivé měření byla sestavena nová kalibrační přímka. Příklad kalibrační přímky je na Obr. 4.4.

**Tab. 4.2 Kalibrace stanovení koncentrace proteinů**

Množství BSA (μg)	Zásobní roztok BSA (μl)	Destilovaná voda (μl)
0	0	50
5	2,5	47,5
10	5	45
20	10	40
30	15	45



**Obr. 4.4 Kalibrační přímka závislosti absorbance na koncentraci proteinů**

## 4.10 Černé lipidické membrány

### **Materiál:**

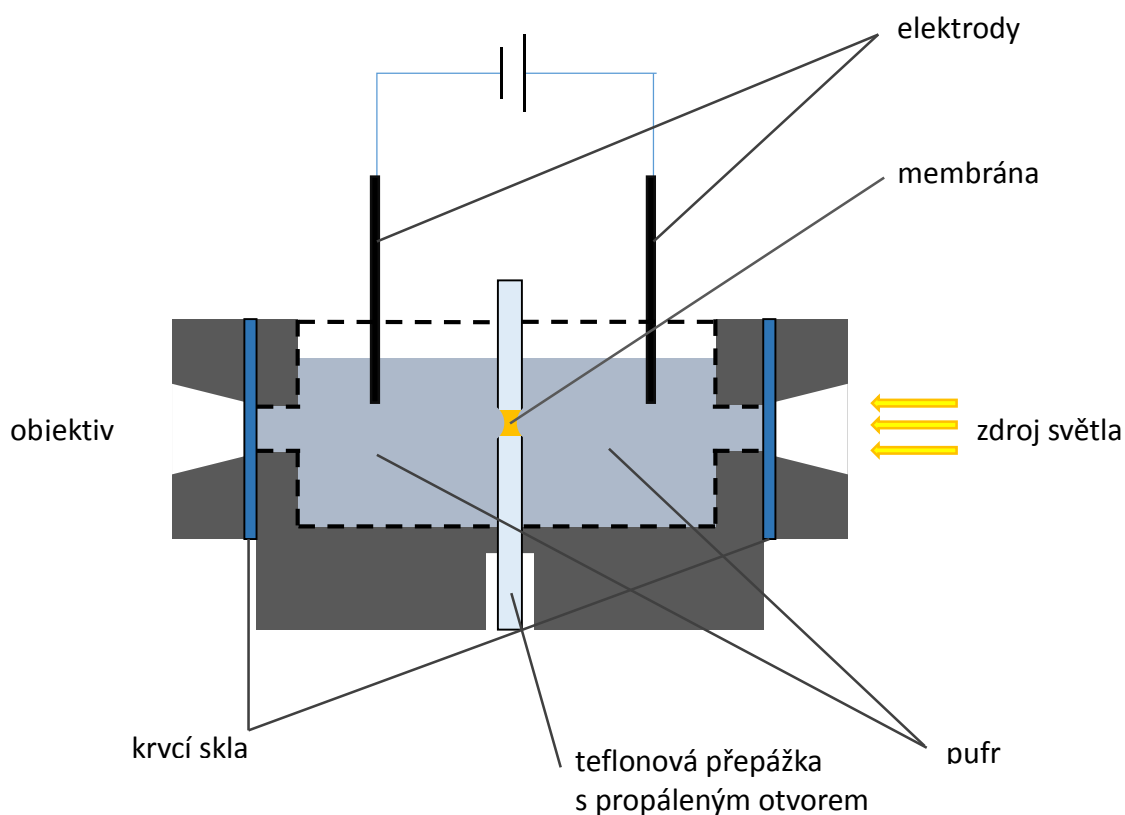
Surfaktin (Sigma-Aldrich)  
NaOH (p. a., Lachema) 10 mmol/l  
Dimetylsulfoxid ( $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich)  
Dekan ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich)  
Butanol ( $\geq 99\%$ , Fluka)  
Pentan (spectrophotometric grade, Sigma-Aldrich)  
Chloroform ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich)  
Etanol (96%, Penta)  
Měřící pufr (1 mol/l KCl, 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4)  
Sójový asolectin ( $\geq 24\%$  fosfatidylcholin, Fluka)  
Fosfolipidový extrakt z *E. coli* (Avanti Polar Lipids)  
Difytanoylfosfatidylglycerol (Avanti Polar Lipids)  
Difytanoylfosfatidyletanolamin (Avanti Polar Lipids)

Metoda BLM (Black Lipid Membranes – Černé lipidické membrány) spočívá v tvorbě planární membránové dvojvrstvy na apertuře v přepážce oddělující dva kyvetové prostory. Mezi tyto dva kyvetové prostory je pomocí Ag/AgCl elektrod vkládáno napětí a pomocí zesilovače, záznamové PCI karty a specializovaného software je zaznamenáván proud procházející přes membránu. V záznamu proudu jsou pak identifikovány a charakterizovány kanály. Schéma měřící komůrky je znázorněno na Obr. 4.5.

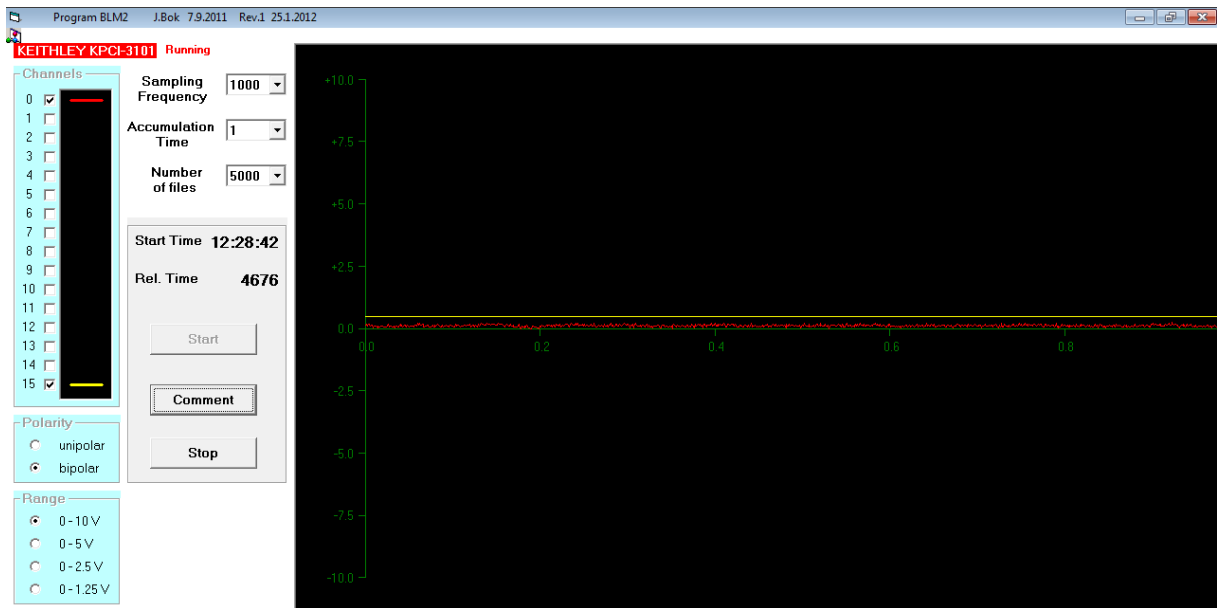
Teflonová měřící komůrka (zakázková výroba Sipoch) byla před každým měřením důkladně vypláchnuta horkou vodou, destilovanou vodou, etanolem a chloroformem pro odstranění případných lipidových reziduí a následně vysušena pentanem. Pro každé lipidové složení membrány byla použita nová teflonová přepážka. Otvor v teflonové přepážce o tloušťce 0,3 mm má plochu přibližně 0,6 mm<sup>2</sup>, z čehož vlastní membránová dvojvrstva při měření zakrývá přibližně 0,5 mm<sup>2</sup>. Po vysušení bylo do obou oddílů napipetováno 1,5 ml měřícího pufru. Před každým měřením byla ověřena symetrie elektrod a nastaven rozdíl potenciálu 50 mV. Z předem připraveného 3% (w/v) roztoku fosfolipidů ve směsi dekan : butanol 9:1 (v/v)

byl 1  $\mu\text{l}$  nanesen na skleněnou špendlíkovou hlavičku. Tou byla přetažením přes otvor v přepážce vytvořena membrána – tzv. metoda „painting“ (Mueller et al. 1962). Výhodou takto vytvořených membrán je poměrně jednoduchá tvorba a velká stabilita, nevýhodou pak residua použitých rozpouštědel v hydrofobním jádře dvojvrstvy. Po vytvoření a cílené destrukci několika kontrolních membrán (membrány se postupně stabilizují, za dostatečnou stabilitu byl v tomto případě považován stav, kdy membrána vydržela více než jednu hodinu) byl na cis stranu přidán surfaktin ze zásobního roztoku na požadovanou výslednou koncentraci a roztok byl opatrně zamíchán automatickou pipetou tak, aby nebyla narušena membránová dvojvrstva. Existence a integrita membrány byla kromě proudových měření kontrolována ještě opticky. V průběhu měření byly dle potřeby vytvářeny nové membrány, případně doplňován roztok fosfolipidů.

Proud procházející membránou byl zaznamenáván pomocí 100 nebo 10 GV/A zesilovače (MIT), sběrnou PCI kartou KPCI - 3108 (Keithley Instruments) a specializovaným software BLM2 (Obr. 4.6) vytvořeným na míru na MFF UK v Praze - Doc. RNDr. Jiří Bok, CSc. Záznam byl pak manuálně analyzován pomocí software QuB (<http://www.qub.buffalo.edu/>) (Obr. 4.7).

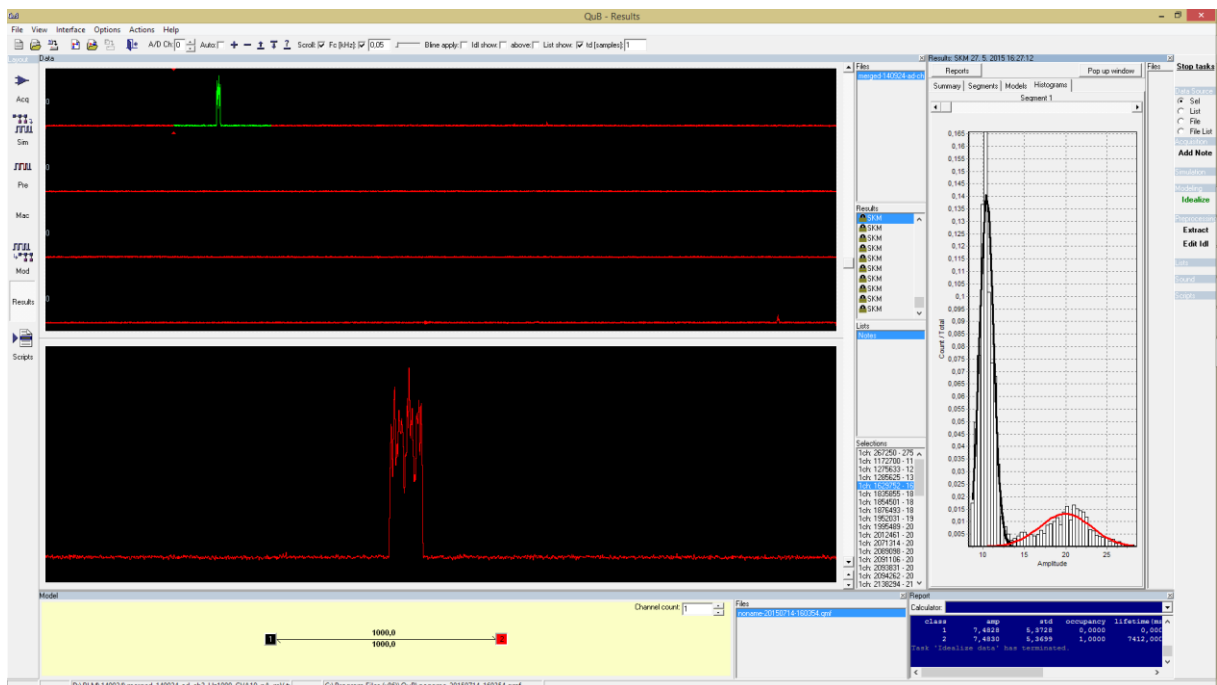


**Obr. 4.5 Schéma měřicí komory v podélném řezu**



**Obr. 4.6 Záznamový software BLM2**

V levé části je rozhraní programu umožňující nastavení vzorkovací frekvence a měřícího rozsahu, vpravo v reálném čase zobrazovaný záznam vodivosti (červená) a vkládaného potenciálu (žlutá).



**Obr. 4.7 Software QuB**

V levé horní části je záznam proudu procházejícího membránou v čase (jeden řádek je 60 s záznamu), v levé dolní detailní zobrazení vybraného úseku (cca 7,5 s) se zaznamenaným kanálem. Histogram vpravo znázorňuje rozložení vodivostí ve vybraném úseku.

## 4.11 Únik fluorescenční sondy z lipozómů

### **Materiál:**

Surfaktin (Sigma-Aldrich)

NaOH (p. a., Lachema) 10 mmol/l

Dimetylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

Sephadex G-50 medium (GE Healthcare)

Chloroform ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich)

Metanol (LC-MS grade, Fluka)

TritonX-100 (Serva)

Vnitřní pufr (50 mmol/l 5(6)-karboxyfluorescein (Sigma-Aldrich), 5 mmol/l HEPES (Fluka), pH 7,4)

Vnější pufr (100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l HEPES (Fluka), 0,5 mmol/l Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma-Aldrich), pH 7,4)

Sójový fosfatidylcholin (Sigma-Aldrich)

Dipalmitoylfosfatidylglycerol (Avanti Polar Lipids)

Diolelylfosfatidylglycerol (Avanti Polar Lipids)

Dipalmitoylfosfatidyletanolamin (Avanti Polar Lipids)

Diolelylfosfatidyletanolamin (Avanti Polar Lipids)

Dipalmitoylfosfatidová kyselina (Avanti Polar Lipids)

Diolelylfosfatidová kyselina (Avanti Polar Lipids)

Tetramyristoylkardiolipin (Avanti Polar Lipids)

Tetraoleylkardiolipin (Avanti Polar Lipids)

Lipidové izoláty (viz kapitola 4.7)

Metoda měření úniku fluorescenční sondy z lipozómů umožňuje sledovat v reálném čase perforaci nebo destrukci lipidických membrán. Je založena na tvorbě uměle vytvořených membránových váček obsahujících fluorescenční sondu a zhasedlo. V našem případě je sonda (karboxyfluorescein) samozhasecí – ve vysoké koncentraci (jako například uvnitř intaktních lipozómů) vytváří dimery a její fluorescence je velmi slabá, při vyředění (jako například při jejím uniknutí z váčky do vnějšího pufru účinkem pórovitné látky) intenzita její fluorescence výrazně vzroste (Chen and Knutson 1988).

Směsi fosfolipidů o požadovaném složení byly převedeny do skleněné zábrusové zkumavky. V případě syntetických lipidů bylo celkové množství lipidů v jedné zkumavce 2 mg, v případě lipidových izolátů byl použit celý výtěžek z 1600 ml exponenciální kultury nebo 400 ml 24h kultury. Lipidy byly rozpuštěny ve 2 ml směsi chloroform:metanol 2:1 (v/v) za účelem dobrého smísení různých typů fosfolipidů a rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce. Poté byl do každé zkumavky napipetován 1 ml chloroformu a jeho odpařením na rotační vakuové odparce za opatrného zahřívání na maximálně 38 °C při tlaku 100 - 200 mbar byl vytvořen tenký lipidový film. K lipidovému filmu byly přidány 2 ml vnitřního pufru a zkumavky byly šestkrát střídavě zahřívány na teplotu odpovídající váženému průměru  $T_m$  jednotlivých obsažených lipidů (38 °C v případě izolovaných lipidů) po dobu 5 min a intenzivně třepány na laboratorním přístroji vortex s platformou na zkumavky po dobu 10 min. Vzniklá suspenze multilamelárních lipozómů různé velikosti byla pomocí přístroje LiposoFast (Avestin) 10krát protažena přes filtr s velikostí pórů 100 nm, čímž byly vytvořeny jednovrstevné membránové váčky o průměru 100 nm. Volná sonda byla od suspenze odstraněna filtrací na koloně naplněné Sephadexem, který byl den předem 3 hodiny hydratován ve vnějším pufru za pokojové teploty a následně umístěn ve 4 °C. Vznikla suspenze membránových váčků obsahujících uvnitř vnitřní pufr (obsahující samozhášecí sondu) ve vnějším pufru (který sondu neobsahuje). U jednotlivých zachycených frakcí byla stanovena koncentrace lipidů podle anorganického fosfátu (viz kapitola 4.8) a vybrané frakce byly naředěny vnějším pufrem na požadovanou koncentraci.

Vlastní měření úniku sondy probíhalo v kyvetách z křemenného skla o minimálním objemu 50  $\mu$ l na přístroji Fluoromax-3 (Jobin Yvon, Horiba). Pokud to dostupné množství suspenze lipozómů umožňovalo, bylo na každé měření použito 100  $\mu$ l suspenze. Vlnová délka excitačního záření byla 480 nm a intenzita fluorescence emise byla měřena při 515 nm. Nejprve bylo u každého vzorku přibližně 20 s měřeno pozadí (bazální fluorescence –  $IF_0$ ), poté bylo přidáno požadované množství zásobního roztoku surfaktinu a obsah kyvety byl opatrně zamíchán automatickou pipetou tak, aby nevznikala pěna (surfaktin je silně pěnivý), která by rozptylem světla mohla zkreslovat měření. Po uplynutí 450 sekund po přidavku surfaktinu byl k suspenzi přidán TritonX-100 na výslednou koncentraci 0,02%, čímž bylo dosaženo destrukce všech váčků a uvolnění veškeré sondy, a tedy dosažení maximální intenzity fluorescence ( $IF_{max}$ ). Hrubá data byla následně normalizována a vyjádřena v procentech podle rovnice:

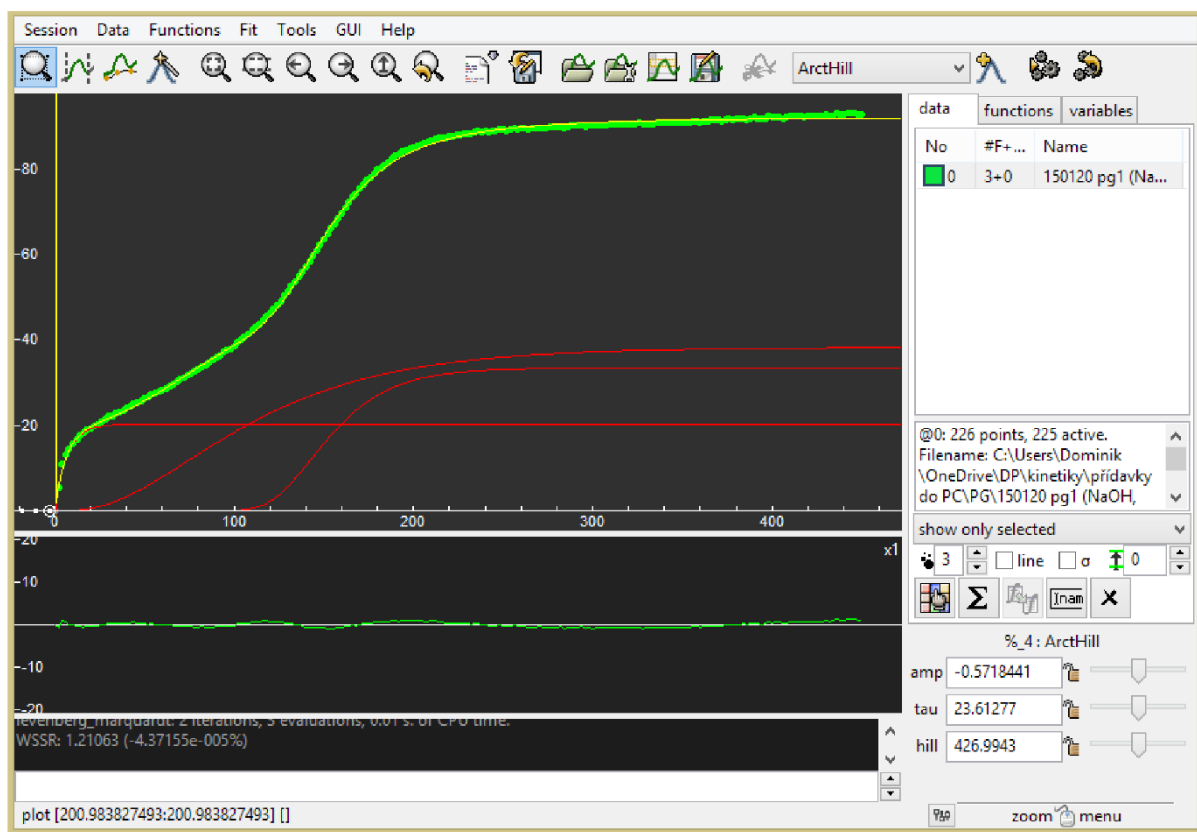
$$\% lyze = \frac{IF - IF_0}{IF_{max} - IF_0} \times 100$$

Naměřené kinetiky byly následně pomocí programu Fityk (<http://fityk.nieto.pl/>) prokládány funkcí:

$$\% lyze = \alpha(1 - e^{-\frac{t}{\tau}})^n$$

kde  $\alpha$  je amplituda (hodnota, ke které funkce konverguje),  $\tau$  je poločas funkce a  $n$  je Hillovo číslo vyjadřující kooperativitu popisovaného děje (Obr. 4.8) (Gray et al. 1998; Goutelle et al. 2008). Pokud je  $n = 1$ , není děj kooperativní, pokud je  $n < 1$  je kooperativita záporná – to znamená, stoupající koncentrace látky v membráně atenuuje efekt daného děje, a to ať už vzájemným odpuzováním, nebo omezením dostupnosti účinné látky její účastí na jiném kooperativnějším ději. Hodnota  $n > 1$  znamená pozitivní kooperativitu – další zvyšování koncentrace látky zesiluje efekt každé jednotlivé částice, nebo je funkční jednotka složena z více než jedné částice. Konkrétní hodnota  $n$  ovšem neznamená přesný počet částic tvořících funkční jednotku. Kinetiky byly prokládány více funkcemi, pokud přidání další komponenty zlepšilo kvadratickou odchylku, a tedy přesnost popisu dané kinetiky o více než 30 %.





