

**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, 28.07.2015

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 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 lipidové membrány, dvojvrstvy na pevném podkladu, dvojvrstvy vzniklé z monovrstev na rozhraní vody a vzduchu a dále liposomy. Ve druhém případě vznikají dvojvrstevné membrány v množství organické fáze tvorbou dvojvrstev na rozhraní kapiček. Každý typ umělých membrán má své experimentální výhody, 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 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 rozhraní kapiček

## **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 bilayers are created in a bulk of organic phase by Droplet interface bilayer method. Each type of artificial bilayer has its experimental advantages that 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 lipidových dvojvrstev.....   | 4         |
| 2.2 Lipidová membrána u prokaryot.....  | 5         |
| 2.3 Lipidová membrána u Archea .....  | 6         |
| 2.4 Proteiny plasmatické membrány.....  | 6         |
| 2.5 Membránová asymetrie eukaryotních buněk .....   | 7         |
| <b>3 Umělé fosfolipidové membrány</b> .....   | <b>9</b>  |
| 3.1 Černé lipidové membrány (BLM - <i>Black lipid membrane</i> ).....                       | 9         |
| 3.1.1 Vznik dvojvrstevných membrán .....  | 10        |
| 3.2 Lipidové dvojvrstvy na pevných podkladech (SLB - <i>Supported lipid bilayer</i> ) ..... | 12        |
| 3.3 Liposomy .....  | 14        |
| 3.3.1 Obří jednodamelární vezikuly ( <i>GUV - Giant unilamellar vesicles</i> ) .....        | 14        |
| 3.4 Dvojvrstvy na rozhraní kapiček (DIB - <i>Droplet interface bilayers</i> ).....          | 16        |
| 3.4.1 Síť kapiček ( <i>Droplet networks</i> ).....  | 18        |
| 3.5 Důležité vlastnosti umělých fosfolipidových membrán a metody jejich studia .....        | 21        |
| 3.5.1 Lipidové rafty.....   | 21        |
| 3.5.2 Tekutost membrán .....  | 22        |
| 3.5.3 Tloušťka membrán.....   | 23        |
| 3.5.4 Propustnost membrán .....   | 24        |
| 3.5.5 Elektrická kapacita.....  | 25        |
| 3.6 Využití umělých fosfolipidových membrán.....  | 26        |
| 3.6.1 Planární dvojvrstvy.....  | 26        |
| 3.6.2 Liposomy.....   | 27        |
| 3.6.3 Dvojvrstvy na rozhraní kapiček.....   | 29        |
| <b>4 Závěr</b> .....  | <b>30</b> |
| <b>5 Literatura</b> .....   | <b>31</b> |

## Seznam použitých zkratek

|        |  |   |
|--------|--|---|
| AFM    | atomová silová mikroskopie   | Atomic force microscopy   |
| BLM    | černá lipidová membrána  | Black lipid membrane  |
| DHB    | dvojvrstva vzniklá mezi kapičkou a hydratovaným povrchem                               | Droplet on hydrated support bilayer   |
| DIB    | dvojvrstva na rozhraní kapiček   | Droplet interface bilayer   |
| DLPC   | 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-fosfocholin   | 1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine   |
| DPH-PC | 3-(difenylhexatrienyl)propanoyl]-1-hexadekanoyl-sn-glycero-3-fosfocholin               | 3-(difenylhexatrienyl)propanoyl]-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine               |
| 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 vezikul  | Giant unilamellar vesicle   |
| LUV    | velký jednolamelární vezikul   | Large unilamellar vesicle   |
| MLV    | multilamelární vezikul   | 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-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine |
| PC     | fosfatidylcholin   | Phosphatidylcholine   |
| PE     | fosfatidylethanolamin  | Phosphatidylethanolamine  |
| PEG    | polyethylenglykol  | Polyethylene glycol   |
| PS     | fosfatidylserin  | Phosphatidylserine  |
| SLB    | dvojvrstva na pevném podkladu  | Supported lipid bilayer   |
| SM     | sfigomyelin  | Sphingomyeline  |
| SPT    | sledování jedné částice  | Single particle tracking  |
| SUV    | malý jednolamelární vezikul  | Small unilamellar vesicle   |
| TF     | tkáňový faktor   | Tissue factor   |

## 1 Úvod

Lipidové dvojvrstvy a membránové proteiny jsou nezbytnou součástí buněčných membrán. Lipidové dvojvrstvy fungují jako bariéry vůči okolnímu prostředí, zatímco membránové proteiny přenášejí chemické signály nebo selektivně transportují ionty a molekuly dovnitř a ven z buněk. Funkce větší části membránových proteinů je nicméně stále nejasná v porovnání s proteiny, které jsou snadno rozpustné ve vodě. Membránové proteiny je složitější studovat, protože dochází ke změně jejich původního uspořádání, pokud je z buněčných membrán izolujeme.

Přestože se na intaktních biologických membránách snadno zkoumají fyziologické vlastnosti a molekulární interakce, měření funkcí jednotlivých membránových proteinů je na těchto membránách složité kvůli značné různorodosti biomolekul přítomných v membránách. Abychom lépe porozuměli složitosti buněčných membrán, je přínosné zaměřit se nejprve na zkoumání zjednodušených systémů. Umělé fosfolipidové membrány jsou zjednodušené modely biologických membrán, jejichž složení je jasně definované a snadno záměrně měnitelné. Díky tomu jsou vhodným uspořádáním 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

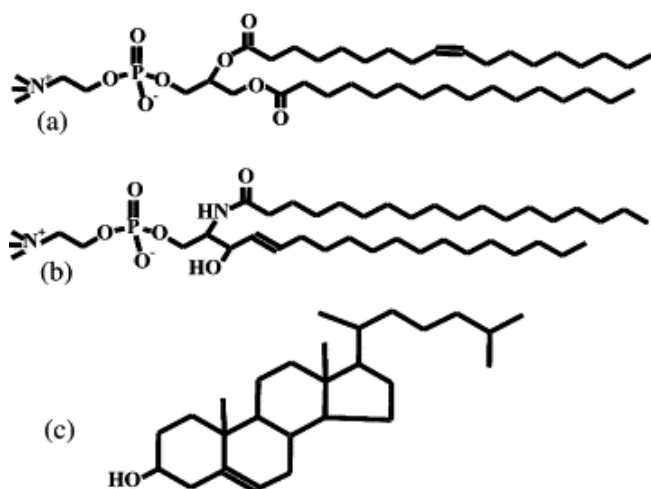
Buněčné membrány hrají zásadní roli téměř ve všech buněčných jevech, a proto je důležité jim dobře porozumět. Strukturu buněčných membrán popsali Singer a Nicolson (1972) jako fluidní mozaiku. V tomto modelu jsou proteiny amfipatické molekuly, jejichž hydrofobní konce jsou začleněny do fosfolipidové dvojvrstvy a jejich hydrofilní konce čnějí do okolí. Za fyziologických podmínek je vždy alespoň část dvojvrstvy fluidní. Koncept fluidní mozaiky se dodnes používá pro popis dynamické struktury buněk, ale některé parametry bylo nutné upravit. Proteiny zabudované do membrány se totiž nemohou náhodně pohybovat laterální difuzí napříč membránou. Díky tomu lze uvažovat o laterální heterogenitě membrán a o vzniku mikrodomén (Jacobson *et al.* 1995). Membrány organizované do mikrodomén mají výhodu v tom, že v oblastech mikrodomén se koncentrují molekuly, které spolu interagují. Tyto oblasti rovněž mohou vyčleňovat molekuly některých difundujících proteinů (Edidin 1997).

Lipidová dvojvrstva je součástí buněčné membrány a je velmi důležitá pro distribuci, organizaci a funkci membránových proteinů. Lipidová dvojvrstva odděluje extracelulární prostor od cytoplasmatického prostoru a uvnitř buňky odděluje cytoplasmu od jednotlivých organel. Acylové řetězce lipidů tvoří hydrofobní jádro dvojvrstvy, díky čemuž dochází ke vzniku bariéry především pro hydrofilní látky. Lipidová složka dvojvrstvy funguje také jako rozpouštědlo pro hydrofobní části transportních a receptorových proteinů (Zachowski 1993). Molekuly lipidů jsou mnohem menší než molekuly proteinů a v biologických membránách je lipidových molekul až stokrát více než proteinů. Molekuly lipidů se díky své velikosti také snáze pohybují napříč membránou. Tento pohyb, laterální difuze, je až desetkrát rychlejší než laterální difuze proteinů (van Meer 1989).

Fosfolipidy jsou amfipatické molekuly složené z hydrofilní hlavičky a z jednoho nebo dvou hydrofobních uhlovodíkových řetězců. Ve vodném prostředí se samy uspořádají do dvojvrstev, micel nebo liposomů. Eukaryotní buňky mají membrány tvořené třemi skupinami lipidů: glycerofosfolipidy, sfingolipidy a cholesteroly nebo cholesterolům příbuznými steroly (Obr. 1) (McMullen *et al.* 2004). Hlavními strukturními lipidy jsou glycerofosfolipidy: fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol a kyselina fosfatidová (van Meer *et al.* 2008).



Fosfolipidy se hojně vyskytují ve všech biologických membránách. Molekula je složena ze čtyř částí: dlouhého uhlovodíkového řetězce, glycerolu nebo sfingosinu, fosfátu a z polární skupiny, která je navázána na fosfát. Mastné kyseliny utvářejí hydrofobní bariéru a zbylé komponenty mají hydrofilní vlastnosti, které jim umožňují interakce 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.



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

Hydrofobní oblast glycerofosfolipidů tvoří tříuhlíkatý alkohol glycerol, na jehož hydroxylové skupiny prvního a druhého uhlíku jsou esterovou vazbou navázány dva řetězce mastných kyselin lišící se délkou a nasyceností uhlíkových řetězců (van Meer *et al.* 2008). Hydroxylová skupina na třetím uhlíku je esterifikovaná kyselinou fosforečnou. Hlavní glycerofosfolipidy mají esterovou vazbou připojenu na fosfátovou skupinu jednu z následujících polárních molekul: serin, ethanolamin, cholin, glycerol nebo inositol.

Další skupinou strukturních lipidů jsou sfingolipidy. Jejich hydrofobní část je tvořena ceramidem, na který je amidovou vazbou napojen dlouhý řetězec mastné kyseliny. V savčích buňkách jsou hlavními sfingolipidy sfingomyelin a glykosfingolipidy (van Meer *et al.* 2008).

