

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie

Studijní obor: D-MIKR



Mgr. Dominik Pinkas

Protektivní efekt kardiolipinu v membráně a další molekulární detaily mechanismu účinku
surfaktinu.

Disertační práce

Vedoucí práce/Školitel:
RNDr. Gabriela Mikušová, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

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

Děkuji zejména své školitelce RNDr. Gabriele Mikušové Ph.D. za odbornou i morální podporu při vypracování této práce i akademické práci obecně.

Děkuji doc. RNDr. Radovanu Fišerovi Ph.D. a doc. RNDr. Ivo Konopáskovi CSc. za nesčetné rady, pomoc a konzultace.

Děkuji Lucii Jánské za neocenitelnou pomoc při realizaci experimentů.

Děkuji celému kolektivu laboratoře fyziologie bakterií i všem ostatním, kteří pomohli se získáním, zpracováním a interpretací dat.

Děkuji své rodině za podporu a trpělivost.

Práce byla vypracována za finanční podpory projektu GA UK č. 536217.

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíle práce	3
3 Literární přehled.....	4
3.1 Mechanismy resistance proti antibiotikům.....	4
3.2 Struktura a funkce bakteriální membrány	6
3.3 Antimikrobiální látky cílící na cytoplazmatickou membránu	8
3.3.1 Eukaryotní ribozomálně produkované membránově aktivní peptidy.....	9
3.3.2 Bakteriální ribozomálně produkované membránově aktivní peptidy.....	12
3.3.3 Neribozomálně produkované membránově aktivní antimikrobiální látky.....	14
3.3.4 Syntetické analogy pórotvorných antibiotik	18
3.4 Surfaktin.....	20
3.4.1 Struktura a vlastnosti surfaktinu.....	20
3.4.2 Interakce surfaktinu s cílovou membránou	21
4 Materiál a metody.....	24
4.1 Bakteriální kmeny.....	24
4.2 Sterilizace.....	24
4.3 Kultivace bakteriálních kultur	24
4.4 Izolace cytoplazmatických membrán	26
4.5 Izolace lipidů	27
4.6 Měření vodivosti planárních membrán	28
4.7 Únik fluorescenční sondy z lipozómů	31
4.7.1 Příprava suspenze lipozómů	32
4.7.2 Stanovení koncentrace fosfátu v suspenzi lipozómů.....	32

4.7.3 Měření kinetiky lyze lipozomů	33
4.7.4 Analýza kinetik lyze lipozomů prokládáním funkcí	33
4.9 Měření permeabilizace buněk pomocí propidium jodidu	35
4.10 Elektronová mikroskopie	35
4.11 Stanovení CMC pomocí fluorescence NPN	36
4.12 Stanovení CMC pomocí konduktivity	37
4.13 Stanovení CMC pomocí kapilární zónové elektroforézy	37
4.14 Stanovení koncentrace surfaktinu pomocí LC-MS	38
4.15 Simulace molekulární dynamiky	38
5 Výsledky.....	40
5.1 Vliv použití DMSO jako rozpouštědla v zásobních roztocích surfaktinu	40
5.2 Vliv DMSO na účinnost dalších póroutvorných látek	41
5.3 Kritická micelární koncentrace surfaktinu	43
5.3.1 Fluorescence sondy NPN	43
5.3.2 Měření vodivosti roztoku	45
5.3.3 Mobilita sondy NEDA v kapilární elektroforéze	46
5.3.4 Simulace molekulární dynamiky	46
5.4 Lyze lipozomů připravených z lipidových extraktů kmenů SF+ a SF-	47
5.5 Lyze lipozomů ze směsi syntetických lipidů napodobujících extrakty SF+ a SF-	48
5.6 Lipozomy ze směsi syntetických lipidů napodobující extrakty kmene SF- adaptovaných na různé koncentrace SF	49
5.7 Vliv obsahu kardiolipinu na lyzi lipozomů vyvolanou surfaktinem	51
5.8 Lyze lipozomů připravených z lipidových extraktů s různým obsahem kardiolipinu	52
5.9 Analýza křivek kinetik lyze lipozomů	53
5.10 Komparativní analýza kinetik lyze lipozomů	55
5.11 Permeabilizace živých bakterií.....	56

5.12 Záchyt SF v membráně živých bakterií	58
5.13 Měření vodivosti jednotlivých transmembránových kanálů	58
5.14 Vizualizace pórů surfaktinu v membráně pomocí elektronové mikroskopie.....	61
6 Diskuse.....	63
7 Závěr	73
8 Přehled publikací	74
8.1 Publikace související s tématem disertační práce	74
8.2 Ostatní publikační aktivita	75
9 Seznam literatury	79

Abstrakt

Surfaktin, cyklický lipoheptapeptid produkovaný *B. subtilis* je povrchově aktivní látka schopná narušovat bariérovou funkci membrány. Se stoupající koncentrací postupně membránu dezorganizuje, tvoří v ní vodivé póry, a nakonec ji kompletně zničí detergentním mechanismem. Detaily mechanismu tohoto účinku nejsou zatím uspokojivě objasněny stejně tak jako není známý mechanismus, kterým se producent brání proti vlastnímu toxickému produktu. Předchozí výzkum naší skupiny ukázal, že *B. subtilis* po vystavení surfaktinu mění lipidické složení své membrány, zejména zvyšuje koncentraci kardiolipinu na úkor koncentrace fosfatidylglycerolu. V rámci tohoto projektu jsme prokázali, že remodelace lipidického složení membrány snižuje náchylnost k permeabilizaci surfaktinem. Nejvýraznější efekt má zvýšená koncentrace kardiolipinu, která vede k nižší účinnosti permeabilizace modelové membrány lipozómů připravené jak ze syntetických lipidů, tak lipidů izolovaných přímo z kultury producenta. Tento efekt je úměrný podílu kardiolipinu v membráně. Test permeabilizace membrány měřený vstupem sondy propidium jodid navíc ukázal, že mutantní kmen *B. subtilis* neschopný produkce kardiolipinu byl výrazně náchylnější k permeabilizaci surfaktinem přes to, že se nepodařilo prokázat změny v množství surfaktinu vázaného do membrán. Mimo to jsme popsali zásadní vliv použitého zásobního roztoku na *in vitro* aktivitu surfaktinu a pokusili se pozorované rozdíly vysvětlit srovnáním micelizaci surfaktinu v použitých rozpouštědlech. Podařilo se nám také vizualizovat předpokládané póry tvořené surfaktinem v membránách lipozómů pomocí elektronové mikroskopie. Na základě těchto zjištění můžeme tvrdit, že změna lipidového složení membrány je významnou částí tolerance *B. subtilis* na vlastní toxický produkt surfaktin.

Abstract

Surfactin is a cyclic lipopeptide produced by *B. subtilis*. It is a surface-active compound capable of interfering with the barrier function of the cytoplasmic membrane. With increasing concentration, it can disorganize the membrane, form conductive pores and eventually disintegrate the membrane in a detergent-like manner. The details of this mode of action are not well understood, nor is the mechanism by which the producer defends itself against its own toxic product. We have previously shown that *B. subtilis*, when exposed to surfactin, changes the lipid composition of its membranes, mainly increasing the amount of cardiolipin at the expense of phosphatidylglycerol. In this work, we have shown that the increase in cardiolipin content leads to a reduced susceptibility to permeabilization by surfactin in a concentration-dependent manner. This applies for membranes composed of synthetic phospholipids, membranes reconstituted from lipid isolates, and even living cells, as demonstrated by the propidium iodide test performed on *B. subtilis* cells deficient in cardiolipin production. However, we have not yet been able to prove whether this protective effect is at the level of surfactin insertion into the membrane or its action once inside the membrane. Besides that, we found that the stock solution used had a disproportionate effect on the effectiveness of surfactin, which we explained by differences in micellization behavior. In addition, we were able to visualize surfactin pores using electron microscopy. Based on the above, we conclude that target site modification, manifested as a change in the lipid composition of the cytoplasmic membrane, is an important part of the mechanism by which *B. subtilis* defends itself against surfactin.

1 Úvod

Rezistence bakterií proti antibiotikům používaným v klinické praxi jsou jedním z velkých globálních problémů současné doby (World Health Organization 2023). Je nutné nejen hledat a testovat nové účinné látky, ale také lépe pochopit jejich mechanismy účinku, mechanismy resistance a procesy, které mikroorganismy uplatňují pro adaptaci vůči antibiotikům (popř. jiným toxickým látkám). Zatím nepřiliš klinicky využívaným zásahovým místem antimikrobiálních látek je samotná cytoplazmatická membrána (Hurdle et al. 2011, Mingeot-Leclercq and Décout 2016). Cytoplazmatická membrána (Singer and Nicolson 1972) je zcela zásadní a jedinou membránovou strukturou bakteriální buňky pro nespočet buněčných pochodů – zejména odděluje vnitřní a vnější prostředí a udržuje akční potenciál bakteriální buňky, ale také nese enzymatické a signalizační funkce. Aby membrána byla schopná plnit jak svou bariérovou funkci, tak poskytovat stabilní prostředí, musí být relativně složitě organizována a aktivně udržována v optimálním stavu (Lopez and Koch 2017). Dá se tedy předpokládat, že pokud budeme o cytoplazmatické membráně uvažovat jako o zásahovém místě antibiotika, tak na rozdíl od konkrétního enzymu nebo signální dráhy, nelze jednoduchou bodovou mutací zajistit rezistenci nebo vyšší odolnost vůči látce poškozující membránu a zároveň udržet správnou funkci na membránu navázaných buněčných pochodů. Je známo množství látek narušujících bariérovou funkci membrány od klasicky kódovaných antimikrobiálních peptidů, přes neribozomálně produkované povrchově aktivní sekundární metabolity jako např. rhamnolipidy (Chrzanowski et al. 2012) nebo lipopeptidy, mezi něž patří daptomycin používaný v současnosti v klinické praxi jako antibiotikum poslední záchrany, po různé syntetické látky jako jsou např. v naší laboratoři zkoumané lipofosfonoxiny (Rejman et al. 2011, Dugić et al. 2024).

Jedním z povrchově aktivních antimikrobiálních lipopeptidů je hlavní objekt zájmu této studie – lipoheptapeptid surfaktin neribozomálně produkovaný Gram-pozitivní půdní bakterií *Bacillus subtilis* (Arima et al. 1968, Kakinuma et al. 1969a, Kakinuma et al. 1969b). U surfaktinu bylo popsáno široké spektrum antimikrobiální aktivity (Beven and Wroblewski 1997, Das et al. 2008, Loiseau et al. 2015) založené na jeho schopnosti permeabilizovat lipidické membrány (Sheppard et al. 1991, Carrillo et al. 2003, Nazari et al. 2012). Detaily mechanismu účinku ale nejsou podrobně objasněny, stejně tak jako faktory determinující náchylnost membrány

k permeabilizaci surfaktinem. Předchozí výzkum v Laboratoři fyziologie bakterií ukázal, že *B. subtilis* reaguje na přítomnost surfaktinu změnou složení membrány, a to ať se jedná o endogenní surfaktin (Seydlova et al. 2013), nebo surfaktin externě přidaný ke kultuře neschopné jeho produkce (Uttlová et al. 2016).

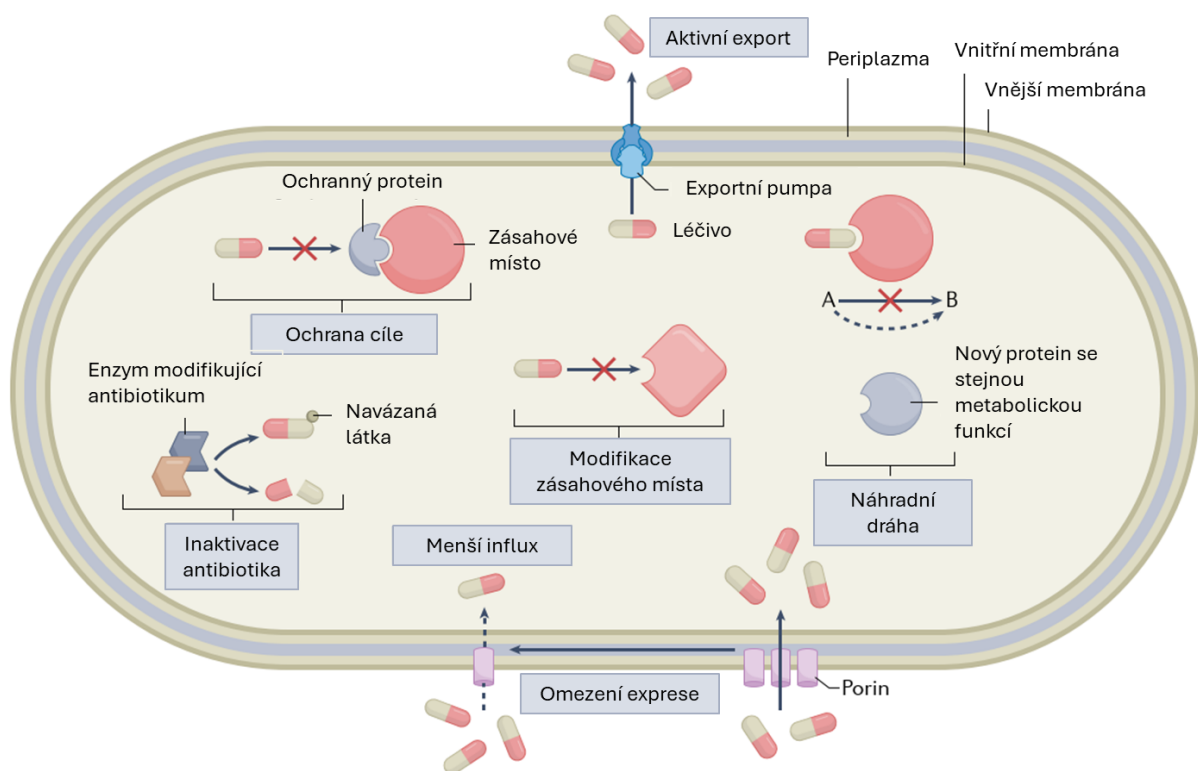
2 Cíle práce

Tato studie si klade za cíl pomocí experimentů s permeabilizací modelových membrán i živými buňkami přispět ke znalostem mechanismu permeabilizačního účinku surfaktinu a dále popsat mechanismus, který *B. subtilis* uplatňuje v obraně proti vlastnímu toxickému produktu, zejména jak k němu přispívá změna lipidického složení membrány. Konkrétně jsme chtěli popsat míru vlivu kardiolipinu na toleranci surfaktinu producentem a získat vhled do mechanismu, jakým k toleranci přispívá. Paralelně jsme chtěli vysvětlit námi dříve pozorovaný efekt zvýšeného účinku surfaktinu při použití DMSO jako rozpouštědla pro přípravu zásobního roztoku surfaktinu.

3 Literární přehled

3.1 Mechanismy resistance proti antibiotikům

Jednou ze základních charakteristik živých organismů je schopnost přizpůsobit se svému prostředí. Patogenní bakterie tuto schopnost mimo jiné manifestují jako vývoj tolerance nebo rezistence vůči antimikrobiálním látkám, kterým jsou vystavovány ať přirozeně, v klinické, veterinární nebo zemědělské praxi nebo jako environmentální kontaminaci následkem výše zmíněného (Okocha et al. 2018, Kaur Sodhi and Singh 2022). Mechanismů, jakými mohou mikroorganismy resistance nebo tolerance dosáhnout je několik (Obr. L1).



Obr.L1 Mechanismy rezistence proti antimikrobiálním látkám.

Obrázek ilustruje různé způsoby, kterými se mikroorganismy mohou bránit účinku antimikrobiálních látek. Převzato a upraveno z (Darby et al. 2023).

Pokud je zásahové místo uvnitř buňky, je jednou z možností jednoduše omezit expozici buď zpomalením vstupu do buňky (Fernández and Hancock 2012) nebo aktivním exportem pomocí transmembránových proteinů (např. ABC transportérů (Markham and Neyfakh 2001). Bakterie často nesou geny i několika příbuzných nebo nepříbuzných transportérů s podobnou

specifitou jako například geny *bmr a blt* u *B. subtilis*, které zprostředkují resistenci proti makrolidům, tetracyklinům a fluorochinonům (Ahmed et al. 1995).

Další metoda, jakou bakterie snižují koncentraci antimikrobiální látky, je enzymatická degradace nebo inaktivace (Wright 2005). Látky s vazbami náchylnými na hydrolýzu mohou být enzymaticky štěpeny – příkladem jsou β -laktamázy štěpící β -laktamová antibiotika (Abraham and Chain 1940), erytromycin esteráza štěpící esterové vazby makrolidových antibiotik (Barthelemy et al. 1984) nebo proteázy štěpící antimikrobiální peptidy (Stumpe et al. 1998). Alternativně je možné antimikrobiální látku inaktivovat kovalentním navázáním funkční skupiny, která znemožní vazbu na zásahové místo, jako například acetylaci amino skupiny ciprofloxacinu acyltransferázou (Robicsek et al. 2006) nebo navázáním fosfátové skupiny či nukleotidu (Ramirez and Tolmasky 2010).

V některých případech mohou bakterie získat nebo vyvinout alternativní metabolickou dráhu kompenzující nebo nahrazující antibiotikem inhibovanou funkci – například na plazmidu nesená dihydrofolát reduktáza, která poskytuje resistenci proti antibiotikům inhibujícím syntézu kyseliny listové (Then 1982). Častějším mechanismem než nahrazení, je ovšem modifikace zásahového místa. Vzhledem k inherentnímu požadavku na selektivitu účinku antibiotik musí být z principu látka schopná vázat se exkluzivně do zásahového místa. Následkem toho může ale malá změna zásahového místa silně omezit afinitu antibiotika k zamýšlenému cíli. Zároveň si ale i zasažená struktura musí zachovat svou funkci a specifitu, což omezuje spektrum možných změn. Příkladem může být rezistence proti antibiotikům inhibujícím proteosyntézu vazbou na 50S podjednotku bakteriálního ribozomu (Schwarz et al. 2016). U *S. aureus* může být rezistence proti linezolidu způsobená jedinou bodovou mutací G2576T na 26S ribozomální RNA a poskytuje zároveň ochranu proti quilpristinu a chloramfenikolu. Popsaná mutace ale také sama o sobě negativně ovlivňuje funkci ribozomu a je tak při absenci selekčního tlaku způsobeného antibiotikem postupně eliminována (Besier et al. 2008). Tyto bodové mutace mohou vznikat spontánně v průběhu replikace a zafixovat se v populaci působením antibiotika, nebo také aktivně, rekombinací mezi různými alelami přítomnými v genomu nebo z environmentální DNA u kompetentních buněk (Huber et al. 2021). Další typickou ukázkou modifikace zásahového místa jsou modifikace transpeptidáz (takzvaných PBP - penicilin binding proteins) aktivních v syntéze buněčné stěny, které jsou hlavním zásahovým místem β -laktamových antibiotik (Ubukata et al. 1989).

Vývoj rezistence proti antibiotikům je sám o sobě zásadním problémem. Situace je ale výrazně závažnější, pokud dochází k horizontálnímu přenosu rezistencí pomocí plazmidů. Takto se mezi patogeny šíří například rezistence proti chinolinům (Strahilevitz et al. 2009) prostřednictvím genů kódujících proteiny chránící gyrázu nebo acyltransferázu (Robicsek et al. 2006) inaktivujících antibiotikum. Na mobilních elementech se v současné době znepokojivě šíří i β -laktamázy včetně forem necitlivých na inhibici kyselinou klavulanovou (Leiris et al. 2019).

Pro odvrácení návratu klinické praxe do doby před zavedením antibiotik je nutné tento problém akutně řešit. Kromě dodržování dobré praxe používání stávajících antibiotik pro oddálení rozšíření rezistencí je nevyhnutelný také vývoj nových antimikrobiálních látek s novými zásahovými místy. Cytoplazmatická membrána je jeden z málo využitých cílů a dá se předpokládat, že mechanismy rezistence proti látkám cílícím membránu budou muset být komplexní a obtížně šiřitelné horizontálním přenosem genetické informace.

3.2 Struktura a funkce bakteriální membrány

Biologické membrány se až na výjimky skládají z dvojvrstvy lipidů, které jsou z obou stran orientovány hydrofobní mastnou kyselinou do středu membrány a hydrofilní hlavičkou vně, do vodného prostředí na obou stranách. Nedílnou součástí membrány jsou také proteiny a lipoproteiny které mohou být k membráně přichycené, vnořené do ní nebo membránou procházejí. Lipidy i proteiny se mohou v ploše membrány do různé míry volně pohybovat, navzájem se ovlivňují a společně tvoří funkční celek – lipidy poskytují proteinům požadované prostředí a proteiny modulují uspořádání membrány a její lipidové složení (Jensen and Mouritsen 2004). Membrána také nese velké množství metabolických funkcí, u nichž je důležité nevodné prostředí (dýchací řetězec) nebo jen snížení počtu stupňů volnosti pohybu tak, aby se komponenty dráhy měly šanci setkat (dvourozměrná membrána v kontrastu s trojrozměrným cytosolem). Všem těmto funkcím musí membrána poskytovat optimální prostředí v širokém spektru vnějších podmínek – jak fyzikálních, tak chemických. Membrány některých, možná většiny, organismů nejsou v celé ploše homogenní. Některé proteiny a lipidy mají tendenci se vyčleňovat do takzvaných mikrodomén nebo „membránových raftů“ s jiným

složením, kde se zmíněné chemické i fyzikální vlastnosti odlišují od okolí (Karnovsky et al. 1982, Coskun and Simons 2010, Lopez and Koch 2017).

