

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie**

Struktura bakteriální membrány - aktuální téma

Martina Sochorová

Praha, květen 2006

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Jaroslava Svobodová, CSc.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně jen s použitím citované literatury.

V Praze dne 3.5.2006

.....

Martina Sochorová

Abstrakt:

Biologické membrány jsou v současné době předmětem intenzivního studia, a to hlavně díky prokázané existenci laterální heterogenity v podobě membránových mikrodomén. První část bakalářské práce popisuje fyzikálně-chemické vlastnosti buněčné membrány. Druhá část se zaměřuje na nejnovější poznatky o membránových mikrodoménách, jak v eukaryotních buňkách, tak i v buňkách prokaryotních, o nichž je však k dispozici mnohem méně publikací. Uveden je i stručný přehled metod detekce membránových mikrodomén a závěrečná část shrnuje pozorování poukazující na účast membránových mikrodomén v jednotlivých buněčných procesech.

Obsah:

1. Úvod	5
2. Seznam zkratk	6
3. Struktura biologické membrány	8
3.1. Model tekuté mozaiky	8
3.2. Chemické složení membrán	9
3.3. Fyzikální vlastnosti membrány	11
3.3.1. Fázové přechody lipidů	12
3.3.2. Fluidita membrány	14
3.3.3. Biologický význam fyzikálního stavu membrány a jeho regulace u bakterií	15
4. Membránové mikrodomény	16
4.1. Obecná charakteristika	16
4.2. Metody studia a detekce membránových mikrodomén.....	17
4.3. Membránové mikrodomény eukaryotních buněk.....	18
4.3.1. Fyzikální a chemické vlastnosti membránových raftů	18
4.3.2. Funkce membránových raftů.....	20
4.3.3. Úloha membránových mikrodomén při vstupu patogenů do hostitelské buňky	22
4.4. Membránové mikrodomény prokaryotních buněk	25
4.4.1. Teorie vzniku membránových mikrodomén pomocí transerce	26
4.4.2. Vizualizace a lokalizace membránových mikrodomén <i>Escherichia coli</i>	28
4.4.3. Vizualizace a lokalizace membránových mikrodomén <i>Bacillus subtilis</i>	30
4.4.4. Význam a úloha membránových mikrodomén při procesu dělení bakterií	31
4.4.5. Význam FtsZ pro buňku.....	32
5. Závěr	34
6. Seznam literatury	35

1. Úvod:

Biologická membrána je nepostradatelnou součástí všech buněk. Pohled na její strukturu se postupně vyvíjel a v posledních 30 letech po objevení dynamických vlastností buněčné membrány, v podobě rychlého laterálního pohybu proteinů a lipidů, se na buněčnou membránu začalo pohlížet jako na jedinečnou dvojrozměrnou kapalinu.

Díky intenzivnímu zkoumání v posledním desetiletí se významným způsobem začala upřesňovat představa o tom, že buněčná membrána není pouze prostředím, ve kterém fungují bílkoviny, ale samotná membrána jako struktura hraje aktivní a nenahraditelnou roli v celé řadě regulací biologických funkcí. Hlavním zájmem současného zkoumání membrány je její laterální heterogenita, důsledek specifického rozložení proteinů a lipidů. V rovině membrány se vytvářejí oblasti odlišného chemického složení a též odlišných fyzikálních vlastností, nazývané membránové domény. Nejlépe prostudovaným typem membránových domén jsou lipidové rafty, neboli oblasti obohacené oproti svému okolí o cholesterol a sfingomyelin.

Existuje řada experimentálních zjištění poukazujících na přítomnost membránových domén v buněčných membránách a též na jejich význam pro buněčné funkce. Nicméně dosavadní metodické přístupy jednoznačně existenci membránových domén v živých buňkách neprokázaly. Bude proto muset být věnováno ještě mnoho úsilí, aby se tento nový aspekt struktury a funkce membrán přesně popsal a pochopil.

2. Seznam zkratek:

B. subtilis	Bacillus subtilis
BCR	receptor B-buňky
C. jejuni	Campylobacter jejuni
C. trachomatis	Chlamydia trachomatis
Cam	chloramfenikol
CH ₃	methylová skupina
CL	kardiolipin
DAPI	(4,6-diamidino-2-fenylindol)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRM	detergent-resistant membrane
E.coli	Escherichia coli
EBOV	Ebola virus
EGF	epidermální růstový faktor
Empigen BB	iontový detergent nesoucí kladný a záporný náboj
Env	obalový protein viru HIV
FM4-64	[N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)fenyl)hexatrienyl) pyridinium dibromid]
GFP	zelený fluorescenční protein
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GTP	guanosintrifosfát
HIV	lidský imunodeficitní virus
IL-2	interleukin-2
INF- γ	interferon gama
I _o	uspořádaná tekutá fáze
LT	enterotoxin
MBGV	Marburg virus
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NAO	10-N-nonyl-akridin-oranž
NBD-cholesterol	7-nitbenzo-2-oxo-1,3-diazol-4-yl-cholesterol
oriC	replikační počátek
PBP	penicilin vázající protein
PC	fosfatidylcholin
PE	fosfatidylserin
PG	fosfatidylglycerol
PL	glycerofosfolipid
PLC	fosfolipáza C
PS	fosfatidylinositol
PTS	fosfotransferázový systém
Pur	puromycin
PY-PE	2-pyrin-dekanoyl-fosfatidylethanolamin
PY-PG	2-pyrin-dekanoyl-fosfatidylglycerol
Rif	rifampicin
Ro	cyklický peptid Ro09-0198
RSV	respirační syncytiální virus
S.typhimurium	Salmonella typhimurium
SV 40	Simian virus 40
TCR	receptor T-buňky

TNF- α

T_m

T_t

UP

VS

tumor nekrotizující faktor alfa

teplota tání

teplota fázového přechodu

uroplakin

virologická synapse

3. Struktura biologické membrány

3.1. Model tekuté mozaiky

Buněčná membrána byla již od 30. let minulého století popisována jako dvojná vrstva lipidů a proteinů (Danieli a Davson, 1935; Robertson, 1959). Molekuly proteinů prostupující lipidovou dvojvrstvou a vázané v ní hydrofobními interakcemi jsou označovány jako integrální, proteiny vázané k povrchu buněčné membrány slabými elektrostatickými silami jsou nazývány periferní. Tyto proteiny lze na rozdíl od integrálních uvolnit z membrány bez poškození fosfolipidové dvojvrstvy, a to například zvýšením iontové síly či nízkou koncentrací neiontových detergentů nebo chelátů. Zmíněné prvotní modely membrány byly vytvořeny pouze na základě pozorování biologických membrán v mikroskopu, a tak zachycovaly membránu jen jako statickou strukturu.

Objevným zjištěním v popisu biomembrány byl důkaz rychlého laterálního pohybu bílkovin v okolní, tekuté – fluidní fosfolipidové matrix. Dynamika membránových komponent inspirovala autory k označení modelu membrány jako tekuté mozaiky (Singer a Nicolson, 1972).

Od 70. let byl Singer – Nicolsonův model membrány postupně v souladu s novými poznatky upřesňován o následující zjištění:

- Kromě molekul lipidů, které se mohou v rovině membrány volně pohybovat, je jejich značná část v přímém kontaktu s membránovými bílkoviny. Tyto anulární lipidy vytvářejí tzv. lipidový prstenec a jejich pohyb je omezen (Sandermann 1978).
- Mimo základní uspořádání fosfolipidů ve vodném prostředí do struktury lamelární dvojvrstvy se v membránách vyskytují i nelamelární minoritní fáze. V oblastech s vysokou koncentrací specifických lipidů (např. fosfatidylethanolaminu, fosfatidylcholinu či kardiolipinu za přítomnosti dvojmocných kationtů), může membránová dvojvrstva lokálně přecházet do hexagonální fáze či struktury invertovaných micel. Jedná se o přechodné struktury uplatňující se v transportu látek přes membránu a v membránové fúzi s jednodamelárními váčky (Noordam et al., 1981).
- Molekuly lipidů se v membráně nevyskytují nahodile, ale agregují do malých oblastí v závislosti na svých chemických či termodynamických vlastnostech. Tyto oblasti, tzv. domény, vznikají laterální fázovou separací lipidů a vytvářejí strukturně variabilní prostředí pro přítomné molekuly bílkovin (Carter a Hakomori, 1981).

3.2. Chemické složení membrán

Hlavní lipidovou složkou membrán jsou glycerofosfolipidy; tvořené molekulou sn-glycerol-3-fosfátu, esterifikovanou na uhlíkových atomech C₍₁₎ a C₍₂₎ mastnými kyselinami. Glycerofosfolipidy (PL) jsou amfipatické molekuly s nepolárními alifatickými konci mastných kyselin a s polární skupinou navázanou na zbytek kyseliny fosforečné v poloze C₍₃₎ sn-glycerolu. Polární funkční skupinou je např. ethanolamin, cholin, serin, myo-inositol, glycerol či fosfatidylglycerol. V poloze C₍₁₎ glycerolu se obvykle vyskytují nasycené mastné kyseliny s řetězcem obsahujícím 16-18 atomů uhlíku, zatímco poloha C₍₂₎ je často obsazena nenasycenými mastnými kyselinami s 16-20 atomy uhlíku. Prokaryotní buňky obsahují oproti eukaryotním buňkám poměrně nízký podíl nenasycených mastných kyselin a vzácně se v mastné kyselině vyskytuje více než jedna dvojná vazba.

V převážné většině bakterií tvoří lipidové složení membrány fosfolipidy, zejména fosfatidylethanolamin, fosfatidylglycerol, kardiolipin (difosfatidylglycerol) a O-aminokyselinové estery fosfatidylglycerolu (např. O-lysylfosfatidylglycerol). Proteiny a lipidy se obvykle pohybují v prokaryotních membránách v hmotnostním poměru 70:30. Prokaryotní membrána je charakterizována jednodušším chemickým složením než membrána eukaryotní, např. cytoplazmatická membrána *E. coli* má jedno z nejjednodušších složení membránových fosfolipidů, které se v přírodě vyskytuje. Skládá se z fosfatidylethanolaminu (PE), fosfatidylglycerolu (PG) a z kardiolipinu (CL), které obsahují pouze tři typy mastných kyselin – palmitovou, palmitoolejovou a cis-vakcenovou. V bakteriální membráně se často nacházejí větvené mastné kyseliny, které se podle polohy methylové skupiny dělí na izo serii (CH₃ – skupina je na předposledním uhlíku) a anteizo serii (CH₃ – skupina se nachází na jiném než předposledním uhlíkovém atomu řetězce); u rodu *Bacillus* mohou dosáhnout až 90 % všech mastných kyselin fosfolipidů.

V buněčných membránách eukaryot se lze setkat navíc s dalšími lipidy, zejména glykolipidy, sfingolipidy (zejména sfingomyelin) a cholesterolem. Je zde běžné zastoupení nenasycených mastných kyselin s větším počtem dvojných vazeb v poloze C₍₂₎ sn-glycerolu. Membrána eukaryotní je z hlediska chemického složení různorodější než membrána prokaryotní, což dokládá Tabulka č.1.