**Obr. 4.8** Prokládání funkcí kinetikami lyze v programu Fityk

Data jsou prokládána jednou nebo více (na obrázku třemi) funkcemi. Červené čáry jsou dílčí komponenty, žlutá jejich součet, zelené body jsou vlastní data. V pravé dolní části jsou hodnoty proměnných – záporná hodnota amplitudy je způsobena nahrazením parametru amp vloženou funkcí omezující rozsah možných hodnot, z té je pak hodnota  $\alpha$  zpětně vypočítána. Pod daty je zobrazena odchylka dat od modelu – v tomto případě je křivka dat oproti modelu zvlňdná, což znamená, že funkce s aktuálním nastavením parametrů data nepopisují přesně.

## 4.12 Stanovení ustálené anizotropie fluorescence

### Materiál:

1,6-diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) 1 mmol/l ve směsi aceton-voda (1:1, v/v) (Life Technologies)

(1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatrien (TMA-DPH) 0,5 mmol/l ve směsi aceton-voda (1:1, v/v) (Life Technologies)

Suspenze buněčných membrán (viz kapitola 4.6)

Lipidové izoláty (viz kapitola 4.7)

Fluorescenční sondy DPH a TMA-DPH mají schopnost se samovolně vkládat do lipidických membrán a zůstávat v hydrofobním jádře membrány v oblasti mastných kyselin (DPH), nebo na povrchu membrány v oblasti polárních hlav (TMA-DPH). Pokud je sonda excitována polarizovaným světlem, vyzářená fluorescence bude také do různé míry polarizovaná ve stejném směru. Tato míra závisí na viskozitě prostředí, ve kterém se molekula sondy nachází, na úhlu, o který se molekula stihne potočit v čase mezi excitací a vyzářením fotonu. Pro tuto míru byla zavedena veličina anizotropie fluorescence  $r_{ss}$ , která se definuje jako:

$$r_{ss} = \frac{I_r - I_k}{I_r + 2I_k}$$

kde  $I_r$  je intenzita fluorescence polarizované ve stejném směru jako excitační záření a  $I_k$  intenzita fluorescence s polarizací kolmou na excitační. Hodnota anizotropie vypovídá o fluiditě (resp. rigiditě) membrány – čím nižší  $r_{ss}$ , tím fluidnější membrána, vyšší  $r_{ss}$  znamená rigidnější membrány.

Izolované lipidy rozpuštěné v chloroformu (viz kapitola 4.7) byly převedeny do skleněné zábrusové zkumavky a odpařením chloroformu na rotační vakuové odparce byl na stěnách zkumavky vytvořen tenký lipidový film. K tomu byl následně přidán membránový pufr a zkumavka byla šestkrát 10 min intenzivně třepána na laboratorním přístroji vortex a mezi třepáními 5 min temperována ve vodní lázni o teplotě 38 °C. Dále byla používána takto vzniklá suspenze lipozómů nebo suspenze izolovaných membrán naředěná na koncentraci membránových proteinů 50 µg/ml v membránovém pufru.

Ke zkoumané suspenzi bylo přidáno takové množství roztoku fluorescenční sondy, aby její výsledná koncentrace byla 1 µmol/l. Sonda se následně zabudovala do lipidických membrán inkubací ve 37 °C po dobu 30 min. V suspenzi membrán pak byla na přístroji Fluoromax-3 (Jobin Yvon, Horiba) s polarizačními filtry měřena intenzita fluorescence rovnoběžná a kolmá k rovině polarizace excitačního záření v rozmezí teplot 20-40 °C v případě izolovaných lipidů, v případě intaktních membrán bylo rozmezí rozšířeno na 10-40 °C kvůli ploché teplotní závislosti. Vlnová délka excitačního záření byla 360 nm a vlnová délka snímané fluorescence 425 nm.

## 4.13 Seznam použitých fosfolipidů

V této práci byly použity komerčně dostupné syntetické fosfolipidy od Avanti Polar Lipids:

- Dipalmitoylfosfatidylglycerol
- Dipalmitoylfosfatidyletanolamin
- Kyselina dipalmitoylfosfatidová
- Tetramyristoylkardiolipin
- Dioleoylfosfatidylglycerol
- Dioleoylfosfatidyletanolamin
- Kyselina dioleoylfosfatidová
- Tetraoleylkardiolipin
- Difytanoylfosfatidylglycerol
- Difytanoylfosfatidyletanolamin

Komerčně dostupné lipidové izoláty:

- Sójový fosfatidylcholin (Sigma-Aldrich), jehož složení bylo v naší laboratoři analyzováno a je shrnuto v Tab. 4.3 a 4.4.
- Fosfatidylcholin z vaječného žloutku (Avanti Polar Lipids), jehož deklarovaná čistota je vyšší než 99 %; složení mastných kyselin (dle výrobce) je shrnuto v Tab. 4.4
- Extrakt polárních lipidů z *E. coli* (Avanti Polar Lipids)

Lipidické extrakty z kultur *B. subtilis* (viz kapitola 4.7)

- Exponenciálně rostoucí kultura *B. subtilis* 168
- Exponenciálně rostoucí kultura *B. subtilis* SDB206
- 24h kultura *B. subtilis* ATCC 21332
- 24h kultura *B. subtilis* 0164

**Tab. 4.3 Relativní zastoupení polárních hlav v komerčních izolátech lipidů (%)**

	<i>PS</i>	<i>PG</i>	<i>PC</i>	<i>PE</i>	<i>CL</i>
<i>sójový fosfatidylcholin</i>	28,6	-	48,3	23,2	-
<i>extrakt z E. coli</i>	-	23,2	-	67,0	9,8

**Tab. 4.4 Procentuální zastoupení mastných kyselin v komerčních izolátech lipidů**

	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	ostatní
<b>sójový fosfatidylcholin</b>	22	-	3	17	51	7
<b>vaječný fosfatidylcholin</b>	33	1	12	32	17	5
<b>extrakt z <i>E. coli</i></b>	44	29	1	16	-	10

## 5 Výsledky

Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat membránovou aktivitu surfaktinu a její závislost na lipidovém složení cílové membrány, aby bylo možno posoudit, zda se na rezistenci producenta vůči surfaktinu podílí přestavba cytoplazmatické membrány.

V první řadě bylo nutné zdokumentovat permeabilizační aktivitu surfaktinu jako takovou a následně zjistit míru závislosti této aktivity na lipidovém složení cílové membrány. Dále byl zkoumán příspěvek jednotlivých fosfolipidových tříd k odolnosti membrány vůči permeabilizační aktivitě surfaktinu. Kombinace efektů těchto fosfolipidových tříd v komplexních směsích pak byla testována na lipidech izolovaných přímo z kultur *B. subtilis* a na směsích syntetických fosfolipidů, které měly složení izolovaných lipidů napodobit. V neposlední řadě byla také porovnávána fluidita membrán *B. subtilis*, jako jeden z možných projevů adaptační reakce k přítomnosti surfaktinu.

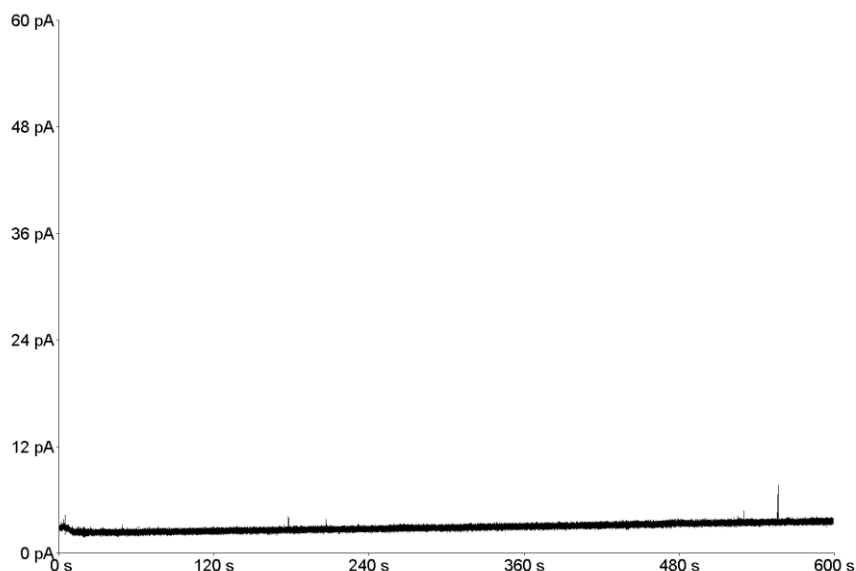
### 5.1 Sledování elektrické vodivosti membrán pomocí metody BLM

Pro charakterizaci pórotvorné aktivity surfaktinu byla použita metoda BLM (viz kapitola 4.10). Již dříve bylo popsáno, že surfaktin tvoří v planárních lipidických membránách iontové kanály nebo vodivé póry (Sheppard et al. 1991; Ostroumova et al. 2010), nicméně tato aktivita nebyla dostatečně podrobně zdokumentována. Cílem této části diplomové práce bylo popsat a charakterizovat kanálotvornou aktivitu surfaktinu v experimentálním uspořádání naší laboratoře a dále zjistit, zda na velikost a distribuci kanálů tvořených surfaktinem má vliv lipidové složení cílové membrány.

#### 5.1.1 Pórotvorná aktivita surfaktinu rozpuštěného v DMSO

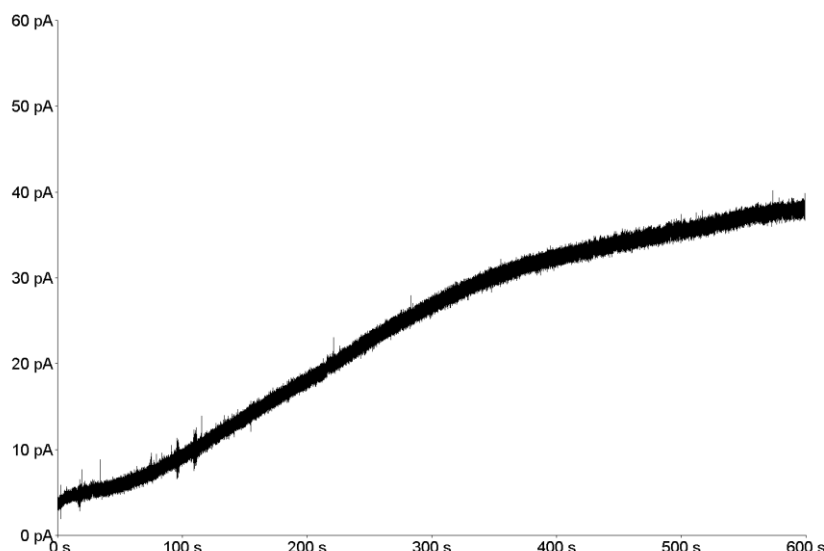
Vzhledem k omezené rozpustnosti surfaktinu ve vodě byl pro prvotní pokusy použit zásobní roztok surfaktinu v DMSO (dimetylsulfoxid) – rozpouštědle, které je často první volbou při práci s obtížně rozpustnými látkami. DMSO je netoxický a nijak neovlivňuje růst bakteriální kultury podle druhu do koncentrací v řádu jednotek až desítek procent (Basch and Gadebusc 1968). Přesto, že byla popsána schopnost DMSO vstupovat do membrán (Surewicz 1984; Yamashita et al. 2000), na černých lipidických membránách sám o sobě nevykazuje žádnou

pozorovatelnou aktivitu ve formě zvýšení proudu protékajícího membránou (Obr. 5.1). Na záznamu je sice patrné mírné zvyšování proudu v jednotkách několika pA, to je ovšem na membránách připravovaných metodou „painting“ běžné.



**Obr. 5.1 Záznam vodivosti membrány tvořené DPhPG v přítomnosti 10% DMSO**  
*Reprezentativní záznam vodivosti membrány v přítomnosti DMSO o výsledné koncentraci 10% na cis straně membrány. Mírný nárůst vodivosti v průběhu několika minut v řádu několika pA je po vytvoření membrány běžným jevem.*

Pro stanovení pórotvorné aktivity byl surfaktin přidán ze zásobního roztoku v DMSO na cis stranu membrány na výslednou koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  (5% DMSO). Na rozdíl od očekávaných skokových nárůstů proudu značících otevírání, resp. zavírání, kanálů po zabudování surfaktinu do membrány, proud procházející membránou namísto toho plynule stoupal (Obr. 5.2), aniž by byly rozpoznatelné jednotlivé skokové nárůsty.



**Obr. 5.2 Záznam vodivosti membrány tvořené DPhPG při 1  $\mu\text{mol/l}$  surfaktinu v DMSO**  
 Reprezentativní záznam nárůstu vodivosti membrány po přidavku surfaktinu na cis stranu membrány, výsledná koncentrace DMSO byla 5%.

Nárůst vodivosti byl pozorován na všech membránách, ať vytvořených před přidavkem surfaktinu nebo vytvořených již za přítomnosti surfaktinu v roztoku na cis straně, a to s obdobným průběhem i amplitudou. Amplituda se v průběhu měření mírně snižovala – každá další vytvořená membrána dosáhla nižší vodivosti než předchozí. Intenzivní promíchání obsahu měřicí komůrky opět amplitudu nárůstu mírně zvýšilo.

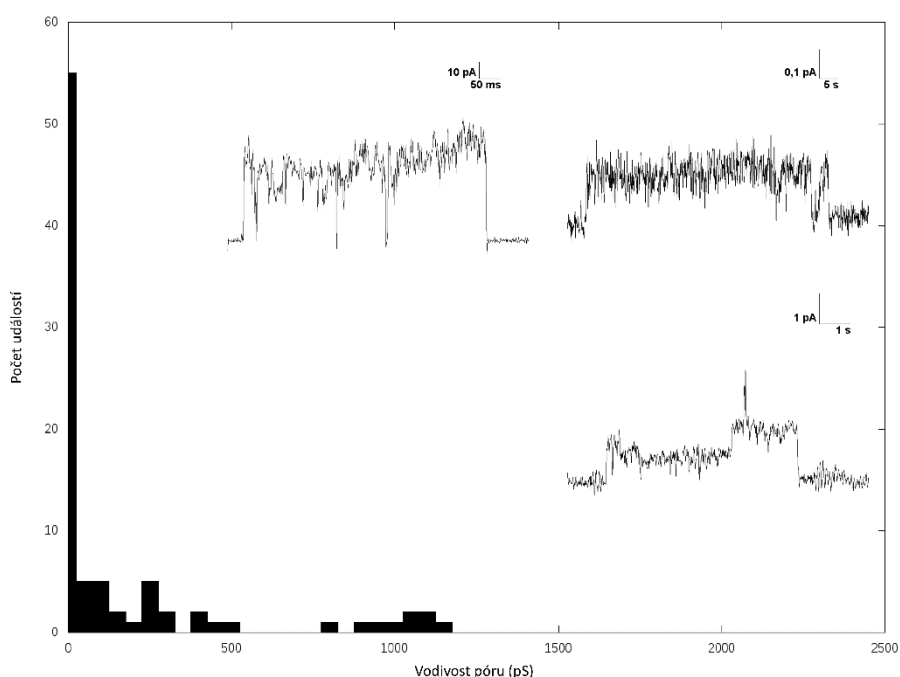
Z uvedených výsledků lze uzavřít, že surfaktin o koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  rozpuštěný v DMSO způsoboval na černých lipidických membránách plynulý nárůst proudu, aniž by byly rozlišitelné jednotlivé vodivostní stavy. Samotný DMSO žádnou pozorovatelnou vodivostní aktivitu nevykazoval.

### 5.1.2 Pórotvorná aktivita surfaktinu rozpuštěného ve vodném roztoku

Vzhledem k absenci charakterizovatelných kanálů jsme stáli před dilematem, jak k získaným datům přistoupit. Vyšší rozlišení, ve kterém by potenciálně mohly být odhalitelné jednotlivé kroky v nárůstu proudu, nebylo v našich technických možnostech vzhledem k relativně velkému šumu vlastnímu planární lipidické membráně o ploše 0,5 mm<sup>2</sup>. Navíc dříve v literatuře

popsané kanály byly dostatečně velké, aby je námi používaná měřící metoda zachytila. Jedním z možných důvodů pro rozpor našich měření s publikovanými daty bylo použité rozpouštědlo surfaktinu. Proto bylo přistoupeno k přípravě nového zásobního roztoku. Sheppard v roce 1991 (Sheppard et al. 1991) popsal rozpouštění surfaktinu v zásaditém vodném roztoku, proto byl připraven zásobní roztok surfaktinu v 10 mmol/l NaOH. Použitá výsledná koncentrace surfaktinu byla vyšší než v předchozím případě – 2 a 4  $\mu\text{mol/l}$  na cis straně.