Nejzásadnější funkcí membrány je ovšem funkce bariérová. Oddělení vnitřního a vnějšího prostředí je zásadní pro samotnou definici živých systémů. Membrána tak zároveň udržuje primární formu buněčné energie – protonový gradient – protože je za normálních podmínek sama o sobě elektrickým izolantem, což také umožňuje studium permeabilizačního účinku membránově aktivních látek pomocí měření změn vodivosti lipidických membrán. Ruku v ruce s bariérovou funkcí jde funkce transportní, zajišťovaná celou řadou transportních systémů – je třeba dostat živiny, signály a ionty do buňky a odpad, produkty, ionty a signály z buňky ven.

Pro udržení optimálního stavu membrány při kolísání teplot vnějšího prostředí buňky je třeba regulovat fluiditu membrány. Při snižování teploty membrána tuhne a bez zásahu by neposkytovala dostatečnou mobilitu membránovým proteinům, případně by se nemohla vyrovnat s mechanickým namáháním a neudržela by integritu. Při vysoké teplotě by příliš fluidní membrána neudržela integritu a mohlo by dojít ke zkratování protonového gradientu a energetické smrti buňky. Různé druhy bakterií používají k detekci a udržování fluidity membrány různé systémy (Beranová et al. 2008, Seydlova et al. 2012, Ernst et al. 2016). Obecně mají lipidy s delším řetězcem nasycené mastné kyseliny vyšší teplotu tuhnutí než ty s kratším. Dále mastné kyseliny s rovným, nasyceným řetězcem ochotněji přijímají uspořádanou gelovou fázi, zatímco nenasycené a větvené mastné kyseliny mají tendenci bránit tuhnutí membrány. S fluiditou souvisí i geometrie membrány, tlaky a pnutí způsobené jednak vnějšími silami deformujícími membránu a jednak vnitřními vlivy, jako je vlastní geometrie lipidů, transport do a z jednotlivých listů membrány. Pnutím a ohyby v membráně jsou pak dále ovlivňovány konformace a funkce membránových a s membránou asociovaných proteinů (Janmey and Kinnunen 2006, Brown 2012). Dokonce i mnohé bakteriální enzymy a signalizační dráhy zřejmě vyžadují složitou organizaci membrán do mikrodomén označovaných jako FFM (Functional Membrane Microdomain) analogických eukaryotním membránovým raftům (Lopez and Koch 2017), které jsou tvořeny specifickými lipidy, jako polycyklické a necyklické terpenoidy, a strukturními proteiny jako flotiliny, které dohromady vytvářejí prostředí zajišťující správnou konformaci a agregaci proteinů a celých metabolických drah.

Majoritní lipidovou složkou membrány jsou glycerofosfolipidy (dále jen fosfolipidy). Kromě výše zmíněných mastných kyselin se fosfolipidy liší polárními částmi molekul - tzv. hlavičkami,

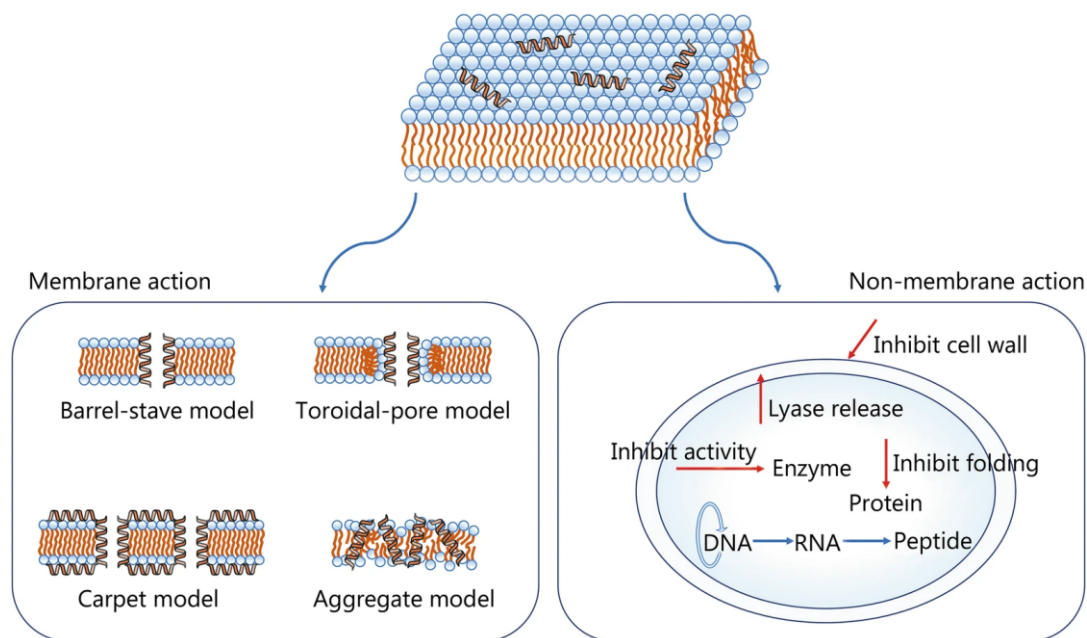
kteří mají různé náboje a také různé velikosti. Poměr velikosti hlavičky a hydrofobní lipidové části určuje preferované zakřivení membrány. Různé organismy mají dramaticky odlišné zastoupení typů fosfolipidů v membráně. Zatímco lidské buňky pečlivě udržují membránu s celkově neutrálním nábojem a s velkými rozdíly mezi vnitřním a vnějším listem a zpravidla se nemusí potýkat s výkyvy teploty, bakterie mívají membrány do různé míry negativně nabitě. Ovšem zastoupení jednotlivých typů lipidů se i mezi různými druhy bakterií výrazně liší. Ani bakteriální membrány navíc nejsou homogenní, jsou složitě organizovány do více či méně stabilních mikrodomén s dalekosáhlými dopady na funkci samotné membrány, kdy některé proteiny a dráhy pro svoji funkci vyžadují lokalizaci/kolokalizaci do mikrodomén. Některé antimikrobiální látky, jakou je i surfaktin, se mohou vázat na rozhraní mikrodomén, kde se koncentrují nebo domény narušují (Matsumoto et al. 2006, Epanand and Epanand 2009, Strahl and Errington 2017).

Narušení bariérové funkce membrány látkou s permeabilizačním účinkem dojde k více nebo méně závažnému zkratování membránového potenciálu, podle charakteru póru také k influxu nebo efluxu iontů, což může mít dalekosáhlé dopady na buněčnou signalizaci a metabolismus. Může dojít k úniku buněčného obsahu nebo dokonce k úplné dezorganizaci membrány a prasknutí buněk. Na rozdíl od některých antibiotik jako je penicilin cílící na enzymy syntézy buněčné stěny, nevyžadují látky permeabilizující membránu metabolicky aktivní buňky (byť např. daptomycin pro aktivitu vyžaduje membránový potenciál (Seydlova et al. 2019)) a dokážou tedy účinně potírat i dormantní mikroorganismy. Samotný účinek je relativně velmi rychlý, což dává buňkám málo času se adaptovat.

3.3 Antimikrobiální látky cílící na cytoplazmatickou membránu

Drtivá většina organismů produkuje v nějaké formě látky toxické pro jiné organismy, ať už jako formu konkurenčního boje, napadání kořisti či hostitele, součást imunitního systému, nebo jen vedlejší produkt metabolismu (Zaslouff 2002, Sansinenea and Ortiz 2011). Pro tuto práci jsou relevantní zejména látky, které jsou schopné specificky napadat mikroorganismy, a zejména ta část těchto přirozených antibiotik, která svým účinkem cílí na cytoplazmatickou membránu. Variabilita molekul s rámcově obdobným účinkem je obrovská a způsob jejich syntézy tuto bohatost odráží. Zhruba se dají tyto látky rozřadit na dvě hlavní skupiny – produkty ribozomální proteosyntézy s různou mírou post-translační modifikace a neribozomálně produkované sekundární metabolity vznikající činností řady enzymů nebo

multienzymatických komplexů. Neribozomální syntézou mohou vznikat jak látky peptidového charakteru, tak látky s peptidovou součástí nebo zcela nepeptidové sloučeniny (Sansinenea and Ortiz 2011). Rozmanitost struktury je reflektována v rozmanitosti mechanismů účinku těchto látek, ilustrované na Obr. L2.



Obr. L2 Mechanismy účinku antimikrobiálních peptidů

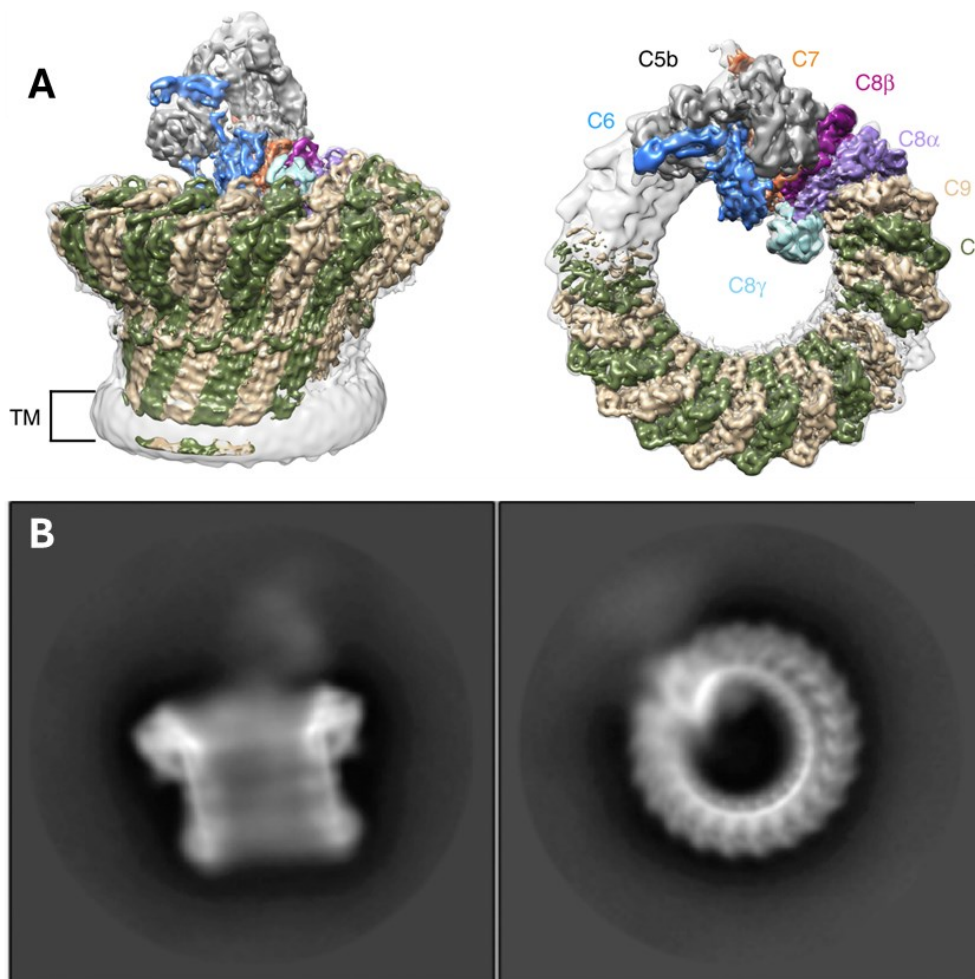
Řada antimikrobiálních látek může mít kromě membránové aktivity (vlevo) i intracelulární zásahové místo (vpravo). Převzato ze (Zhang et al. 2021).

3.3.1 Eukaryotní ribozomálně produkované membránově aktivní peptidy

Nejjednodušší a energeticky nejlevnější způsob, jak může buňka vytvořit látku se specifickou funkcí, je genová exprese vedoucí k vytvoření funkčního proteinu ribozomální syntézou podle genetické předlohy. I proto je značná část antimikrobiálních látek produkovaných napříč říšemi charakteru ribozomálních proteinů. Liší se komplexitou, velikostí i specifitou.

Příkladem extrémně komplexního systému je lidský komplement. Jedná se o systém více než 30 proteinů, které dohromady mimo jiné umožňují protilátkám a fagocytujícím buňkám efektivně zabít citlivé mikroorganismy, ale paleta funkcí tohoto systému je mnohem širší (Ricklin et al. 2010). Pórtovným efektoem je takzvaný MAC (membrane attack complex) (Müller-Eberhard 1985), který při sestavení v membráně vytvoří velký stabilní pór, jehož stěna je tvořena jedním velkým β -barelem. Vzniku tohoto terminálního komplementového

komplexu (jak se MAC někdy nazývá) předchází několik úrovní regulace, kdy se postupně hydrolyticky aktivují jednotlivé komponenty signálních drah, které nakonec aktivují komplex tvořený podjednotkami C5b, C6 a C7 vstupující po sestavení do membrány. Ten pak umožní vložení a aktivaci podjednotky C8 která iniciuje sestavení MAC vkládáním a polymerizací přibližně 18 podjednotek C9 (Obr. L3 (Menny et al. 2018)). Přesto, že primárním stavebním kamenem póru je zde tedy podjednotka C9, sama o sobě pórotvorný efekt nemá a vyžaduje složitý komplex velkých proteinů pod kontrolou extrémně složitých regulačních kaskád (Ricklin et al. 2010). Samotný pór má v průměru asi 10 nm (Müller-Eberhard 1985, Morgan et al. 2017, Menny et al. 2018). Velká část potenciálních cílů – lidských patogenů – je proti lytickému efektu komplementu do různé míry chráněna. Systém jako takový má však mnohem širší funkci integrovanou do složité regulační sítě imunitní odpovědi (Lambris et al. 2008).



Obr. L3 Plně sestavený MAC komplemetového systému

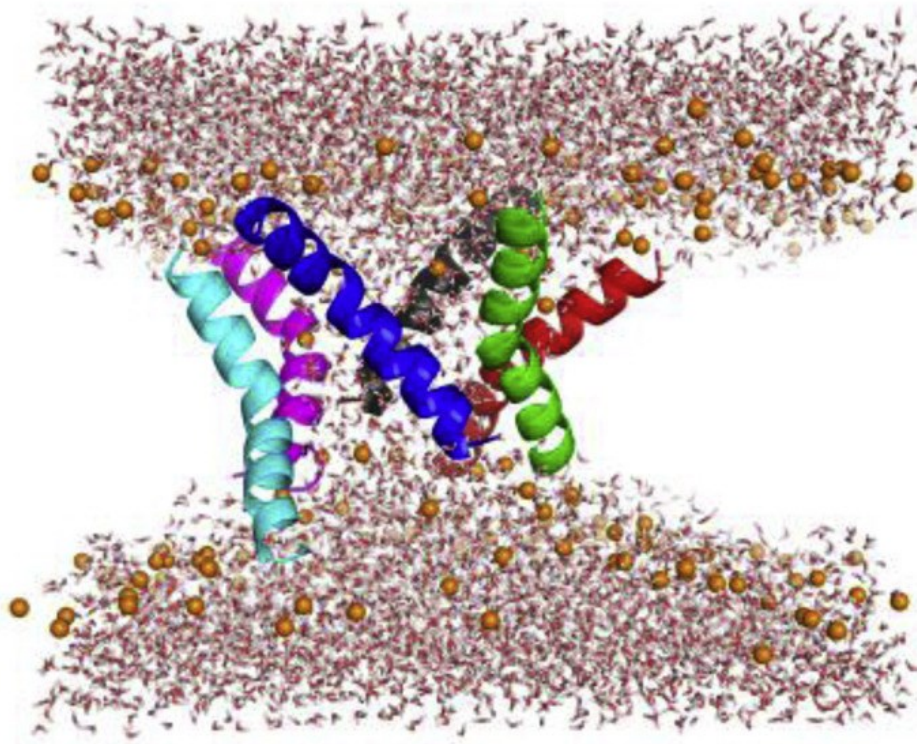
Model MAC (A) (Menny et al. 2018) se zřetelnou β -listovou strukturou po obvodu a stejný komplex zobrazený pomocí zprůměrování velkého množství kryo-elektron mikroskopických snímků (B) (Morgan et al. 2017). Vnitřní průměr póru je asi 10 nm.

Příkladem dalšího, podstatně jednoduššího, membránově aktivního proteinu je toxin melitin, který je hlavní složkou jedu včely medonosné (*Apis mellifera*). Jedná se o peptid dlouhý 23 aminokyselin (Jentsch and Habermann 1967 podle Jentsch and Mücke 1977), který je produkován ribozomálně ve formě promelitinu, který je po štěpení ještě formulovaný na C-konci.

V roztoku se primárně vyskytuje ve formě monomerů charakteru neuspořádané vlásenky ale ve vysoké koncentraci nebo iontové síle potřebné ke krystalizaci tvoří tetramery, ve kterých melitin nabývá struktury ohnutého α -helixu (Anderson et al. 1980). N-konec nese kladné náboje a v α -helikálním uspořádání je tělo peptidu amfipatické – hydrofilní aminokyseliny jsou uspořádané na jedné straně helixu. Ve fyziologických podmínkách podle všeho melitin helikální struktury nabývá až při vstupu do membrány (Raghuraman and Chattopadhyay 2007). Po vstupu do membrány melitin agreguje a v závislosti na vlastnostech jako náboj a tloušťka membrány je schopen tvořit transientní vodivé póry s různým a zřejmě nestabilním množstvím podjednotek. Podle *in silico* simulací (Sepehri et al. 2020) jsou póry na pomezí modelů barrel-stave a toroidních pórů. Vzhledem k jednoduché struktuře bylo připraveno a otestováno mnoho syntetických a polosyntetických analogů melitinu za účelem získání látek s lepšími parametry nebo poznání vlivu jednotlivých částí molekuly. Například varianta pHD15, která má celkem 14 aminokyselinových záměn při zachování hrubé struktury peptidu (Wiedman et al. 2017), tvoří stabilnější póry (Obr. L4). Při vyšších koncentracích melitin dokáže, obzvláště při změnách teplot, z membrán vytrhávat micely a stabilizovat diskovité fragmenty a způsobit tak kompletní destrukci membrán.

Melitin dokáže napadat jak savčí, tak bakteriální membrány. Primárním cílem melitinu, coby jedu, jsou membrány erytrocytů a způsobení hemolýzy. Už při koncentracích nižších než 1 $\mu\text{mol/l}$ melitin způsobuje rychlý únik hemoglobinu do extracelulárního média (DeGrado et al. 1982). Podle toho, že únik iontů předchází úniku hemoglobinu, tvoří melitin malé póry a až následná osmotická nerovnováha způsobí rupturu membrány (Subbalakshmi et al. 1999). Zajímavé je, že přes to, že membrána primárního cíle – erytrocytů – obsahuje až 45 % cholesterolu, je pórotvorná aktivita melitinu přítomností cholesterolu výrazně oslabována (Allende and McIntosh 2003). Cholesterol brání jak silné vazbě melitinu do membrány, tak zřejmě uspořádání molekul melitinu do funkčního pórotvorného komplexu omezením

mobility melitinu v membráně. Dále melitin vykazuje silnou baktericidní aktivitu i přes to, že negativní náboj přítomný na většině bakteriálních membrán, opět výrazně brání utvoření vodivých komplexů. Vazbu na membránu samotnou ovšem negativní náboj posiluje (Allende and McIntosh 2003).



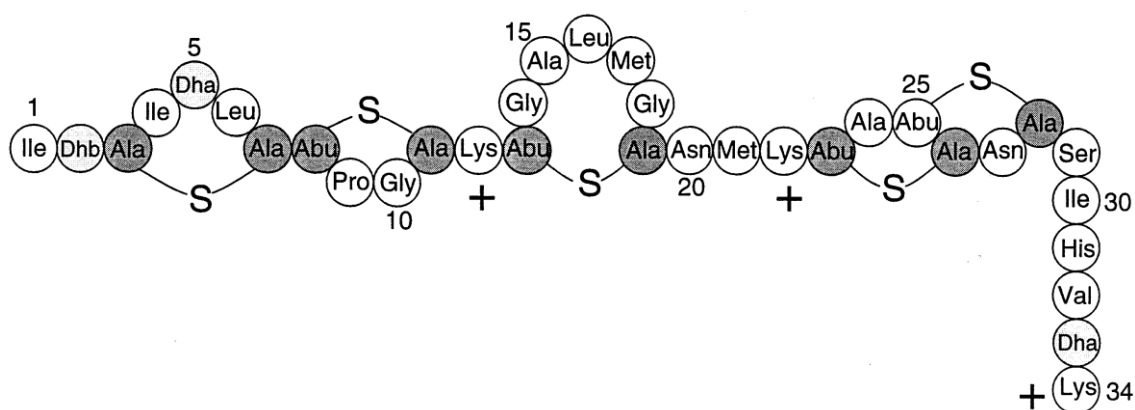
Obr. L4 In silico model póru tvořeného melittinem pHD15.

Obrázek po 10 μ s simulace molekulární dynamiky transmembránového póru tvořeného šesti monomery polosyntetického analogu melitinu pHD15. Jednotlivé α -helikální molekuly jsou rozlišené barevně, membránové lipidy nejsou zobrazeny. Převzato z (Sepehri et al. 2020).

3.3.2 Bakteriální ribozomálně produkované membránově aktivní peptidy

Kromě eukaryotních organismů velké množství (nejen) antimikrobiálních pórtočtovných látek produkují i samotné bakterie. Tyto ribozomálně produkované (a často silně posttranslačně modifikované) látky se souhrnně označují jako „bakteriocíny“ a jsou velmi různorodou skupinou jak z hlediska velikosti a struktury tak z hlediska specifity účinku (Cotter et al. 2005).

