

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Klára Hryzáková

Umělé fosfolipidové membrány – metody přípravy, vlastnosti a využití

Artificial phospholipid membranes – methods of preparation, properties and  
their usage

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Radovan Fišer, Ph.D

Praha, 2015

### **Prohlášení:**

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

V Praze, 12.05.2015

Klára Hryzáková

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména svému školiteli Radovanu Fišerovi, Ph.D, za pomoc a cenné rady při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat ostatním členům Laboratoře fyziologie bakterií na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy za přijetí do kolektivu a četné rady při mé experimentální činnosti.

## **Abstrakt**

Heterogenita biologických membrán vedla ke vzniku širokého spektra zjednodušených modelových systémů, jejichž uspořádání, velikost a tvar se dají přizpůsobovat různým aktuálním požadavkům. Existují dva rozdílné přístupy k vytváření umělých fosfolipidových membrán. První z nich je založen na vzniku membrán ve vodném prostředí. Do této skupiny patří černé lipidické membrány, dvojvrstvy na pevném podkladu, dvojvrstvy vzniklé z monovrstev na rozhraní vody a vzduchu a liposomy. Ve druhém případě vznikají dvojvrstevné membrány v množství organické fáze metodou dvojvrstev na kapičkovém rozhraní. Každý typ umělých membrán má své experimentální výhody a nevýhody, což se používá ke studiu různých problémů sahajících od chování jednotlivých fosfolipidů a proteinů až po fúze membrán. Umělé fosfolipidové membrány jsou vhodným nástrojem pro elektrickou charakterizaci dvojvrstev a nebo membránových proteinů. Tato práce je ucelený přehled nejpoužívanějších metod vhodných pro vznik umělých fosfolipidových membrán.

**Klíčová slova:** membrána, lipid, fosfolipidová dvojvrstva, liposom, černá lipidová membrána, dvojvrstvy na pevném podkladu, dvojvrstva na kapičkovém rozhraní

## **Abstract**

The heterogeneity of biological membranes has led to development of a wide spectrum of simplified model systems whose composition, size and shape can be adapted to the requirements. There are two different approaches of making artificial phospholipid bilayers. One of them is based on creating bilayers in aqueous phase. This includes Black lipid membranes, Supported phospholipid bilayers, bilayers from water/air interface and liposomes. In the second approach are bilayers created in a bulk of organic phase by Droplet interface bilayer method. Each type of artificial bilayer has its experimental advantages and disadvantages, which have been used to study many problems ranging from behaviour of single phospholipids and proteins to membrane fusion. Artificial lipid membranes are perfect tool for electrical characterisation of bilayers and embedded membrane proteins. This work is a complete review of most useful techniques of model membrane preparation.

**Key words:** membrane, lipid, phospholipid bilayer, liposome, black lipid membrane, supported lipid bilayer, droplet interface bilayer

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	<b>IV</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Vlastnosti přírodních fosfolipidových membrán</b> .....	<b>2</b>
2.1 Fosfolipidová membrána u eukaryot.....	2
2.1.1 Fázové chování lipidických dvojvrstev .....	4
2.2 Lipidická membrána u prokaryot.....	5
2.3 Lipidická membrána u Archea .....	6
2.4 Proteiny plasmatické membrány.....	6
2.5 Membránová asymetrie eukaryotních buněk .....	7
2.6 Mitochondriální membrána .....	9
2.7 Jaderná membrána.....	9
2.8 Plasmatická membrána, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát a endosomy.....	10
<b>3 Umělé fosfolipidové membrány</b> .....	<b>11</b>
3.1 Černé lipidické membrány (BLMs - Black lipid membranes).....	11
3.1.1 Vznik dvojvrstevných membrán .....	12
3.2 Lipidové dvojvrstvy na pevných podkladech (SLBs - Supported lipid bilayers) .....	14
3.3 Liposomy .....	16
3.3.1 Obří jednolamelární vesikuly (GUVs - Giant unilamellar vesicles).....	17
3.4 Dvojvrstvy na kapičkovém rozhraní - (DIBs - Droplet interface bilayers) .....	18
3.4.1 Síť kapiček - Droplet networks.....	20
3.5 Vlastnosti umělých fosfolipidových membrán.....	22
3.5.1 Lipidové rafty.....	22
3.5.2 Tekutost membrán .....	24
3.5.3 Tloušťka membrán.....	25
3.5.4 Propustnost membrán .....	26
3.5.5 Elektrická kapacita.....	27
3.6 Využití umělých fosfolipidových membrán.....	28
3.6.1 Planární dvojvrstvy.....	28
3.6.2 Liposomy.....	29
<b>4 Závěr</b> .....	<b>31</b>
<b>5 Literatura</b> .....	<b>33</b>

## Seznam použitých zkratek

AFM	atomová silová mikroskopie	Atomic force microscopy
BLM	černá lipidická membrána	Black lipid membrane
DHB	dvojvrstva vzniklá mezi kapičkou a hydratovaným povrchem	Droplet on hydrated support bilayer
DIB	dvojvrstva na kapičkovém rozhraní	Droplet interface bilayer
DLPC	1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-fosfocholine	1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DPH-PC	3-(difenylhexatrienyl)propanoyl]-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-fosfocholin	3-(difenylhexatrienyl)propanoyl]-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-fosfocholin	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
FP	polarizace fluorescence	Fluorescence polarisation
FTIR	experimentální spektroskopická technika	Fourier transform infrared (spectroscopy)
GPex	excitační generalizovaná polarizace	Excitation generalized polarization
GUV	obří jednolamelární vesikl	Giant unilamellar vesicle
LUV	velký jednolamelární vesikl	Large unilamellar vesicle
MLV	multilamelární vesikl	Multilamellar vesicle
NBD-PE	N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadekanoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin	N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadekanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
PC	fosfatidylcholin	phosphatidylcholine
PE	fosfatidylethanolamin	phosphatidylethanolamine
PEG	polyethyleneglykol	polyethylenglycol
PS	fosfatidylserin	phosphatidylserine
SLB	dvojvrstva na pevném podkladu	Supported lipid bilayer
SM	sfingomyelin	sphingomyeline
SPT	sledování jedné částice	Single particle tracking
SUV	malý jednolamelární vesikl	Small unilamellar vesicle
TF	tkáňový faktor	Tissue factor

# 1 Úvod

Základní funkcí biologických membrán je definování hranice mezi buňkami a uvnitř buněk mezi organelami. Mnoho buněčných procesů závisí na schopnosti membrán separovat odlišné oblasti, zatímco umožňují komunikaci a přísně regulovaný transport uvnitř a napříč membránou. Veškerá mezibuněčná komunikace a další uspořádání do tkání, orgánů a organismů se děje díky těmto interakcím. Biologické membrány jsou značně proměnlivé v kompozici dokonce i v rámci eukaryotní buňky. Jejich organizace musí být dynamická s cílem zprostředkovat a formovat konformační změny, signalizaci, dopravu a rozpoznávání (Chan & Boxer, 2007).

Lipidové dvojvrstvy a membránové proteiny jsou esenciální součásti buněčných membrán. Lipidové dvojvrstvy fungují jako bariéry vůči externímu prostředí, zatímco membránové proteiny transdukují chemické signály nebo selektivně transportují ionty a molekuly dovnitř a ven z buněk. Nicméně funkce větší části membránových proteinů je stále nejasná v porovnání s proteiny, které jsou rozpustné ve vodě. Membránové proteiny je složitější studovat, neboť jsou ve vodě nerozpustné a mění své původní uspořádání a aktivity pokud je z buněčných membrán izolujeme.

Ačkoliv se na intaktních biologických membránách snadno zkoumají fyziologické vlastnosti a molekulární interakce, kvantitativní měření funkcí jednotlivých membránových proteinů je na těchto membránách složité kvůli značné heterogenitě biomolekul přítomných v membránách. Umělé fosfolipidové membrány jsou zjednodušené modely biologických membrán, jejichž složení je jasně definované a snadno záměrně měnitelné. To je dělá vhodnými uspořádáními pro analýzu jednotlivých, druhově specifických membránových proteinů.

Cílem této práce je shrnout vlastnosti biologických membrán a především vytvořit ucelený přehled metod, vhodných pro vznik umělých fosfolipidových membrán. Dalším cílem je porovnat přednosti a limitace těchto metod a zjistit jejich možnou aplikaci. Dále bych se chtěla zaměřit na metody přípravy umělých membrán, jejich vlastnosti jako je tloušťka, tekutost nebo propustnost a využití membrán v různých odvětvích vědy.

## 2 Vlastnosti přírodních fosfolipidových membrán

### 2.1 Fosfolipidová membrána u eukaryot

Buněčné membrány hrají zásadní roli téměř ve všech buněčných jevech a proto je důležité jim dobře porozumět. Strukturu buněčných membrán popsali Singer a Nicolson (1972) jako fluidní mozaiku. V tomto modelu jsou proteiny amfipatické molekuly, jejichž hydrofobní konce jsou začleněny do fosfolipidové dvojvrstvy a jejich hydrofilní konce čnějí do okolí. Za fyziologických podmínek je vždy alespoň část dvojvrstvy fluidní. Tento koncept se používá nadále pro uvažování o dynamické struktuře biomembrán, ale některé aspekty bylo nutné pozměnit. Komplikované cesty proteinové difuze naznačují značnou laterální heterogenitu v membránové struktuře. Některé proteiny jsou dočasně uvězněny do malých doménách ve zdánlivě nediferenciovaných membránových regionech (Jacobson, Sheets, & Simson, 1995).

Lipidová dvojvrstva je součástí buněčné membrány a je velmi důležitá pro distribuci, organizaci a funkci membránových proteinů. Lipidická dvojvrstva je bariéra mezi extracelulárním prostorem a cytoplasmou a mezi cytoplasmou a organelami. Vzhledem k tomu, že jádro dvojvrstvy je hydrofobní, dvojvrstva brání průchodu především hydrofilním látkám. Oproti tomu lipidická složka dvojvrstvy funguje jako rozpouštědlo pro transportní a receptorové proteiny (Zachowski, 1993).

Fosfolipidy jsou amfifilní molekuly složené z hydrofilní hlavičky a z jednoho nebo dvou hydrofobních uhlovodíkových řetězců. Ve vodném prostředí se samy uspořádají do dvojvrstev, micel nebo liposomů. Fosfolipidová dvojvrstva má v typické eukaryotní buňce tloušťku několik nm a povrch o velikosti stovek čtverečních mikrometrů, ve kterých je obsaženo na stovky různých typů lipidů. V plasmatické membráně malých živočišných buněk je až  $10^9$  jednotlivých molekul (Lodish & Zipursky, 2001).

Membrány eukaryotních buněk tvoří tři třídy lipidů: glycerofosfolipidy, sfingolipidy a cholesterol nebo blízkce příbuzný sterol. Hlavními strukturními lipidy jsou glycerofosfolipidy: fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol a kyselina fosfatidová (Obr.1).

Fosfolipidy se hojně vyskytují ve všech biologických membránách. Molekula je složena ze čtyř částí: dlouhého uhlovodíkového řetězce, glycerolu nebo sfingosinu, fosfátu a z alkoholu, který je navázán na fosfát. Mastné kyseliny utvářejí hydrofobní bariéru a zbylé komponenty mají hydrofilní vlastnosti, které jim umožňují interakci s okolním prostředím.



Přesto, že se fosfolipidy vyskytují téměř ve všech organismech, Van Mooy et al. (2009) objevili v Sargasovém moři fytoplankton, jež v prostředí s nedostatkem fosforu nahrazuje fosfolipidy nefosforovými lipidy. Testování těchto membránových lipidů ukázalo, že postrádající fosfor nahrazují skupinami síry a dusíku.

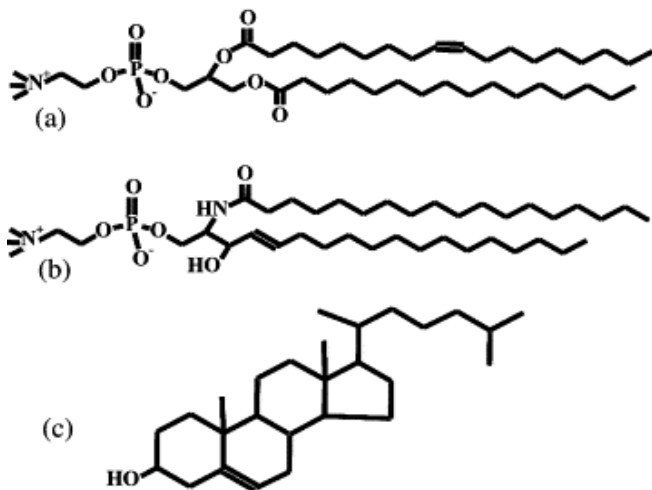
Glycerofosfolipidy tvoří tří-uhlíkatý alkohol glycerol, na jehož hydroxylové skupiny prvního a druhého uhlíku jsou esterovou vazbou navázány dva řetězce mastných kyselin. Hydroxylová skupina na třetím uhlíku je esterifikovaná kyselinou fosforečnou. Hlavní glycerofosfolipidy mají esterovou vazbou připojen na fosfátovou skupinu jeden z následujících alkoholů: serin, ethanolamin, cholin, glycerol a inositol.

Další skupinou strukturních lipidů jsou sfingolipidy. Jejich hydrofobní kostru tvoří alkohol sfingosin, na který je amidovou vazbou napojen řetězec mastné kyseliny a fosforylovaný alkohol. V savčích buňkách jsou hlavními sfingolipidy sfingomyelin a glykosfingolipidy.

Třetí důležitou složkou lipidových membrán jsou steroly, které jsou zodpovědné za regulaci membránové fluidity a permeability. V živočišných buňkách převažuje cholesterol. Cholesterol se dramaticky liší svojí strukturou od fosfolipidů a spinholipidů eukaryotních membrán (McMullen & McElhaney, 1996). Struktura cholesterolu je složena z jedné polární hydroxylové skupiny a alifatického postranního řetězce napojených na cyklickou strukturu čtyř kruhů, která je planární a rigidní. Molekuly cholesterolu se ve dvojvrstvě orientují hydroxylovou skupinou blízko k polární hlavičce vedlejšího fosfolipidu (McMullen, Lewis, & McElhaney, 2004).

Na rozdíl od buněk živočichů a hub, které obsahují pouze jeden hlavní sterol, rostlinné buňky syntetizují řadu různých sterolů, mezi kterými dominuje sitosterol, stigmasterol a 24-methylcholesterol. Sitosterol a 24-methylcholesterol jsou schopny regulovat membránovou fluiditu a permeabilitu podobným způsobem jako cholesterol v savčích membránách. Rostlinné steroly mohou také ovlivňovat aktivitu membránově vázaných enzymů (Hartmann, 1998).

Ačkoliv se relativní zastoupení těchto tří lipidických tříd liší podle druhu a buněčného typu obratlovců, cholesterol je obvykle přítomen v rozmezí 30-40 mol.%, sfingolipidy v rozmezí 10-20 mol.% a glycerofosfolipidy v rozmezí 40-60 mol.% všech plasmatických lipidů (McMullen et al., 2004; Meer, 1989).