Při použití tohoto vodného zásobního roztoku surfaktinu byly již v záznamu pozorovány skokové nárůsty proudu svědčící o přítomnosti kanálů na membráně. Distribuce jejich velikostí byla velmi široká - vodivost nejmenších kanálů byla přibližně 2 pS a největší zaznamenané kanály měly více než 1 nS (Obr. 5.3 a 5.4).

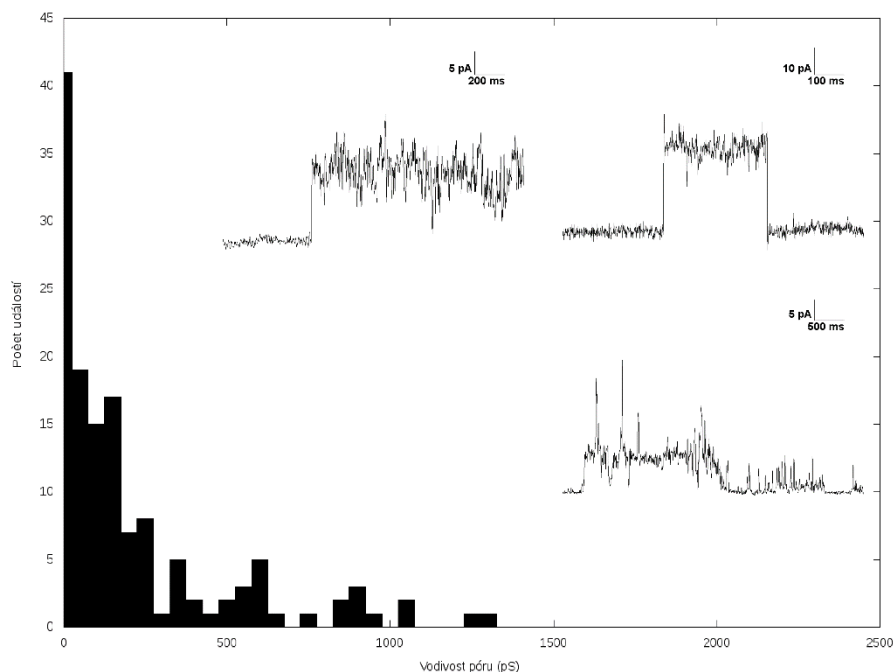


**Obr. 5.3 Histogram vodivostí kanálů v membráně tvořené DPhPG s 2  $\mu\text{mol/l}$  surfaktinu**  
*Surfaktin o výsledné koncentraci 2  $\mu\text{mol/l}$  přidáný z vodného zásobního roztoku tvořil širokou distribuci kanálů jak z hlediska vodivosti a doby života, tak stability a průběhu. Do histogramu jsou vloženy typické ukázky různých zaznamenaných kanálů.*

Vytvořené histogramy zaznamenaných vodivostí přibližně odpovídaly Poissonovu rozdělení. V otevřeném stavu vodivost kanálů výrazně kolísala a často bylo otevřeno několik různých kanálů zároveň. Některé kanály se navíc neuzavřely po celou dobu existence dané



membrány, čímž velmi zvyšovaly hladinu šumu v záznamu. To znemožnilo hodnotit dobu trvání otevřeného stavu jednotlivých kanálů, jelikož jednotlivá uzavření nebyla vždy pozorovatelná a v případě že ano, nebylo možné je spolehlivě přiřadit ke konkrétnímu otevření.



**Obr. 5.4 Histogram vodivostí kanálů v membráně tvořené DPhPG s 4  $\mu\text{mol/l}$  surfaktinu**  
Koncentrace surfaktinu 4  $\mu\text{mol/l}$  tvořila obdobně širokou velikostní škálu kanálů jako 2  $\mu\text{mol/l}$ , změnila se pouze četnost výskytu ve prospěch kanálů s vyšší vodivostí. Do histogramu jsou vloženy ukázky různých typů zaznamenaných kanálů.

V obou použitých koncentracích surfaktinu byl zaznamenán srovnatelný rozsah vodivostí. Nejčastěji se vyskytující kanály byly v obou koncentracích menší než 50 pS, ale zvýšení koncentrace surfaktinu vedlo k nárůstu relativního zastoupení kanálů s vodivostmi v řádu několika stovek pS. Námi naměřený rozsah vodivostí nemusí být konečný, nemůžeme vyloučit existenci ještě menších kanálů, které nejsou identifikovatelné kvůli šumu. Navíc počet malých kanálů byl pravděpodobně podhodnocený, protože ve chvílích, kdy je otevřený větší kanál, se snížila schopnost identifikovat v záznamu velmi malé kanály kvůli výraznému nárůstu šumu.

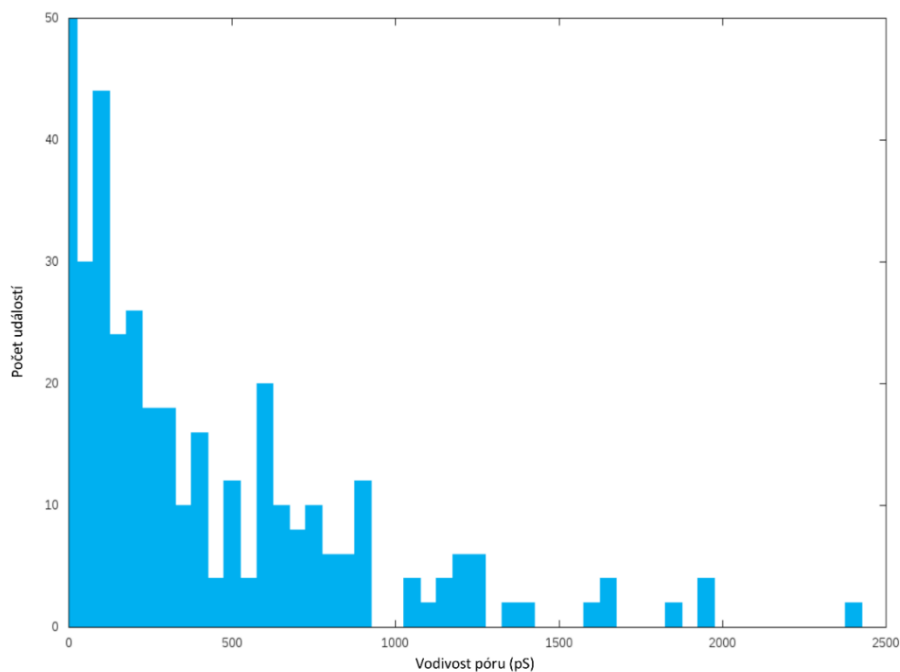
Stejně tak horní hranice měřícího rozsahu je omezená použitým zesilovačem (v tomto případě 100 GV/A) a záznamovým zařízením.

Surfaktin rozpuštěný ve vodném roztoku na rozdíl od roztoku v DMSO na černých lipidických membránách tvořil zaznamenané kanály. Jejich velikost měla rozptyl od 2 pS až do větších než 1 nS a distribuce velikostí připomínala Poissonovo rozdělení. Při zvýšení koncentrace se rozsah vodivostí zaznamenaných kanálů nezměnil, ale v souladu s Poissonovým rozdělením se zvýšilo relativní zastoupení kanálů s vyšší vodivostí oproti těm s menší.

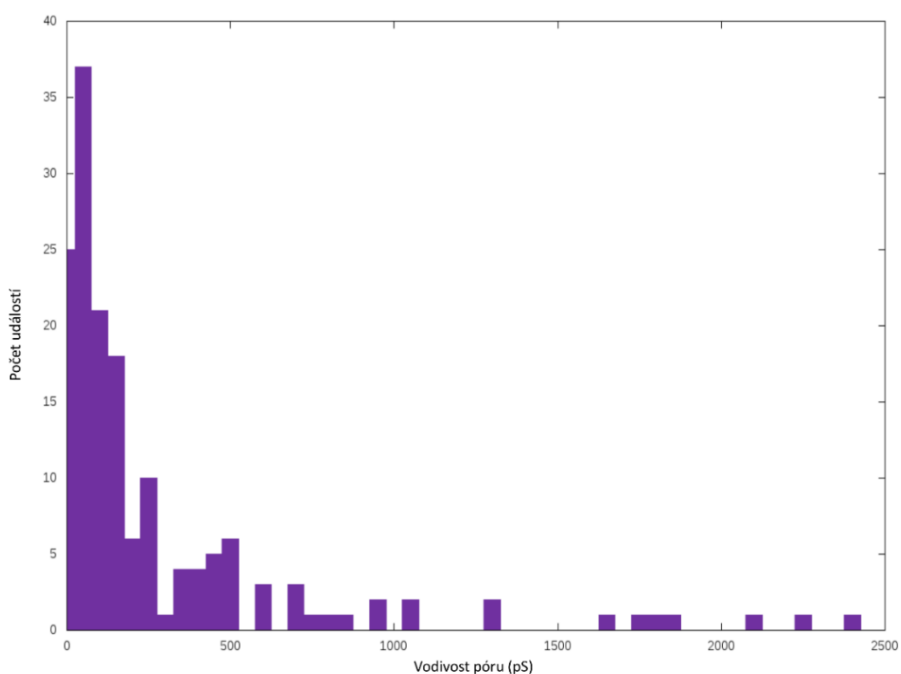
### 5.1.3 Vliv složení lipidů membrány na velikost a distribuci kanálů tvořených surfaktinem

Metodou černých lipidických membrán byl dále zkoumán vliv rozdílného složení membrány na pórtvornou aktivitu surfaktinu. Cílem bylo zjistit, zda a jak může různé lipidové složení membrány ovlivňovat charakter (velikost a/nebo distribuci) kanálů tvořených surfaktinem a zda se tedy případný rozdíl v účinku surfaktinu na membrány různého složení může odehrávat už na úrovni velikosti kanálů, které v ní vytváří.

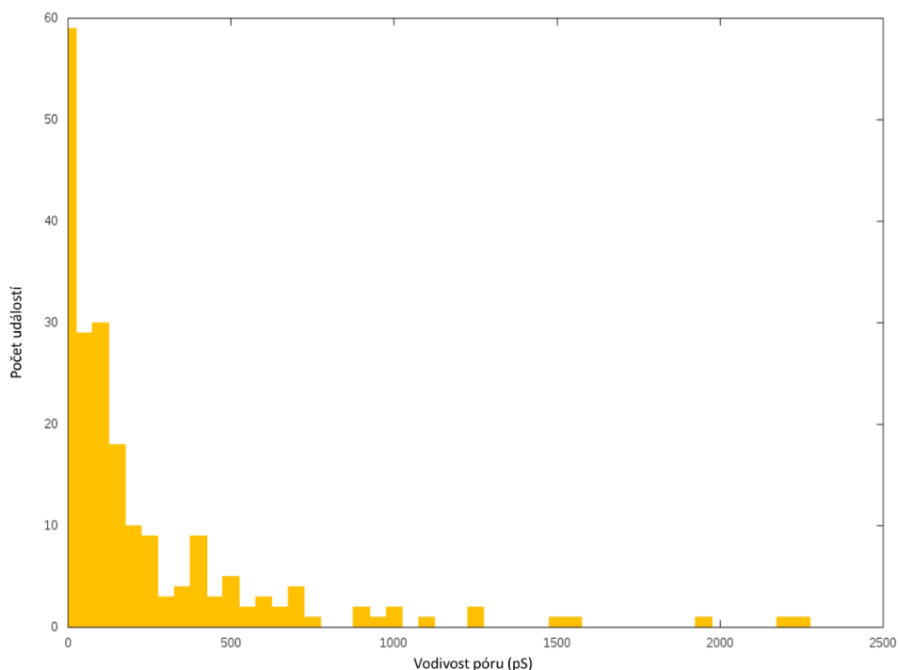
Byla použita dvousložková směs syntetických lipidů DPhPG a DPhPE (Obr. 5.5) v poměru 2:1 (m/m), který odpovídá poměru těchto dvou majoritních lipidů v membráně *B. subtilis* v exponenciální fázi růstu (viz kapitola 2.3.4), a dále komplexní lipidové směsi – sójový fosfatidylcholin (Obr. 5.7) simulující eukaryotní membránu a komerčně dostupný izolát fosfolipidů z *E. coli* (Obr. 5.6) zastupující prokaryotní membránu. Vytvořit planární membrány z fosfolipidů izolovaných přímo z bakteriální kultury *B. subtilis* se nepodařilo kvůli nerozpustnosti izolátu v žádné ze zkoušených směsí rozpouštědel použitelných k tvorbě planárních membrán.



**Obr. 5.5 Histogram vodivostí kanálů v membráně tvořené DPhPG:DPhPE 2:1**  
 Koncentrace surfaktinu 4  $\mu\text{mol/l}$  na cis straně membrány. Nejčastěji jsou zastoupené kanály s vodivostí pod 50 pS, vodivosti v řádu stovek pS mají vysokou relativní četnost.



**Obr. 5.6 Histogram vodivostí kanálů v membráně tvořené PL extraktem z E. coli**  
 Koncentrace surfaktinu 4  $\mu\text{mol/l}$  na cis straně membrány. Nejčastější vodivost kanálů je mezi 50 a 100 pS, vyšší vodivosti se vyskytují méně než v případě směsi DPhPG:DPhPE.



**Obr. 5.7 Histogram vodivostí kanálů v membráně tvořené sójovým fosfatidylcholinem**  
 Koncentrace surfaktinu 4  $\mu\text{mol/l}$  na *cis* straně membrány. Distribuce vodivostí je srovnatelná s čistým DPhPG, nejvíce jsou zastoupené kanály s vodivostí do 50 pS.

Zaznamenaný rozsah vodivostí byl na membránách všech složení srovnatelný, pouze s mírně odlišnou distribucí. Z důvodů uvedených v kapitole 5.1.2 nebylo možné hodnotit jiné charakteristiky než amplitudu otevření kanálů. Oba komplexní systémy mají distribuci srovnatelnou s DPhPG, u směsi DPhPG:DPhPE je však viditelně vyšší výskyt kanálů s vodivostí v řádu několika stovek pS. Membrány složené z lipidů *E. coli* mají jako jediné nejvíce zastoupenou vodivost mezi 50 a 100 pS (na rozdíl od < 50 pS). K měření na těchto membránách byl použit zesilovač 10 GV/A (na rozdíl od předchozích dat se 100 GV/A zesilovačem), čímž byla zvýšena horní hranice zaznamenaných vodivostí. Frekvence výskytu událostí, které spadají do tohoto rozšíření rozsahu (mezi 1500 a 2500 pS) je ovšem velmi nízká (jednotlivé kanály).

Rozsah vodivostí zaznamenaných na membránách různého složení je tedy srovnatelný, rozdíly jsou v rozložení velikostí zaznamenaných vodivostí. V membránách ze směsi DPhPG:DPhPE bylo výrazně vyšší relativní zastoupení kanálů s vodivostí několika set pS a v membránách z lipidů *E. coli* byla posunutá nejčastější zaznamenaná vodivost z intervalu 0-50 do 50-100 pS.

## 5.2 Únik fluorescenční sondy z lipozómů

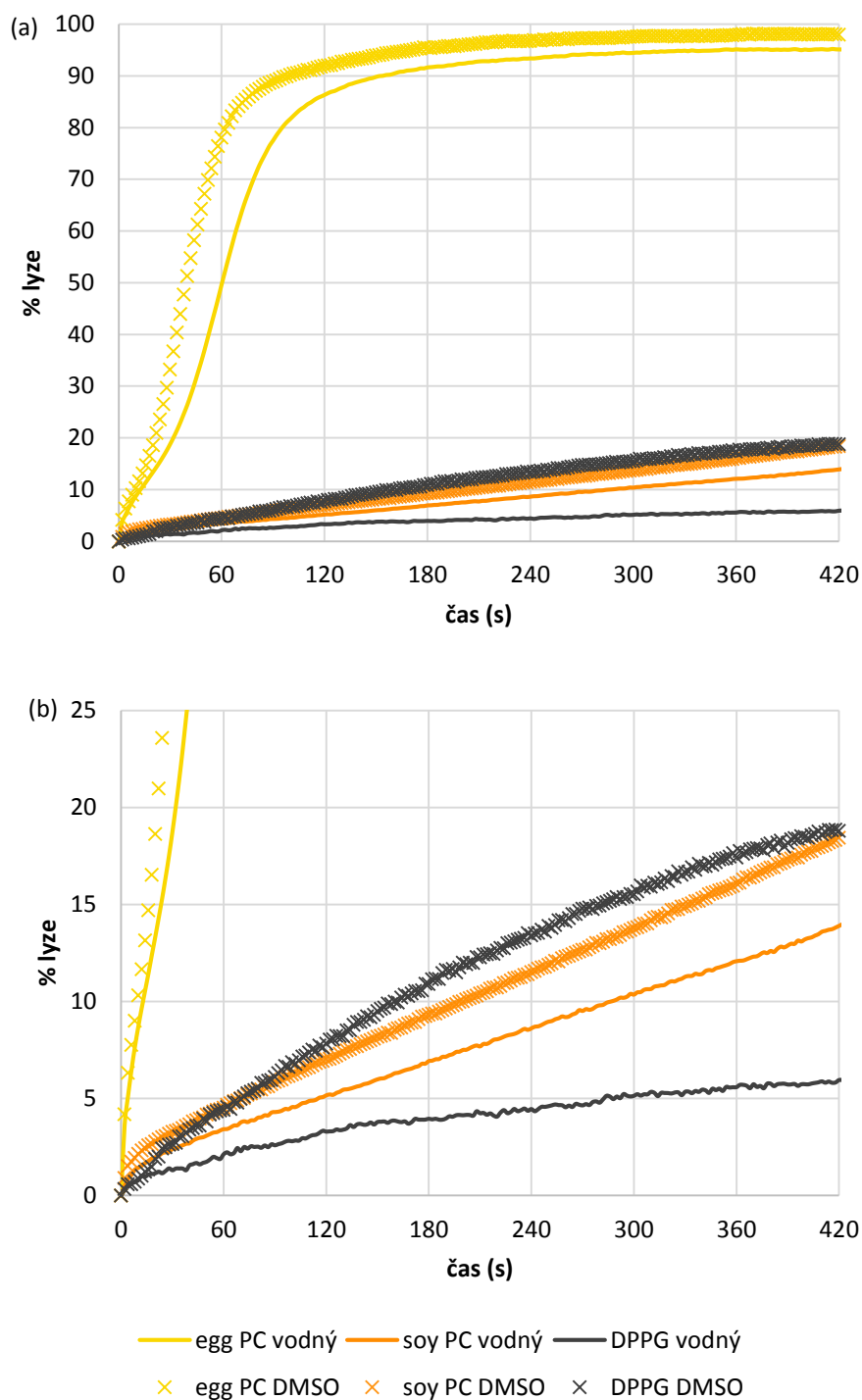
Měření úniku fluorescenční sondy z lipozómů umožňuje zkoumání a dokonce souběžné porovnávání odolnosti membrán různého složení vůči permeabilizačnímu účinku surfaktinu. Naším cílem bylo pomocí této metody zhodnotit závislost účinku surfaktinu na fosfolipidovém složení membrány a zmapovat vliv jednotlivých fosfolipidových tříd vyskytujících se v membránách *B. subtilis*, u kterých bylo v naší laboratoři zjištěno, že se jejich hladina v membráně vlivem přítomnosti surfaktinu mění. Jedná se konkrétně o PG, PE, CL a PA (viz kapitola 2.3.4).