Většinou se jedná o kladně nabitě hydrofobní nebo amfipatické peptidy (Savadogo et al. 2006). Praktický dopad pro lidskou civilizaci mají zejména látky produkované bakteriemi mléčného kvašení – zejména jako způsob uchovávání potravy. Produkce těchto antibakteriálních molekul je jedním z důvodů, proč fermentované potraviny nepodléhají zkáze (Cotter et al. 2005). Významným zástupcem je nisin původně objevený jako produkt *Lactococcus lactis* (Whitehead 1933). Je obecně považovaný za neškodný (U.S Food and Drug Administration 1988) a kromě přirozeného výskytu se smí do potravin přidávat coby přírodní konzervační látka E234. Patří do skupiny bakteriocinů nazývané lantibiotika podle aminokyseliny lanthioninu vzniklé posttranslační dehydratací serinů a threoninu a následnou tvorbou thioetherové vazby s cysteiny (Sahl and Bierbaum 1998). Nisin je lineární peptid o délce 34 aminokyselin obsahující 5 lanthioninových cyklů (Obr. L5). Molekula nese v neutrálním pH čtyři kladné náboje.



Obr. L5 Nisin Z

Obrázek struktury Nisinu Z ukazující pět thioetherových vazeb tvořících lanthioninové a methyllanthioninové kruhy řadící nisin do skupiny „lantibiotik“.

Lanthioninové kruhy jsou zhruba rozděleny do dvou rigidních komplexů oddělených flexibilním úsekem. To dává molekule nisinu charakteristický tvar ohnuté vývrtky a udržuje rozmístění hydrofilních a hydrofobních zbytků tak, aby byl zajištěn amfipatický charakter molekuly v roztoku i po vazbě na membránu (Van Den Hooven et al. 1996). Nisin se *in vitro* preferenčně váže na negativně nabitě membrány a negativní náboj je potřeba i k efektivní pórtvorné aktivitě (Kordel et al. 1989). V citlivých membránách způsobuje vznik aniont-selektivních transientních pórů a dokáže způsobit vylití karboxyfluoresceinu z lipozomů. Tvorba pórů je také podpořena transmembránovým potenciálem (Sahl et al. 1987). Představa

vzniku pórů je, že monomery nisinu se nejprve vážou na povrch membrány a později se ponoří do vnější vrstvy tak, že „leží“ rovnoběžně s rovinou membrány. Tím způsobují pnutí expanzí vnějšího listu a ovlivňují uspořádání lipidů (Breukink et al. 1998). Při setkání několika (zřejmě 4-6) molekul nisinu dojde k translokaci zřejmě N-konců skrz membránu a vytvoření vodivého póru s krátkou životností. Koncentrace nisinu potřebná k permeabilizaci membrán *in vitro* ale je o 2 až 3 řády vyšší než k permeabilizaci membrán živých bakterií. (Breukink and de Kruijff 1999) zjistili, že nisin se specificky váže na lipid II, čímž vysvětlují selektivitu a vysokou afinitu nisinu k bakteriálním membránám.

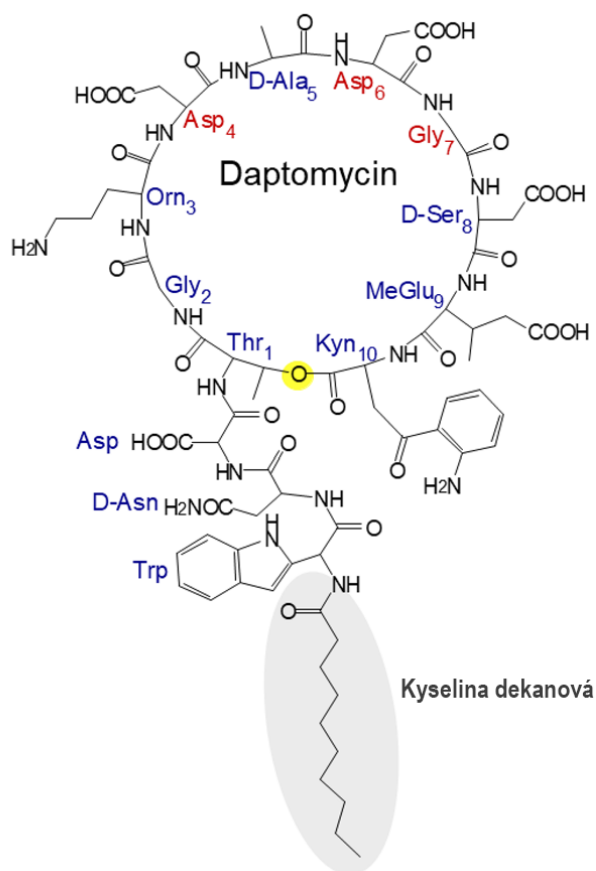
Zmíněná afinita a pórotvorná aktivita dělá z nisinu účinné antibiotikum využitelné jak v už zmíněném potravinářském průmyslu, ale i v biologickém výzkumu a potenciálně i klinické praxi (Shin et al. 2016). Značná pozornost je věnovaná i imunomodulačním účinkům nisinu (Małaczewska and Kaczorek-Łukowska 2021).

3.3.3 Neribozomálně produkované membránově aktivní antimikrobiální látky

Neribozomálně produkované antimikrobiální látky jsou chemicky nesmírně rozmanité. Mechanismus jejich syntézy pomocí multienzymatických komplexů umožňuje tvořit peptidové řetězce složené z klasických aminokyselin, ale i nekanonických L i D-aminokyselin, modifikovaných aminokyselin, mastných kyselin a dalších chemických zbytků neproteinogenní povahy (Grunewald and Marahiel 2006). Velké multi-enzymatické komplexy jsou, kromě přidávání dalších bloků, schopny na produktech provádět různé chemické modifikace jako je např. oxidace, redukce, hydratace a cyklizace, což ještě navyšuje variabilitu těchto látek a moduluje jejich účinnost (Marahiel 2009). Do této skupiny spadá i hlavní objekt zájmu této práce, surfaktinu.

Významným zástupcem neribozomálně produkovaných membránově aktivních antimikrobiálních látek je lipopeptid **daptomycin** používaný v klinické praxi jako antibiotikum poslední volby pod názvem Cubicin. Daptomycin je účinný proti gram pozitivním bakteriím včetně kmenů *Staphylococcus aureus* rezistentních k methicillinu (MRSA) a enterokoků rezistentních k vankomycinu (VRE) (Richter et al. 2003). Daptomycin byl poprvé izolován v osmdesátých letech minulého století jako produkt aktinomycety *Streptomyces roseosporus* (Eliopoulos et al. 1986). Do klinické praxe byl uveden v roce 2003 k léčbě zejména multirezistentních nosokomiálních infekcí (Sauer mann et al. 2008).

Daptomycin je cyklický lipopeptid složený z 13 aminokyselinových zbytků (Obr. L6), kdy 10 aminokyselin je vázáno v kruhu, a kyseliny dekanové navázané na aminoskupinu na N-konci peptidické části. Molekula se tak skládá z hydrofilní vlásenky tvořené laktonovým kruhem a hydrofobního ocásku obsahujícího lineární část peptidu a zmíněnou mastnou kyselinu. Daptomycin obsahuje kromě kanonických aminokyselin i tři D-aminokyseliny a neproteinogenní aminokyseliny ornitin, metylglutamát a kynurenin (Huber et al. 1988). V neutrálním pH nese daptomycin tři negativní náboje, které musí být kompenzovány vápenatými kationty.



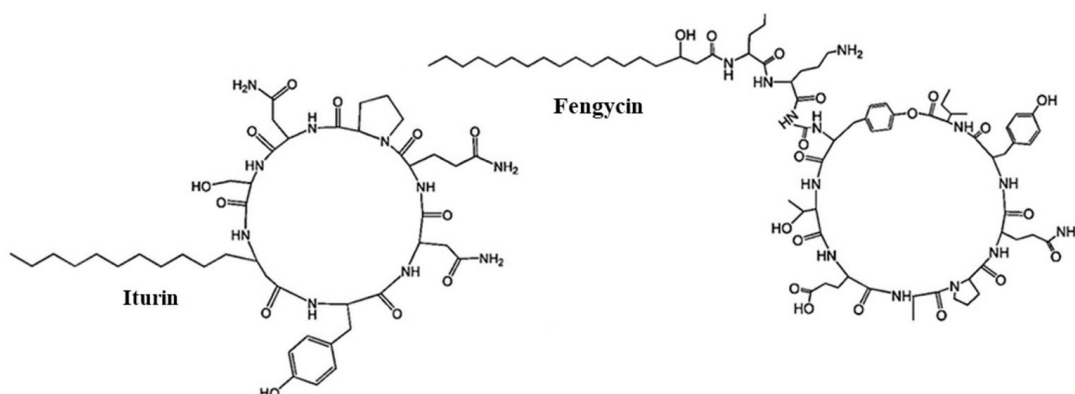
Obr. L6 Primární struktura Daptomycinu

Daptomycin se skládá z cyklického deka-peptidu a lineárního tripeptidu nesoucího mastnou kyselinu. Převzato a upraveno z (Rimal et al. 2023).

Bylo navrženo několik mechanismů účinku daptomycinu – od přímého pórtvorného účinku (Alborn et al. 1991), po inhibici syntézy buněčné stěny (Menginlecreux et al. 1990). Skutečný mechanismus zřejmě zahrnuje interakci s membránou (Grein et al. 2020), v rámci kterého

dojde k narušení syntézy komponent buněčné stěny dělícího septa a následného selhání integrity membrány v těchto místech (Karas et al. 2020). Daptomycin k aktivitě vyžaduje membránový potenciál (Seydlova et al. 2019), kationty Ca^{2+} a přítomnost fosfatidylglycerolu (PG) v cílové membráně (Hachmann et al. 2011). Nahrazení Ca^{2+} a PG jinými kationty nebo jinými lipidy aktivitu daptomycinu výrazně potlačuje (Jung et al. 2008). Přesto, že případy patogenů rezistentních k daptomycinu jsou dobře popsány, jedná se obecně spíše o komplexnější kombinace více faktorů a změn. Zejména se jedná o zesílení buněčné stěny, změny fluidity membrány, změny lipidového složení membrány jako například přeměna PG na lysylPG nebo kardiolipin (Mishra et al. 2012) a změny v regulačních systémech ovládajících údržbu buněčné stěny i cytoplazmatické membrány (Slavetinsky et al. 2012). Obecně tyto změny cílí na omezení přístupu daptomycinu k membráně (modifikace stěny), oslabení interakce s membránou (introdukce pozitivního náboje, odstranění PG) případně narušení efektu v zásahovém místě (změny fluidity). Všechny tyto změny musí podle všeho být kompenzovány dalšími adaptacemi. Tedy přesto, že rezistence proti daptomycinu u klinicky relevantních mikroorganismů existuje, nebyla vzhledem ke komplexitě vyvinutých mechanismů zatím zaznamenána horizontálně přenosná rezistence (Tran et al. 2015).

Dalšími pro tuto práci relevantními zástupci kategorie neribozomálně produkovaných pórotvorných antimikrobiálních látek jsou **fengyciny** (Vanittanakom et al. 1986) a **ituriny** (Delcambe 1952) produkované, často společně se surfaktinem, půdní bakterie *Bacillus subtilis* (Obr. L7). *B. subtilis* kromě výše zmíněných látek produkuje více než 20 dalších druhů antimikrobiálních látek různého chemického charakteru (Stein 2005).



Obr. L7 Struktura Iturinu a fengycinu

Primární struktura iturinu a fengycinu, převzato z (Khan et al. 2017).

Jedná se opět o cyklické lipopeptidy, přičemž peptidická část se v případě fengycinů skládá z deseti a u iturinů ze sedmi aminokyselinových zbytků. Fengyciny mají podobně jako daptomycin makrolaktonový kruh a lineární tripeptid, na nějž je navázaná β -hydroxy mastná kyselina. Fengyciny jsou obvykle produkovány ve směsi isoform s variabilním složením peptidové i lipidové části. V neutrálním pH nese fengycin celkově jeden záporný náboj (Vanittanakom et al. 1986). Různé isoformy se výrazně liší co do rozpustnosti a schopnosti tvořit v roztoku agregáty i biologické aktivity (Deleu et al. 1999). Část poznatků pochází z výzkumu purifikovaných isoform, většina studií nicméně pracuje s nepurifikovanou směsí produkovanou do média. Vlastnosti směsi nejsou pouze součtem nebo průměrem vlastností jednotlivých variant. Například prakticky nerozpustná isoforma fengycinu, agrastatin, který samostatně tvoří pseudokrystalické struktury, je rozpustný ve směsi s jinými isoformami (Patel et al. 2011). I málo rozpustné fengyciny jsou schopné se stabilně vázat do lipidových membrán (Deleu et al. 1999). Vzhledem ke své geometrii v membránách způsobují pnutí a mají tendenci membrány ohýbat a dezorganizovat. Po dosažení hraniční koncentrace v membráně fengycin začne agregovat, tvořit velké stabilní póry, a nakonec rozpouští membránu detergentním mechanismem (Patel et al. 2011). Výsledkem interakce je – vzhledem k fyzikálně-chemickému mechanismu – překvapivě specifická antifungální aktivita (Vanittanakom et al. 1986, Schneider et al. 1999). Potenciálně možné vysvětlení relativně nízké toxicity fengycinu pro savčí buňky ve srovnání s vláknitými houbami může nabídnout *in silico* navrhovaná ochranná funkce cholesterolu (Sur and Grossfield 2022), která by mohla částečně bránit dezorganizaci a ohýbání membrány a agregaci fengycinu v membráně.

Iturin se skládá z heptapeptidu a β -amino mastné kyseliny, která je na rozdíl od fengycinu a daptomycinu přímo součástí makrolaktonového kruhu (Delcambe and Devignat 1957, Besson and Michel 1984). I ituriny jsou velmi variabilní co do peptidové sekvence. Relativně malá hydrofobní doména zodpovědná za inzerci do membrány je tvořená mastnou kyselinou a postranním řetězcem tyrozinu na pozici 2. Iturin ve vodném roztoku ochotně agreguje a tvoří různorodé micely (Razafindralambo et al. 1997, Deleu et al. 1999), ale ve vyšších koncentracích je schopen se samouspořádat do dvojvrstevných struktur podobným lipidickým membránám (Grau et al. 2001). Stejně jako ostatní antimikrobiální lipopeptidy je iturin schopný vázat se do biologických membrán, agregovat v nich a tvořit mikrodomény bohaté na iturin a zřejmě i stabilní póry. Permeabilizační aktivita iturinu je podporována membránovým

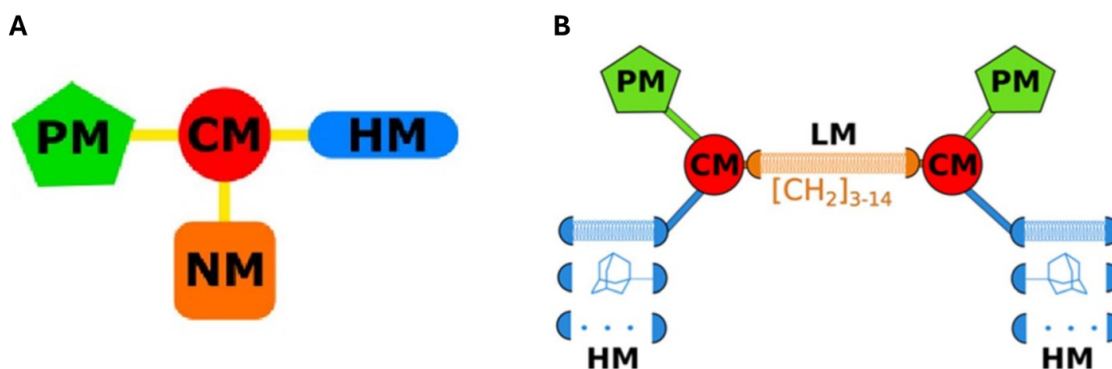
cholesterolem, který se zřejmě váže na tyrozin 2 (Maget-Dana et al. 1985, Grau et al. 2000, Grau et al. 2001, Aranda et al. 2005). Podobně jako u fengycinů, biologická aktivita iturinů kromě přímého antifungálního účinku (Delcambe and Devignat 1957) zahrnuje i indukci systémové imunity rostlin vůči fungálním patogenům a je možné pozorovat synergii mezi působením iturinů a fengycinů (Ongena et al. 2009, Lam et al. 2021).

3.3.4 Syntetické analogy pórotvorných antibiotik

Poznávání mechanismů účinku biologických membránově aktivních antibiotik vedlo vědce k pokusům vytvořit syntetické látky podobných fyzikálně-chemických vlastností napodobením struktury přírodních látek, ať už za účelem poznávání zákonitostí interakcí takových látek s membránou nebo za účelem vývoje nových účinných terapeutik. Syntetické látky slibují jednak výrazně nižší výrobní náklady a také potenciál řešit některé časté problémy látek přírodních, jako je toxicita pro hostitele (Gholamreza et al. 2005), špatná rozpustnost, nízká stabilita a špatné farmakokinetické vlastnosti (Humphrey and Ringrose 1986, Perez 2018). Typickým případem jsou takzvané peptidomimetické látky, které jsou výsledkem snahy modifikovat původní peptidovou strukturu a/nebo zachovat co nejmenší funkční část původního účinného antimikrobiálního peptidu. Příkladem je tripeptid LTX-109 (Isaksson et al. 2011), který pod názvem Lytxar prošel druhou fází klinických testů na léčbu kožních infekcí.

Jedněmi z dalších potenciálně slibných kandidátů jsou neproteinové modulární syntetické antimikrobiální látky zvané lipofosfonoxiny (LPPO) v současné době vyvíjené na UOCHB (Rejman et al. 2011) a testované ve spolupráci se skupinou Fyziologie bakterií na Katedře genetiky a mikrobiologie PŘF UK (Panova et al. 2015, Seydlova et al. 2017, Látrová et al. 2021, Do Pham et al. 2022, Dugić et al. 2024). Celkem byly vytvořeny již čtyři generace LPPO (Obr. L8). LPPO se obecně skládají z pozitivně nabitého hydrofilního modulu zajišťujícího rozpustnost a interakci s membránou cílového mikroorganismu, hydrofobního modulu velmi různorodé chemické povahy, která zajišťuje zanoření do hydrofobního jádra membrány, a pomocného modulu ovlivňujícího celkovou geometrii molekuly (Rejman et al. 2011). LPPO vykazují aktivitu proti širokému spektru bakteriálních kmenů založenou na permeabilizaci membrány pomocí pórů složených z mnoha monomerů. Tato aktivita byla přímo prokázána *in vitro* na modelových membránách pomocí metod velmi podobným metodám popsaným v této práci (Latrova et al. 2021), a antimikrobiální aktivita byla potvrzena i *in vivo* (Dugić et al.

2024). LPPO první generace byly účinné pouze proti gram-pozitivním bakteriím jako je methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*. Druhá generace LPPO, která posílila pozitivní náboj na polárním modulu, byla navíc účinná i proti gram-negativním patogenům jako *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* (Seydlova et al. 2017). Pozdější iterace měly za cíl zejména zlepšit selektivitu a farmakokinetické vlastnosti (Do Pham et al. 2022).



Obr. 18 Struktura LPPO

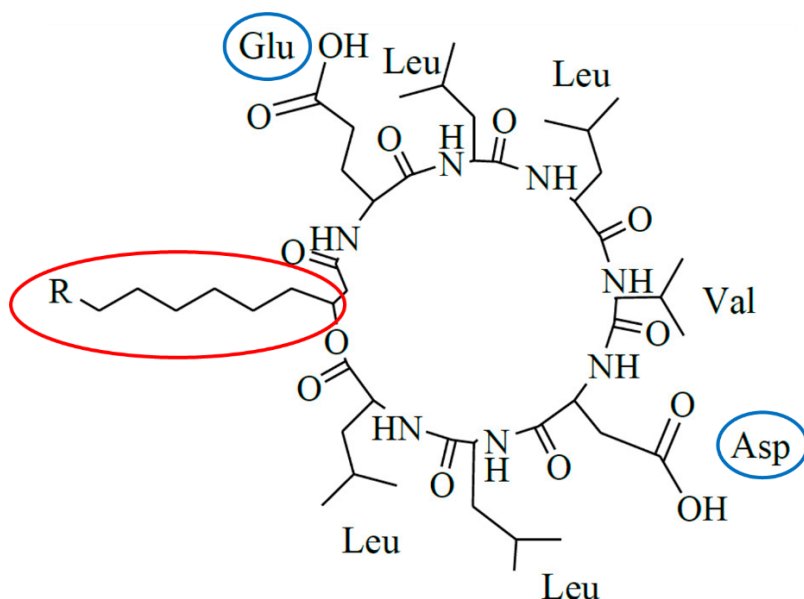
Obrázek ukazuje generalizovanou strukturu LPPO první generace (A) a LEGO-LPPO (B). PM znamená polární modul, NM znamená nukleosid, HM znamená hydrofobní modul, CM znamená spojovací modul a LM značí linker modul. Převzato a upraveno z (Do Pham et al. 2022).

In vitro experimenty také ukázaly, že permeabilizační aktivita obou generací LPPO je dramaticky ovlivněna lipidickým složením cílové membrány. Snížení podílu negativně nabitých lipidů v membráně negativně ovlivnilo aktivitu první generace, ale ne druhé generace LPPO. Druhá generace zároveň vykazovala velmi slabou permeabilizační aktivitu na membránách s celkovým neutrálním nábojem, simulujících povrch eukaryotní buňky. Složení membrány ale není jediným faktorem definujícím náchylnost organismu k účinku LPPO – membrány obsahující lipopolysacharid z vnější membrány gram-negativních bakterií byly před permeabilizací částečně chráněny. Naproti tomu kmen *E. coli* s defektní vnější membránou byl citlivý i vůči první generaci LPPO. Organismy se tedy vůči působení membránově aktivních látek mohou bránit na více úrovních a různým způsobem přerušit řetězec vedoucí k vytvoření vodivého póru. Popsání mechanismu jednotlivých kroků v tomto případě může vést k cílenému designu variant LPPO, které se vyhnou danému mechanismu odolnosti (Latrova et al. 2021) a celkově přispět k porozumění vztahu mezi strukturou a funkcí těchto molekul (Dugić et al. 2024).