Třetí důležitou složkou lipidových membrán jsou steroly, které jsou zodpovědné za regulaci membránové fluidity a permeability. V živočišných buňkách převažuje cholesterol. Cholesterol se významně liší svojí strukturou od fosfolipidů a sfingolipidů eukaryotních membrán (McMullen a 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

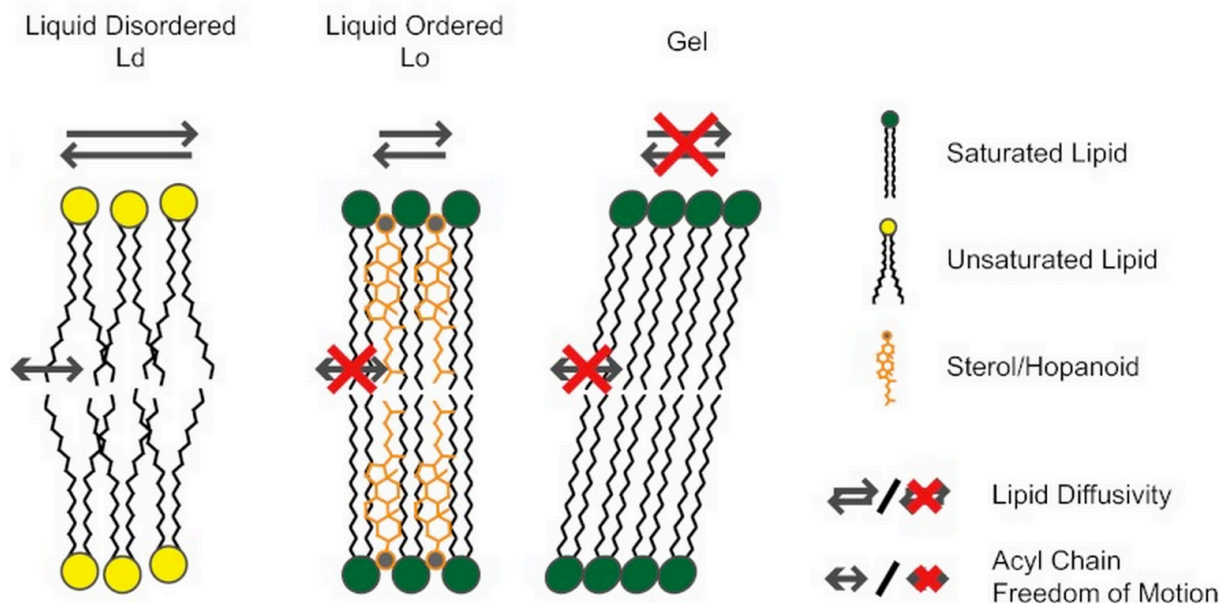
hydroxylovou skupinou blízko k polární hlavičce vedlejšího fosfolipidu (McMullen *et al.* 2004).

V buněčných membránách obratlovců je ze sterolů nejvíce zastoupen cholesterol a v případě hub ergosterol (Beck *et al.* 2007). Rostlinné buňky se od buněk živočichů a hub odlišují zejména vyšším počtem sterolů v plasmatických membránách. Většina rostlinných sterolů reguluje tekutost a propustnost fosfolipidové dvojvrstvy, zatímco zbylá část je využita na syntézu sekundárních metabolitů. Mezi nejběžnější rostlinné steroly patří sitosterol a 24-methylcholesterol (Hartmann 1998).

### **2.1.1 Fázové chování lipidových dvojvrstev**

V nepřítomnosti cholesterolu se čisté lipidové dvojvrstvy nacházejí 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; nasycené uhlovodíkové řetězce sfingomyelinu způsobují ve sfingomyelinově bohatých membránách fázi gelu. Nenasycené uhlovodíkové řetězce, nacházející se u membránových glycerofosfolipidů, udávají tekutou fázi (van Meer *et al.* 2008). Steroly nejsou samy zodpovědné za formování fází, ale společně s lipidy tvořícími membránu mohou vytvořit tekutou uspořádanou fázi.

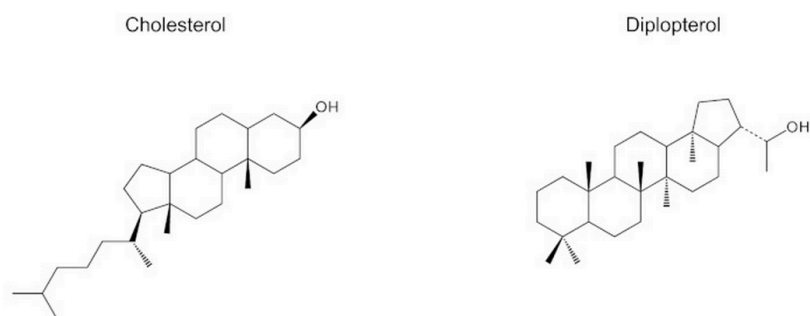
Tekutá uspořádaná fáze je termodynamický přechod mezi tekutou neuspořádanou fází a nefyziologickou fází gelu (Obr. 2) (Devaux a Morris 2004). Formování tekuté fáze je závislé na vlastnosti sterolů. Steroly se zároveň vmezeřují mezi nasycené řetězce sfingolipidů a zabraňují jejich krystalizaci (tedy vzniku gelové fáze) a uspořádávají nenasycené acylové řetězce (Sáenz *et al.* 2012).



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

## 2.2 Lipidová 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 *et al.* 1984), které však zastávají stejnou funkci jako cholesterol v eukaryotních buňkách. Sáenz *et al.* (2012) prokázali, že diplopterol, nejjednodušší bakteriální hopanoide, 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 *et al.* 1987).



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

### 2.3 Lipidová membrána u Archea

Lipidové 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. Lipidové molekuly jsou složeny z glycerolu a izoprenoidního alkoholu dlouhého 20, 25 nebo 40 uhlíkových atomů (De Rosa *et al.* 1986).

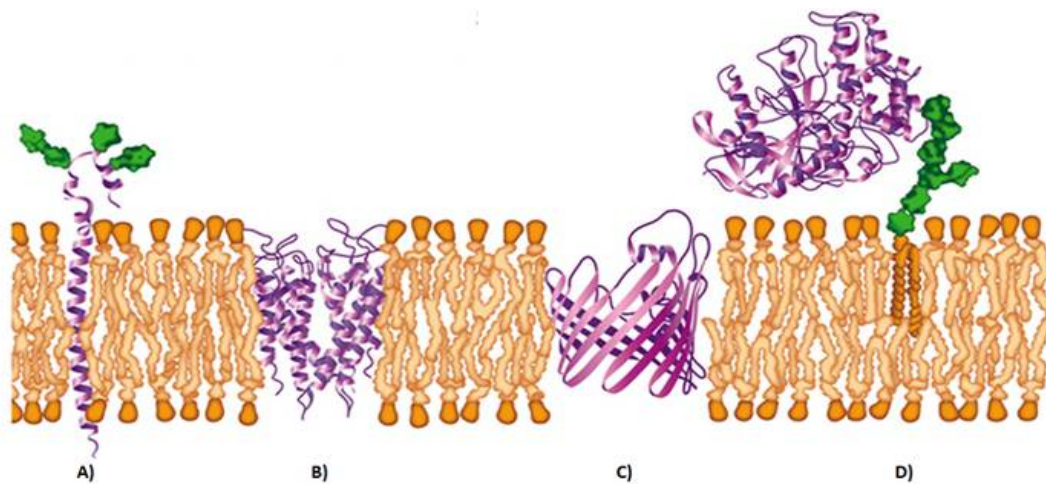
Izoprenoidní uhlovodíkové řetězce jsou značně větvené metylovými výběžky. Uhlovodíkové řetězce jsou u Archea navázány na glycerol v poloze sn-2 a sn-3, což znamená, že glycerolfosfátová páteř je z glycerol-1-fosfátu, oproti glycerol-3-fosfátu u eukaryot a bakterií (Koga a Morii 2007).

### 2.4 Proteiny plasmatické membrány

Proteiny s membránou asociované interagují s lipidy a umožňují 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 *et al.* 2001). U většiny z těchto proteinů byla předpokládána cytosolická orientace N-terminální i C-terminální domény, což se experimentálně potvrdilo u *Saccharomyces cerevisiae* (Kim *et al.* 2006). Nesložené polypeptidové řetězce membránou procházejí většinou za pomoci translokonů, které umožňují polypeptidovým řetězcům projít skrz nebo se začlenit do membrány. Již během vkládání proteinu do membrány je ve většině případů rozhodnuto o jeho orientaci v membráně (von Heijne 2006).

Proteiny jsou s membránou asociovány dvěma způsoby. Jedná se o proteiny periferní a integrální (Obr. 4). Singer a Nicolson (1972) popisují periferní proteiny tak, že stačí pouze mírná úprava okolních podmínek, jako vzrůst iontové síly média nebo přidání chelatačního činidla, aby proteiny 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.

Konečná membránová orientace většiny transmembránových proteinů je u eukaryotních buněk získávána během syntézy nebo okamžitě po syntéze na hrubém endoplasmatickém 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 (Hartmann *et al.* 1989).



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

## 2.5 Membránová asymetrie eukaryotních buněk

Lipidy plasmatické membrány jsou v eukaryotních buňkách rozloženy nerovnoměrně mezi oběma vrstvami dvojvrstvy (Ikeda *et al.* 2006). Glycerofosfolipid fosfatidylcholin je lokalizován především ve vnější vrstvě plasmatické membrány, zatímco fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin a v menším množství také fosfatidylinositol a kyselina fosfatidová jsou lokalizovány na cytosolické straně dvojvrstvy. Sfingomyelin a glykosfingolipidy se nacházejí výhradně ve vnější vrstvě (Devaux 1991; Ikeda *et al.* 2006).

Hlavním syntetickým aparátem fosfolipidů v buňkách je endoplasmatické retikulum. Syntéza fosfolipidů probíhá zejména na cytoplasmatické straně endoplasmatického retikula, díky čemuž je nutné přibližně polovinu nově syntetizovaných lipidových molekul transportovat na druhou stranu membrány tak, aby došlo k rovnoměrnému rozdělení lipidů do obou monovrstev (Pomorski a Menon 2006). Asymetrie plasmatické membrány se neshoduje s nerovnoměrnou syntézou lipidů. To znamená, že asymetrické rozložení lipidů musí být v membránách nějak vytvořeno a následně udržováno. O vytvoření asymetrie se starají transportní systémy, které ovlivňují pohyb lipidů napříč membránou (Pomorski *et al.* 2001). Ustanovená membránová asymetrie je udržována kombinací pomalé difuze napříč membránou, interakcí proteinů a lipidů a transportem zprostředkovaným proteiny (Daleke 2003).

