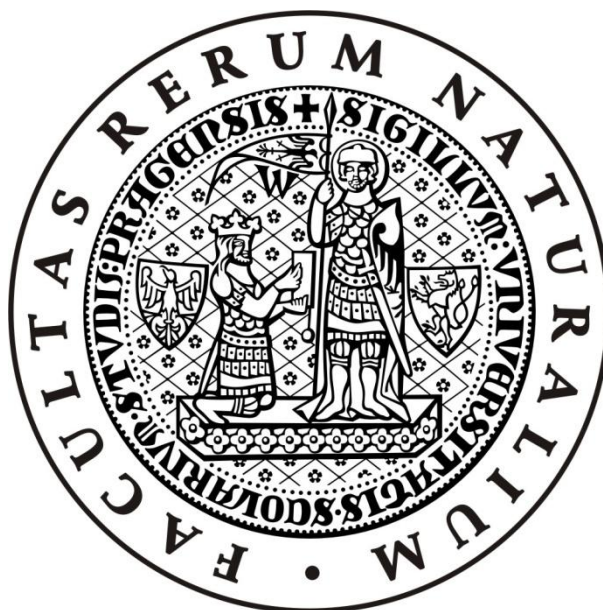


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

Speciální chemicko - biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Ján Valášek

Umělé lipidické membrány a vlastnosti membránových proteinů

**Artificial lipid membranes and the properties of the membrane
proteins**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Radovan Fišer Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Umělé lipidické membrány a vlastnosti membránových proteinů“ 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 dne 24. 8. 2012

.....

Poděkování

Děkuji RNDr. Radovanu Fišerovi Ph.D. za cenné připomínky, rady a odborné vedení při vypracování bakalářské práce. Dále děkuji své přítelkyni Silvii Hrubé a své rodině za jejich podporu a pomoc.

OBSAH

Seznam použitých zkratk.....	5
Abstrakt.....	6
1. ÚVOD.....	7
2. BIOLOGICKÁ MEMBRÁNA.....	7
2.1. Složení a rozměry.....	7
2.2. Symetrie.....	9
2.3. Transport látek.....	10
2.3.1. Aquaporiny.....	10
2.4. Adaptace BM na teplotu.....	10
2.4.1. Lipidová dvouvrstva a teplota.....	11
2.5. Elektrická vodivost.....	11
2.5.1. Kapacita.....	11
2.5.2. Elektrický odpor.....	12
3. OBECNÉ METODY PRO ZKOUMÁNÍ MEMBRÁN A MP.....	12
3.1. Totální vnitřní odrazová fluorescence (TIRF).....	12
3.2. Atomová hmotnostní mikroskopie (AFM).....	13
3.3. Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS).....	13
3.4. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	13
3.5. Rentgenová strukturní analýza (RTG-difrakce).....	14
3.6. Nukleární magnetická rezonance (NMR).....	14
3.7. Anizotropní fluorescence.....	15
4. UMĚLÉ LIPIDICKÉ MEMBRÁNY (ALM).....	15
4.1. Supported lipid bilayers (SLB).....	15
4.2. Černé lipidické membrány (BLM).....	16
4.3. Langmuir–Blodgett film (LB film).....	17
4.3.1. Techniky spojování monovrstev.....	17
4.3.2. Využití techniky LB filmu.....	19
4.4. Dvouvrstva na rozhraní kapičky (DIB).....	19
4.4.1. Manipulace a aplikace.....	20
4.4.2. Uchovávání.....	20
4.4.3. DIB Sítě.....	21
4.5. Dvouvrstva kapičky a hydrogelu (DHB).....	22
4.6. Metoda padajících kapiček (Falling Droplets).....	23
5. PATCH CLAMP.....	23
5.1. Patch clamp celých buněk.....	24

5.2.	Inside-out a Outside-out Patch clamp.....	24
5.3.	Patch clamp - fosfolipidová dvouvrstva.....	24
6.	SINGLE MOLECULE RECORDING POMOCÍ LIPIDOVÉ DVOUVRSTVY A PATCH CLAMP	25
6.1.	Transport proteinů přes kanál.....	25
6.2.	Transport cukrů skrz pór.....	26
6.3.	Transport DNA /RNA.....	26
7.	MEMBRÁNOVÉ PROTEINY (MP).....	27
7.1.	Stavba.....	27
7.2.	Translokace MP.....	27
7.3.	Topologie MP.....	28
7.3.1.	β -barely.....	28
7.3.2.	Amfipatické α -helixy.....	29
7.4.	Acylace TM proteinů.....	30
7.4.1.	N-myristilace.....	30
7.4.2.	Palmitoylace.....	30
7.5.	Odkazy na stránky s predikcí TM oblastí.....	30
7.6.	Pórotvorné toxiny (PFT).....	31
8.	ZÁVĚR.....	33
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	34

Seznam použitých zkratek

AFM	atomic force microscopy	atomová hmotnostní mikroskopie
ALM	artificial lipid membrane	umělé lipidické membrány
AQP1		auqaporin 1
ATP		adenosintrifosfát
BLM	black lipid bilayer	černá lipidická dvouvrstva
BM	biological membrane	biologická membrána
CDC	cholesterol-dependent cytolisins	cholesterol dependentní cytolysiny
C_m		specifická kapacita membrány
C_T		efektivní kapacita membrány
DHB	droplet hydrogel bilayer	dvouvrstva kapičky a hydrogelu
DIB	droplet interface bilayer	dvouvrstva na rozhraní kapičky
DOPC		dioleoylphosphatidylcholine
DOPE		dioleoylphosphatidylethanolamine
DOPS		dioleoylphosphatidylserine
DPG		difosfatidylglycerol
EF	edema factor	faktor edému
FCS	fluorescence correlation spectroscopy	fluorescenční korelační spektroskopie
G1P		sn-glycerol-1-fosfát
G3P		sn-glycerol-3-fosfát
LB film		Langmuir – Blodgett film
LF	lethal factor	letální faktor
LPC		lysofosfatidylcholin
L_α		krystal-tekutá fáze
L_β		gelová fáze membránu
MK		mastná kyselina
MP	membrane protein	membránový protein
NMR	nuclear magnetic resonance	magnetická nukleární resonance
PA	protective antigen	ochranný antigen
PC		fosfatidylcholin
PE		fosfatidylethanolamin
PFT	pore-forming toxin	pórotvorný toxin
PG		fosfatidylglycerol
PI		fosfatidylinositol
PS		fosfatidylserin
RTG-difrakce		rentgenová difrakce
SCR	single channel recording	zaznamenávání jednoho kanálu
SLB	supported lipid bilayers	podporovaná lipidová dvouvrstva
SM		sřingomyelin
TEM	transmission electron microscopy	transmisní elektronová mikroskopie
TIRF	total internal reflection fluorescence	totální vnitřní odrazová fluorescence
TM	transmembrane	transmembránový
wt. %	weight percent	hmotnostní procento
ϵ_0		permitivita vakua
ϵ_m		permitivita materiálu tvořícího

Abstrakt

Buněčná membrána a membránové proteiny hrají v životě buňky fundamentální úlohu. Pomocí transportérů a iontových kanálů komunikují s okolím a udržují buněčnou homeostázu. Proto je jejich poznání a charakterizace významnou oblastí základního i aplikovaného výzkumu. Velké rozměry buňky a nerozpustnost membránových proteinů ztěžují jejich studium a vyžaduje sofistikovanější přístupy, např. pro výzkum jednotlivých kanálů a transportérů.

Tato práce se snaží vytvořit jednoduchý přehled nejvíce využívaných metod pro tvorbu umělých lipidických membrán. Jsou jimi LB film, DIB, BLM a SLB. Jejich aplikováním je možné zkoumat lipidové dvouvrstvy a jednotlivé proteiny. Práce dále nastiňuje postup příprav, výhody a využití jednotlivých přístupů a stručně popisuje membránové proteiny, biologické membrány a konvenční metody pro jejich studium.

Klíčová slova: membránové proteiny, membrána, umělé lipidické membrány, LB film, DIB, SLB, BLM, SLB, ALB

Abstract

Cell membrane and membrane proteins play fundamental roles in cell life. Cells use transporters and ion channels to interact with the environment and maintain cellular homeostasis. Therefore, their understanding and characterization are important area of basic and applied research. Large size of the cell and membrane protein insolubility make hamper their study and requires more sophisticated approaches, e.g. for the research of individual channels and transporters.

This work seeks to create a simple overview of the most used methods for creating artificial lipid membranes. They are LB film, DIB, BLM and SLB. They can be examined by applying lipid bilayer and individual proteins. The work also outlines the procedure for the preparation, use and benefits of different approaches and briefly describes the membrane proteins, biological membranes and conventional methods for their study.

Key words: membrane protein, membrane, artificial lipid bilayer, LB film, DIB, SLB, BLM, SLB, ALB

1. ÚVOD

Eukaryotní, prokaryotní a archeální buňky ohraničuje plasmatická membrána. Intracelulární struktury a orgány jako mitochondrie, chloroplasty, endoplazmatické retikulum, jádro a mnohé další jsou také obklopeny membránou (Eisenberg and McLaughlin, 1976). Její hlavní složkou jsou lipidová dvouvrstva, která tvoří bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím buňky, a membránové proteiny. Ty hrají zásadní úlohu u všech organismů, u nichž 20 – 30% otevřených čtecích rámců tvoří právě geny pro membránové proteiny (převážně α -helixy). Slouží např. jako iontové kanály, receptory a různé typy transportérů (Nilsson et al., 2005). Jejich studium je ztíženo jejich nerozpustností ve vodě a při jejich izolaci z buněčných membrán dochází ke konformačním a funkčním změnám.

Obecnými metodami je možné určit fyziologické vlastnosti a molekulární interakce buněčných membrán. Ovšem komplexita membrány nedovoluje provádět kvantitativní měření funkce samostatného membránového proteinu (Funakoshi et al., 2006). Umělé lipidické dvouvrstevné membrány poskytují přirozené prostředí pro vložení membránových proteinů (receptorů, enzymů, protilátek, kanálů). Umožňují popsat a charakterizovat jejich funkce a vlastnosti (Ivnitski et al., 2000). Jsou využívány i při studiu biofyzikálních vlastností samotné lipidové dvouvrstvy (Nagle and Tristram-Nagle, 2000).

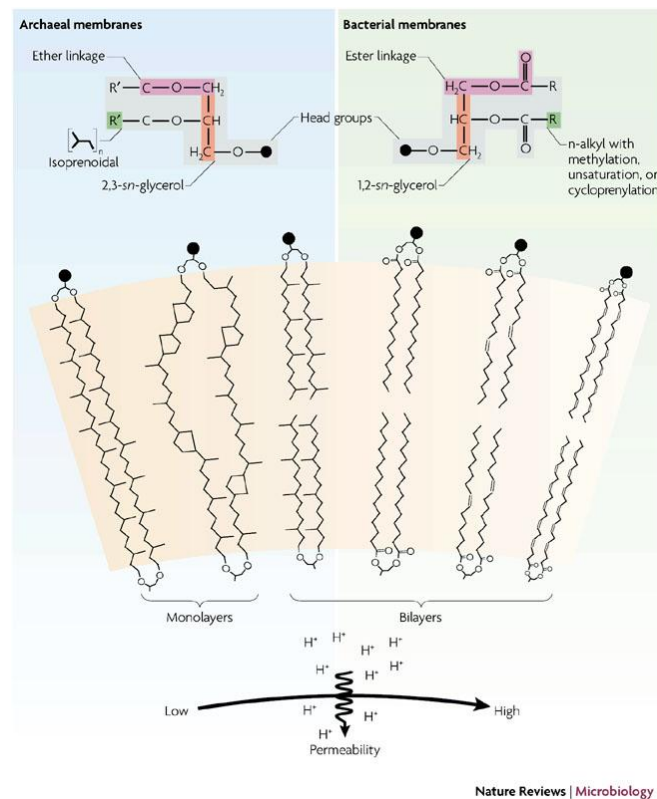
2. BIOLOGICKÁ MEMBRÁNA (BM)

2.1. Složení a rozměry

Obecně je přijata představa fluidní mozaiky, která je tvořena dvouvrstvou fosfolipidů, integrálních a periferních proteinů. Fosfolipidy jsou amfipatické molekuly, skládající se ze sn-glycerol-3-fosfátu (G3P) propojeného esterovou vazbou s uhlíkatými řetězci (většinou C14 - C20). Hydrofilní hlavička je prezentována do vodného prostředí a hydrofobní část je v kontaktu s mastnými kyselinami protilehlého listu dvouvrstvy (Pereto et al., 2004; Singer and Nicolson, 1972).

Rozměry membrány záleží na délce a nasycenosti uhlíkatých řetězců. Hydrofobní jádro má tloušťku v rozmezí 3.4 – 4.4 nm (Rawicz et al., 2000) s průměrem polární části molekuly 0.85 – 0.9 nm podle jejího typu (Nagle and Tristram-Nagle, 2000). Průměrná tloušťka činí 4.25 – 5.3 nm. U některých archeí jsou v membránách známy isoprenoidní ethery vázané na sn-glycerol-1-fosfát (G1P) (Pereto et al., 2004). Tvoří lamelární vrstvu,

ve které má každá molekula dvě polární hlavičky a dva velmi dlouhé uhlíkaté řetězce (viz Obr. 1) (Barenholz, 2002).