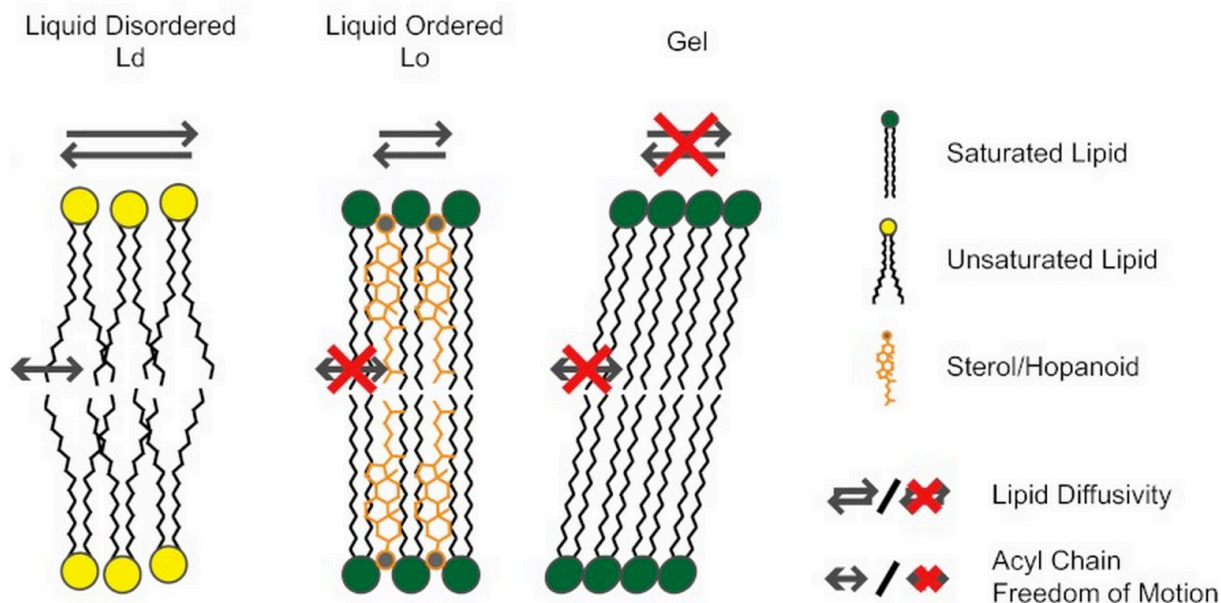


**Obr. 1:** Chemické struktury zástupců tří hlavních tříd lipidů, vyskytujících se v eukaryotních buňkách: (a) glycerosfolipid fosfatidylcholin, (b) sfingolipid sfingomyelin, (c) cholesterol (McMullen et al., 2004)

### 2.1.1 Fázové chování lipidických dvojvrstev

V nepřítomnosti cholesterolu existují lipidové dvojvrstvy v jedné ze dvou fází. Ve fázi gelu, která nastává při nižších teplotách a v tekuté fázi, která nastává při vyšších teplotách (McMullen et al., 2004). Fázový stav je závislý na lipidové struktuře; satureované uhlovodíkové řetězce sfingomyelinu způsobují ve sfingomyelinově bohatých membránách fázi gelu. Nenasycené uhlovodíkové řetězce, nacházející se u membránových glycerofosfolipidů, udávají tekutou fázi (van Meer, Voelker, & Feigenson, 2008). Steroly nejsou samy zodpovědné za formování fází, ale společně s lipidy tvořícími membránu mohou vytvořit tekutou uspořádanou fázi.

Tekutá uspořádaná fáze je termodynamický intermediát mezi tekutou neuspořádanou fází a nefyziologickou fází gelu (Obr. 2) (Devaux & Morris, 2004). Formování tekuté fáze je závislé na vlastnosti sterolů. Steroly se zároveň vmezeřují mezi nasycené řetězce sfingolipidů a zabráňují jejich krystalizaci (tedy vzniku gelové fáze) a uspořádávají nenasycené acylové řetězce (Sáenz, Sezgin, Schwille, & Simons, 2012).

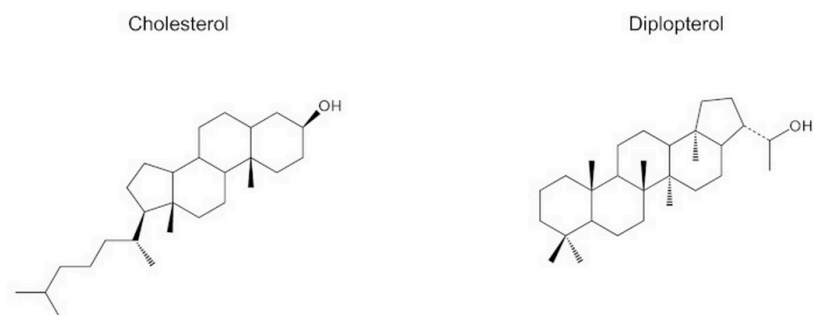


**Obr. 2:** Koncept tekuté neuspořádané fáze (Ld), tekuté uspořádané fáze (Lo) a fáze gelu (Sáenz et al., 2012)

## 2.2 Lipidická membrána u prokaryot

V prokaryotních buňkách obvykle nejsou přítomny steroly nebo jsou přítomny v zanedbatelném množství. Steroly jsou v prokaryotních buňkách nahrazeny jinými lipidy, převážně hopanoidy (Rohmer, Bouvier-Nave, & Ourisson, 1984), které však zastávají stejnou funkci jako cholesterol v eukaryotních buňkách. Sáenz et al. (2012) prokázali, že diplopterol, nejjednodušší bakteriální hopanoid, má podobnou strukturu a vlastnosti jako cholesterol (Obr. 3) a je tedy schopen uspořádat satureované lipidy a vytvořit tekutou fázi v modelových membránách.

Hopanoidy jsou odvozeny od metabolismu terpenů. Jejich struktury jsou větvené, cyklické a nesou metylové skupiny (Ourisson, Rohmer, & Poralla, 1987).



**Obr. 3:** Strukturální podobnost cholesterolu a diplopterolu (Sáenz et al., 2012)

### 2.3 Lipidická membrána u Archea

Lipidické membrány Archea jsou charakteristické zvláštními strukturními vlastnostmi. Na rozdíl od ostatních organismů mají Archea nepolární řetězce připojené ke glycerolové kostře éterovou vazbou, nikoli esterovou. Éterová vazba lépe odolává hydrolýze a zajišťuje tak membráně větší stabilitu. Lipidické molekuly jsou složeny z glycerolu a izoprenoidního alkoholu dlouhé 20, 25 nebo 40 uhlíkových atomů (De Rosa, Gambacorta, & Gliozzi, 1986). Izoprenoidní uhlovodíkové řetězce jsou značně větvené metylovými výběžky. Uhlovodíkové řetězce jsou u Archea navázány na glycerol v poloze sn-2 a sn-3, což znamená, že glycerofosfátová páteř je glycerol-1-fosfát, oproti glycerolu-3-fosfátu u eukaryot a bakterií (Koga & Morii, 2007).

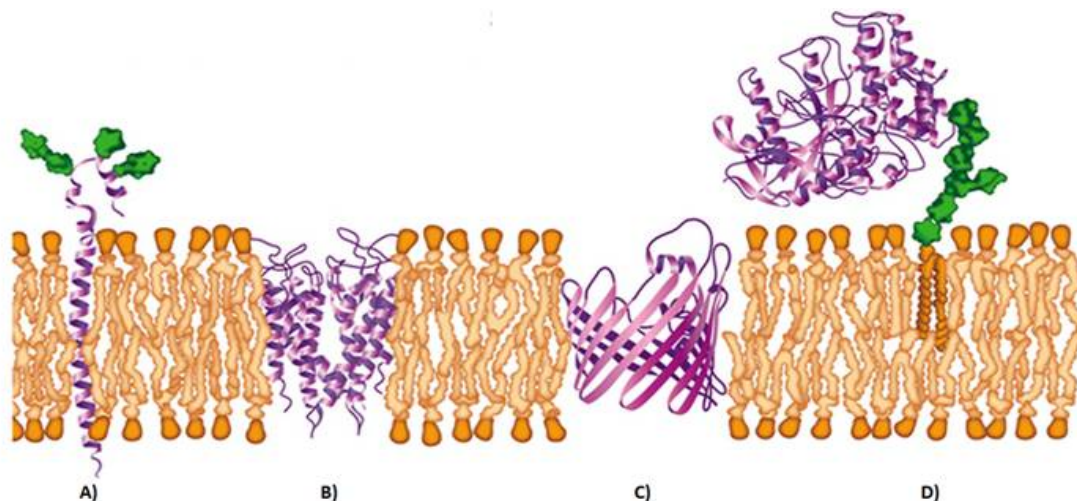
### 2.4 Proteiny plasmatické membrány

Proteiny s membránou asociované interagují s lipidy a usnadňují tím základní procesy v buňce jako je respirace, fotosyntéza, transport, signalizace nebo motilita. V současné době se ukazuje, že 20-30% všech genů většiny genomů kóduje membránové proteiny (Krogh, Larsson, von Heijne, & Sonnhammer, 2001). Z těchto proteinů byla u většiny předpokládána cytosolická orientace N i C terminální domény, což se experimentálně potvrdilo u *Saccharomyces cerevisiae* (Kim, Melén, Österberg, & von Heijne, 2006).

Topologie membránových proteinů je ve většině případů určena již během počátečního vkládání polypeptidového řetězce do membrány. Tento proces se děje téměř vždy prostřednictvím translokonů, které umožňují nascentním polypeptidovým řetězcům projít skrz a nebo se začlenit do membrány (von Heijne, 2006).

Singer a Nicolson (1972) rozlišili dva typy proteinů asociovaných s membránou: periferní a integrální (Obr. 4). Periferním proteinům stačí pouze mírná úprava okolních podmínek, jako vzrůst iontové síly média nebo přidání chelatačního činidla, aby disociovaly od membrány. V disociovaném stavu jsou tyto proteiny relativně rozpustné v neutrálních vodných pufrch. Periferní proteiny jsou s membránou spojeny pouze slabými nekovalentními, hlavně elektrostatickými interakcemi.

V eukaryotních buňkách většina transmembránových proteinů získává jejich finální membránovou orientaci během nebo okamžitě po syntéze na hrubém plasmatickém retikulu. Orientace proteinů je určována sekvencí aminokyselin. Membránové proteiny mohou procházet membránou jednou nebo vícekrát, přičemž N koncová doména bývá orientována jak na cytosolickou, tak na extracelulární stranu (E. Hartmann, Rapoport, & Lodish, 1989)



**Obr. 4:** Schématický obrázek membránových proteinů. A) Transmembránový alfa-helikální protein, procházející membránou pouze jednou. B) Transmembránový alfa-helikální protein, procházející několikrát membránou. C) Transmembránový protein tvořený strukturou beta-barelu. D) Periferní protein (převzato z internetového zdroje)<sup>1</sup>

## 2.5 Membránová asymetrie eukaryotních buněk

V eukaryotních buňkách mají membrány intracelulárních organel odlišnou lipidovou kompozici a různé biomembrány vykazují asymetrickou distribuci lipidových druhů napříč dvojvrstvou. Membránová lipidová organizace odráží dynamickou rovnováhu lipidů pohybujících se skrz dvojvrstvu v obou směrech (Thomas Pomorski, Hrafnadóttir, Devaux, & Meer, 2001).

Z glycerofosfolipidů je fosfatidylcholin lokalizován především ve vnější vrstvě plasmatické membrány, zatímco fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin a v menším množství také fosfatidylinositol jsou lokalizovány na cytosolické monovrstvě. Sfingomyelin a glycerosfingolipidy se nacházejí výhradně ve vnější vrstvě (Devaux, 1991).

Většina fosfolipidů je syntetizována v membráně endoplasmatického retikula. Vzhledem k tomu, že syntéza probíhá na cytoplasmatické straně ER, zhruba polovina nově syntetizovaných lipidických molekul musí být transportována na druhou stranu membrány, aby byla umožněna jednotná propagace dvojvrstvy (T. Pomorski & Menon, 2006). Kompoziční asymetrie plasmatické membrány nekoresponduje úplně s asymetrií lipidové syntézy. Lipidová asymetrie musí být tedy vytvářena a následně udržována specifickými mechanismy, které kontrolují pohyb lipidů napříč membránou a vyvažují náhodné lipidové transmembránové pohyby (Thomas Pomorski et al., 2001). Když už je membránová

<sup>1</sup> [http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/active/11\\_01.html](http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/active/11_01.html)

asymetrie ustanovena, udržuje jí kombinace pomalé difuze skrz membránu, interakce proteinů a lipidů a proteiny zprostředkovaný transport (Daleke, 2003).

Pravděpodobně nejdůležitější účast na udržování membránové asymetrie mají proteiny katalyzující pohyb lipidů skrz membránu. Byly popsány dvě třídy transportních aktivit, které jsou zodpovědné za ATP-závislý transport lipidů. Nejlépe charakterizovaná je aminofosfolipidová translokáza (flipáza), která transportuje PS a PE z vnější monovrstvy na cytoplasmatickou stranu. Druhým ATP-závislým proteinem je tzv. flopáza, jež katalyzuje transport lipidů opačným směrem. Rovnovážný asymetrický stav lipidů se okamžitě rozruší při aktivaci skramblázy. ATP-nezávislá skrambláza transportuje lipidy nespecificky v obou směrech (Daleke, 2003; van Meer, 2011). Biologická funkce členů rodiny skrambláz zatím není zcela známá. Nejstudovanější člen této rodiny je fosfolipidové skrambláza 1, která je zapojená do rychlé  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní redistribuce fosfolipidů skrz plasmatickou membránu. Další studie ukazují, že fosfolipidové skrambláza typu 3 je zapojena do regulace de novo biosyntézy kardiolipinu v mitochondriální membráně (Sahu, Gummadi, Manoj, & Aradhyam, 2007).

Některé regulační nebo strukturní proteiny, např. protein kináza C (Palfrey & Waseem, 1985) nebo spektrin (O'Toole, Wolfe, Ladha, & Cherry, 1999) se vyskytují na cytoplasmatické straně membrány díky jejich interakci s fosfatidylserinem. Spektrin interaguje s molekulami fosfatidylserinu bipolárními interakcemi na rozhraní lipidů a vody. Tyto interakce umožňují silnou asociaci spektrinu s lipidickým povrchem a dovolují mu rychle difundovat.

Dynamické procesy fosfolipidové translokace regulují důležité děje v buňce, například membránové pučení a endocytózu. Funkční role lipidové asymetrie je regulace biofyzických vlastností. Distribuce fosfolipidů reguluje mechanickou stabilitu membrán červených krvinek. Regulace membránových vlastností je ovlivňována interakcí skeletálních proteinů s aminofosfolipidy na vnitřní straně dvojvrstvy (Manno, Takakuwa, & Mohandas, 2002).

Udržování transmembránové lipidové asymetrie je esenciální pro normální membránovou funkci. Ztráta asymetrie a následná expozice fosfatidylserinu na vnější monovrstvu vede k rozpoznání apoptotických buňek makrofágy a jinými fagocyty. Většina makrofágů totiž specificky rozeznává tento fosfolipid a ukázalo se, že PS je rozhodujícím ligandem při pohlcování apoptotické buňky. Pokud je PS nahrazen jeho strukturním analogem, pohlcení buňky makrofágem je inhibováno (Fadok, de Cathelineau, Daleke, Henson, & Bratton, 2001).

Nádorové buňky produkují tkáňový faktor (TF), rakovinový prokoagulant a různé další faktory, které způsobují trombózy a šířené intravaskulární koagulace u pacientů s rakovinou. Ačkoliv zvýšená expozice aminofosfolipidů není obecným rysem nádorových buněk, aktivita jejich prokoagulantů vede z části k expresi PS (Balasubramanian & Schroit, 2003).