3.4 Surfaktin

3.4.1 Struktura a vlastnosti surfaktinu

Surfaktin (Obr. L9) je lipopeptid produkovaný různými kmeny *Bacillus subtilis*, často společně s fengyciny, ituriny a jinými antimikrobiálními látkami. Peptidový kruh obsahuje L- i D- aminokyseliny a nese dva negativní náboje na Glu1 a Asp5, které společně tvoří jakési hydrofilní „klepeto“, zbytek peptidu společně s mastnou kyselinou tvoří hydrofobní doménu. Amfipatický charakter surfaktinu poskytuje nebývale silnou povrchovou aktivitu – surfaktin snižuje povrchové napětí vody ze 72 na přibližně 30 mN/m při koncentraci pouhých 10-20 $\mu\text{mol/l}$ (Ishigami et al. 1995, Peypoux et al. 1999). Molekula surfaktinu zaujímá nejméně dvě různé konformace (Vass et al. 2001) a v roztoku podle dostupných kationtů a isoformy tvoří různě velké micely a agregáty (Heerklotz and Seelig 2001, Shen et al. 2009, Zou et al. 2010).



Obr. L9 Struktura surfaktinu

Surfaktin se skládá z heptapeptidu, který spolu s β -amino mastnou kyselinou (červeně) uzavírá makrolaktonový kruh. Dva negativní náboje na Glu1 a Asp5 (modře) tvoří hydrofilní doménu. (převzato a upraveno z (Shao et al. 2015))

Podobně jako ostatní antimikrobiální lipopeptidy je surfaktin schopný vstupovat do lipidických membrán a narušovat jejich bariérovou funkci. To je základem širokého spektra popsané antimikrobiální aktivity proti patogenům jako je *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*,

Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli* (Fernandes et al. 2007), *Listeria monocytogenes* (Sabate and Audisio 2013) a *Legionella pneumophyla* (Loiseau et al. 2015), byť recentní publikace (Lilge et al. 2022) naznačuje, že pro aktivitu je třeba synergické působení dalších látek jako jsou fengyciny nebo ituriny. Kromě toho byly pozorované další účinky, jako je aktivita proti obaleným virům (Vollenbroich et al. 1997a, Yuan et al. 2018), antifungální (Vitullo et al. 2012) aktivita, která je výrazná zejména při synergickém působení s dalšími lipopeptidy *Bacillus subtilis* (Desmyttere et al. 2019), dále imunomodulační aktivita jak u savců (Park and Kim 2009), tak u rostlin (Henry et al. 2011, Gilliard et al. 2024) a dokonce určitá protirakovinná aktivita (Kameda et al. 1974, Cao et al. 2009).

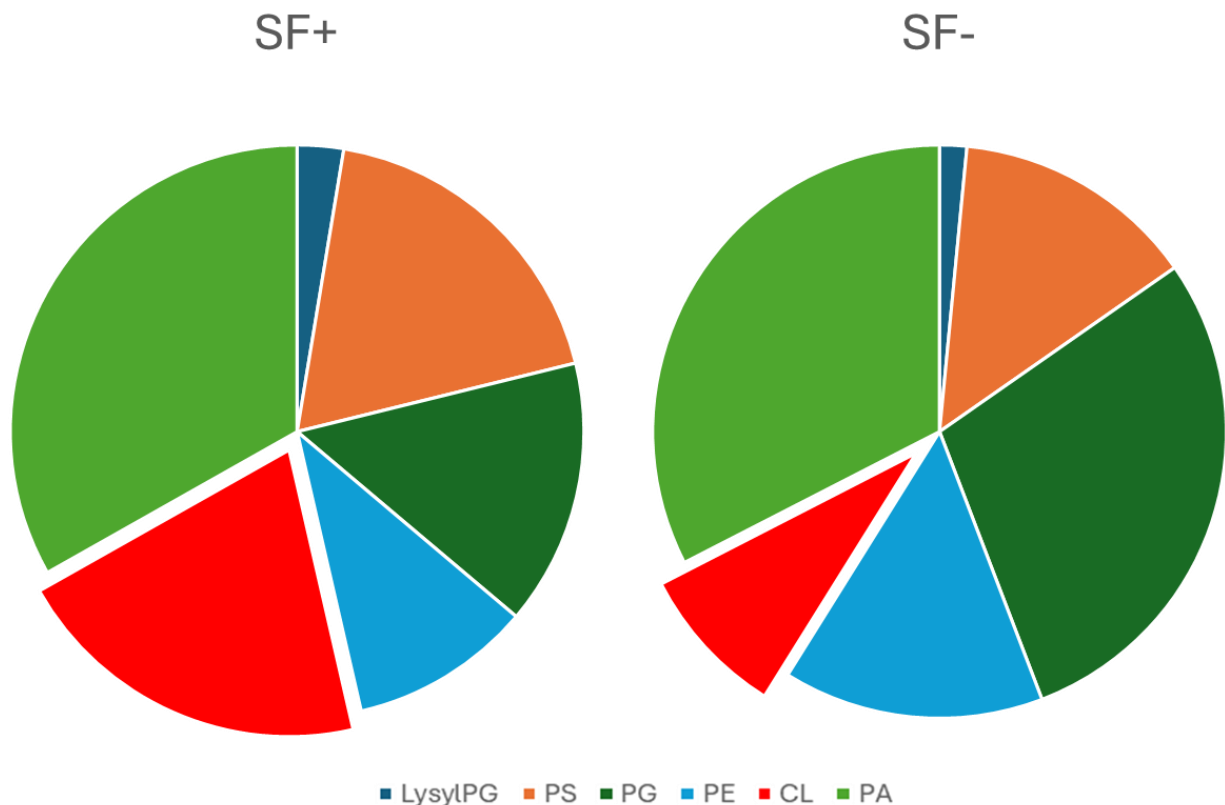
Pro producenta má surfaktin více fyziologických funkcí než jen potlačení potenciální konkurence. Populaci *B. subtilis* slouží jako quorum sensing molekula – signál indikující hustotu populace. Mechanismus je zřejmě závislý na určité nízké míře pórtvorné aktivity surfaktinu přítomného v okolí kultury, která způsobuje eflux draselných iontů z buňky (Lopez and Kolter 2010) a tím dává signál k diferenciaci subpopulace producentů extracelulární matrix klíčové k vývoji biofilmů (Zhang et al. 2022). Dále, kromě toho, že aktivace genů produkce surfaktinu vede v subpopulaci buněk k vývoji stavu přirozené kompetence (Dsouza et al. 1994, Hamoen et al. 2003), silnější pórtvorná aktivita způsobuje lyzi části buněk a následný únik jejich DNA do okolního prostředí. Tato tzv. eDNA je pak výše zmíněnými kompetentními buňkami přijata a použita k rekombinaci v rámci horizontálního přenosu genetické informace (Danevcic et al. 2021). Surfaktin je zároveň klíčový pro pohyb *B. subtilis* – snižováním povrchového napětí umožňuje klouzání po površích nezávislé na přítomnosti bičků (Kinsinger et al. 2003). V neposlední řadě pomáhá surfaktin solubilizovat jinak obtížně dostupné živiny nebo kontaminanty, jak dokládají mnohé studie zabývající se pozitivním vlivem surfaktinu při bioremediaci půd kontaminovaných například ropnými produkty nebo těžkými kovy (Mulligan et al. 1999, Whang et al. 2008).

3.4.2 Interakce surfaktinu s cílovou membránou

Současná představa o působení surfaktinu v cílové membráně, kterou většinou simulují biomimetické modelové membrány (Gilliard et al. 2022), je taková, že je surfaktin schopen vytvořit vodivé póry (Sheppard et al. 1991, Heerklotz and Seelig 2007) a lokální selhání integrity (Carrillo et al. 2003). To může v konečném důsledku vést k regulačnímu a energetickému selhání buňky a buněčné smrti. Při dostatečné koncentraci surfaktinu nakonec

dochází ke kompletní destrukci membrány detergentním mechanismem (Heerklotz and Seelig 2001, Carrillo et al. 2003, Shen et al. 2010). Vkládání surfaktinu do membrány má tendenci membránu mechanicky ohýbat, ztenčovat a dezorganizovat (Carrillo et al. 2003). Molekuly surfaktinu se nejprve vkládají do vnějšího listu membrány, čímž způsobují asymetrickou expanzi vnějšího listu a následný mechanický stres, který může vést až k dočasnému lokálnímu selhání integrity dvojvrstvy, přelití části vnějšího listu do vnitřního a současného úniku buněčného obsahu (Heerklotz et al. 2004). Buď tímto nebo flip-flop mechanismem se pak molekuly surfaktinu mohou dostat i do vnitřního listu a díky slabé mísitelnosti s lipidy v membráně vytvářet segregované domény, v nichž je vysoká lokální koncentrace surfaktinu. To vede k další permeabilizaci, selháním a po dosažení hraniční koncentrace destrukci membrány detergentním mechanismem (Nazari et al. 2012). (Deleu et al. 2013) popsali agregaci surfaktinu na rozhraní fází v membráně, je tedy možné, že surfaktin mimo jiné narušuje membránové mikrodomény, nebo že přítomnost mikrodomén stimuluje agregaci surfaktinu v membráně a umožňuje nástup detergentních mechanismů v podstatně nižší celkové koncentraci surfaktinu. Mísitelnost surfaktinu s lipidy v membráně závisí jak na zastoupení lipidových tříd, tak na délce a typu mastné kyseliny (Maget-Dana and Ptak 1995, Bouffieux et al. 2007). Dalším faktorem jsou nefosfolipidové složky membrány jako steroly, které podle všeho poskytují určitou ochranu proti dezorganizaci způsobené vkládáním molekul surfaktinu (Heerklotz and Seelig 2007).

Klíčovým úkolem této práce je prozkoumat mechanismus rezistence, který producent – *Bacillus subtilis* – uplatňuje k obraně proti vlastnímu toxickému produktu. V literatuře je ve spojitosti se surfaktinem popsán nárůst exprese genu kódujícího transportérový protein yerP (Tsuge et al. 2001). Jeho nadprodukce ovšem mimo jiné zvyšuje kapacitu produkce surfaktinu bakteriální kulturou, zřejmě zrychlením exportu z buňky. Naopak delece yerP neměla žádný vliv na toleranci kultury k surfaktinu (Li et al. 2015, Wan et al. 2022). Dá se tedy předpokládat, že gen yerP není uplatněn ani tak v obraně proti surfaktinu jako spíš v jeho produkci spolu s dalšími exportními systémy YcxA a KrsE (Qiao et al. 2024). Předchozí výzkum v naší skupině ukázal, že *Bacillus subtilis* vystavený působení surfaktinu, ať už v důsledku vlastní produkce nebo externě dodaného, mění lipidové složení cytoplazmatické membrány (Seydlova et al. 2013, Uttlová et al. 2016). Nejvýraznější změnou u producenta byl nárůst koncentrace kardiolipinu (CL) zejména na úkor fosfatidylglycerolu (Obr. L10).



Obr. L10 Změny v zastoupení fosfolipidů v membráně po expozici surfaktinu

B. subtilis se adaptuje na přítomnost surfaktinu v médiu mimo jiné změnou zastoupení fosfolipidů v membráně, zejména nárůst podílu CL na úkor PG. Grafy ukazují poměry fosfolipidů v membráně kmene produkujícího surfaktin (SF+) a kmene neschopného produkce (SF-) po dvaceti hodinách stacionární fáze dle (Seydlova et al. 2013).

Naše předběžná data naznačovala, že vyšší obsah kardiolipin stabilizuje membránu vůči permeabilizaci způsobené surfaktinem. V předkládané disertační práci jsme tuto hypotézu testovali pomocí biofyzikálních metod jako měření vodivosti černých lipidických membrán a měření úniku fluorescenční sondy z lipozomů a výsledky publikovali (Pinkas et al. 2020).

4 Materiál a metody

4.1 Bakteriální kmeny

V projektu byly použity následující dvojice kmenů *Bacillus subtilis* – vždy divoký kmen a na něm založený mutantní kmen s cílenou deficiencí:

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

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

***Bacillus subtilis* 168** (*trp*₂-) –laboratorní kmen neprodukující surfaktin (*Bacillus* Genetic Stock Center), dále označován jako **CL+**

***Bacillus subtilis* SDB206** (*clsA*::pMutin4, *ywjE1*::*spc*, *ywiE2*::*neo*) – kmen vycházející z *B. subtilis* 168 s přerušeny geny *clsA*, *ywjE1* a *ywiE2* esenciálními pro syntézu kardiolipinu laskavě poskytnutý autory studie Kawai et al. 2004, dále označován **CL-**

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

4.2 Sterilizace

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

4.3 Kultivace bakteriálních kultur

Živný agar:

Živný agar (Oxoid) 28 g/l

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

Živné médium:

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

Yeast extract (Oxoid) 2,0 g/l

Bacteriological Pepton (Oxoid) 5,0 g/l

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

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

Sporulační agar:

Složka 1:

Živný agar (Difco) 23g/l

NaCl (Lach-Ner) 18 $\mu\text{mol/l}$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner) 1 $\mu\text{mol/l}$

Složka 2:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lachema) 1 $\mu\text{mol/l}$

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Penta) 10 $\mu\text{mol/l}$

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Lachema) 1 $\mu\text{mol/l}$

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

Kultivace

Biomasa ze šikmého agaru (viz kapitola 4.1) byla asepticky zaočkována do 30 ml živného média v Erlenmayerově baňce a ta byla přes noc aerobně kultivována v horkovzdušné třepačce NB-205 (N-BIOTEK) při 30 °C a 150 rpm. Z této noční kultury byla poté zaočkována ranní kultura na $OD_{420nm} = 0,045$. Ranní kultura byla za stejných podmínek (30 °C, 150 rpm) kultivována, dokud nedosáhla $OD_{420nm} = 0,500$. Bezprostředně po dosažení $OD_{420nm} = 0,500$ byla z ranní kultury zaočkována vlastní růstová kultura na $OD_{420nm} = 0,015$ a kultivována (30 °C, 150 rpm) ve větších objemech (třepačka Gallenkamp, Schoeller Instruments). Pro získání buněk v exponenciální fázi růstu (CL+ a CL-) byla biomasa z růstové kultury po dosažení $OD_{420nm} = 0,500$ zfiltrována pomocí vývěvy a filtrů Synpor č. 5 (velikost pórů 0,6 μ m) a ihned zpracována podle protokolu v kapitole 4.5. Pro získání buněk v pozdní stacionární fázi (SF+ a SF-) byla kultura inkubována přes noc a biomasa získána centrifugací 15 min, 4500 g 4 °C.

Příprava spórových konzerv

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

4.4 Izolace cytoplazmatických membrán

Materiál:

Biomasa z 24h kultur *B. subtilis* (viz kapitola 4.3)

K_2HPO_3 (Roth) 0,2 mol/l

KH_2PO_3 (Fluka) 0,2 mol/l

K⁺EDTA (Sigma-Aldrich) 150 mmol/l

MgSO₄ (Penta) 500 mmol/l

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

DNáza I (Sigma-Aldrich) – 1 mg DNázy v 50% glycerol (w/v), 10 mmol/l Tris-HCl pH 7,5, 1 mmol/l MgCl₂, uchováváno v -20 °C

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

Lysozym (Sigma-Aldrich, 100000 U/mg)

Buněčný pufr: 50 mmol/l fosfátový pufr pH 8,0 (94,7 ml 0,2 mol/l K₂HPO₃, 5,3 ml 0,2 mol/l KH₂PO₃, doplnit destilovanou vodou do 400 ml)

Biomasa získaná centrifugací ze 100 ml 24h kultury (viz kapitola 4.3) byla dvakrát promyta vytemperovaným buněčným pufrem a následně zmrazena v tekutém dusíku a uložena k pozdějšímu zpracování v -80 °C, nebo ihned resuspendována v 10 ml buněčného pufru obsahujícího 10 mg/ml lysozymu a 150 µl PMSF. Poté bylo přidáno 25 µl DNázy a TRN a suspenze byla intenzivně promíchána. Nakonec bylo přidáno 200 µl MgSO₄ a suspenze byla inkubována 60 min při 30 °C. Poté byl přidán 1 ml K⁺EDTA a po jedné minutě dalších 200 µl MgSO₄. Nezlyzované buňky a spóry byly odstraněny centrifugací v 50 ml centrifugačních zkumavkách Falcon 10 min při 3000 g a 4 °C. Pelet byl odstraněn a supernatant obsahující buněčné membrány byl ultracentrifugován 25 min při 25000 g a 4 °C. Získaný pelet membránových váček byl ihned použit k izolaci lipidů (viz kapitola 4.5).

4.5 Izolace lipidů

Materiál:

Biomasa *B. subtilis* v exponenciální fázi růstu (viz kapitola 4.3) nebo cytoplazmatické membrány 24h kultur (viz kapitola 4.4)

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

Chloroform (≥99%, Sigma-Aldrich)

Filtry Whatman GF/C 25 mm

Buněčná biomasa nebo cytoplazmatické membrány byly intenzivně míchány na laboratorním přístroji vortex po dobu alespoň 60 s ve 30 ml směsi hexan:isopropanol v teflonových centrifugačních zkumavkách (Oak Ridge, Nalgene) a přes noc extrahovány při 4 °C. Nerozpustné složky byly od extraktu odděleny centrifugací (5000 g, 10 min, 4 °C) a extrakt byl následně odpařen při 38 °C na rotační vakuové odparce. Lipidová frakce byla rozpuštěna v 7,5 ml chloroformu a pomocí skleněné filtrační aparatury Whatman přefiltrována přes filtry ze skelných vláken Whatman GF/C 25 mm za účelem odstranění složek nerozpustných v chloroformu. Filtr byl následně ještě promyt 2,5 ml chloroformu a oba filtráty byly spojeny. Chloroform byl opět odpařen na vakuové odparce a lipidy byly buď v chloroformu převedeny do skleněných vialek s teflonovým víčkem (Restek nebo Supelco) nebo ihned zpracovány (viz kapitola 4.7.1). Izolace lipidů tímto způsobem měla velmi nízkou výtěžnost (~2mg z 1600ml exponenciální a <1mg z 400ml 24h kultury).

4.6 Měření vodivosti planárních membrán

Materiál:

1 mmol/l surfaktin (Sigma-Aldrich) v 10 mmol/l NaOH (p. a., Lachema)

Dekan (≥99%, Sigma-Aldrich)

Butanol (≥99%, Fluka)

Pentan (spectrophotometric grade, Sigma-Aldrich)

Chloroform (≥99%, Sigma-Aldrich)

Etanol (96%, Penta)

Měřicí pufr (1 mol/l KCl, 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4)

Dioleýlfosfatidylglycerol (Avanti Polar Lipids)

Dioleýlfosfatidyletanolamin (Avanti Polar Lipids)

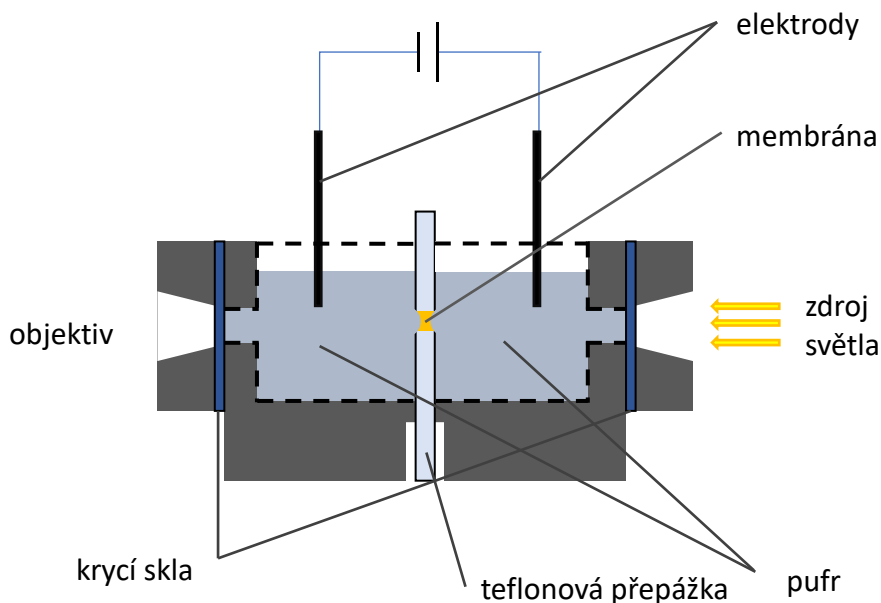
Dioleýlfosfatidová kyselina (Avanti Polar Lipids)

Tetraoleýlkardiolipin (Avanti Polar Lipids)

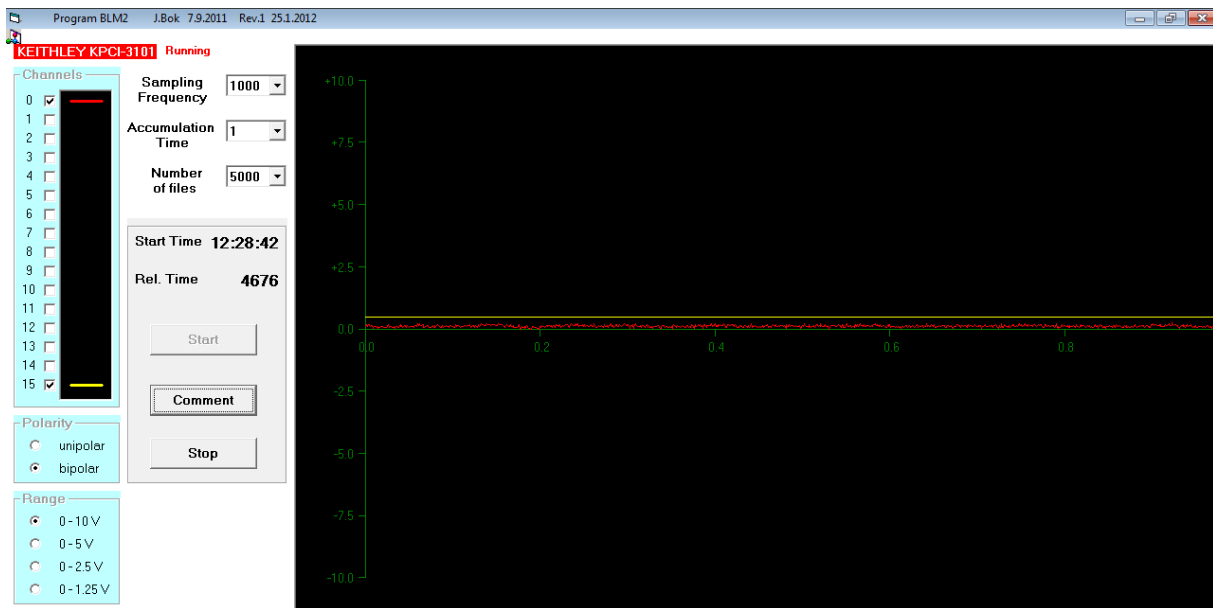
Černé lipidické membrány (dále BLM - Black Lipid Membranes) slouží k měření vodivosti jednotlivých kanálů v lipidických membránách. Membrána je vytvořena v malé apertuře v přepážce oddělující dva kyvetové prostory s Ag/AgCl elektrodami (Obr. M1). Vodivost je

zaznamenávána pomocí 100 nebo 10 GV/A zesilovače (MIT), sběrné PCI karty KPCI - 3108 (Keithley Instruments) a specializovaného software BLM2 (Obr. M2) vytvořeným na míru na MFF UK v Praze - doc. RNDr. Jiří Bok, CSc. V záznamu proudu jsou pak identifikovány a charakterizovány kanály pomocí software QuB (<http://www.qub.buffalo.edu/>)(Nicolai and Sachs 2013) (Obr. M3).