Obr. 1: Rozdíly v chemické struktuře archeální (levá) a bakteriální (pravá) membrány. Na příkladech je ukázáno, že archea mohou tvořit mono i dvouvrstvy a některé bakterie obsahují ve fosfolipidech vysoce nenasycené mastné kyseliny. Šipka naznačuje trend nárůstu propustnosti pro ionty jako protony a sodík. Membrány eukaryot se podobají membránám bakterií (Valentine, 2007).

Variabilita lipidů je u bakterií mnohem menší než v membránách evolučně mladších savčích buněk, které obsahují více než 2000 druhů lipidových molekul a také steroly a sfingolipidy (viz Tab. 1) (Barenholz, 2002). U různých buněčných typů se hmotnostní poměr lipidů k proteinům v membráně liší, od 5:1 pro myelin až k 1:5 pro vnitřní membránu mitochondrií. Stechiometrický poměr lipidů a proteinů v membráně můžeme vyjádřit i procentuálním zastoupením lipidů na buněčném povrchu. To odpovídá 65% lipidů u erytrocytů, 40% u vnitřní mitochondriální membrány a 100% u myelinové membrány. Zbytek povrchu membrány je tvořen pravděpodobně proteiny (Eisenberg and McLaughlin, 1976).

U gram-negativních bakterií s vysokým zastoupením nenasycených mastných kyselin (>65%) se vyskytuje hlavně fosfatidylcholin (PC), fosfatidylethanolamin (PE),

fosfatidylglycerol (PG) a kardiolipin (difosfatidylglycerol – DPG). Složení vnitřní a vnější membrány se liší poměrným zastoupením fosfolipidů, např. u *Salmonella Whimurium* jsou ve vnější PE, PG a DPG v poměru 81:17:6, v cytoplazmatické membráně v poměru 60:33:7. To platí i pro eukaryotní buňky. Např. v lidských erytrocytech je fosfatidylserin (PS) obsažen pouze ve vnitřním listu společně s velkou částí PE, kdežto ve vnějším listu je sfingomyelin (SM), PC a cholinové fosfolipidy (Florin-Christensen et al., 2001) .

U zástupce grampozitivních bakterií *Clostridium botulinum*, který má pouze cytoplazmatickou membránu, jsou čtyři hlavní fosfolipidy: PS, PE, PG, DPG (Evans et al., 1998).

V eukaryotních buňkách se vyskytuje více druhů fosfolipidů jako fosfatidylinositol (PI), lysofosfatidylcholin (LPC), PS, PE, DPG. Zastoupeny jsou také sfingofosfolipidy, kde páteř molekuly tvoří glycerol, ale sfingosin. Příkladem může být sfingomyelin (Ferlazzo et al., 2011).

Sfingo/fosfolipidy	<i>Thiobacillus novellus</i> (G-)	<i>Clostridium botulinum</i> (G+)	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Člověk	Skot
PS		20.6	2	18	19.1
PE	25	31	31.8	27.2	28.1
PC	35		32.9	28.9	0
DPG	6	17.5	0.4		
PG	27	22.5	1.3		
Esphingomyelin				26.9	46.2
<i>citace</i>	(Goldfine, 1984)	(Evans et al., 1998)	(Weeks and Herring, 1980)	(Spengler et al., 2008)	(Spengler et al., 2008)

Tab. 1: Procentuální zastoupení fosfolipidů u různých organismů (pozn. Pro *Clostridium botulinum* zjišťováno při kultivaci kolonii ve 20°C).

2.2. Symetrie

Zajištění asymetrie membrány je pro organismy esenciální. Za patologického stavu dochází ke ztrátě asymetrie a k expozici PS do vnějšího listu membrány, která indukuje apoptózu buněk eukaryotního organismu. Za její udržování jsou zodpovědné enzymy, které jsou rozděleny do tří tříd:

- 1) **Flipázy:** ATP-dependentní transportéry, které přesouvají fosfolipidy z vnějšího listu do vnitřního. Jsou vysoce selektivní pro PS, který udržují na vnitřní straně membrány.

2) **Flopázy**: ATP-dependentní ABC transportéry, umisťující fosfolipidy z vnitřního listu do vnějšího.

3) **Skramblázy**: ATP-nezávislé transportéry, jsou nespecifické přenašeče, které vytváří náhodnou distribuci nově syntetizovaných lipidů na endoplazmatickém retikulu nebo plasmatické membráně (Daleke, 2003).

2.3. Transport látek

Přes membránu mohou volně difundovat malé nepolární a nenabitě polární molekuly jako voda. Také délka řetězců mastných kyselin (MK) souvisí s propustností vody. Nenasycené lipidy jsou pro vodu propustnější než nasycené. Pro ionty je membrána nepropustná. Je přijat názor, že se pasivní difúze malých nenabitých molekul uskutečňuje přes přechodné póry (Gauthier and Joos, 2007; Simon, 1974).

2.3.1. Aquaporiny

Voda je základní a nejrozšířenější molekulou v buňce. Přes membránu může pronikat pouze prostou difúzí. Integrované membránové proteiny – aquaporiny slouží jako kanály usnadňující transport vody u bakterií, rostlin a zvířat.

Jsou tvořeny jedním peptidovým řetězcem, který je dlouhý přibližně 270 aminokyselin. Ze sekvence aquaporinu AQP1 bylo predikováno 6 transmembránových domén s intracelulárními N a C konci. U ostatních aquaporinů se předpokládá podobné molekulární uspořádání. Průchodnost molekul vody je závislá na uspořádání konkrétních smyček mezi doménami. Pokud se dvě smyčky složí do lipidové dvouvrstvy a vhodně se v ní spojí, jsou následně obklopeny transmembránovými (TM) doménami a mohou vytvořit hydrofilní průchod pro molekuly vody přes lipidovou dvouvrstvu.

Název aquaporiny byl dříve používán pouze pro kanály schopné transportu vody. Přenašeče s podobnou strukturou a schopností usnadňovat pohyb iontů a jiných molekul jako je glycerol, nebyly do této skupiny transportérů řazeny. Nyní je tento termín užíván pro všechny strukturně podobné molekuly (např. aquaglyceroporin) a jsou považovány za členy aquaporinů (Takata et al., 2004).

2.4. Adaptace BM na teplotu

Buňka se na nízkou teplotu adaptuje snížením nasycenosti mastných kyselin, zkrácením jejich délky, nebo větvením acylových řetězců methylovými skupinami (Klein et

al., 1999). Při vyšších teplotách naopak buňka zvýší podíl nasycených MK a index nasycenosti klesá (Cossins and Prosser, 1978).

2.4.1. Lipidová dvouvrstva a teplota

Při fyziologickém rozmezí teplot se lipidová dvouvrstva nachází v jedné ze dvou fází. Při nízké teplotě se nachází ve vysoce organizované gelové fázi (L_β), ve které obsahuje více nenasycených MK v trans stavu. Při nízké teplotě se nachází ve vysoce organizované gelové fázi (L_β), ve které obsahuje více nenasycených MK v trans stavu. Při vyšší teplotě přechází do částečně organizované krystalo-tekuté fáze (L_α), pozorované u biologicky aktivních membrán. V průběhu přechodu z L_β do L_α dochází ke zvýšení objemu a fluidity, snižuje se tloušťka a jednotlivé lipidy vykonávají pohyby, jako jsou axiální rotace, laterální difúze, trans/cis izomerizace (Pastor et al., 1991).

2.5. Elektrické vlastnosti

2.5.1. Kapacita

Orientační hodnotu pro celkovou kapacitu na jednotku plochy (C_T ; pF cm^{-2}) pro membránu lze nalézt pomocí rovnice pro desku dielektrika:

$$C_T = \epsilon_0 \cdot \epsilon_m / d \quad (1)$$

Kde d (cm^2) je tloušťka membrány, ϵ_m je permitivita materiálu tvořícího membránu a ϵ_0 je permitivita vakua. U jednoduché dvouvrstevné membrány složené z jednoho typu fosfolipidů, můžeme odhad d získat z měření C_T a naopak. Ve většině případu je kapacita membrány z velké části určena její hydrofobní částí a hodnota d je poměrně dobře zjištěná od molekulárních modelů, RTG-difrakce, elektronové a neutronové difrakce (Pethig and Kell, 1987).

Kapacita membrány je také závislá na specifické kapacitě C_M . C_M je nezávislá na ploše membrány. Rozdílnost v tloušťce membrány, způsobená různým složením fosfolipidů nebo fází a modulací jejich dielektrických vlastností způsobených vázanými proteiny, ovlivňuje C_M .

Pro charakterizaci změn specifické membránové kapacity byly použity černé lipidické membrány (Black Lipid Bilayer – BLM). Kapacita byla měřena při změnách různých faktorů, jako je membránové složení, teplota, pH a transmembránový potenciál (Gross et al., 2011).

Pomocí BLM, které neobsahovaly proteiny, byly získány dvě typické hodnoty pro C_T . Hodnota pro membrány tvořené asolecitinovými lipidy je $0.70 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ a hodnota pro membrány z vaječného lecitinu je $0.94 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Hodnoty C_T pro biologické membrány byly nejdříve získány z obřích axonů chobotnice, které mají velký průměr a dovolují měřit plochu a kapacitu přímo. C_T byla odhadnuta na $1.0 - 1.3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. V nedávné době byly měřeny myší žírné buňky za použití Whole-cell patch clamp a získaná hodnota C_T byla $1.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Pro sférické savčí buňky bylo C_T získáno použitím elektro-rotací techniky. Pro tři rozdílné buněčné linie byla hodnota C_T $0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Gentet et al., 2000). U dvouvrstevné membrány je pak možné z C_T odhadnout d nebo naopak (Pethig and Kell, 1987).

2.5.2. Elektrický odpor

Elektrický odpor nemodifikované membrány je podobný jako u BLM připravených v přítomnosti uhlovodíkového rozpouštědla, tj. $10^6 - 10^8 \Omega\text{ohm cm}^2$. Hodnoty 10^3ohm cm^2 můžeme docílit použitím antibiotika gramicidinu. Jeho použitím se tak membrána stane 1 000x až 100 000x propustnější pro různé ionty (Montal and Mueller, 1972).

3. OBECNÉ METODY PRO ZKOUMÁNÍ MEMBRÁN A MP

Zde jsou uvedeny některé obecné metody umožňující výzkum MP a BM, které jsou velice rozšířené i v mnoha dalších oblastech výzkumu buněčné a molekulární biologie.

3.1. Totální vnitřní odrazová fluorescence (TIRF)

TIRF je velmi hojně využívaná metoda pro studium vazebných událostí odehrávajících se na rozhraní dvou fází. Hloubka průniku je od 45 – 200 nm a určuje ji použitý laser a optické vybavení.

V kombinaci s umělými lipidovými membránami lze zobrazit navázání bakteriálního toxinu na gangliosidy (Moran-Mirabal et al., 2005), laterální pohyb jedné lipidové molekuly, single molecule recording iontového kanálu (Ide and Yanagida, 1999) a zkoumat vazby proteinů na lipidové dvouvrstvě. Poslední příklad je hojně využíván v imunologickém výzkumu např. u monoklonálních protilátek (Pisarchick and Thompson, 1990).

3.2. Atomová hmotnostní mikroskopie (AFM)

Tato metoda byla vyvinuta v roce 1985 Binnigem, Quatem a Gerberem. Nepoškozuje povrch a dokáže měřit síly menší než 10^{-18} N (Binnig et al., 1986). Lze získat elektrické, magnetické, topografické a mechanické informace a navíc dovoluje manipulaci se vzorky v řádu nanometrů. Díky vysokému prostorovému rozlišení se využívá se na reálné 3D zobrazení, in situ zobrazení, měření kapalin a na získání nanomechanických informací povrchu vzorku.

Při studiu nativních membrán umožnila zobrazit zlomek růžové membrány bakterie *Halobacterium halobium* a ukázala dvourozměrný vzor krystalu molekuly bacteriorhodopsinu (Singh and Keller, 1991). Dále byla zobrazena tvorba jednovrstevných váčků (Reviakine and Brisson, 2000) a adsorpce neporušených PC váčků, o kritické velikosti 75nm, na slídivý podklad při tvorbě SLB (Schonherr et al., 2004).

3.3. Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

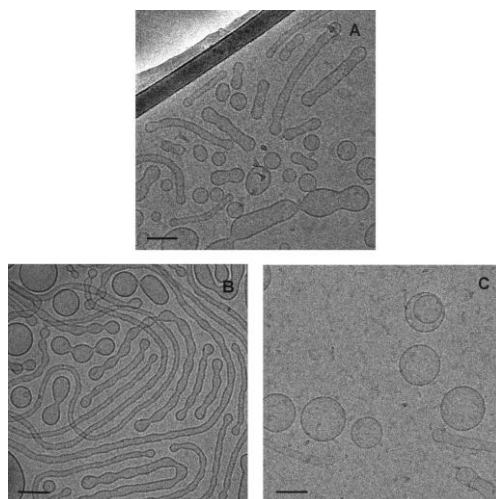
FCS byla představena na začátku sedmdesátých let minulého století. Pracuje na úrovni jedné molekuly (citlivost až do nanomolárních koncentrací). Navíc je méně invazivní a spolehlivější kvůli minimálnímu porušení systému v průběhu výzkumu. Byla využita na stanovení chemických a fotofyzikálních rychlostních konstant, určení lokálních koncentrací, rotačních a difúzních koeficientů molekul a nadmolekulárních komplexů (Kahya et al., 2004; Zhong and He, 2012).