Vzhledem k tomu, že asymetrie monovrstev je v přírodě převládající, není divu, že bylo rozvinuto mnoho metod vhodných pro jejich studium: planární systémy (Hagge et al., 2002), dvojvrstvy na pevném podkladu (Katagiri, Hashizume, Kikuchi, Taketani, & Murakami, 2004), liposomy (McIntyre & Sleight, 1991) a dvojvrstvy na kapičkovém rozhraní (Hwang, Chen, Cronin, Holden, & Bayley, 2008).

## **2.6 Mitochondriální membrána**

Mitochondriální membrány savčích, rostlinných i kvasinkových buněk se vyznačují charakteristickým jednoduchým lipidovým složením. Neobsahují žádné glykosfingolipidy a hladina sterolu, fosfatidylseriu a fosfatidylmyelinu je v nich velmi nízká. Hlavními skupinami fosfolipidů mitochondriálních membrán jsou fosfatidylcholin a fosfatidylethanolamin, jejichž zastoupení činí až 80% (Horvath & Daum, 2013).

Významnou složkou vnitřní mitochondriální membrány je kardiolipin, který se pohybuje v rozmezí 10-15% všech fosfolipidů, zatímco mitochondriální fosfatidylinositol je lokalizován primárně do vnější membrány. Poměr fosfolipidů a proteinů je v mitochondriích nižší než u jiných buněčných organel, stejně tak poměr sterolů a proteinů (Daum & Vance, 1997; Meer, 1989).

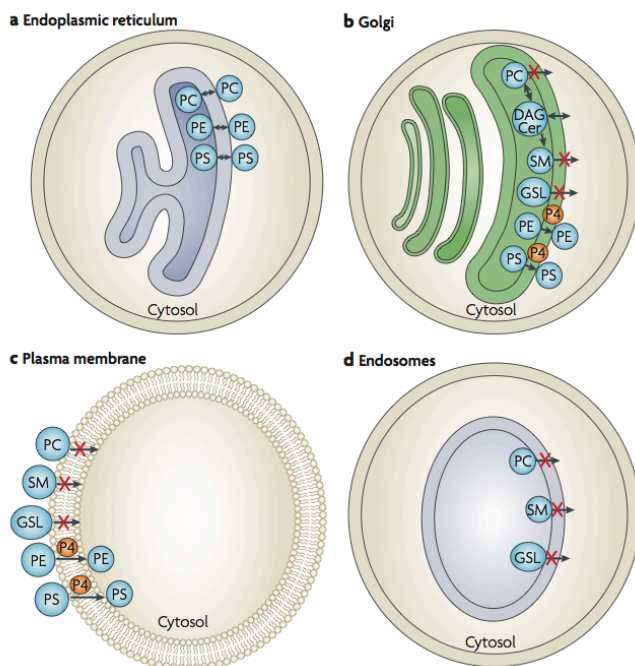
## **2.7 Jaderná membrána**

Kleinig (1970) zjistil, že jádro, jaderná membrána a mikrozomy jsou složeny ze stejných fosfolipidů ve velmi podobné relativní koncentraci.

Fosfatidylcholin je hlavní jaderný fosfolipid a zaujímá 60% z celkového obsahu fosfolipidů, 34 % připadá na fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol a fosfatidylserin. Zbylé fosfolipidy tvoří kardiolipin, sfingomyelin a lysofosfatidylcholin (Khandwala & Kasper, 1971).

## 2.8 Plasmatická membrána, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát a endosomy

Všechny orgány obsahují alespoň nějaké lipidy, které byly syntetizovány jinde a získány transportem. Lipidový transport mezi organelami musí být specifický, aby byla udržována jedinečná lipidová kompozice. Plasmatická membrána, endosomy a lysozomy jsou kompletně závislé na lipidovém transportu z jiných organel, které jsou aktivně zapojeny do lipidové syntézy (Obr. 5) (van Meer et al., 2008).



**Obr. 5:** Mechanismus vytváření asymetrické lipidové distribuce. Pohyb lipidů z endoplasmatického retikula do Golgiho aparátu, plasmatické membrány a do endozomů je určován vnitřními lipidovými transportéry. A) V ER je ustanovena nespecifická fosfolipidová transmembránová rovnováha, Membrána vykazuje téměř symetrickou distribuci mezi vrstvami dvojvrstvy. B) V Golgiho aparátu P4 ATPáza translokuje fosfatidylserin a fosfatidylethanolamin na cytosolickou stranu. Sfingomyelin je produkován sfingomyelin syntázou z ceramidu na lumenální straně. Fosfatidylcholin ani sfingomyelin nejsou transportovány na cytosolickou stranu, čímž je ustanovena asymetrie. Při syntéze sfingomyelinu je fosfatidylcholin konvertován na diacylglycerol, který volně difunduje membránou. Diacylglycerol funguje jako substrát pro cholinofosfotransferázový isozym, jehož produktem je fosfatidylcholin. C) V plasmatické membráně je fosfatidylserin a fosfatidylethanolamin transportován P4 ATPázou na cytosolickou stranu spolu s malým nebo žádným množstvím fosfatidylcholinu a sfingomyelinu. Tato homeostatická distribuce může být narušena aktivací skrambláz a nebo inhibicí P4 ATPáz. D) V endozomu dokázaly fluorescenčně značené glykosfingolipidy, fosfatidylcholin a sfingomyelin, že jsou omezeny pouze na lumenální stranu, kvůli nedostatku transportních mechanismů (van Meer et al., 2008).



### 3 Umělé fosfolipidové membrány

Heterogenita biologických membrán se nedá připisovat pouze lipidům nebo proteinům. Pouze pokud uvážíme interakce mezi lipidy, proteiny a ostatními membránovými složkami, dostaneme kompletní obrázek. V živých buňkách se dějí všechny procesy najednou a ovlivňují se navzájem, proto jsou možnosti studia na intaktních biologických membránách značně omezené. Oddělené, jednotlivé buněčné procesy, stejně tak jako vliv lipidové skladby na fyzikální a chemické vlastnosti membrán, se dají snadno studovat na umělých modelových systémech, kde je složení definované a snadno měnitelné.

#### 3.1 Černé lipidické membrány (BLMs - Black lipid membranes)

V běžném biologickém výzkumu je membránový transport studován hlavně na živých buňkách za použití molekulárních sond nebo elektrofyziologických metod (např. patch clamp (Sakmann & Neher, 1984)). Přestože tyto metody jsou schopné detekovat fyziologické vlastnosti a molekulární interakce buněčných membrán, kvantitativní měření funkce jednotlivých membránových proteinů je stále složité kvůli přítomnosti heterogenních biomolekul v membráně.

Umělé fosfolipidové membrány, neboli zjednodušené modely membrán, se skládají z purifikovaných nebo syntetizovaných fosfolipidů a používají se na analýzu jednotlivých, druhově specifických membránových proteinů už pět dekad. Existují dvě hlavní platformy: liposomy a planární dvojvrstvy (Funakoshi, Suzuki, & Takeuchi, 2006).

Planární lipidické dvojvrstvy nabízejí velkou výhodu: s malým množstvím materiálu můžeme měřit například velikost jednotlivých kanálů, iontovou selektivitu nebo translokaci ligandů. Navíc černé lipidické membrány umožňují charakterizaci fyzikálně-chemických vlastností lipidových membrán a jsou speciálně sensitivní ke změnám elektrických vlastností jako je vodivost, dielektrická konstanta membrány nebo povrchový náboj (Winterhalter, 2000).

Planární lipidické dvojvrstvy vznikají dvěma hlavními způsoby, v obou případech vzniká membrána ve speciální aparatuře s teflonovou přepážkou. Lipidická vrstva vzniklá rozprostřením roztoku přes aperturu (otvor v teflonu) je zpočátku tlustá několik mikrometrů. Postupně se začíná zužovat až do stavu planární dvojvrstvy (C. Miller, 1986). Kvalitu těchto volně stojících planárních vrstev je možné zjistit osvětlením vrstvy a sledováním odraženého světla v mikroskopu. Když začíná vrstva řídnout, objeví se barevné odrazy (interference na tenké vrstvě) a následně můžeme pozorovat šedo-černé tečky šířící se přes vrstvu. To je důsledkem interference odraženého světla od vody/lipidů a fázového posunu světla z rozhraní

lipidů a vody, kdy začíná být destruktivní interference pokud je optická cesta skrz membránu a zpět zanedbatelná v porovnání s vlnovou délkou použitého světla (Winterhalter, 2000).

Další výhody černých lipidických membrán proti liposomům jsou následující: elektrody pro elektrofyziologické studie jsou snadněji přístupné a je možné vyměnit činidla na obou stranách membrány. Černé lipidické membrány jsou nejčastěji vytvářeny malováním dvojvrstvy přes otvor v septu (Mueller, Rudin, Tien, & Wescott, 1962) nebo skládáním dvojvrstev z monovrstev (Montal & Mueller, 1972). Nevýhoda malovací techniky tkví v tom, že dvojvrstva může obsahovat rozpouštědla, která se používají na rozpouštění lipidů, což ovlivňuje fyzikální vlastnosti umělé membrány. Planární lipidické dvojvrstvy vytvářené z monovrstev mají naopak obsah rozpouštědel velmi malý, ba dokonce žádný (S. H. White, Petersen, Simon, & Yafuso, 1976).

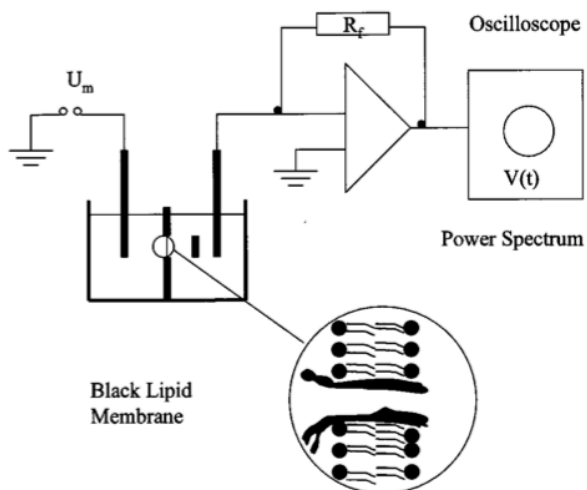
Obě metody obecně tvoří velmi stabilní dvojvrstvy s vysokým elektrickým odporem, což je činí vhodným nástrojem pro dlouhotrvající měření jednotlivých kanálů. Problém s oběma metodami je vytvoření vhodné membrány, které může být časově náročné. Často se také stává, že je membrána děravá, nestabilní, snadno se rozbíjí nebo je otvor v septu pokryt příliš mnoha lipidy, které nevytvoří dvojvrstvu. Dalším častým problémem je vkládání příliš velkého množství proteinových kanálů do membrány, což limituje použití dat pro jednokanálovou analýzu (Braun, Baer, Moroni, & Thiel, 2014).

### **3.1.1 Vznik dvojvrstevných membrán**

Membrány jsou formovány na aparatuře sestávající ze dvou prohlubní oddělených vertikálním septem, které má ve svém centru otvor s průměrem 1 cm překrytý tenkým (25  $\mu\text{m}$ ) teflonovým filmem. Teflonový film obsahuje malou aperturu. Septum je těsně připevněno ke stěnám prohlubní a elektricky izoluje dva vodné kompartmenty (Montal & Mueller, 1972).

Pro vytváření černých lipidických membrán existuje mnoho metod, přičemž v literatuře se nejčastěji setkáváme s painting (malovací) metodou (Mueller et al., 1962) a s metodou skládání monovrstev (Montal & Mueller, 1972). Painting metoda spočívá v použití nanášecího štětce (nebo například špendlíkové hlavičky) k vytvoření lipidové dvojvrstvy. Štětcem je roztok fosfolipidů v rozpouštědle nanesen přes malý otvor v teflonu. Důležité je na teflon nanést pouze minimální množství lipidového roztoku. Nanášení roztoku se provádí v podmínkách, kdy je apertura (otvor v teflonu) ponořena ve vodném pufu, což nepatrně ztěžuje podmínky. Tato metoda je citlivá na příliš velké množství lipidů na nanášecím štětci a na přílišném množství lipidů aplikovaných do okolí apertury. Druhá metoda, nazývaná též

technika Montal-Mueller se provádí tak, že lipidy rozpuštěné v organickém rozpouštědle jsou rozprostřeny jako monovrstvy na hladinách vodných roztoků v prohlubních. Po odpaření rozpouštědla se monovrstvy skládají přes otvor v teflonovém filmu tak, že se nejprve zvedne hladina v jedné prohlubni a poté v druhé. Tím vznikne dvojvrstva. Pro elektrická měření jsou tyto dvě prohlubně propojeny elektrodami (Obr. 6) (Montal & Mueller, 1972; Ti Tien, 1968).



**Obr. 6:** Schématické uspořádání pro měření vodivosti na planárních lipidických membránách. Na jednu stranu, obvykle nazývanou cis-strana, je aplikováno napětí  $U$ . Proud procházející napříč membránou nebo skrz kanál je detekován napětově-proudovým zesilovačem.  $R_f$  je zpětnovazební odpor a určuje zesílení. Zesílený signál  $V(t)$  je dále zpracováván buď analogově digitálním převodníkem a následně vhodným počítačovým programem, nebo pokročilým osciloskopem (Winterhalter, 2000).

Braun et al. (2014) přišel s vylepšenou metodou vzniku planární lipidové dvojvrstvy z monovrstev za pomoci vzduchové bubliny. V přípravné fázi této metody ošetřil okraje kolem otvoru v teflonovém filmu roztokem 1% hexadekanu, což dalo vzniku hydrofobní oblasti kolem otvoru. Dvojvrstva se pak tvoří klasickou metodou ze dvou monovrstev (Montal & Mueller, 1972). Pokud tato procedura vede ke vzniku stabilní dvojvrstvy, může být proteinový kanál vložen do membrány a elektrické měření může začít. V případě, že je membrána nestabilní, je možné aplikovat pseudo-malovací techniku se vzduchovou bublinou. Vzhledem k předešlému ošetření okrajů apertury hexadekanem, obsahují hydrofobní okraje kolem teflonové apertury zásobu lipidů. Tyto zásobní lipidy mohou být rozprostřeny přes aperturu. Pro tento účel použil Braun et al. (2014) mikro stříkačku Hamilton a vytvořil malou vzduchovou bublinu pod vodní hladinou. Vzduchová bublina je pak rozprostřena přes teflonovou aperturu, což se dá sledovat skrz stereomikroskop. Pohyb bubliny z okrajů přes aperturu přemístí lipidy ze zmíněné zásoby a dá vzniknout nové dvojvrstvě.

### 3.2 Lipidové dvojvrstvy na pevných podkladech (SLBs - Supported lipid bilayers)

Lipidové dvojvrstvy na pevných podkladech jsou planární struktury složené ze dvou lipidových monovrstev adsorbující na hydrofilní pevné látky. Ačkoliv je plocha SLBs mnohem větší než plocha černých lipidových membrán, její stabilita je mnohem větší a membrána si své elektrické vlastnosti udržuje i několik týdnů (Purrucker, Hillebrandt, Adlkofer, & Tanaka, 2001).

Pokud by dvojvrstevné membrány ležely přímo na pevném podkladu, tak by se jejich vlastnosti příliš nepodobaly biologickým membránám, zejména kvůli ztrátě membránové fluidity. Membránová fluidita je v systémech SLB udržována 10–20 Å (1-2 nm) tenkou vrstvou vody mezi membránou a pevným podkladem (Obr. 7) (Tamm & McConnell, 1985). Separace membrány od pevného podkladu ultratenkou vrstvou vody udržuje termodynamické a strukturní vlastnosti volné membrány, což umožňuje aplikaci některých povrchově sensitivních metod (E. Sackmann, 1996).