	Lidský erytrocyt	Lidský myelin	Mitochondrie z hovězího srdce	Escherichia coli
fosfatidová kyselina	1,5	0,5	0	0
fosfatidylcholin	19	10	39	0
fosfatidylethanolamin	18	20	27	65
fosfatidylglycerol	0	0	0	18
fosfatidylinositol	1	1	7	0
fosfatidylserin	8,5	8,5	0,5	0
kardiolipin	0	0	22,5	12
sfingomyelin	17,5	8,5	0	0
glykolipidy	10	26	0	0
cholesterol	25	26	3	0

Tabulka č.1 Hmotnostní složení lipidů v některých biomembránách (v %). Převzato z Biochemie (D.Voet a J.G. Voetová, 1995).

Z tabulky je patrné poměrně vysoké procentuální zastoupení cholesterolu, sfingomyelinu a glykolipidů v eukaryotních membránách, zatímco v prokaryotních membránách se tyto lipidy nevyskytují. Místo sterolů jsou v prokaryotních membránách přítomné sterolům podobné hopanoidy, které mají oproti cholesterolu jeden šestičlenný kruh navíc. V eukaryotních membránách je též širší spektrum fosfolipidů. Poměrně vysokým procentem je zastoupen fosfatidylcholin (PC) a fosfatidylserin (PS), naopak pro prokaryotní membrány typický fosfatidylglycerol (PG) a kardiolipin (CL) se v eukaryotních membránách téměř nevyskytuje. Fosfatidylethanolamin (PE), převažující fosfolipid v *E. coli*, se vyskytuje jak v prokaryotních, tak v eukaryotních membránách. Zřejmá je podobnost chemického složení membrány erytrocytu a myelinu (plazmatické membrány Schwannovy buňky obalující nervová vlákna), na druhé straně o prokaryotním původu mitochondrie svědčí vysoké procentuální zastoupení CL, naopak přítomnost PC a cholesterolu jsou důsledkem dlouhé evoluční koexistence mitochondrií s eukaryotní buňkou.

3.3. Fyzikální vlastnosti membrány

Ke studiu fyzikálních vlastností buněčných membrán je využíváno široké spektrum metod, umožňujících postihnout jejich strukturní a dynamické vlastnosti. Základní informace o fyzikálně-chemickém chování fosfolipidů i membránových proteinů byly získány studiem umělých membrán s chemicky definovaným složením. Mezi nejčastěji používané metody pro studium membrán umělých i buněčných patří diferenční kalorimetrie, ohyb X paprsků, viskozimetrie, rozptyl světla a protonová magnetická rezonance. Velmi používané jsou rovněž techniky fluorescenční spektroskopie, elektronová spinová rezonance a elektronová mikroskopie s mrazovým trháním či leptáním preparátu (Hubbel a McConnell, 1971).

Fosfolipidy mají díky své amfipatické povaze tendenci zaujímat ve vodném prostředí termodynamicky nejvýhodnější uspořádání, jímž je struktura micel či tvorba dvojvrstvy. V lamelární dvojvrstvě, která je základní strukturou membrány, se molekuly fosfolipidů orientují převážně do polohy kolmé k rovině membrány. Největší neuspořádanost vykazují v oblasti středu dvojvrstvy fosfolipidů, zatímco směrem k polárním skupinám fosfolipidů uspořádanost alifatických řetězců stoupá.

Membrána tvořená dvojvrstvou fosfolipidů se ve vodném prostředí vyskytuje ve dvou základních fázích:

- 1) ve fázi gel – pevná fáze; molekuly lipidů jsou vysoce uspořádané, vykonávají kmitavý pohyb, avšak laterální pohyb je omezen
- 2) ve fázi tekutý krystal – fluidní; tekutá fáze, fosfolipidy jsou méně uspořádané, kromě kmitavého pohybu vykazují i rychlý laterální pohyb

V eukaryotních membránách může v oblastech obohacených sfingomyelinem a cholesterolem vzniknout třetí fáze tzv. uspořádaná tekutá fáze I_o (liquid-ordered phase), která se vyznačuje natažením a vysokou uspořádaností řetězců mastných kyselin jako ve fázi gel, ale daleko vyšší laterální pohyblivostí fosfolipidů (Brown a London, 1998).

Některé specifické fosfolipidy (PE nebo CL s dvojmocnými kationty) vyvolávají vznik minoritních nedvojvrstevných struktur, jimiž jsou:

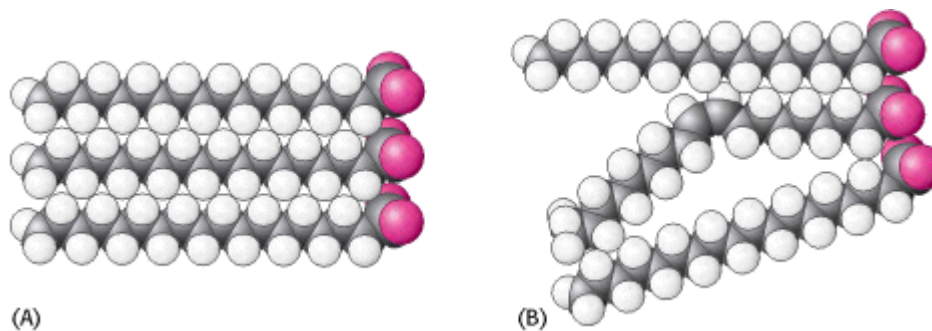
- 1) hexagonální fáze I – lipidy tvoří cylindrické útvary s hexagonálním uspořádáním fosfolipidů, jejichž polární hlavy směřují do vnějšího vodného prostředí
- 2) hexagonální fáze II – lipidy tvoří též hexagonálně uspořádané cylindrické útvary, mají však polární hlavy orientované směrem do nitra těchto útvarů, nazývaných též invertované micely a uzavírajících v sobě sloupec vody

3.3.1. Fázové přechody lipidů

Faktorem výrazně určujícím fyzikální stav membrány je teplota. Při teplotě fázového přechodu označované T_t (temperature of transition) dochází k endotermnímu fázovému přechodu fosfolipidů z fáze gel do fáze tekutý krystal. Při teplotě T_t obě fáze koexistují v rovnováze. Podstatou endotermního fázového přechodu je kooperativní změna konformace alifatických řetězců mastných kyselin. V energeticky nejchudší *trans*-konformaci leží uvažovaná C-C vazba v rovině dvou vazeb předcházejících a je rovnoběžná s první z nich. Tato *trans*-konformace může konvertovat rotací C-C vazeb o 120° na *gauche*-konformaci, zavádějící do uhlovodíkového řetězce ohyb. Pod teplotou fázového přechodu se alifatické řetězce nacházejí převážně v *trans*-konformaci v níž vykonávají kmitavý pohyb, laterální pohyb je však omezen. Zvýšením teploty nad hodnotu T_t dojde u některých řetězců ke kooperativní rotaci *trans-gauche*, a tím k přechodu lipidů do méně uspořádané fáze tekutý krystal, kde jsou molekuly lipidů charakterizovány rychlým laterálním pohybem. Transverzní difúze, přechod molekul fosfolipidů z jedné vrstvy membrány do druhé, tzv. flip-flop pomocí enzymu „flipáza“, je proces velmi pomalý jak v pevné, tak v tekuté fázi (Ortwein et al. 1994).

Teplotní šíře fázového přechodu, v němž koexistuje fáze pevná i tekutá, je dána chemickým složením membrány a vypovídá o její heterogenitě. Čím různorodější složení membrány, tím je teplotní šíře fázového přechodu větší. Teplotu T_t a šíři teplotního rozmezí fázového přechodu lze snadno stanovit např. pomocí diferenční kalorimetrie.

T_t fosfolipidů nejvýrazněji ovlivňují změny v alifatických řetězcích mastných kyselin. Nasycené stejně jako delší řetězce mastných kyselin T_t lipidů zvyšují. Naopak mastné kyseliny nenasycené, anteizo větvené či s cyklopropanovým kruhem, T_t lipidů snižují. Tyto třídy mastných kyselin, s nižší teplotou tání (T_m), narušují uspořádanost, a tak snižují možnost těsného kontaktu jednotlivých řetězců mastných kyselin mezi sebou (viz Obr.1). Narušení uspořádanosti vede ke snížení plošné hustoty membrány, a tím k větší fluiditě (tekutosti) membrány za dané teploty. V anteizo sérii mají mastné kyseliny nižší T_m než v *izo* sérii se stejným počtem atomů uhlíku, podobně *cis*-nenasycené mastné kyseliny vykazují nižší T_m než homologní *trans*-nenasycené deriváty.



Obr.1: Vliv nenasycené mastné kyseliny na uspořádání řetězců mastných kyselin v membráně. Model na obrázku ukazuje uspořádání tří molekul kyseliny stearové ($C_{18:0}$) (A); a molekulu kyseliny olejové ($C_{18:1}$ -cis konformace) mezi dvěma molekulami kyseliny stearové (B). Převzato z Biochemistry, editor: Lubert Stryer,1995.

Teplotu fázového přechodu významně ovlivňují i další komponenty membrány a lipofilní či iontové agens. Molekuly proteinů snižují pohyblivost fosfolipidů, a jsou tak rigidizujícím faktorem.

Záměna polární části fosfolipidu např. fosfatidylcholinu (PC) za fosfatidylethanolamin (PE) esterifikovaného dvěma zbytky kyseliny myristové se projeví výrazným zvýšením T_t . Polární hlava PE je tedy významným rigidizujícím faktorem (Oldfield a Chapman, 1972).

Sfingomyelin je esterifikován na amido skupině acylovým řetězcem, který je obvykle nasycený. Díky této skutečnosti způsobuje sfingomyelin, stejně jako fosfolipidy s nasycenými mastnými kyselinami, poměrně vysokou uspořádanost membrány, a tím i vysokou teplotu jejího fázového přechodu.

Cholesterol, steroid tvořený čtyřmi kondenzovanými nasycenými kruhy, se v membráně vmezeřuje do oblastí řetězců mastných kyselin. Zvyšuje T_t a rozšiřuje teplotní interval, v němž dochází k fázovému přechodu.

Lipofilní uhlovodíky, stejně jako iontové detergenty (např. aniontový sodiumdodecylsulfát SDS), interagují s biologickými membránami, a ovlivňují tak fyzikální stav membrán. U gramnegativních bakterií dochází po působení rozpouštědel k rigidizaci jejich membrán. Naopak u grampozitivní bakterie *Staphylococcus haemolyticus* byl po použití 100% toluenu či benzenu zaznamenán nárůst fluidity

(tekutosti) membrány, způsobený zvýšením obsahu anteizo větvených mastných kyselin a snížením zastoupení dlouhých nevětvených mastných kyselin (Nielson et al., 2005).

Změny pH nebo přítomnost Ca^{2+} , Mg^{2+} iontů mohou za dané konstantní teploty indukovat fázový přechod působením na polární skupiny či fosfolipidy s negativním nábojem (PG, PS, CL).

V membráně, jejíž lipidy se nacházejí ve fázi tekutý krystal, tedy v teplotách nad T_t , jsou proteiny rozmístěny v rovině membrány rovnoměrně. S poklesem teploty pod T_t přecházejí lipidy do fáze gel a proteiny vytvářejí relativně velké oblasti agregátů. Některé plochy membrány mají hladký povrch bez proteinových partikulí a jsou tvořeny vysoce uspořádanými fosfolipidy. Z těchto uspořádaných okrsků jsou proteiny vytlačovány do zbývajících okrsků tekuté fáze membrány, kde agregují. Tento princip utváření strukturně odlišných okrsků, tj. koexistence fáze gel a tekutý krystal, byl pozorovaný u *E. coli* již začátkem 70. let a je označován jako laterální fázová separace (Heast et al.1974).