<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)

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 fosfatidylserin a fosfatidylethanolamin 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 skrambláz zatím není zcela známá. Například fosfolipidová skrambláza 1 se účastní rychlé změny distribuce fosfolipidů skrz plasmatickou membránu, která je závislá na přítomnosti  $Ca^{2+}$ . Dalším příkladem je skrambláza typu 3, která je zapojena do regulace *de novo* biosyntézy kardiolipinu v mitochondriální membráně (Sahu *et al.* 2007).

Membránová asymetrie je také důležitá pro správnou funkci některých proteinů, např. protein kinázy C (Palfrey a Waseem 1985) nebo spektrinu (O'Toole *et al.* 1999). Spektrin interaguje s molekulami fosfatidylserinu bipolárními interakcemi na rozhraní lipidů a vody. Tyto interakce umožňují silnou asociaci spektrinu s lipidovým povrchem a dovolují mu rychle difundovat.

Manno *et al.* (2002) testovali na membránách červených krvinek roli asymetrického rozložení lipidů ve dvojrstvách. Rozložení fosfolipidů podle nich ovlivňuje mechanickou stabilitu membrán červených krvinek. Regulace membránových vlastností je ovlivňována interakcemi skeletálních proteinů s aminofosfolipidy na vnitřní straně dvojrstvy.

Pro správnou funkci plasmatických membrán je klíčové udržovat transmembránovou lipidovou asymetrii (Daleke 2003). Ztráta membránové asymetrie, při které dochází k vystavení fosfatidylserinu na vnější monovrstvu, vede k rozpoznání apoptotických buněk makrofágy nebo jinými fagocyty. Většina makrofágů totiž specificky rozeznává tento fosfolipid. Ukázalo se, že fosfatidylserin je rozhodujícím ligandem při pohlcování apoptotické buňky (Fadok *et al.* 2001). Liposomy, které obsahují na svém povrchu fosfatidylserin totiž v závislosti na množství dokáží inhibovat apoptózu srpkovitých červených krvinek, které na svém povrchu fosfatidylserin exponují (Fadok *et al.* 1992).

Další efekt změny rozložení fosfolipidů byl pozorován u nádorových buněk. Nádorové buňky produkují tkáňový faktor (TF). TF je transmembránový receptorový protein, který funguje jako primární rakovinový prokoagulant (Gale a Gordon 2001). Aktivita prokoagulantů nádorových buněk vede zčásti k vystavení fosfatidylserinu na vnější stranu

plasmatické membrány. Nádorové buňky s vystaveným fosfatidylserinem na povrchu membrány jsou rozpoznávány a vázány na aktivované lidské monocyty (Utsugi *et al.* 1991).

Vzhledem k tomu, že asymetrie monovrstev je v přírodě převládajícím jevem, není divu, že bylo vynalezeno mnoho metod usnadňujících jejich studium, například planární systémy (Hagge *et al.* 2002), dvojvrstvy na pevném podkladu (Katagiri *et al.* 2004), liposomy (McIntyre a Sleight 1991) nebo dvojvrstvy na kapičkovém rozhraní (Hwang *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 lipidové membrány (BLM - *Black lipid membrane*)

Membránový transport je běžně studován na živých buňkách za použití molekulárních sond nebo elektrofyziologických metod. Tyto metody jsou sice schopné detekovat fyziologické vlastnosti a molekulární interakce buněčných membrán, ale díky přítomnosti různorodých biomolekul v membráně je měření funkce jednotlivých membránových proteinů složité (Funakoshi *et al.* 2006). Biologické membrány jsou velmi složité systémy, proto je někdy nutné snížit množství jednotlivých parametrů (Winterhalter 2000) a použít zjednodušený model membrány, abychom porozuměli základním procesům. Umělé fosfolipidové membrány se skládají z purifikovaných nebo syntetizovaných fosfolipidů a vyskytují se ve dvou hlavních uspořádáních, jako liposomy nebo planární dvojvrstvy (Funakoshi *et al.* 2006). Planární lipidové dvojvrstvy jsou svým uskupením velmi výhodné zejména díky velké citlivosti ke změnám elektrických vlastností, což umožňuje popis fyzikálních a chemických vlastností umělých membrán nebo například velikosti zabudovaných kanálů (Winterhalter 2000).

Planární lipidové dvojvrstvy vznikají dvěma hlavními způsoby. V obou případech vzniká membrána ve speciální aparatuře s teflonovou přepážkou. Lipidová vrstva vzniklá

rozprostřením roztoku přes aperturu (otvor v teflonu) je zpočátku tlustá několik mikrometrů. Postupně se začíná zužovat až do stavu planární dvojvrstvy (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 šedočerné tečky šířící se přes vrstvu. To je důsledkem interference odraženého světla od vody a lipidů a fázového posunu světla z rozhraní lipidů a vody (Winterhalter 2000).

Pro vytváření černých lipidových membrán existuje mnoho metod, přičemž v literatuře se nejčastěji setkáváme s *painting* (malovací) metodou (Mueller *et al.* 1962) a s metodou skládání monovrstev (Montal a Mueller 1972). Planární dvojvrstvy vzniklé malovací metodou obsahují mezi monovrstvami zbytky organických rozpouštědel. Přítomnost rozpouštědla ovlivňuje tloušťku umělé membrány a může mít za následek například neúspěšné zabudovávání proteinů do membrán (Montal a Mueller 1972).

Obě metody tvoří dvojvrstvy s vysokým elektrickým odporem, díky čemuž se využívají na elektrická měření jednotlivých kanálů. Vytvoření vyhovující membrány však může trvat i delší dobu vzhledem k tomu, že často dochází ke vzniku nestabilních membrán, které se snadno rozbijí nebo nedojde ke vzniku dvojvrstvy kvůli přílišnému množství lipidů v okolí apertury (Braun *et al.* 2014).

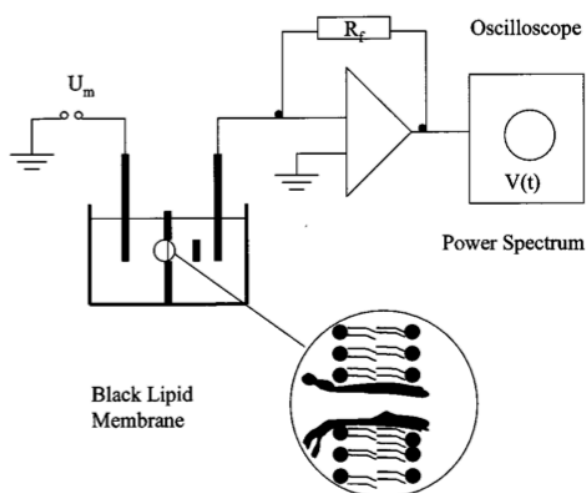
### 3.1.1 Vznik dvojvrstevných membrán

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 a Mueller 1972).

Jak bylo výše zmíněno, černé lipidové membrány se dají vytvářet dvěma způsoby. *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 (Castellana a Cremer 2006). 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 puftru, 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 (Ti Tien 1968; Montal a Mueller 1972). Takto vzniklé dvojvrstvy obsahují pouze minimální množství rozpouštědla, nebo dokonce žádné (White *et al.* 1976). Pro elektrická měření jsou tyto dvě prohlubně propojeny elektrodami (Obr. 5).



**Obr. 5:** Schématické uspořádání pro měření vodivosti na planárních lipidových 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 zpětnovazebný 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).

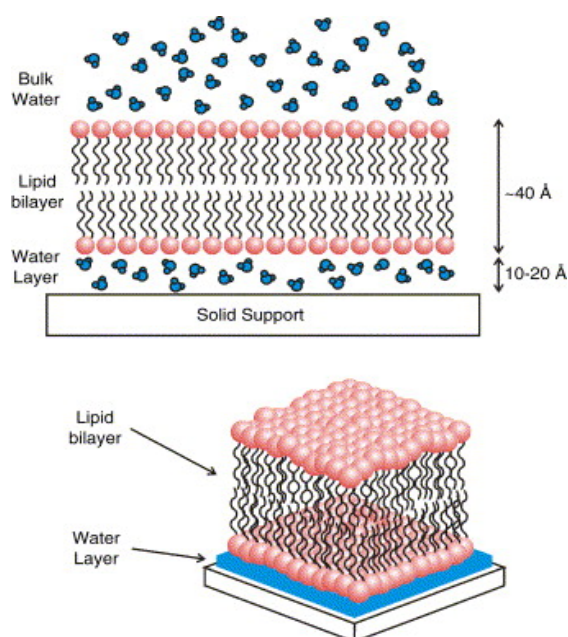
Braun *et al.* (2014) přišli s vylepšenou metodou vzniku planární lipidové dvojvrstvy z monovrstev za pomoci vzduchové bubliny. V první fázi ošetřili okraje kolem otvoru v teflonovém filmu roztokem hexadekanu, což dalo vzniku hydrofobní oblasti kolem otvoru. Dvojvrstvu pak vytvořili klasickou metodou Montal a Mueller (1972) ze dvou monovrstev. V případě, že je takto vzniklá membrána nestabilní, je možné aplikovat tzv. pseudomalovací techniku se vzduchovou bublinou.

V hydrofobní oblasti kolem apertury ulpěly lipidy z předešlého pokusu o vytvoření membrány. Tyto zásobní lipidy mohou být rozprostřeny přes aperturu. Pro tento účel použili Braun *et al.* (2014) mikrostříkačku a vytvořili malou vzduchovou bublinu pod vodní hladinou. Vzduchovou bublinu potom rozprostřeli přes teflonovou aperturu. Pohyb bubliny z okrajů přes aperturu přemístí lipidy ze zmíněné zásoby a vzniká tak nová dvojvrstva. Díky této metodě vznikají membrány s mnohem nižším obsahem rozpouštědla, což je žádoucí.