Existuje několik metod na přípravu lipidových dvojvrstev na pevném podkladu. První metoda se provádí Langmuir-Blodgett technikou, kdy se na hydrofobní substrát ponořený ve vodném roztoku naváže monovrstva lipidů a následně je přiložen k další lipidické monovrstvě za vzniku dvojvrstvy (Tamm & McConnell, 1985). Druhou metodou je adsorpce a fúze váčků z vodného prostředí na povrch substrátu. Další možností je rovněž kombinace obou předešlých metod (Kalb, Frey, & Tamm, 1992). Fosfolipidové dvojvrstvy jsou tvořeny na různých hydrofilních substrátech, nejčastěji na částicích oxidu křemičitého (Katagiri et al., 2004), skle (Cremer & Boxer, 1999) nebo slídě (Zasadzinski et al., 1991).

Jednou z povrchově sensitivních metod vhodných pro lipidické dvojvrstvy na pevném povrchu je např. Mikroskopie atomárních sil (AFM), kterou Lin, Blanchette, Ratto a Longo (2006) použili ke zjištění distribuce domén DSPC v rámci jednotlivých vrstev DLPC/DSPC lipidových dvojvrstev na pevném podkladu, aby získali nový pohled na důsledky lipidické asymetrie v živých buňkách. AFM je ideální nástroj pro vizualizaci biologických a organických povrchů ve vysokém rozlišení. AFM zaznamenává mezi-atomární síly mezi hrotem na ohebném nosníku a povrchem vzorku a je kompatibilní s variabilním prostředím, včetně vody nebo solného roztoku (Zasadzinski et al., 1991).

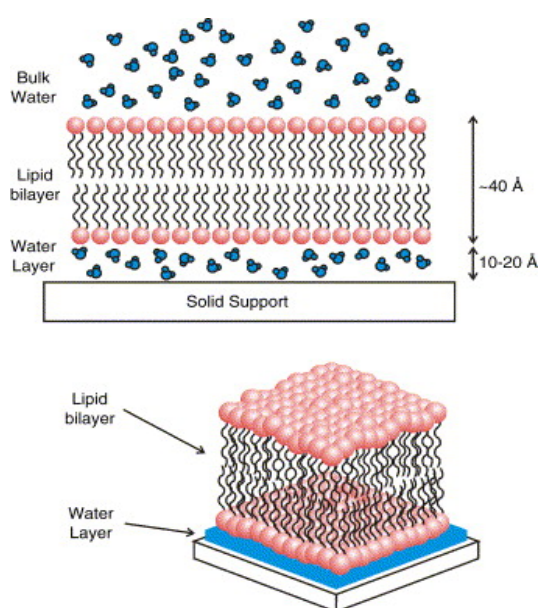
Přestože jsou fosfolipidové membrány na pevných površích vhodné pro mnohá zkoumání buněčných povrchů, přímý kontakt spodní monovrstvy a pevného povrchu představuje značná omezení v některých systémech. Různé typy membránových deformací

jsou potlačeny a inkorporace transmembránových proteinů s velkou cytosolickou doménou je nemožná nebo zcela nefyziologická (Wong, Park, Seitz, & Israelachvili, 1999). Depozicí ultratenké polymerové vrstvy na pevný podklad vznikne prostředí vhodné pro imobilizaci glykolipidů, membránových receptorů a proteinů a vytvoření modelových buněčných povrchů (Erich Sackmann & Tanaka, 2000).

Polymery vhodné pro vznik umělé membrány musejí mít několik specifických vlastností. Polymery musí být hydrofilní a relativně chemicky inertní, aby nedocházelo k nechtěným interakcím mezi nimi a membránou, a musí být schopné tvořit tenkou vrstvu s jednotným povrchem, vhodným pro vznik dvojvrstvy (McCabe & Forstner, 2013).

Lipidové dvojvrstvy oddělené od pevného podkladu nanometrovou vrstvou vody nebo ultratenkou vrstvou polymeru si udržují vlastnosti volných dvojvrstev. Tato vlastnost umožňuje aplikaci několika povrchově sensitivních metod – elipsometrie, povrchové plasmonové resonance, FTIR (Fourier transform infrared) spektroskopie, mikointerferometrie, nukleární magnetické resonance, neutronové a x- ray povrchové reflektometrie (E. Sackmann, 1996).

Další užitečnou metodou je měření laterální difuze (obvykle prováděno pomocí fluorescenčních technik). Je to způsob, jak snadno charakterizovat kontinuitu a fluiditu membrán na pevném povrchu. Tato technika umožňuje citlivé měření poloměrů membránově vázaných proteinů, měření koeficientu tření mezi lipidovou vrstvou a polymerem, měření hydrodynamických vlastností nebo třeba povrchové viskozity polymerových filmů (Kühner, Tampé, & Sackmann, 1994).



**Obr. 7:** Schématický diagram fosfolipidové dvojvrstvy na pevném podkladu. Membrána je od substrátu oddělena 10–20 Å tenkou vrstvou vody (Castellana & Cremer, 2006).

### 3.3 Liposomy

Fosfolipidy jsou amfifilní molekuly, které se samy uspořádávají do vesikulů, pokud jsou rozptýleny ve vodném prostředí. V přírodě fungují velké lipidické vesikuly jako membrány živých buněk a chrání jejich intracelulární komponenty od extracelulárního prostředí. Malé lipické vesikuly (velké několik nanometrů) fungují jako intracelulární transportéry. Kompartimentizace lipidickými membránami umožňuje zvýšení komplexity a funkčnosti biologických systémů (Tan, Hettiarachchi, Siu, Pan, & Lee, 2006). Umělé syntézy nanometr velkých lipidových vesikulů mohou být navrženy s odlišnými povrchovými vlastnosti pro různé aplikace, například cílený transport léků (Wright & Huang, 1989).

Hlavními rysy liposomů jsou za prvé charakteristická morfologie, tedy relativně nepropustná membrána kompletně uzavírající vodné prostředí, a za druhé schopnost uzavřít do sebe během formování různá rozpouštědla přítomná ve vodné fázi (Szoka Jr & Papahadjopoulos, 1980).

V případě, že pouze jedna fosfolipidová dvojvrstva obklopuje rozpouštědlo, nazýváme tyto struktury v závislosti na velikosti malé (SUV) nebo velké (LUV) jednodamelární vesikuly, zatímco termín multilamelární vesikuly (MLV) se používá v případě velkého množství membrán uzavírajících rozpouštědlo. Termíny obří vesikuly (GV – giant vesicle) a velké nebo malé oligolamelární vesikuly se používají pro velké vesikuly a struktury, ve kterých několik dvojvrstev obklopuje uvězněné rozpouštědlo (Lasic, 1988).

Mechanické rozptýlení suchých lipidů ve vodné fázi vede ke vzniku multilamelárních vesikulů dosahujících velikostí od 0,1 až po několik  $\mu\text{m}$ . Energickým mícháním, krátkou sonikací nebo filtrací skrz polykarbonátové membrány získáme menší a více jednotné multilamelární vesikuly (Szoka Jr & Papahadjopoulos, 1980). Velké jednodamelární vesikuly a oligolamelární vesikuly vznikají zpětným fázovým odpařováním. To znamená zavedení vodného pufru do směsi fosfolipidů a organického rozpouštědla, přičemž organické rozpouštědlo je následně odstraněno vypařováním za sníženého tlaku. Tyto liposomy jsou tvořeny různými kombinacemi lipidů a vyznačují se velkým poměrem zachyceného vodného roztoku v poměru k množství lipidů (Szoka & Papahadjopoulos, 1978).

Další metodou přípravy malých a velkých jednodamelárních liposomů je opakované zmrazování a rozmrazování vodných roztoků obsahujících lipidy za vzniku liposomů menších než 200  $\mu\text{m}$  (Traikia, Warschawski, Recouvreux, Cartaud, & Devaux, 2000).

### 3.3.1 Obří jednodamelární vesikuly (GUVs - Giant unilamellar vesicles)

Obří jednodamelární vesikuly jsou vhodné modely pro studium buněčných membrán, zejména kvůli jejich podobné velikosti a zakřivení. GUVs dosahují v průměru velikosti mezi 10 až 200  $\mu\text{m}$ . V tom také spočívá jejich důležitá vlastnost; jsou viditelné pod světelným mikroskopem (Menger & Angelova, 1998; Tan et al., 2006).

Několik různých metod vede ke vzniku obřích liposomů. Tyto metody zahrnují: opatrnou hydrataci, zmrazování a tání roztoků, hydrataci pevných látek, odpařování rozpouštědel a elektroformaci. Tyto metody produkují obří liposomy ve vysoké kvalitě s velkým výtěžkem, ale typicky jsou limitovány roztoky o nízké iontové síle (Horger, Estes, Capone, & Mayer, 2009).

Hydratace pevné látky spočívá v rozpuštění fosfolipidů nebo jejich směsi v  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , načež je rozpouštědlo odstraněno za sníženého tlaku. K suchému filmu fosfolipidů se přidá deionizovaná voda a vše se promíchá na vortexu. Následné zmrazení a lyofilizace vedou ke vzniku načechnutého pudru. Vznik GUV pak spočívá v nanesení 0,1 mg pudru do teflonového kolečka připevněného na krycí skličko. Přibližně 0,5 ml vody je použito na zakrytí pudru. Je nutné nechat pudr hydratovat po 30 min (Menger & Angelova, 1998).

Elektroformace obřích jednodamelárních vesikulů (GUVs) je efektivní metoda umožňující reprodukovatelnou formaci obřích liposomů tak, že se aplikuje střídavé napětí na tenkou uspořádanou lipidovou vrstvu uloženou na povrchu elektrody (Collins & Gordon, 2013). Angelova a Dimitrov (1986) popsali jako první vznik obřích liposomů aplikací elektrického pole. Elektroformace začíná pokrytím platinových elektrod chloroformovým roztokem se směsí lipidů. Elektrody jsou vysušeny plynným dusíkem. Zbylý chloroform je odstraněn umístěním komůrky na hodinu do vakua. Následně jsou lipidy hydratovány asi 1 ml vody. Teplota v komůrce je nastavena na hodnotu fázového přechodu lipidů s nejvyšším bodem tání. Střídavé elektrické pole o velikosti 3V a frekvenci 10 Hz je aplikováno napříč komůrkou (Wesołowska, Michalak, Maniewska, & Hendrich, 2009).

Elektroformace jako metoda vhodná pro vznik GUV umožnila produkci obřích vesikulů složených ze směsi lipidů s přirozeným sklonem k fázovému chování a vzniku lipidových raftů. Fázový přechod se dá snadno pozorovat ve směsi dvou lipidů, pokud se tyto lipidy znatelně liší v teplotě fázového přechodu. Pokud je teplota systému nastavena na hodnotu mezi těmito teplotami, jeden druh lipidů je ve fázi gelu a druhý v tekuté fázi (Wesołowska et al., 2009).

Zabudovávání iontových kanálů do chemicky definovaných lipidových membrán pro elektrofyziologické nahrávání je vhodné pro identifikaci a charakterizaci těchto proteinů.

Buňkám podobná struktura obřích liposomů umožňuje aplikaci tradiční metody patch clamp (Sakmann & Neher, 1984) bez ztráty kontroly nad lipidickým prostředím (Collins & Gordon, 2013). Principem patch clamp je elektrická izolace membránového terčičku od okolního roztoku a nahrávání proudu procházejícího terčičkem. Toho je dosaženo tlačení skleněné mikropipety proti povrchu liposomu a aplikováním lehkého sání. Mikropipeta je naplněna vhodným elektrolytem. V místě kontaktu pipety a membrány vznikne těsnění, jehož elektrický odpor je vyšší než 10 GΩ a umožňuje tak následný záznam elektrického proudu jednotlivých iontových kanálů (Ogden & Stanfield, 1994).

### **3.4 Dvojvrstvy na kapičkovém rozhraní - (DIBs - Droplet interface bilayers)**

Umělé lipidové dvojvrstvy jsou tvořeny několika různými technikami, z nichž některé jsou popsány výše: Dvojvrstvy na pevném podkladě, černé lipidové membrány, dvojvrstvy vzniklé z monovrstev na rozhraní vody a vzduch (Montal-Mueller technika) a liposomy. Tyto techniky mají společný znak: vždy vznikají ve vodném prostředí. Funakoshi et al. (2006) jako první popisují vznik dvojvrstev mezi dvěma vodnými objemy ponořenými do směsi lipidů a oleje. Bayley et al. (2008) popisuje konfiguraci, ve které je vodná fáze přítomná pouze jako malá kapička (o objemu 100 – 300 nl) v množství organické (nepolární) fáze. Pozice kapiček a velikost lipidových membrán je kontrolována připojením kapiček k Ag/AgCl elektrodám, které jsou napojeny na mikromanipulátory. Elektrody v kapičkách umožňují jak aplikaci potenciálu, tak měření iontového proudu tekoucího skrz zabudované kanály a póry (Leptihn et al., 2013). Konce elektrod jsou obaleny agarózou, aby byl jejich povrch hydrofilní a kapičky se na nich udržely (Holden, Needham, & Bayley, 2007). Dvojvrstva na kapičkovém rozhraní vzniká tak, že se vodná kapička ponoří do směsi oleje (hexadekan, skvalen) a lipidů. Spontánně se na kapičce utvoří monovrstva samouspořádaných lipidů, jejichž hlavičky přiléhají ke kapičce a acylové řetězce ční do okolí. Pokud dojde k fyzickému kontaktu dvou takto vzniklých kapiček, vytvoří se dvojvrstva. Dvojvrstvy na kapičkovém rozhraní jsou mnohem robustnější a jejich životnost je mnohem delší v porovnání s planárními systémy. DIBs mohou být rozděleny a následně spojeny několikrát za sebou pohybováním kapiček od sebe a k sobě (Hwang, Holden, White, & Bayley, 2007). Membránové proteiny rozptýlené v jedné z kapiček se přímo zabudovávají do membrány. Výhoda použití kapiček spočívá v tom, že můžeme měřit elektrický záznam iontových kanálků na membránách, které jsou *in vivo* příliš malé na to, aby na ně bylo možné použít jiné metody, např. patch clamp (Sakmann & Neher, 1984). Příkladem takových membrán jsou membrány erytrocytů nebo mitochondrií

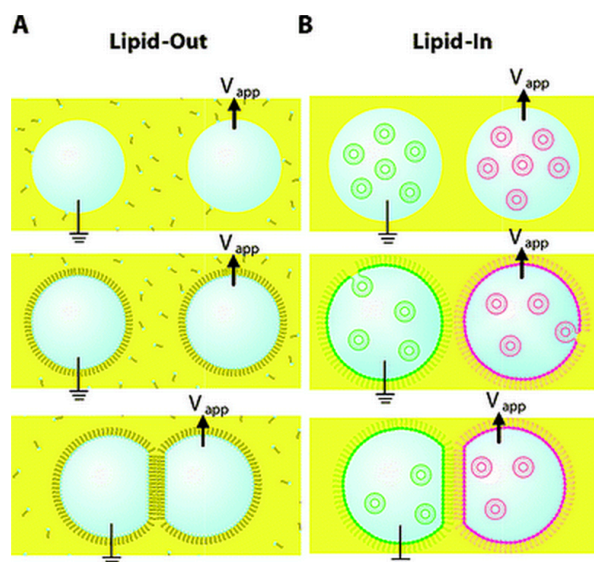


(Leptihn, Thompson, Ellory, Tucker, & Wallace, 2011). Aby bylo možné měřit elektrický záznam membrán mitochondrií a erytrocytů, musí se z lipidů izolovaných z těchto membrán vytvořit dvojvrstvy na kapičkovém rozhraní.