3.3.2. Fluidita membrány

Pomocí fluorescenční spektroskopie nebo elektronové spinové rezonance lze sledovat fluiditu membrány, základní fyzikální vlastnost charakterizující dynamiku buněčných membrán. Fluidita (Φ) je v hydrodynamice mírou snadnosti pohybu molekul v kapalině a je převrácenou hodnotou viskozity (η). Viskozita je naopak výrazem odporu kladeného pohybu molekul v kapalině.

$$\Phi = 1/\eta$$

Viskozita je kvantitativní mírou absorpce kinetické energie, zatímco fluidita představuje nedostatek této absorpce. Fluidita membrány je nepřímo úměrná plošné hustotě (počtu molekul na jednotku plochy). Při překročení T_t dochází ke snížení plošné hustoty přechodem nasycených řetězců mastných kyselin z trans do gauche izomerní konformace, ale i inkorporací nenasycených či větvených mastných kyselin do fosfolipidů. Se snižující se plošnou hustotou dochází ke zvýšení pohyblivosti jednotlivých komponent buněčné membrány, tedy ke zvýšení fluidity membrány, respektive snížení viskozity.

3.3.3. Biologický význam fyzikálního stavu membrány a jeho regulace u bakterií

Fyzikální stav biomembrány tj. fáze, v níž se nacházejí lipidy, významně ovlivňuje aktivitu funkcí na membránu vázaných. Aby mohla membrána plnit své funkce je nezbytné, aby se nacházela celá nebo z větší části ve fázi tekutý krystal. Membrána nacházející se ve fázi gel má silně sníženou mechanickou odolnost a ztrácí funkci permeabilní bariéry a integritu (Steim, 1972).

Změnou složení fosfolipidů je v bakteriích udržován optimální stav membrány. Podle principu homeoviskózní adaptace je v bakterii *E. coli* viskozita membránových lipidů udržována na konstantní úrovni v širokém rozmezí kultivačních teplot (Sinensky, 1974).

Funkci membrány podmiňuje přítomnost fosfolipidů s nižší T_t než je teplota růstu. Proto se snižující se teplotou růstu, dochází v buněčné membráně k preferenčnímu zabudování mastných kyselin s nižší T_m .

Termoregulační mechanismy udržující vhodný fyzikální stav cytoplazmatické membrány jsou velmi významné. V *E. coli* se při poklesu teploty zvyšuje obsah nenasycené kyseliny cis-vakcenové a snižuje zastoupení nasycené kyseliny palmitové, beze změn zůstává podíl kyseliny palmitoolejové. Enzym zodpovědný za prodloužení kyseliny palmitoolejové ($C_{16}\Delta^9$) na kyselinu cis-vakcenovou ($C_{18}\Delta^{11}$) se nazývá β -ketoacyl-ACP syntetáza II; je syntetizován konstitutivně, ale jeho aktivita se mnohonásobně zvyšuje právě při snížení teploty (Garwin et al., 1980).

U rodu *Bacillus* jsou poklesem teploty indukovány dva mechanismy pro snížení T_t fosfolipidů membrány. Prvním mechanismem je syntéza de novo anteizo větvených mastných kyselin. Dochází tedy ke zvýšení poměru mezi anteizo a izo větvenými mastnými kyselinami v membráně. Tento mechanismus se uplatňuje při dlouhodobé odpovědi bakterií na chladový stres. Druhým mechanismem, zajišťujícím optimální fyzikální stav membrány bezprostředně po snížení teploty tzv. chladovém šoku, je zvýšení obsahu nenasycených mastných kyselin. Za přítomnosti kyslíku se tvorba nenasycených mastných kyselin uskutečňuje dehydrogenací řetězců mastných kyselin již zabudovaných ve fosfolipidech. Enzym zodpovědný za dehydrogenaci, tj. tvorbu cis-nenasycených mastných kyselin, je membránově vázaná desaturáza obsahující železo. Pokles teploty vede k aktivaci transkripce genu *des*. Exprese genu *des* je regulována dvojsložkovým systémem tvořeným membránově vázanou histidinovou protein-kinázou DesK a cytoplazmatickým regulačním proteinem DesR s konzervovanou aspartátovou doménou. Zvýšená uspořádanost membránových fosfolipidů při snížené teplotě stimuluje kinázovou

aktivitu DesK vedoucí k její autofosforylaci a následnému předání fosfátové skupiny na zbytek kyseliny asparagové v dimeru DesR. Navázání dvou fosforylovaných dimerů DesR-P na promotor genu *des* umožní nasednutí RNA polymerázy a zahájení transkripce. Nově syntetizovaná desaturáza zvýší procentuální zastoupení nenasycených mastných kyselin ve fosfolipidech, čímž rovněž zvýší neuspořádanost membrány, jež vede k poklesu kinázové aktivity DesK a aktivaci její fosfatázové aktivity. DesK defosforyluje DesR, který se následně odpoutá od promotoru, a tím zastaví transkripci genu *des* (Mansilla a Mendoza, 2005).

Protein-kináza DesK se skládá z membránové a cytoplazmatické domény. Membránová doména je termosenzorem reagujícím na pokles teploty. Cytoplazmatická doména, nesoucí protein-kinázovou aktivitu, je na teplotě nezávislá a bez regulace membránovou doménou vede její aktivita ke konstitutivní expresi genu *des* (Hunger et al., 2004).

L. monocytogenes, další grampozitivní bakterie, je schopna růst a množit se ve velmi nízkých teplotách. Z tohoto důvodu přežívá tento nebezpečný patogen, infikující hostitele alimentární cestou, i jako kontaminace potravin uchovávaných v lednici. V této bakterii představují větvené mastné kyseliny s lichým počtem atomů uhlíků ($C_{15:0}$; $C_{17:0}$) až 95% všech mastných kyselin ve fosfolipidech. Snížení teploty je doprovázeno zkracováním řetězců mastných kyselin a změnou syntézy větvených mastných kyselin z *izo* formy na *anteizo*. Oba tyto procesy vedou ke snížení plošné hustoty, zvýšení fluidity (tekutosti) membrány a požadovanému snížení T_f fosfolipidů. Po snížení růstové teploty byl zaznamenán hlavně nárůst *anteizo* $C_{15:0}$ mastné kyseliny (Annous et al., 1997).

4. Membránové mikrodomény

4.1. Obecná charakteristika

Membránová mikrodoména je definovaná jako oblast biomembrány, která se od okolních oblastí liší svým složením lipidů a proteinů, a tedy i svými fyzikálními vlastnostmi. První zmínka o nenáhodném rozložení lipidů a proteinů v membráně, o tzv. doménách, pochází z roku 1981, kdy byly v lidských a křeččích fibroblastech popsány velké glykoproteinové shluky nerozpustné v iontovém detergentu Empigen BB (Carter a Hakomori, 1981). Membránové mikrodomény, vykazující větší uspořádanost, tím i větší viskozitu, než zbývající oblasti membrány.

Na vytváření a stabilizaci membránových mikrodomén se výrazně podílejí integrální membránové proteiny vázající lipidy. Interakcí se specifickými anulárními fosfolipidy napomáhají shlukování fosfolipidů a dalších molekul proteinů za vzniku membránových mikrodomén. Příkladem proteinů obsahujících ve své struktuře konzervované domény pro specifickou vazbu k anulárním lipidům jsou anexiny. Tyto ve vodě rozpustné proteiny, obsahující Ca^{2+} ionty, se váží specifickou oblastí tzv. anexinovým záhybem (annexin fold) k aniontovým fosfolipidům a podílejí se na regulaci iontových kanálů (Bandorowitz-Pikula, 2000).

Cholesterol, sfingolipidy a glykolipidy se díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem významně podílejí na utváření membránových mikrodomén v eukaryotních buňkách. Membránové mikrodomény s vysokým obsahem cholesterolu a sfingomyelinu se nazývají membránové rafty. Příčinou vzniku těchto specializovaných mikrodomén je rozdílnost v uspořádanosti sfingolipidů (hlavně sfingomyelinu) a fosfolipidů, která vede k jejich separaci a k tvorbě odlišných domén. Natažené nasycené acylové řetězce sfingomyelinu se k sobě těsně přikládají, a jsou příčinou vysoké uspořádanosti a rigidity lipidových raftů. Cholesterol je dalším významným rigidizujícím prvkem membrán, podílejícím se na udržení jejich stability.

K formování lipidových domén přispívá několik mechanismů: fázová separace lipidů, bariéry tvořené proteiny či elektrostatická interakce mezi membránově asociovanými komponentami (Bandorowitz-Pikula, 2000).

Velikost membránových mikrodomén se pohybuje v rozmezí 10^{-10} – 10^{-6} m. Membránové domény tvořené pouze interakcí mezi lipidy jsou malé (do 10 nm) a nestabilní. Větší domény jsou výsledkem interakce mezi lipidy a proteinovými molekulami. Vznik a zánik buněčných domén je dynamický proces (Bandorowitz-Pikula, 2000). Některé mikrodomény existují pouze několik nanosekund, jiné přetrvávají po celý život buňky. Membránové domény hrají nezastupitelnou roli v mnoha buněčných procesech jako např. přenosu signálu, endocytóze, transcytóze či interakci patogenů s hostitelskou buňkou (Duncan et al., 2004; Clark et al., 2005; Yeagle, 2005).

4.2. Metody studia a detekce membránových mikrodomén

První experimentální důkazy o existenci lipidových domén byly získány kombinací mikroskopických technik a extrakcí membrán odolných k neiontovým detergentům. Bylo zjištěno, že rafty pozorované v mikroskopu odpovídají membránovým komplexům

odolným k solubilizaci Tritonem X-100 při teplotě 4 °C a nazývají se DRM (detergent-resistant membranes). Takto získané membránové frakce jsou obohaceny cholesterolem, sfingomyelinem, proteiny účastnícími se přenosu signálů a molekulami vázanými GPI – kotvou.

K průkazu laterální heterogenity v rozložení lipidů a proteinů, jak v modelových membránách, tak v živých buňkách, se osvědčily mikroskopické techniky. Často používanou metodou je fluorescenční mikroskopie, využívající fluorescenčně značených protilátek membránových antigenů, fúzních proteinů s GFP a lipofilních fluorescenčních sond jako např. styrylové sondy FM4-64 pro sledování nerovnoměrné distribuce fosfolipidů v membráně (Fishov a Woldringh, 1999). Další možností studia membránových domén je mikroskopické pozorování laterální difúze jednotlivé fluorescenční lipidové sondy (single molecule microscopy) (Schutz et al., 2000).

K velmi využívaným metodám patří fluorescenční spektroskopie. Ve fluorescenční spektroskopii se používají pyrimem značené fosfolipidy k průkazu heterogenní distribuce a segregace fosfatidylethanolaminu (PE) a fosfatidylglycerolu (PG) v rámci bakteriální membrány (Vanounou et al., 2003), či fluorescenční značky specifické pro kardiolipin (CL) 10-N-nonyl-akridin-oranž (NAO) pro detekci CL-bohatých domén (Kawai et al., 2004). Metoda rovnovážné anizotropie fluorescence poskytuje informace o fyzikálním stavu membrány, případně o tvorbě či rozpadu membránových domén u bakterií (Binenbaum et al., 1999).