Uplatnění najde např. při studiu laterální mobility v modelových systémech membrán. Dva hlavní typy jsou SLB a velké jednovrstevné váčky. Je výhodná v tom, že měření lze provádět ve velmi malém objemu (sub- μm^3) dovolujícím vysoké prostorové a časové rozlišení dostatečné pro jakýkoli biologicky významný transportní proces (Machan and Hof, 2010; Petrasek et al., 2011). Umožňuje charakterizovat dynamický tvar a asociaci naniloproteinových částic s membránovými proteiny (Gao et al., 2011).

3.4. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Tato metoda umožňuje vysoké rozlišení obrazu. Používá se k určení struktur proteinů a různých organických sloučenin. Dále umožňuje např. určit molekulární anatomii virové kapsidy v kombinaci s dalšími metodami (Downing, 1991; Newcomb et al., 1993).

Pro studium jemných útvarů vytvářených lipidy v samouspořádacích procesech se používá Cryo-TEM (viz Obr. 2). Dokáže charakterizovat přechody mezi sférickými a nesférickými strukturami váčků, stejně jako mezi micelami a váčky (Waninge et al., 2003).



Obr. 2: Cryo-TEM obrázky váčků ve vodě. Složení váčků: **A** 80 wt.% (weight percent) DOPE (dioleoylphosphatidylethanolamine) a 20wt.% SM/DOPC (dioleoylphosphatidylcholine); **B** 80 wt.% DOPE, 16 wt.% DPC/SM a 4 wt.% PI/DOPS (dioleoylphosphatidylserine); **C** 50 wt.% DOPE a 50 wt.% DOPC/SM. Měřítka pruhu_ 100 nm (Waninge et al., 2003).

3.5. Rentgenová strukturní analýza (RTG-difrakce)

Technika RTG-difrakce používá měkké rentgenové záření vhodné pro vzorky, které jsou příliš tenké pro světelnou mikroskopii a příliš silné pro elektronovou mikroskopii. Zobrazení vzorku při nejvyšším možném rozlišení je limitováno jeho krystalizací (Miao et al., 1999). U jedné modifikace však není nutné vzorek krystalizovat, a přesto se získá 3D zobrazení celých zmražených hydratovaných buněk v rozlišení 10 nm a lepším (Miao et al., 2008).

Nejvíce se využívá pro získávání proteinových struktur. Bylo popsáno více než 60 000 proteinových struktur pomocí RTG-difrakce, elektronové mikroskopie a NMR. Nicméně strukturní informace pro velké multiproteinové komplexy a membránové proteiny jsou vzácné. V roce 2011 bylo určeno méně než 300 unikátních struktur membránových proteinů (Hunter et al., 2011). Existuje tisíce struktur rozpustných proteinů, ale jen přes 20 membránových. Krystalizace membránových proteinů je komplikována jejich amfipatickou povahou a obtížným získáváním dostatečného množství velmi čistého a stabilního proteinu (Fyfe et al., 2001).

3.6. Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Tato technika se začala používat ve strukturní biologii od roku 1970. Je využívána pro studium dynamiky, struktury a funkce biomolekul. U proteinů lze studovat např.: jak proteinová dynamika přispívá k termodynamické stabilitě funkčního stavu a jakou má

úlohu v katalytické funkci proteinu; v molekulárně rozlišovacích procesech; ve vazbě ligandů do míst, která jsou za normálních okolností skryta, atd. Časová škála, ze které je možno obdržet informace dynamice pohybu, je v rozmezí od pikosekund po sekundy (Mittermaier and Kay, 2006). Také nahrazuje metody jako chromatografie na tenké vrstvě (TLC), iontová chromatografie, plynová chromatografie (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) při studiu lipidů a mastných kyselin (Adosraku et al., 1994).

Při výzkumu biomembrán byla NMR použita na získání informací o lokalizaci léčiv a rozpouštědel v lipidové matrix, k určení interakcí lipid-protein a laterální organizaci lipidů (Gawrisch et al., 2002). Při studiu membránových proteinů je možné sloučit NMR se SLB a napodobit tak prostředí buněčné membrány (Mahalakshmi et al., 2007).

3.7. Anisotropie fluorescence

Metodou anizotropní fluorescence je možné zkoumat dynamiku a interakci biomolekul. Využívá se např. pro určení struktury, flexibility, agregace, konformačních změn, intramolekulárních vzdáleností v biomolekulách, biologické funkce a mezimolekulárních vazeb. Dále ke studiu difúzního pohybu polymerů a membránových komponent v časovém rozmezí od 1 ns po 1 μ s (Schroder et al., 2005; Velez and Axelrod, 1988).

Pro popis rychlých pohybů proteinové dynamiky jsou využívány fluofory s krátkou dobou života excitovaného stavu. Naopak pro pohyby velkých subdomén a celých proteinů slouží fluofory s dlouhou dobou života excitovaného stavu. Dále se fluorofory dělí podle hydrofobnosti/hydrofilnosti. Různé typy hydrofilních sond umožňují měřit viskózní vlastnosti buněčné cytoplasmy a lipofilními fluorescenčními látkami viskozitu membrán (Dix and Verkman, 1990; Yengo and Berger, 2010).

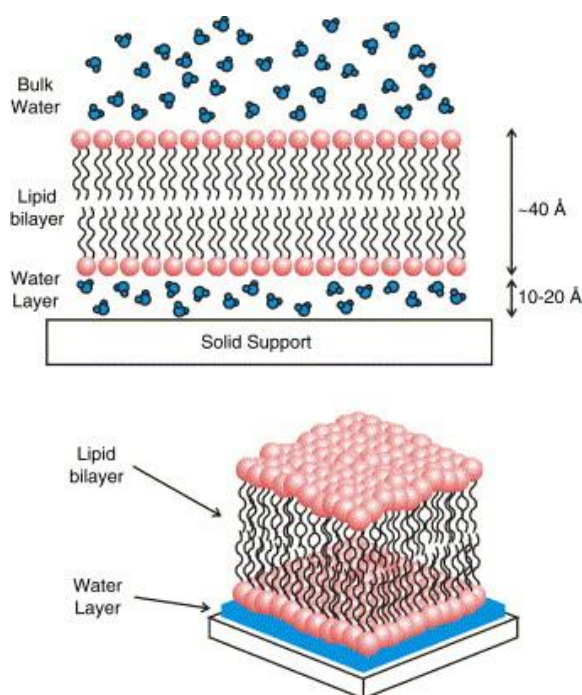
4. UMĚLÉ LIPIDICKÉ MEMBRÁNY (ALM)

Následující metody umělých lipidických membrán v kombinaci s předešlými technikami umožňují velice detailní pochopení různých buněčných fenoménů, které se odehrávají na membráně, nebo se týkají membránových proteinů.

4.1. Supported lipid bilayers (SLB)

SLB se využívají pro výzkum biosensorů. Výhodou této metody je možnost kombinovat ji s metodami pro povrchovou analýzu, mezi které patří povrchová plasmonová rezonanční spektroskopie a elektrochemické metody za předpokladu, že podklad je elektricky

vodivý (Romer and Steinem, 2004). Slouží jako matrix pro inkorporaci receptorů a při studiu buněčné adheze v imunologických odpovědích. Umožňují navrhnout fantomové buňky s dobře definovaným rozložením mobilních a imobilizovaných receptorů regulovaných silami klíč-zámek (Sackmann, 1996). Další aplikaci naleznou při určování vlivu koncentrace ligandu v roztoku na tok iontů skrz ligandem řízené kanály (Steinem et al., 1997) a pro charakterizaci transmembranového protonového transportu (McBee et al., 2006). Oproti BLM je tato metoda stabilnější a robustnější (viz Obr. 3) (Castellana and Cremer, 2006).



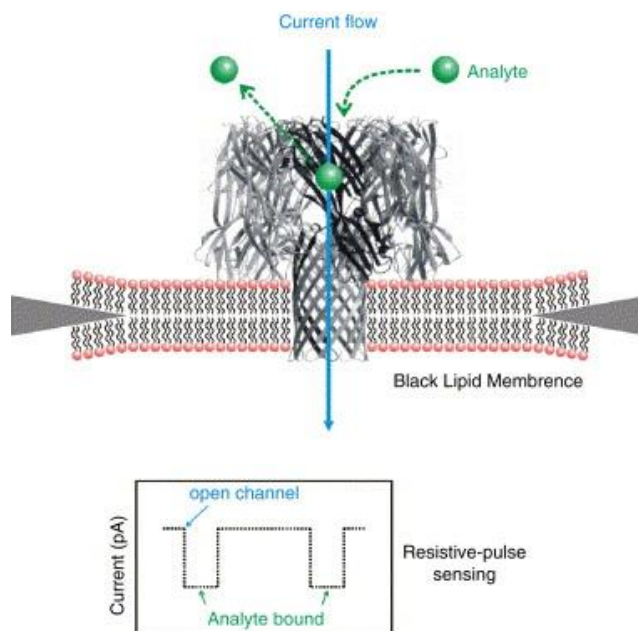
Obr. 3: Schematický diagram pevně podporovaných fosfolipidových dvouvrstev. Membrána je oddělena od substrátu 10 – 20 Å silnou vrstvou vody (Castellana and Cremer, 2006).

4.2. Černé lipidické membrány (Black lipid membrane – BLM)

BLM získaly svůj název ze vzhledu, který mají v optickém mikroskopu. Jsou významným a zajímavým membránovým modelem, protože je možné snadno nadefinovat jejich složení a ovládat vlastnosti okolí pomocí vložených elektrod na obou stranách oddílu. To umožňuje elektrické sondování dvouvrstvy. Jejich mechanická odolnost je vhodná pro sestavení chemických senzorů a molekulární elektroniky. Využívají se pro zkoumání různých biofyzikálních procesů. Jedním z nich je formování iontových kanálů v lipidových dvouvrstvách antibiotiky, peptidy, proteiny a dalšími pórtvornými molekulami (viz Obr. 4) (Castellana and Cremer, 2006; Ovalle-Garcia and Ortega-Blake, 2007).

Dále dovolují určit funkční vlastnosti nesouvisející se strukturou, jako je přesun

proteinových jednotek skrz kanál a translokaci náboje skrz aktivní pumpy (Winterhalter, 2000).



Obr. 4: Stochastické snímání s použitím BLM. Pórotvorný protein, jako je α -Hemolysin, může být použit ke snímání navázání jedné molekuly uvnitř iontového kanálu. Při procesu navázání pozorujeme snížení průtoku proudu skrz pór v přítomnosti analytu (Castellana and Cremer, 2006).

4.3. Langmuir – Blodgett film (LB film)

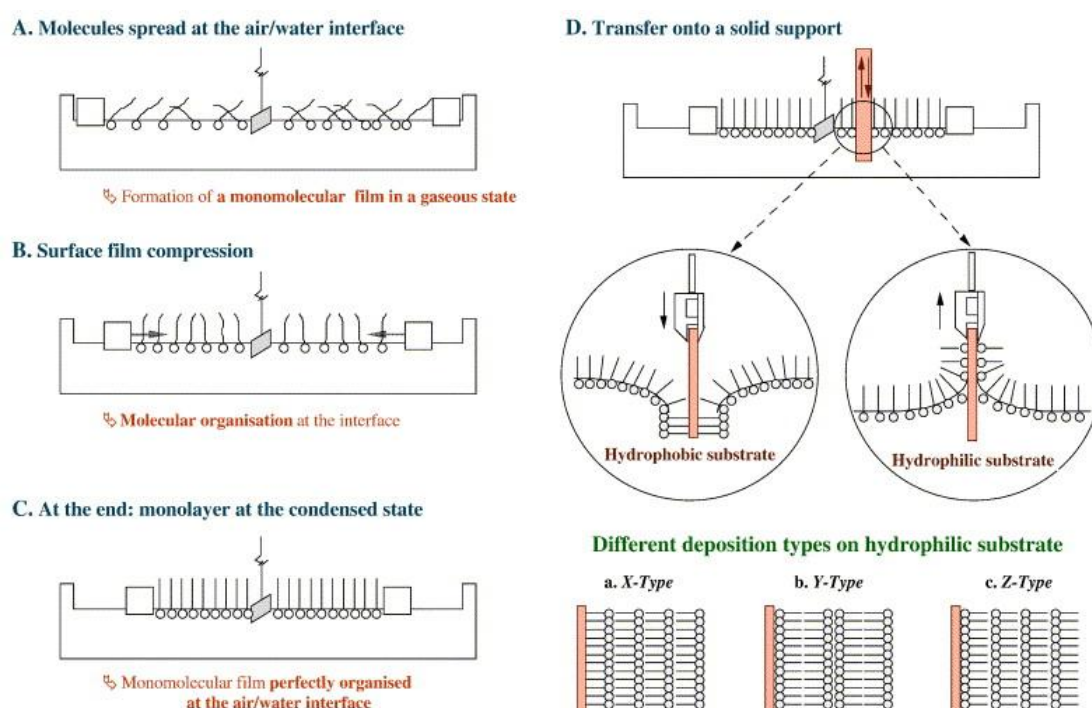
Tato technika dostala své jméno po Irvingovi Langmuirovi a Katharine Blodgettové, vědcích z General Electric Company v první polovině dvacátého století. Langmuir získal roku 1932 Nobelovu cenu za chemii za jeho výzkum v chemii povrchu, kde použil plující monovrstvy pro studium mezimolekulárních sil. Vyvinul několik nových technik pro studium monomolekulárních filmů, které jsou používány dodnes. Spolu s Kathrine Blodgettovou vylepšil metodu přenosu plující monovrstvy na pevný podklad.