Byly představeny dvě metody formování dvojvrstev na kapičkovém rozhraní (Obr. 8). Lipid-out metoda používá lipidy rozpuštěné v olejové fázi za vzniku kapiček obalených identickou monovrstvou. Druhá metoda - lipid-in pracuje s lipidovými váčky uvnitř vodné fáze (uvnitř kapiček). Lipid-in dvojvrstva na kapičkovém rozhraní vzniká na rozhraní oleje a vody, kde tyto vesikly fúzí a tvoří monovrstvy. Výhoda techniky lipid-in je mimo jiné nižší experimentální cena oproti lipid-out. Lipidy totiž nemusí být v množství olejové fáze a množství lipidů tvořící vesikly je mnohem větší, než jaké je množství lipidů rozpustných v olejové fázi. Navíc vytvářením kapiček s odlišnou kompozicí vesiklů mohou být kapičky ve stejné lázni obaleny jinými monovrstvami a umožnit tak vznik asymetrických dvojvrstev (Hwang et al., 2008).

Kromě formování dvojvrstev na rozhraní dvou kapiček je také možné vytvořit dvojvrstvu mezi kapičkou a polopevným podkladem jako je hydrogel (Heron, Thompson, Mason, & Wallace, 2007). Tyto kapičky na hydratovaném pevném povrchu (Droplet-on-hydrated support bilayers – DHBs) vykazují mechanickou stabilitu; dvojvrstvy vydrží až několik týdnů a odolávají mechanickému namáhání (Bayley et al., 2008).

Single-particle tracking (SPT, sledování jedné částice) je počítačová video-mikroskopie, která se používá na sledování pohybu fluorescenčně značených proteinů nebo lipidů na buněčném povrchu (Saxton & Jacobson, 1997). Thompson, Heron, Santoso a Wallace (2007) použili fluorescenční mikroskopii s rozlišením jednotlivých molekul na systému DHBs, aby charakterizovali lipidickou membránu a zjistili mechanismus vkládání pórotovního toxinu alfa-hemolysinu ze *Staphylococcus aureus*. Jejich výsledky ukázaly, že DHBs se vyznačují vysokou lipidovou mobilitou, podobnou mobilitě pozorované na volných dvojvrstvách, a proteinová difúze v těchto dvojvrstvách je charakteristická snižující se laterální mobilitou.

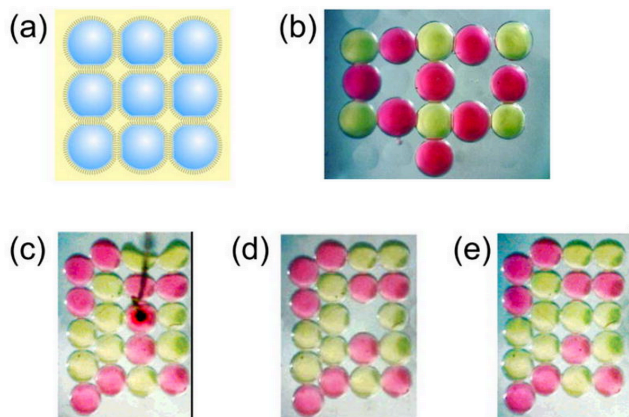


**Obr. 8:** Schéma formování dvojvrstev na kapičkovém rozhraní v uspořádání lipid-in a lipid-out. A) Vznik symetrické dvojvrstvy metodou lipid-in. Vrchní obrázek: Dvě vodné kapičky jsou ponořeny do roztoku lipidů a hexadekanu. B) Vznik asymetrické dvojvrstvy. Vrchní obrázek: Dvě vodné kapičky obsahující lipidové vesikuly rozdílného složení jsou ponořeny do hexadekanu. A,B) Prostřední obrázek: Vznik monovrstvy na každé kapičce. Spodní obrázek: přiblížení kapiček a vznik dvojvrstvy (Hwang et al., 2008).

### 3.4.1 Sítě kapiček - Droplet networks

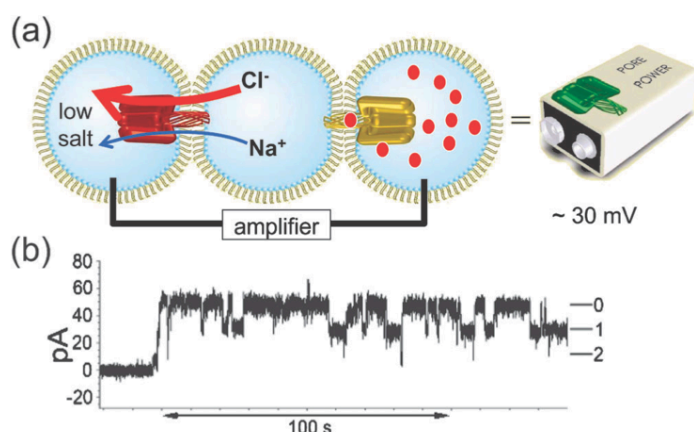
Holden et al. (2007) vytvořili takzvané biosítě z kapiček propojených fosfolipidovou dvojvrstvou, které fungují jako modelový systém pro studium biologických fenoménů založených na membránách. Na rozhraní mezi kapičkami jsou dvojvrstvy umožňující spontánní vkládání kanálů a pórů. Elektrody vkládané do kapiček pak dovolují měření transmembránových iontových proudů nesených jednotlivými kanály (Syeda, Holden, Hwang, & Bayley, 2008). Systém dvojvrstev na povrchu kapiček je využit na sestavení lineárních nebo větvených sítí, které se chovají jako dráty, baterie nebo světelné sensory (Holden et al., 2007).

Dále uvádím příklad praktického provedení soustavy kapiček. Holden et al. (2007) vytvořil síť 20 kapiček (Obr. 9) na povrchu z plexiskla, jež bylo pokryto čtvercovými řadami mikrodolíčků, které usnadnily přesné uspořádání. Každá kapička byla naplněná barvivem pro lepší vizualizaci. Ke vzniku sítě je nutno kapičky nejdříve stabilizovat (počkat navznik monovrstvy), než jsou aplikovány na povrch s dolíčky. Kapičky se připojují k sousedním kapičkám v momentě, kdy je vypuzováno mezilehlé nepolární rozpouštědlo. Vzdálenost mezi dolíčky a průměr kapiček (určený jejich objemem) pak řídí průměr vzniklých dvojvrstev. Síť kapiček lze tvarovat pomocí zavedené elektrody s koncem obaleným v agaróze (Bayley et al., 2008).



**Obr. 9:** Vytváření a měnění sítě dvojrstev. A) Schéma vzniku propojené sítě kapiček na plastovém povrchu s dolíčky. B) Obrázek kapičkového uspořádání ze světelného mikroskopu. Růžové a žluté kapičky jsou naplněny různými barvivy. Velikost kapiček je v průměru  $700 \mu\text{m}$ . Každé rozhraní mezi kapičkami je lipidová dvojrstva. C) Obrázek dvaceti obarvených kapiček ukazuje dva typy uspořádání. Pět kapiček na levé straně je mimo dolíčkový povrch a spontánně se váží k ostatním v hexagonálním uspořádání. Zbýlých patnáct kapiček je usazeno do dolíčků a tvoří čtvercovou síť. Černý objekt je elektroda obalená agarózou. Hydrofilní gel se chová jako kotva, takže když elektrodu zdvihneme, kapička naní zůstává uchycena a odpoutá se od sítě. D) Okolní dvojrstvy zůstanou neporušené, navzdory odštěpení čtyř dvojrstev při přemísťování kapičky. E) Stabilizovaná žlutá kapička je vložena do prázdného důlku. Proces vyjímání a vracení kapiček může být libovolně opakován (Bayley et al., 2008).

Funkční sítě vznikají díky začlenění membránových proteinů se specifickými vlastnostmi (Hwang et al., 2007). Například biobaterie, tři-kapičková síť, vzniká spojením iontového gradientu s alfa-hemolysinovým pórem mutovaným tak, aby byl anion selektivní (Obr. 10).



**Obr. 10:** Biobaterie poháněná koncentračním gradientem. A) Tři kapičky v řadě formují dvě dvojrstvy. Dvě kapičky vpravo jsou naplněny 1M roztokem NaCl, zatímco levá kapička je naplněna 100mM roztokem NaCl. V levé dvojrstvě je zabudovaný alfa-hemolysin ze

*Staphylococcus aureus*, mutovaný tak (N123R), aby byl anion selektivní. Z tohoto uspořádání vyplývá mnohem větší tok chloridových než sodných iontů z prostřední kapičky do levé. B) Takto spontánně generované napětí pohání tok iontů skrz celý systém a umožňuje pozorování vazebných událostí v pravé dvojvrstvě. V pravé dvojvrstvě je zaznamenávána reversibilní vazba b-cyclodextrinu do alfa-hemolysinového mutantu M1113/K147N (Bayley et al., 2008).

Aby živé buňky mohly udržovat důležité vlastnosti tkání, musejí mezi sebou komunikovat a kooperovat. Syntetické nápodoby buněk, jako liposomy, nejsou typicky schopné kooperace a neumějí tedy vykazovat kolektivní chování. Wauer et al. (2014) rozvinuli kapičkové sítě pro další aplikace v biotechnologii a syntetické biologii tak, že vytvořili volně stojící 3D sítě schopné vnitřní komunikace, např. předávání chemických a elektrických signálů mezi kompartmenty podél předdefinovaných cest. Sítě kapiček jsou tištěny na automatických tiskárnách, které tisknou až desítky tisíc heterologních kapiček o velikosti piko-litru pomocí speciálně vyvinutého programu. Vzniklý trojrozměrný makroskopický materiál je kohezivní a samostatně stojící. Sítě jsou složeny ze zřetelných vodných částí oddělených jednou lipidovou dvojvrstvou. Dvojvrstvy nabývají na funkčnosti díky zabudovaným proteinům dovolujícím elektrickou komunikaci podél specifických cest. Vytisknuté kapičkové sítě mohou být programovány gradienty osmolarity tak, aby se po vytisknutí složili do rozličných tvarů, které nelze vytisknout přímo (Villar, Graham, & Bayley, 2013). V odkazovaném videozáznamu můžeme pozorovat zrychlený záznam spontánně se skládající sítě kapiček řízený gradientem osmolarity.<sup>2</sup>

### **3.5 Vlastnosti umělých fosfolipidových membrán**

#### **3.5.1 Lipidové rafty**

Existuje stále více důkazů o tom, že specializované oblasti v plasmatické membráně eukaryotních buněk, známé jako lipidové rafty, hrají důležité role v signální transdukcii a v dalších buněčných procesech (Simons & Toomre, 2000). Hypotéza lipidových raftů navrhuje, že lipidová dvojvrstva není strukturně pasivní rozpouštědlo, ale že preferenční asociace mezi sfingolipidy, steroly a specifickými proteiny uděluje potenciál buněčným membránám s laterální segregací (Lingwood & Simons, 2010).

Některé studie ukázaly, že je možné z buněk izolovat membránové fragmenty, které jsou rezistentní vůči neiontovým detergentům, včetně Tritonu X-100, což naznačuje, že

---

<sup>2</sup> <https://www.youtube.com/watch?v=biiunqCgJIY>

biologické membrány nejsou vždy ve fázi tekutého krystalu. Namísto toho membrány bohaté na sfingolipidy, cholesterol, glycerofosfolipidy s nasycenými acylovými řetězci, stejně tak glykosylfosfatidylinositolem kotvené proteiny a tyrosin kinázové proteiny z rodiny Src, kotvené duálně nasycenými acylovými řetězci (plasmatické membrány) existují alespoň částečně v tekuté uspořádané fázi. Domény bohaté na sfingolipidy a cholesteroly pak mohou existovat ve fázově oddělených membránových raftech (Brown & London, 1998). Převaha saturovaných uhlovodíkových řetězců v buněčných sfingolipidech umožňuje cholesterolu těsné vmezeření. Jednou z nejdůležitějších vlastností lipidových raftů je jejich schopnost v různém rozsahu zahrnovat nebo vylučovat proteiny a usnadňovat tak selektivní protein-proteinové interakce (Simons & Toomre, 2000). Tento mechanismus třídění, založený na lipidech, byl široce zapojen do uspořádání přechodných signálních struktur ale i do trvalejších struktur, jako imunologické synapse nebo do třídění proteinů před vstupem do specifických transportních drah (Hancock, 2006).

Domény s vlastnostmi podobnými raftům koexistují v tekutých oblastech jak ve dvojvrstvách na pevném podkladu, tak i v obřích jednolamelárních vesiklech. Tyto domény vznikají z ekvimolární směsi fosfolipidů, cholesterolu a sfingolipidů nebo z přírodních lipidů extrahovaných z membrán kartáčového lemu (mikroklky trávicí soustavy), které jsou bohaté na sfingomyelin a cholesterol (Dietrich et al., 2001).

Planární dvojvrstvy na pevném podkladu představují vhodný modelový systém pro studium membránových domén zejména díky tomu, že dvojvrstva může být vytvořena ze dvou monovstev rozdílného složení. Může tak být napodobena asymetrie biologických membrán. Navzdory přítomnosti pevného podkladu si membrány udržují důležité vlastnosti, například fázové přechody (Tamm & McConnell, 1985). Druhým modelem jsou obří jednolamelární vesikly, které poskytují plovoucí dvojvrstevné membrány bez potenciálních substrátových artefaktů (Dietrich et al., 2001). V takovýchto systémech mohou být vizualizovány doménové struktury vyskytující se během fázového přechodu a fázové separace. Bagatolli a Gratton (1999) studovali chování GUVs během přechodu z fáze gelu do tekuté fáze využitím efektu separace fází pomocí dvou-fotonové fluorescenční mikroskopie. Pro takovéto pokusy musejí být GUVs vzniklé elektroformací označeny fluorescenční sondou. V tomto případě 6-dodekanoyl-2-dimethyl-amino-naftalenem (LAURDAN). Tato sonda poskytuje několik výhod při studiu fázových přechodů a fázové koexistence v lipidických systémech. Například ve fosfolipidových vesiklech maximální emise LAURDANu vykazuje 50 nm červený posun po přechodu membrány z gelové do tekuté krystalové fáze. Tyto spektroskopické rozdíly mezi gelovou a tekutou fází umožňují

rozlišování stavu membrány jednoduše měřením fluorescenční intenzity při dvou vlnových délkách nebo analýzou fluorescenčního spektra. Pro umožnění kvantifikace emisí spektrálních změn byla definována excitační generalizovaná polarizace (GPex). Tato funkce je citlivá k balení lipidů, odrážející obsah vody a dynamiku lipidového rozhraní. Ukázalo se, že LAURDAN nepreferuje účast ve fázi gelu, ani ve fázi tekutého krystalu (Bagatolli & Gratton, 1999), (Parasassi, Krasnowska, Bagatolli, & Gratton, 1998) a je proto ideální sondou pro studium fázových přechodů. Bagatolli a Gratton (1999) sledovali chování jednotlivých GUVs tvořených čistými fosfolipidy pomocí skenovací dvoj-fotonové excitační fluorescenční mikroskopie. Jejich strategie je založena na monitorování jednotlivých liposomů během teplotních změn, přičemž používají mikroskopické snímky fluorescence LAURDANu a snímky převedené na škálu GPex, která poskytuje informace o lipidové fázi.