Mezi další metody používané pro studium membránových domén patří metoda obnovené fluorescence (FRAP – fluorescence recovery after photobleaching) pro měření laterální difúze proteinů a lipidů (Salome et al., 1998) a fluorescenčně-rezonační energetický přenos (FRET – fluorescence resonance energy transfer), kterým lze určit vzdálenost mezi GPI-vázanými proteiny (Varma a Mayor, 1998).

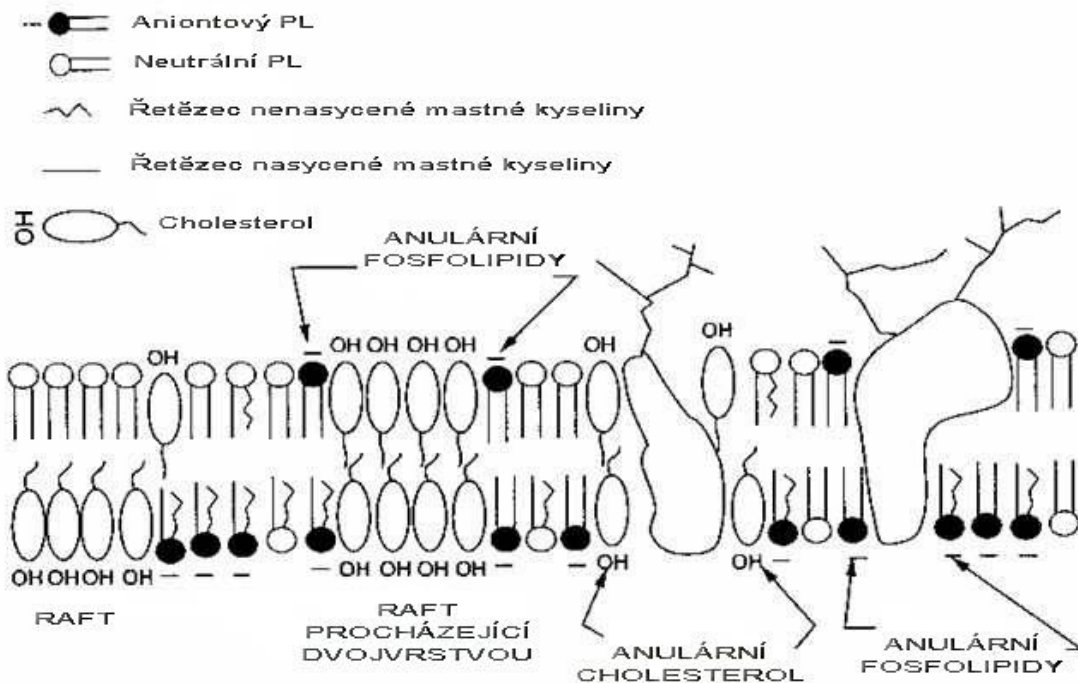
4.3. Membránové mikrodomény eukaryotních buněk

4.3.1. Fyzikální a chemické vlastnosti membránových raftů

V posledních letech nejvíce studovanými membránovými doménami v eukaryotních buňkách jsou membránové rafty, obsahující vysoké procentuální zastoupení cholesterolu a sfingomyelinu, jež určují jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Sfingomyelin má díky své volné amido a hydroxy skupině jak akceptor, tak donor vodíkových iontů pro tvorbu

vodíkových můstků. Tato vlastnost umožňuje sfingomyelinu vytvářet rozsáhlé vodíkovými můstky propojené sítě podílející se na vyšší uspořádanosti membránových oblastí obohacených sfingomyelinem.

Cholesterol se svými čtyřmi konjugovanými cykly o malé konformační flexibilitě a s hydroxylovou skupinou orientovanou do vodného prostředí zabraňuje volnému laterálnímu pohybu mastných kyselin, tím membrány rigidizuje. Tato vlastnost cholesterolu zvyšuje teplotu fázového přechodu v oblastech obohacených jak sfingomyelinem, tak i v oblastech bohatých na fosfolipidy.



Obr.2: Membránové rafty eukaryotních buněk. Anulární lipidy přímo sousedí s membránovými doménami bohatými na cholesterol či proteiny a jejich pohyb je značně omezen (Yeagle, 2005).

Membránové rafty se pravděpodobně vyskytující v I_0 fázi (vysoká uspořádanost, ale i poměrně vysoká laterální pohyblivost lipidů a proteinů) a jsou charakteristické svou nerozpustností v neiontových rozpouštědlech (lze je izolovat např. Tritonem X – 100). Za tuto vlastnost zodpovídá hlavně sfingomyelin a cholesterol. Jednotlivé membránové rafty

se liší co do složení fosfolipidů, tak i proteinů a jejich velikost se pohybuje od 50 do 300 nanometrů (Yeagle, 2005). Membránové rafty vytvářejí dva typy struktur:

1) membránové dutiny (membrane caves) - mikrodomény obsahující vysokou koncentraci signálních molekul, jako EGF receptor, TCR, BCR, IL-2 receptor, rodinu $G\alpha$ proteinů, Src rodinu tyrozinových kináz, fosfolipázu C γ a adenylát cyklázu (Yeagle, 2005). Dále obsahují mnoho proteinů vázaných GPI – kotvou a kaveoliny (proteiny o velikosti 21-25 kDa). Kaveolinem bohaté membránové rafty se nazývají kaveoly, což jsou membránové invaginace mající 50-100 nm v průměru. Kaveoly však mohou být i ploché, baňkovité, či tvořit váčky; uplatňují se v endocytóze, přenosu signálu a jsou též cílovým místem pro vstup patogenů do buňky (Duncan et al., 2002).

2) membránové bárky (membrane barges) - mikrodomény vyznačující se vyšší hustotou než ostatní membránové rafty, způsobenou vysokým zastoupením oligomerních proteinových komplexů. Např. oligomerní komplexy Gag, obalového proteinu viru HIV, asociují s membránovými barges a hrají významnou roli při sestavování HIV infekčních virionů na cytoplazmatické membráně infikovaných buněk (Lindwasser a Resh, 2001).

4.3.2. Funkce membránových raftů

Z chemického složení raftů vyplývají i rozdílné funkce, kterých se tyto rafty účastní. Jedná se hlavně o lokalizaci (sorting) proteinů, transport cholesterolu, potocytózu - endocytózu neklatrinového typu uskutečněnou pomocí kaveol, transcytózu (Yeagle, 2005).

Velmi prostudovaná je úloha membránových raftů v přenosu, zesílení či modifikaci buněčných signálů. Membránové rafty obsahují vysokou koncentraci molekul účastnících se přenosu signálu, čímž vytvářejí signalizační centra. V nejjednodušším případě jsou komponenty signalizační dráhy trvale lokalizovány do membránových raftů a navázání ligandu na receptor spouští signalizační kaskádu. Touto cestou probíhá pravděpodobně signalizace u signálních molekul vázaných GPI-kotvou. Přes připojený transmembránový adaptér je signál přenesen na tyrozinovou kinázu ze Src rodiny kináz; ta je lokalizovaná na cytoplazmové straně membrány, kde fosforyluje intracelulární signální molekuly. Komplexnější variantou předchozího mechanismu je přesun receptoru s navázaným ligandem do okolní oblasti raftu, kde dochází k následné regulaci signálu (Zajchowski a Robbins, 2002). Alternativní možností je, že se receptor po navázání ligandu přesune ven z raftu, kde interaguje s dalšími signalizačními komplexy a iniciuje jejich signální

odpověď. Příkladem tohoto signalizačního mechanismu je IL-2 receptor. IL-2 receptor α je lokalizován v membránových raftech, zatímco IL-2 receptory β a γ se nacházejí v oblastech mimo rafty. Teprve po navázání ligandu (IL-2) na IL-2 receptor α , dojde k přesunu komplexu receptor-ligandu ven z oblasti raftu a k tvorbě heteromerního trimeru IL-2 receptorových řetězců, jenž zprostředkovávají další přenos signálu (Marmor a Julius, 2001).

V některých případech se membránový receptor nachází mimo membránové rafty a teprve po navázání ligandu je do nich přesunut. Poslední možností je lokalizace receptoru též mimo membránový raft, přičemž aktivace navázáním ligandu vede k přenosu signálu na signalizační molekuly nacházející se v membránových raftech (Zajchowski a Robbins, 2002).

Membránové rafty se zřejmě také podílejí na přenosu signálu v krevních destičkách. V těchto malých buňkách, majících v průměru 2-4 μm , se v rámci odpovědi na podnět uskutečňuje translokace membránových fosfolipidů. Po stimulaci trombinem nebo kolagenem dochází k přesunu PS a PE z vnitřní do vnější monovrstvy plazmatické membrány. Díky tomuto přesunu dochází k formování protrombinázového komplexu, jenž je nezbytný v hemostatickém procesu. Pomocí fluorescenční sondy NBD-cholesterolu bylo zjištěno, že po stimulaci krevních destiček kolagenem dochází k přesunu cholesterolu z vnější do vnitřní monovrstvy plazmatické membrány, což je právě opačným směrem než PS a PE (Boesze-Battaglia et al., 1996). Otázkou zatím zůstává, jaká je spojitost mezi procesem formování membránových raftů a přesunem fosfolipidů v reakci na vnější podnět.

Dalším procesem, na jehož uskutečnění se též významně podílejí membránové rafty, je internalizace toxinů, bakterií a virů (Fivaz et al., 1999; Duncan et al., 2004; Clark et al., 2005). Mnoho komponent membránových raftů funguje jako specifické receptory pro oligomerní toxiny vytvářející póry. Jedním z hlavních toxinů gram pozitivní bakterie *Clostridium perfringens* je iota-toxin skládající se ze dvou oddělených proteinů. Iota b (Ib) je zodpovědný za navázání k povrchu buňky, na němž se sdružuje do vysokomolekulárního heptamerního komplexu. Tento heptamerní komplex vytváří propustný Na^+/K^+ pór, skrz nějž proniká iota a (Ia) do cytosolu. Ia narušuje po proniknutí do buňky svou ADP-ribozyltransferázovou aktivitou cytoskelet hostitele. Bylo prokázáno, že iota b využívá DRM mikrodomény pro tvorbu svých heptamerních komplexů a intoxikaci hostitelských buněk (Hale et al., 2004).