Měření úniku fluorescenční sondy z lipozómů poskytuje obdobnou informaci jako měření proudu procházejícího přes černé lipidické membrány v tom smyslu, že popisuje narušení bariérové funkce membrány. Oba experimentální přístupy se ale velmi odlišují v měřítku – zatímco BLM sleduje jednotlivé molekuly případně oligomery tvořící jeden, maximálně několik málo kanálů, měřením úniku sondy z lipozómů sledujeme dynamiku permeabilizace membrány na makroskopické úrovni. Rozdíly jsou i v poměru množství fosfolipidů (a tedy plochy membrány) a použité koncentrace testované látky. Zatímco na černých lipidických membránách je do roztoku o objemu 1,5 ml exponovaná membrána o ploše 0,5 mm<sup>2</sup>, při měření úniku sondy z lipozómů je to přibližně 5 cm<sup>2</sup> ve 100 μl suspenze. Odlišná je také tloušťka membrány (rozpouštědla použitá k tvorbě membrány metodou „painting“ mírně zvětšují tloušťku membrány) a zejména zakřivení membrány (planární dvojvrstva vs. kulovitá dvojvrstva váčku). Také velikost pórů sledovatelných oběma metodami je odlišná. Na BLM jsou zaznamenatelné kanály, kterými prochází jednotlivé ionty. Naopak póry v lipozómech musí být dostatečně velké, aby jimi prošla molekula karboxyfluoresceinu, jinak nejsou touto metodou zachytitelné.

### 5.2.1 Výběr nosičového systému pro testované fosfolipidy

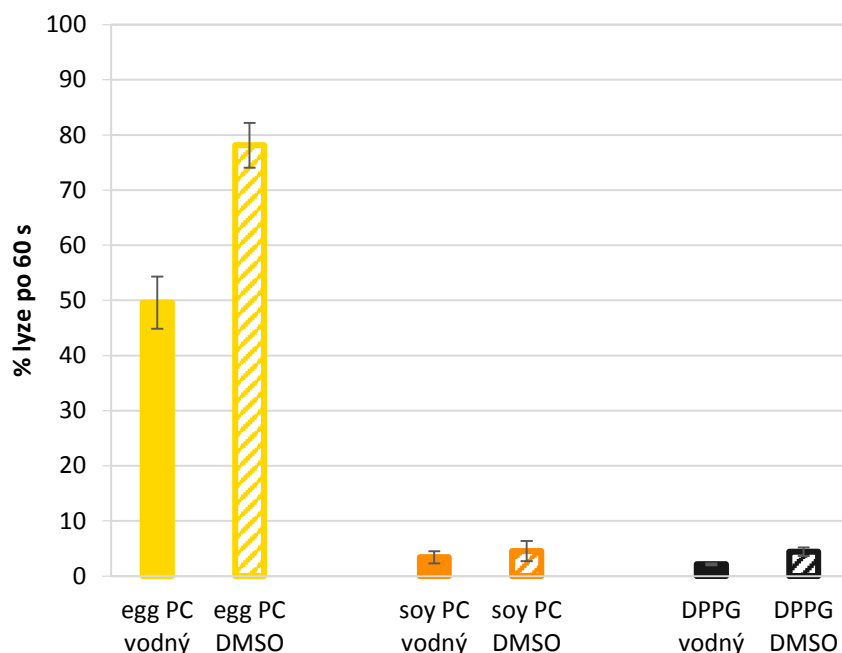
Pro prozkoumání vlivu jednotlivých fosfolipidů na odolnost membrány vůči působení surfaktinu je třeba nějaký nosičový systém, do kterého budou lipidy přimíchávány. Porovnávat lipozómy tvořené pouze námi zkoumanými fosfolipidy není možné, protože s výjimkou DPPG fosfolipidy esterifikované dvěma palmitovými (resp. čtyřmi myristovými v případě CL) mastnými kyselinami samy o sobě netvoří stabilní lipozómy. Kardiolipin, fosfatidyletanolamin

a kyselina fosfatidová se mohou tvorby lipozómů účastnit pouze jako příměsi. Pro výběr vhodného tzv. nosičového systému pro tyto fosfolipidy byly tedy připraveny lipozómy ze sójového fosfatidylcholinu (označované jako soy PC), fosfatidylcholinu izolovaného z vaječných žloutků (označované jako egg PC) a ze syntetického DPPG (Obr. 5.8 a Obr. 5.9) a nejprve byla měřena kinetika lyze surfaktinem pouze v těchto jednoduchých lipidových systémech. Pro měření byly připravené suspenze lipozómů naředěny na koncentraci 25  $\mu\text{mol/l}$  anorganického fosfátu. Koncentrace fosfátu v nejkonzentrovější frakci lipozómů byly 1 mmol/l pro egg PC, 0,9 mmol/l pro soy PC a 0,7 mmol/l pro DPPG. Testovány byly opět oba zásobní roztoky surfaktinu – tj. vodný a roztok v DMSO.



**Obr. 5.8 Lyze lipozómů tvořených sójovým cholinem, vaječným cholinem a DPPG**

Výsledná koncentrace surfaktinu v květetě byla  $10 \mu\text{mol/l}$ , byl použit jak vodný zásobní roztok (čára), tak zásobní roztok v DMSO (body). Koncentrace lipidů byla  $25 \mu\text{mol/l}$ . Surfaktin byl přidán v čase 0 s, jako 100 % je označena lyze dosažená po přidavku 0,02% Triton X-100. Výsledné křivky jsou průměrem nejméně 4 opakování. (a) Znáznorňuje celé měřítko, (b) je detailnější zobrazení lyze soy PC a DPPG.



**Obr. 5.9 Míra lyze lipozómů dosažená po 60 s**

Průměrná úroveň lyze dosažená 60 s po přidavku surfaktinu na výslednou koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  (data z Obr. 5.8). Roztok surfaktinu v DMSO lipozómy permeabilizoval s větší účinností. Plné sloupce znázorňují surfaktin přidávaný z vodného roztoku, šrafované z roztoku v DMSO.

Různé lipidové systémy podléhaly lyzi surfaktinem značně rozdílnou měrou (Obr. 5.8, Obr. 5.9). Zatímco z lipozómů tvořených vaječným fosfatidylcholinem uniklo po jedné minutě 50 % (vodný roztok) resp. 80 % (DMSO) obsahu, lyze sójových ani fosfatidylglycerolových nedosáhla za stejných podmínek ani 5 %. Rozdíly mezi účinky různých zásobních roztoků surfaktinu se zde projeví vyšší účinností lyze roztokem surfaktinu v DMSO.

Pro další pokusy byl tedy jako nosičový lipid vybrán vaječný fosfatidylcholin. Za prvé jeho rychlejší lyze umožňuje lépe pozorovat případné stabilizační efekty přísadků a za druhé je ve srovnání se sójovým fosfatidylcholinem definovanější – sójový PC je dle výrobce fosfatidylcholinem tvořen pouze z 24 % a teoreticky může obsahovat i fytoosteroly, které by mohly interferovat s účinkem surfaktinu podobně jako cholesterol (Carrillo et al. 2003). V neposlední řadě byl vaječný PC vybrán také pro vysokou účinnost vytřepávání lipozómů.

Kvůli tomu, že syntetické fosfolipidy (DPPA, DPPE, TMCL) netvoří samostatně stabilní lipozómy, byly vyzkoušeny lipozómy ze sójového a vaječného fosfatidylcholinu a dále z DPPG coby nosičové systémy. Z testovaných lipidů byl jako nejvhodnější vybrán vaječný

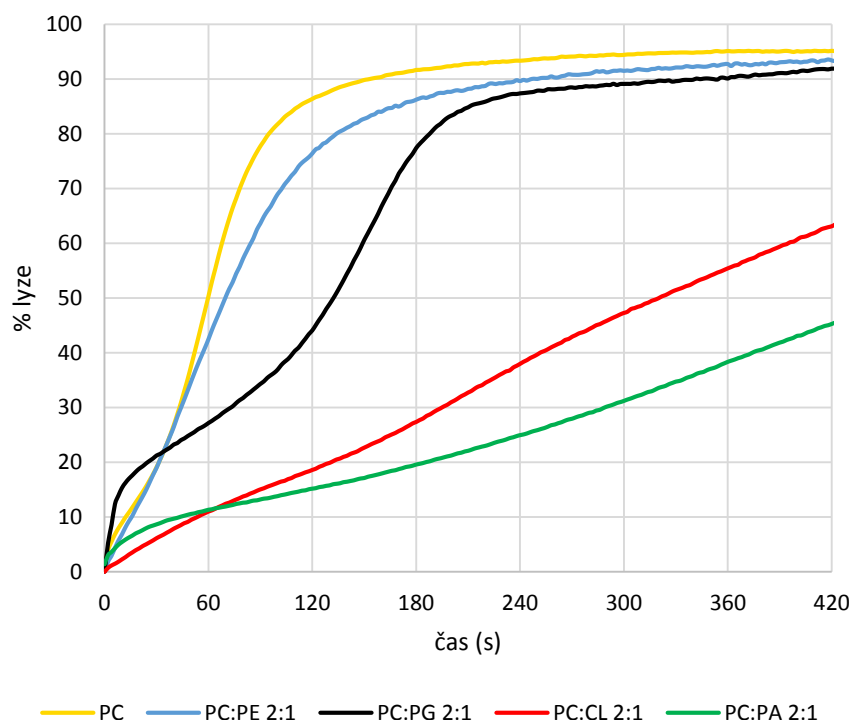


fosfatidylcholin vzhledem k větší náchylnosti k lyzi způsobené surfaktinem a vyšší definovanosti obsahu.

### 5.2.2 Vliv jednotlivých fosfolipidových tříd na odolnost lipozómů vůči lyzi surfaktinem

Cílem následujících pokusů bylo zjistit, do jaké míry mají jednotlivé testované fosfolipidy vliv na stabilitu membrány v přítomnosti surfaktinu a zda tedy v naší laboratoři již dříve popsané změny v jejich hladinách v membráně *B. subtilis* mohou být součástí adaptační reakce *B. subtilis* na přítomnost surfaktinu.

Pro následující pokusy byly připraveny lipozómy ze směsi vaječného fosfatidylcholinu a zkoumaného fosfolipidu v poměru 2:1 (m/m). Koncentrace fosfátu v použité frakci byla ve všech případech přibližně 1 mmol/l. Nadále byly testovány oba zásobní roztoky surfaktinu – jak vodný (Obr. 5.10, Tab. 5.1), tak v DMSO (Obr. 5.11, Tab. 5.2), aby bylo možné zhodnotit, do jaké míry DMSO ovlivňuje závislost účinku surfaktinu na složení membrány. Získané kinetiky byly prokládány jednou a případně více Hillovými funkcemi pomocí programu Fityk (viz kapitola 4.11). Parametry funkce vyjadřují následující: „ $\alpha$ “ amplitudu – hodnotu, ke které křivka konverguje v nekonečnu, „ $\tau$ “ poločas lyze v sekundách a „ $n$ “ Hillův koeficient, který vypovídá o kooperativitě molekul v popisovaném ději.



**Obr. 5.10 Lyze lipozómů o různém složení fosfolipidů – surfaktin ve vodném roztoku**  
 Výsledná koncentrace surfaktinu přidaného z vodného roztoku byla 10  $\mu\text{mol/l}$ , koncentrace lipidů byla 25  $\mu\text{mol/l}$ . Příměs všech zkoumaných lipidů do různé míry lipozómy ve srovnání s čistým cholinem stabilizovala. Výsledné křivky jsou průměrem nejméně tří opakování.

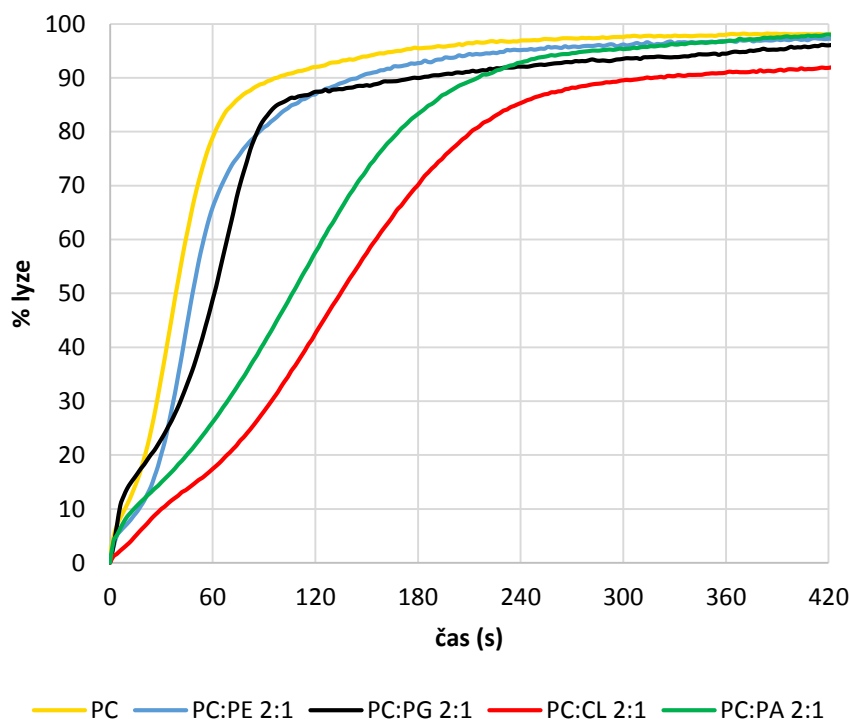
**Tab. 5.1 Parametry proložených funkcí – surfaktin ve vodném roztoku**

Lipidy	Počet funkcí	1. funkce			2. funkce			3. funkce		
		$\alpha$ (%)	$\tau$ (s)	n	$\alpha$ (%)	$\tau$ (s)	n	$\alpha$ (%)	$\tau$ (s)	n
PC	3	39	89	0,75	31	20	11	24	15	70
PC:PG	3	20	8	0,86	40	66	3,5	31	23	588
PC:PE	2	56	75	1,2	34	21	15	-	-	-
PC:CL	2	7,6	21	2,0	100	311	2,0	-	-	-
PC:PA	2	19	94	0,34	100	374	3,1	-	-	-

Přídavky všech zkoumaných fosfolipidů do různé míry fosfatidylcholinové lipozómy vystavené surfaktinu z vodného roztoku stabilizovaly. Nejvýraznější stabilizační efekt můžeme pozorovat u kyseliny fosfatidové a kardiolipinu. Z funkcí proložených kinetikami lze odečíst, že lyze lipozómů probíhá několika různými mechanismy lišícími se jak rychlostí (poločasem), tak kooperativitou.

Různé složení lipozómů také ovlivnilo různý počet zaznamenaných mechanismů vůbec – zatímco z průběhů kinetik lyze čistého PC a PC s přidavkem fosfatidylglycerolu bylo možné odečíst tři různé funkce s odlišnými parametry (a tedy tři mechanismy účinku surfaktinu), průběh kinetik lyze lipozómů s příměsí fosfatidyletanolaminu, kardiolipinu nebo kyseliny fosfatidové lze popsat pouze dvěma funkcemi. V případě čistého PC a PC s příměsí PG byla jedna funkce silně ( $n_3 = 70$ , resp. 588), druhá méně ( $n_2 = 11$ , resp. 3,5) a třetí negativně kooperativní ( $n_1 = 0,75$ , resp. 0,86).

V případě příměsí PE byla jedna funkce silněji ( $n_2 = 15$ ) a druhá velmi slabě pozitivně kooperativní ( $n_1 = 1,2$ ) a stejně jako v předchozích dvou případech měla kooperativnější funkce rychlejší průběh ( $\tau_2 = 21$  s, resp.  $\tau_1 = 75$  s). Funkce proložené kinetikou lyze lipozómů s příměsí kyseliny fosfatidové byly jedna slabě pozitivně ( $n_2 = 3,1$ ) a druhá negativně kooperativní ( $n_1 = 0,34$ ), na rozdíl od výše popsaných kinetik byla ovšem funkce s  $n > 1$  pomalejší ( $\tau_2 = 374$  s vs.  $\tau_1 = 94$  s). Zvláštním případem je kardiolipin, u nějž měly obě proložené funkce  $n = 2$ , lišily se ale amplitudou a poločasem.



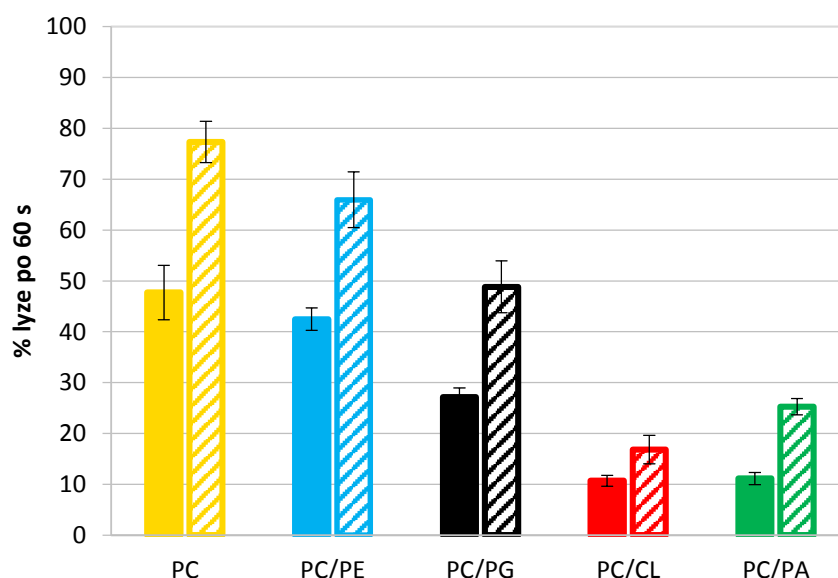
**Obr. 5.11 Lyze lipozómů o různém složení fosfolipidů – surfaktin v DMSO**

Výsledná koncentrace surfaktinu v květě byla  $10 \mu\text{mol/l}$ , výsledná koncentrace DMSO 1%, koncentrace lipidů byla  $25 \mu\text{mol/l}$ . Výsledné křivky jsou průměrem nejméně tří opakování.

**Tab. 5.2 Parametry proložených funkcí – surfaktin v DMSO**

Lipidy	Počet funkcí	1. funkce			2. funkce			3. funkce		
		$\alpha$ (%)	$\tau$ (s)	n	$\alpha$ (%)	$\tau$ (s)	n	$\alpha$ (%)	$\tau$ (s)	n
egg PC	3	38	90	0,58	37	11	11	23	11	61
PC:PG	3	28	30	0,57	33	16	19	28	10	644
PC:PE	3	23	137	0,48	26	53	2,0	48	12	27
PC:CL	3	19	31	1,6	65	53	9,7	6,3	27	656
PC:PA	3	38	151	0,60	32	38	7,3	28	36	38

Příměsí zkoumaných fosfolipidů zpomalovaly lyzi způsobenou i surfaktinem rozpuštěným v DMSO, nicméně celková rychlost lyze napříč všemi složeními lipozómů byla znatelně vyšší (Obr. 5.12). V tomto případě byly všemi kinetikami proloženy 3 funkce, jejichž parametry jsou shrnuty v Tab. 5.2. Jedna, z pravidla nejpomalejší (s nejdelším poločasem), funkce měla zápornou hodnotu n, u druhé a třetí funkce pak pozitivní hodnota n postupně narůstala. Funkce s nejvyšší hodnotou n byla zpravidla také tou nejrychlejší. Výjimku tvoří lyze lipozómů s příměsí kardiolipinu. U této kinetiky, stejně jako tomu bylo při použití vodného roztoku surfaktinu, mají všechny tři funkce  $n > 1$ , jehož hodnota jen postupně narůstá.



**Obr. 5.12 Úroveň lyze lipozómů tvořených PC s příměsemi zkoumaných lipidů dosažená po 60 s**

Přidávky všech zkoumaných fosfolipidů PC lipozómy stabilizuje, nejvýraznější je efekt v případě kardiolipinu. Roztok surfaktinu v DMSO byl ve všech případech účinnější než vodný roztok. Plné sloupce znázorňují surfaktin přidávaný z vodného roztoku, šrafované z roztoku v DMSO.