Teflonová měřící komůrka vlastního designu vyrobená na zakázku firmou Sipoch byla před každým měřením důkladně vyčištěna (v pořadí horká voda, destilovaná voda, etanol, chloroform) od případných reziduí lipidů a/nebo účinných látek a následně vysušena vypláchnutím pentanem. Pro každé lipidové složení membrány byla použita nová teflonová přepážka. Po vysušení byly obou oddíly naplněny 1,5 ml měřícího pufru, na elektrody byl vložen potenciál 50 mV. Membrána byla pomocí skleněné špendlíkové hlavičky vytvořena z 3% (w/v) roztoku fosfolipidů ve směsi dekan : butanol 9:1 (v/v) metodou „painting“ (Mueller et al. 1962). Plocha vlastní membránové dvojvrstvy při měření je přibližně 0,5 mm². Po stabilizaci membrány byl na cis stranu přidán surfaktin ze zásobního roztoku na požadovanou výslednou koncentraci a roztok byl opatrně zamíchán automatickou pipetou tak, aby nebyla narušena membránová dvojvrstva. Existence a integrita membrány byla kromě proudových měření kontrolována ještě opticky. V průběhu měření byly dle potřeby vytvářeny nové membrány, případně doplňován roztok fosfolipidů.

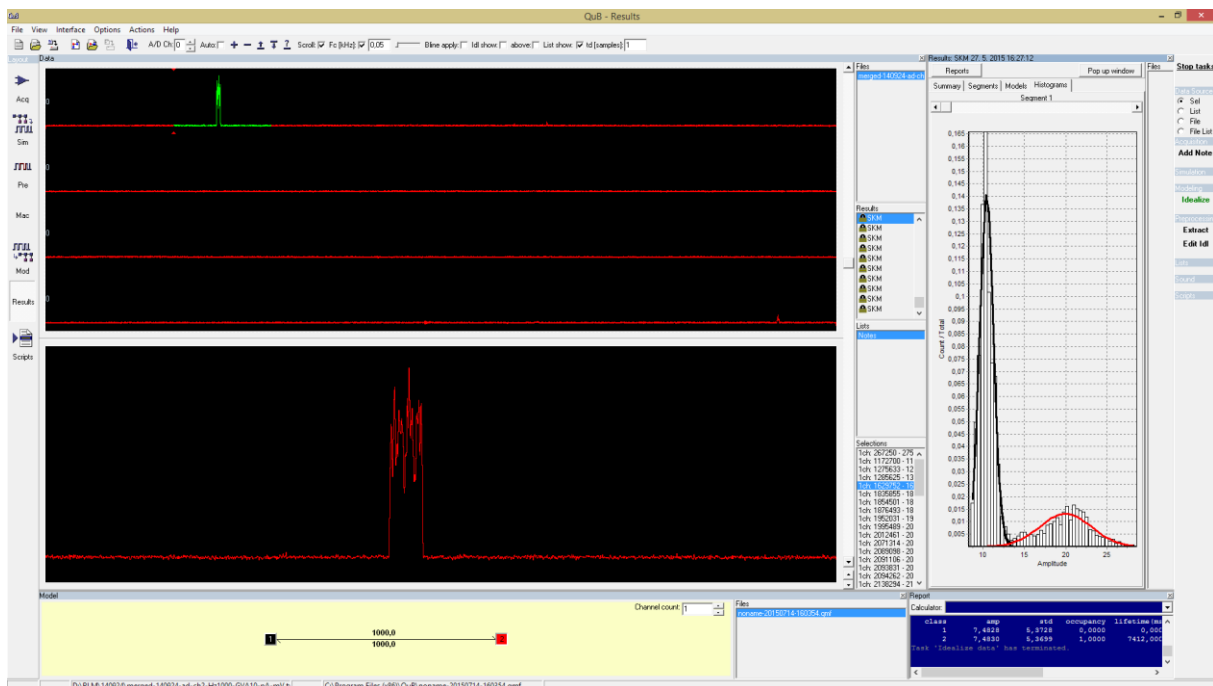


Obr. M1 Schéma aparatury na měření vodivosti planárních membrán
Schéma bočního průřezu měřící komůrky vyvinuté v Laboratoři fyziologie bakterií.



Obr. M2 Záznamový software BLM2

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



Obr. M3 Software QuB

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

4.7 Únik fluorescenční sondy z lipozómů

Materiál:

1 mmol/l surfaktin (Sigma-Aldrich) v 10 mmol/l NaOH (p. a., Lachema)

Dimetylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

Sephadex G-50 medium (GE Healthcare)

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

Metanol (LC-MS grade, Fluka)

TritonX-100 (Serva)

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

Vnější pufr (100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l HEPES (Fluka), 0,5 mmol/l Na₂EDTA (Sigma-Aldrich), pH 7,4)

Sójový fosfatidylcholin (Sigma-Aldrich)

Dipalmitoylfosfatidylglycerol (Avanti Polar Lipids)

Diolelylfosfatidylglycerol (Avanti Polar Lipids)

Dipalmitoylfosfatidyletanolamin (Avanti Polar Lipids)

Diolelylfosfatidyletanolamin (Avanti Polar Lipids)

Dipalmitoylfosfatidová kyselina (Avanti Polar Lipids)

Diolelylfosfatidová kyselina (Avanti Polar Lipids)

Tetramyristoylkardiolipin (Avanti Polar Lipids)

Tetraoleylkardiolipin (Avanti Polar Lipids)

Lipidové izoláty (viz kapitola 4.5)

70% HClO₄ (Penta)

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

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

Standard – K₂HPO₄ (Roth) 0,2 mmol/l

Metoda měření úniku fluorescenční sondy z lipozómů spočívá v přípravě jednovrstevných lipidových váčků naplněných fluorescenční sondou, která je při použité koncentraci

samozhášecí, a následném sledování nárůstu intenzity fluorescence při úniku sondy do okolního prostředí působením účinné látky (surfaktinu), ve kterém samozhášecí efekt pomíjí.

4.7.1 Příprava suspenze lipozomů

Suspenze lipozomů byla připravena „vytřepáváním“ směsi lipidů v roztoku s vysokou koncentrací sondy, homogenizací lipozomů protlačením membránou s definovanou velikostí pórů a následném odstranění volné sondy gelovou filtrací.

1 mg požadované lipidové směsi rozpuštěný v chloroformu byl důkladně vysušen na stěnách skleněné zábrusové zkumavky pomocí rotační vakuové odparky při 38 °C. Do zkumavky byl následně přidán 1 ml vnitřního roztoku a zkumavka byla střídavě intenzivně třepána a zahřívána na 38 °C po celkovou dobu 90 minut aby lipidový film ze stěn zkumavky přešel do suspenze - vzniknou multilamelární váčky s různou velikostí. Roztok se při procesu viditelně zakalí. Suspenze byla následně 10x protlačena přes polykarbonátový filtr s velikostí pórů 100 nm pomocí přístroje Liposo-fast (Avanti Polar Lipids) aby došlo k vytvoření monodisperzních jednovrstevných lipozomů. Homogenizovaná suspenze byla zbavena volné sondy gelovou filtrací přes 20ml kolonu naplněnou Sephadexem G50 (GE Healthcare) hydratovaným vnějším puftem. Při filtraci byly zachycovány 0,5ml frakce, u kterých byla následně stanovena koncentrace fosfátu a frakce s nejvyšší koncentrací byly spojeny a naředěny na požadovanou koncentraci.

4.7.2 Stanovení koncentrace fosfátu v suspenzi lipozómů

Koncentrace fosfátu byla stanovena kolorimetrickou reakcí, při které vzniká fosfomolybdenová modř. 100 µl suspenze lipozómů bylo v čisté a suché skleněné zkumavce smíseno s 0,5 ml 70% HClO₄ a mineralizováno 60 minut při 180 °C. K mineralizovanému vzorku bylo přidáno 3,4 ml destilované vody a 0,5 ml roztoku molybdenanu amonného. Po důkladném promíchání na laboratorním přístroji vortex bylo přidáno 0,5 ml roztoku kyseliny askorbové a roztok byl opět důkladně promíchán. Poté byl vzorek 5 minut inkubován na vodní lázni při 100 °C.

Po ochlazení na laboratorní teplotu byla měřena absorbance při 820 nm proti vodě. Koncentrace fosfátu ve vzorcích byla poté odečtena z kalibrační přímky získané měřením absorbance roztoků o známé koncentraci fosfátu. Ke standardům byl přidán 1 ml 70% HClO₄ a 1 ml roztoku molybdenanu amonného a po důkladném promíchání 1 ml roztoku kyseliny

askorbové. Poté byly standardy zahřívány a jejich absorbance měřena stejně jako v případě vzorků. Pro každé stanovení byly připraveny čerstvé roztoky kyseliny askorbové a molybdenanu amonného a vytvořena nová kalibrační přímka, jednotlivé body kalibrační přímky byly stanovovány v duplikátech a použit průměr obou hodnot.

4.7.3 Měření kinetiky lyze lipozomů

Měření úniku fluorescenční sondy z lipozomů bylo prováděno v křemenných kyvetách o minimálním objemu 100 μ l. Fluorescence byla měřena pomocí spektrofluorometru Fluoromax-3 (Jobin Yvon, Horiba) s excitačním zářením s vlnovou délkou 480 nm a emisní snímanou při vlnové délce 515 nm. Nejprve byla přibližně 20 s byla měřena intenzita fluorescenčního pozadí (bazální fluorescence – IF_0) suspenze lipozomů, poté bylo automatickou pipetou přidáno požadované množství zásobního roztoku surfaktinu. Po uplynutí předem stanoveného časového úseku nebo po dosažení ustáleného stavu byl do kyvety přidán TritonX-100 na výslednou koncentraci 0,1 % pro stanovení maximální intenzity fluorescence (IF_{max}) po destrukci všech lipozomů. Data byla následně vyjádřena v procentech uniklé sondy podle rovnice:

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

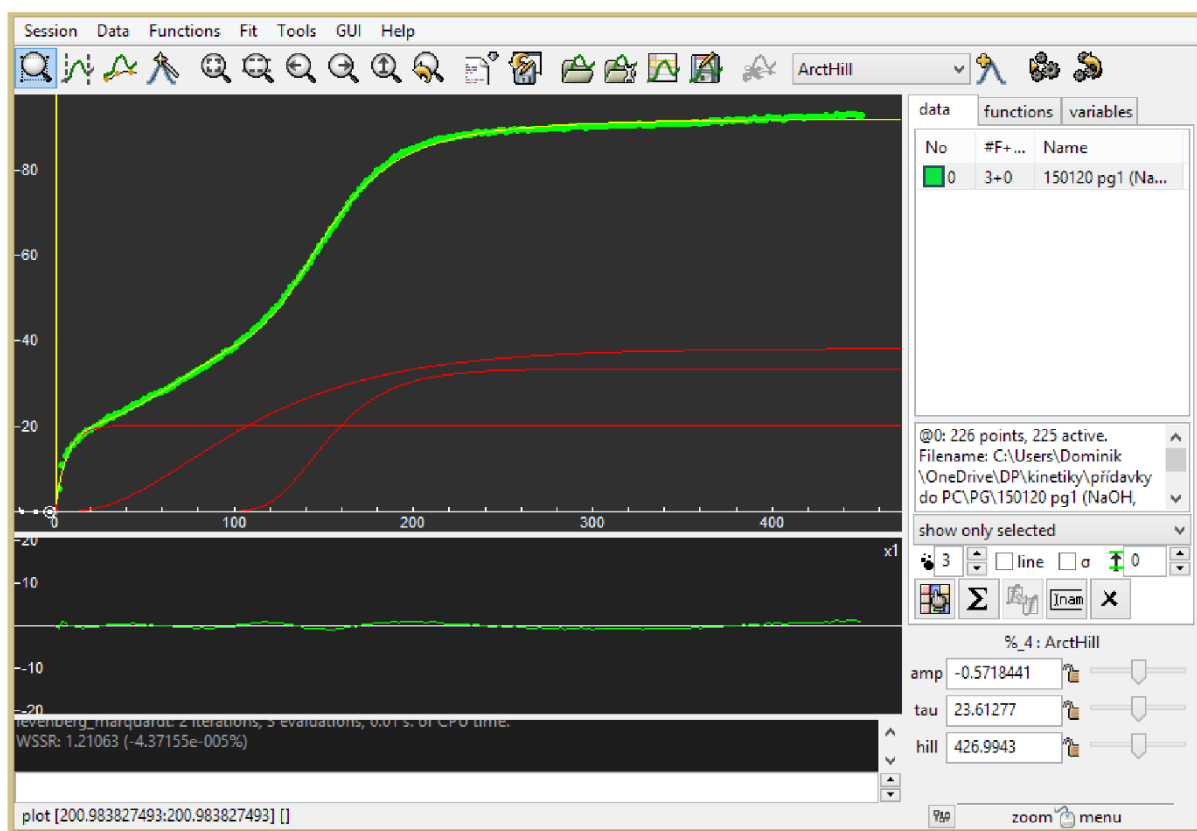
4.7.4 Analýza kinetik lyze lipozomů prokládáním funkcí

Pro analýzu průběhu kinetiky byly změřené křivky pomocí programu Fityk (<http://fityk.nieto.pl/>) (Wojdyc 2010) prokládány funkcí:

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

kde α je amplituda (hodnota, ke které funkce konverguje), τ je poločas funkce a n je Hillovo číslo vyjadřující kooperativitu popisovaného děje (Obr. M4) (Gray et al. 1998, Goutelle et al. 2008). Pokud je $n < 1$ (negativní kooperativita) znamená to, že se zvyšující se koncentrací látky v membráně se efekt dalšího přídavku snižuje. Hodnota $n > 1$ (pozitivní kooperativita) znamená, že efekt každého dalšího přídavku se se zvyšující se koncentrací zvyšuje – zejména, je-li funkční komplex složený z více než jedné podjednotky a nárůst koncentrace monomerů

tak znamená vyšší pravděpodobnost složení komplexu. Konkrétní hodnota n ovšem neznamená přesný počet částic tvořících funkční jednotku. Kinetiky byly prokládány více funkcemi, pokud přidání další komponenty zlepšilo kvadratickou odchylku, a tedy přesnost popisu dané kinetiky o více než 30 %.



Obr. M4 Prokládání funkcí kinetikami lyze v programu Fityk

Data jsou prokládána jednou nebo více (na obrázku třemi) funkcemi. Červené čáry jsou dílčí komponenty, žlutá jejich součet, zelené body jsou vlastní experimentální data. V pravé dolní části jsou hodnoty proměnných – záporná hodnota amplitudy je způsobena nahrazením parametru amp vloženou funkcí omezující rozsah možných hodnot, z té je pak hodnota α zpětně vypočítána. Pod daty je zobrazena odchylka dat od modelu – v tomto případě je křivka dat oproti modelu zvlněná, což znamená, že funkce s aktuálním nastavením parametrů data nepopisují zcela přesně. Numericky je chyba vyjádřena parametrem WSSR (weighted sum of square residuals – vážená suma čtverců reziduálních odchylek).

4.9 Měření permeabilizace buněk pomocí propidium jodidu

Materiál:

1 mmol/l surfaktin (Sigma-Aldrich) v 10 mmol/l NaOH (p. a., Lachema)

Biomasa *B. subtilis* v exponenciální fázi růstu (viz kapitola 4.3)

100 mmol/l glukóza v 10 mmol/l HEPES (Fluka), pH 7,4

Propidium jodid (Sigma-Aldrich)

Melitin

Permeabilizace buněk byla měřena pomocí nárůstu intenzity fluorescence propidium jodidu po vstupu do vnitřního prostředí buňky (Nicoletti et al. 1991). Exponenciálně rostoucí kultury z kapitoly 4.3 byly sedimentovány centrifugací a (5000g, 5 min, 25 °C) a resuspendovány v 100mmol/l glukóze v 10 mmol/l HEPES (pH 7,4). na $OD_{420} = 0,2$ což přibližně odpovídá koncentraci 2×10^7 buněk /ml. Fluorescence byla měřena v křemenných kyvetách pomocí spektrofluorometru Fluoromax-3 (Jobin Yvon, Horiba) s excitačním zářením s vlnovou délkou 515 nm a emisní snímanou při vlnové délce 620 nm. Pro odstranění záření rozptýleného buňkami byly použity optické filtry 3RD500-530 v excitaci a 3RD570LP v emisi. Do kyvety s pufrém, propidium jodide o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ a surfaktinem o zamyšlené koncentraci byla v čase 0 přidána suspenze buněk na výslednou $OD_{420} = 0.2$ což přibližně odpovídá koncentraci 2×10^7 buněk /ml. Výsledný objem směsi byl 2 ml. Intenzita fluorescence byla měřena každé 2 s a po uplynutí 15 min od přídávku byly zbylé buňky permeabilizovány přídávkem melitinu s výslednou koncentrací 2,5 $\mu\text{mol/l}$ pro stanovení maximální hodnoty fluorescence (IF_{max}). Data byla vynášena obdobně jako v kapitole 4.7.2, přičemž jako hodnota IF_0 byl použit první datový bod po uzavření aparatury po přídávku buněk.

4.10 Elektronová mikroskopie

Materiál:

TEM sítky Cu 400 mesh (Agar scientific)

Tetrahydrát molybdenanu amonného (Sigma-Aldrich)

Vnější pufr (100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l HEPES (Fluka), 0,5 mmol/l Na_2EDTA (Sigma-Aldrich), pH 7,4)

Sójový fosfatidylcholin (Sigma-Aldrich)

Lipidové váčky byly připraveny ze sójového lecitinu (Sigma-aldrich) obdobně jako v kapitole 4.7.1, nebyly nicméně naplněny sondou – pro jejich „vytřepání“ byl použit vnější pufr, nebylo tedy třeba provádět gelovou filtraci. K homogenizaci byly použity filtry s 400nm póry. Koncentrace nebyla stanovována.

Suspenze byla před depozicí na žárovým výbojem aktivované 3mm TEM sítky potažené 5nm uhlíkovou blánou po 10 minut vystavena působení surfaktinu o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. 5 μl suspenze bylo na sítky ponecháno 30 s a poté odtaženo filtračním papírem. Část sítěk byla potažena 6 nm platiny pod úhlem 30° (výsledná tloušťka 3 nm) při tlaku 2×10^{-8} mbar ve vakuové pokovovačce Leica EM ACE900 (Leica microsystems). Druhá část sítěk byla ihned, ještě před vyschnutím, opláchnuta 3x 1% roztokem molybdenanu amonného. Poslední oplach byl na sítky ponechán po dobu 30 s a poté byl roztok odtažen filtračním papírem a sítky na vzduchu osušena.

Elektronmikroskopické snímky byly pořízeny pomocí transmisního elektronového mikroskopu Jeol JEM-1400 provozovaného při urychlovacím napětí 80kV vybaveného kamerou Matataki Flash.