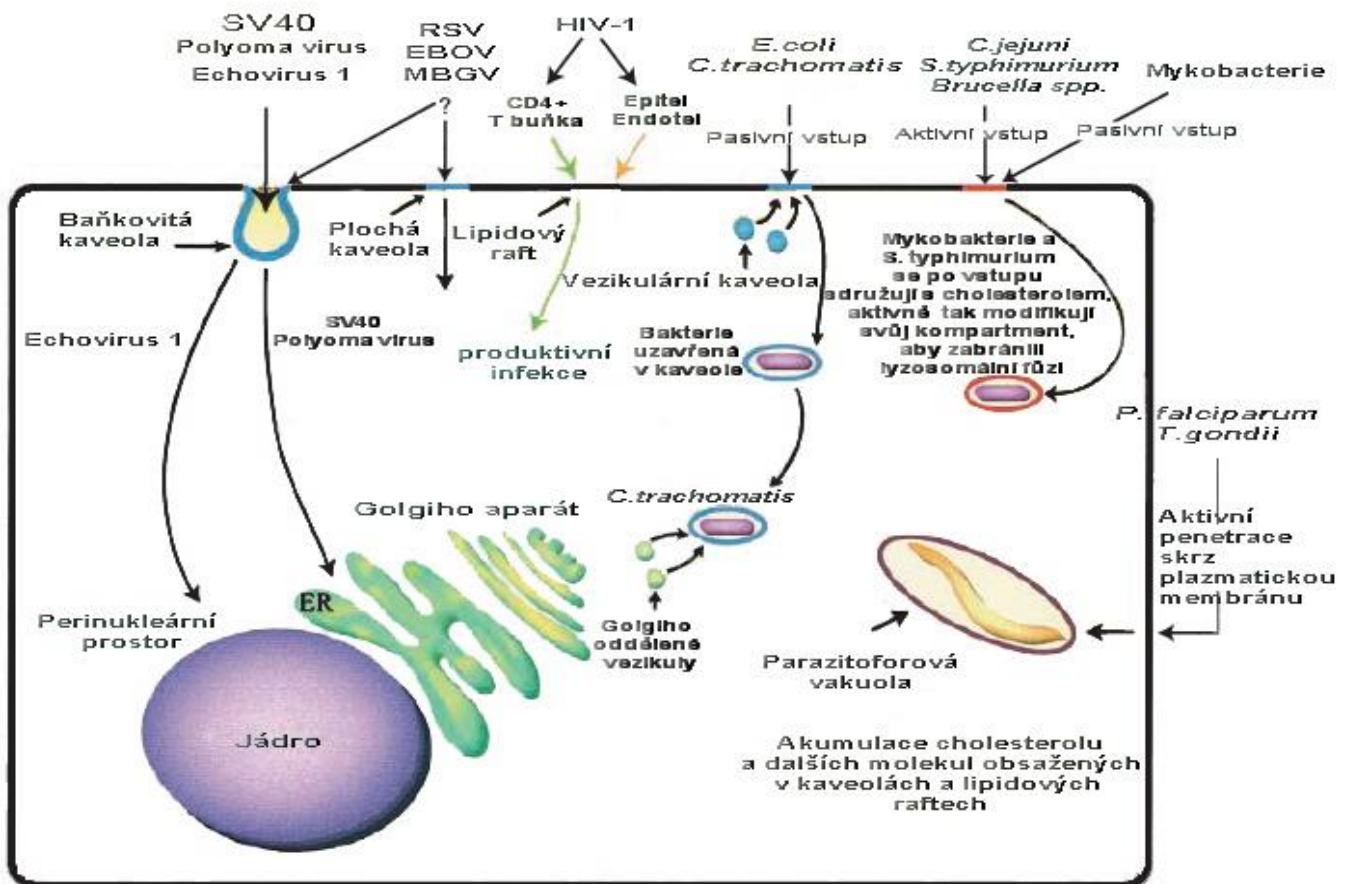
Escherichia coli produkující enterotoxin (ETEC) je častý původce cestovních průjmů a kojenecké úmrtnosti v třetím světě. ETEC produkuje váčky, obsahující teplotně labilní enterotoxin (LT), které jsou směřovány k střevním epitelálními buňkám. LT vázaný na povrch váčků se specificky váže na receptory lokalizované do lipidových raftů obohacených cholesterolem. Po navázání dojde k endocytóze celých váčků, z nichž se LT uvnitř buňky uvolní a je směřován do Golgiho aparátu nebo endoplazmatického retikula (Kesty et al., 2004).

Lipidové rafty se dále účastní proniknutí HIV-1 viru do T lymfocytu a tvorby virologických synapsí (Graham et al., 2003; Jolly a Sattentau, 2005) a napomáhají konformační změně rhodopsinu při fototransdukci u tyčinek v retině (Yeagle, 2005). Všechny tyto procesy jsou vázány na oblasti membránových domén specifických chemických a fyzikálních vlastností. V další části textu je věnována pozornost membránovým raftům usnadňujícím vstup patogena do hostitelské buňky.

4.3.3. Úloha membránových mikrodomén při vstupu patogenů do hostitelské buňky

Kaveoly spolu s lipidovými rafty jsou pro mnohé patogenní mikroorganismy velmi výhodnými vstupními místy do hostitelské buňky. Viry, bakterie i prvoci takto obcházejí endocytickou dráhu směřující k lyzozomům, a tudíž k jejich usmrcení. Výrazné obohacení kaveol a lipidových raftů o cholesterol, sfingomyelin, glykosfingolipidy, proteiny vázané GPI-kotvou a hlavně velké množství receptorů, z nichž každý je rozpoznáván jinou skupinou patogenů, vedlo k vytvoření rozdílných strategií pronikání patogenních mikroorganismů do buňky. Jak ukazuje obr.3, vstupními místy pro patogeny do buňky jsou morfologicky odlišné typy kaveol nebo lipidové rafty. Simian virus 40, Polyoma virus a Echovirus 1 využívají pro vstup do hostitelské buňky baňkovité kaveoly. Ploché kaveoly umožňují vstup Respiračnímu syncytiálnímu viru (RSV), Ebola viru (EBOV) a Marburg viru (MBGV). Ploché kaveoly spolu s vezikulárními kaveolami jsou místem pasivního vstupu některých bakterií jako např. *E. coli* a *C. trachomatis* (Duncan et. al., 2002). Přes lipidové rafty vstupuje do buněk lidský imunodeficitní virus typu 1 (HIV-1) (Graham et al., 2003). Mykobakterie stejně jako *C. jejuni*, *S. typhimurium* a *Brucella* spp. pronikají do hostitelských buněk přes lipidové rafty. Pro přežití v hostitelské buňce modulují a o cholesterol obohacují váčky, v nichž jsou uzavřeny, čímž zabrání fúzi svého obalového váčku s lyzozomem (Duncan et. al., 2002).

Parazitní organizmy jako *Toxoplasma gondii* a *Plasmodium falciparum* do hostitelské buňky pronikají aktivní penetrací, nezávisle na membránových doménách. Po svém vstupu však vytvářejí ochranný, pro přetrvání v buňce nezbytný, útvar zvaný parazitoforová vakuola, ve kterém akumulují cholesterol a též transmembránové a GPI-koťvou vázané proteiny, typické pro oblasti kaveol a lipidových raftů (Duncan et al., 2002).



Obr. 3: Model vstupu patogenů do buňky prostřednictvím kaveolů a lipidových raftů (Duncan et al., 2002).

Ze současných studií vyplývá, že lipidové rafty v buňkách střevní sliznice, jež obsahují receptorové molekuly, jsou místem umožňujícím proniknutí komenzálních bakterií *E.coli* C25 skrz jinak neprůchodnou bariéru střevního epitelu. Cytokin IFN- γ (interferon-gama) vyvolává shlukování lipidových raftů, čímž se mnoho receptorových proteinů dostane do těsné blízkosti. Toto shluknutí receptorových proteinů zahájí na raftech závislou kaskádu zatím blíže neidentifikovaných událostí, umožňující transcytózu jinak neškodných, komenzálních bakterií přes epitelovou monovrstvu a aktivaci imunitního systému na bazální straně střevního epitelu. Tím se zvýší produkce cytokinů jako TNF- α (tumor nekrotizující faktor-alfa) a INF- γ a dojde k vyvolání, či mnohonásobnému zesílení zánětu (Clark et al.,2005).

Nedávné pokusy ukázaly, že i vysoce nepropustným epitelem močového měchýře může proniknout uropatogenní *E.coli*, produkující fimbrie typu 1, které napomáhají její adhezi k buňkám epitelu močových cest. Za vysokou nepropustnost epitelu močového traktu zodpovídají lipidové rafty specifického složení spolu s molekulami proteinu uroplakinu (UP), jenž pokrývá povrch močového epitelu v podobě plaků (Duncan et al., 2004). Proniknutí *E. coli* do epiteliální buňky močového měchýře, se však paradoxně uskutečňuje také přes molekuly uroplakinu, a to UPIa, sloužícího jako receptor pro *E.coli* s fimbriemi typu 1. Dalšími složkami účastnicími se proniknutí bakterie do epiteliální buňky jsou lipidové rafty obohacené kaveolinem 1 a signální molekulou Rac1. Asociace a obalení *E.coli* lipidovými rafty s kaveolinem 1 vytváří útvar zvaný fagozóm, který umožňuje přetrvání bakterie v klidové formě v buňkách močového měchýře a může později vyvolat opakované záněty (Duncan et al., 2004).

Obzvlášť diskutovaný je vstup a následná infekce buněk virem HIV-1. Je známo, že virionová partikule viru HIV-1 pro svůj vstup do T lymfocytu využívá v lipidových raftech lokalizovanou CD4 molekulu, na kterou se váže. K fúzi viru a hostitelské membrány dojde však až poté, co jsou do lipidových raftů, obsahujících CD4 s navázaným virem, přitaženy chemokinové receptory CXCR4 nebo CCR5, a mohou tak interagovat s virovými proteiny. Odstraněním cholesterolu z lipidových raftů pomocí methyl- β -cyklodextrinu (β -CD), dojde k jejich rozrušení, a tím k zamezení vstupu viru HIV-1 do buňky a ve svém důsledku k zabránění infekce (Graham et al., 2003).

Nové studie prokázaly, že virologické synapse (VS) je efektivnější v šíření viru HIV-1 než jeho volné viriony. Virologická synapse je uskutečňována jako fúzní propojení cytoplazmatických membrán dvou T buněk. Pro efektivní propojení virem infikované (efektorové) a neinfikované (cílové) T buňky přes virologickou synapsi, je nezbytná

lokalizace Env a Gag (HIV obalových proteinů) do intaktních lipidových raftů na infikované (efektorové) buňce. Po úspěšném propojení membrán obou buněk přechází část Env a Gag proteinů do cílové neinfikované buňky, což umožňuje rychlé šíření infekce (Jolly a Sattentau, 2005).

4.4. Membránové mikrodomény prokaryotních buněk

Po mnohých pokusech poukazujících na existenci membránových mikrodomén v eukaryotních buňkách, byla přítomnost laterální heterogenity zkoumána i v buňkách prokaryotních. Během posledních let byla existence membránových domén v prokaryotních buňkách prokázána a též byla potvrzena jejich nezastupitelná role v buněčných procesech, jakými je časování DNA replikace, rozchod dceřiných chromozómů, dělení buňky (Norris a Fishov, 2001; Mileyskova a Dohan, 2005) a též sporulace (Kawai et al., 2004).