V moderních studiích se LB filmy využívají ve dvou oblastech výzkumu. První oblast je studium fyzikální povahy a struktury monovrstev a filmů. Druhá oblast se zabývá aplikacemi využívajícími možnost připravit tenké a definované filmy (Talham et al., 2008).

4.3.1. Techniky spojování monovrstev

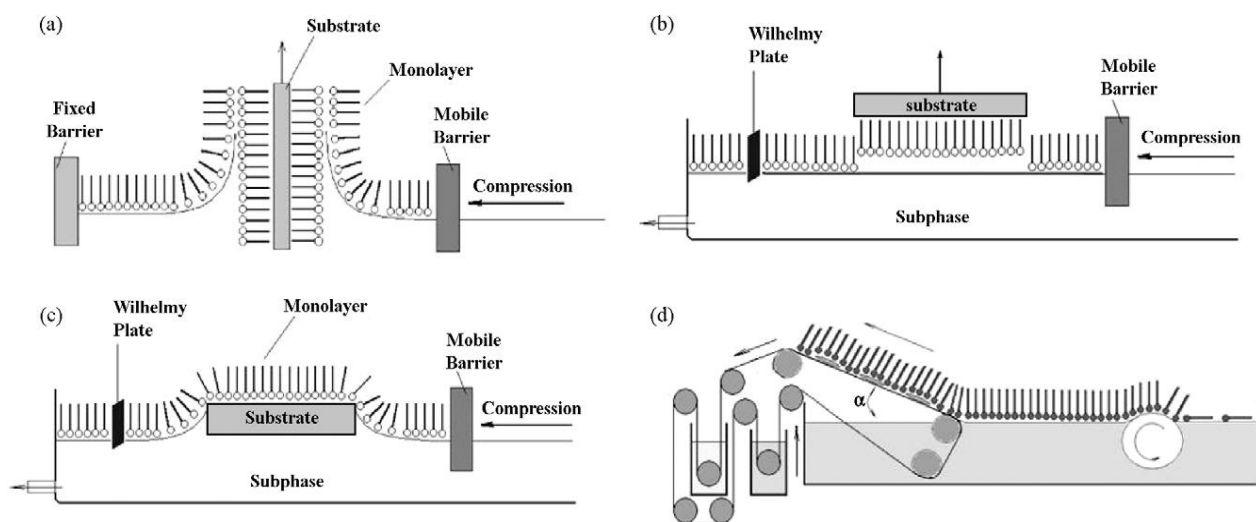
Tato technologie je založena na vlastnostech organických molekul, jako jsou lipidy, fosfolipidy nebo glykolipidy, zorientovat se na rozhraní kapalně a plynné fáze vzduchu a vody. Tímto minimalizují svou volnou energii a tvoří nerozpustný Langmuirův film (Girard-Egrot et al., 2005).

V technice tvorby LB filmu je postup rozdělen do dvou fází (viz Obr. 5). V první fázi se tvoří jedna vrstva molekul na vodní hladině. Vrstva má tloušťku pouze jedné molekuly díky silným anizotropním interakcím organických molekul s vodou. Tato vrstva je zpočátku nehomogenní a volně složená. Snížením plochy vodní hladiny dojde k přiblížení molekul a tvorbě homogenní vrstvy. Ve druhém kroku je jednotná monovrstva přenesena na podklad. Nanesení materiálu je možné opakovat vícekrát a tím vytvořit film o definované tloušťce. Kritická část postupu zahrnuje existenci silných anizotropních interakcí mezi molekulami, proto molekuly v monovrstvě nemají tendenci preferovat svůj vlastní typ a nekrytalizují (Peterson, 1990).



Obr. 5: Princip Langmuir–Blodgett techniky (Girard-Egrot et al., 2005).

Langmuir–Blodgettův film je termín používaný pro monovrstvy, které byly přeneseny vertikálně z vody na pevný podklad jako sklo, silikon nebo křemen. Tento vertikální přenos je nejčastější metoda LB přenosu, nicméně je možný i horizontální přenos monovrstvy na pevný podklad nazývaný *Langmuir–Schaefferova depozice* (Talham et al., 2008). Další způsob přenosu monovrstvy spočívá v umístění podkladu pod vodní hladinu a její následné snížení (viz Obr. 6) (Zhavnerko and Marletta, 2010).



Obr. 6: Schematická ilustrace různých způsobů přenosu Langmuirova filmu : (a) Langmuir–Blodgettova vertikální metoda, (b) Langmuir–Shaferova horizontální metoda, (c) Horizontální precipitace; (d) Roll-To-Roll depozice (Zhavnerko and Marletta, 2010).

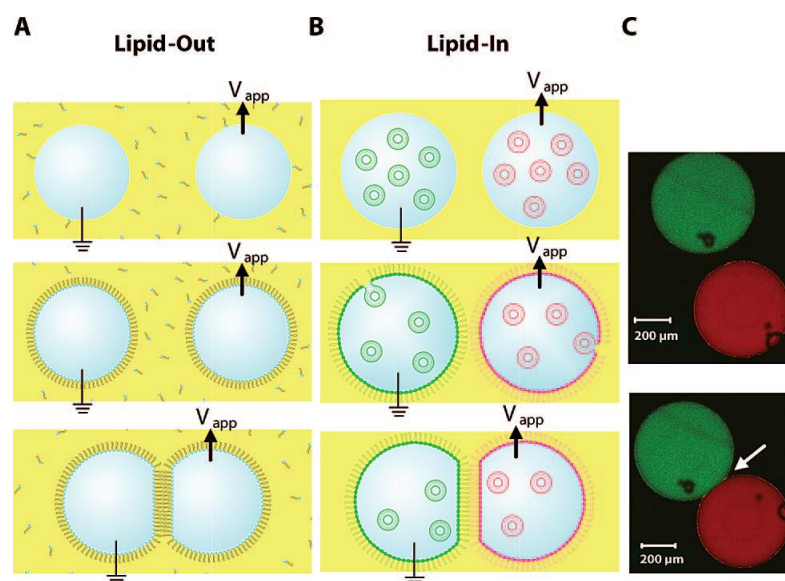
4.3.2. Využití techniky LB filmu

Langmuir-Blodgettova metoda s využitím molekulární a supramolekulární chemie nebo složitějších nanostrukturových stavebních částic (nanočástice, uhlíkové nanotrubičky, atd.) může vést k tvorbě nových materiálů. Existuje mnoho pokusů zkonstruovat hybridní a vzorové materiály aplikováním LB metodiky, např. v oblasti polymerních membrán, elektronických a molekulárně elektronických přístrojů, plastických solárních článků a diod emitujících organické světlo (Zhavnerko and Marletta, 2010).

4.4. Dvourstva na rozhraní kapičky (DIB)

Tato metoda využívá vzniku monovrstev kolem kapiček vody, které se ponoří do směsi oleje a lipidů (lipid-out DIBs). Obalené kapičky jsou tak obklopeny stejným typem lipidů.

Při tvorbě asymetrické dvourstvy, se umístí do každé z kapiček váčky s různým lipidickým složením. Ty následně fúzí s rozhraním voda/olej a vytváří monovrstvu (viz Obr. 7). Tento přístup je výhodný díky své experimentální ceně a větší škále složení dvourstev (Hwang et al., 2008).



Obr. 7: **A** Symetrická lipid-out formace. **B** Asymetrická lipid-in formace. **C** Skenovací konfokální fluorescence z-řezů dvou kapiček obsahujících fluorescenčně značené lipidy (Hwang et al., 2008).

4.4.1. Manipulace a aplikace

Do dvouvrstvy lze inkorporovat iontové kanály nebo póry a elektrodami ponořenými do kapiček měřit procházející proud (Hwang et al., 2008). Rozměry kontaktního povrchu kapička/kapička nebo kapička/hydrogel mohou být reversibilně a reprodukovatelně kontrolovány vloženými elektrodami (Creasy and Leo, 2010) nebo externě aplikovaným elektrickým polem (Punnamaraju and Steckl, 2011).

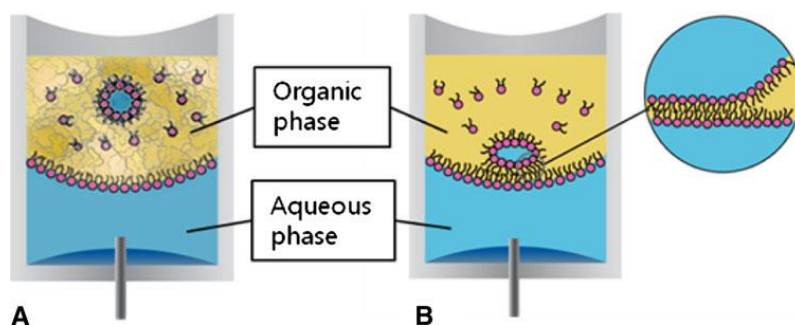
Hrozí ovšem nebezpečí protržení. Nová technika využívá elektrody obalené hydrogelem, které nemusí kapičku propíchnout. Lipidy z organického roztoku mohou vytvořit na elektrodě monovrstvu, kterou lze spojit s kapičkou za vzniku dvouvrstvy. Do toho rozhraní se mohou inkorporovat proteiny z vodní kapičky (Creasy and Leo, 2010). Pro manipulaci s kapičkami byla vytvořena technika využívající laser infračerveného světla (Dixit et al., 2010).

Výhodou DIB je lepší laterální mobilita lipidů oproti SLB, která ovlivňuje funkci proteinů. SLB jsou limitovány nehomogenitou dvouvrstvy. Přes tyto nevýhody jsou SLBs principiálně výhodnější pro zobrazování (Thompson et al., 2007). DIB se využívají např. při studiu translokace proteinových toxinů (antrax, botulotoxin) přes buněčnou membránu (Fischer et al., 2011).

4.4.2. Uchovávání

Pro případ potřeby lze vytvořit dlouhodobý skladovací prekurzor pro DIB.

Do lahvičky s vodní a organickou fází jsou přidány vodní kapičky, které mohou obsahovat iontové kanály. Dříve než klesnou na rozhraní voda/organická fáze, je systém zmrazen $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ metanolem. Po rozmrazení jsou kapičky přitahovány gravitační silou k rozhraní a vytvoří dvouvrstvu, kde je možno plnohodnotně provádět elektrická měření (viz Obr.8) (Jung et al., 2012).



Obr. 8: Schématická ilustrace: **A** Zmražené kapičky prekursoru membrány v lahvičce.

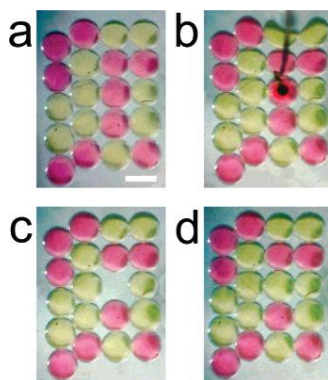
B Formace DIB po rozmrazení (Jung et al., 2012).

4.4.3. DIB Sítě (DIB Networks)

DIB jsou oproti planárním membránám výhodné svou vyšší stabilitou a životností. Kapičky umožňují sestavit funkční síť propojenou membránovými proteiny se specifickými vlastnostmi (viz Obr. 9). Např. pomocí iontového gradientu a α -hemolysinu může být zkonstruována síť biobaterií. Byly využity na zkonstruování zařízení citlivého na světlo vložení bacteriorhodopsinu, světlem aktivované protonové pumpy (Hwang et al., 2007).

Tyto sítě jsou robustní a mají dlouhou životnost. Dokonce lze mechanicky vyjmout jednotlivé kapičky a nahradit je novými bez protrhnutí přilehlé DIB. Jejich přeskupením dojde k celkové změně vlastností sítě. Využívají se ke studiu biologických fenoménů buněčné membrány, nebo pro výzkum membránových proteinů (Holden et al., 2007).

Kapičky mezi sebou mohou komunikovat elektrickými signály skrz síť. K tomuto účelu jsou vyvíjeny proteiny, které by simulovaly chování diod včetně omezování proudu a usměrňování pólů a celých vln. Výsledné vlastnosti takovéto sítě by mohly být použity na vybudování systémů reagujících nosičů léčiv (Maglia et al., 2009).