Lipozomy tvořené fosfatidylcholinem jsou samy o sobě velmi náchylné k lyzi surfaktinem. Příměsí všech zkoumaných fosfolipidů (PE, PG, CL a PA) míru lyze snižovaly. Mimo to se měnil i průběh kinetiky lyze. Kinetikami lyze lipozómů s příměsí fosfatidyletanolaminu, kardiolipinu a kyseliny fosfatidové, ke kterým byl přidán surfaktin z vodného roztoku, se daly proložit dvě Hillovy funkce, všemi zbývajícími kinetikami byly proloženy tři funkce. Z těch měla zpravidla jedna negativní kooperativitu a zbylé slabě, resp. silně pozitivní kooperativitu. Nejsilnější stabilizační efekt byl pozorován u lipozómů s příměsí kardiolipinu.

### 5.2.3 Lipidy izolované z kultur *B. subtilis*

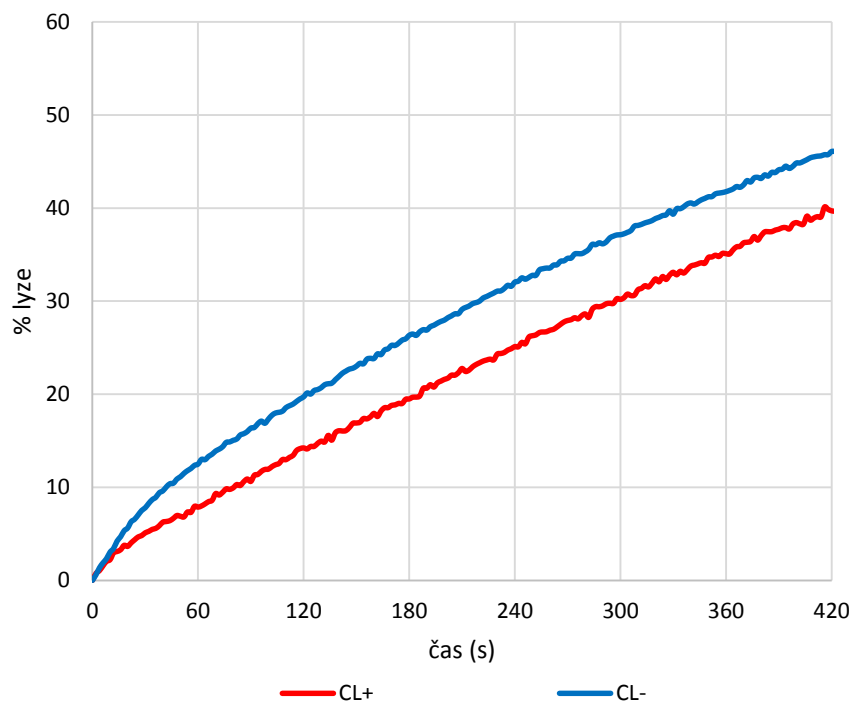
Vytvoření lipozómů přímo z lipidů izolovaných z kultur kmenů *B. subtilis* lišících se lipidovým složením membrán vypovídá o účinnosti reálných adaptačních změn na úrovni fosfolipidového složení membrány, na rozdíl od dat získaných v předchozích pokusech se syntetickými lipidy, které umožňují oddělit od ostatních vlivů efekt jednotlivých typů polárních hlav a objasnit tak jejich roli v odolnosti membrány vůči lyzi surfaktinem.

#### 5.2.3.1 Účinnost lyze lipozómů připravených z lipidů izolovaných z *B. subtilis* deficientním v syntéze kardiolipinu

Nejúčinnějšího stabilizačního efektu vůči lyzi surfaktinem bylo dosaženo příměsí kardiolipinu do lipozómů tvořených PC (viz kapitola 5.2.2). V naší laboratoři byl již dříve popsán nárůst podílu kardiolipinu v membráně *B. subtilis* v průběhu produkce surfaktinu (Seydlova et al. 2013). Za účelem ověření vlivu kardiolipinu v komplexních podmínkách membrány *B. subtilis* byly připraveny lipozomy přímo z lipidových extraktů z kultur *B. subtilis* 168 a mutantního kmene *B. subtilis* SDB206, který má přerušené všechny tři geny pro syntézu kardiolipinu (Kawai et al. 2004), není tedy schopen jeho produkce. V této kapitole budou tyto kmeny označovány jako *B. subtilis* CL+ a CL-.

Vzhledem k relativně nízkým výtěžkům (maximálně 2 mg lipidů na 1600 ml kultury v exponenciální fázi růstu) bylo množství vytvořených lipozómů relativně malé v porovnání se syntetickými lipidy (nejvyšší koncentrace lipidů ve frakci 50  $\mu\text{mol/l}$  pro CL- a 80  $\mu\text{mol/l}$  pro CL+ ve srovnání s milimolárními koncentracemi pro syntetické lipozomy), ale odolnost těchto lipozómů byla naopak znatelně vyšší. Proto byla pro následující měření použita zředěnější

suspenze lipozómů, a to o koncentraci fosfátu 10  $\mu\text{mol/l}$ . Nadále byl používán pouze vodný roztok surfaktinu. Zaznamenané kinetiky lyze a parametry proložených funkcí jsou na Obr. 5.13, resp. v Tab. 5.3.



**Obr. 5.13 Lyze lipozómů tvořených izolovanými lipidy z kultur *B. subtilis***

Výsledná koncentrace surfaktinu byla 10  $\mu\text{mol/l}$ , koncentrace lipidů 10  $\mu\text{mol/l}$ . Zobrazené křivky jsou průměrem tří opakování.

**Tab. 5.3 Parametry proložených funkcí – lipidy CL+ a CL- kmene**

Lipidy	Počet funkcí	1. funkce			2. funkce		
		$\alpha$ (%)	$\tau$ (s)	n	$\alpha$ (%)	$\tau$ (s)	n
CL+	2	13,1	123	1	56	351	2
CL-	2	93	1037	0,8	6,2	47	4

Lipozomy tvořené lipidy izolovanými z *B. subtilis* obsahujícího CL v membráně zřetelně lépe odolávaly lyzi surfaktinem, úroveň lyze po 60 s dosáhla u CL+ 7,9 % a CL- 12,5 %. Kinetikami jak CL+ tak CL- lipozómů byly proloženy dvě funkce. V obou případech měla jedna negativní (CL-,  $n_1 = 0,8$ ) nebo nulovou (CL+,  $n_1 = 1$ ) a druhá pozitivní kooperativitu ( $n_2 = 4$ , resp. 2). V případě CL+ ale měla kooperativnější funkce delší poločas ( $\tau_2 = 351$  s proti  $\tau_1 = 123$  s u méně kooperativní) na rozdíl od CL-, kde byla funkce s vyšším n výrazně rychlejší než funkce s nižším

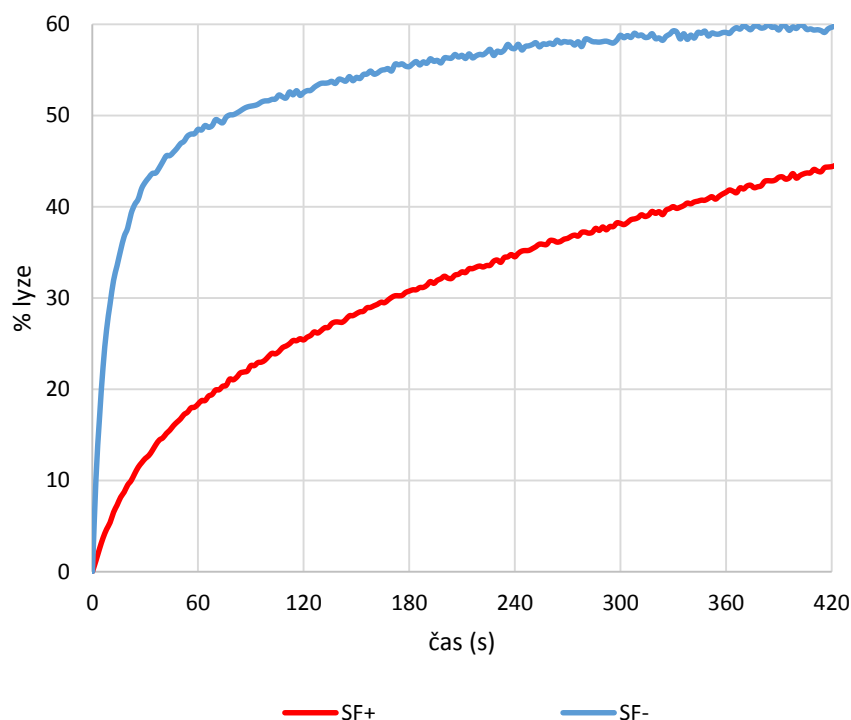
n (poločas  $\tau_2 = 47$  s proti  $\tau_1 = 1037$  s). Průběh lyze byl ovšem ve srovnání s lipozómy tvořenými fosfatidylcholinem velmi pomalý, a proto zaznamenaný časový úsek nemusí dávat kompletní informaci o průběhu kinetiky lyze.

Lipozómy tvořené lipidovým extraktem z kultur *B. subtilis* byly v přítomnosti surfaktinu výrazně stabilnější než lipozómy z fosfatidylcholinu. Lipidy kmene produkujícího kardiolipin byly odolnější, než lipidy kmene neschopného jeho syntézy. Kinetikami bylo možné proložit dvě Hillové funkce. Stabilizační účinek CL se tedy podařilo potvrdit i na úrovni komplexní směsi membránových lipidů.

#### 5.2.3.2 Účinnost lyze lipozómů vytvořených z lipidů izolovaných z kultury *B. subtilis* produkujícího surfaktin

Cílem dalšího pokusu bylo v návaznosti na předchozí výsledky naší laboratoře zjistit, do jaké míry může popsaná změna lipidového složení membrány (viz kapitola 2.3.4, Tab. 2.4) související s produkcí surfaktinu kulturou *B. subtilis*, ovlivnit odolnost membrány k permeabilizačnímu efektu surfaktinu. Využity byly lipidy buněk produkujících a neprodukujících surfaktin, tedy buněk adaptovaných, resp. neadaptovaných k surfaktinu.

Fosfolipidy byly izolovány ze stacionárních kultur (24 h kultivace) kmene produkujícího surfaktin (označený SF+) – *B. subtilis* ATCC 21332 a kmene s mutací v sfp genu esenciálním pro syntézu surfaktinu, který tedy není schopný jeho produkce (označený SF-) – *B. subtilis* 0164. Izolované lipidy membrány kmene neschopného produkce surfaktinu sloužily jako kontrola pro odstínění případného vlivu pokročilé stacionární fáze. Lipozómy byly připraveny přímo z lipidového izolátu a naředěny na koncentraci fosfátu 10  $\mu\text{mol/l}$ . Koncentrace použitých frakcí suspenze lipozómů po odstranění volné sondy byly 240  $\mu\text{mol/l}$  pro SF- a 80  $\mu\text{mol/l}$  pro SF+. Výsledky měření jsou uvedeny na Obr. 5.14 a v Tab. 5.5.



**Obr. 5.14 Lyze lipozómů tvořených izolovanými lipidy ze SF+ a SF- kmenů *B. subtilis***  
 Výsledná koncentrace surfaktinu přidaného z vodného roztoku byla 10  $\mu\text{mol/l}$ , koncentrace lipidů 10  $\mu\text{mol/l}$ . Zobrazené křivky jsou průměrem tří opakování.

**Tab. 5.5 Parametry proložených funkcí – lipidy SF+ a SF- kmene**

Lipidy	Počet funkcí	1. funkce			2. funkce			3. funkce			$\chi^2$
		$\alpha$ (%)	$\tau$ (s)	n	$\alpha$ (%)	$\tau$ (s)	n	$\alpha$ (%)	$\tau$ (s)	n	
SF+	2	11	29	1,0	57	590	0,8	-	-	-	-
SF-	2	34	10	0,8	27	155	0,6	-	-	-	0,32
	3	32	6	1,0	14	119	1,73	15	18	1,9	0,23

Na Obr. 5.14 je vidět, že lipozómy vytvořené z lipidů SF+ kmene v porovnání se SF- lépe odolávaly působení surfaktinu, míra lyze po 60 s je u SF+ 18,4 % oproti 48,5 % u SF-. Kinetikou SF+ lipozómů byly proloženy dvě funkce, jedna s Hillovým koeficientem 1, což značí nulovou kooperativitu, a relativně rychlým průběhem ( $\tau_1 = 29$  s) a druhá s negativní kooperativitou ( $n_2 = 0,8$ ) a pomalým průběhem ( $\tau_2 = 590$  s). U kinetiky lyze SF- lipozómů přidání třetí funkce sice zmenšilo  $\chi^2$  (kvadratickou odchylku) oproti dvěma funkcím, nicméně časový úsek, po který byla kinetika lyze zaznamenávána nebyl dostatečně dlouhý na to, aby bylo možné rozhodnout, které ze dvou možností proložení funkcí je správné. V Tab. 5.5 jsou proto uvedeny obě možnosti.

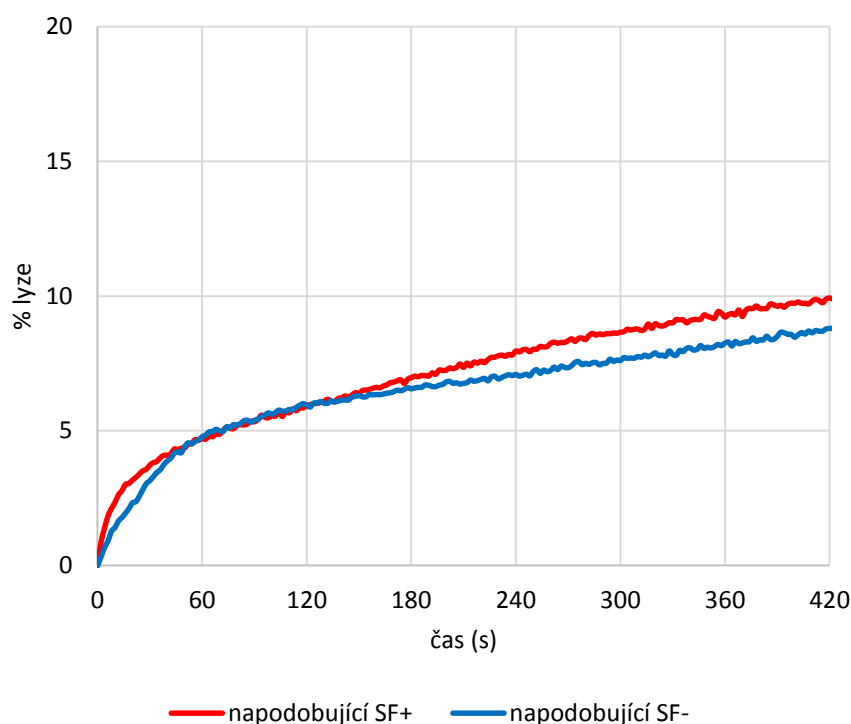


Lipidy adaptovaného kmene byly odolnější než lipidy neadaptovaného kmene. Kinetikou lyze SF+ lipozómů bylo možné proložit dvě Hillovy funkce, v kinetice SF- lipozómů nebylo možno rozhodnout, zda ji lépe popisují dvě nebo tři funkce. Změny ve složení lipidů membrány lze ale na základě těchto výsledků považovat za součást mechanismů, pomocí nichž producent je schopen tolerovat přítomnost surfaktinu.

#### 5.2.4 Lipidové směsi napodobující membránu *B. subtilis*

Dalším cílem práce bylo připravit lipozómy ze směsí fosfolipidů napodobujících složení membrán *B. subtilis* v různých fyziologických stavech (adaptovaných a neadaptovaných k surfaktinu). Tento systém by mohl dát přesnější představu o vlivu jednotlivých fosfolipidových tříd v komplexní směsi o různých vzájemných poměrech, protože lze důvodně předpokládat, že daný lipid se bude chovat odlišně samostatně nebo ve směsi s ostatními lipidy tak, jak je tomu v buněčné membráně. Tento experimentální přístup navíc odstíní případný efekt jiných než fosfolipidových složek membrány a navíc je bez vlivu případného rozdílného složení mastných kyselin.

Z fosfolipidů esterifikovaných dvěma olejovými kyselinami byly připraveny lipozómy svým složením napodobující membrány *B. subtilis* produkujícího surfaktin a surfaktin deficientní mutanty ve stacionární fázi (viz kapitoly 5.2.3.2 a 2.3.4). Navážky jednotlivých lipidů (PG, PE, CL a PA) byly vypočítány z údajů ze sloupce označeného jako  $t_{20}$  v Tab. 2.4 a jejich molekulových hmotností. Výsledky měření jsou uvedeny v Obr. 5.15 a Tab. 5.6. Použitá koncentrace lipozómů a surfaktinu byla v tomto případě 10 resp. 50  $\mu\text{mol/l}$ .



**Obr. 5.15 Lyze lipozómů napodobujících membrány SF+ s SF- kultur *B. subtilis***

Suspenze lipozómů byla naředěna na koncentraci fosfátu 10  $\mu\text{mol/l}$ , výsledná koncentrace surfaktinu byla 50  $\mu\text{mol/l}$ . Zobrazené křivky jsou průměrem tří opakování.

**Tab. 5.6 Parametry proložených funkcí – směsi napodobujících membrány SF+ a SF- kmen**

Složení v % (PG:PE:PA:CL)*	Napodobuje	1. funkce			2. funkce		
		$\alpha$ (%)	$\tau$ (s)	n	$\alpha$ (%)	$\tau$ (s)	n
19:13:42:26	SF+	4	19	0,6	8	281	1,4
33:19:38:10	SF-	6	42	0,9	9	405	2,6

\* Procentuální zastoupení vypočtené z molárních koncentrací (viz Tab. 5.5). Procentuální zastoupení testovaných lipidů tvoří dohromady 100 %.

Úroveň lyze dosažená na konci zaznamenaného časového úseku byla 8,8 % v případě SF+ a 9,9 % u SF-, a to přes použití pětinasobné (ve srovnání s předchozími pokusy) koncentrace surfaktinu. Ve srovnání s lipozómy tvořenými PC s příměsí sledovaných fosfolipidů je poměr lipid : surfaktin dokonce 12,5 krát vyšší. Při takto malých intenzitách lyze jsou rozdíly obtížně pozorovatelné. Oběma kinetikami byly proloženy dvě Hillovy funkce, rychlejší ( $\tau_1 = 19$  resp. 42 s) negativně kooperativní ( $n_1 = 0,6$  resp. 0,9) a pomalejší ( $\tau_2 = 281$  resp. 405 s) s mírnou pozitivní kooperativitou ( $n_2 = 1,4$  resp. 2,6).

Lipozómy tvořené ze směsí fosfolipidů esterifikovaných dvěma olejovými kyselinami byly vůči působení surfaktinu velmi rezistentní. Přes použití vyšší koncentrace surfaktinu dosáhly za sledovaný časový úsek pouze necelých 10 % maximální lyze. Zaznamenaný časový úsek proto popisuje jen malou část průběhu lyze. Relevance funkcí proložených těmito kinetikami je proto velmi omezená, pro přesnější vyhodnocení bude nutné pokusy opakovat a výrazně prodloužit dobu měření. Za těchto podmínek není možné posoudit, která směs fosfolipidů je vůči působení surfaktinu odolnější, prokázat stabilizační efekt přestavby membrány se tedy tímto experimentem nepodařilo.