Úloha lipidů v membránových doménách je často diskutovaným tématem. Lipidy nevykazují katalytickou aktivitu, ale i přesto díky svým chemickým a fyzikálním vlastnostem a specifické interakci s preferovanými proteiny hrají nezastupitelnou roli v mnoha buněčných procesech. Fosfolipidové složení v membráně je pro daný druh bakterie charakteristické a patrně optimální. Je důležité podotknout, že buněčné procesy jsou spíše ovlivněny souhrnem chemických a fyzikálních vlastností všech přítomných fosfolipidových tříd (jako je velikost náboje či přítomnost amino skupiny), než přítomností konkrétní třídy fosfolipidu. Tento závěr vyplývá ze studií s mutanty *E. coli* neschopnými syntézy určitého fosfolipidu (např. PE). Jeho funkce byla nahrazena dodáním jiného fosfolipidu o stejných vlastnostech do media (např. CL při současném podání dvojmocných kationtů) (Dowhan et al., 2004). Bakterie obsahující zástupné fosfolipidy sice nerostou optimálním růstem, ale jsou schopné přežití a nehynou. Jak domény bohaté na PE, tak domény bohaté na CL v přítomnosti Ca^{2+} , Mg^{2+} či Sr^{2+} kationtů, zřejmě přispívají k tvorbě nedvojrstevné struktury membrány, která se uplatňuje při tvorbě dělicího septa v průběhu buněčného dělení, integraci a stabilizaci membránových proteinů a též zanořování prespory do mateřské buňky při sporulaci (Dowhan et al., 2004). Nezastupitelná úloha fosfolipidů se zřejmě uplatňuje i při správném sbalování membránových proteinů a interakci s amfitropními proteiny (nacházejí se buď volně v cytoplazmě nebo asociují s membránou) jako je FtsZ

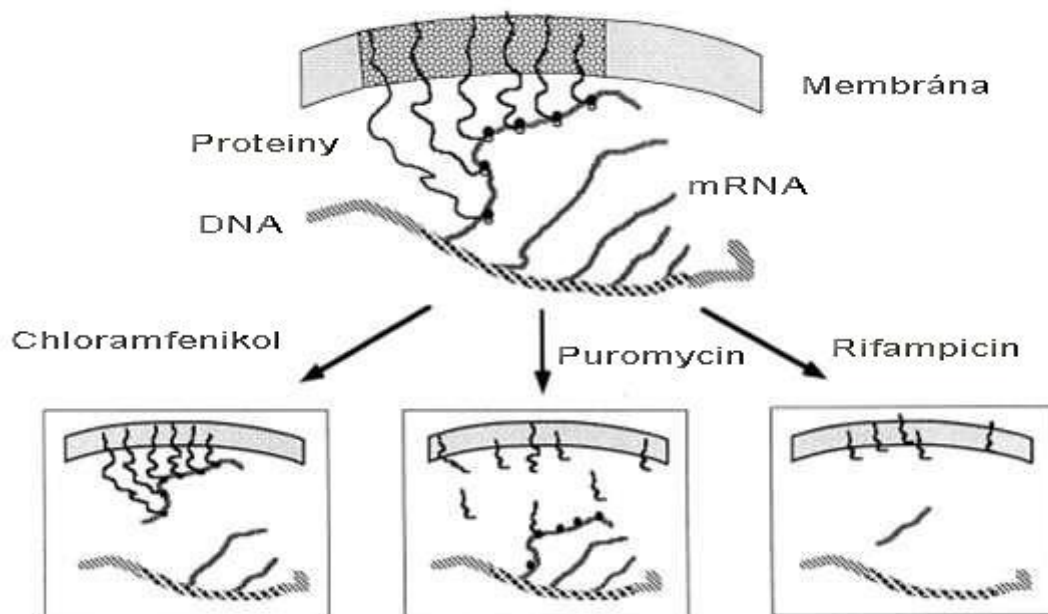
zahajující buněčné dělení, či proteiny Min systému, zabraňující tvorbě Z dělicího kruhu na pólech buňky (Dowhan et al., 2004).

4.4.1. Teorie vzniku membránových mikrodomén pomocí transerce

Transerce je spojení procesu transkripce, translace a inserce proteinů do membrány bakteriálních buněk. Díky tomuto propojení může docházet k tvorbě membránových domén a supramolekulárních komplexů. Tyto dynamické struktury zanikají v různých fázích životního cyklu buňky, a naopak jiné vznikají. Celá cytoplazmatická membrána, cytoplazma i nukleoid vytvářejí supramolekulární komplexy, tvořené propojenými geny, enzymy, lipidy a ionty, jež hrají významnou roli v buněčných procesech jako DNA replikaci či buněčném dělení (Norris a Fishov, 2001). Hlavní silou vedoucí ke vzniku supramolekulárních komplexů jsou interakce mezi proteiny a lipidy nebo interakce mezi proteiny navzájem.

Použitím antibiotik zastavujících proteosyntézu či iniciaci transkripce se zamezí procesu transerce. Membránové domény se v tomto případě nevytvoří, stávající domény se rozpadají a dojde k celkovému poklesu uspořádanosti membrány. Měřitelným výstupem těchto změn je pokles viskozity membrány, jak bylo zjištěno metodou anizotropie fluorescence (Binenbaum et al., 1999).

V citované práci byly použity tři inhibitory polymeračních procesů: chloramfenikol (Cam), který zastavuje proteosyntézu blokadí peptidyltransferázové aktivity, puromycin (Pur), jenž způsobuje předčasné uvolnění nově vznikajícího proteinového řetězce a rifampicin (Rif), který zastavuje iniciaci transkripce. Po podání všech těchto antibiotik došlo ke snížení viskozity membrány a zároveň ke kondenzaci DNA ve středu buňky. Tyto výsledky jsou ve shodě s předpokládaným transerčním modelem, díky němuž je DNA zakotvena do specifické oblasti v cytoplazmatické membráně propojením nascentní mRNA, na ní nasedlých ribozomů (tvořících polyzom) a nově vznikajících membránových proteinů. Daná membránová oblast, která je obohacena o specifický protein, jakožto produkt určitého genu, navíc přitahuje jen určité specifické fosfolipidy, které mají k danému proteinu největší afinitu. Vzniká tak membránová doména, obsahující pro ni charakteristické proteiny i fosfolipidy a vyznačující se vyšší uspořádaností a homogenitou oproti svému okolí.



Obr. 4: Zastavení proteosyntézy (Cam) či iniciace transkripce (Rif) způsobuje rozvolnění polyzómů a DNA, předčasné uvolnění nascentních proteinů (Pur) vede k oddělení polyzómů od membrány. Ve všech případech se tedy přeruší spojení mezi DNA a specifickou oblastí v membráně, které vede k rozpadu vysoce uspořádaných membránových domén, a tím k poklesu viskozity (Binenbaum et al., 1999).

Podání stejných antibiotik u *B. subtilis* vedlo k obdobným závěrům. Navíc lze u této bakterie použít další antibiotikum, a to streptolydigin (u *E. coli* neprochází vnější membránou), který zastavuje elongaci transkripce. Tím dochází k „zamrznutí“ celého procesu transkripce a i když je proteosyntéza nových membránových proteinů zastavena, DNA zůstává zakotvena k membráně prostřednictvím mRNA se „zamrzlými“ ribozomy s nascentními proteiny. Nedochozí tudíž k rozpadu vzniklých membránových domén, ani k poklesu uspořádanosti membrány, a tím snížení její viskozity. Stálé přichycení DNA k membráně zabraňuje též kondenzaci nukleoidu uprostřed buňky. Dalším důsledkem zastavení transkripce je i pokles negativního nadšroubovicového vinutí DNA, které vede k roztažení nukleoidu po celé buňce (Binenbaum et al., 1999).

Podání streptolydiginu před podáním Cam či Pur zabrání účinku těchto antibiotik. Dojde-li totiž jednou k „zamrznutí“ transkripce, daná antibiotika už nemohou způsobit oddělení polyzómů od DNA, a ani destrukci membránových domén, a tím snížení

viskozity. Podají-li se naopak Cam nebo Pur jako první, dojde k rozpadu zakotvení DNA v membráně; ani následné přidání streptolydiginu nedokáže tento stav zvrátit a znovu vytvořit rozpadlé membránové domény (Binenbaum et al., 1999).

4.4.2. Vizualizace a lokalizace membránových mikrodomén *Escherichia coli*

Pro studium laterální heterogenity v prokaryotních buňkách, tj. jejich membránových mikrodomén, lze použít fluorescenčně značené fosfolipidové sondy nebo specifické značky a pomocí fluorescenční mikroskopie či fluorescenční spektroskopie sledovat jejich inkorporaci a rozmístění v cytoplazmatické membráně bakterií.

Fosfatidylethanolamin (PE) a fosfatidylglycerol (PG) jsou majoritními membránovými fosfolipidy *E. coli*. K detekci membránových domén bylo použito značení těchto fosfolipidů pyrinem. Za použití 20% methanolu došlo k jemnému a reverzibilnímu narušení membránové struktury, což umožnilo inkorporaci fluorescenčních fosfolipidových sond PY-PE a PY-PG do membrány.

U hyperosmoticky plazmolyzovaných bakterií *E. coli* dochází k odtažení cytoplazmatické membrány od rigidního peptidoglykanu. Pomocí fluorescenční mikroskopie bylo zjištěno, že fluorescenčně značené fosfolipidy se přednostně inkorporují do cytoplazmatické membrány, která jasně svítí. Naproti tomu vnější membrána vykazuje jen malé zastoupení fluorescenčně značených sond, a proto je ve fluorescenčním mikroskopu téměř nezatelná (Vanounou et al., 2003). K podobným výsledkům dospěli i Fishov a Woldringh (1999), když značili membránu *E. coli* pomocí FM 4-64 a zaznamenali též přednostní inkorporaci této sondy do cytoplazmatické membrány v porovnání s vnější membránou. Použitím PY-PE a PY-PG sond se též zjistilo, že v membráně *E. coli* existují alespoň dvě odlišné domény. Tyto domény vznikají díky různé afinitě fosfolipidů PE a PG k membránovým proteinům. PY-PE je lokalizován v blízkosti membránových proteinů, zatímco PY-PG se nachází spíše v prostředí bez proteinů a jím vytvořené domény se svými fyzikálními vlastnostmi více podobají homogenním lipozomům. (Vanounou et al., 2003).

Mezi oběma doménami existují měřitelné rozdíly.