### 3.5.2 Tekutost membrán

Tekutost membrán je běžně hodnocena použitím různých fluorescenčních membránových sond a měřením ustálené fluorescenční polarizace nebo anizotropie fluorescence. Základním principem jsou změny v balení lipidů, např. na teplotě závislé fázové přechody, díky kterým dochází ke změně mobility membránově vázaného fluoroforu. Další parametr – rotační relaxace v čase, je možné monitorovat pomocí excitace fluoroforu krátkým pulzem polarizovaného světla a měřením emitovaného světla v paralelní a kolmé rovině vůči polarizační rovině excitovaného světla (Kushnareva, 2009).

Kvůli kvantifikaci uspořádaných lipidů v biologických membránách testovali Gidwani, Holowka a Baird (2001) ustálené stavy anizotropie fluorescence dvou lipidických sond, [3-(difenylhexatrienyl)propanoyl]-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (DPH-PC) a N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin (NBD-PE). Na modelových membránách s různým zastoupením cholesterolu ukazují, že hodnota ustálené anizotropie fluorescence je citlivá na změny v uspořádání membrány vyvolané přítomným cholesterolem. Gidwani et al. (2001) dále ukazují, že DPH-PC je mnohem citlivější sonda, než NBD-PE. Použitím DPH-PC zjistili, že plasmatická membrána žírných buněk RBL-2H3 je podstatně organizovaná, přibližně ze 40%, což určili porovnáním hodnot anizotropie modelových membrán v úplné tekuté fázi a tekuté neuspořádané fázi. Struktury podobné lipidovým raftům tedy zabírají velkou část plasmatické membrány. Tyto závěry jsou v souladu s biochemickými daty o nerozpustnosti fosfolipidů detergenty a s předpoklady ko-redistribučních studií pomocí fluorescenční mikroskopie (Holowka, Sheets, & Baird, 2000).

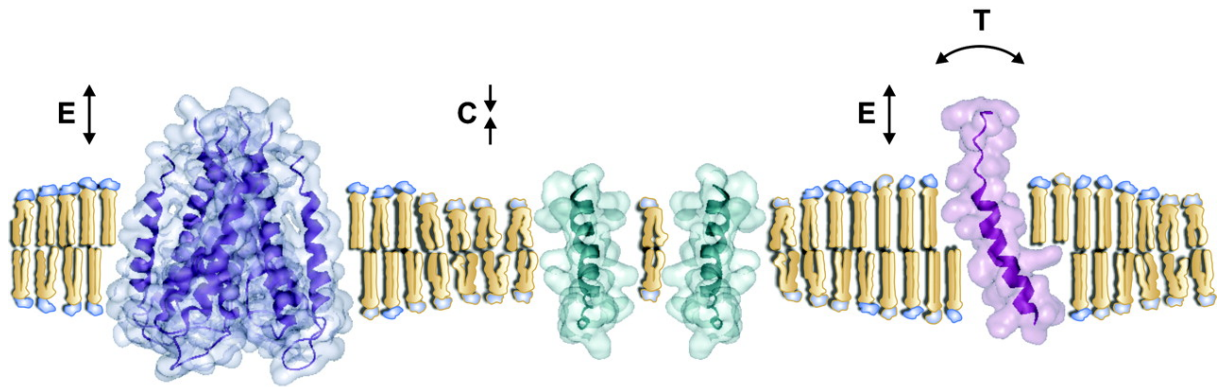
### 3.5.3 Tloušťka membrán

Vzhledem k charakteristickému uspořádání fosfolipidových membrán do centrální hydrofobní oblasti, ohraničené dvěma polárními oblastmi, se dá očekávat, že tloušťka hydrofobních regionů bude ovlivňovat některé vlastnosti, jako například iontovou propustnost, elektrickou kapacitu, strukturu a funkci transmembránových proteinů (Lewis & Engelman, 1983).

Hydrofobní síly dominují interakcím mezi lipidy a proteiny v membránách. Předpokládá se, že délka hydrofobních oblastí membránových proteinů fyzicky pasuje do membrány zejména proto, že je pro membránové proteiny energeticky nevýhodné vystavovat hydrofobní oblasti vodě nebo vkládat hydrofilní části do uhlovodíkového jádra lipidické dvojvrstvy (Mitra, Ubarretxena-Beia, Taguchi, Warren, & Engelman, 2004; Mouritsen & Bloom, 1984). Optimální tloušťka dvojvrstvy je například nutná pro maximální aktivitu integrálního proteinu Ca<sup>2+</sup>-ATPázy ze sarkoplasmatického retikula (Johannsson et al., 1981), stejně tak pro cytochrom c oxidázu (Montecucco et al., 1982).

Vlastnosti lipidů jako stupeň nenasycenosti a délka uhlovodíkového řetězce ovlivňují tloušťku membrán jak v biologických, tak v umělých membránách. Membránová tloušťka se mění lineárně s počtem uhlíků v acylovém řetězci (Lewis & Engelman, 1983). Novější studie ukázaly, že za jistých podmínek zvyšuje přítomnost cholesterolu tloušťku lipidových membrán, zejména díky uspořádání fosfolipidových acylových řetězců (Smondyrev & Berkowitz, 1999). Nezil a Bloom (1992) použili metodu NMR ke studiu změn hydrofobní tloušťky a mechanických vlastností dvojvrstvy po přidání 30 mol% cholesterolu k deuterované 1-palmitoyl-2-oleoylfosfatidylcholinové membráně. Tloušťka membrány se vlivem cholesterolu zvětšila z 2,58 nm na 2,99 nm.

Mitra et al. (2004) ve své práci prezentují data, která poskytují přímé hodnoty tloušťky dvojvrstevných membrán eukaryotních buněk. Tato data, oproti očekávání, ukazují na fakt, že v biologických membránách ovlivňují tloušťku membrány transmembránové domény proteinů spíše než cholesterol, přičemž proteiny nejspíš nepasují do dvojvrstev přirozeně a dvojvrstvy se jim musí přizpůsobovat (Obr. 11).



**Obr. 11:** Upravený pohled na strukturu biologické membrány. Vzhledem k tomu, že komponenty membrány na sebe přirozeně nepasují, musejí se napnout a vynaložit energii na to, aby k sobě hydrofobně pasovaly. To vede k relativně vysoké energii membrány. Kompenzační konformační změny zahrnují prodloužení lipidických acylových řetězců (E) a naklápění transmembránových helixů (T) za předpokladu, že lipidy obklopují protein s dlouhým transmembránovým úsekem. Pokud lipidy obklopují protein s krátkou transmembránovou doménou, dochází ke kompresi lipidických acylových řetězců (Mitra et al., 2004).

### 3.5.4 Propustnost membrán

Umělé fosfolipidové membrány složené pouze z fosfolipidů, nebo z fosfolipidů a cholesterolu, jsou propustné pro plyny jako je  $O_2$ ,  $CO_2$  a malé nenabitě polární molekuly, například močovina nebo etanol. Tyto molekuly mohou přes membránu procházet pasivní difuzí bez pomoci transportních proteinů. Pohyb se děje směrem z vysoké do nízké koncentrace molekul po chemickém koncentračním gradientu (Lodish & Zipursky, 2001).

Nemodifikované čistě lipidové membrány jsou nepropustné pro ionty a malé hydrofilní molekuly. Voda prochází membránou bez větších obtíží i bez přítomnosti speciálních vodních kanálů, což umožňuje buňkám rychlou regulaci objemu (Finkelstein & Cass, 1968). V některých tkáních, například v ledvinových kanálcích, sekrečních žlázách nebo v červených krvinkách je transport vody zprostředkováván kromě difuze také akvaporiny. Akvaporiny jsou malé membránové proteiny, které jsou exprimovány v plasmatických membránách mnoha různých buněčných typů. Akvaporinové kanály jsou tak selektivní, že propouštějí vodu, ale ne kyseliny (Agre, 2006).

Ukázalo se, že propustnost membrán pro vodu koreluje s membránovou fluiditou tak, že nižší membránová fluidita redukuje permeabilitu snížením schopnosti propouštět molekuly skrz lipidovou dvojvrstvu (Lande, Donovan, & Zeidel, 1995).

Bylo prokázáno, že membrány složené z polynenasycených lipidů, které se nacházejí v mozkových synaptosomech, jsou mnohem víc propustné pro vodu než nasycené a mononasyčené dvojvrstvy (Huster, Jin, Arnold, & Gawrisch, 1997). Značné zvýšení



propustnosti dvojvrstev s polynenasycenými uhlovodíkovými řetězci koreluje s volnějším balením polynenasycených lipidů na rozhraní lipidů a vody a s hlubším vnikáním vody do těchto dvojvrstev. Etanol může blokovat difuzní cesty pro vodu tak, že zablokuje místa vstupu vody na povrchu dvojvrstvy (Huster et al., 1997).

Membránový koeficient propustnosti pro třídy aminokyselin včetně neutrálních, polárních, hydrofobních a nabitých tříd byl měřen a porovnáván různými technikami, například elektronovou spinovou rezonancí, nebo radioznačenými aminokyselinami v planárních lipidických membránách. Běžnou metodou je také uvěznění aminokyselin v liposomech a následná gelová filtrace, aby došlo k odstranění volných aminokyselin (Chakrabarti, 1994).

Snížením délky řetězců u lipidů se permeabilita pro aminokyseliny zvyšuje (přibližně pětkrát, pokud se počet uhlíků sníží o dva), zatímco změny v pH mají pouze minimální efekt na permeabilitu aminokyselin testovanou na liposomech. Zvyšováním povrchového napětí membrány roste permeabilita pro aminokyseliny s opačným nábojem. Pokud se zvyšuje obsah cholesterolu, permeabilita naopak klesá. Koeficient permeability pro většinu testovaných aminokyselin byl podobný koeficientu naměřenému u monovalentních kationtů jako jsou sodné a draselné ionty (Chakrabarti, 1994).

### **3.5.5 Elektrická kapacita**

Pro objasnění základní povahy biologických membrán je důležité znát jejich molekulární strukturu. Existuje několik způsobů, které lze použít ke zjištění struktury, například studium permeability, měření elektrické impedance a kapacity, měření povrchového napětí, chemická analýza a mnohé další (Ohki, 1969).

Základní elektrické vlastnosti biologických membrán jsou vodivost a kapacita. Abychom porozuměli elektrickým vlastnostem buněk, je nutné studovat oba parametry. Buněčná kapacita určuje, jak rychle může membránový potenciál odpovědět na změnu proudu. Lipidová dvojvrstva může být považována za paralelní deskovitý kondenzátor (Stephen H. White, 1970). Kondenzátor je složen ze dvou vodivých materiálů oddělených izolátorem. V případě buněk jsou extracelulární a intracelulární tekutiny vodiče a membrána je izolátor.

Elektrická kapacita na jednotku plochy membrány je označována jako specifická kapacita, která je určována tloušťkou membrány a její dielektrickou konstantou. Tyto parametry jsou do značné míry určovány lipidickými složkami buněčné membrány, ačkoliv jsou také ovlivňovány i proteinovým obsahem (Gentet, Stuart, & Clements, 2000).

Vytvářením dynamických změn plochy membrán na kapičkovém rozhraní rozvinuli Gross, Heron, Baca a Wallace (2011) metodu vhodnou na měření specifické membránové kapacity. Touto metodou určili, že závislost kapacity dvojvrstvy na aplikovaném potenciálu je převážně výsledek spontánního zvětšení plochy membrány a ne dlouho předpokládaným ztenčováním lipidické dvojvrstvy.

Důležitým rysem měření elektrické kapacity je schopnost monitorovat skokové změny plochy plazmatické membrány a to buď vlivem endocytózy nebo naopak exocytózy (Neher & Marty, 1982).

Gross et al. (2011) měřili jak se mění kapacita (a tedy tloušťka) při tvorbě membrán s různými použitými rozpouštědly. Jednalo se o sérii alkanů od dekanu po heptadekan. Dvojvrstvy tvořené v alkanech s kratším řetězcem (dekan) jsou tlustší (mají nižší specifickou kapacitu), což je výsledkem zvýšené schopnosti menších alkanových molekul pronikat do fosfolipidové dvojvrstvy.

### **3.6 Využití umělých fosfolipidových membrán**

#### **3.6.1 Planární dvojvrstvy**

Měření iontového proudu procházejícího skrz iontové kanály v biologických membránách nebo v planárních lipidických membránách je běžný postup v neurobiologii nebo v biofyzice. Ačkoliv je většina kanálů uzavírána mechanismem závislým na ligu nebo na napětí (Keynes & Elinder, 1998), existují i takové kanály, které vydrží otevřené delší dobu a umožňují tedy kontinuální tok iontového proudu skrz membránu. Tento typ kanálů nemůže za fyziologických podmínek na povrchu buněk existovat dlouhodobě, protože vede k buněčné smrti. Jedná se tedy většinou o molekuly toxinů, které buňky napadají. Jedním z těchto pórotočných toxinů je alfa-hemolysin ze *Staphylococcus aureus* (Bhakdi & Tranum-Jensen, 1991).

Transmembránové napětí aplikované napříč kontinuálně otevřeným kanálem příhodné velikosti vede polyaniontové DNA nebo RNA molekuly skrz kanál (Akeson, Branton, Kasianowicz, Brandin, & Deamer, 1999). Protože je průměr kanálu velký pouze tak, že se do něj vejde jenom jednovláknová DNA nebo RNA, každý polymer prochází membránou ve formě prodlouženého řetězce, který částečně zablokuje kanál. Průchod každé molekuly je detekován přechodným poklesem iontového proudu, jehož trvání je úměrné délce polymeru. Tyto blokace umožňují použití jedno-kanálových nahrávání k detekci a kvantifikaci široké škály analytů (John J. Kasianowicz, Brandin, Branton, & Deamer, 1996), včetně H<sup>+</sup> a D<sup>+</sup> v roztoku (John J. Kasianowicz & Bezrukov, 1995), malých organických molekul,

polyetylenglykolu (PEG) (Merzlyak et al., 1999) a podjednotek antraxového toxinu (Halverson et al., 2005).

PEG se používá ke zjišťování velikosti biologických iontových kanálů. Dřívější studie ukázaly, že je PEG (do molekulové hmotnosti 4kDa) dostatečně malý na to, aby vstupoval do alfa-hemolysinového nanopóru a snižoval tak vodivost jednotlivého kanálu (Krasilnikov, Sabirov, Ternovsky, Merzliak, & Muratkhodjaev, 1992).

Interakce mezi polyetylenglykolem a alfa-hemolysinovým kanálem v elektrolytu s vysokou iontovou silou (4M KCl, pH 7,4) se využívají na vytváření modelů polymerů uvězněných v nanopórech. Pokud je analyt nepřítomný, proud napříč kanálem je stabilní a nedochází k žádným blokacím. Po přidání analytu, polydisperzního PEGu, vstupuje polyetylenglykol do jednotlivých alfa-hemolysinových pórů a způsobuje tak zřetelné na hmotnosti závislé vodivostní stavy s charakteristickou dobou zdržení (Robertson et al., 2007). Stupeň blokace je často charakteristický pro daný analyt. Různé polymery způsobují komplexní charakteristické vzory blokáci. Tak jako hmotnostní spektroskopie, tyto vzory tvoří v podstatě otisk prstu polymeru blokujícího nanopór (Robertson et al., 2007; Rodrigues, Machado, Chevtchenko, & Krasilnikov, 2008). Tento model popisuje zároveň hloubku proudových blokáci a délku doby zdržení. Zejména blokace způsobené neelektrolytickým PEGem vykazují pokles v průměrném čase blokace i v průměrném trvání blokace při zvýšení rozsahu aplikovaného potenciálu. PEG v tomto modelu snižuje iontový proud tak, že redukuje koncentraci mobilních iontů v póru dvěma mechanismy: vyloučením objemu a kationtovou vazbou s polymerem (Reiner, Kasianowicz, Nablo, & Robertson, 2010). Touto metodou je možné analyzovat rozsáhlé množství molekul. Podmínkou je aby byly dostatečně velké a neprocházely tedy kanálem příliš rychle.