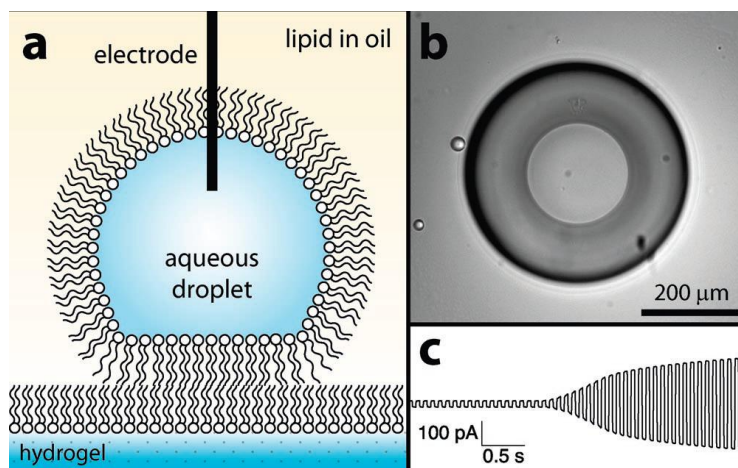


Obr. 9: DIB network sestavená z 20 kapiček. Snímky ze stereoskopického mikroskopu. Zabarvily se tetramethylrhodaminem a Alexou488 připojenou k dextranu. **A** Kapičky byly separátně stabilizovány. Poté se najednou převedly a vytvořily síť. **B** K proražení a vytažení kapičky ze sítě se použila agarózou potažená Ag/AgCl elektroda. **C** Nepoškozená síť po odstranění kapičky. **D** Stabilizovaná žlutá kapička v síti na místě odstraněné kapičky (Holden et al., 2007)

4.5. Dvouvrstva kapičky a hydrogelu (Droplet Hydrogel Bilayer – DHB)

U metody DHB dochází k vytvoření dvouvrstvy mezi hydrogelem, ponořeným ve směsi oleje a lipidů, a vodní kapičkou, jejíž velikost lze kontrolovat (viz Obr. 10). Oproti jiným metodám má tento přístup delší životnost. Jeho aplikováním je možné zaznamenávání jednoho iontového kanálu (single channel recording – SCR), skenování hydrogelu z gelové elektroforézy, který obsahuje oddělené proteiny. V kombinaci s TIRF umožňuje studium inserce β -barrelových pórtvorných toxinů, jako je α -hemolysin. Samostatně se využívá např. v proteomice, při objevování nových iontových kanálů (Heron et al., 2007; Thompson et al., 2007).

Hydrogel zvyšuje stabilitu podporovaných struktur, která je limitovaná nosnou konstrukcí, náchylností na mechanické vibrace a omezením aplikovaného potenciálního gradientu přes membránu (Creasy and Leo, 2010).



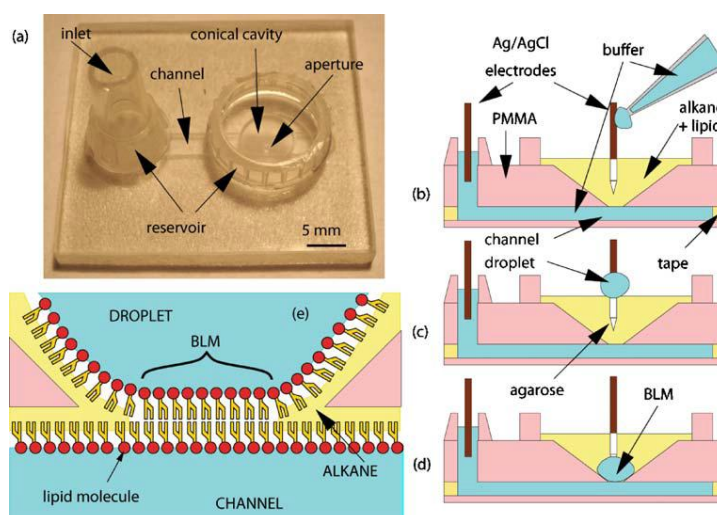
Obr. 10: **A** Schéma DHB. **B** Dvouvrstva kapičky zobrazená inverzním mikroskopem. **C** Dvouvrstva kapičky a

hydratovaného podkladu je elektricky přístupná pomocí elektrod vložených do každé komponenty.

4.6. Metoda padajících kapiček (Falling Droplets)

Metoda, která se liší od tradičních přístupů využívajících směs oleje a lipidů na tvorbu BLM (viz Obr. 11). Tento systém poskytuje rychlé a spontánní vytvoření lipidové dvouvrstvy uvnitř mikrofluidní platformy s téměř 100% účinností. To vše bez použití externího vybavení. Umožňuje elektrická měření bez nutnosti mikromanipulace. Pokud kapičky obsahují proteiny, může být zaznamenáváno chování iontových kanálů.

Systém má kónický reservoár obsahující směs lipidů a dekanu, v jejímž centru je umístěna elektroda, po které stékají kapky vody. Reservoár je spojen s aparaturou spodním mikrofluidním kanálem obsahujícím pufr. Rozdílná hustota vody a organické směsi způsobuje, že kapička klesá na dno kónické nádrže a vytváří BLM na rozhraní povrchu kapky a horního povrchu kanálu s pufr (Zagnoni et al., 2009).



Obr. 11: A Zařízení pro tvorbu BLMs. B-D Proces tvorby BLM výdejem kapičky na drát elektrody. E Schematická tvorba BLM mezi vodní kapičkou a spodním pufr (Zagnoni et al., 2009).

5. PATCH CLAMP

Je vhodným doplňkem technik umělých lipidických membrán, jelikož dovoluje měření na celých buňkách. Její předností je, že měření je prováděno na biologických membránách různého složení.

Na konci 70. let a začátkem let 80. byla tato technika vyvinuta Neherem a Sackmanem (Karmazinova and Lacinova, 2010). V dnešní době je standardem pro měření napětí nebo

proudu při studiu buněčných membrán, kde umožňuje kontrolovat iontové složení na obou stranách membrány a detailně charakterizovat zavírání iontových kanálů, propustnost a interakce léčiv (Gonzalez et al., 1999).

5.1. Patch clamp celých buněk (Whole-cell patch clamp)

Jednou z neúspěšnějších z těchto metod je Patch clamp celých buněk (Whole-cell Patch clamp). Zde je na špičku skleněné pipety částečně nasáta membrána celé buňky, která se utěsní. Toto spojení se nazývá *seal* a po jeho přetržení se zpřístupní intracelulární prostor.

Umožňuje měření iontového proudu na celé buněčné membrány. Tento přístup ovšem nelze dobře zkombinovat s ostatními fyzikálními experimenty, jako jsou optické, fluorescenční a sondou skenovací (scanning probe) metody (Fertig et al., 2002).

Záleží na konfiguraci Patch clamp zesilovače, na kterém ze dvou režimů záznamu bude pracovat. Ve „voltage-clamp“ je nahrávaným signálem transmembránový proud a řízeným vstupem je „clamped“ membránové napětí dodávané do zkoumané buňky, které je konstantní. Druhým režimem je „current-clamp“, kde vstupuje proud, který je přiváděn do buňky a následně se nahrávají změny v membránovém potenciálu, např. generování akčního potenciálu (Karmazinova and Lacinova, 2010).

5.2. Inside-out a Outside-out patch clamp

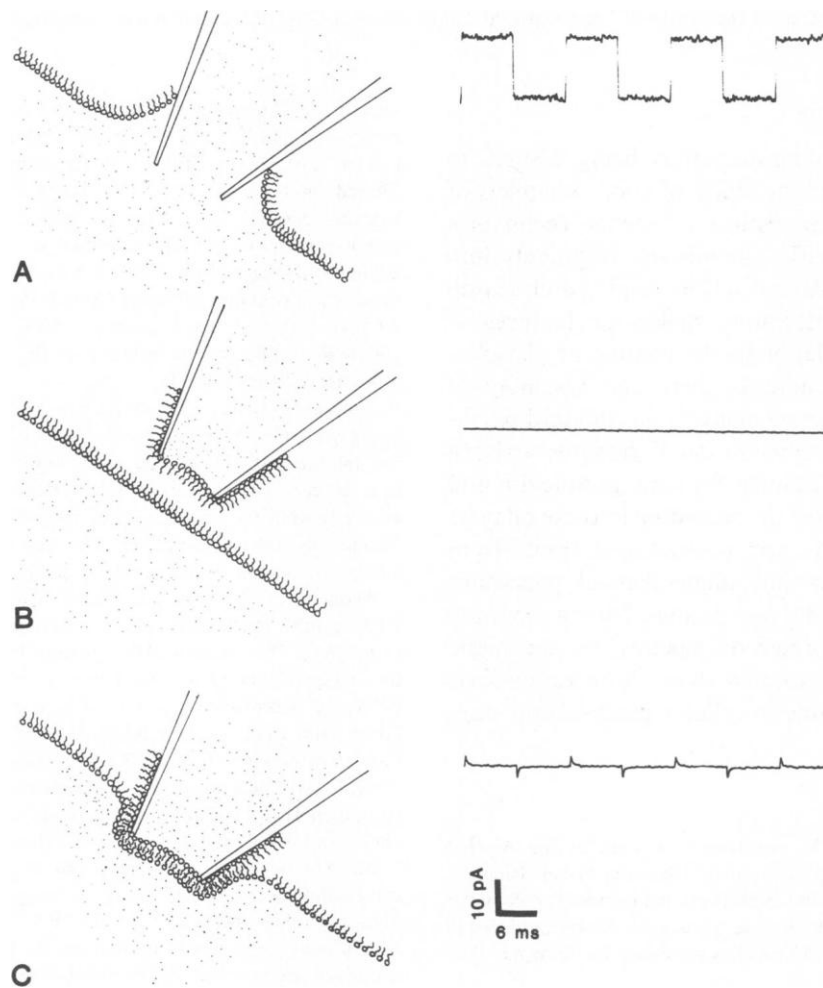
Při studiu části membrány jsou možné dva přístupy. Prvním je "inside-out" při kterém se pomocí mikropipety vytrhne z buněčné membrány váček, jehož rozložení lipidových listů odpovídá lipidovým listům membrány. Poté dojde k rozrušení váčku ze strany vystavené do roztoku mimo mikropipetu. Cytoplasmatická strana váčku je exponována do roztoku mimo mikropipetu a extracelulární strana do roztoku, který je v pipetě.

Při „outside-out“ Patch clamp je opět na špičce pipety váček, jehož rozložení lipidových listů odpovídá lipidovým listům membrány. Ovšem k rozrušení váčku dojde ze strany exponované do roztoku v mikropipetě. Cytoplasmatická strana buněčné membrány je tak vystavena do roztoku v mikropipetě a extracelulární strana do roztoku mimo mikropipetu (Hamill et al., 1981).

5.3. Patch clamp - fosfolipidová dvouvrstva

Pomocí techniky patch clamp byly z monovrstev fosfolipidů na rozhraní voda/vzduch vytvořeny fosfolipidové dvouvrstvy, které mohou obsahovat různé iontové kanály (viz Obr. 12). Malé rozměry takto vzniklé membrány dovolují studium iontových kanálů s úrovní šumu

a časovým rozmezím srovnatelným s klasickou buněčnou patch clamp technikou (Coronado and Latorre, 1983).



Obr. 12: Průběh proudu spojený s tvorbou membrán a model tvorby membrány (Coronado and Latorre, 1983).

6. SINGLE MOLECULE RECORDING POMOCÍ LIPIDOVÉ DVOUVRSTVY A PATCH CLAMP

Zde jsou konkrétní příklady využití technik ALM a Patch clamp. Uvedený přehled není ani zdaleka vyčerpávající.

6.1. Transport proteinů přes kanál

Kombinace patch clamp a umělých lipidických membrán najde uplatnění při studiu toxinů, jako jsou antrax z *Bacillus anthracis* a diphtheria toxin (DT) z *Corynebacterium diphtheriae*. Patří do AB rodiny bakteriálních toxinů, které se skládají

z A a B fragmentů. Z fragmentu B se vytváří pór, skrz který se fragment A dostává do cytoplazmy. Část B fragmentů vytváří kanály v planárních lipidických membránách při nízkém pH, které napodobuje podmínky kyselých buněčných váček (Donovan et al., 1981; Zhang et al., 2004).

U antrax toxinu se B komponenta nazývá ochranný antigen (PA) a váže se na buněčné receptory zodpovědné za translokaci A komponenty, kterou tvoří letální faktor (LF) a faktor edému (EF), jenž se přemístí do cytoplazmy. Přidáním PA monomeru k planárním lipidickým membránám vedlo k tvorbě pórů i v nepřítomnosti buněčných receptorů, ale buňky postrádající receptory jsou vůči antraxu odolné. To proto, že u buněk je tvorba pórů je pH závislá, ale závislost nakonec spočívá v přítomnosti receptoru pro PA (Wolfe et al., 2005). Dále bylo zjištěno, že tetraalkylamoniové ionty (od tetramethylamoniových k tetrahexylamoniovým) způsobují rychlou blokaci PA kanálu. Podmínkou je přítomnost PA domény na obou stranách membrány. Blok je uvolněn velkým pozitivním napětím na blokující straně (Blaustein et al., 1990).