4.11 Stanovení CMC pomocí fluorescence NPN

Materiál:

1 mmol/l surfaktin (Sigma-Aldrich) v 10 mmol/l NaOH (p. a., Lachema)

Dimetylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

1-N-fenylnaftylamin (Sigma-Aldrich)

SDS (Sigma-Aldrich)

Byla připravena koncentrační řada testované látky (SF v 10mmol/l NaOH a SDS v ddH₂O) tak, aby pokrývala koncentrace pod i nad očekávanou hodnotou CMC. Ke každému vzorku byla přidána sonda NPN na výslednou koncentraci 1 mmol/l (SDS) nebo 0,1 mmol/l (SF). Poté byla pro všechny vzorky změřena spektra emisní spektra při excitaci vlnovou délkou 380nm pomocí spektrofluorometru Fluoromax-3 (Jobin Yvon, Horiba. Ze spekter byla odečtena vlnová délka maxima intenzity a hodnota intenzity fluorescence při této vlnové délce. Tyto hodnoty byly

pro každou koncentraci vyneseny do grafu a z grafu byla odečtena hodnota, při které se vlnová délka maxima snížila ze 435 nm na 410 nm a intenzita maxima začala stoupat.

4.12 Stanovení CMC pomocí konduktivity

Materiál:

1 mmol/l surfaktin (Sigma-Aldrich) v 10 mmol/l NaOH (p. a., Lachema)

Dimetylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

SDS (Sigma-Aldrich)

Byla připravena koncentrační řada testované látky (SF v 10mmol/l NaOH a SDS v ddH₂O) tak, aby pokrývala koncentrace pod i nad očekávanou hodnotou CMC. Konduktivita každého vzorku byla změřena pomocí konduktometru. Zaznamenané hodnoty byly vyneseny do grafu, ze kterého byla odečtena hodnota koncentrace, při které zpomalil nárůst konduktivity s další přidanou látkou.

4.13 Stanovení CMC pomocí kapilární zónové elektroforézy

Materiál:

1 mmol/l surfaktin (Sigma-Aldrich) v 10 mmol/l NaOH (p. a., Lachema)

1 mmol/l surfaktin (Sigma-Aldrich) v Dimetylsulfoxidu (Sigma-Aldrich)

Dimetylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

Základní elektrolyt: 100 mmol/m NaCl, 5 mmol/l HEPES, 0,5 mmol/l Na₂EDTA, pH 7,4

Sonda: 0,1 mg/ml *N*-(1-Naftyl) etylendiamin dihydrochlorid (NEDA) + 0,1 mg/ml thiourea v základním elektrolytu

Kapilára (Silika, vnitřní průměr 50 μm, celková délka 49 cm, efektivní délka 40,5 cm; Polymicro Technologies, Phoenix, AR, USA) byla naplněna základním elektrolytem s požadovanou koncentrací SF, případně SF a DMSO, přičemž koncentrace DMSO byla vždy upravena na výslednou celkovou koncentraci 5 %. V kapilární elektroforéze Agilent 7100 CE System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) byla na začátek kapiláry hydrodynamicky injikována sonda (5 kPa × 5 s) a sledována doba jejího průchodu kapilárou při napětí 15kV (proud 83 μA). Sonda byla detekována pomocí absorpance při vlnové délce 240 nm.

4.14 Stanovení koncentrace surfaktinu pomocí LC-MS

Materiál:

1 mmol/l surfaktin (Sigma-Aldrich) v 10 mmol/l NaOH (p. a., Lachema)

Biomasa *B. subtilis* v exponenciální fázi růstu (viz kapitola 4.3)

100 mmol/l glukóza v 10 mmol/l HEPES (Fluka), pH 7,4

Methanol

Mobilní fáze: 0,1 % kys. mravenčí ve vodě a 0,1% kys. mravenčí v methylycyanidu v poměru 88:12 (v/v)

Exponenciálně rostoucí kultury z kapitoly 4.5 byly sedimentovány centrifugací a (5000g, 5 min, 25 °C) a resuspendovány v 100 mmol/l glukóze v 10 mmol/l HEPES (pH 7.4) na $OD_{420} = 0,2$ což přibližně odpovídá koncentraci 2×10^7 buněk /ml. K buňkám byl přidán odpovídající objem surfaktinu a směs byla inkubována po dobu 10 min při pokojové teplotě. Následně byly buňky opět sedimentovány centrifugací (10000g, 5min, 25 °C), supernatant byl odstraněn a surfaktin byl z peletu přes noc izolován methanolem za intenzivního míchání při 4°C.

Koncentrace surfaktinu v extraktu byla stanovena doc. RNDr. Petrem Kozlíkem Ph.D. pomocí kapalinového chromatografu Agilent Infinity 1290 s tandemovým hmotnostním spektrometrem Triple Quad 6460 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Byla použita kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4.6 mm, velikost částic 5 μm; Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) temperovaná na 25 °C. Chromatografie probíhala za izokratických podmínek s průtokem 1 ml/min. Objem injektovaného vzorku byl 5 μl. Hmotnostní spektrometrie byla prováděna v módu monitorování vybrané reakce s využitím pozitivní elektrosprejové ionizace. Bylo detekováno celkem 5 isoform surfaktinu (C12-16 s a bez sodného iontu) při m/z 994.6; 1016.6; 1008.6; 1030.6; 1022.6; 1044.6, 1036.6; 1058.6; 1050.6, a 1072.6. Zdroj iontů byl nastaven na teplotu plynu 300 °C, průtok 10 l/m, tlak v generátoru mlhovinového plynu 275 kPa a napětí v kapiláře 4 kV.

4.15 Simulace molekulární dynamiky

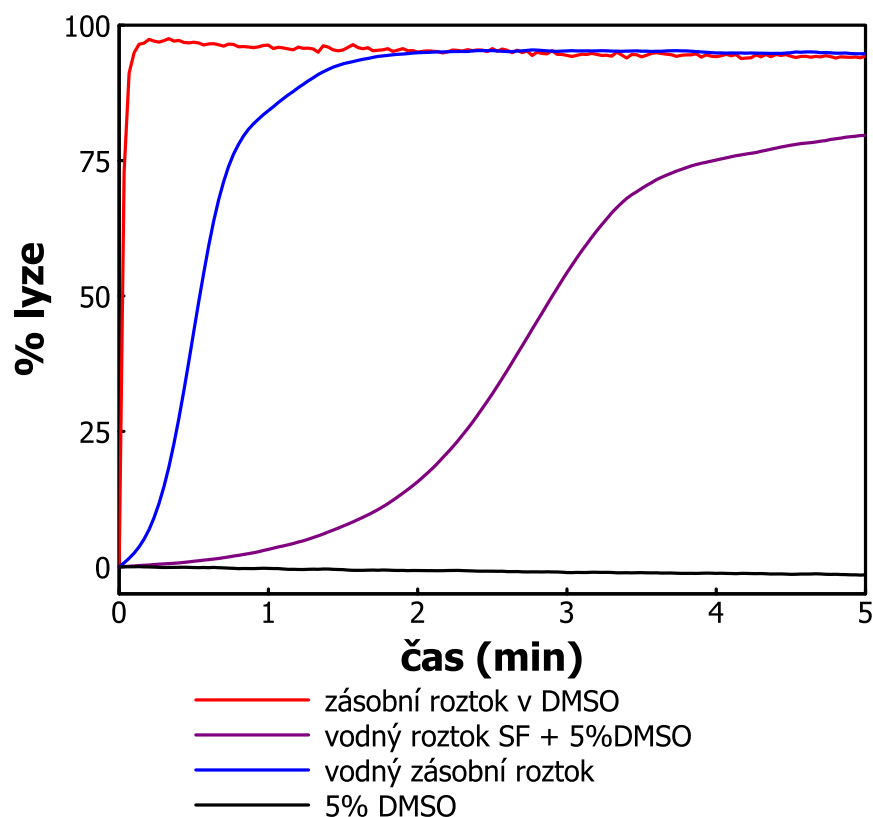
Silové konstanty pro surfaktin a DMSO byly vytvořeny pomocí serveru ParamChem (<https://cgenff.umaryland.edu/>). Energie systému byla minimalizována v průběhu 1000 kroků.

Newtonovy pohybové rovnice byly řešeny Verletovým algoritmem s 2 fs krokem pomocí softwarového balíčku NAMD (Phillips et al. 2005, Phillips et al. 2020). Teplota simulovaných systémů pak byla nastavena na 310 K. Simulace pokrývaly časový úsek 20 ns a teplota byla kontrolována Langevinovým termostatem s tlumícím koeficientem 1 ps. Tlak 1 atm byl udržován metodou Langevinova pístu s oscilační periodou 200 fs časovým měřítkem tlumení 100 fs. Van der Waalsovské interakce s krátkým dosahem byly počítány s parametry switching 10,0 Å a cutoff 12,0 Å. Elektrostatické interakce byly počítány pomocí Ewaldovy sumace. K vizualizaci výsledků byly použity softwarová balíčky VMD (Humphrey et al. 1996) a UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004).

5 Výsledky

5.1 Vliv použití DMSO jako rozpouštědla v zásobních roztocích surfaktinu

V průběhu vypracování diplomové práce jsem při měření kinetik úniku fluorescenční sondy z lipozomů zjistil poměrně výrazné rozdíly v účinnosti surfaktinu v závislosti na rozpouštědle použitého v zásobním roztoku. Obecně se pro přípravu zásobních roztoků používal dimethylsulfoxid (DMSO) pro svou velkou rozpouštěcí kapacitu. Alternativně je možné použít vodný roztok 10 mol/l NaOH, u kterého je možné spolehlivě dosáhnout koncentrace surfaktinu 1 mmol/l. Kinetiky úniku CF z DOPG lipozomů na Obr. V1 mají velmi rozdílné průběhy přesto, že koncentrace SF i lipozomů byla identická – zásobní roztok v DMSO způsobil 50% únik v čase $T_{1/2} = 4$ s s počáteční rychlostí lyze 1180 %/min zatímco vodný zásobní roztok této hodnoty dosáhl až po 30 s (počáteční rychlost 32 %/min). Dále jsme otestovali vodný roztok SF se současným přídatkem DMSO k suspenzi lipozomů. Výsledným složením byl tento roztok téměř identický, jako kdybychom přidávali SF z roztoku v DMSO (tj. 5% DMSO). Kinetika lyze byla ovšem přesto výrazně pomalejší i než srovnatelný přídavek bez DMSO – $T_{1/2} = 180$ s a počáteční rychlost pouhá 2 %/min. Samotný přídavek čistého DMSO na výslednou 5% koncentraci bez přítomnosti SF se na intenzitě fluorescence za sledovaný časový úsek nijak neprojevil. Není tedy pravděpodobné, že se jedná o přímý efekt DMSO nebo případně nějakou synergii. Možné vysvětlení se nabízí ve vlivu stavu agregace surfaktinu v různých zásobních roztocích v okamžiku přídatku. Vzhledem k nízké kritické micelární koncentraci surfaktinu (< 10 $\mu\text{mol/l}$, kapitola 5.3.3) je ve vysokých koncentracích surfaktin ve vodném roztoku predominantně ve formě micel a jen velmi málo ve formě monomerů. Naproti tomu v DMSO se dá očekávat převaha formy monomerů.

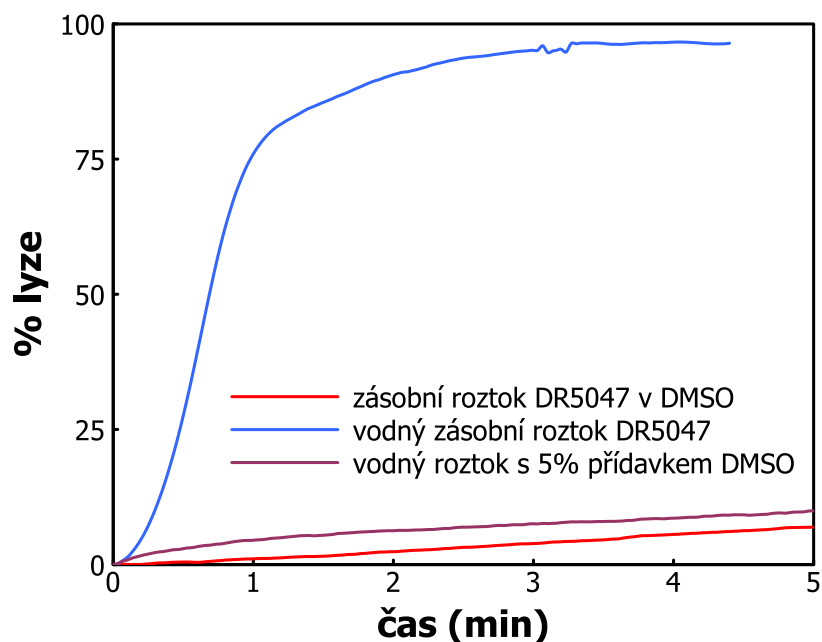


Obr. V1 Únik karboxyfluoresceinu z DOPG lipozomů podle přítomnosti DMSO

Rozdíl v kinetice lyze DOPG lipozomů mezi zásobním roztokem surfaktinu v DMSO (výsledná c DMSO 5%), vodným zásobním roztokem a vodným zásobním roztokem se současným přídávkem čistého DMSO do kyvety na výslednou c 5%. Koncentrace suspenze lipozomů 10 $\mu\text{mol/l}$. Koncentrace SF 50 $\mu\text{mol/l}$.

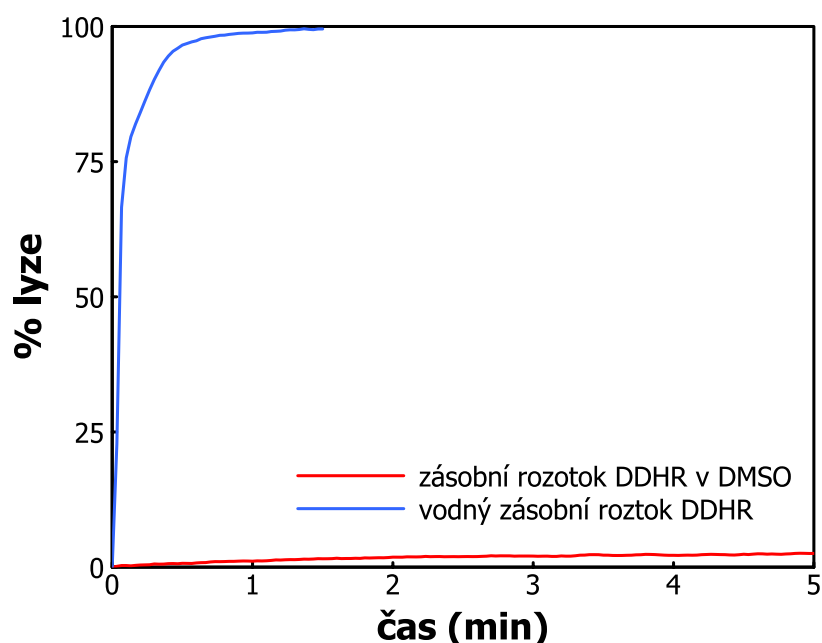
5.2 Vliv DMSO na účinnost dalších pórotvorných látek

Pomocí následujících experimentů jsme chtěli ověřit, do jaké míry je výše popsáný efekt specifický pro surfaktin. Použili jsme dvě další pórotvorné látky - lipofosfonoxin DR5047 (Panova et al. 2015) a pentaenový makrolid Didehydroroflamycoin (DDHR,(Koukalova et al. 2015)). Porovnávali jsme jejich pórotvornu aktivitu ve vodném roztoku a v roztoku s DMSO. Jak je zjevné z Obr. V2 a Obr. V3, ani u jedné z těchto pórotvorných látek se potencující efekt DMSO neprojevil a 5% koncentrace DMSO, ať už dosažená zásobním roztokem účinné látky nebo zvláštním přídávkem prakticky dokonale potlačila únik fluorescenční sondy z lipozomů. Účinek DMSO na obě pórotvorné látky byl tedy opačný než u surfaktinu.



Obr. V2 Únik karboxyfluoresceinu z DOPG lipozomů při použití 10 $\mu\text{g/ml}$ DR5047.

Rozdíl v kinetice lyze DOPG liposomů při použití zásobního roztoku lipofosfonoxinu DR5047 v DMSO (výsledná c DMSO 5%), vodným zásobním roztokem a vodným zásobním roztokem se současným přidavkem čistého DMSO do kyvety na výslednou c 5%. Koncentrace suspenze lipozomů byla 10 $\mu\text{mol/l}$.



Obr. V3 Únik karboxyfluoresceinu z DOPG lipozomů při použití 10 mg/ml DDHR.

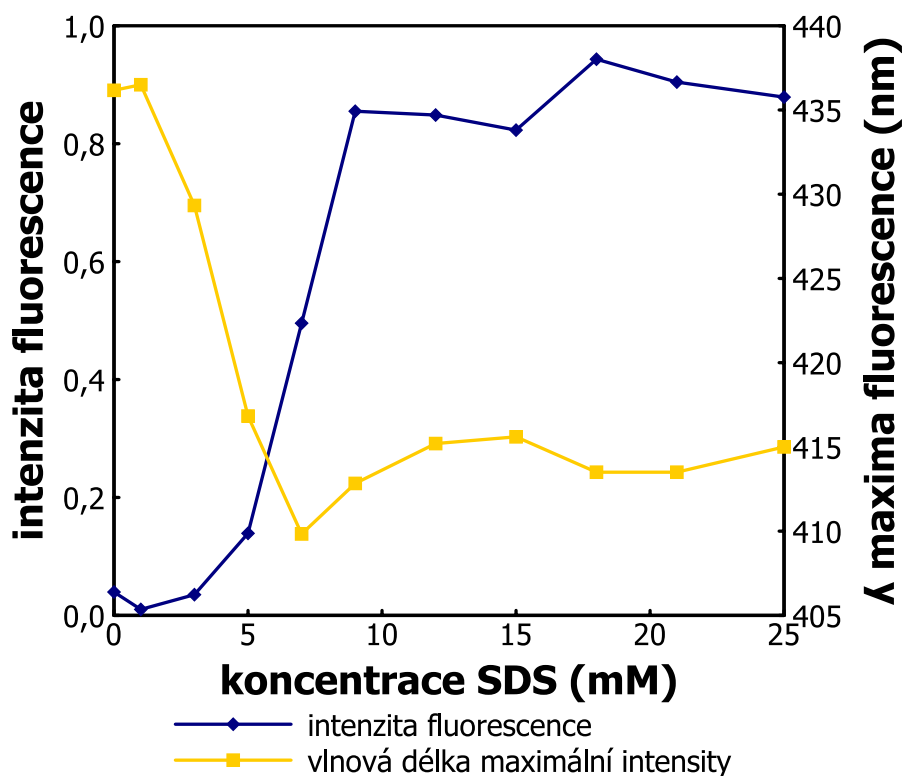
Rozdíl v kinetice lyze DOPG lipozomů při použití zásobního roztoku DDHR v DMSO (výsledná c DMSO 5%) a vodným zásobním roztokem bez přítomnosti DMSO. Koncentrace suspenze lipozomů byla 10 $\mu\text{mol/l}$.

5.3 Kritická micelární koncentrace surfaktinu

Vzhledem ke zvýšené aktivitě surfaktinu přidávaného ze zásobního roztoku DMSO jsme považovali za důležité porovnat kritickou micelární koncentraci (CMC) surfaktinu ve vodném roztoku s hodnotami pro roztok v DMSO a roztocích obsahujících DMSO. Chtěli jsme ověřit hypotézu, zda rozdíl v účinnosti obou roztoků surfaktinu může být způsoben různou dostupností monomerů surfaktinu. Vyzkoušeli jsme několik metod stanovení CMC – jako testovací látku pro validaci postupu jsme zvolili SDS.

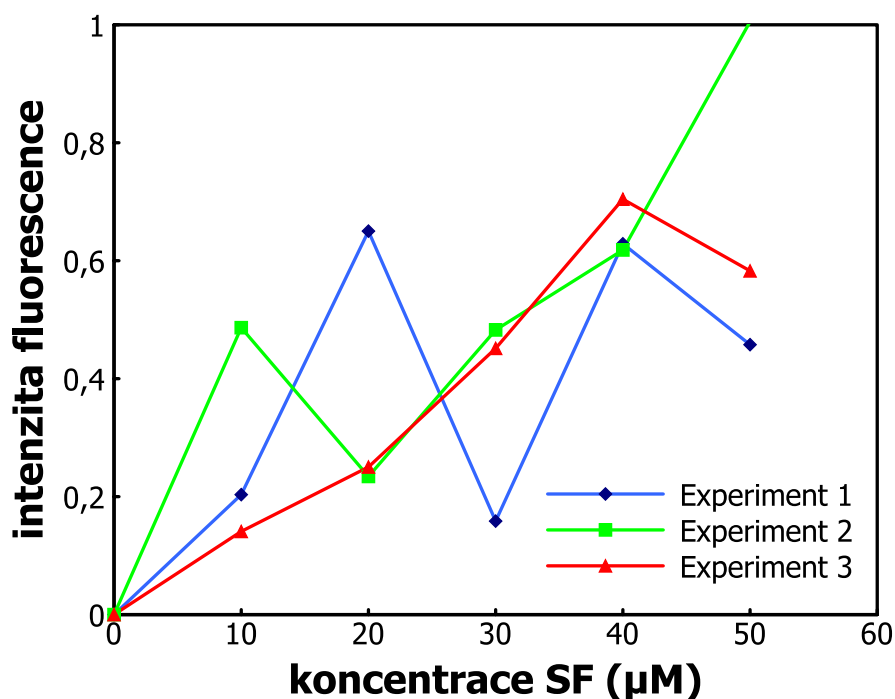
5.3.1 Fluorescence sondy NPN

První metodou bylo měření intenzity a vlnové délky sondy 1-N-fenylnaftylamin (NPN), která zvyšuje intenzitu a zkracuje vlnovou délku při přechodu do hydrofobního jádra micely. Validační pokus s SDS (Obr. V4) byl v souladu s hodnotou CMC udávanou v literatuře (8,2 mol/l, (Motin et al. 2015)), nicméně při reálném experimentu se surfaktinem (Obr. V5) jsme hodnotu CMC nebyli schopní z dat stanovit. Vzhledem k tomu, že koncentrace SF je o tři řády nižší, kapacita micel okolo CMC zřejmě není dostatečná na to, aby pojala dostatečné množství sondy. Nárůst intenzity fluorescence sice byl měřitelný, ale ani při minimalizování množství sondy (100 $\mu\text{mol/l}$) a koncentraci SF výrazně převyšující očekávanou CMC nemohlo dojít k saturaci. Data byla navíc vzhledem k nízkým měřeným intenzitám zatížena velkou chybou. Nárůst intenzity fluorescence byl relativně nízký v porovnání s intenzitou pozadí a spektrální posun tedy nebylo možné změřit.