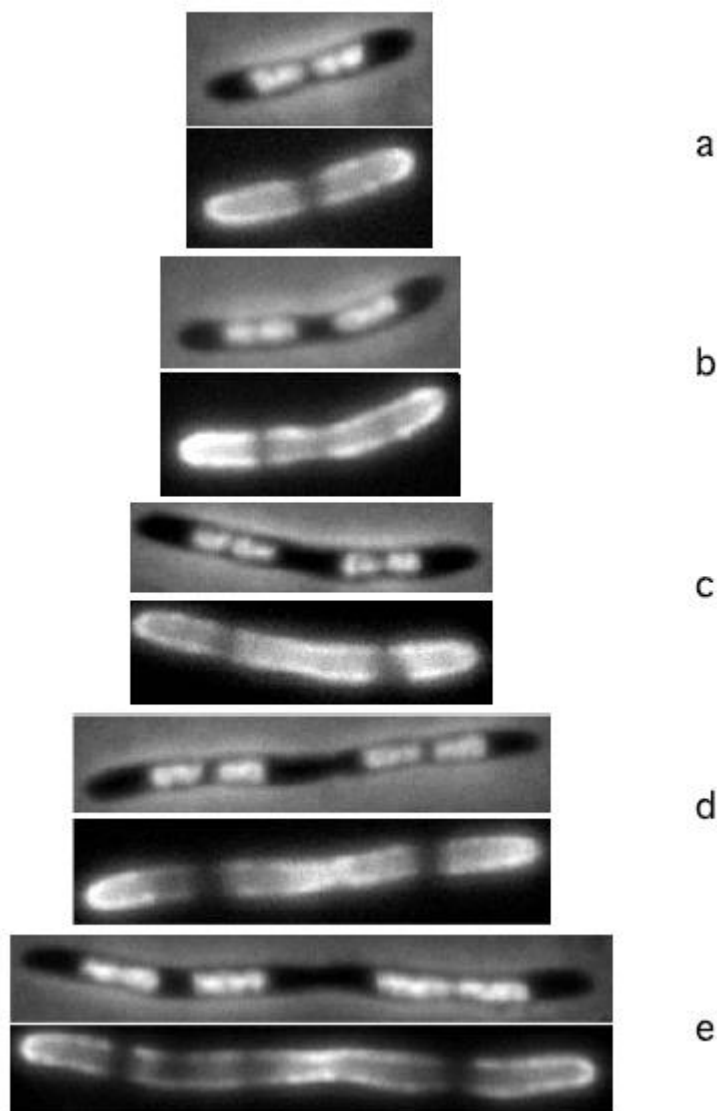
- Po excitaci fluorescenčních sond dojde k fluorescenčnímu záření monomerů i excimerů. Excimery jsou dimery stejné molekuly, vznikající jen v excitovaném stavu a emitující záření o delší vlnové délce než excitované monomery téže molekuly. Poměr intenzity fluorescence excimerů ku monomerům byl měřen

spektrofluorometrem. Doména obohacená PY-PE vykazovala dvakrát vyšší poměr fluorescence excimerů ku monomerům než doména obohacená PY-PG. Je to připisováno vyšší koncentraci PY-PE sondy v její doméně.

- Doména obohacená PY-PE též vykazuje vyšší teplotu fázového přechodu a vyšší odolnost k extrakci detergenty (např. Tritonem X – 100) než doména obohacená PY – PG. Oba tyto výsledky vypovídají o vyšší uspořádanosti domény PY – PE, která je zároveň charakterizována i vyšší viskozitou (Vanounou et al., 2003).

Po uměle navozené inhibici syntézy proteinů chloramfenikolem (inhibice transerace membránových domén) byla v membráně *E. coli* zaznamenána tvorba heteroexcimerů (excitovaných dimerů tvořených PY-PE a PY-PG sondou), která se za normálních podmínek vyskytuje v bakteriální membráně jen zřídka, a naopak je běžná u homogenních lipozomů. Tento pokus potvrzuje představu o rozpadu existujících PY – PE a PY – PG obohacených membránových domén, lišících se svým chemickým složením a též fyzikálními vlastnostmi. Postupné vytváření homogenního prostředí bylo doprovázeno rozšířením teplotního rozmezí fázového přechodu a srovnatelnou extrahovatelností detergenty pro obě pyrimem značené fosfolipidové sondy (Vanounou et al., 2003).

Další možností pro detekci membránových domén v živých buňkách *E. coli* je značení membrány pomocí fluorescenční sondy např. FM 4-64 a DNA pomocí DAPI . Stejně fluorescenční značení bylo použito i u teplotně senzitivní mutanty v PBP1b (penicilin vázající protein), která vytváří při 42 °C filamenta (Fishov a Woldringh, 1999). Distribuce fluorescenčních sond pozorovaná pomocí fluorescenční mikroskopie, jasně potvrdila předpokládané membránové domény, které vznikají interakcí DNA s membránou a napomáhají dělení buněk (Norris a Fishov, 2001). Současné značení membrány, pomocí FM 4-64, a DNA, použitím DAPI, umožnilo pozorovat vzájemně posunuté oscilace fluorescence těchto dvou sond při růstu a dělení bakterie. V místech právě probíhajícího rozchodu nukleoidů do dceřiných buněk byla membrána tmavá, což vypovídá o jiném složení fosfolipidů v této oblasti v době tvorby FtsZ dělicího kruhu. Po rozestoupení nukleoidů došlo ve filamentu k obnovení fluorescence původního místa dělení a tmavá oblast membrány se objevila v místě následujících rozchodů nukleoidů (napravo a nalevo od prvotního místa dělení viz Obr.5) (Fishov a Woldringh, 1999).



Obr.5: Fluorescenční mikroskopie filamentů teplotně senzitivní mutanty *E.coli* pbpB rostoucí při 42 °C. Současné obarvení DNA pomocí DAPI, zvýrazněno fázovým kontrastem, (horní snímky) a membrány pomocí FM 4-64 (dolní snímky) (Fishov a Woldringh, 1999).

4.4.3. Vizualizace a lokalizace membránových mikrodomén *Bacillus subtilis*

Membránové mikrodomény bohaté na PE lze dobře zviditelnit pomocí biotinylované Ro značky, která se specificky váže na PE. Kultivace s tetramethyl rhodaminem napojeným na streptavidin se projeví červenou fluorescencí v oblastech bohatých na PE. Dělicí se buňky *B. subtilis* vykazovaly největší fluorescenci, a tudíž zastoupení

membránových domén obohacených PE, v oblasti membrány septa. Ve sporulujících buňkách byly membránové domény bohaté na PE nalezeny jak v polárním septu, tak v dvojité membráně, která obklopuje do mateřské buňky se zanořující presporu (Nishibori et al., 2005). U exponenciálně rostoucích buněk byla pomocí NAO, fluorescenční barvy specifické pro CL, prokázána shodná lokalizace CL jako PE, a to v membráně septa; navíc se CL vyskytuje i v oblastech buněčných pólů. Sporulující buňky *B.subtilis* vykazují shodnou přítomnost CL s PE jak v polárním septu, tak v obou membránách prespory. CL bohaté domény se zřejmě samy významně podílejí na úspěšném průběhu procesu sporulace (Kawai et al., 2004). Je pozoruhodné, že v *E.coli*, kde PE tvoří 70% všech fosfolipidů, žádné PE bohaté domény objeveny nebyly a distribuce tohoto fosfolipidu je víceméně rovnoměrná (Nishibori et al., 2005). Syntázy fosfolipidů pro PE a CL (fosfatidylserinsyntázy, kardiolipinsyntázy a fosfatidylglycerolfosfátsyntázy) a též většina ostatních syntáz lipidů se nachází v membráně septa. Nově syntetizované fosfolipidy prostupují laterální difúzí do ostatních částí membrány (Nishibori et al., 2005). Pro PE a CL existuje zřejmě určitý mechanismus zadržující je v membráně septa.

4.4.4. Význam a úloha membránových mikrodomén při procesu dělení bakterií

Dříve přijímanou domněnkou, že v prokaryotické buňce neexistuje cytoskeletální systém, recentní publikace popírají. V bakteriích byla prokázána přítomnost proteinů podobných aktinu a tubulinu. Jedná se o proteiny účastné v procesu jaderného a buněčného dělení. Například tubulinu podobný bakteriální protein FtsZ, jehož GTPázová aktivita je spojena s jeho polymerací, se podílí na vytváření příčné přepážky při dělení mateřské buňky. FtsZ působí v součinnosti s řadou dalších proteinů, integrovaných či asociovaných s membránou, a vznik příčné přepážky je výsledkem dílčích kroků přesné chronologie (Norris a Fishov, 2001).

Podle Norrisa a Fishova (2001) lze hypotézu tvorby a funkce membránových domén, účastnících se dělení bakteriální buňky, shrnout do pěti bodů:

- 1) Proteinlipidové membrány jsou tvořeny transerací (spojená transkripce, translace a inserce) a vzájemnou afinitou proteinů ke specifickým lipidům.
- 2) Kolem tvořících se dceřiných nukleoidů vznikají proteinlipidové domény, do kterých se váže FtsZ. Podle jedné představy jsou kolem obou dceřiných nukleoidů shodné

membránové domény. Uprostřed nich je septální doména, odlišného proteinlipidového složení, na kterou se váže FtsZ. Alternativní možností je předpoklad, že kolem každého nukleoidu je membránová doména jiného složení proteinů a lipidů. Jejich rozhraní interaguje s hydrofobní částí proteinových molekul jako například s FtsZ a napomáhá ke změně jejich konformace a polymeraci. Tím dochází k formování FtsZ proteinového kruhu kolem bakteriální nukleoidové DNA.

3) Bakteriální membrána stejně jako cytoplazma jsou tvořeny různorodými supramolekulárními komplexy, které se seskupují a zase rozcházejí podle aktuálních požadavků buňky. Toto seskupování a rozchod jednotlivých složek supramolekulárních komplexů (jimiž jsou geny, mRNA, proteiny a membránové lipidy) je uskutečňováno pomocí změn afinit těchto složek k sobě navzájem.

4) V nedělící se buňce je FtsZ asociován s glykolytickými enzymy za tvorby glykolytického supramolekulárního komplexu. Během buněčného dělení dochází k rozpadu tohoto glykolytického supramolekulárního komplexu a uvolnění FtsZ, který se může vázat na rozhraní mezi proteolipidovými doménami, obklopujícími rozcházející se chromozomy.

5) Dělení je dokončeno vytvořením dělicího supramolekulárního komplexu, jehož seskupení je ovlivněno dynamikou jiných supramolekulárních komplexů. Klíčovým krokem je vytvoření rozhraní mezi proteolipidovými membránovými doménami kolem dceřiných nukleoidů a atrakce FtsZ k tomuto rozhraní. Toto rozhraní též přitáhne další DNA vazebné proteiny a dochází tak k vytvoření dělicího supramolekulárního komplexu, který umožní, že geny pro proteiny účastníci se dělení a geny zodpovědné za syntézu peptidoglykanu (mureinu) se dostanou do těsné blízkosti a při dělení buňky jsou tak jejich produkty dopraveny na správné místo ve správný čas.

4.4.5. Význam FtsZ pro buňku

FtsZ má význam pro buňku nejen během jejího dělení, ale i v ostatních fázích buněčného cyklu bakterie. Předpokládalo se, že po většinu buněčného cyklu, kdy nedochází k dělení buňky, se FtsZ vyskytuje jako neaktivní monomer v cytoplasmě. Postupně se však prosazuje spíše domněnka, že FtsZ tvoří protofilamenta, která procházejí

přes celou buňku a pomáhají udržovat její stabilitu. Dále se předpokládá, že stejně jako v eukaryotní buňce, kde jsou glykolytické enzymy asociovány s tubulinem, asociuje FtsZ s transportéry PTS (fosfotrasferázový systém). Vytváří se PTS-glykolytický supramolekulární komplex, který se však bez přítomnosti substrátu (cukru) zase brzy rozpadá. FtsZ napomáhá udržení stability tohoto supramolekulárního komplexu, i při fluktuaci dostupnosti substrátu. Při replikaci DNA se PTS – glykolytický supramolekulární komplex rozpadá, FtsZ se uvolní a může se pak uplatnit v dělení buňky (Norris a Fishov, 2001).