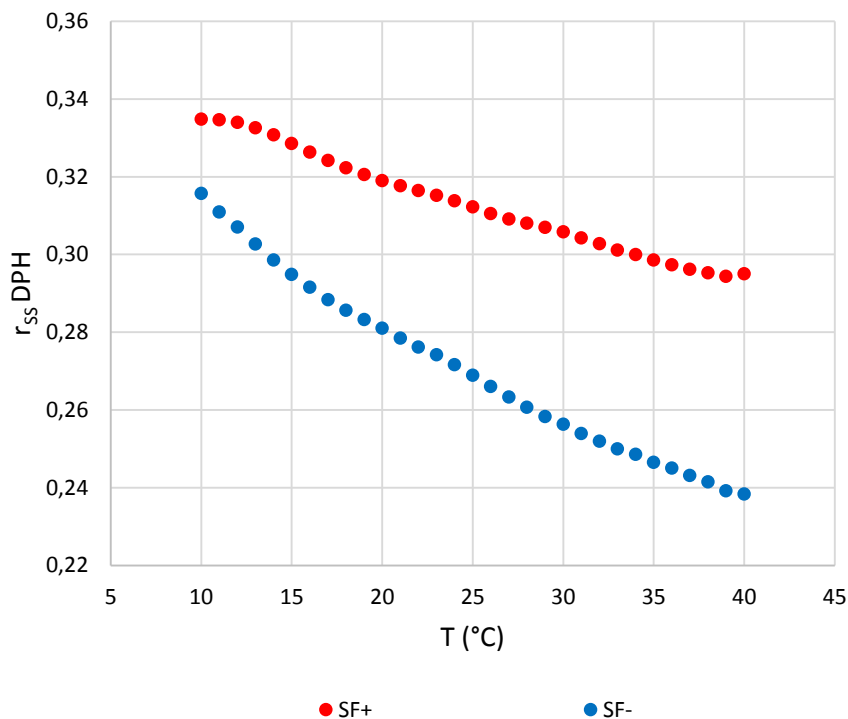
### 5.3 Stanovení ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH

Měření ustálená anizotropie fluorescence sondy DPH, případně polárního derivátu TMA-DPH, poskytuje informaci o fluiditě membrány v hydrofobním jádře (DPH) a v oblasti polárních hlav (TMA-DPH) fosfolipidů. Přítomnost surfaktinu v membráně zvyšuje její fluiditu (Carrillo et al. 2003), proto by součástí adaptační reakce mohla být rigidizace membrány. Cílem těchto pokusů proto bylo porovnat fluiditu membrán adaptovaných a neadaptovaných buněk. Použití obou fluorescenčních sond umožní porovnat vliv změn složení polárních hlav a mastných kyselin.

Vyšší hodnota ustálené anizotropie vypovídá o vyšší rigiditě membrány. Odečítala se hodnota  $r_{ss}$  v teplotě rovné kultivační (30 °C) a pokud možno rozdíl teplot pro stejnou hodnotu anizotropie.

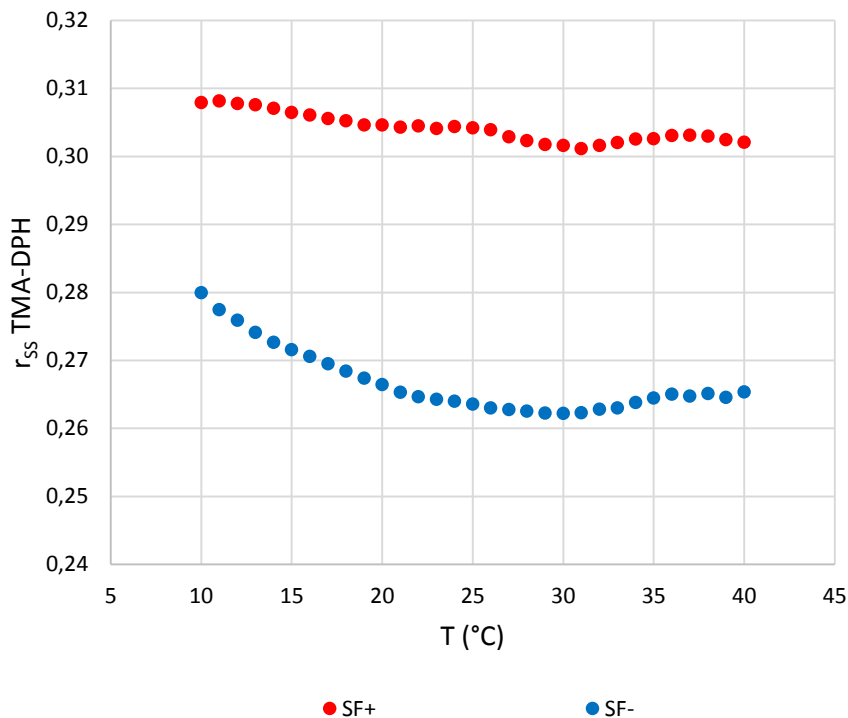
#### 5.3.1 $r_{ss}$ DPH a TMA-DPH v izolovaných membránách

Nejbližší popis situace in vivo poskytne  $r_{ss}$  DPH v intaktních membránách. Ty byly izolovány diferenciální centrifugací z buněčného lyzátu SF+ a SF- kmenů *B. subtilis* po 24 h kultivace a obsahovaly kromě membránových lipidů i nelipidové složky, membránové proteiny. Fluorescenční sondy byly přidány k suspenzi membránových váčků naředěné na koncentraci membránových proteinů 50 µg/ml, výsledná koncentrace sondy byla 1 µmol/l. Teplotní závislost hodnoty ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH a TMA-DPH v izolovaných membránách v teplotním rozsahu 10 – 40 °C jsou zaznamenané v Obr 5.16 resp. 5.17.



**Obr. 5.16 Teplotní závislost ustálené anizotropie fluorescence DPH v izolovaných membránách**

Hodnota  $r_{ss}$  DPH při 30 °C dosahovala 0,256 v SF- membránách a 0,306 v SF+ membránách.



**Obr. 5.17 Teplotní závislost ustálené anizotropie fluorescence TMA-DPH v izolovaných membránách**

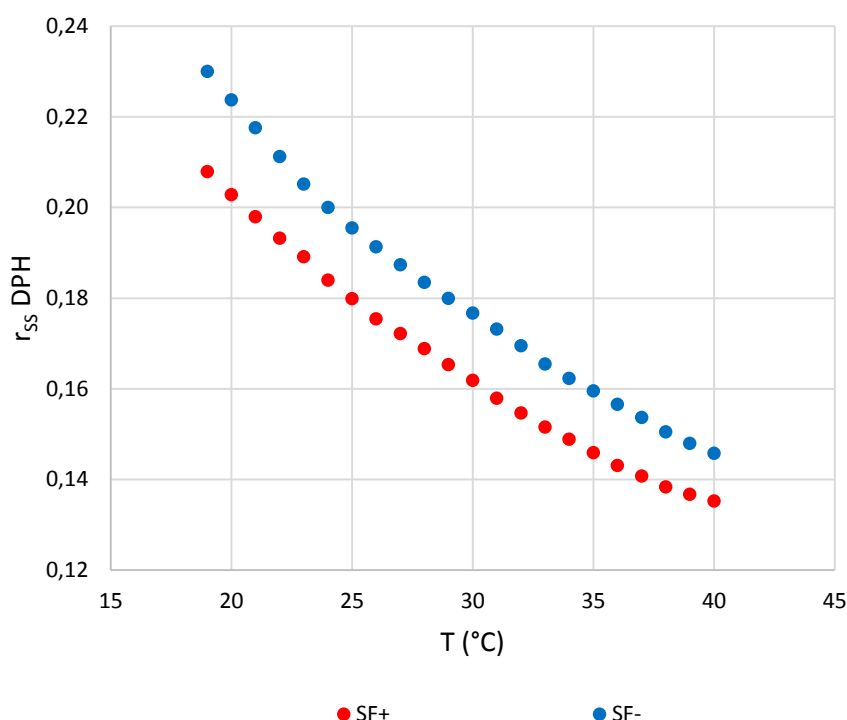
Hodnota  $r_{ss}$  TMA-DPH při 30 °C dosahovala 0,262 v SF- a 0,302 v SF+ membránách.

Hodnoty  $r_{ss}$  se se zvyšující se teplotou snižují, fluidita membrán tedy roste. Jak v oblasti povrchu tak nitra membrány jsou hodnoty ustálené anizotropie fluorescence vyšší u SF+ buněk, a to v celé teplotní škále měření. Rozdíl  $r_{ss}$  DPH v teplotě rovné kultivační, tj. 30 °C byl 0,052. SF- membrány dosáhly stejné fluidity SF+ membrán při teplotě o 18 °C nižší. V oblasti polárních hlav byl rozdíl  $r_{ss}$  TMA-DPH 0,040. Vzhledem k tomu, že teplotní závislost je v tomto případě velmi plochá, není možné určit teplotní rozdíl.

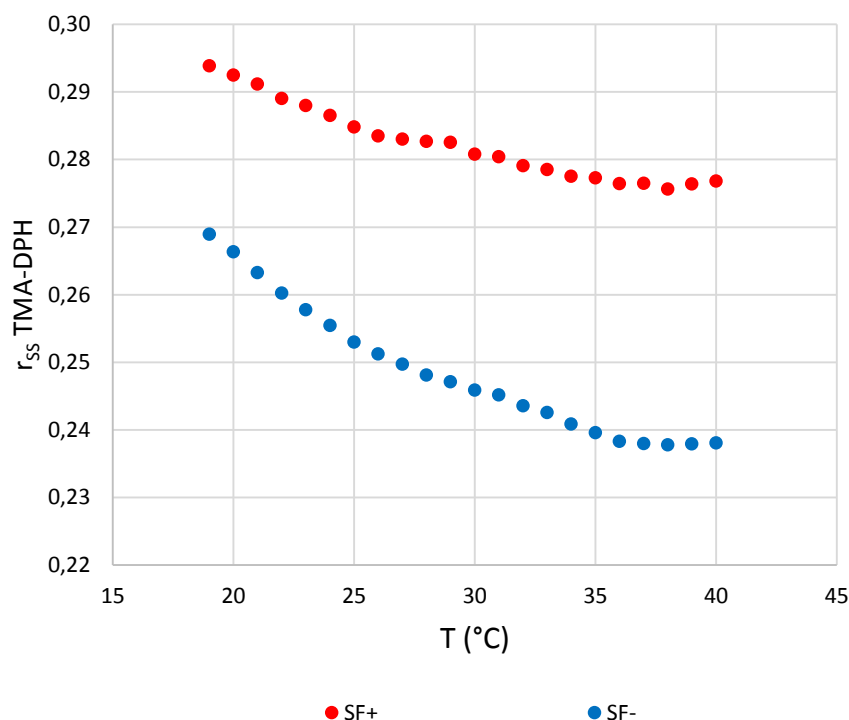
### 5.3.2 $r_{ss}$ DPH a TMA-DPH v izolované lipidické frakci membrán

Měření  $r_{ss}$  DPH a TMA-DPH v izolovaných lipidech poskytne informaci, do jaké míry jsou rozdíly ve fluiditě membrán dané lipidovým složením a do jaké proteinovou složkou membrán.

Z lipidů izolovaných ze SF+ a SF- cytoplazmatických membrán byly připraveny lipozómy a následně byla k suspenzi lipozómů přidána sonda DPH, případně TMA-DPH na výslednou koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$ . Hodnoty ustálené anizotropie fluorescence byly měřeny v rozmezí teplot 20 – 40 °C. Teplotní závislosti  $r_{ss}$  DPH a TMA-DPH jsou na Obr 5.18, resp. 5.19.



**Obr. 5.18 Teplotní závislost ustálené anizotropie fluorescence DPH v izolovaných lipidech**  
Hodnota  $r_{ss}$  DPH při 30 °C dosahovala v lipozómech tvořených SF- lipidy 0,177 a SF+ lipidy 0,162.



**Obr. 5.19 Teplotní závislost ustálené anizotropie fluorescence TMA-DPH v izolovaných lipidech**

Hodnota  $r_{ss}$  TMA-DPH při 30 °C dosahovala v lipozómech tvořených SF- lipidy 0,246 a SF+ lipidy 0,281.

Samotné lipidy jsou dle předpokladu tekutější než intaktní membrány. Hodnoty ustálené anizotropie fluorescence DPH, které jsou určeny fluiditou hydrofobního jádra membrány, jsou u lipidů izolovaných z buněk adaptovaných na surfaktin nižší. Hodnota  $r_{ss}$  byla při 30 °C u SF+ nižší o 0,015 než u SF-, což odpovídá rozdílu teplot o 4 °C. Naopak fluidita oblasti polárních hlav sledovaná pomocí ustálené anizotropie fluorescence TMA-DPH byla vyšší u lipidů izolovaných ze SF- buněk, rozdíl v hodnotách  $r_{ss}$  TMA-DPH činí 0,035. Teplotní rozdíl v tomto případě nemohl být určen, protože zjištěné hodnoty  $r_{ss}$  TMA-DPH se v měřeném teplotním rozsahu nepřekrývají.

V oblasti polárních hlav jsou lipidy producenta surfaktinu dle předpokladu rigidnější, v hydrofobním jádře membrány je tomu ovšem naopak – rigidnější jsou lipidy buněk neadaptovaných na surfaktin. Na celkovou fluiditu membrán má zřejmě výraznější vliv proteinová složka, protože hydrofobní jádro intaktních membrán buněk SF+ je výrazně rigidnější než SF- přesto, že samotné lipidy naznačují opak.

## 6. Diskuze

Vzhledem k podstatné změně lipidového složení membrány *B. subtilis* v souvislosti s produkcí surfaktinu, která byla v naší laboratoři pozorována a zdokumentována, se tato práce zabývá interakcí surfaktinu s modelovými membránami a závislostí těchto interakcí a z nich plynoucí permeabilizace na složení cílové membrány. K dosažení těchto cílů byla zkoumána permeabilizační aktivita surfaktinu na úrovni jednotlivých kanálů pomocí metody BLM, i ve větším měřítku pomocí úniku fluorescenční sondy z lipozómů. Stanovením ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH byla také zkoumána fluidita membrán. Tyto experimenty měly přispět k objasnění, zda dříve pozorované změny ve složení membrány producenta mohou být efektivní adaptivní strategií *B. subtilis* vůči svému vlastnímu toxickému produktu.

Cílem experimentů na černých lipidických membránách bylo ověřit dříve publikovaná pozorování vodivostních skoků způsobených surfaktinem v experimentálním uspořádání naší laboratoře na modelových membránách, které se svým složením více blíží různým biologickým membránám. Cílem bylo srovnání tvorby a charakteru kanálů na membránách různého složení. V literatuře dříve popsaná pórtvorná aktivita surfaktinu podporuje námi popsané široké rozložení amplitud nárůstů vodivosti, stejně tak jako obtížné přiřazování otevření kanálu ke korespondujícím uzavřením. Sheppard et al. v roce 1991 obdobnou metodou, ovšem na membránách tvořených fosfatidylglycerolem esterifikovaným pouze jednou kyselinou olejovou, zkoumal vliv různých koncentrací různých druhů monovalentních kationtů. Z jeho zjištění vyplývá, že mechanismus účinku a tvorby kanálů se zřejmě vlivem rozdílných kationtů nemění, ale vzniklé kanály jsou kationt-selektivní a to v pořadí  $K > Rb > Na > Cs = Li$  (Sheppard et al. 1991). Proto byl pro experimenty v této diplomové práci vybrán roztok KCl o koncentraci 1 mol/l, který by měl poskytovat nejlepší rozlišení. Ostroumová et al. v roce 2010 za použití stejného pufru s 1 mol/l KCl na membránách tvořených DPhPC zkoumala vliv dipólového potenciálu membrány. Potvrzuje závěry Sheppard et al., že zabudovávání surfaktinu a tvorba kanálů nejsou závislé na napětí, ani na tom, zda je surfaktin přítomen na jedné straně membrány nebo na obou (Ostroumova et al. 2010).

Obě tyto studie se shodují na širokém rozmezí zaznamenaných vodivostí, nicméně na rozdíl od našich výsledků prezentují několik konkrétních hodnot vodivostí vyskytujících se s vyšší četností. Tyto hodnoty jsou různé pro různé experimentální podmínky. V obou studiích autoři

prokládají histogramy několika normálními rozloženími, ale nedokumentují počet hodnocených událostí. Naproti tomu naše výsledky podporují spíše jedno Poissonovské rozdělení. Rozdíly ve frekvenci výskytu různých vodivostních nárůstů zaznamenaných při našich měřeních a ve studiích výše uvedených autorů by mohl vysvětlovat hlavní předmět našeho zájmu – rozdílné složení membrány. Sheppard využívá záporně nabitě membrány (obdobně jako membrány tvořené DPhPG v našich pokusech) tvořené monooleylfosfatidylglycerolem. Takováto membrána ovšem bude mít kvůli esterifikaci fosfatidylglycerolové hlavy pouze jednou mastnou kyselinou značně odlišný charakter než biologické membrány, jimž se snažíme v našich pokusech co nejvíce přiblížit. Ostroumovou et al. použitý DPhPC je nenabitý. Pro přesnější popis bude nutné provést detailnější měření, zejména redukovat šum úměrný ploše membrány a vyvinout automatický postup vyhledávání vodivostních skoků v záznamu, aby bylo možné hodnotit výrazně větší počet jednotlivých událostí.

V této práci byly pro měření vodivostí použity celkem čtyři lipidové systémy – dva ze syntetických lipidů a dva z komplexních lipidových izolátů. Odlišnosti mezi nimi byly na úrovni relativní četnosti kanálů s různou vodivostí. Zatímco u syntetických lipidů a u sójového extraktu je nejvyšší počet kanálů v kategorii 0 – 50 pS (Obr. 5.4, 5.5 a 5.7), u lipidů *E. coli* byl nejvyšší výskyt kanálů zaznamenán v kategorii 50 - 100 pS (Obr. 5.6). Četnější tvorba větších kanálů není v tomto případě překvapivá, protože právě membrána *E. coli* má být jedním z primárních cílů surfaktinu. Druhá komplexní membrána (sójový fosfatidylcholin) se od této liší jak složením polárních hlav (membrána ze sójového PC je nenabitá, na rozdíl od membrány *E. coli* nesoucí mírně záporný náboj), tak mastných kyselin (membrána *E. coli* má kratší průměrnou délku řetězců mastných kyselin, je tedy tenčí). Oba tyto faktory, tj. náboj i délka řetězce mastné kyseliny, ovlivňují aktivitu surfaktinu v membráně (viz kapitola 2.3.3). Záporně nabitý povrch membrány může elektrostaticky odpuzovat stejně nabitě molekuly surfaktinu, ale do membrány s kratšími řetězci se surfaktin naopak inzeruje snáze. Izolát sójového PC navíc obsahuje fytoosteroly (Scholfield 1981), které mohou s membránovou aktivitou surfaktinu interferovat obdobně jako cholesterol (Heerklotz and Seelig 2007).

Při srovnávání distribuce kanálů v obou membránách tvořených ze syntetických lipidů je zřejmé, že přidavek fosfatidyletanolaminu vede k vyššímu výskytu kanálů s vodivostmi v řádu několika stovek pS. Toto pozorování lze vysvětlit tím, že nenabitý fosfatidyletanolamin



zmenšuje hustotu negativního náboje membrány, čímž by mohl oslabit odpuzování záporně nabitého surfaktinu a usnadnit jeho vkládání do membrány, nicméně jeho kónická geometrie by naopak mohla působit proti pnutí způsobenému vkládání surfaktinu do membrány. Ve studii Lohner et al. (2001) byla na směsných membránách tvořených fosfatidyletanolaminem a fosfatidylglycerolem v různých poměrech popsána samovolná tvorba segregovaných domén. Surfaktin se preferenčně vkládá a je schopen agregovat v rozhraní takovýchto domén (Deleu et al. 2013), je tedy možné, že otevírání kanálů dané velikosti se odehrává právě na těchto rozhraních.