Obr. V4 Kontrolní stanovení CMC SDS pomocí fluorescence NPN.

Graf ukazující závislost intenzity fluorescence (modrá, pravá osa) a vlnové délky maxima (žlutá, levá osa) na koncentraci SDS. Stanovená hodnota je mezi 6 a 10 mmol/l.

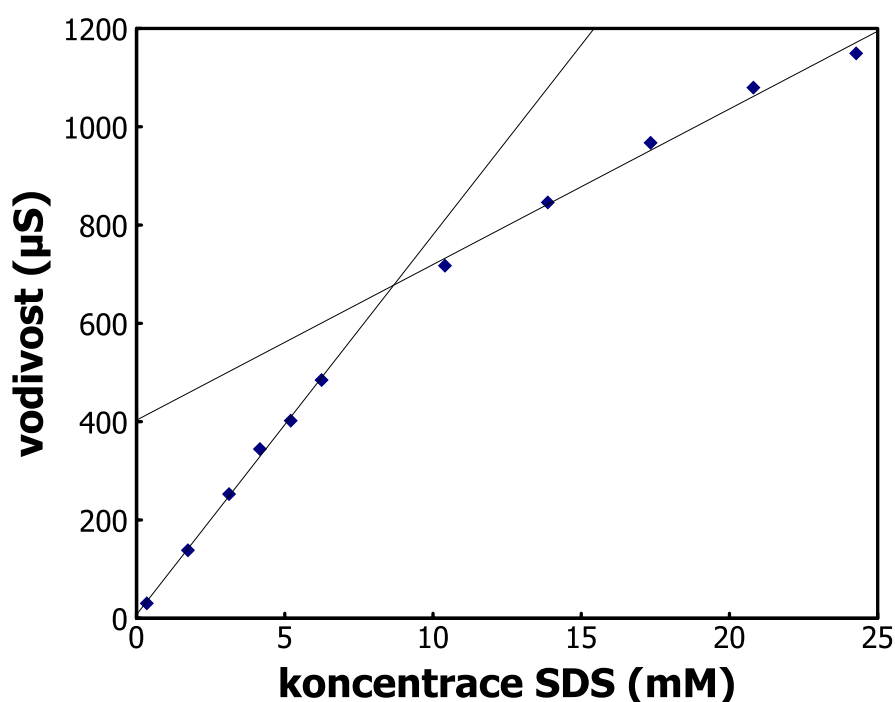


Obr. V5 Pokus o stanovení CMC surfaktinu pomocí fluorescence NPN

Metoda zřejmě nemá dostatečnou citlivost, dostatek místa v micelách, koncentrace je o tři řády nižší než u SDS.

5.3.2 Měření vodivosti roztoku

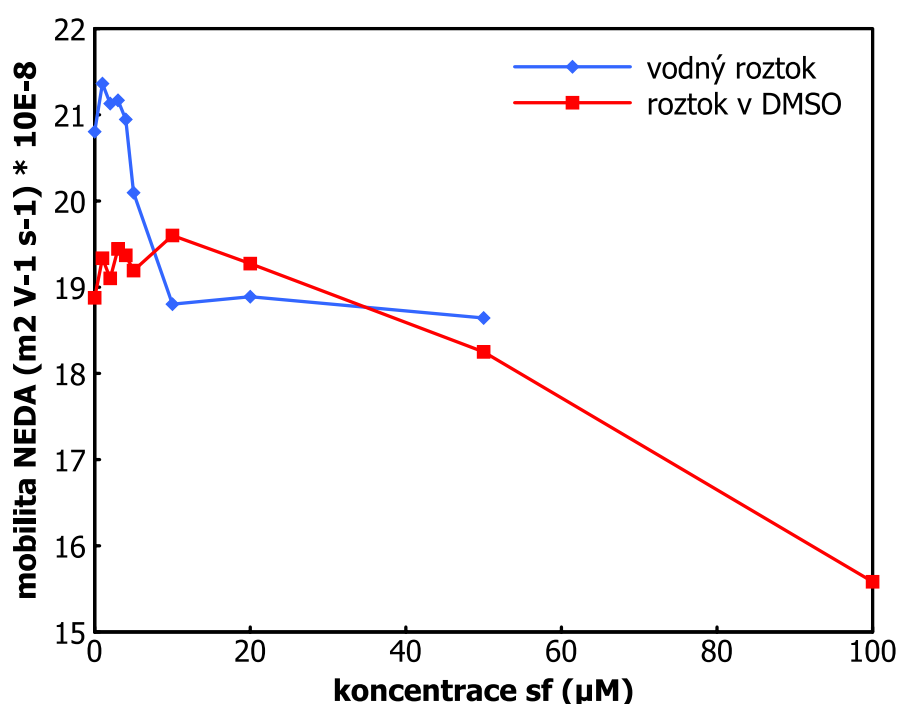
Další testovanou metodou bylo stanovení CMC měřením konduktivity roztoku. Teorie je taková, že surfaktin, coby nabitá molekula, bude přispívat k vodivosti roztoku lineárně s nárůstem koncentrace. Uspořádání do micel omezuje mobilitu tak, že další nárůst koncentrace bude znamenat menší zvýšení vodivosti roztoku. Validace s SDS (Obr. V6) potvrdila literární hodnotu CMC (8,2 mol/l, (Motin et al. 2015)) a měřené vodivosti rostly lineárně s koncentrací SDS v obou fázích křivky, zaznamenané vodivosti se pohybovaly v řádech stovek μS . Reálný pokus se surfaktinem ovšem selhal hned v počátku, když jsme změřili vodivosti v krajních koncentracích – 0 a 30 $\mu\text{mol/l}$. Vodivost roztoku bez SF byla 10,8 μS , zatímco vodivost roztoku SF s maximální zamýšlenou koncentrací byla mírně nižší – 9 μS . Ani tato metoda tedy nemá v našem uspořádání dostatečnou citlivost na stanovení CMC surfaktinu.



Obr. V6 Kontrolní stanovení CMC SDS pomocí měření konduktivity. Stanovená hodnota cca 8 mmol/l.

5.3.3 Mobilita sondy NEDA v kapilární elektroforéze

Poslední metodou pro stanovení CMC surfaktinu, kterou jsme vyzkoušeli, byla změna mobility sondy N-(1-Naftyl)etylendiamin dihydrochlorid (NEDA) v kapilární elektroforéze ve spolupráci s Doc. Tomášem Křížkem, PhD. z Katedry analytické chemie PŘF UK. Citlivost této metody byla dostatečná a podařilo se (Obr. V7) ověřit literární hodnotu CMC SF ve vodném prostředí (okolo 5 $\mu\text{mol/l}$). V přítomnosti DMSO byla závislost mobility NEDA na koncentraci surfaktinu výrazně ovlivněna a v dostupných koncentracích ještě nebylo dosaženo ustálení hodnoty. Můžeme ale se značnou jistotou říct, že CMC SF v přítomnosti DMSO je významně zvýšená (> 100 $\mu\text{mol/l}$), a tedy že v roztoku s DMSO bude tedy více dostupných monomerů.



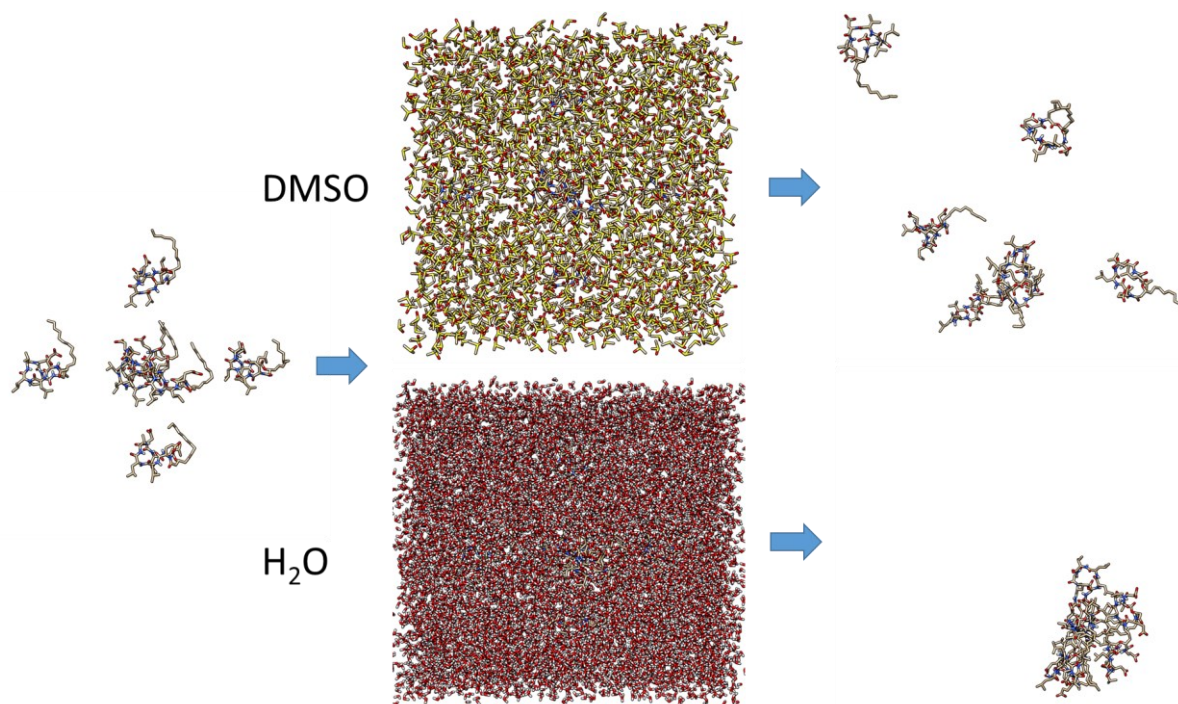
Obr. V7 Stanovení CMC SF pomocí mobility NEDA v kapilární elektroforéze.

CMC surfaktinu ve vodném roztoku cca 5-10 $\mu\text{mol/l}$, v přítomnosti 5% DMSO je hodnota vyšší než 100 $\mu\text{mol/l}$.

5.3.4 Simulace molekulární dynamiky

Pro lepší pochopení chování surfaktinu v použitých roztocích jsme se rozhodli využít *in silico* model surfaktinu pro simulace molekulární dynamiky. Ve spolupráci s RNDr. Ivanem Barvíkem PhD. z Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy jsme simulovali 7 molekul surfaktinu ve vodném roztoku a v čistém DMSO po dobu 20 ns. Na Obr. V8 vidíme, že v DMSO SF zůstává v podobě monomerů bez výraznější vzájemné interakce, zatímco ve vodném prostředí se

velmi rychle uspořádal do podoby micely s hydrofilními zbytky exponovanými do vnějšího prostředí a hydrofobním jádrem. Tyto simulace tedy podporují představu, že forma surfaktinu, které jsou membrány vystaveny, se mezi použitými zásobními roztoky liší – ve vodném je surfaktin primárně ve formě micel a v DMSO ve formě monomerů.



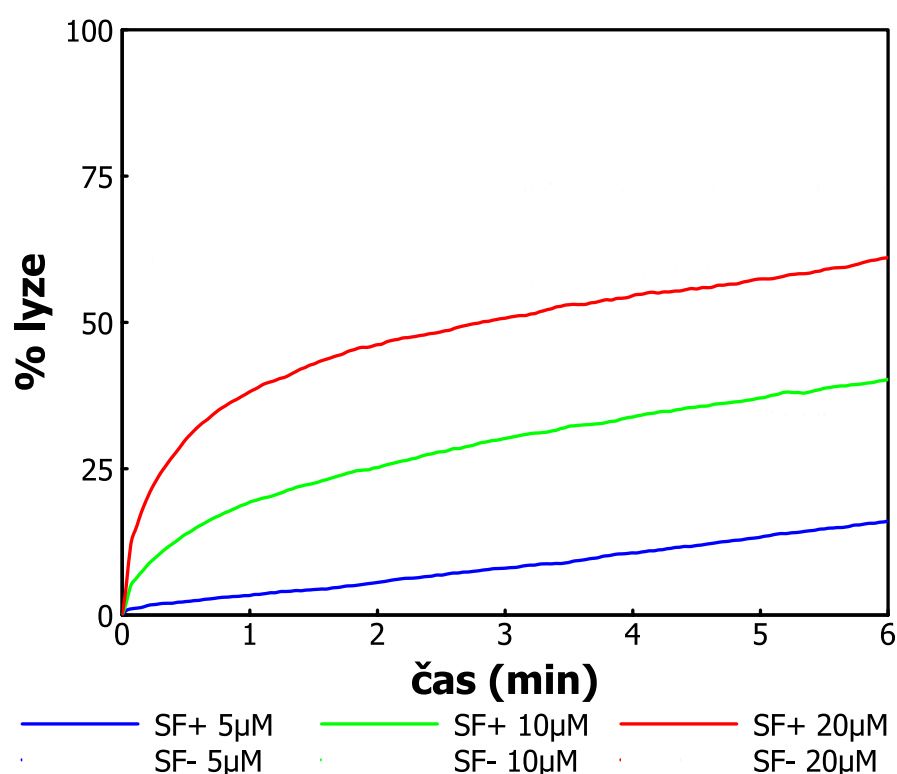
Obr. V8 Simulace molekulární dynamiky SF ve vodném roztoku a v DMSO

Obrázek ukazuje uspořádání molekul surfaktinu po 20 ns simulace. Z počátečního stavu (vlevo) se molekuly ve vodném roztoku (dole) samouspořádaly do micely, zatímco v DMSO (nahore) k žádné interakci ve sledovaném časovém úseku nedochází.

5.4 Lyze lipozomů připravených z lipidových extraktů kmenů SF+ a SF-

Pro průkaz adaptace *B. subtilis* proti působení surfaktinu na úrovni složení membrány jsme pomocí metody úniku fluorescenční sondy z lipozomů porovnali náchylnost lipozomů k lyzi vyvolané surfaktinem. Lipozomy byly připraveny z celkových lipidových extraktů z kultur dvou kmenů *B. subtilis* – divokého kmene SF+ produkujícího surfaktin a mutantního kmene SF- deficientního v produkci surfaktinu. SF+ byl tedy v průběhu růstu vystaven koncentracím vlastního surfaktinu okolo 84 $\mu\text{mol/l}$ (Seydlova et al. 2013), zatímco SF- se před izolací lipidů se surfaktinem neseťkal. Únik sondy byl při všech použitých koncentracích surfaktinu rychlejší

u membrán izolovaných ze SF- buněk a dosáhl vyšší maximální hladiny (Obr. V9). Efekt byl nejvýraznější u nejnižší koncentrace (5 μ mol/l surfaktin), kde byla počáteční rychlost lyze pouhých $v = 2,7 \text{ %/min}$ u SF+ membrán proti $66,6 \text{ %/min}$ u SF-. Ve vyšších koncentracích surfaktinu nebyl rozdíl tak výrazný (ale v 10 i 20 μ mol/l SF byla počáteční rychlost u SF- více než 4x vyšší). Obecně bylo u SF+ potřeba přibližně dvojnásobná koncentrace surfaktinu pro dosažení srovnatelného efektu jako u SF-.



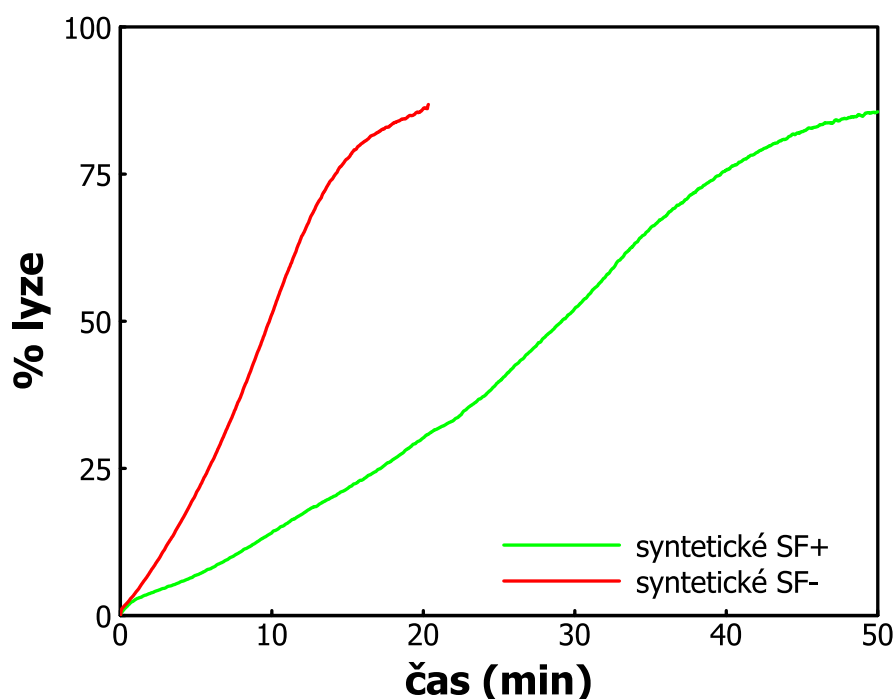
Obr. V9 Únik karboxyfluoresceinu z lipozomů tvořených celkovým lipidovým extraktem ze SF+ a SF- kmenů *B. subtilis*.

Fosfolipidové složení extraktů bylo dříve popsáno v (Seydlova et al. 2013) – viz Obr. L10. Surfaktin přidán v čase 0 na výslednou koncentraci 5, 10 a 20 μ mol/l. 100% únik sondy byl dosažen pomocí 0,1% Tritonu X-100. Koncentrace lipidů byla 10 μ mol/l.

5.5 Lyze lipozomů ze směsi syntetických lipidů napodobujících extrakty SF+ a SF-
Následně jsme připravili syntetické směsi lipidů, svým složením napodobující výše použité extrakty. Rozhodli jsme se použít ternární systém s použitím lipidů, jejichž zastoupení se v reakci na surfaktin mezi kmeny SF+ a SF- nejvíce měnilo (Seydlova et al. 2013). Jedná se o fosfatidylglycerol (PG), fosfatidyletanolamin (PE) a kardiolipin (CL). Kmen SF+ reprezentovaly

DOPG/DOPE/TOCL v poměru 0,35 : 0,20 : 0,45 (w/w/w) a SF- v poměru 0,55 : 0,30 : 0,15 (w/w/w). Celkově byly lipozomy tvořené ze syntetických diolelyglycerofosfolipidů výrazně odolnější než ty tvořené z lipidových extraktů. Lipozomy napodobující SF- složení byly dle očekávání výrazně náchylnější k permeabilizaci surfaktinem – jejich celková rychlost lyze byla $v = 5 \text{ %/min}$ ve srovnání s $v = 1,7 \text{ %/min}$ u SF+. Obr. V10 navíc ukazuje neobvyklý průběh křivek nárůstu intenzity fluorescence ve tvaru písmene S, který naznačuje vícefázovou kinetiku.

Adaptace proti permeabilizačnímu působení surfaktinu již na úrovni lipidového složení membrány se tak podařila prokázat jak na izolátech z živých bakterií, tak pomocí směsi syntetických fosfolipidů.



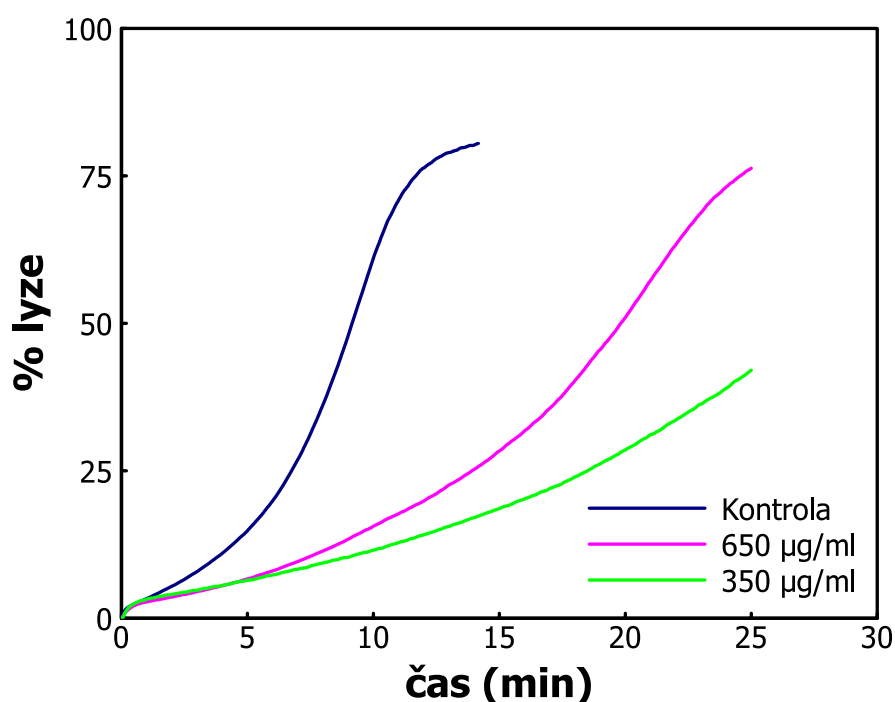
Obr. V10 Únik karboxyfluoresceinu z lipozomů napodobujících složení SF+ a SF-

Lipozomy připravené ze směsí syntetických lipidů napodobujících lipidové izoláty prezentované v Obr. V1 - DOPG:DOPE:TOCL 0,35 : 0,20 : 0,45 (w/w/w) a 0,55 : 0,30 : 0,15 (w/w/w) pro SF+ a SF-. Surfaktin přidán v čase 0 na výslednou koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$. 100% únik sondy byl dosažen pomocí 0.1 % Tritonu X-100. Koncentrace lipidů byla 10 $\mu\text{mol/l}$.