### **3.6.2 Liposomy**

Kromě výzkumu průniku různých látek přes membrány, se objevují i mnohá praktická využití například v lékařství a genové terapii.

#### **3.6.2.1 Liposomy jako nástroje na dopravu léků**

Většina farmakologických vlastností konvenčních léků se dá vylepšit použitím systému na dopravu léků, který zahrnuje částicové nosiče složené primárně z lipidů nebo polymerů a z asociovaných léčiv. Tyto systémy jsou navrženy tak, aby měnily farmakokinetiku a biodistribuci léků, nebo fungují jako jejich rezervoáry (Allen & Cullis, 2004). Léky s různorodou lipofilií mohou být enkapsulovány liposomy buď do fosfolipidové

dvojrstvy, do vodného objemu nebo na povrch dvojrstvy. Existují minimálně dva typy liposomů, které mohou být dále přizpůsobovány konkrétním potřebám, a to na základě jejich schopnosti interagovat s buňkami a krevními komponenty. Jsou to neinteraktivní stéricky stabilizované liposomy a vysoce interaktivní kationtové liposomy (Sharma & Sharma, 1997).

Liposomy propouštějí svůj obsah jedním ze čtyř způsobů interakce s buňkami: adsorpcí, endocytózou, lipidovou výměnou nebo fúzí. Léky asociované s liposomy jsou v těle distribuovány odlišně než volné léky. Pokud jsou podány intravenózně, většina liposomů se hromadí v játrech, slezině, plicích, kostní dřeni a lymfatických uzlinách. Liposomy se také řednostně hromadí v místech zánětu a infekce a některých nádorech (Ostro & Cullis, 1989).

### **3.6.2.2 Liposomy v genové terapii**

Genová terapie pomocí liposomů prokázala potenciál pro léčbu získaných i zděděných chorob (Tseng & Huang, 1998). Princip tkví v tom, že pacientovi, který trpí chorobou způsobenou známým genetickým defektem, by měla být doručena správná kopie defektního genu do nemocné buňky nebo orgánu, přičemž liposomy brání štěpení DNA před tím, než se do buňky dostane. Doručení je zprostředkované speciálně navrženým vektorem. To by ideálně vedlo k opravě genetického defektu a k vyléčení choroby (A. D. Miller, 1998). Hlavními elementy úspěšné genové terapie je identifikace choroby a cílové buňky nebo tkáně, konstrukce vhodných genových vektorů, efektivní transfer a exprese v cílových buňkách (Lasic & Templeton, 1996).

Kationtové liposomy jsou formovány z jednotlivých kationtových amfifilů (známé jako cytofektiny: cyto- znamená buněčná a -fektin je odvozeno od transfekce), nebo častěji kombinací cytofektinů a neutrálních lipidů. Způsob, jakým zprostředkovávají doručování nukleových kyselin, je jednoduchý. Pozitivně nabitě kationtové liposomy interagují elektrostaticky s negativně nabitými sekvencemi nukleových kyselin, přičemž vznikají komplexy schopné vniknout do buněk (A. D. Miller, 1998).

## 4 Závěr

Umělé fosfolipidové membrány mají do budoucna velký potenciál. Branton et al. (2008) pracují už delší dobu na metodě sekvenování založené na nanopórovém systému, který umožňuje detekci jednotlivých molekul. Výsledky ukazují, že molekuly jednovláknové DNA a RNA mohou procházet pórtvorným proteinem, přičemž můžeme detekovat jejich efekt na iontový proud skrz nanopór. V tomto uspořádání byl použit pórtvorný protein alfa-hemolysin, jehož vnitřní průměr je sotva tak velký jako průměr jednoho vlákna nukleové kyseliny. Nanopór je tak schopen rozplést sbalené struktury nukleových kyselin tak, že pórem procházejí jednotlivé nukleotidy v sekvenčním uspořádání. Proud iontů skrz nanopór je částečně blokován procházejícími molekulami. Každá molekula způsobuje snadno detekovatelnou redukcii iontového proudu vzhledem k proudu tekoucímu skrz neblokovaný pór.

Značná výhoda této metody spočívá v tom, že molekula DNA může být přímo sekvenována bez předchozí amplifikace metodou PCR nebo bez předchozího chemického značení. V současné době vyvíjí společnost Oxford Nanopore Technologies zařízení určená pro rychlou analýzu DNA pomocí nanopórů. MinION je ruční sekvenovací zařízení, které může být připojeno k počítači USB portem. Sestává se z membrány, která obsahuje okolo pěti set proteinových pórů. Póry propojují dvě komůrky naplněné elektrolytem a dovolují tak měření toku proudu. Zatím se nanopórové sekvenování potýká s mírnou chybovostí, ale rychlost, citlivost k jednotlivým bázím a schopnost zpracovávání dlouhých úseků činí nanopóry slibnou sekvenovací technologií.

Touto metodou byly rozlišeny od guaninu, adeninu, cytosinu a thyminu dvě DNA báze, 5-methylcytosin, nejběžnější epigenetická modifikace eukaryotního genomu a 5-hydroxymethylcytosin. Tento přístup by v budoucnu mohl být vhodným prostředkem k vyhledávání epigenetických změn v neamplifikované DNA (Wallace et al., 2010).

Další způsob využití umělých fosfolipidových membrán navrhli profesor Hagan Baylely a jeho výzkumná skupina, kteří nedávno publikovali metodu, kterou se dají modelovat trojrozměrné sítě kapiček pomocí speciálně upravených 3D tiskáren (Villar et al., 2013). Výsledný makroskopický materiál je kohezivní a samonosný, složený z odlišných vodných mikrokompartmentů oddělených jednotlivými lipidickými dvojvrstvami. Dvojvrstvy jsou funkční díky membránovým proteinům, které zprostředkovávají elektrickou komunikaci.

Vzniklé sítě kapiček mohou být dále zapouzdrěny tak, aby vznikl systém ve kterém je uspořádání vodné kapičky podporováno větší olejovou kapičkou, která je obklopena vodou.

Takovéto uspořádání by mohlo být vhodné jako nástroj na dopravu léků nebo jako podpora pro selhávající orgány v těle. Profesor Bayley a jeho skupina předpokládají, že další využití kapičkových sítí bude v tkáňovém inženýrství, zejména kvůli tomu, že kapičkové sítě mohou tvořit systémy s elektrickými a koncentračními gradienty, které usměrňují jejich růst. Některé systémy jsou dokonce skládány do tvarů, které nemohou být natištěny 3D tiskárnou. K tomu se využívají osmotické gradienty, které mění relativní velikost kapiček a umožňují tak plynulé složení do požadovaného tvaru. Možnost skládání kapičkových sítí také navrhuje, že by mohly být tyto sítě v budoucnu využity v bio-inspirované robotice, nebo na vytváření motorů a různých pohonů. Umělé fosfolipidové membrány se i nadále vyplatí podrobovat zkoumání, protože z nich i v budoucnu mohou vznikat další zajímavé aplikace.

## 5 Literatura

- Agre, P. (2006). The Aquaporin Water Channels. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(1), 5-13. doi: 10.1513/pats.200510-109JH
- Akeson, M., Branton, D., Kasianowicz, J. J., Brandin, E., & 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(6), 3227-3233.
- Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2004). Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science*, 303(5665), 1818-1822. doi: 10.1126/science.1095833
- Angelova, M. I., & Dimitrov, D. S. (1986). Liposome electroformation. *Faraday discussions of the Chemical Society*, 81, 303-311.
- Bagatolli, L. A., & Gratton, E. (1999). Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. *Biophysical Journal*, 77(4), 2090-2101.
- Balasubramanian, K., & Schroit, A. J. (2003). AMINOPHOSPHOLIPID ASYMMETRY: A Matter of Life and Death. *Annual review of physiology*, 65(1), 701-734. doi: doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142459
- Bayley, H., Cronin, B., Heron, A., Holden, M. A., Hwang, W. L., Syeda, R., . . . Wallace, M. (2008). Droplet interface bilayers. *Molecular bioSystems*, 4(12), 1191-1208. doi: 10.1039/B808893D
- Bhakdi, S., & Tranum-Jensen, J. (1991). Alpha-toxin of Staphylococcus aureus. *Microbiological Reviews*, 55(4), 733-751.
- Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. A., Butler, T., . . . Schloss, J. A. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotech*, 26(10), 1146-1153.
- Braun, C. J., Baer, T., Moroni, A., & Thiel, G. (2014). Pseudo painting/air bubble technique for planar lipid bilayers. *Journal of Neuroscience Methods*, 233(0), 13-17. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.05.031
- Brown, D. A., & London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology*, 14(1), 111-136.
- Castellana, E. T., & Cremer, P. S. (2006). Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports*, 61(10), 429-444. doi: 10.1016/j.surfrep.2006.06.001
- Collins, M. D., & Gordon, S. E. (2013). Giant Liposome Preparation for Imaging and Patch-Clamp Electrophysiology. *Journal of visualized experiments : JoVE*(76), 10.3791/50227. doi: 10.3791/50227
- Cremer, P. S., & Boxer, S. G. (1999). Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(13), 2554-2559.
- Daleke, D. L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *Journal of Lipid Research*, 44(2), 233-242.
- Daum, G., & Vance, J. E. (1997). Import of lipids into mitochondria. *Progress in Lipid Research*, 36(2-3), 103-130. doi: 10.1016/S0163-7827(97)00006-4
- De Rosa, M., Gambacorta, A., & Gliozzi, A. (1986). Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiological Reviews*, 50(1), 70-80.
- Devaux, P. F. (1991). Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry*, 30(5), 1163-1173.

- Devaux, P. F., & Morris, R. (2004). Transmembrane Asymmetry and Lateral Domains in Biological Membranes. *Traffic*, 5(4), 241-246. doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.0170.x
- Dietrich, C., Bagatolli, L. A., Volovyk, Z. N., Thompson, N. L., Levi, M., Jacobson, K., & Gratton, E. (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical Journal*, 80(3), 1417-1428.
- Fadok, V. A., de Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M., & Bratton, D. L. (2001). Loss of Phospholipid Asymmetry and Surface Exposure of Phosphatidylserine Is Required for Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages and Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 1071-1077. doi: 10.1074/jbc.M003649200
- Finkelstein, A., & Cass, A. (1968). Permeability and Electrical Properties of Thin Lipid Membranes. *The Journal of General Physiology*, 52(1), 145-172. doi: 10.1085/jgp.52.1.145
- Funakoshi, K., Suzuki, H., & Takeuchi, S. (2006). Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis. *Analytical Chemistry*, 78(24), 8169-8174. doi: 10.1021/ac0613479
- Gentet, L. J., Stuart, G. J., & Clements, J. D. (2000). Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. *Biophysical Journal*, 79(1), 314-320.
- Gidwani, A., Holowka, D., & Baird, B. (2001). Fluorescence Anisotropy Measurements of Lipid Order in Plasma Membranes and Lipid Rafts from RBL-2H3 Mast Cells†. *Biochemistry*, 40(41), 12422-12429. doi: 10.1021/bi010496c
- Gross, L. C. M., Heron, A. J., Baca, S. C., & Wallace, M. I. (2011). Determining Membrane Capacitance by Dynamic Control of Droplet Interface Bilayer Area. *Langmuir*, 27(23), 14335-14342. doi: 10.1021/la203081v
- Hagge, S. O., de Cock, H., Gutschmann, T., Beckers, F., Seydel, U., & Wiese, A. (2002). Pore Formation and Function of Phosphoporin PhoE of Escherichia coli Are Determined by the Core Sugar Moiety of Lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34247-34253. doi: 10.1074/jbc.M201950200
- Halverson, K. M., Panchal, R. G., Nguyen, T. L., Gussio, R., Little, S. F., Misakian, M., . . . Kasianowicz, J. J. (2005). Anthrax Biosensor, Protective Antigen Ion Channel Asymmetric Blockade. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 34056-34062. doi: 10.1074/jbc.M507928200
- Hancock, J. F. (2006). Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(6), 456-462. doi: 10.1038/nrm1925
- Hartmann. (1998). Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science*, 3(5), 170-175. doi: 10.1016/S1360-1385(98)01233-3
- Hartmann, E., Rapoport, T. A., & Lodish, H. F. (1989). Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(15), 5786-5790.
- Heron, A. J., Thompson, J. R., Mason, A. E., & Wallace, M. I. (2007). Direct Detection of Membrane Channels from Gels Using Water-in-Oil Droplet Bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, 129(51), 16042-16047. doi: 10.1021/ja075715h
- Holden, M. A., Needham, D., & Bayley, H. (2007). Functional Bionetworks from Nanoliter Water Droplets. *Journal of the American Chemical Society*, 129(27), 8650-8655. doi: 10.1021/ja072292a
- Holowka, D., Sheets, E. D., & Baird, B. (2000). Interactions between Fc (epsilon) RI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 113(6), 1009-1019.



- Horger, K. S., Estes, D. J., Capone, R., & Mayer, M. (2009). Films of Agarose Enable Rapid Formation of Giant Liposomes in Solutions of Physiologic Ionic Strength. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(5), 1810-1819. doi: 10.1021/ja805625u
- Horvath, S. E., & Daum, G. (2013). Lipids of mitochondria. *Progress in Lipid Research*, *52*(4), 590-614. doi: 10.1016/j.plipres.2013.07.002
- Huster, D., Jin, A. J., Arnold, K., & Gawrisch, K. (1997). Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by 17O NMR. *Biophysical Journal*, *73*(2), 855.
- Hwang, W. L., Holden, M. A., White, S., & Bayley, H. (2007). Electrical behavior of droplet interface bilayer networks: experimental analysis and modeling. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(38), 11854-11864.
- Hwang, W. L., Chen, M., Cronin, B., Holden, M. A., & Bayley, H. (2008). Asymmetric Droplet Interface Bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(18), 5878-5879. doi: 10.1021/ja802089s
- Chakrabarti, A. C. (1994). Permeability of membranes to amino acids and modified amino acids: Mechanisms involved in translocation. *Amino Acids*, *6*(3), 213-229.
- Chan, Y.-H. M., & Boxer, S. G. (2007). Model membrane systems and their applications. *Current Opinion in Chemical Biology*, *11*(6), 581-587. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.09.020
- Jacobson, K., Sheets, E. D., & Simson, R. (1995). Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science*, *268*(5216), 1441-1442. doi: 10.1126/science.7770769
- Johannsson, A., Keightley, C. A., Smith, G. A., Richards, C. D., Hesketh, T. R., & Metcalfe, J. C. (1981). The effect of bilayer thickness and n-alkanes on the activity of the (Ca<sup>2+</sup>++ Mg<sup>2+</sup>)-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, *256*(4), 1643-1650.
- Kalb, E., Frey, S., & Tamm, L. K. (1992). Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1103*(2), 307-316. doi: 10.1016/0005-2736(92)90101-Q
- Kasianowicz, J. J., & Bezrukov, S. M. (1995). Protonation dynamics of the alpha-toxin ion channel from spectral analysis of pH-dependent current fluctuations. *Biophysical Journal*, *69*(1), 94-105.
- Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D., & Deamer, D. W. (1996). Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(24), 13770-13773.
- Katagiri, K., Hashizume, M., Kikuchi, J.-i., Taketani, Y., & Murakami, M. (2004). Creation of asymmetric bilayer membrane on monodispersed colloidal silica particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *38*(3-4), 149-153. doi: 10.1016/j.colsurfb.2004.05.019
- Keynes, R. D., & Elinder, F. (1998). Modelling the activation, opening, inactivation and reopening of the voltage-gated sodium channel. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *265*(1393), 263-270.
- Khandwala, A. S., & Kasper, C. B. (1971). The Fatty Acid Composition of Individual Phospholipids from Rat Liver Nuclear Membrane and Nuclei. *Journal of Biological Chemistry*, *246*(20), 6242-6246.
- Kim, H., Melén, K., Österberg, M., & von Heijne, G. (2006). A global topology map of the *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(30), 11142-11147.
- Kleinig, H. (1970). NUCLEAR MEMBRANES FROM MAMMALIAN LIVER : II. Lipid Composition. *The Journal of Cell Biology*, *46*(2), 396-402.