Výsledky předkládané diplomové práce také ukázaly, že použité rozpouštědlo ovlivňuje permeabilizační aktivitu surfaktinu. Sheppard et al. (1991) používal surfaktin izolovaný z kultury *B. subtilis* ATCC 21332 a pomocí analýzy složení aminokyselin v izolátu stanovil čistotu surfaktinu na 90 %. Tento izolát poté rozpustil v destilované vodě o pH 9,0. Ostroumová et al. (2010) použité rozpouštědlo neuvádí, nicméně používá pro experimenty na černých lipidických membránách komerčně dostupný surfaktin o vyšší čistotě stejně jako naše laboratoř. Než jsme přistoupili k pokusům se surfaktinem rozpuštěným v zásaditém vodném roztoku obdobně jako Sheppard et al., byl používán surfaktin rozpuštěný v DMSO, které je rozpouštědlem první volby pro obtížně rozpustné látky. Výsledky získané za těchto podmínek – plynulé nárůsty vodivosti bez jednotlivých rozlišitelných kroků (Obr. 5.2) sice neodpovídaly předchozím zjištěním jiných autorů, nicméně jsou samy o sobě zajímavým fenoménem. DMSO je schopný vstupovat do lipidických membrán a jeho přítomnost, ač sama membrány žádným způsobem nepermeabilizuje, zjevně na membránu působí synergisticky se surfaktinem. Vzhledem k důležitosti vzájemné mísitelnosti surfaktinu s membránovými lipidy navrhuje vysvětlení, že DMSO mění tendenci surfaktinu agregovat v membránách, a tím pádem moduluje nástup jednotlivých předpovězených mechanismů účinku – dimer coby iontový přenašeč a tvorba pórů nebo lokálních selhání membrány (viz kapitola 2.3.3). Touto otázkou se budeme zabývat v dalším výzkumu – navrhuje řešení pomocí in silico simulací chování DMSO a surfaktinu v membráně zvláště i zároveň, a dále pomocí fluorescenčních metod zdokumentovat možné změny agregace surfaktinu v membránách.

Na černých lipidických membránách se nám tedy podařilo potvrdit permeabilizační aktivitu surfaktinu na membrány o různém složení, naše výsledky se nicméně s literaturou neshodují v distribuci různých vodivostních stavů. Bohužel se nepodařilo vytvořit stabilní membrány

z lipidického extraktu z kultur *B. subtilis*, jak bylo původně zamýšleno. Pro jejich použití a pro získání podrobnějších výsledků budou nutné další pokusy s modifikovanou metodikou, v ideálním případě umožňující simultánní fluorescenčně mikroskopické pozorování a měření proudu procházejícího membránou.

Efekt rozpuštění surfaktinu v DMSO se projevil i v následujících pokusech s měřením úniku fluorescenční sondy z lipozómů. Cílem těchto experimentů bylo porovnat kvantitativně odolnost membrán o různém složení a popsat případné změny průběhu kinetik lyze. Použití roztoku surfaktinu v DMSO mělo za následek vyšší účinnost lyze lipozómů všech použitých složení (Obr. 5.12) ve srovnání se stejnou koncentrací surfaktinu přidanou z vodného zásobního roztoku. Na základě měření na černých lipidických membránách jsme předpokládali, že surfaktin rozpuštěný v DMSO tvoří příliš malé kanály na to, aby byly rozlišitelné v záznamu. Nicméně fakt, že pozorujeme únik sondy z lipozómu znamená, že kanály musí být dostatečně velké na to, aby jimi prošly molekuly karboxyfluoresceinu. Tvar kinetiky lyze je navíc s kinetikou lyze surfaktinem z vodného roztoku srovnatelný. Je tedy možné, že DMSO umožňuje tvorbu již velmi malých vodivých komplexů a jejich postupné plynulé zvětšování. Tímto způsobem by se dala vysvětlit absence vodivostních skoků na BLM, ale obdobný průběh lyze lipozómů. Je také ovšem možné, že v tomto nesouladu výsledků hraje rozdíl zakřivení membrány – membrány na BLM jsou planární, zatímco membrány lipozómů o průměru 100 nm jsou silně zakřivené.

Metoda lyze lipozómů umožňuje velmi dobře porovnávat permeabilizační účinek různých látek, nebo stejné látky za různých podmínek. Často uváděným údajem pro hodnocení kinetik lyze je její počáteční rychlost udávaná směrnicí tečny ke křivce v počátku. Tento parametr omezí vliv nelineární závislosti míry lyze na nárůstu intenzity fluorescence (viz dále), ale není nicméně použitelný pro vícefázové kinetiky zaznamenané při našich experimentech. Dalším způsobem hodnocení rychlosti nebo efektivity lyze je porovnání dosažených intenzit ve zvoleném časovém bodě kinetiky – tento ukazatel je sice ilustrativní, nicméně velmi zjednodušující a při rozdílném průběhu kinetik může výsledky výrazně zkreslovat, což je opět případ našich experimentů. Nejpřesnějším způsobem prezentace je popsání celého průběhu kinetiky proloženou funkcí, pro vícefázové kinetiky nacházející se v našich výsledcích je to také prakticky jediný možný způsob. Získané kinetiky byly prokládány modifikací Hillovy funkce (Gray et al. 1998) hojně používanou ve farmakokinetice k popisu dynamiky a stechiometrie

účinku zkoumané látky. Jinou modifikací původní Hillovy rovnice je například i rovnice Michaelise a Mentenové popisující kinetiku enzymatických reakcí (Goutelle et al. 2008). Vzhledem k tomu, že se kinetiky nedaly uspokojivě popsat pouze jednou funkcí, předpokládáme, že se v lyzi pravděpodobně uplatňuje více mechanismů, a je tedy křivku nutné proložit součtem více funkcí. Každá funkce potom v ideálním případě popisuje jiný mechanismus. Při prokládání větším počtem funkcí se ovšem více projeví artefakty způsobené chybou měření a nelinearitou závislosti nárůstu fluorescence na míře permeabilizace membrány a nelinearitou závislosti intenzity fluorescence na koncentraci volného karboxyfluoresceinu (Schwarz and Arbusova 1995). Takto získané hodnoty parametrů funkcí popisujících různé simultánně probíhající mechanismy permeabilizace membrány proto mohou být zatíženy značnou chybou. Je proto nutné chápat konkrétní číselné hodnoty jako přibližný charakter dané funkce, nikoli přesný popis. Součet amplitud všech funkcí proložených jednou kinetikou by z definice neměl přesahovat 100 %. Přesto se tak v některých případech (např. přídavky PA a CL do vaječného cholinu) stalo. Příčinou je absence záznamu celého průběhu lyze a amplitudy funkcí, které ve sledovaném úseku nedosáhly maxima, nemusí tedy odpovídat realitě. Stejně tak hodnoty  $\tau$ , které jsou větší než délka sledovaného úseku (420 s), budou zatíženy velkou chybou. Řešením je opět zaznamenání dostatečně dlouhého úseku, aby lyze stihla dosáhnout svého maxima. Vysokou vypovídací hodnotu by ale mohl mít samotný počet funkcí proložených danou kinetikou. Ten koresponduje s několika různými mechanismy účinku surfaktinu popsanými v literatuře (viz kapitola 2.3.3).

Pro experimenty mapující únik fluorescenční sondy z lipozómů vlivem působení surfaktinu bylo nejprve nutné vybrat nosičový systém, ke kterému budou jednotlivé zkoumané fosfolipidy přimíchávány. Na základě pilotních pokusů (Obr. 5.8) byl jako vhodnější možnost zvolen fosfatidylcholin izolovaný z vaječného žloutku, u kterého výrobce (Avanti Polar Lipids) deklaroval čistotu > 99 %. Tvorba lipozómů z tohoto izolátu byla velmi efektivní a rychlost jejich lyze byla výrazně vyšší než v případě alternativ – čistého syntetického DPPG nebo sójového PC. Sójový extrakt je, co se složení týče, komplexní směs, která se tím pádem může snáze vyrovnávat s pnutím a ohyby způsobenými surfaktinem, délka řetězců mastných kyselin je v obou izolátech srovnatelná (viz Tab. 4.4). Jak již bylo výše uvedeno, sójový izolát ovšem obsahuje fytosteroly, které mohou omezovat účinek surfaktinu na membránu. Naproti tomu jednodruhové lipidové váčky složené z fosfatidylglycerolu mohou svým silně negativním

nábojem elektrostaticky omezovat už samotné vkládání surfaktinu do membrány. Náš předpoklad byl takový, že rychlá lyze lipozómů z vaječného cholinu umožní lépe pozorovat případné stabilizační efekty jednotlivých zkoumaných lipidových příměsí.

Jak jsme zjistili, stabilizační efekt do určité míry vykázaly všechny čtyři zkoumané fosfolipidy, ale fosfatidylglycerol a fosfatidyletanolamin pouze velmi omezený. Kyselina fosfatidová a kardiolipin oba membrány stabilizovaly mnohem výrazněji (Obr. 5.10). Oba tyto lipidy jsou negativně nabitě (kardiolipin sice nese dva negativní náboje, ale jeho plocha v membráně je přibližně dvojnásobná, takže hustota náboje zůstává stejná) a mohly by tedy opět elektrostaticky odpuzovat záporně nabitý surfaktin. Oba tyto lipidy mají také kónickou geometrii, která může působit proti efektu obráceného kónusu surfaktinu a membránu tak stabilizovat před jeho účinkem. Fosfatidyletanolamin je sice také kónický, ale nese obojaký náboj a membránu stabilizuje jen částečně. Fosfatidylglycerol je sice naopak negativně nabitý, ale má válcovitou geometrii. Proto se domníváme, že k dosažení stabilizačního efektu jsou nutné oba tyto parametry, které splňují právě PA a CL. Zvýšení obsahu těchto fosfolipidů v membráně bylo v recentních pracích spojováno s rezistencí proti antibiotikům. Klinické izoláty daptomycin rezistentních enterokoků vykazovaly zvýšení exprese genů zodpovědných za syntézu kardiolipinu (Davlieva et al. 2013). Nárůst podílu kardiolipinu v membráně pravděpodobně blokuje translokaci daptomycinu do vnitřního listu membrány, čímž efektivně brání tvorbě pórotvorného komplexu (Zhang et al. 2014). Negativní náboj kyseliny fosfatidové je zase spojován se zvýšenou odolností gram-negativních bakterií proti vankomycinu (Sutterlin et al. 2014).

Stabilizační efekt CL na membránu byl potvrzen i na komplexní lipidové směsi izolované přímo z *B. subtilis*. Obecně lze říci, že lipozómy tvořené lipidy izolovanými z kultur *B. subtilis* byly proti lyzi surfaktinem výrazně odolnější. Kinetika lyze byla pomalejší i přes použití méně koncentrované suspenze lipozómů a tím pádem 2,5 krát vyššímu poměru surfaktin:lipid. Lipozómy vytvořené z lipidů kmene deficientního v produkci kardiolipinu byly zřetelně náchylnější k permeabilizaci surfaktinem než lipozómy obsahující kardiolipin (Obr. 5.13). Stejně tak lipidy izolované z kultury producenta surfaktinu (Obr. 5.14) a tedy adaptované na jeho přítomnost (s vyšším podílem kardiolipinu, viz kapitola 2.3.4) daly vznik odolnějším lipozómům než lipidy kmene neadaptovaného (s třikrát nižším obsahem kardiolipinu). Přestavbu cytoplazmatické membrány a zejména zvýšení podílu kardiolipinu tedy lze

považovat přinejmenším za částečnou příčinu rezistence producenta *B. subtilis* proti surfaktinu.

Pro vyloučení vlivu mastných kyselin a případných nefosfolipidových složek v izolovaných lipidech byly připraveny i lipozómy tvořené ze směsí syntetických lipidů esterifikovaných dvěma olejovými mastnými kyselinami. Zastoupením polárních hlav napodobovaly složení membrán buněk *B. subtilis* – producenta adaptovaného k surfaktinu a naopak neadaptovaného mutantního kmene v téže fázi růstu, který ale surfaktin neprodukuje. Takto připravené lipozómy ovšem svou odolností proti lyzi výrazně převýšily i v předchozím pokusu použité lipozómy připravené přímo z lipidových izolátů. I přes velké zvýšení efektivní koncentrace surfaktinu (5krát ve srovnání s izolovanými lipidy, 12,5krát ve srovnání s přidavky do vaječného cholinu) byla na konci sledovaného úseku úroveň dosažené lyze nižší než 10 % a to v případě lipozómů napodobujících jak adaptované, tak kontrolní buňky. Rozdíly mezi těmito dvěma kinetikami byly při tak nízké úrovni lyze na úrovni chyby měření. Vysoká odolnost je zřejmě zapříčiněna příliš velkou tloušťkou membrány tvořené fosfolipidy s uniformní délkou mastných kyselin s 18 uhlíky v řetězci. Použitý surfaktin obsahuje několik izoform lišícími se různými délkami mastných kyselin, 14-ti a 15-ti uhlíkaté izoformy dohromady tvoří 90 %. Na rozdíl od komplexních směsí lipidů, ve kterých se hojně vyskytují i kratší řetězce, nebo v předchozích pokusech použitých palmitovaných lipidů zřejmě lipozómy tvořené lipidy esterifikovanými 18-ti uhlíkatými řetězci neumožňují surfaktinu tak snadno vytvářet vodivé komplexy procházející přes celou šířku membrány. Tímto experimentem se tedy souvislost mezi změnou zastoupení fosfolipidových tříd v membráně *B. subtilis* a odolností vůči působení surfaktinu prokázat nepodařilo. Bude zřejmě nutné výrazně prodloužit dobu měření nebo využít fosfolipidy s kratšími řetězci mastných kyselin.

Kinetiky lyze lipozómů všech testovaných složení byly vícefázové. Popisovaly je dvě nebo tři funkce, které se mezi různými složeními lišily jak amplitudou, tak poločasem i Hillovým číslem. Kooperativita děje (vyjádřená Hillovým číslem) byla zpravidla u jedné funkce nulová ( $n = 1$ ) nebo mírně negativní, u druhé mírně pozitivní a u třetí velmi silně pozitivní ( $n$  v řádu desítek až stovek). Toto pozorování by mohlo odpovídat třem různým mechanismům permeabilizace membrány, z nichž každý vyžaduje účast jinak velkého agregátu molekul surfaktinu. U kinetik lyze (za použití surfaktinu ve vodném roztoku) lipozómů s příměsí fosfatidyletanolaminu a kyseliny fosfatidové a u všech lipozómů z izolovaných lipidů byly proloženy pouze dvě funkce,

což zřejmě znamená, že se poslední, nejkooperativnější děj na lipozómech tohoto složení za dané koncentrace surfaktinu neuplatňuje. Kinetikou lyze lipozómů z vaječného cholinu s příměsí kardiolipinu byly proloženy dvě funkce, které měly shodnou kooperativitu ( $n = 2$ ). První z nich má menší amplitudu ( $\alpha = 8$ ) a rychlejší ( $\tau = 21$  s) průběh, druhá má ovšem amplitudu příliš vysokou ( $\alpha = 100$ ), tudíž i jiné její parametry mohou být mírně zkreslené.

Lyze lipozómů vytvořených z izolovaných lipidů bohužel kvůli pomalému průběhu nejsou zaznamenány celé, proto mohou být parametry funkcí zkreslené, případná kooperativnější funkce s pozdějším nástupem by za námi sledovaný časový úsek nebyla zaznamenána. Ještě ve větší míře to platí pro průběh lyze lipozómů napodobujících složení membrán *B. subtilis* pomocí syntetických lipidů. Všechny tyto experimenty, u nichž nebyl zaznamenán celý průběh, budou opakovány a záznam bude prodloužen na nejméně 2500 s.

Poslední část práce se věnovala odpovědi *B. subtilis* na další efekt surfaktinu – fluidizaci a dezorganizaci membrány. Lze předpokládat, že odpovědí buňky na fluidizační účinek surfaktinu na membránu by mohla být adaptivní rigidizace membrány, která se u producenta surfaktinu také potvrdila. Fluidita izolovaných membrán se snižuje jak v jádru membrány v oblasti mastných kyselin (Obr. 5.16) tak na povrchu v oblasti polárních hlaviček fosfolipidů (Obr. 5.17). To odpovídá dřívějším zjištěním, kdy byla fluidita membrán stanovována pomocí měření generalizované polarizace laurdanu (Seydlova et al. 2013). Fluidita jádra membrány tvořené pouze fosfolipidovým izolátem sice tomuto trendu odporuje (Obr. 5.18), ale je v souladu s výsledky analýzy mastných kyselin, které vypovídají o přítomnosti mastných kyselin s vyšším bodem tání (a tedy rigiditou) u neprodukčního kmene *B. subtilis*. Rozhodující je tedy zřejmě vliv membránových proteinů. Vzhledem k tomu, že poměr lipid:protein se v reakci na přítomnost surfaktinu nemění (nepublikovaná data), musí tato změna být způsobená kvalitativně jiným složením membránových proteinů. V oblasti polárních hlav, které jako první vstupují do interakce se surfaktinem, jsou výsledky z lipidového izolátu v souladu s výsledky z intaktních membrán. Rezistence producenta proti surfaktinu je tedy zřejmě založena na komplexní změně jak lipidového tak proteinového složení cytoplazmatické membrány.

## 7. Souhrn

- Surfaktin tvoří v planárních membránách kanály s širokým spektrem vodivostí od 2 pS do 2 nS.
- Distribuce vodivostí kanálů je závislá na složení cílové membrány.
- Surfaktin způsobuje únik fluorescenční sondy karboxyfluoresceinu z jednovrstevných lipozómů o velikosti 100 nm.
- Rychlost lyze lipozómů se značně liší v závislosti na jejich lipidovém složení.
- Lipozómy tvořené komplexní směsí lipidů a jednodruhové lipozómy tvořené negativně nabitým syntetickým fosfatidylglycerolem odolávají surfaktinu výrazně lépe než lipozómy tvořené vaječným cholinem.
- Příměsi syntetických fosfolipidů (DPPG, DPPE, DPPA a TMCL) lipozómy tvořené vaječným fosfatidylcholinem stabilizují. Příměsi negativně nabitých lipidů s kónickou geometrií (PA a CL) stabilizují membránu výrazně více než pouze negativně nabitě s válcovitou geometrií (PG) nebo kónické s obojetným nábojem (PE).
- Lipozómy tvořené z lipidických izolátů z buněk *B. subtilis* neschopných produkovat kardiolipin jsou výrazně náchylnější k permeabilizaci surfaktinem.
- Lipozómy tvořené z lipidických izolátů z buněk producenta surfaktinu, tj. vystavených surfaktinu, jsou výrazně odolnější než lipozómy připravené z lipidů buněk, které se se surfaktinem nesetkaly (jejich složení se lišilo zejména obsahem kardiolipinu).
- Fluidita intaktních membrán producenta surfaktinu v produkční fázi určená pomocí hodnoty ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH (oblast hydrofobního jádra) a TMA-DPH (oblast polárních hlav) byla nižší než fluidita membrán buněk neprodukcujících surfaktin.
- Změnu zastoupení membránových fosfolipidů *B. subtilis* lze považovat za součást mechanismů tolerance vlastního toxického produktu surfaktinu.