### 3.2 Lipidové dvojvrstvy na pevných podkladech (SLB - *Supported lipid bilayer*)

Lipidové dvojvrstvy na pevných podkladech jsou planární struktury složené ze dvou lipidových monovrstev adsorbující na hydrofilní pevné látce. Stabilita SLB je mnohem větší v porovnání s černými lipidovými membránami, přestože je jejich plocha mnohem větší než u BLM. Tyto membrány si své elektrické vlastnosti udržují i několik týdnů (Purrucker *et al.* 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. 6) (Tamm a McConnell 1985). Oddělení membrány od pevného podkladu ultratenkou vrstvou vody udržuje termodynamické a strukturální vlastnosti volné membrány, což umožňuje použití některých povrchově sensitivních metod (Sackmann 1996).



**Obr. 6:** Schématický diagram fosfolipidové dvojvrstvy na pevném podkladu. Membrána je od substrátu oddělena 10–20 Å tenkou vrstvou vody (Castellana a Cremer 2006).

Existuje několik způsobů přípravy lipidových dvojvrstev na pevném podkladu. První způsob se provádí metodou Langmuir-Blodgettové, kdy se na hydrofobní substrát ponořený ve vodném roztoku naváže monovrstva lipidů. Substrát s monovrstvou je následně přiložen k další lipidové monovrstvě za vzniku dvojvrstvy (Tamm a McConnell 1985). Další způsob je spontánní fúze váčků z vodného prostředí na povrch substrátu (Brian a McConnell 1984). Je možné rovněž kombinovat oba předešlé způsoby, kdy se první vrstva dvojvrstvy vytváří na pevném substrátu metodou Langmuir-Blodgettové, přičemž dvojvrstva vznikne následnou fúzí liposomu s touto vrstvou (Wenzl *et al.* 1994). Fosfolipidové dvojvrstvy jsou tvořeny na

různých hydrofilních substrátech, nejčastěji na částicích oxidu křemičitého (Katagiri *et al.* 2004), skle (Cremer a Boxer 1999) nebo slídě (Zasadzinski *et al.* 1991).

Jednou z povrchově sensitivních metod vhodných pro lipidové dvojvrstvy na pevném povrchu je např. Mikroskopie atomárních sil (AFM), kterou Lin *et al.* (2006) použili ke zjišťování rozmístění domén DSPC v rámci jednotlivých vrstev DLPC/DSPC lipidových dvojvrstev na pevném podkladu, aby mohli porovnat důsledky lipidové asymetrie s asymetrií živých buněk. AFM je nástroj vhodný pro vizualizaci biologických a organických povrchů ve vysokém rozlišení. Tato metoda zaznamenává meziatomární síly mezi hrotem na ohebném nosníku a povrchem vzorku a je funkční v různorodém prostředí, včetně vody nebo solného roztoku (Zasadzinski *et al.* 1991).

Přestože jsou fosfolipidové membrány na pevných podkladech vhodné pro mnohá zkoumání buněčných povrchů, přímý kontakt spodní monovrstvy a pevného povrchu představuje jistá omezení, zejména pokud bychom chtěli do membrány zabudovat transmembránový protein s velkou cytosolickou doménou. Vrstva vody mezi podkladem a membránou je totiž příliš tenká, takže neposkytuje dostatečný prostor pro cytosolické domény většiny proteinů (McCabe a Forstner 2013). Nanesením ultratenké polymerové vrstvy na pevný podklad vznikne planární membránový systém, který je vhodný pro znehybnění glykolipidů, membránových receptorů a proteinů a vytvoření modelových buněčných povrchů (Sackmann a Tanaka 2000). Polymery vhodné pro vznik umělé membrány musí mít několik specifických vlastností. Polymery musí být hydrofilní a relativně chemicky inertní, aby nedocházelo k nechtěným interakcím mezi nimi a membránou. Také musí být schopné tvořit tenkou vrstvu s jednotným povrchem vhodným pro vznik dvojvrstvy (McCabe a 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 (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 proteinů vázaných na membránu, měření koeficientu tření mezi lipidovou vrstvou a polymerem,

měření hydrodynamických vlastností nebo třeba povrchové viskozity polymerových filmů (Kühner *et al.* 1994).

### 3.3 Liposomy

Fosfolipidy jsou díky svým vlastnostem schopny se samy uspořádat do vezikulů, pokud jsou rozptýleny ve vodném prostředí. Velké lipidové vezikuly fungují v přírodě jako membrány živých buněk a chrání jejich intracelulární komponenty před okolním prostředím (Tan *et al.* 2006). Hlavními rysy liposomů jsou za prvé typická morfologie, tedy relativně nepropustná membrána, která úplně uzavírá vodné prostředí, a za druhé schopnost uzavřít do sebe během formování různá rozpouštědla přítomná ve vodné fázi (Szoka a Papahadjopoulos 1980). Malé lipidové vezikuly (velké několik nanometrů) mohou fungovat jako intracelulární transportéry (Tan *et al.* 2006).

Liposomy se dělí v závislosti na své velikosti a počtu fosfolipidových dvojvrstev, které obklopují rozpouštědlo na malé (SUV) nebo velké (LUV) jednodamelární vezikuly, zatímco označení multilamelární vezikuly (MLV) se používá v případě velkého množství membrán uzavírajících rozpouštědlo. Obří vezikuly (GV – *giant vesicle*) a velké nebo malé oligolamelární vezikuly označují velké vezikuly a struktury, ve kterých několik dvojvrstev obklopuje uvězněné rozpouštědlo (Lasic 1988).

Multilamelární vezikuly vznikají mechanickým rozptýlením suchých lipidů ve vodné fázi a dosahují velikostí od 0,1 až po několik mikrometrů. Energickým mícháním, krátkou sonikací nebo filtrací skrz polykarbonátové membrány získáme menší a více jednotné multilamelární vezikuly (Szoka a Papahadjopoulos 1980). Velké jednodamelární vezikuly a oligolamelární vezikuly vznikají zpětným fázovým odpařováním. To znamená zavedení vodného pufru do směsi fosfolipidů a organického rozpouštědla. Organické rozpouštědlo je následně odstraněno vypařováním za sníženého tlaku. Liposomy jsou takto tvořeny z různých kombinací lipidů a vyznačují se velkým poměrem zachyceného vodného roztoku v poměru k množství lipidů Szoka a 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  $\mu\text{m}$  (Traïkia *et al.* 2000).

#### 3.3.1 Obří jednodamelární vezikuly (GUV - *Giant unilamellar vesicles*)

Obří jednodamelární vezikuly jsou vhodné modely pro studium buněčných membrán, zejména kvůli jejich podobné velikosti a zakřivení. GUV dosahují v průměru velikosti mezi

10 až 200  $\mu\text{m}$ . V tom také spočívá jejich důležitá vlastnost; jsou viditelné pod světelným mikroskopem (Menger a 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 *et al.* 2009).

Hydratace pevné látky spočívá v rozpuštění fosfolipidů nebo jejich směsi v organickém rozpouštědle, načež je rozpouštědlo za sníženého tlaku odstraněno. K suchému filmu fosfolipidů se přidá deionizovaná voda a vše se promíchá. Následné zmrazení a lyofilizace vedou ke vzniku načechráného pudru. Vznik GUV pak spočívá v hydrataci pudru na speciálně upraveném podložním sklíčku. Pudr je nutné hydratovat po určitou dobu (Menger a Angelova 1998).

Elektroformace obřích jednodamelárních vezikulů (GUV) je efektivní metoda, která umožňuje opakovatelné vytváření obřích liposomů tak, že se aplikuje střídavé napětí na tenkou uspořádanou lipidovou vrstvu uloženou na povrchu elektrody (Collins a 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 do vakua. Následně jsou lipidy hydratovány. Teplota v komůrce je nastavena na hodnotu fázového přechodu lipidů s nejvyšším bodem tání. Obří jednodamelární vezikuly vznikají po aplikaci střídavého elektrického pole napříč komůrkou (Wesołowska *et al.* 2009). Touto metodou vznikají obří liposomy jednotné velikosti, která se pohybuje kolem 20  $\mu\text{m}$  v průměru (Girard *et al.* 2004).

Elektroformace jako metoda vhodná pro vznik GUV umožnila produkci obřích vezikulů složených ze směsi lipidů s přirozeným sklonem k fázovému chování a ke vzniku lipidových raftů. Fázový přechod se dá pomocí mikroskopu snadno pozorovat ve směsi dvou lipidů, pokud se tyto lipidy zřetelně 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).

Inkorporace proteinů do obřích jednodamelárních vezikulů může být značně problematická zejména kvůli dehydrataci, která předchází vzniku těchto vezikulů. Bylo objeveno několik způsobů jak tomuto problému předejít. Doeven *et al.* (2005) využili stabilizačních účinků disacharidů na membrány a proteiny a dokázali tak do obřích

jednolamelárního vezikulu zabudovat čtyři proteinové komplexy, aniž by došlo ke ztrátě proteinové aktivity.

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 a Neher 1984) bez ztráty kontroly nad lipidovým prostředím (Collins a Gordon 2013). Principem *patch clamp* je elektrická izolace membránového terčíku od okolního roztoku a nahrávání proudu procházejícího terčíkem. 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 a Stanfield 1994).

### **3.4 Dvojvrstvy na rozhraní kapiček (DIB - *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 popisuje vznik dvojvrstev mezi dvěma vodnými objemy ponořenými do směsi lipidů a organického rozpouštědla. Bayley *et al.* (2008) popisuje uspořádání, ve kterém 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 ovládána 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 *et al.* 2007). Dvojvrstva na kapičkovém rozhraní vzniká tak, že se vodná kapička ponoří do směsi organického rozpouštědla (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. DIB mohou být rozděleny a následně spojeny několikrát za sebou pohybáním kapiček od sebe a k sobě (Hwang *et al.* 2007).