Pokusy z poslední doby naznačují význam lipidových domén obohacených o CL pro správnou lokalizaci dělicího Z-kruhu, tvořeného FtsZ a dalšími proteiny, doprostřed mateřské buňky. Lipidové domény bohaté na CL, aniontový fosfolipid, se vyskytují na pólech buňky a též v centrální doméně uprostřed buňky (Kawai et al., 2004). V obou svých lokalitách se účastní navázání amfitropních proteinů k membráně. Amfitropní proteiny se nacházejí jak v cytoplazmě, tak v cytoplazmatické membráně, a jejich funkce je závislá a regulovaná membránovými lipidy (hlavně záporně nabitými). Na pólech se s CL váží proteiny Min systému, které chrání póly před chybným navázáním FtsZ do těchto míst. Domény s vysokým obsahem CL, které se nacházejí uprostřed buňky, k sobě nejprve váží amfitropní protein DnaA, jenž s navázaným ATP umožní rozestoupení dvojřetězce DNA v místě *oriC* a zahájení replikace. Postupující replikací jsou nová *oriC* vznikajících dceřiných nukleoidů oddálena k pólům a replizomy už nezakrývají kardiolipinové domény nacházející se uprostřed buňky. Na odkrytý CL centrální domény se váže FtsZ, který zahájí buněčné dělení (Mileykovskaya a Dohan, 2005).

Bylo zjištěno, že syntázy CL a PE se nacházejí v membráně septa a dělicí kruh FtsZ proteinu se podílí na lokalizaci jejich syntáz (fosfatidylserinsyntázy, kardiolipinsyntázy a fosfatidylglycerolfosfátsyntázy) do septální membrány. CL i PE jsou pak zadrženy v membráně septa, kde napomáhají buněčnému dělení a sporulaci (Nishibori et al., 2005; Kawai et al., 2004).

5. Závěr:

Objevením laterální heterogenity, tj. membránových mikrodomén v buněčných membránách, se otevřel úplně nový pohled na buněčné membrány. Membránové domény začaly být sledovány z hlediska jejich komplexního strukturního a funkčního uplatnění v rámci buněčných procesů během životního cyklu jak eukaryotních, tak prokaryotních buněk.

Díky četným pokusům provedeným v posledních letech se podařilo objevit mnohé funkce v eukaryotních buňkách, jež jsou na membránové domény přímo vázány jako např. přenos buněčných signálů, endocytóza, transcytóza, lokalizace proteinů. A v neposlední řadě se membránové domény též velmi významně podílejí na vstupu toxinů, bakterií a virů do hostitelských buněk. Podrobnější a ucelenější pochopení významu membránových domén pro eukaryotní buňku je předpokladem pro větší porozumění rychlého šíření nebezpečných patogenů a efektivnější prevenci a léčbu infekcí.

Mnohem méně prací bylo věnováno biologicky též velmi významnému fenoménu laterální heterogenity v prokaryotních membránách. Nicméně dosavadní pokusy jasně poukazují na nezastupitelnou roli membránových mikrodomén pro existenci prokaryotních buněk, jelikož se podílejí na tak nepostradatelných procesech jako je DNA replikace či buněčné dělení.

Vystavení bakteriálních buněk stresovým podmínkám je dobrým nástrojem pro studium vzniku a rozrušení membránových mikrodomén. Stresovými podmínkami může být např. podání antibiotik zastavujících proteosyntézu či transkripci nebo chladový a osmotický šok, jež mají též inhibiční účinek na probíhající proteosyntézu.

Budoucí diplomová práce by se měla podrobněji zabývat právě studiem prokaryotních membrán vystavených stresovým faktorům. Pomocí fluorescenční spektroskopie, separačních a analytických metod by mohly být odhaleny nové poznatky o funkci membránových mikrodomén a hlavně o jejich chování při chladovém či osmotickém stresu.

6. Seznam literatury:

1. Annous, B.A., Becker, L.A., Bayles, D.O., Labeda, D.P., Wilkinson, B.J. (1997): Critical role of anteiso-C_{15:0} fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3887-3894.
2. Bandorowicz-Pikula, J. (2000): Lipid-binding proteins as stabilizers of membrane microdomains-possible physiological significance. *Acta Biochimica Polonica* 47: 553-564.
3. Binenbaum, Z., Parola, A.H., Zaritsky, A., Fishov, I. (1999): Transcription- and translation-dependent changes in membrane dynamics in bacteria: testing the transertion model for domain formation. *Mol. Microbiol.* 32: 1173-1182.
4. Boesze-Battaglia, K., Clayton, S.T., Schimmel, R.J. (1996): Cholesterol redistribution within human platelet plasma membrane: evidence for a stimulus-dependent event. *Biochemistry* 35: 6664-6673.
5. Brown, D.A., London, E. (1998). Citováno podle Yeagle, P.L. (2005): *The Structure of Biological Membranes, Second Edition.* CRC Press.
6. Carter, W.G., Hakomori, S. (1981): A new cell surface, detergent-insoluble glycoprotein matrix of human and hamster fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 256: 6953-6960.
7. Clark, E. et al. (2005). Citováno podle Boyle, E.C., Finlay, B.B. (2005): Leaky guts and lipid rafts. *TRENDS in Microbiology* 13: 560-563.
8. Danieli, J.F., Davson, H. (1935). Citováno podle Yeagle, P.L. (2005): *The Structure of Biological Membranes, Second Edition.* CRC Press.
9. Dowhan, W., Mileykovskaya, E., Bogdanov, M. (2004): Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. *Biochim. Biophys. Acta* 1666: 19-39.
10. Duncan, M.J., Li, G., Shin, J., Carson, J.L., Abraham, S.N. (2004): Bacterial penetration of bladder epithelium through lipid rafts. *J.Biol.Chem.* 279: 18944-18951.
11. Duncan, M.J., Shin, J., Abraham, S.N. (2002): Microbial entry through caveolae: variations on a theme. *Cellular Microbiology* 4: 783-791.
12. Fishov, I., Woldringh, C.L. (1999): Visualization of membrane domains in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 32: 1166-1172.
13. Fivaz, M., Abrahami, L., van der Goot, F.G. (1999): Landing on lipid rafts. *Trends Cell. Biol.* 9: 212-213.

14. Garwin, J.L., Klages, A.L., Cronan, J.E. (1980): β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 255: 3263-3265.
15. Graham et al. (2003). Citováno podle Nguyen, D.H., Taub, D.D. (2004): Targeting lipids to prevent HIV infection. Molecular interventions 4: 318-320.
16. Hale, M.L., Marvaud, J.Ch., Popoff, M.R., Stiles, B.G. (2004): Detergent-resistant membrane microdomains facilitate Ib oligomer formation and biological activity of *Clostridium perfringens* iota-toxin. Infect. Immun. 72: 2186-2193.
17. Heast et al. (1974). Citováno podle Svobodová, J. (1987): Regulace membránové fluidity bakterií. Biologické listy 52: 91-108.
18. Hubbel a McConnell (1971). Citováno podle Svobodová, J. (1987): Regulace membránové fluidity bakterií. Biologické listy 52: 91-108.
19. Hunger, K., Beckering, C.L., Marahiel, M.A. (2004): Genetic evidence for the temperature-sensing ability of the membrane domain of the *Bacillus subtilis* histidine kinase DesK. FEMS Microbiology Letters 230: 41-46.
20. Jolly, C., Sattentau, Q.J. (2005): Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity. J. Virol. 79: 12088-12094.
21. Kawai, F., Shoda, M., Harashima, R., Sadaie, Y., Hara, H., Matsumoto, K. (2004): Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* marburg membranes. J. Bacteriol. 186: 1475-1483.
22. Kesty, N.C., Mason, K.M., Reedy, M., Miller, S.E., Kuehn, M.J. (2004): Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. The EMBO Journal 23: 4538-4549.
23. Lindwasser, O.W., Resh, M.D. (2001): Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. J. Virol. 75: 7913-7924.
24. Mansilla, M.C., de Mendoza, D. (2005): The *Bacillus subtilis* desaturase: model to understand phospholipid modification and temperature sensing. Arch. Microbiol. 183: 229-235.
25. Marmor, M.D., Julius, M. (2001): Role for lipid rafts regulating interleukin-2 receptor signaling. Blood 98: 1489-1497.
26. Mileykovskaya, E., Dowhan, W. (2005): Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. Curr. Opin. Microbiol. 8: 135-142.
27. Nielson, L.E., Kadavy, D.R., Rajagopal, S., Drijber, R., Nickerson, K.W. (2005): Survey of extreme solvent tolerance in gram-positive cocci: Membrane fatty acid

- changes in *Staphylococcus haemolyticus* grown in toluene. Appl. Environ. Microbiol. 71: 5171-5176.
28. Nishibori, A., Kusaka, J., Hara, H., Umeda, M., Matsumoto, K. (2005): Phosphatidylethanolamine domains and localization of phospholipid synthases in *Bacillus subtilis* membranes. J. Bacteriol. 187: 2163-2174.
 29. Noordam, P.C., Verkleij, A.J., de Kruijff, B., van Echteld, C.J., Gerritsen, W.J., Mombers, C., Leunissen-Bijvelt, J., de Grier, J. (1981): Lipid particles. Acta. Histochem. Suppl. 23: 145-149.
 30. Norris, V., Fishov, I. (2001): Division in bacteria is determined by hyperstructure dynamics and membrane domains. Journal of Biological Physics and Chemistry 1: 29-37.
 31. Oldfield, E., Chapman, D. (1972): Dynamics of lipids in membranes: Heterogeneity and the role of cholesterol. FEBS Lett. 23: 285-297.
 32. Ortwein, R., Oslender-Kohnen, A., Deuticke, B. (1994): Band 3, the anion exchanger of the erythrocyte membrane, is also a flippase. Biochim. Biophys. Acta. 1191: 317-23.
 33. Robertson (1959). Citováno podle Svobodová, J. (1987): Regulace membránové fluidity bakterií. Biologické listy 52: 91-108.
 34. Salome, L., Cazeils, J.L., Lopez, A., Tocanne, J.F. (1998): Characterization of membrane domains by FRAP experiments at variable observation areas. Eur. Biophys. J. 27: 391-402.
 35. Sandermann (1978). Citováno podle Svobodová, J. (1987): Regulace membránové fluidity bakterií. Biologické listy 52: 91-108.
 36. Schutz, G.J., Kada, G., Pastushenko, V., Schindler, H. (2000): Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. EMBO J. 19: 892-901.
 37. Sinensky, M. (1974): Homeoviscous adaptation-a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. 71: 522-525.
 38. Singer, S.J., Nicolson, G.L. (1972). Citováno podle Yeagle, P.L. (2005): The Structure of Biological Membranes, Second Edition. CRC Press.
 39. Steim (1972). Citováno podle Svobodová, J. (1987): Regulace membránové fluidity bakterií. Biologické listy 52: 91-108.

40. Vanounou, S., Parola, A.H., Fishov, I. (2003): Phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol are segregated into domains in bacterial membrane. A study with pyrene-labelled phospholipids. *Mol.Microbiol.* 49: 1067-1079.
41. Varma, R., Mayor, S. (1998): GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature.* 394: 798-801.
42. Voet, D., Voetova, J.G. (1995): *Biochemie*, Victoria publishing, Praha.
43. Yeagle, P.L. (2005): *The Structure of Biological Membranes*, Second Edition. CRC Press.
44. Zajchowski, L.D., Robbins, S.M. (2002): Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signaling in membrane microdomains. *Eur. J. Biochem.* 269: 737-752.