## 8. Seznam použité literatury

- Abalos, A., A. Pinazo, M. Infante, M. Casals, F. Garcia and A. Manresa (2001). "Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes." Langmuir **17**(5): 1367-1371.
- Arima, K., A. Kakinuma and G. Tamura (1968). "Surfactin a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis* - isolation and characterization and its inhibition of fibrin clot formation." Biochemical and Biophysical Research Communications **31**(3): 488-494.
- Arutchelvi, J., J. Sangeetha, J. Philip and M. Doble (2014). "Self-assembly of surfactin in aqueous solution: Role of divalent counterions." Colloids and Surfaces B-Biointerfaces **116**: 396-402.
- Athenstaedt, K. and G. Daum (1999). "Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism." European Journal of Biochemistry **266**(1): 1-16.
- Basch, H. and H. H. Gadebusc (1968). "In vitro antimicrobial activity of dimethylsulfoxide." Applied Microbiology **16**(12): 1953-&.
- Beven, L. and H. Wroblewski (1997). "Effect of natural amphiphathic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes." Research in Microbiology **148**(2): 163-175.
- Bevers, E. M., P. Comfurius, D. W. Dekkers and R. F. Zwaal (1999). "Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells." Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids **1439**(3): 317-330.
- Bhakdi, S. and J. Trantum-Jensen (1991). "Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*." Microbiological Reviews **55**(4): 733-751.
- Boeneman, K. and E. Crooke (2005). "Chromosomal replication and the cell membrane." Current Opinion in Microbiology **8**(2): 143-148.
- Bogdanov, M. and W. Dowhan (1999). "Lipid-assisted protein folding." Journal of Biological Chemistry **274**(52): 36827-36830.
- Bouffiuou, O., A. Berquand, M. Eeman, M. Paquot, Y. F. Dufrene, R. Bresseur and M. Deleu (2007). "Molecular organization of surfactin-phospholipid monolayers: effect of phospholipid chain length and polar head." Biochimica et Biophysica Acta **1768**(7): 1758-1768.
- Brown, J. L., T. Ross, T. A. McMeekin and P. D. Nichols (1997). "Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance." International Journal of Food Microbiology **37**(2-3): 163-173.
- Brown, M. F. (2012). "Curvature forces in membrane lipid-protein interactions." Biochemistry **51**(49): 9782-9795.
- Cao, X. H., A. H. Wang, R. Z. Jiao, C. L. Wang, D. Z. Mao, L. Yan and B. Zeng (2009). "Surfactin induces apoptosis and G(2)/M arrest in human breast cancer MCF-7 cells through cell cycle factor regulation." Cell Biochemistry and Biophysics **55**(3): 163-171.
- Carrillo, C., J. A. Teruel, F. J. Aranda and A. Ortiz (2003). "Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin." Biochimica et Biophysica Acta **1611**(1-2): 91-97.



- Cooper, D., C. Macdonald, S. Duff and N. Kosaric (1981). "Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions." Applied and Environmental Microbiology **42**(3): 408-412.
- Cosmina, P., F. Rodriguez, F. Deferra, G. Grandi, M. Perego, G. Venema and D. Vansinderen (1993). "Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*." Molecular Microbiology **8**(5): 821-831.
- Creuwels, L., L. Van Golde and H. Haagsman (1997). "The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects." Lung **175**(1): 1-39.
- Das, P., S. Mukherjee and R. Sen (2008). "Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*." Journal of Applied Microbiology **104**(6): 1675-1684.
- Davlieva, M., W. Zhang, C. A. Arias and Y. Shamoo (2013). "Biochemical characterization of cardiolipin synthase mutations associated with daptomycin resistance in enterococci." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **57**(1): 289-296.
- Debois, D., K. Hamze, V. Guerineau, J. P. Le Caer, I. B. Holland, P. Lopes, J. Ouazzani, S. J. Seror, A. Brunelle and O. Laprevote (2008). "In situ localisation and quantification of surfactins in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry." Proteomics **8**(18): 3682-3691.
- Deleu, M., J. Lorent, L. Lins, R. Brasseur, N. Braun, K. El Kirat, T. Nylander, Y. F. Dufrene and M. P. Mingeot-Leclercq (2013). "Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation." Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1828**(2): 801-815.
- Dufour, S., M. Deleu, K. Nott, B. Wathélet, P. Thonart and M. Paquot (2005). "Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties." Biochimica et Biophysica Acta **1726**(1): 87-95.
- Emoto, K. and M. Umeda (2001). "Advances in cytokinesis research. Membrane lipid control of cytokinesis." Cell structure and function **26**(6): 659-665.
- Epand, R. F., P. B. Savage and R. M. Epand (2007). "Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins)." Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1768**(10): 2500-2509.
- Epand, R. M. and R. F. Epand (2009). "Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents." Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1788**(1): 289-294.
- Esser, A. F. (1994). "The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity." Toxicology **87**(1): 229-247.
- Fernandes, P. E., J. F. B. Sao Jose, E. R. M. A. Zerdas, N. J. Andrade, C. M. Fernandes and L. D. Silva (2014). "Influence of the hydrophobicity and surface roughness of mangoes and tomatoes on the adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and evaluation of cleaning procedures using surfactin." Food Control **41**: 21-26.
- Goutelle, S., M. Maurin, F. Rougier, X. Barbaut, L. Bourguignon, M. Ducher and P. Maire (2008). "The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling." Fundamental & clinical pharmacology **22**(6): 633-648.
- Gray, M., G. Szabo, A. S. Otero, L. Gray and E. Hewlett (1998). "Distinct mechanisms for K<sup>+</sup> efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin." Journal of Biological Chemistry **273**(29): 18260-18267.
- Heerklotz, H. and J. Seelig (2001). "Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes." Biophysical Journal **81**(3): 1547-1554.
- Heerklotz, H. and J. Seelig (2007). "Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin." European Biophysics Journal **36**(4-5): 305-314.

- Heerklotz, H., T. Wieprecht and J. Seelig (2004). "Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by deuterium." Journal of Physical Chemistry B **108**(15): 4909-4915.
- Hopwood, D. A. (2007). "How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them?" Molecular Microbiology **63**(4): 937-940.
- Howorka, S., S. Cheley and H. Bayley (2001). "Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores." Nature Biotechnology **19**(7): 636-639.
- Huang, X., X. Gao, L. Zheng and G. Hao (2009). "Optimization of sterilization of *Salmonella enteritidis* in meat by surfactin and iturin using a response surface method." International Journal of Peptide Research and Therapeutics **15**(1): 61-67.
- Hwang, M. H., M. H. Kim, E. Gebru, B. Y. Jung, S. P. Lee and S. C. Park (2008). "Killing rate curve and combination effects of surfactin C produced from *Bacillus subtilis* complex BC1212 against pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae*." World Journal of Microbiology and Biotechnology **24**(10): 2277-2282.
- Chen, R. F. and J. R. Knutson (1988). "Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes - energy-transfer to nonfluorescent dimers." Analytical Biochemistry **172**(1): 61-77.
- Ingram, L. O. (1976). "Adaptation of membrane lipids to alcohols." Journal of Bacteriology **125**(2): 670-678.
- Ishigami, Y., M. Osman, H. Nakahara, Y. Sano, R. Ishiguro and M. Matsumoto (1995). "Significance of  $\beta$ -sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin." Colloids and Surfaces B-Biointerfaces **4**(6): 341-348.
- Janmey, P. A. and P. K. J. Kinnunen (2006). "Biophysical properties of lipids and dynamic membranes." Trends in Cell Biology **16**(10): 538-546.
- Jensen, M. O. and O. G. Mouritsen (2004). "Lipids do influence protein function - the hydrophobic matching hypothesis revisited." Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1666**(1-2): 205-226.
- Kakinuma, A., M. Hori, M. Isono, G. Tamura and K. Arima (1969b). "Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*." Agricultural and Biological Chemistry **33**(6): 971-&.
- Kakinuma, A., H. Sugino, M. Isono, G. Tamura and K. Arima (1969a). "Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin." Agricultural and Biological Chemistry **33**(6): 973-976.
- Kameda, Y., S. Ouhira, K. Matsui, S. Kanatomo, T. Hase and T. Atsusaka (1974). "Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311." Chemical & Pharmaceutical Bulletin **22**(4): 938-944.
- Kaneda, T. (1977). "Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference." Bacteriological Reviews **41**(2): 391-418.
- Kawai, F., M. Shoda, R. Harashima, Y. Sadaie, H. Hara and K. Matsumoto (2004). "Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* Marburg membranes." Journal of Bacteriology **186**(5): 1475-1483.
- Kim, K., S. Y. Jung, D. K. Lee, J. K. Jung, J. K. Park, D. K. Kim and C. H. Lee (1998). "Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A(2)." Biochemical Pharmacology **55**(7): 975-985.

- Koller, D. and K. Lohner (2014). "The role of spontaneous lipid curvature in the interaction of interfacially active peptides with membranes." Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1838**(9): 2250-2259.
- Kracht, M., H. Rokos, M. Ozel, M. Kowall, G. Pauli and J. Vater (1999). "Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives." Journal of Antibiotics **52**(7): 613-619.
- Kusters, R., E. Breukink, A. Gallusser, A. Kuhn and B. Dekruiff (1994). "A dual role for phosphatidylglycerol in protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane." Journal of Biological Chemistry **269**(2): 1560-1563.
- Lavery, G., S. P. Gorman and B. F. Gilmore (2011). "The potential of antimicrobial peptides as biocides." International Journal of Molecular Sciences **12**(10): 6566-6596.
- Leung, C., N. V. Dudkina, N. Lukyanova, A. W. Hodel, I. Farabella, A. P. Pandurangan, N. Jahan, M. P. Damaso, D. Osmanović and C. F. Reboul (2014). "Stepwise visualization of membrane pore formation by sulysin, a bacterial cholesterol-dependent cytolysin." Elife **3**: e04247.
- Li, X., H. Yang, D. Zhang, X. Li, H. Yu and Z. Shen (2015). "Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in *Bacillus subtilis*." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **42**(1): 93-103.
- Li, Y., A. H. Zou, R. Q. Ye and B. Z. Mu (2009). "Counterion-induced changes to the micellization of surfactin-C-16 aqueous solution." Journal of Physical Chemistry B **113**(46): 15272-15277.
- Lohner, K., A. Latal, G. Degovics and P. Garidel (2001). "Packing characteristics of a model system mimicking cytoplasmic bacterial membranes." Chemistry and Physics of Lipids **111**(2): 177-192.
- Loiseau, C., M. Schlusshuber, R. Bigot, J. Bertaux, J. M. Berjeaud and J. Verdon (2015). "Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-Legionella activity." Applied Microbiology and Biotechnology **99**(12): 5083-5093.
- Lopez, C. S., A. F. Alice, H. Heras, E. A. Rivas and C. Sanchez-Rivas (2006). "Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity." Microbiology-SGM **152**: 605-616.
- Lopez, D. and R. Kolter (2010). "Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*." Fems Microbiology Reviews **34**(2): 134-149.
- Maget-Dana, R. and M. Ptak (1992). "Interfacial properties of surfactin." Journal of Colloid and Interface Science **153**(1): 285-291.
- Maget-Dana, R. and M. Ptak (1995). "Interactions of surfactin with membrane models." Biophysical Journal **68**(5): 1937-1943.
- Maier, R. M. and G. Soberon-Chavez (2000). "*Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications." Applied Microbiology and Biotechnology **54**(5): 625-633.
- Mishra, N. N., S. J. Yang, A. Sawa, A. Rubio, C. C. Nast, M. R. Yeaman and A. S. Bayer (2009). "Analysis of cell membrane characteristics of in vitro-selected daptomycin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **53**(6): 2312-2318.
- Mo, X., Y. Fu, J. S. Patel and S. Zhang (2013). "Surfactin and biofilm production by *Bacillus subtilis* IN937b, a biological control agent for suppressing *Phytophthora* blight on squash." Phytopathology **103**(6): 98-98.

- Mueller, P., D. O. Rudin, H. T. Tien and W. C. Wescott (1962). "Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system." Nature **194**(4832): 979-980.
- Murahi, J. K., J. Harris, S. D. Taylor and M. Palmer (2012). "Characterization of daptomycin oligomerization with perylene excimer fluorescence: Stoichiometric binding of phosphatidylglycerol triggers oligomer formation." Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1818**(3): 673-678.
- Nazari, M., M. Kurdi and H. Heerklotz (2012). "Classifying surfactants with respect to their effect on lipid membrane order." Biophysical Journal **102**(3): 498-506.
- Ortiz, A., J. A. Killian, A. J. Verkleij and J. Wilschut (1999). "Membrane fusion and the lamellar-to-inverted-hexagonal phase transition in cardiolipin vesicle systems induced by divalent cations." Biophysical Journal **77**(4): 2003-2014.
- Ostroumova, O. S., V. V. Malev, M. G. Ilin and L. V. Schagina (2010). "Surfactin activity depends on the membrane dipole potential." Langmuir **26**(19): 15092-15097.
- Pangborn, M. C. (1942). "Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart." Journal of Biological Chemistry **143**(1): 247-256.
- Park, S. Y. and Y. Kim (2009). "Surfactin inhibits immunostimulatory function of macrophages through blocking NK-kappa B, MAPK and Akt pathway." International Immunopharmacology **9**(7-8): 886-893.
- Perozo, E., A. Kloda, D. M. Cortes and B. Martinac (2002). "Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating." Nature Structural Biology **9**(9): 696-703.
- Phadtare, S. (2004). "Recent developments in bacterial cold-shock response." Current issues in molecular biology **6**(2): 125-136.
- Ramamurthi, K. S., S. Lecuyer, H. A. Stone and R. Losick (2009). "Geometric cue for protein localization in a bacterium." Science **323**(5919): 1354-1357.
- Ramamurthi, K. S. and R. Losick (2009). "Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(32): 13541-13545.
- Razafindralambo, H., P. Thonart and M. Paquot (2004). "Dynamic and equilibrium surface tensions of surfactin aqueous solutions." Journal of Surfactants and Detergents **7**(1): 41-46.
- Rejman, D., A. Rabatinová, A. R. Pombinho, S. Kovačková, R. Pohl, E. Zborníková, M. Kolář, K. Bogdanová, O. Nyč, H. Šanderová, T. Látal, P. Bartůněk and L. Krásný (2011). "Lipophosphonoxins: new modular molecular structures with significant antibacterial properties." Journal of Medicinal Chemistry **54**(22): 7884-7898.
- Romantsov, T., Z. Guan and J. M. Wood (2009). "Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria." Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1788**(10): 2092-2100.
- Seydlova, G., R. Fiser, R. Cabala, P. Kozlik, J. Svobodova and M. Patek (2013). "Surfactin production enhances the level of cardiolipin in the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*." Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1828**(11): 2370-2378.
- Seydlova, G. and J. Svobodova (2008). "Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications." Central European Journal of Medicine **3**(2): 123-133.
- Shen, H. H., T. W. Lin, R. K. Thomas, D. J. F. Taylor and J. Penfold (2011). "Surfactin structures at interfaces and in solution: The effect of pH and cations." Journal of Physical Chemistry B **115**(15): 4427-4435.

- Sheppard, J. D., C. Jumarie, D. G. Cooper and R. Laprade (1991). "Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer-membranes." Biochimica et Biophysica Acta **1064**(1): 13-23.
- Scholfield, C. (1981). "Composition of soybean lecithin." Journal of the American Oil Chemists Society **58**(10): 889-892.
- Schwarz, G. and A. Arbuzova (1995). "Pore kinetics reflected in the dequenching of a lipid vesicle entrapped fluorescent dye." Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1239**(1): 51-57.
- Silvius, J. (1982). "Thermotropic phase transitions of pure lipids in model membranes and their modifications by membrane proteins." Lipid-protein interactions **2**: 239-281.
- Singer, S. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Day and Good Membranes and viruses in immunopathology: 7-47.
- Sklenářová, P. (2014). "Účinek surfaktinu na lipidovou složku cytoplazmatické membrány *Bacillus subtilis*." Diplomová práce.
- Song, L., M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley and J. E. Gouaux (1996). "Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore." Science **274**(5294): 1859-1866.
- Steller, S., A. Sokoll, C. Wilde, F. Bernhard, P. Franke and J. Vater (2004). "Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SrfD-thioesterase protein." Biochemistry **43**(35): 11331-11343.
- Strieker, M. and M. A. Marahiel (2009). "The structural diversity of acidic lipopeptide antibiotics." ChemBiochem **10**(4): 607-616.
- Surewicz, W. K. (1984). "Membrane actions of water-soluble fusogens - effect of dimethylsulfoxide, glycerol and sucrose on lipid bilayer order and fluidity." Chemistry and Physics of Lipids **34**(4): 363-372.
- Sutterlin, H. A., S. Zhang and T. J. Silhavy (2014). "Accumulation of phosphatidic acid increases vancomycin resistance in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **196**(18): 3214-3220.
- Suutari, M. and S. Laakso (1994). "Microbial fatty-acids and thermal adaptation." Critical Reviews in Microbiology **20**(4): 285-328.
- Tabbene, O., I. Ben Slimene, F. Bouabdallah, M. L. Mangoni, M. C. Urdaci and F. Limam (2009). "Production of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus* activity from *Bacillus subtilis* sp strain B38 newly isolated from soil." Applied Biochemistry and Biotechnology **157**(3): 407-419.
- Tanaka, K., Y. Amaki, A. Ishihara and H. Nakajima (2015). "Synergistic effects of Ile(7) surfactin homologues with bacillomycin D in suppression of gray mold disease by *Bacillus amyloliquefaciens* biocontrol strain SD-32." Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**(22): 5344-5353.
- Teixeira, V., M. J. Feio and M. Bastos (2012). "Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes." Progress in lipid research **51**(2): 149-177.
- Tsan, P., L. Volpon, F. Besson and J. M. Lancelin (2007). "Structure and dynamics of surfactin studied by NMR in micellar media." Journal of the American Chemical Society **129**(7): 1968-1977.
- Tsuge, K., Y. Ohata and M. Shoda (2001). "Gene yerP, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **45**(12): 3566-3573.
- Vitullo, D., A. Di Pietro, A. Romano, V. Lanzotti and G. Lima (2012). "Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*." Plant Pathology **61**(4): 689-699.

- Vollenbroich, D., M. Ozel, J. Vater, R. M. Kamp and G. Pauli (1997a). "Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*." Biologicals **25**(3): 289-297.
- Vollenbroich, D., G. Pauli, M. Ozel and J. Vater (1997b). "Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*." Applied and Environmental Microbiology **63**(1): 44-49.
- Wada, H. and N. Murata (2007). "The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis." Photosynthesis Research **92**(2): 205-215.
- Walsh, C. T. (2008). "The chemical versatility of natural-product assembly lines." Accounts of Chemical Research **41**(1): 4-10.
- Yamashita, Y., K. Kinoshita and M. Yamazaki (2000). "Low concentration of DMSO stabilizes the bilayer gel phase rather than the interdigitated gel phase in dihexadecylphosphatidylcholine membrane." Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1467**(2): 395-405.
- Zander, S., M. Hermes, F. Scholz, A. Groning, C. A. Helm, D. Vollmer, U. Lendeckel and L. Schild (2012). "Membrane fluidity of tetramyristoyl cardiolipin (TMCL) liposomes studied by chronoamperometric monitoring of their adhesion and spreading at the surface of a mercury electrode." Journal of Solid State Electrochemistry **16**(7): 2391-2397.
- Zhang, T., J. K. Muraih, N. Tishbi, J. Herskovitz, R. L. Victor, J. Silverman, S. Uwumarenogie, S. D. Taylor, M. Palmer and E. Mintzer (2014). "Cardiolipin prevents membrane translocation and permeabilization by daptomycin." Journal of Biological Chemistry.
- Zou, A., J. Liu, V. M. Garamus, Y. Yang, R. Willumeit and B. Mu (2010). "Micellization activity of the natural lipopeptide [Glu1, Asp5] surfactin-C15 in aqueous solution." Journal of Physical Chemistry B **114**(8): 2712-2718.