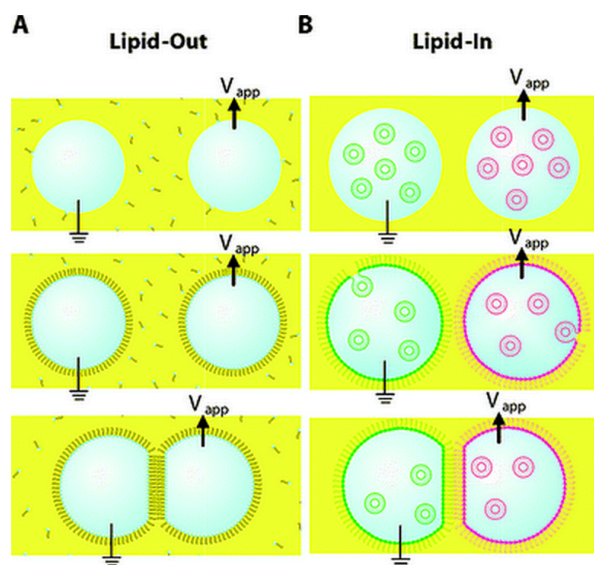
Membránové proteiny rozptýlené v jedné z kapiček se přímo zabudovávají do membrány. Výhoda použití kapiček spočívá v tom, že můžeme měřit elektrický záznam iontových kanálků na membránách, které jsou *in vivo* příliš malé na to, aby na ně bylo možné použít jiné metody, např. *patch clamp* (Sakmann a Neher 1984). Příkladem takových membrán jsou membrány erytrocytů nebo mitochondrií (Leptihn *et al.* 2011). Aby bylo možné měřit elektrický záznam membrán mitochondrií a erytrocytů, musí se z lipidů izolovaných z těchto membrán vytvořit dvojvrstvy na kapičkovém rozhraní.

Dvojvrstvy na kapičkovém rozhraní se dají tvořit dvěma odlišnými způsoby (Obr. 7). Metodou *Lipid-out* vzniká dvojvrstva z lipidů rozpuštěných v organické fázi, kdy se tvoří kapičky obalené shodnou monovrstvou. Druhá metoda, která se nazývá *lipid-in*, se od předešlé metody odlišuje tím, že lipidy nejsou ve směsi s organickou fází, ale jsou obsaženy přímo ve vodné fázi, tedy uvnitř kapiček, ve formě liposomů. Metodou *Lipid-in* vzniká dvojvrstva na rozhraní oleje a vody, kde tyto vezikuly spolu fúzí a tvoří monovrstvy. Výhoda techniky *lipid-in* je mimo jiné nižší experimentální cena než u *lipid-out*. Lipidů je totiž potřeba daleko méně a množství lipidů, které skutečně tvoří dvojvrstvu, je mnohem větší, než jaké je množství lipidů rozpustných v olejové fázi. Pokud jsou vytvářeny kapičky s odlišným složením vezikulů, vznikají na kapičkách ve stejné organické lázni rozdílné monovrstvy a dochází tak ke vzniku asymetrických dvojvrstev (Bayley *et al.* 2008; 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 *et al.* 2007). Tyto kapičky na hydratovaném pevném povrchu (DHB - Droplet-on-hydrated support bilayer) se vyznačují velkou mechanickou stabilitou; dvojvrstvy vydrží až několik týdnů a odolávají mechanickému namáhání, například otřesům nebo vysokému aplikovanému napětí (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 a Jacobson 1997). Přestože se dá sledování jedné částice provádět *in vivo*, výsledky takovýchto měření mohou být často těžko zpracovatelné, neboť nelze přesně definovat lipidové složení zkoumaných membrán. Z umělých membránových systémů jsou DHB vhodné pro tuto mikroskopii zejména díky jejich stabilitě (Bayley *et al.* 2008). Thompson *et al.* (2007) použili fluorescenční mikroskopii s rozlišením jednotlivých molekul na systému DHB, aby charakterizovali lipidovou membránu a prozkoumali mechanismus vkládání pórtovného toxinu alfa-hemolysinu ze *Staphylococcus aureus*. Jejich

výsledky například ukázaly, že DHB obsahují jen malé procento pomalu se pohybujících lipidů v porovnání s mnohem větším procentem u membrán na pevných površích.



**Obr. 7:** Schéma formování dvojvrstev na kapičkovém rozhraní v uspořádání *lipid-in* a *lipid-out*. A) Vznik symetrické dvojvrstvy metodou *lipid-out*. Vrchní obrázek: dvě vodné kapičky jsou ponořeny do roztoku lipidů a hexadekanu. B) Vznik asymetrické dvojvrstvy. Vrchní obrázek: dvě vodné kapičky obsahující lipidové vezikuly 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).

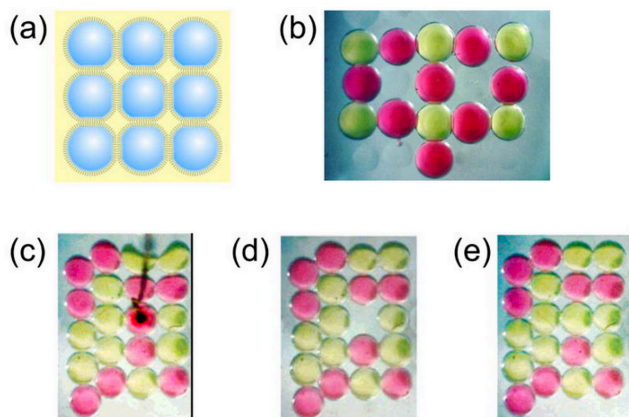
### 3.4.1 Sítě kapiček (*Droplet networks*)

Holden *et al.* (2007) vytvořili takzvané biosítě z kapiček propojených fosfolipidovou dvojvrstvou. Tyto biosítě slouží jako modelový systém pro studium biologických jevů spjatých s membránami. Na rozhraní mezi kapičkami jsou dvojvrstvy, do kterých je možné vkládat různé kanály a póry. Elektrody vkládané do kapiček pak dovolují měření transmembránových iontových proudů nesených jednotlivými kanály (Syeda *et al.* 2008). Systém dvojvrstev na povrchu kapiček je využit na sestavení lineárních nebo větvených sítí, které se chovají jako baterie nebo světelné sensory (Holden *et al.* 2007).

Dále uvádím příklad praktického provedení soustavy kapiček. Holden *et al.* (2007) uspořádali do sítě 20 kapiček (Obr. 8). Pro snazší manipulaci a přesnější uspořádání sestavili síť na povrchu z plexiskla, jež bylo pokryto čtvercovými řadami mikrodolíčků. Každou kapičku naplnili barvivem pro lepší vizualizaci. Důležitým krokem v přípravě sítí je nechat kapičky nejdříve stabilizovat (počkat na vznik monovrstvy), než jsou nanесeny na povrch s dolíčky, aby se předešlo splývání jednotlivých kapiček. Kapičky se připojují k sousedním kapičkám v momentě, kdy je vypuzováno mezilehlé nepolární rozpouštědlo. Vzdálenost mezi

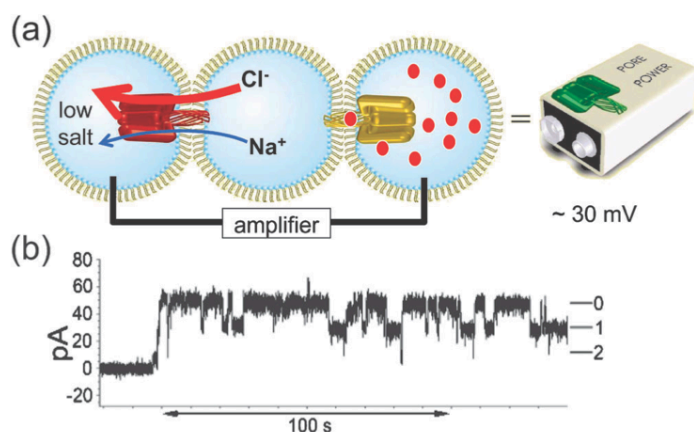


dolíčky a průměr kapiček (určený jejich objemem) pak řídí průměr vzniklých dvojvrstev. Síť kapiček lze tvarovat pomocí zavedené elektrody s koncem obaleným v agaróze (Bayley *et al.* 2008).



**Obr. 8:** Vytváření a měnění sítě dvojvrstev. 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 barvami. Velikost kapiček je v průměru  $700 \mu\text{m}$ . Každé rozhraní mezi kapičkami je lipidová dvojvrstva. 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 na ní zůstává uchycena a odpoutá se od sítě. D) Okolní dvojvrstvy zůstanou neporušené, navzdory odštěpení čtyř dvojvrstev při přemístování kapičky. E) Stabilizovaná žlutá kapička je vložena do prázdného důlku. Proces vyjímání a vracení kapiček může být libovolně opakován (Bayley *et al.* 2008).

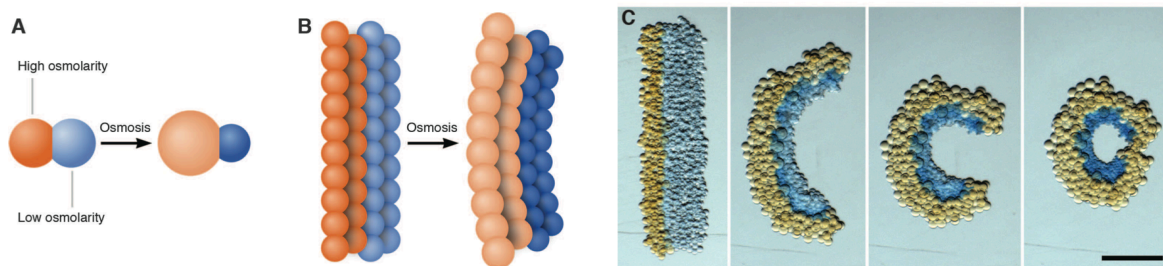
Funkční sítě vznikají díky začlenění membránových proteinů se specifickými vlastnostmi (Hwang *et al.* 2007). Například biobaterie, síť ze tří kapiček, vzniká spojením iontového gradientu, který je na membráně mezi kapičkami, s alfa-hemolysinovým pórem mutovaným tak, aby byl anion selektivní (Obr. 9).



**Obr. 9:** 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 dvojrstvě. V pravé dvojrstvě je zaznamenávána reversibilní vazba beta-cyclodextrinu do alfa-hemolysinového mutanta M1113/K147N (Bayley *et al.* 2008).