- Koga, Y., & Morii, H. (2007). Biosynthesis of Ether-Type Polar Lipids in Archaea and Evolutionary Considerations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(1), 97-120. doi: 10.1128/mmbr.00033-06
- Krasilnikov, O. V., Sabirov, R. Z., Ternovsky, V. I., Merzliak, P. G., & Muratkhodjaev, J. N. (1992). A simple method for the determination of the pore radius of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *FEMS Microbiology Letters*, 105(1-3), 93-100. doi: 10.1016/0378-1097(92)90079-4
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes<sup>1</sup>. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567-580. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315
- Kühner, M., Tampé, R., & Sackmann, E. (1994). Lipid mono- and bilayer supported on polymer films: composite polymer-lipid films on solid substrates. *Biophysical Journal*, 67(1), 217-226.
- Kushnareva, Y. (2009). Membrane Fluidity Measurements Using UV Fluorescence Polarization and the POLARstar Omega. *La Jolla Institute for Allergy and Immunology*.
- Lande, M. B., Donovan, J. M., & Zeidel, M. L. (1995). The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *The Journal of General Physiology*, 106(1), 67-84.
- Lasic, D. D. (1988). The mechanism of vesicle formation. *Biochemical Journal*, 256(1), 1-11.
- Lasic, D. D., & Templeton, N. S. (1996). Liposomes in gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 20(2), 221-266.
- Leptihn, S., Castell, O. K., Cronin, B., Lee, E.-H., Gross, L. C. M., Marshall, D. P., . . . Wallace, M. I. (2013). Constructing droplet interface bilayers from the contact of aqueous droplets in oil. *Nat. Protocols*, 8(6), 1048-1057. doi: 10.1038/nprot.2013.061
- Leptihn, S., Thompson, J. R., Ellory, J. C., Tucker, S. J., & Wallace, M. I. (2011). In Vitro Reconstitution of Eukaryotic Ion Channels Using Droplet Interface Bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, 133(24), 9370-9375. doi: 10.1021/ja200128n
- Lewis, B. A., & Engelman, D. M. (1983). Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *Journal of Molecular Biology*, 166(2), 211-217.
- Lin, W.-C., Blanchette, C. D., Ratto, T. V., & Longo, M. L. (2006). Lipid Asymmetry in DLPC/DSPC-Supported Lipid Bilayers: A Combined AFM and Fluorescence Microscopy Study. *Biophysical Journal*, 90(1), 228-237. doi: 10.1529/biophysj.105.067066
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science*, 327(5961), 46-50. doi: 10.1126/science.1174621
- Lodish, H., & Zipursky, S. L. (2001). Molecular cell biology. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29, 126-133.
- Manno, S., Takakuwa, Y., & Mohandas, N. (2002). Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 1943-1948.
- McCabe, I., & Forstner, M. (2013). Polymer Supported Lipid Bilayers. *Open Journal of Biophysics*, 3(1A), 59-69. doi: 10.4236/ojbiphy.2013.31A008

- McIntyre, J. C., & Sleight, R. G. (1991). Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry. *Biochemistry*, *30*(51), 11819-11827. doi: 10.1021/bi00115a012
- McMullen, T. P. W., Lewis, R. N. A. H., & McElhaney, R. N. (2004). Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *8*(6), 459-468. doi: 10.1016/j.cocis.2004.01.007
- McMullen, T. P. W., & McElhaney, R. N. (1996). Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *1*(1), 83-90. doi: 10.1016/S1359-0294(96)80048-3
- Meer, G. V. (1989). Lipid Traffic in Animal Cells. *Annual Review of Cell Biology*, *5*(1), 247-275. doi: doi:10.1146/annurev.cb.05.110189.001335
- Menger, F. M., & Angelova, M. I. (1998). Giant vesicles: imitating the cytological processes of cell membranes. *Accounts of chemical research*, *31*(12), 789-797.
- Merzlyak, P. G., Yuldasheva, L. N., Rodrigues, C. G., Carneiro, C. M. M., Krasilnikov, O. V., & Bezrukov, S. M. (1999). Polymeric nonelectrolytes to probe pore geometry: application to the  $\alpha$ -toxin transmembrane channel. *Biophysical Journal*, *77*(6), 3023-3033.
- Miller, A. D. (1998). Cationic Liposomes for Gene Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, *37*(13-14), 1768-1785. doi: 10.1002/(SICI)1521-3773(19980803)37:13/14<1768::AID-ANIE1768>3.0.CO;2-4
- Miller, C. (1986). *Ion channel reconstitution*: Springer Science & Business Media.
- Mitra, K., Ubarretxena-Belandia, I., Taguchi, T., Warren, G., & Engelman, D. M. (2004). Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(12), 4083-4088. doi: 10.1073/pnas.0307332101
- Montal, M., & 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*(12), 3561-3566.
- Montecucco, C., Smith, G. A., Dabbeni-sala, F., Johannsson, A., Galante, Y. M., & Bisson, R. (1982). Bilayer thickness and enzymatic activity in the mitochondrial cytochrome c oxidase and ATPase complex. *FEBS letters*, *144*(1), 145-148. doi: 10.1016/0014-5793(82)80588-7
- Mouritsen, O. G., & Bloom, M. (1984). Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophysical Journal*, *46*(2), 141-153. doi: 10.1016/S0006-3495(84)84007-2
- Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., & Wescott, W. C. (1962). Reconstitution of Excitable Cell Membrane Structure in Vitro. *Circulation*, *26*(5), 1167-1171. doi: 10.1161/01.cir.26.5.1167
- Neher, E., & Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(21), 6712-6716.
- Nezil, F. A., & Bloom, M. (1992). Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes. *Biophysical Journal*, *61*(5), 1176-1183.
- O'Toole, P. J., Wolfe, C., Ladha, S., & Cherry, R. J. (1999). Rapid diffusion of spectrin bound to a lipid surface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1419*(1), 64-70. doi: 10.1016/S0005-2736(99)00048-6

- Ogden, D., & Stanfield, P. (1994). *Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording*. Paper presented at the Microelectrode techniques: the Plymouth workshop handbook.
- Ohki, S. (1969). The Electrical Capacitance of Phospholipid Membranes. *Biophysical Journal*, 9(10), 1195-1205.
- Ostro, M. J., & Cullis, P. R. (1989). Use of liposomes as injectable-drug delivery systems. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 46(8), 1576-1587.
- Ourisson, G., Rohmer, M., & Poralla, K. (1987). Prokaryotic Hopanoids and other Polyterpenoid Sterol Surrogates. *Annual Review of Microbiology*, 41(1), 301-333. doi: doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.001505
- Palfrey, H. C., & Waseem, A. (1985). Protein kinase C in the human erythrocyte. Translocation to the plasma membrane and phosphorylation of bands 4.1 and 4.9 and other membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 260(29), 16021-16029.
- Parasassi, T., Krasnowska, E., Bagatolli, L., & Gratton, E. (1998). Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes. *Journal of Fluorescence*, 8(4), 365-373. doi: 10.1023/A:1020528716621
- Pomorski, T., Hrafnisdóttir, S., Devaux, P. F., & Meer, G. v. (2001). Lipid distribution and transport across cellular membranes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 12(2), 139-148. doi: 10.1006/scdb.2000.0231
- Pomorski, T., & Menon, A. K. (2006). Lipid flippases and their biological functions. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(24), 2908-2921. doi: 10.1007/s00018-006-6167-7
- Purrucker, O., Hillebrandt, H., Adlkofer, K., & Tanaka, M. (2001). Deposition of highly resistive lipid bilayer on silicon-silicon dioxide electrode and incorporation of gramicidin studied by ac impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*, 47(5), 791-798. doi: 10.1016/S0013-4686(01)00759-9
- Reiner, J. E., Kasianowicz, J. J., Nablo, B. J., & Robertson, J. W. F. (2010). Theory for polymer analysis using nanopore-based single-molecule mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27), 12080-12085.
- Robertson, J. W. F., Rodrigues, C. G., Stanford, V. M., Rubinson, K. A., Krasilnikov, O. V., & Kasianowicz, J. J. (2007). Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20), 8207-8211. doi: 10.1073/pnas.0611085104
- Rodrigues, C. G., Machado, D. C., Chevtchenko, S. F., & Krasilnikov, O. V. (2008). Mechanism of KCl Enhancement in Detection of Nonionic Polymers by Nanopore Sensors. *Biophysical Journal*, 95(11), 5186-5192. doi: 10.1529/biophysj.108.140814
- Rohmer, M., Bouvier-Nave, P., & Ourisson, G. (1984). Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. *Journal of General Microbiology*, 130.5 1137-1150.
- Sackmann, E. (1996). Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. *Science*, 271(5245), 43-48. doi: 10.1126/science.271.5245.43
- Sackmann, E., & Tanaka, M. (2000). Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications. *Trends in Biotechnology*, 18(2), 58-64. doi: 10.1016/S0167-7799(99)01412-2
- Sáenz, J. P., Sezgin, E., Schwille, P., & Simons, K. (2012). Functional convergence of hopanoids and sterols in membrane ordering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(35), 14236-14240. doi: 10.1073/pnas.1212141109

- Sahu, S. K., Gummadi, S. N., Manoj, N., & Aradhyam, G. K. (2007). Phospholipid scramblases: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(1), 103-114. doi: 10.1016/j.abb.2007.04.002
- Sakmann, B., & Neher, E. (1984). Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annual review of physiology*, 46(1), 455-472.
- Saxton, M. J., & Jacobson, K. (1997). Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 26(1), 373-399.
- Sharma, A., & Sharma, U. S. (1997). Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154(2), 123-140. doi: 10.1016/S0378-5173(97)00135-X
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1), 31-39.
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Day and Good Membranes and viruses in immunopathology*, 7-47.
- Smondryev, A. M., & Berkowitz, M. L. (1999). Structure of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations: molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*, 77(4), 2075-2089.
- Syeda, R., Holden, M. A., Hwang, W. L., & Bayley, H. (2008). Screening Blockers Against a Potassium Channel with a Droplet Interface Bilayer Array. *Journal of the American Chemical Society*, 130(46), 15543-15548. doi: 10.1021/ja804968g
- Szoka, F., & Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(9), 4194-4198.
- Szoka Jr, F., & Papahadjopoulos, D. (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual review of biophysics and bioengineering*, 9(1), 467-508.
- Tamm, L. K., & McConnell, H. M. (1985). Supported phospholipid bilayers. *Biophysical Journal*, 47(1), 105-113. doi: 10.1016/S0006-3495(85)83882-0
- Tan, Y.-C., Hettiarachchi, K., Siu, M., Pan, Y.-R., & Lee, A. P. (2006). Controlled Microfluidic Encapsulation of Cells, Proteins, and Microbeads in Lipid Vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, 128(17), 5656-5658. doi: 10.1021/ja056641h
- Thompson, J. R., Heron, A. J., Santoso, Y., & Wallace, M. I. (2007). Enhanced Stability and Fluidity in Droplet on Hydrogel Bilayers for Measuring Membrane Protein Diffusion. *Nano Letters*, 7(12), 3875-3878. doi: 10.1021/nl071943y
- Ti Tien, H. (1968). Black Lipid Membranes at Bifaces: Formation characteristics, optical and some thermodynamic properties. *The Journal of General Physiology*, 52(1), 125-144. doi: 10.1085/jgp.52.1.125
- Traïkia, M., Warschawski, D. E., Recouvreur, M., Cartaud, J., & Devaux, P. F. (2000). Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance. *European Biophysics Journal*, 29(3), 184-195.
- Tseng, W.-C., & Huang, L. (1998). Liposome-based gene therapy. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(5), 206-213.
- van Meer, G. (2011). Dynamic Transbilayer Lipid Asymmetry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(5), a004671. doi: 10.1101/cshperspect.a004671

- van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2), 112-124.
- Van Mooy, B. A. S., Fredricks, H. F., Pedler, B. E., Dyhrman, S. T., Karl, D. M., Koblizek, M., . . . Webb, E. A. (2009). Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature*, 458(7234), 69-72. doi: [www.nature.com/nature/journal/v458/n7234/supinfo/nature07659\\_S1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v458/n7234/supinfo/nature07659_S1.html)
- Villar, G., Graham, A. D., & Bayley, H. (2013). A Tissue-Like Printed Material. *Science*, 340(6128), 48-52. doi: 10.1126/science.1229495
- von Heijne, G. (2006). Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(12), 909-918. doi: [www.nature.com/nrm/journal/v7/n12/supinfo/nrm2063\\_S1.html](http://www.nature.com/nrm/journal/v7/n12/supinfo/nrm2063_S1.html)
- Wallace, E. V. B., Stoddart, D., Heron, A. J., Mikhailova, E., Maglia, G., Donohoe, T. J., & Bayley, H. (2010). Identification of epigenetic DNA modifications with a protein nanopore. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 46(43), 8195-8197. doi: 10.1039/c0cc02864a
- Wauer, T., Gerlach, H., Mantri, S., Hill, J., Bayley, H., & Sapra, K. T. (2014). Construction and Manipulation of Functional Three-Dimensional Droplet Networks. *ACS Nano*, 8(1), 771-779. doi: 10.1021/nn405433y
- Wesołowska, O., Michalak, K., Maniewska, J., & Hendrich, A. B. (2009). Giant unilamellar vesicles—a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. *Acta Biochim. Pol*, 56, 33-39.
- White, S. H. (1970). A study of lipid bilayer membrane stability using precise measurements of specific capacitance. *Biophysical Journal*, 10(12), 1127.
- White, S. H., Petersen, D. C., Simon, S., & Yafuso, M. (1976). Formation of planar bilayer membranes from lipid monolayers. A critique. *Biophysical Journal*, 16(5), 481-489.
- Winterhalter, M. (2000). Black lipid membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(3-4), 250-255. doi: 10.1016/S1359-0294(00)00063-7
- Wong, J. Y., Park, C. K., Seitz, M., & Israelachvili, J. (1999). Polymer-cushioned bilayers. II. An investigation of interaction forces and fusion using the surface forces apparatus. *Biophysical Journal*, 77(3), 1458-1468.
- Wright, S., & Huang, L. (1989). Antibody-directed liposomes as drug-delivery vehicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 3(3), 343-389. doi: 10.1016/0169-409X(89)90027-6
- Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochemical Journal*, 294(Pt 1), 1-14.
- Zasadzinski, J. A., Helm, C. A., Longo, M. L., Weisenhorn, A. L., Gould, S. A., & Hansma, P. K. (1991). Atomic force microscopy of hydrated phosphatidylethanolamine bilayers. *Biophysical Journal*, 59(3), 755-760.