6.2. Transport cukrů skrz pór

Planární lipidické membrány umožňují u bakterií studovat transportní systémy pro cukry. Např. byl zkoumán specifický trimetrický maltodextrinový kanál, neboli maltoporin z gramnegativní bakterie *Escherichia coli*. Studováním analýzy šumu se ukázalo, že přidáním maltózových oligosacharidů (maltóza, maltotrióza a maltohexosa) dochází k blokaci kanálů. Přidání cukrů snižuje průměrnou vodivost kanálů a indukuje nadměrný šum, ze kterého byl vyvozen závěr, že se cukr nezávisle váže na každý monomer.

Kanál je vždy inkorporovaný orientovaným způsobem, což způsobuje asymetrický transport cukrů i iontů a současně nedovolí průchod jiným cukrům. Zatímco asymetrie iontové vodivosti je poměrně slabá, napětí indukované asymetrickou translokací cukru je velmi výrazné (Bezrukov et al., 2000; Winterhalter, 1999).

6.3. Transport DNA /RNA

Pro studium transportu DNA nebo RNA skrz póry byly použity metodiky umělých lipidických membrán a Patch clamp. Membrány obsahovaly protein α -hemolysin z grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*, který má kanál o průměru 1.5-2.0 nm. Tyto rozměry umožňují průchod pouze jednořetězcové molekule (Meller and Branton, 2002).

Průchodem elektrického proudu je možné detekovat translokaci a délku

jednořetězcové DNA nebo RNA skrz α -hemmolysin. Jednotlivé homopolymery (polyC, polyA, atd.) jsou dobře rozlišitelné zaznamenáním délky translokace a blokace proudu (rozsah snížení iontového toku přes póry) (Akeson et al., 1999; Meller et al., 2000).

Byly vyřčeny názory, že v budoucnu bude díky této technologii možné zkonstruovat levné zařízení schopné osekvenovat až miliardu bází DNA v průběhu 6 hodin. Zařízení o velikost flash disku by nestálo více než 900\$ (Pennisi, 2012).

7. MEMBRÁNOVÉ PROTEINY (MP)

Dříve zmíněné vlastnosti lipidických membrán a technik jejich tvorby jsou pro popis MP zcela nezbytné. Umožnily získat znalosti, které o nich v současnosti máme.

Z dosud osekvenovaných genomů patří 20 – 30% otevřených čtecích rámců membránovým proteinům (Krogh et al., 2001). U všech organismů hrají zásadní úlohu při udržování homeostázy a zastávají funkci iontových kanálů, receptorů a různých transportérů (Nilsson et al., 2005).

Současně lipidové složení membrány ovlivňuje transport a třídění v průběhu sekretorické dráhy, účinnost translace, topologii a stabilitu výsledného proteinu, schopnost složení oligomerních komplexů a také enzymatickou aktivitu (Schneider and Toulmay, 2007).

7.1. Stavba

Membránová část proteinu je tvořena hydrofobními aminokyselinami. Na rozhraní hydrofobního okolí membrány a hydrofilního prostředí cytosolu/extracelulárního prostoru dochází k interakci polárních hlaviček fosfolipidů. Preferenčními aminokyselinami, mezi cytosolickou částí proteinu a hydrofobní doménou jsou Lysin a Arginin (Cowan and Rosenbusch, 1994; Gaur and Natekar, 2010).

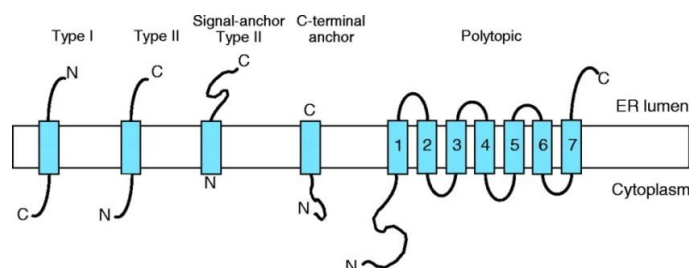
7.2. Translokace MP

Na endoplazmatickém retikulu eukaryot nebo plasmatické membráně archeí a prokaryot probíhá kotranslační inzerce proteinu. U eukaryot k tomu dochází skrz heterotrimerický membránový komplex, Sec61 komplex u eukaryot a SecY komplex u prokaryot, který tvoří translokon. Translokon ve spolupráci s navázaným ribozomem rozeznává vznikající transmembránový helix, 15-20 aminokyselinových zbytků dlouhý, na základě jeho hydrofobnosti a pouští jej přes boční otvor do lipidové dvouvrstvy (Schneider

and Toulmay, 2007). Správné skládání většiny nově syntetizovaných proteinů vyžaduje spoluúčast molekulárních chaperonů, které zabraňují špatnému složení nebo agregaci v přeplněném prostředí cytosolu (Hartl and Hayer-Hartl, 2002).

7.3. Topologie MP

Některé integrální membránové proteiny mají pouze jednu doménu, která prochází membránou (biotopické), jiné jich mají několik (polytopické). Biotopické proteiny se dělí do kategorií podle vlastností jejich transmembránové domény. V průběhu biogeneze je N-konec integrálního membránového proteinu typu I v lumen ER, zatímco u typu II je N-konec v cytoplazmě. Pokud má první transmembránová doména funkci signální sekvence i *stop transfer sequence*, jsou tyto proteiny klasifikovány jako signal-anchored (signálem ukotvené). C-koncem ukotvené proteiny mají signál kotvící doménu na nejbližším C-konci (viz Obr. 13) (Ott and Lingappa, 2002).



Obr. 13: Typy integrálních membránových proteinů. Integrální membránové proteiny mohou být syntetizovány v mnoha různých formách. Zde jsou ukázány integrální membránový protein typu I, II, C-koncem ukotvený integrální membránový protein, typ II signální sekvencí kotvený protein a multi-průchozí membránový protein (Ott and Lingappa, 2002).

7.3.1. β -barely

Struktura β -barelu se vyskytuje ve vnější membráně mitochondrií, chloroplastů a gramnegativních bakterií (viz Obr. 14). U bakterií plní funkci porinů a u mitochondrií transportérů malých molekul (porin), umožňují translokaci proteinů a regulují mitochondriální morfologii. (Paschen et al., 2003).

Bakteriální protein vnější membrány OmpX chrání bakterii tím, že naváže a neutralizuje proteinové toxiny. Mechanismus zřejmě závisí na vnějších smyčkách. Doména β -barelu funguje primárně jako membránová kotva, ale vnější smyčky mají také funkci receptorů pro různé fágy a koliciny.

V membránových β -listech proteinů tvořících β -barely je bohaté zastoupení glycinu a aromatických zbytků Tryptofan a Tyrosin tvořících dva kruhy, které kontaktují rozhraní

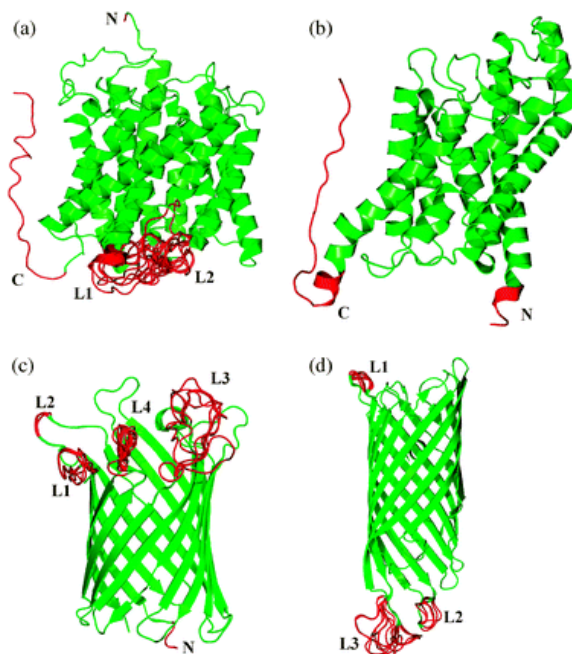
lipidové dvouvrstvy na obou koncích barelu. Zbytky uvnitř nejmenších osmistranných β -barelů jsou těsně seskládány, takže vnitřní lumen barelu je plný polárních postranních řetězců. Ty interagují mezi sebou pomocí sítě vodíkových vazeb a elektrostatických interakcí. Rozsah β -barelů je od 8-vláknových po 22-vláknové (Tamm et al., 2004).

7.3.2. Amfipatické α -helixy

Vysoce rozšířeným strukturním motivem membránových proteinů, plasmatických lipoproteinů, membránově účinných toxinů a antimikrobiálních peptidů je amfipatický α -helix (viz Obr. 14). Strukturní výhoda vyplývá z jeho termodynamického polárního/nepolárního povrchu, který je shodný s rozhraním voda/lipid u micel a dvouvrstev (Hristova et al., 1999).

Své hydrofobní aminokyselinové zbytky vystavují do vnitřní hydrofobní části membrány a umožňují tvorbu vodíkových vazeb v páteři α -helixu. Délka TM segmentů je v rozmezí 20 – 27 aminokyselin (Cowan and Rosenbusch, 1994; Daman et al., 2005).

Algoritmy založené na hydrofobnosti spolehlivě dovolují identifikovat tyto domény z primárních sekvencí. Díky tomu byla vytvořena rozsáhlá databáze transmembránových domén. Strukturní informace v sekvenci MP může být statisticky vyhodnocena. Prvky strukturální jednoduchosti těchto proteinů naznačují existenci běžně užívaných vzorů v transmembránových helix - helix interakcích. Komplexita transmembránových sekvencí je nízká, protože dvě třetiny transmembránových zbytků obsahuje v průměru jen šest aminokyselin (Leucin, Isoleucin, Valin, Fenylalanin, Alanin a Glycin) (Senes et al., 2000).



Obr. 14: Příklad 3D struktury membránových proteinů obsahujících neuspořádané oblasti. Jsou zobrazeny dva

helikální (A), (B) a dva beta (C), (D) membránové proteiny. Helikální proteiny jsou: A Amoniový kanál; B Protein usnadňující vstřebávání glycerolu. Beta proteiny jsou: C Monomerní porin; D *E. coli* transportér. Vreční část (A) a (B) odpovídá extracelulárním segmentům. TM orientace porinu (C) a transportéru (D) je neznámá. Neuspořádané oblasti jsou zobrazeny jako červené segmenty. Číslování je v pořadí od N-konce k C-konci (Nugent and Jones, 2012)

7.4. Acylace TM proteinů

Kovalentní navázání mastné kyseliny je posttranslační modifikací proteinů. Mnoho acylovaných proteinů má významnou úlohu v buněčné funkci a struktuře. Dvě nejčastější MK při acylaci jsou kyselina myristová, 14 - uhlíkatá nasycená MK, a kyselina palmitová, 16 - uhlíkatá nasycená MK (Resh, 1999).

7.4.1. N-myristilace

Hraje významnou strukturální úlohu ve stabilizaci trojrozměrné konformace proteinů. Např. poliovirus nevytvoří virion, dokud není jeho kapsidový protein myristilován a v katalitické podjednotce proteinkinázy A dojde k myristilaci hydrofobní kapsy, což přispěje ke strukturní stabilitě a termostabilitě proteinu. Kyselina myristová tedy nemusí vždy vyčnívat v proteinu (Resh, 1999).

Myristilace a posttranslační palmitoylace u heterotrimerického G-proteinu umožňuje, aby $G\alpha$ podjednotka byla zakotvena do membrány nezávisle na $\beta\gamma$ komplexu (Peskan and Oelmuller, 2000).

7.4.2. Palmitoylace

Zvyšuje hydrofobicitu proteinu, usnadňuje interakci proteinu s lipidovou dvouvrstvou a může výrazně ovlivnit funkci a třídění proteinů. Dochází k ní hlavně u mnoha signalizačních enzymů specializovaných v mikrodoménách na cytosolické straně plasmatické membrány. Tím je řízena jejich integrace do konkrétních transdukčních drah (El-Husseini and Bredt, 2002).