Živé tkáně se od samostatně fungujících buněk odlišují především schopností komunikace mezi sebou. Tento jev se typicky nedaří napodobit na syntetických napodobeninách buněk, jako jsou například liposomy (Villar *et al.* 2013). Wauer *et al.* (2014) rozvíjejí kapičkové sítě pro další využití tak, že vytvořili volně stojící 3D sítě schopné vnitřní komunikace (předávání chemických a elektrických signálů). Trojrozměrné sítě kapiček, které se svým uskupením podobají živým tkáním, jsou mnohem výhodnější než sítě dvojrozměrné, zejména díky rychlejší komunikaci mezi jednotlivými kapičkami (Wauer *et al.* 2014). Sítě kapiček jsou tištěny na automatických tiskárnách, které tisknou až desetitisíce kapiček pomocí speciálně vyvinutého programu. Vzniká trojrozměrné volně stojící uskupení. Sítě jsou složeny z vodných kapiček oddělených lipidovou dvojrstvou. Do dvojrstev zabudované proteiny zajišťují elektrickou komunikaci mezi jednotlivými kapičkami. Vytisknuté kapičkové sítě mohou být také skládány mechanismy založenými na gradientech osmolarity tak, že se po vytištění složí do rozličných tvarů, které nelze vytvořit přímo tiskárnou (Obr. 10) (Villar *et al.* 2013). V odkazovaném videozáznamu můžeme pozorovat zrychlený záznam spontánně se skládající sítě kapiček řízený gradientem osmolarity.<sup>2</sup>

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



**Obr. 10:** Síť spontánně se skládajících kapiček na základě osmotického gradientu. A) Schéma dvou kapiček s rozličnými osmolaritami (červená kapička s vyšší, modrá s nižší), které jsou spojené lipidovou dvojvrstvou. B) Schéma síť kapiček složené ze dvou pruhů kapiček s rozdílnou osmolaritou. Tok vody z kapiček s nižší osmolaritou do kapiček s vyšší osmolaritou vede k samovolné změně tvaru této síť. C) Fotografie skládající se síť kapiček (Villar *et al.* 2013).

### 3.5 Důležité vlastnosti umělých fosfolipidových membrán a metody jejich studia

#### 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 a Toomre 2000). V buňkách se objevují membránové oblasti, které jsou odolné vůči neiontovým detergentům, jako je Triton X-100, což ukazuje na to, že biologické membrány nejsou vždy v tekuté neuspořádané fázi (Brown a London 1998). Lipidové rafty jsou mikrodomény vyskytující se v plasmatických membránách ve fázi podobné tekuté uspořádané fázi modelových membrán. Tyto rafty jsou obklopeny kontinuální membránovou oblastí s lipidovou strukturou tekuté neuspořádané fáze (Hancock 2006). Tekutá uspořádaná fáze je typická vysokým výskytem uspořádaných acylových řetězců a lipidů s nasycenými acylovými řetězci, které mají vyšší teplotu tání (Brown a London 1998). Asociace mezi sfingolipidy, steroly a specifickými proteiny uděluje buněčným membránám s takovou laterální segregací množství výhod. Jednou z nejdůležitějších vlastností lipidových raftů je jejich schopnost zahrnovat nebo vylučovat různé množství proteinů a usnadňovat tak selektivní protein-proteinové interakce (Simons a Toomre 2000; Lingwood a Simons 2010).

Signalizační komplexy lokalizované v oblasti lipidových mikrodomén jsou chráněny před činností enzymů, které se v lipidových raftech nenacházejí. Mezi takové enzymy patří například membránová fosfatáza, která by jinak mohla ovlivnit průběh signalizace (Simons a Toomre 2000).

Domény s vlastnostmi podobnými lipidovým raftům se dají vytvořit v umělých membránových systémech. Dvojvrstvy na pevném podkladu jsou jedním z modelových systémů. Tyto dvojvrstvy jsou skládány ze dvou monovrstev z ekvimolární směsi fosfolipidů, cholesterolu a sfingolipidů nebo z izolovaných přírodních lipidů. Druhým modelem jsou obří jednodamelární vezikuly, které poskytují volně stojící dvojvrstevné membrány (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 GUV během přechodu z fáze gelu do tekuté fáze využitím efektu separace fází pomocí dvoufotonové fluorescenční mikroskopie. Pro takovéto pokusy musejí být GUV vzniklé elektroformací označeny fluorescenční sondou. V tomto případě 6-dodekanoyl-2-dimethyl-amino-naftalenem (Laurdan). Laurdan poskytuje několik výhod při studiu fázových přechodů v lipidových systémech. Spektrum této sondy je citlivé k polaritě okolí. Dochází ke vzniku až 50nm červeného posunu emisního maxima při přechodu z nepolárního do polárního prostředí (Parasassi *et al.* 1997). Tyto spektroskopické rozdíly mezi gelovou a tekutou fází umožňují rozlišování stavu membrány měřením fluorescenční intenzity při dvou vlnových délkách nebo analýzou fluorescenčního spektra (Bagatolli a Gratton 1999). Parasassi *et al.* (1990) definovali excitační generalizovanou polarizaci (GPex), aby bylo možné kvantifikovat data o intenzitě nasbíraná při rozdílných excitačních a emisních vlnových délkách. Ukázalo se, že Laurdan neupřednostňuje fázi gelu, ani fázi tekutého krystalu (Bagatolli a Gratton 1999), a je proto ideální sondou pro studium fázových přechodů. Bagatolli a Gratton (1999) monitorovali jednotlivé liposomy během teplotních změn, přičemž použili mikroskopické snímky fluorescence sondy Laurdan a snímky převedené na škálu GPex, která poskytla informace o lipidové fázi.

### **3.5.2 Tekutost membrán**

Tekutost plasmatických membrán je vlastnost buněk, která popisuje pohyb molekul ve fosfolipidové dvojvrstvě a je závislá na lipidovém složení dvojvrstvy. Tekutost membrán je běžně hodnocena pomocí různých fluorescenčních membránových sond. Jednou z metod, která sleduje pohyblivost fluorescenčně značených molekul je takzvané obnovení fluorescence po fotovybělení (FRAP – *fluorescence recovery after photobleaching*) (Axelrod *et al.* 1976). Dalšími metodami jsou ustálená fluorescenční polarizace nebo anizotropie fluorescence. Základním principem těchto metod jsou změny způsobené balením lipidů, např. u teplotně závislých fázových přechodů, díky kterým dochází ke změně mobility membránově vázaného fluoroforu. (Kushnareva 2009).

Gidwani *et al.* (2001) měřili ustálené stavy anizotropie fluorescence dvou lipidových sond, [3-(difenylhexatrienyl)propanoyl]-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-fosfocholinové sondy (DPH-PC) a sondy N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolaminové (NBD-PE), aby mohli kvantifikovat uspořádání lipidů biologických membrán. Tato měření prováděli jak na modelových membránách, tak na biologických membránách žírných buněk RBL-2H3. Různé zastoupení cholesterolu ukázalo, 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 z těchto dvou sond mnohem citlivější. Použitím DPH-PC zjistili, že plasmatická membrána žírných buněk RBL-2H3 je z velké části organizovaná, to znamená, že velkou část plasmatické membrány tvoří struktury podobné lipidovým raftům. K takovým závěrům došli porovnáním hodnot anizotropie modelových membrán v úplné tekuté fázi a tekuté neuspořádané fázi.

### 3.5.3 Tloušťka membrán

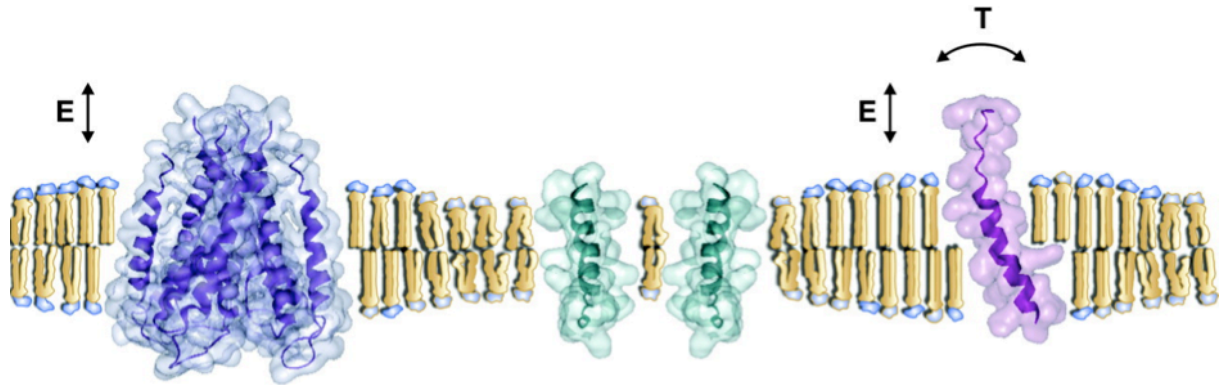
Fosfolipidové membrány jsou typické charakteristickým uspořádáním do centrální hydrofobní oblasti, která je ohraničená dvěma polárními oblastmi. Můžeme tedy předpokládat, že tloušťka hydrofobních regionů bude ovlivňovat některé membránové vlastnosti, jako například iontovou propustnost, elektrickou kapacitu, strukturu nebo funkci transmembránových proteinů (Lewis a Engelman 1983). Optimální tloušťka membrány je důležitá například pro správnou funkci mitochondriální cytochrom c oxidázy a ATP syntázy (Montecucco *et al.* 1982)

Lipidy a proteiny spolu v membránách interagují převážně hydrofobními silami. Pro membránové proteiny je energeticky nevýhodné vystavovat hydrofobní oblasti vodě nebo vkládat hydrofilní části do uhlovodíkového jádra lipidové dvojvrstvy (Mitra *et al.* 2004). Z těchto důvodů dochází u transmembránových proteinových molekul, které svojí hydrofobní oblastí nepasují přirozeně do průměrné tloušťky membrány k zvlnění a přizpůsobení membrán, které je obklopují (Obr. 11) (Mouritsen a Bloom 1984; Mitra *et al.* 2004).

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 a Engelman 1983). Novější studie ukázaly, že v závislosti na koncentraci a rozložení ovlivňuje přítomnost cholesterolu hydrofobní tloušťku lipidových membrán a to zejména uspořádáním fosfolipidových acylových řetězců (Smondyrev a Berkowitz 1999). Nezil a Bloom (1992) použili deuteriovou NMR ke studiu změn hydrofobní tloušťky membrány po přidání 30 mol.% cholesterolu

k deuteriované 1-palmitoyl-2-oleoylfosfatidylcholinové dvojvrstvě. Tloušťka membrány se zvětšila o několik desetin nanometru.

Mitra *et al.* (2004) ve své práci prezentují data, která udávají 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.



**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 lipidových 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 lipidových acylových řetězců (Mitra *et al.* 2004).

### 3.5.4 Propustnost membrán

Čistě lipidové membrány jsou nepropustné pro ionty a malé hydrofilní molekuly. Voda prochází membránou bez obtíží i bez přítomnosti speciálních vodních kanálů, díky čemuž je koeficient permeability pro vodu relativně nízký (Finkelstein a 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 vysoce selektivní tak, že propouštějí vodu, ale už ne kyseliny (Agre 2006).

Propustnost membrán pro vodu je závislá na membránové fluiditě tak, že nižší membránová fluidita zmenšuje permeabilitu membrán snížením schopnosti propouštět molekuly skrz lipidovou dvojvrstvu (Lande *et al.* 1995). Membrány složené z lipidů s polynenasycenými acylovými řetězci, které se nacházejí například v mozkových

synaptosomech, jsou mnohem víc propustné pro vodu než nasycené a mononenasyčené dvojvrstvy (Huster *et al.* 1997). Propustnost membrán pro vodu také ovlivňuje zvýšená přítomnost molekul ethanolu. Ty brání vniknutí molekul vody do membrány díky své amfipatické struktuře. Díky této struktuře totiž molekuly zůstávají na kraji membrány a vodu nepropouští. To se děje z toho důvodu, že molekuly ethanolu dosahují nejnižší volné energie, pokud jsou umístěny na rozhraní mezi vodou a lipidy (Huster *et al.* 1997).

Paula *et al.* (1996) měřili závislost koeficientu permeability na tloušťce membrány u protonů, malých polárních molekul a draselných iontů. Tato měření prováděli na umělých membránách složených z fosfolipidů, jejichž acylové řetězce se lišily počtem uhlíků v rozmezí od 14 až po 24 uhlíků. Glycerol a močovina mají propustnost podobnou, avšak propustnost glycerolu je o trochu větší. Gradienty draselných iontů procházejí membránou až o osm řádů pomaleji než protonové gradienty a až o šest řádů pomaleji než gradienty močoviny nebo glycerolu. Se zvyšující se délkou řetězců klesá permeabilita draselných iontů o dva řády, zatímco permeabilita pro vodu, glycerol a močovinu se se zvyšujícím se počtem uhlíků v acylovém řetězci snižuje přibližně pětkrát (Paula *et al.* 1996).

Propustnost fosfolipidových dvojvrstev pro aminokyseliny se zvyšuje přibližně pětkrát v případě, že se počet uhlíků acylového řetězce sníží o dva uhlíky. S postupným snižováním počtu uhlíků roste i propustnost membrány. Zvyšováním povrchového napětí membrány roste propustnost pro aminokyseliny s opačným nábojem. Naopak ke snižování membránové propustnosti pro aminokyseliny dochází v případě, kdy se obsah cholesterolu zvyšuje. (Chakrabarti 1994).

### **3.5.5 Elektrická kapacita**

Pro získání základních znalostí o povaze 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 (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 značně ovlivňovány lipidovými složkami buněčné membrány a do jisté míry i obsahem proteinů (Gentet *et al.* 2000). Vytvářením dynamických změn plochy membrán na kapičkovém rozhraní rozvinuli Gross *et al.* (2011) metodu vhodnou na měření specifické membránové kapacity. Touto metodou určili, že závislost kapacity dvojvrstvy na aplikovaném potenciálu je převážně výsledkem spontánního zvětšení plochy membrány a ne dlouho předpokládaným ztenčováním lipidové dvojvrstvy. Důležitým rysem měření elektrické kapacity je schopnost monitorovat skokové změny plochy plazmatické membrány, a to buď vlivem endocytózy nebo naopak exocytózy (Neher a 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. Je důležité s tím počítat, protože u některých proteinů by mohlo docházet k potížím při zabudování do tlustějších membrán.

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

#### **3.6.1 Planární dvojvrstvy**

Planární lipidové dvojvrstvy jsou nejvhodnějšími umělými systémy na zaznamenávání i naprosto minimálních změn ve vodivosti (Winterhalter 2000). Měření iontových proudů se provádí pomocí iontových kanálů nebo pórů zabudovaných do membrány. Iontové kanály se vyznačují malou velikostí a schopností zabudovávat se do plasmatické membrány, která elektricky izoluje dva vodné kompartmenty (Kasianowicz a Bezrukov 1995) Pro tento typ experimentů je klíčové použít takový kanál, který zůstane otevřený delší dobu a nedochází u něj k samovolnému zavírání. 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 takovýchto pórotvorných toxinů je alfa-hemolysin ze *Staphylococcus aureus* (Bhakdi a Tranum-Jensen 1991).

Transmembránové napětí aplikované napříč trvale otevřeným kanálem příhodné velikosti vede molekuly některých polymerů skrz kanál. Výjimkou jsou například molekuly polyethylenglykolu, které skrz kanál vede difuze. Průchod každé molekuly je detekován přechodným poklesem iontového proudu, jehož trvání je úměrné velikosti polymeru. Díky těmto blokacím je možné popsat vlastnosti velké škály různých analytů včetně jednovláknové



RNA a DNA (Kasianowicz *et al.* 1996), polyetylen glykolu (PEG) (Merzlyak *et al.* 1999) nebo molekul sacharidů (Kullman *et al.* 2002).

Polyethylenglykol se používá k určování velikosti a geometrie biologických iontových kanálů. Pro měření proudových blokad je polyethylenglykol aplikován asymetricky pouze na jednu stranu lipidové membrány (Merzlyak *et al.* 1999). Interakce mezi polyethylenglykolem a alfa-hemolysinovým kanálem v elektrolytu s vysokou iontovou silou se využívají na zjišťování interakcí mezi polymery zachycenými v nanopórech. Pokud je analyt nepřítomný, proud napříč kanálem je stabilní a nedochází k žádným blokacím. Po přidání analytu, v tomto případě polydisperzního polyethylenglykolu, polyethylenglykol vstupuje do jednotlivých alfa-hemolysinových pórů a způsobuje dobře rozpoznatelné na hmotnosti závislé vodivostní stavy s charakteristickou dobou zdržení (Robertson *et al.* 2007). Stupeň blokace je často pro daný analyt typický, to znamená, že různé polymery způsobují odlišné vzory blokad. Tak jako hmotnostní spektroskopie tyto vzory tvoří v podstatě otisk prstu polymeru blokujícího nanopór (Robertson *et al.* 2007; Rodrigues *et al.* 2008). Tento model popisuje zároveň hloubku proudových blokad a délku doby zdržení. Zejména u blokad způsobených neelektrolytickým polyethylenglykolem dochází k poklesu 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 *et al.* 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 umělé membrány se objevují i mnohá praktická využití, například v lékařství a genové terapii.

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

Cílená doprava léčiv do buněk a orgánů pomocí speciálních nosičů má hned několik výhod. Důležitou výhodou je omezení nežádoucích účinků léků ve zdravé tkáni nebo orgánu. Další výhodou je fakt, že specifickým dopravením léčiva na místo působení se sníží nezbytná dávka léčiva potřebná pro správnou funkci v místě určení, čímž se sníží nejen pravděpodobnost potenciálních nežádoucích účinků, ale v mnohých případech i cena léčby (Goyal *et al.* 2005). Systémy na dopravu léků se skládají z nosiče, složeného nejčastěji

z lipidů nebo různých polymerů, a z asociovaných léčiv. Tyto systémy mají za cíl změnit distribuci léčiva nebo fungovat jako jeho zásobníky (Allen a Cullis 2004).

Liposomy se svojí strukturou podobají buněčným membránám a obvykle jsou tvořeny z přírodních snadno odbouratelných a netoxických lipidových molekul, díky čemuž jsou vhodnými nosiči léčiv (Lasic 1998). Léky s různorodou lipofilií jsou pohlcovány liposomy buď do fosfolipidové dvojvrstvy, do vodného objemu uvnitř liposomu nebo se váží na povrch dvojvrstvy. Na základě schopnosti liposomů interagovat s buňkami a krevními komponenty můžeme rozlišit dva hlavní typy liposomů. Jsou to neinteraktivní stéricky stabilizované liposomy a vysoce interaktivní kationtové liposomy. Tyto liposomy mohou být dále přizpůsobovány konkrétním potřebám (Sharma a Sharma 1997). Liposomy interagují s buňkami několika možnými způsoby. Jedná se o výměnu lipidů liposomu s lipidy buněčných membrán a adsorbci liposomu na buněčný povrch. Adsorbce na povrch fagocytických buněk je často následována endocytózou liposomu nebo fúzí buňky s liposomem (Lasic 1998).

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

Genová terapie pomocí liposomů má potenciál jak pro léčbu získaných, tak i zděděných chorob (Tseng a Huang 1998). Pacientovi, který trpí chorobou způsobenou známým genetickým defektem, je doručena správná kopie defektního genu do nemocné buňky nebo orgánu, přičemž liposomy brání štěpení DNA před tím, než se do buňky dostane. Doručení zprostředkovávají speciální vektory, které se podle původu dělí na vektory virové a neviróvé. Tento postup v ideálním případě vede k opravě genetického defektu a k vyléčení choroby (Miller 1998). Klíčovými body úspěšné genové terapie je rozpoznání choroby a cílové buňky nebo tkáně, dále konstrukce vhodných genových vektorů, efektivní transport a exprese v cílových buňkách (Lasic a Templeton 1996). Mezi neviróvé vektory patří takzvané kationtové liposomy. Tyto liposomy jsou vytvářeny z kladně nabitých molekul fosfolipidů v kombinaci s pomocnými neutrálními fosfolipidy. Kladně nabité liposomy se elektrostatickými silami váží na záporně nabitě úseky DNA a vznikají tak kladně nabitě komplexy. Díky celkovému kladnému náboji jsou tyto komplexy vázány a následně endocytovány negativně nabitou buněčnou membránou (Miller 1998; Karmali a Chaudhuri 2007).

### 3.6.3 Dvojvrstvy na rozhraní kapiček

#### 3.6.3.1 Nanopórové sekvenování

Sekvenování založené na nanopórech umožňuje detekci jednotlivých nukleotidů. Molekuly jednovláknové DNA a RNA mohou procházet pórotvorným proteinem, přičemž můžeme pozorovat, jaký mají efekt na iontový proud procházející skrz nanopór (Kasianowicz *et al.* 1996). V tomto uspořádání byl použit pórotvorný 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 blokaci iontového proudu vzhledem k proudu tekoucímu skrz neblokovaný pór (Branton *et al.* 2008).

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 přenosné 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.