7.5. Odkazy na stránky s predikcí TM oblastí:

- <http://octopus.cbr.su.se/>
- <http://phobius.sbc.su.se/>
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>
- <http://www.enzim.hu/hmmtop/>

- <http://split4.pmfst.hr/split/4/>

7.6. Pórotvorné toxiny (PFT)

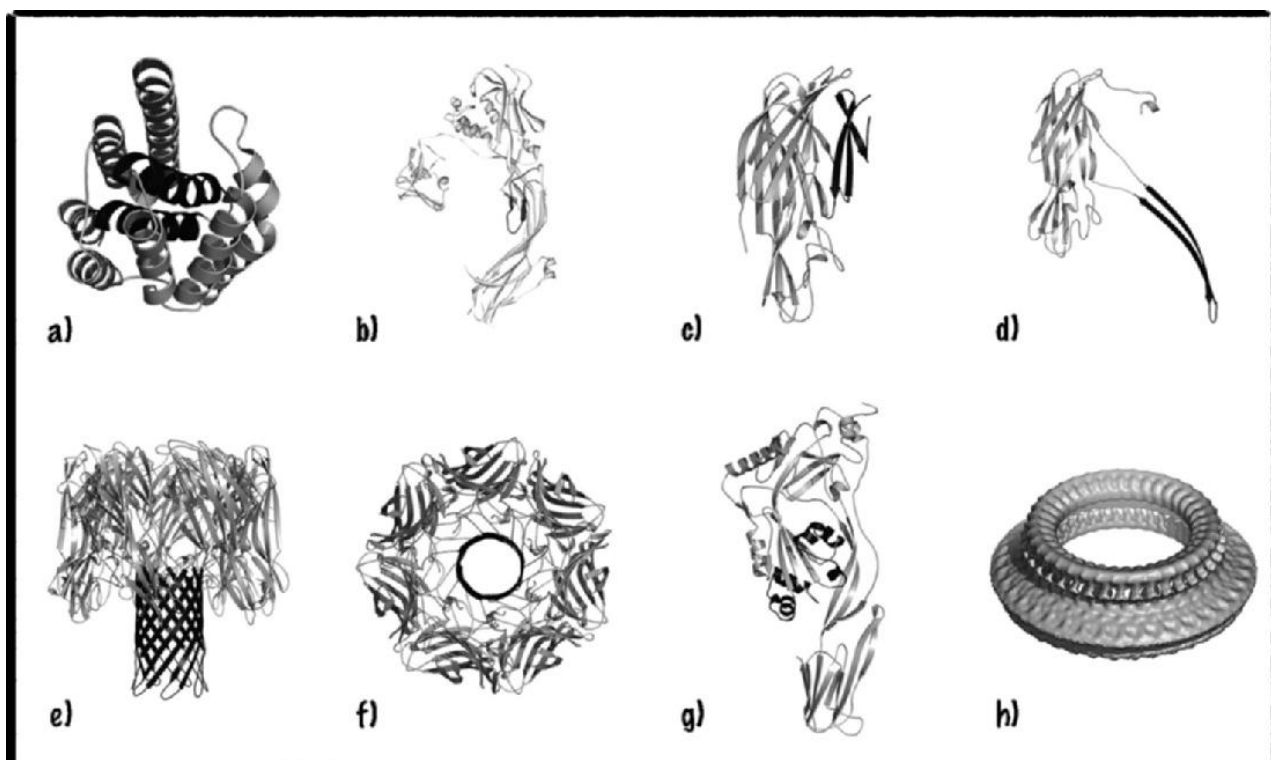
Bakteriální toxiny tvořící póry mohou být rozděleny do dvou skupin, podle strukturního motivu na α -PFT a β -PFT (viz Obr. 15) (Gilbert, 2002).

Dále se dělí do různých rodin (viz Tab. 2). Největší rodina pórotvorných toxinů jsou cholesterol dependentní cytolysiny (CDC). Tvoří je více než 20 členů z 24 různých gram pozitivních bakterií, jako jsou *Clostridium*, *Streptococcus*, *Listeria* nebo *Bacillus*. Většina CDC je produkována extracelulárně a vložena do plasmatické membrány cílové buňky. Póry mohou být tvořeny až 50 monomery (Gonzalez et al., 2008).

Mnoho bakteriálních PFT je řazeno do rodiny AB toxinů. Ty se skládají ze dvou částí: enzymatické části A a části B, která doručuje část A do cytosolu cílové buňky, kde působí (Zhang et al., 2004).

Toxin	Typ toxinu	Bakterie
α -toxin	Malý β -PFT	<i>Staphylococcus aureus</i>
α -toxin	Malý β -PFT	<i>Clostridium septicum</i>
Aerolysin	Malý β -PFT	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Anthrax toxin	AB/Malý β -PFT	<i>Bacillus anthracis</i>
Cry5B	Malý α -PFT	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Diphtheria toxin	Malý β -PFT	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Kolicin	AB/ α -PFT	<i>Escherichia coli</i>
Listeriolysin O (LLO)	CDCs (β -PFT)	<i>Listeria monocytogenes</i>
Perfringolysin O (PFO)	CDCs (β -PFT)	<i>Clostridium perfringens</i>
Pneumolysin O (PLY)	CDCs (β -PFT)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Streptolysin O (SLO)	CDCs (β -PFT)	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Vcc	Malý β -PFT	<i>Vibrio cholerae</i>

Tab. 2: Bakteriální pórotvorné (Gonzalez et al., 2008).



Obr. 15: α a β -PFT. U každého toxinu je oblast tvořící póř zvýrazněna tmavým zastíněním. **(a)** α -PFT člen rodiny kolicinu B sekretovaný *E. coli*. **(b)** Struktura ve vodě rozpustného aerolysinu od *Aeromonas hydrophila*. **(c)** Ve vodě rozpustný monomer LukF, produkovaný bakterií *Staphylococcus aureus*, který má podobnou strukturu jako α -toxin produkovaný toutéž bakterií. **(d)** β -PFT, člen rodiny α -toxinů, protomer produkovaný bakterií *S. aureus*, ukázaný v pórové struktuře **(e,f)**. **(e, f)** Heptamer póru *S. aureus*. Zobrazení **(e)** kolmo k ose póru **(f)** dolů k ose. **(g)** Perfringolysin O od *Clostridium perfringens* jako příklad ve vodě rozpustného CDC monomeru. **(h)** Cryo-EM rekonstrukce pneumolysinového póru od bakterie *Streptococcus pneumoniae* (Gonzalez et al., 2008).

8. ZÁVĚR

Pochopení a popis buněčných procesů odehrávajících se na membráně je důležitou kapitolou buněčné fyziologie i patogenity. Mezibuněčná komunikace, vlastnosti lipidické dvouvrstvy, udržování homeostázy a mnoho dalších dějů by nebylo možné studovat bez možnosti vytvořit umělý definovaný systém napodobující přirozené prostředí.

Černé lipidické membrány, planární membrány a různé typy kapiček jsou elegantní volbou při výběru metody pro experimenty ve fyziologických, mikrobiologických, imunologických a jiných zařízeních. Umožňují studium obecných fyzikálních vlastností lipidové dvouvrstvy i charakterizaci jednotlivého membránového proteinu na molekulární úrovni, např. iontového kanálu. Jejich příprava a manipulace s nimi je poměrně snadná a jednotlivé techniky mají oproti obecným technikám specifické přednosti. Navíc jejich modifikací mohou být vytvořena zařízení sloužící k různým účelům. Nové sekvenovací zařízení nukleových kyselin, elektronické senzory a „biobaterie“ už nejsou jen hudbou daleké budoucnosti.

V této práci jsem se snažil vytvořit stručný přehled vybraných metod pro tvorbu a studium lipidických dvouvrstev, a také ukázat jejich praktickou aplikaci při výzkum pórtočtovných toxinů, kterými bych se v budoucnu rád zabýval. Věřím, že tato oblast výzkumu poskytne ještě mnoho nových metod a inovací. Dále jsem uvedl stručný popis přirozených buněčných membrán, membránových proteinů a obecných technik pro jejich studium.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

Adosraku, R.K., Choi, G.T.Y., Constantinoukokotos, V., Anderson, M.M., and Gibbons, W.A. (1994). NMR Lipid Profiles Of Cells, Tissues, And Body-Fluids - Proton NMR Analysis Of Human Erythrocyte Lipids. *Journal of Lipid Research* 35, 1925-1931.

Akeson, M., Branton, D., Kasianowicz, J.J., Brandin, E., and Deamer, D.W. (1999). Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules. *Biophysical Journal* 77, 3227-3233.

Barenholz, Y. (2002). Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts". *Progress in Lipid Research* 41, 1-5.

Bezrukov, S.M., Kullman, L., and Winterhalter, M. (2000). Probing sugar translocation through maltoporin at the single channel level. *Febs Letters* 476, 224-228.

Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* 56, 930-933.

Blaustein, R.O., Lea, E.J.A., and Finkelstein, A. (1990). Voltage-Dependent Block Of Anthrax Toxin Channels In Planar Phospholipid-Bilayer Membranes By Symmetrical Tetraalkylammonium Ions - Single-Channel Analysis. *Journal of General Physiology* 96, 921-942.

Castellana, E.T., and Cremer, P.S. (2006). Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports* 61, 429-444.

Coronado, R., and Latorre, R. (1983). Phospholipid-Bilayers Made From Monolayers On Patch-Clamp Pipettes. *Biophysical Journal* 43, 231-236.

Cossins, A.R., and Prosser, C.L. (1978). Evolutionary Adaptation Of Membranes To Temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 2040-2043.

Cowan, S.W., and Rosenbusch, J.P. (1994). Folding Pattern Diversity Of Integral Membrane-Proteins. *Science* 264, 914-916.

Creasy, M.A., and Leo, D.J. (2010). Non-invasive measurement techniques for measuring properties of droplet interface bilayers. *Smart Materials & Structures* 19.

Daleke, D.L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *Journal of Lipid Research* 44, 233-242.

Daman, O., Wallace, J., Harris, F., and Phoenix, D.A. (2005). An investigation into the ability to define transmembrane protein spans using the biophysical properties of amino acid residues. *Molecular and Cellular Biochemistry* 275, 189-197.

Dixit, S.S., Kim, H., Vasilyev, A., Eid, A., and Faris, G.W. (2010). Light-Driven Formation and Rupture of Droplet Bilayers. *Langmuir* 26, 6193-6200.

Donovan, J.J., Simon, M.I., Draper, R.K., and Montal, M. (1981). Diphtheria-Toxin Forms Transmembrane Channels In Planar Lipid Bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 78, 172-176.

Downing, K.H. (1991). Spot-Scan Imaging In Transmission Electron-Microscopy. *Science* 251, 53-59.

- Eisenberg, M., and McLaughlin, S. (1976). Lipid Bilayers As Models Of Biological-Membranes. *Bioscience* 26, 435-443.
- El-Husseini, A.E.D., and Bredt, D.S. (2002). Protein palmitoylation: A regulator of neuronal development and function. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 791-802.
- Evans, R.I., McClure, P.J., Gould, G.W., and Russell, N.J. (1998). The effect of growth temperature on the phospholipid and fatty acyl compositions of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *International Journal of Food Microbiology* 40, 159-167.
- Ferlazzo, A.M., Bruschetta, G., Di Pietro, P., Medica, P., Notti, A., and Rotondo, E. (2011). Phospholipid composition of plasma and erythrocyte membranes in animal species by (31)P NMR. *Veterinary Research Communications* 35, 521-530.
- Fertig, N., Blick, R.H., and Behrends, J.C. (2002). Whole cell patch clamp recording performed on a planar glass chip. *Biophysical Journal* 82, 3056-3062.
- Fischer, A., Holden, M.A., Pentelute, B.L., and Collier, R.J. (2011). Ultrasensitive detection of protein translocated through toxin pores in droplet-interface bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 16577-16581.
- Florin-Christensen, J., Suarez, C.E., Florin-Christensen, M., Wainszelbaum, M., Brown, W.C., McElwain, T.F., and Palmer, G.H. (2001). A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7736-7741.
- Funakoshi, K., Suzuki, H., and Takeuchi, S. (2006). Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis. *Analytical Chemistry* 78, 8169-8174.
- Fyfe, P.K., McAuley, K.E., Roszak, A.W., Isaacs, N.W., Cogdell, R.J., and Jones, M.R. (2001). Probing the interface between membrane proteins and membrane lipids by X-ray crystallography. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 106-112.
- Gao, T.J., Blanchette, C.D., He, W., Bourguet, F., Ly, S., Katzen, F., Kudlicki, W.A., Henderson, P.T., Laurence, T.A., Huser, T., *et al.* (2011). Characterizing diffusion dynamics of a membrane protein associated with nanolipoproteins using fluorescence correlation spectroscopy. *Protein Science* 20, 437-447.
- Gaur, R.K., and Natekar, G.A. (2010). Prokaryotic and eukaryotic integral membrane proteins have similar architecture. *Molecular Biology Reports* 37, 1247-1251.
- Gauthier, A., and Joos, B. (2007). Stretching effects on the permeability of water molecules across a lipid bilayer. *Journal of Chemical Physics* 127, 8.
- Gawrisch, K., Eldho, N.V., and Polozov, I.V. (2002). Novel NMR tools to study structure and dynamics of biomembranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 116, 135-151.
- Gentet, L.J., Stuart, G.J., and Clements, J.D. (2000). Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. *Biophysical Journal* 79, 314-320.
- Gilbert, R.J.C. (2002). Pore-forming toxins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 832-844.