#### 3.6.3.2 Síť kapiček ve tkáňovém inženýrství

Další způsob využití umělých fosfolipidových membrán navrhli profesor Hagan Baylely a jeho výzkumná skupina, kteří nedávno publikovali výše zmíněnou metodu, kterou se dají modelovat trojrozměrné sítě kapiček pomocí speciálně upravených 3D tiskáren (Villar *et al.* 2013).

Vzniklé sítě kapiček mohou být zapouzďeny 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 Baylely 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.

## 4 Závěr

Tato práce je přehled metod, které se v současné době používají na vytváření umělých fosfolipidových membrán. Umělé membrány se vytvářejí z izolovaných nebo syntetických lipidů, jejichž složení je snadno měnitelné a lze jej přizpůsobit potřebám výzkumu.

Umělé membrány se připravují různými metodami s ohledem na to, co na membránách chceme zkoumat a jakým způsobem budeme data zpracovávat a vyhodnocovat. Pro elektrofyziologická měření se již několik desítek let používají takzvané černé lipidové membrány. Jedná se o planární lipidové dvojvrstvy, které vznikají ve vodném prostředí. Poněkud novější metodou, která je rovněž vhodná pro elektrofyziologická měření, jsou dvojvrstvy, které vznikají na rozhraní mezi dvěma vodnými kapičkami. Dvojvrstvy na rozhraní kapiček jsou sice odolnější a stabilnější než poněkud běžnější černé lipidové membrány, ale sestavit dvojvrstvu mezi kapičkami s vloženými mikroelektrodami je na druhou stranu o něco náročnější nejen na vybavení, ale také na zručnost.

Planární dvojvrstvy na pevném podkladu jsou v porovnání s černými lipidovými membránami mnohem stabilnější a vzniklá membrána má několikrát větší plochu. Za limitaci těchto umělých membrán se dají považovat obtíže při zabudovávání transmembránových proteinů. Někdy může docházet i ke ztrátě laterální mobility, a tím ke ztrátě funkčnosti transmembránového proteinu. Toto uspořádání sice není vhodné pro elektrofyziologická měření, ale díky dobře přístupné dvojvrstvě se hodí pro zkoumání různými mikroskopickými technikami.

Liposomy se z umělých membránových systému podobají nejvíce svým uspořádáním a velikostí (v případě obřích jednolamelárních vezikulů) živým buňkám. Nejčastěji se používají ke studiu fázových přechodů, což se dá sledovat pomocí fluorescenčně značených sond. Kvůli jejich nestabilitě nejsou liposomy vhodným modelem pro elektrofyziologická měření.

Způsoby tvorby umělých fosfolipidových membrán popsané v této práci jsou jenom malým vzorkem všech různých metod, které byly vynalezeny. V současné době se pracuje jak na nových metodách, tak i na nových způsobech využití již existujících umělých systémů, například na sekvenování nové generace nebo na náhradách lidských tkání.

## 5 Literatura

- Agre, P.** (2006): The Aquaporin Water Channels. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(1), 5-13.
- Allen, T. M., Cullis, P. R.** (2004): Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science*, 303(5665), 1818-1822.
- Angelova, M. I., Dimitrov, D. S.** (1986): Liposome electroformation. *Faraday discussions of the Chemical Society*, 81, 303-311.
- Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E., Webb, W. W.** (1976): Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*, 16(9), 1055.
- 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.
- Bayley, H., Cronin, B., Heron, A., Holden, M. A., Hwang, W. L., Syeda, R., Thompson, J., Wallace, M.** (2008): Droplet interface bilayers. *Molecular bioSystems*, 4(12), 1191-1208.
- Beck, J. G., Mathieu, D., Loudet, C., Buchoux, S., Dufourc, E. J.** (2007): Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks. *Faseb Journal*, 21(8), 1714-1723.
- Bhakdi, S., Trantum-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., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X., Jovanovich, S. B., Krstic, P. S., Lindsay, S., Ling, X. S., Mastrangelo, C. H., Meller, A., Oliver, J. S., Pershin, Y. V., Ramsey, J. M., Riehn, R., Soni, G. V., Tabard-Cossa, V., Wanunu, M., Wiggin, M., 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.
- Brian, A. A., McConnell, H. M.** (1984): Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(19), 6159-6163.
- 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.
- 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.
- 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.
- De Rosa, M., Gambacorta, A., Gliozzi, A.** (1986): Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaebacterial 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.
- 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.
- Doeven, M. K., Folgering, J. H. A., Krasnikov, V., Geertsma, E. R., van den Bogaart, G., Poolman, B.** (2005): Distribution, Lateral Mobility and Function of Membrane Proteins Incorporated into Giant Unilamellar Vesicles. *Biophysical Journal*, 88(2), 1134-1142.
- Edidin, M.** (1997): Lipid microdomains in cell surface membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(4), 528-532.
- 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.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., Henson, P. M.** (1992): Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*, 148(7), 2207-2216.
- Finkelstein, A., Cass, A.** (1968): Permeability and Electrical Properties of Thin Lipid Membranes. *The Journal of General Physiology*, 52(1), 145-172.
- 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.
- Gale, A. J., Gordon, S. G.** (2001): Update on tumor cell procoagulant factors. *Acta haematologica*, 106(1-2), 25-32.
- 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.
- Girard, P., Pécréaux, J., Lenoir, G., Falson, P., Rigaud, J.-L., Bassereau, P.** (2004): A New Method for the Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles. *Biophysical Journal*, 87(1), 419-429.
- Goyal, P., Goyal, K., Kumar, S. G. V., Singh, A., Katore, O. P., Mishra, D. N.** (2005): Liposomal drug delivery systems-clinical applications. *Acta pharmaceutica*, 55(1), 1-25.
- 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.
- 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.
- Hancock, J. F.** (2006): Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(6), 456-462.
- Hartmann.** (1998): Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science*, 3(5), 170-175.

- 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.
- Holden, M. A., Needham, D., Bayley, H.** (2007): Functional Bionetworks from Nanoliter Water Droplets. *Journal of the American Chemical Society*, 129(27), 8650-8655.
- 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.
- Huster, D., Jin, A. J., Arnold, K., Gawrisch, K.** (1997): Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by <sup>17</sup>O 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.
- Chakrabarti, A. C.** (1994): Permeability of membranes to amino acids and modified amino acids: Mechanisms involved in translocation. *Amino Acids*, 6(3), 213-229.
- Ikeda, M., Kihara, A., Igarashi, Y.** (2006): Lipid Asymmetry of the Eukaryotic Plasma Membrane: Functions and Related Enzymes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(8), 1542-1546.
- Jacobson, K., Sheets, E. D., Simson, R.** (1995): Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science*, 268(5216), 1441-1442.
- Karmali, P. P., Chaudhuri, A.** (2007): Cationic liposomes as non - viral carriers of gene medicines: Resolved issues, open questions, and future promises. *Medicinal research reviews*, 27(5), 696-722.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Kullman, L., Winterhalter, M., Bezrukov, S. M.** (2002): Transport of maltodextrins through maltoporin: a single-channel study. *Biophysical Journal*, 82(2), 803-812.
- 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.** (1998): Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16(7), 307-321.
- 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., Thompson, J. R., Holden, M., Wallace, M. I.** (2013): Constructing droplet interface bilayers from the contact of aqueous droplets in oil. *Nat. Protocols*, 8(6), 1048-1057.
- 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.
- 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.
- Lingwood, D., Simons, K.** (2010): Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science*, 327(5961), 46-50.
- 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.
- McIntyre, J. C., Sleight, R. G.** (1991): Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry. *Biochemistry*, 30(51), 11819-11827.
- 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.
- McMullen, T. P. W., McElhaney, R. N.** (1996): Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1(1), 83-90.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mouritsen, O. G., Bloom, M.** (1984): Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophysical Journal*, 46(2), 141-153.
- 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.
- 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.
- Ogden, D., Stanfield, P.** Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording. *Presented at Microelectrode techniques: the Plymouth workshop handbook*.
- Ohki, S.** (1969): The Electrical Capacitance of Phospholipid Membranes. *Biophysical Journal*, 9(10), 1195-1205.
- Ourisson, G., Rohmer, M., Poralla, K.** (1987): Prokaryotic Hopanoids and other Polyterpenoid Sterol Surrogates. *Annual Review of Microbiology*, 41(1), 301-333.
- 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., De Stasio, G., d'Ubaldo, A., Gratton, E.** (1990): Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*, 57(6), 1179-1186.
- Parasassi, T., Gratton, E., Yu, W. M., Wilson, P., Levi, M.** (1997): Two-photon fluorescence microscopy of laurdan generalized polarization domains in model and natural membranes. *Biophysical Journal*, 72(6), 2413-2429.

- Paula, S., Volkov, A. G., Van Hoek, A. N., Haines, T. H., Deamer, D. W.** (1996): Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophysical Journal*, 70(1), 339-348.
- 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.
- Pomorski, T., Menon, A. K.** (2006): Lipid flippases and their biological functions. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(24), 2908-2921.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sackmann, E., Tanaka, M.** (2000): Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications. *Trends in Biotechnology*, 18(2), 58-64.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Smondjyrev, 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.
- 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, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Utsugi, T., Schroit, A. J., Connor, J., Bucana, C. D., Fidler, I. J.** (1991): Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Research*, 51(11), 3062-3066.
- van Meer, G.** (1989): Lipid Traffic in Animal Cells. *Annual Review of Cell Biology*, 5(1), 247-275.
- van Meer, G.** (2011): Dynamic Transbilayer Lipid Asymmetry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(5), 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., Lomas, M. W., Mincer, T. J., Moore, L. R., Moutin, T., Rappe, M. S., Webb, E. A.** (2009): Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature*, 458(7234), 69-72.
- Villar, G., Graham, A. D., Bayley, H.** (2013): A Tissue-Like Printed Material. *Science*, 340(6128), 48-52.
- von Heijne, G.** (2006): Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(12), 909-918.

- Wauer, T., Gerlach, H., Mantri, S., Hill, J., Bayley, H., Sapa, K. T.** (2014): Construction and Manipulation of Functional Three-Dimensional Droplet Networks. *ACS Nano*, 8(1), 771-779.
- Wenzl, P., Fringeli, M., Goette, J., Fringeli, U. P.** (1994): Supported phospholipid bilayers prepared by the "LB/vesicle method": a Fourier Transform Infrared attenuated total reflection spectroscopic study on structure and stability. *Langmuir*, 10(11), 4253-4264.
- 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.
- 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.