- Girard-Egrot, A.P., Godoy, S., and Blum, L.J. (2005). Enzyme association with lipidic Langmuir-Blodgett films: Interests and applications in nanobioscience. *Advances in Colloid and Interface Science* 116, 205-225.
- Goldfine, H. (1984). Bacterial-Membranes And Lipid Packing Theory. *Journal of Lipid Research* 25, 1501-1507.
- Gonzalez, J.E., Oades, K., Leychkis, Y., Harootunian, A., and Negulescu, P.A. (1999). Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets. *Drug Discovery Today* 4, 431-439.
- Gonzalez, M.R., Bischofberger, M., Pernot, L., van der Goot, F.G., and Freche, B. (2008). Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story? *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 493-507.
- Gross, L.C.M., Heron, A.J., Baca, S.C., and Wallace, M.I. (2011). Determining Membrane Capacitance by Dynamic Control of Droplet Interface Bilayer Area. *Langmuir* 27, 14335-14342.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved Patch-Clamp Techniques For High-Resolution Current Recording From Cells And Cell-Free Membrane Patches. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 391, 85-100.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002). Protein folding - Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Heron, A.J., Thompson, J.R., Mason, A.E., and Wallace, M.I. (2007). Direct detection of membrane channels from gels using water-in-oil droplet bilayers. *Journal of the American Chemical Society* 129, 16042-16047.
- Holden, M.A., Needham, D., and Bayley, H. (2007). Functional bionetworks from nanoliter water droplets. *Journal of the American Chemical Society* 129, 8650-8655.
- Hristova, K., Wimley, W.C., Mishra, V.K., Anantharamiah, G.M., Segrest, J.P., and White, S.H. (1999). An amphipathic alpha-helix at a membrane interface: A structural study using a novel X-ray diffraction method. *Journal of Molecular Biology* 290, 99-117.
- Hunter, M.S., DePonte, D.P., Shapiro, D.A., Kirian, R.A., Wang, X., Starodub, D., Marchesini, S., Weierstall, U., Doak, R.B., Spence, J.C.H., *et al.* (2011). X-ray Diffraction from Membrane Protein Nanocrystals. *Biophysical Journal* 100, 198-206.
- Hwang, W.L., Chen, M., Cronin, B., Holden, M.A., and Bayley, H. (2008). Asymmetric droplet interface bilayers. *Journal of the American Chemical Society* 130, 5878-+.
- Hwang, W.L., Holden, M.A., White, S., and Bayley, H. (2007). Electrical behavior of droplet interface bilayer networks: Experimental analysis and Modeling. *Journal of the American Chemical Society* 129, 11854-11864.
- Ide, T., and Yanagida, T. (1999). An artificial lipid bilayer formed on an agarose-coated glass for simultaneous electrical and optical measurement of single ion channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265, 595-599.
- Ivnitski, D., Wilkins, E., Tien, H.T., and Ottova, A. (2000). Electrochemical biosensor based on supported planar lipid bilayers for fast detection of pathogenic bacteria. *Electrochemistry Communications* 2, 457-460.
- Jung, S.H., Choi, S., Kim, Y.R., and Jeon, T.J. (2012). Storable droplet interface lipid bilayers for cell-free ion channel studies. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35, 241-246.

- Kahya, N., Scherfeld, D., Bacia, K., and Schwille, P. (2004). Lipid domain formation and dynamics in giant unilamellar vesicles explored by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Structural Biology* 147, 77-89.
- Karmazinova, M., and Lacinova, L. (2010). Measurement of Cellular Excitability by Whole Cell Patch Clamp Technique. *Physiological Research* 59, S1-S7.
- Klein, W., Weber, M.H.W., and Marahiel, M.A. (1999). Cold shock response of *Bacillus subtilis*: Isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *Journal of Bacteriology* 181, 5341-5349.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305, 567-580.
- Machan, R., and Hof, M. (2010). Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1798, 1377-1391.
- Maglia, G., Heron, A.J., Hwang, W.L., Holden, M.A., Mikhailova, E., Li, Q.H., Cheley, S., and Bayley, H. (2009). Droplet networks with incorporated protein diodes show collective properties. *Nature Nanotechnology* 4, 437-440.
- Mahalakshmi, R., Franzin, C.M., Choi, J., and Marassi, F.M. (2007). NMR structural studies of the bacterial outer membrane protein OmpX in oriented lipid bilayer membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1768, 3216-3224.
- McBee, T.W., Wang, L.Y., Ge, C.H., Beam, B.M., Moore, A.L., Gust, D., Moore, T.A., Armstrong, N.R., and Saavedra, S.S. (2006). Characterization of proton transport across a waveguide-supported lipid bilayer. *Journal of the American Chemical Society* 128, 2184-2185.
- Meller, A., and Branton, D. (2002). Single molecule measurements of DNA transport through a nanopore. *Electrophoresis* 23, 2583-2591.
- Meller, A., Nivon, L., Brandin, E., Golovchenko, J., and Branton, D. (2000). Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1079-1084.
- Miao, J.W., Charalambous, P., Kirz, J., and Sayre, D. (1999). Extending the methodology of X-ray crystallography to allow imaging of micrometre-sized non-crystalline specimens. *Nature* 400, 342-344.
- Miao, J.W., Ishikawa, T., Shen, Q., and Earnest, T. (2008). Extending X-ray crystallography to allow the imaging of noncrystalline materials, cells, and single protein complexes. *Annual Review of Physical Chemistry* 59, 387-410.
- Mittermaier, A., and Kay, L.E. (2006). Review - New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics. *Science* 312, 224-228.
- Montal, M., and Mueller, P. (1972). Formation Of Bimolecular Membranes From Lipid Monolayers And A Study Of Their Electrical Properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69, 3561-3566.

- Moran-Mirabal, J.M., Edel, J.B., Meyer, G.D., Throckmorton, D., Singh, A.K., and Craighead, H.G. (2005). Micrometer-sized supported lipid bilayer arrays for bacterial toxin binding studies through total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophysical Journal* 89, 296-305.
- Nagle, J.F., and Tristram-Nagle, S. (2000). Structure of lipid bilayers. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes* 1469, 159-195.
- Newcomb, W.W., Trus, B.L., Booy, F.P., Steven, A.C., Wall, J.S., and Brown, J.C. (1993). Structure Of The Herpes-Simplex Virus Capsid - Molecular Composition Of The Pentons And The Triplexes. *Journal of Molecular Biology* 232, 499-511.
- Nilsson, J., Persson, B., and von Heijne, G. (2005). Comparative analysis of amino acid distributions in integral membrane proteins from 107 genomes. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 60, 606-616.
- Nugent, T., and Jones, D.T. (2012). Accurate de novo structure prediction of large transmembrane protein domains using fragment-assembly and correlated mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E1540-E1547.
- Ott, C.M., and Lingappa, V.R. (2002). Integral membrane protein biosynthesis: why topology is hard to predict. *Journal of Cell Science* 115, 2003-2009.
- Ovalle-Garcia, E., and Ortega-Blake, I. (2007). Joining patch-clamp and atomic force microscopy techniques for studying black lipid bilayers. *Applied Physics Letters* 91.
- Paschen, S.A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D., and Neupert, W. (2003). Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* 426, 862-866.
- Pastor, R.W., Venable, R.M., and Karplus, M. (1991). Model For The Structure Of The Lipid Bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 892-896.
- Pennisi, E. (2012). Search for Pore-fection. *Science* 336, 534-537.
- Pereto, J., Lopez-Garcia, P., and Moreira, D. (2004). Ancestral lipid biosynthesis and early membrane evolution. *Trends in Biochemical Sciences* 29, 469-477.
- Peskan, T., and Oelmuller, R. (2000). Heterotrimeric G-protein beta-subunit is localized in the plasma membrane and nuclei of tobacco leaves. *Plant Molecular Biology* 42, 915-922.
- Peterson, I.R. (1990). Langmuir-Blodgett-Films. *Journal of Physics D-Applied Physics* 23, 379-395.
- Pethig, R., and Kell, D.B. (1987). The Passive Electrical-Properties Of Biological-Systems - Their Significance In Physiology, Biophysics And Biotechnology. *Physics in Medicine and Biology* 32, 933-970.
- Petrasek, Z., Derenko, S., and Schwill, P. (2011). Circular scanning fluorescence correlation spectroscopy on membranes. *Optics Express* 19, 25006-25021.
- Pisarchick, M.L., and Thompson, N.L. (1990). Binding Of A Monoclonal-Antibody And Its Fab Fragment To Supported Phospholipid Monolayers Measured By Total Internal-Reflection Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal* 58, 1235-1249.
- Punnamaraju, S., and Steckl, A.J. (2011). Voltage Control of Droplet Interface Bilayer Lipid Membrane Dimensions. *Langmuir* 27, 618-626.

- Rawicz, W., Olbrich, K.C., McIntosh, T., Needham, D., and Evans, E. (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophysical Journal* 79, 328-339.
- Resh, M.D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1451, 1-16.
- Reviakine, I., and Brisson, A. (2000). Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* 16, 1806-1815.
- Romer, W., and Steinem, C. (2004). Impedance analysis and single-channel recordings on nano-black lipid membranes based on porous alumina. *Biophysical Journal* 86, 955-965.
- Sackmann, E. (1996). Supported membranes: Scientific and practical applications. *Science* 271, 43-48.
- Schneiter, R., and Toulmay, A. (2007). The role of lipids in the biogenesis of integral membrane proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 1224-1232.
- Schonherr, H., Johnson, J.M., Lenz, P., Frank, C.W., and Boxer, S.G. (2004). Vesicle adsorption and lipid bilayer formation on glass studied by atomic force microscopy. *Langmuir* 20, 11600-11606.
- Schroder, G.F., Alexiev, U., and Grubmuller, H. (2005). Simulation of fluorescence anisotropy experiments: Probing protein dynamics. *Biophysical Journal* 89, 3757-3770.
- Senes, A., Gerstein, M., and Engelman, D.M. (2000). Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: The GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *Journal of Molecular Biology* 296, 921-936.
- Production of functional bacteriorhodopsin by an Escherichia coli cell-free protein synthesis system supplemented with steroid detergent and lipid. *Protein Science* 18, 2160-2171.
- Simon, E.W. (1974). Phospholipids And Plant Membrane-Permeability. *New Phytologist* 73, 377-420.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). Fluid Mosaic Model Of Structure Of Cell-Membranes. *Science* 175, 720-&.
- Singh, S., and Keller, D.J. (1991). Atomic Force Microscopy Of Supported Planar Membrane Bilayers. *Biophysical Journal* 60, 1401-1410.
- Spengler, M.I., Bertoluzzo, S.M., Catalani, G., and Rasia, M.L. (2008). Study on membrane fluidity and erythrocyte aggregation in equine, bovine and human species. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 38, 171-176.
- Steinem, C., Janshoff, A., Galla, H.J., and Sieber, M. (1997). Impedance analysis of ion transport through gramicidin channels incorporated in solid supported lipid bilayers. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 42, 213-220.
- Takata, K., Matsuzaki, T., and Tajika, Y. (2004). Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 39, 1-83.
- Talham, D.R., Yamamoto, T., and Meisel, M.W. (2008). Langmuir-Blodgett films of molecular organic materials. *Journal of Physics-Condensed Matter* 20.

- Tamm, L.K., Hong, H., and Liang, B.Y. (2004). Folding and assembly of beta-barrel membrane proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1666, 250-263.
- Thompson, J.R., Heron, A.J., Santoso, Y., and Wallace, M.I. (2007). Enhanced stability and fluidity in droplet on hydrogel bilayers for measuring membrane protein diffusion. *Nano Letters* 7, 3875-3878.
- Valentine, D.L. (2007). Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature Reviews Microbiology* 5, 316-323.
- Velez, M., and Axelrod, D. (1988). Polarized Fluorescence Photobleaching Recovery For Measuring Rotational Diffusion In Solutions And Membranes. *Biophysical Journal* 53, 575-591.
- Waninge, R., Nylander, T., Paulsson, M., and Bergenstahl, B. (2003). Milk membrane lipid vesicle structures studied with Cryo-TEM. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 31, 257-264.
- Weeks, G., and Herring, F.G. (1980). The Lipid-Composition And Membrane Fluidity Of Dictyostelium-Discoideum Plasma-Membranes At Various Stages During Differentiation. *Journal of Lipid Research* 21, 681-686.
- Winterhalter, M. (1999). Sugar transport through channels reconstituted in planar lipid membranes. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 149, 547-551.
- Winterhalter, M. (2000). Black lipid membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 5, 250-255.
- Wolfe, J.T., Krantz, B.A., Rainey, G.J.A., Young, J.A.T., and Collier, R.J. (2005). Whole-cell voltage clamp measurements of anthrax toxin pore current. *Journal of Biological Chemistry* 280, 39417-39422.
- Zagnoni, M., Sandison, M.E., Marius, P., and Morgan, H. (2009). Bilayer lipid membranes from falling droplets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 1601-1605.
- Zhang, S., Udho, E., Wu, Z.Y., Collier, R.J., and Finkelstein, A. (2004). Protein translocation through anthrax toxin channels formed in planar lipid bilayers. *Biophysical Journal* 87, 3842-3849.
- Zhavnerko, G., and Marletta, G. (2010). Developing Langmuir-Blodgett strategies towards practical devices. *Materials Science and Engineering B-Advanced Functional Solid-State Materials* 169, 43-48.
- Zhong, J., and He, D.N. (2012). Recent Progress in the Application of Atomic Force Microscopy for Supported Lipid Bilayers. *Chemistry-a European Journal* 18, 4148-4155.