5.6 Lipozomy ze směsí syntetických lipidů napodobující extrakty kmene SF- adaptovaných na různé koncentrace SF

V průběhu práce na projektu jsme zjistili, že i při vystavení exponenciálně rostoucí kultury *B. subtilis* kmene SF- externě přidanému surfaktinu dochází k výrazné změně lipidového

složení (Uttlová et al. 2016). Následující experimenty měly za cíl napodobit membrány kultur vystavených různé koncentraci surfaktinu. Jak je ve výše zmíněné publikaci popsáno, obě koncentrace surfaktinu způsobily v porovnání s kontrolou zastavení růstu a následný obnovený růst s mírně zvýšenou dobou zdvojení pro koncentraci 350 $\mu\text{g/ml}$ a výrazně sníženou růstovou rychlostí při koncentraci 650 $\mu\text{g/ml}$. Obr. V11 ukazuje, že obě směsi napodobující adaptované membrány odolávaly permeabilizaci surfaktinem lépe než směs napodobující naivní membrány.



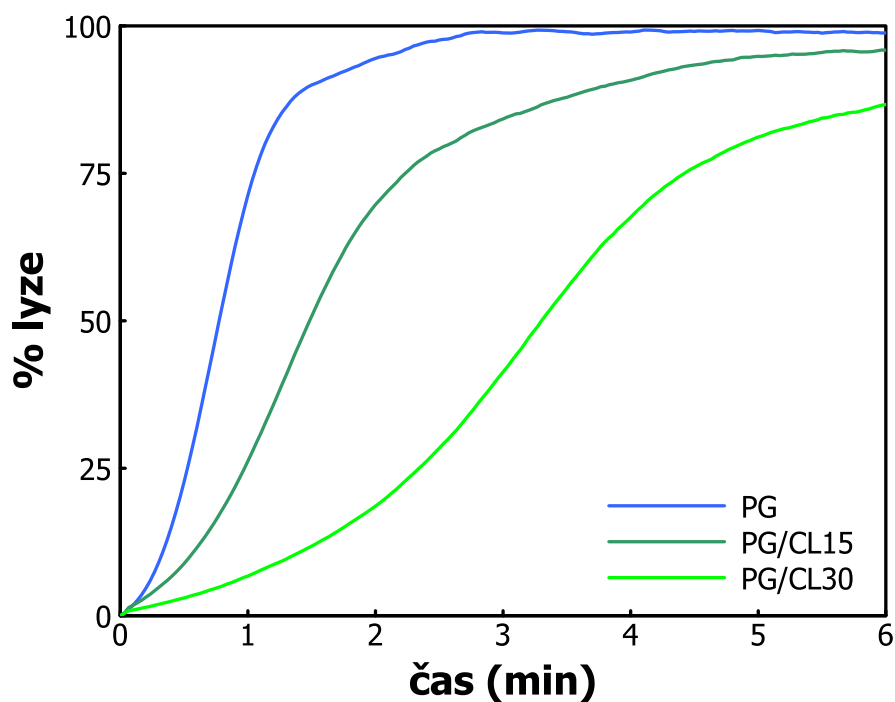
Obr. V10 Únik karboxyfluoresceinu z lipozomů tvořených směsí napodobujících membrány SF- kmene *B. subtilis* vystavené různým koncentracím surfaktinu

Lipozomy připravené ze směsí napodobujících složení kontrolní kultury SF- (PG:PE 2:1) a kultur vystavených 650 $\mu\text{g/ml}$ a 350 $\mu\text{g/ml}$ složené z PG:PE 1:1, respektive PG:PE:PA 1:1:1. Surfaktin přidán v čase 0 na výslednou koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$. 100% únik sondy byl dosažen pomocí 0,1% Tritonu X-100. Koncentrace lipidů byla 10 $\mu\text{mol/l}$.

Obě směsi napodobující membrány adaptovaných kultur byly odolnější než membrána naivní, přičemž složení napodobující buňky rostoucí při stimulační koncentraci odolávalo ještě lépe než složení napodobující buňky rostoucí při vyšší, inhibiční koncentraci SF. U všech křivek je zřejmá vícefázová kinetika. S výjimkou kinetiky „stimulace“, která vyžadovala proložení třemi funkcemi, se křivky nedaly uspokojivě proložit Hillovou funkcí (viz kapitola 4.7.4).

5.7 Vliv obsahu kardiolipinu na lyzi lipozomů vyvolanou surfaktinem

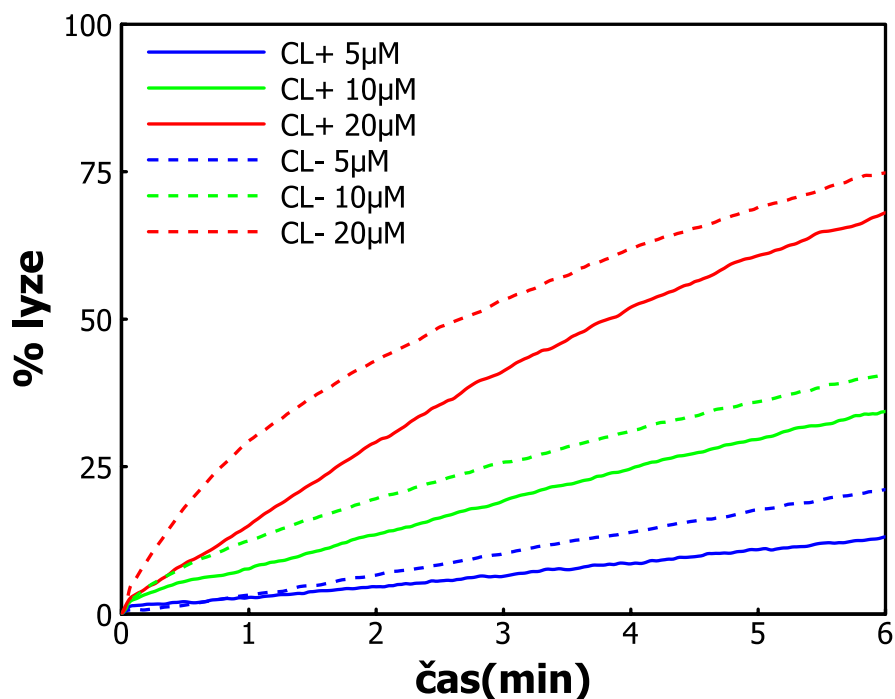
Z předchozích dat srovnávajících SF+ a SF- kmen během produkční fáze surfaktinu je zjevné (kapitoly 5.4 a 5.5), že zastoupení fosfolipidů má zásadní vliv na citlivost membrány vůči působení surfaktinu. Hlavním rozdílem mezi srovnávanými systémy byl nárůst koncentrace kardiolipinu na úkor ostatních fosfolipidových tříd. Rozhodli jsme se tedy otestovat efekt přidavku kardiolipinu do čistého nosičového lipidu – rozhodli jsme se pro PG, jelikož se jedná o majoritní lipid *B. subtilis*. Obr. V12 ukazuje kinetiku lyze lipozomů s různou koncentrací CL (15 a 30 %) v PG. Z průběhu křivek nárůstu intenzity fluorescence je zjevné, že přidavek kardiolipinu má stabilizující účinek, který je při jeho vyšší výsledné koncentraci výraznější. Počáteční rychlost lyze byla 57,4%/min u lipozomů z čistého PG a 41,7%/min, resp. 17,2%/min u směsí obsahujících 15 a 30 % kardiolipinu. Můžeme tedy tvrdit, že samotný nárůst podílu kardiolipinu v membráně zpomaluje permeabilizaci indukovanou surfaktinem, a to v závislosti na jeho koncentraci v membráně.



Obr. V12 Únik karboxyfluoresceinu z lipozomů jako funkce koncentrace kardiolipinu.
Pro přípravu lipozomů byl použit čistý DOPG a DOPG s přidavkem 15 a 30 % (w/w) TOCL. Surfaktin přidán v čase 0 na výslednou koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$. 100% únik sondy byl dosažen pomocí 0,1% Tritonu X-100. Koncentrace suspenze lipozomů byla 10 $\mu\text{mol/l}$.

5.8 Lyze lipozomů připravených z lipidových extraktů s různým obsahem kardiolipinu

Předchozí experimenty ukazují na zásadní roli kardiolipinu v obraně membrány před permeabilizací surfaktinem. Rozhodli jsme se tedy ověřit tuto roli v komplexním prostředí cytoplazmatické membrány *B. subtilis* neadaptované na surfaktin. Použili jsme kontrolní divoký kmen označený jako CL+ a z něj vycházející mutantní kmen neschopný produkce kardiolipinu, dále označovaný jako CL-, jehož membrána místo CL obsahuje adekvátně větší podíl PG. Tyto kmeny neprodukují v žádné růstové fázi SF a nebudou tedy nést žádné případné další adaptace. Z exponenciálně rostoucích kultur těchto dvou kmenů jsme izolovali lipidový extrakt a z něj opět připravili lipozomy naplněné karboxyfluoresceinem, které jsme dále vystavili působení 5, 10 a 20 $\mu\text{mol/l}$ surfaktinu (Obr. V13). V obou vyšších koncentracích byla počáteční rychlost lyze CL- membrán přibližně dvojnásobná (32 %/min vůči 13,7 %/min a 15,5 %/min vůči 7,9 %/min u 20, resp. 10 $\mu\text{mol/l}$ SF), u koncentrace 5 $\mu\text{mol/l}$ byl rozdíl méně výrazný – 2,2 proti 2,0 %/min.



Obr. V13 Únik karboxyfluoresceinu z lipozomů tvořených celkovým lipidovým extraktem z CL+ a CL- kmenů *B. subtilis*.

Surfaktin byl přidán v čase 0 na výslednou koncentraci 5, 10 nebo 20 $\mu\text{mol/l}$. 100% únik sondy byl dosažen pomocí 0,1% Tritonu X-100. Koncentrace suspenze lipozomů byla 10 $\mu\text{mol/l}$.

5.9 Analýza křivek kinetik lyze lipozomů

Pro detailní analýzu křivek lyze různých lipozomárních systémů jsme použili prokládání Hillovou funkcí, jejíž parametry vyjadřují celkovou **amplitudu (α)**, tedy procento maximální možné lyze, kterou daný děj dosáhne (a také relativní míru, do jaké se uplatňuje v každé křivce v porovnání s dalšími funkcemi), **poločas (τ)**, který vyjadřuje rychlost průběhu popisovaného děje, a **Hillův koeficient (n)**, který vyjadřuje kooperativitu popisovaného děje, což lze pochopit jako míru, do jaké má každá další jednotka účinné látky větší (nebo menší) efekt než předchozí. Typicky bude $n < 1$ mít děj, u kterého bude docházet k nasycení, a $n > 1$ například děj, který vyžaduje k průběhu oligomerizaci jednotek účinné látky. Dále jsme u křivek stanovili počáteční rychlost lyze (směrnice přímkou proložené prvními deseti body po přidavku) a pokud možno také čas dosažení 50 % maximální lyze ($T_{1/2}$). Parametry jsou shrnuty v Tabulce V1.

Tabulka V1 Parametry funkcí proložených křivkami úniku karboxyfluoresceinu z lipozomů.

	Obr,	Surfactin ($\mu\text{mol/l}$)	α	τ	n	v (%/min)	$T_{1/2}$ (min)
izolované SF+	V8	5	3,3	44,9	0,6	2,7 \pm	*
			26,8	276,1	2,4	0,3	
	V8	10	8,8	31,2	0,7	54,1 \pm	*
			69,1	935,0	0,7	10,0	
	V8	20	20,1	18,3	0,8	122,6 \pm	2,95 \pm 0,12
			70,6	490,6	0,7	21,0	
izolované SF-	V8	5	10,8	11,3	0,7	66,6 \pm	*
			30,2	213,5	0,7	16,8	
	V8	10	34,9	8,0	0,7	247,1 \pm	0,97 \pm 0,3
			28,0	247,0	0,4	44,6	
	V8	20	46,6	3,2	1,3	561,3 \pm	0,12 \pm 0,02
			27,2	78,5	0,3	32,1	
syntetické SF+	V9	50	5,6	169,7	0,7	1,7 \pm	30,0 \pm 0,5
			50,6	867,5	2,7	0,0	

			38,3	490,2	50,3		
syntetické SF-	V9	50	8,6	300,8	0,6	5,0 ± 0,0	11,0 ± 1,5
			42,5	284,8	2,6		
			38,0	184,2	27,0		
PG/--	V11	50	48,7	44,6	1,6	57,4 ± 4,8	0,9 ± 0,1
			49,5	17,0	13,7		
PG/CL15	V11	50	47,8	66,2	0,9	41,7 ± 6,7	1,2 ± 0,2
			50,0	28,5	8,4		
PG/CL30	V11	50	64,0	166,3	1,1	17,2 ± 2,1	2,9 ± 0,4
			32,9	44,6	34,0		
izolované CL+	V12	5	3,3	307,8	0,2	2,0 ± 0,8	*
			21,7	326,7	2,0		
	V12	10	4,0	9,1	0,8	7,9 ± 0,4	*
			59,7	360,6	1,5		
	V12	20	8,8	54,9	0,6	13,7 ± 1,0	2,7 ± 0,0
			82,2	204,5	1,6		
izolované CL-	V12	5	4,5	60,6	1,4	2,2 ± 0,2	*
			28,3	227,3	2,6		
	V12	10	7,9	19,8	0,8	15,5 ± 2,4	*
			59,3	305,2	1,6		
	V12	20	55,9	99,9	0,9	32,0 ± 0,8	3,7 ± 0,1
			35,4	160,2	4,7		

Tabulka shrnující parametry funkcí použitých k popisu kinetik lyze lipozomů. Hodnoty v (%/min) a $T_{1/2}$ (min) ukazují průměrné hodnoty ± směrodatnou odchylku z alespoň tří analyzovaných křivek. Parametry α , τ a n ukazují hodnoty reprezentativní křivky ukázané v odpovídajícím Obr. Směrodatné odchylky pro hodnoty α , τ and n nepřekračují 15 %.

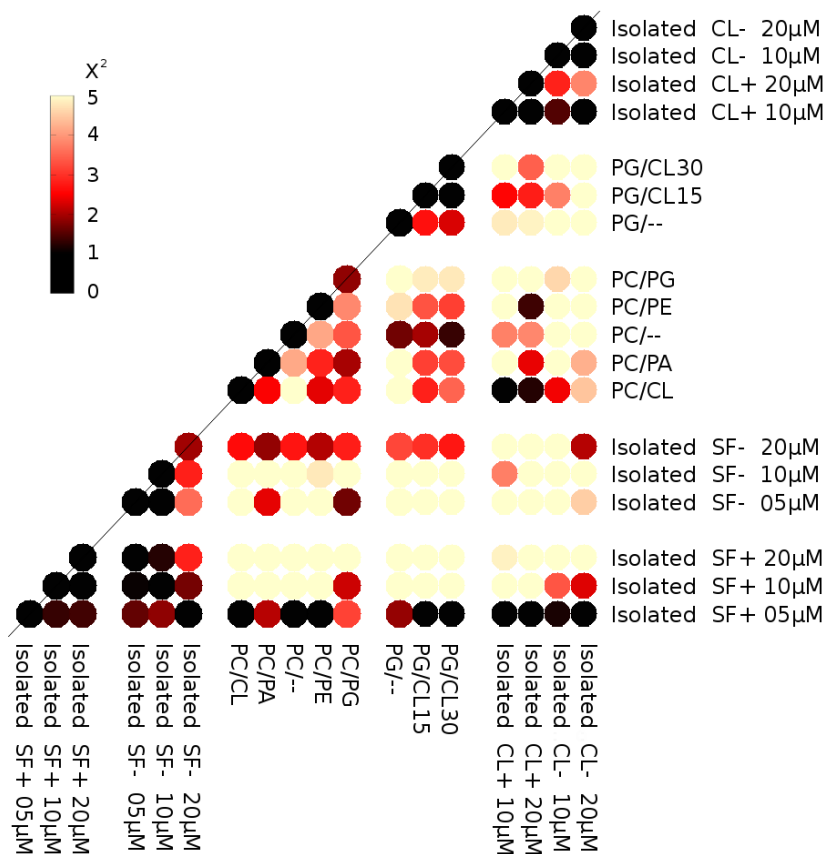
* Hodnota $T_{1/2}$ nemohla být určena, protože kinetika ve sledovaném časovém úseku nedosáhla 50 % maximální intenzity.

Počáteční rychlost a čas dosažení poloviny maximální intenzity jsme používali k přímému porovnání účinnosti permeabilizačního efektu v jednotlivých experimentech, parametry a

počet prokládaných funkcí napovídají o charakteru dějů na molekulární úrovni. Typicky bylo možné v průběhu kinetik nalézt alespoň dvě funkce – jednu s negativní kooperativitou a jednu kooperativní jejíž efekt se s přibývajícím časem zesiloval.

5.10 Komparativní analýza kinetik lyze lipozomů

Pro lepší pochopení a srovnání rozdílů a podobností průběhů lyze lipozomů jsme s pomocí doc. RNDr. Radovana Fišera Ph.D. provedli komparativní analýzu tvarů křivek. Matice v Obr. V13 ukazuje, jak přesně se dají v programu Gnuplot 5.0 pomocí funkce (sumy funkcí) proložené jednotlivými datovými řadami popsat ostatní datové řady. Vzhledem k rozdílným časovým měřítkům jednotlivých experimentů jsme umožnili volně měnit měřítko na osách x i y . Jednoduše řečeno – kdybychom měli datové řady A, B a C a jimi proložené funkce (sumy funkcí) a , b a c , zkusili bychom funkci a proložit řadami B a C a zjistit, zda její přeškálování nevede k lepšímu popisu dat a zaznamenali hodnotu nejmenší odchylky χ^2 . Stejně bychom funkci b proložili řadami A a C a funkci c řadami A a B atd. Zaznamenaná odchylka – čím menší, tím podobnější si funkce byly svým průběhem – byla graficky znázorněna pomocí barevné škály odpovídající χ^2 $\langle 0-5 \rangle$. Do analýzy byly zahrnuty i kinetiky lyze lipozomů s přísádky různých lipidů k PC lipozómům z diplomové práce, které byly taktéž použity v publikaci (Pinkas et al. 2020).



Obr. V14 Porovnání kinetik lyze lipozomů

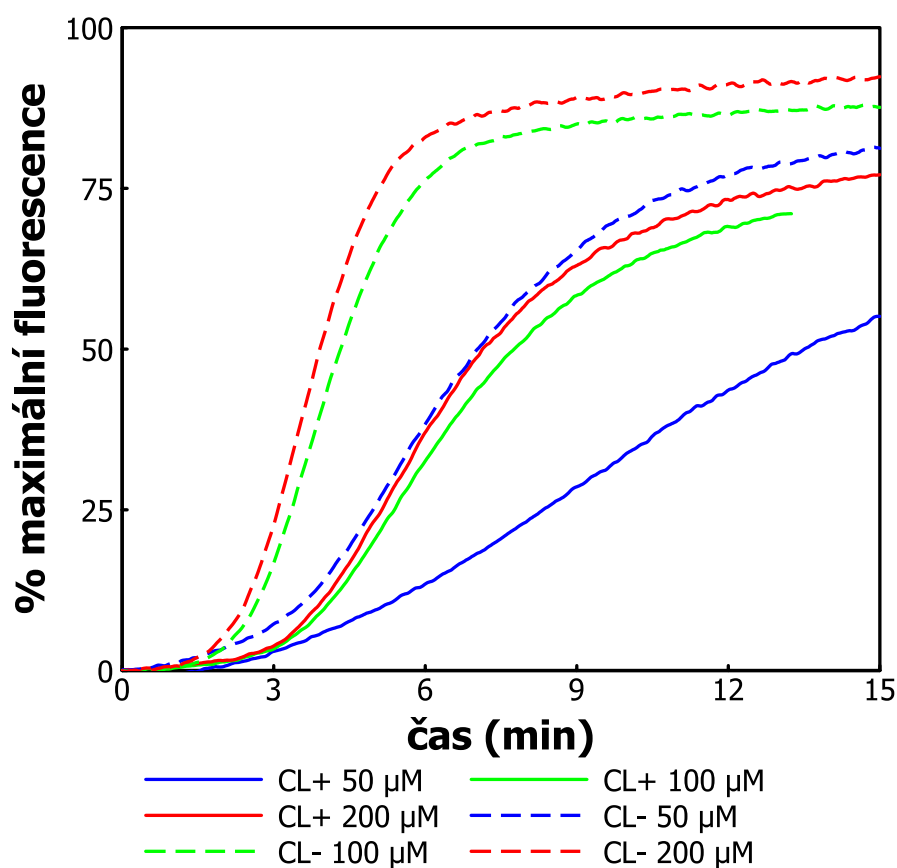
Graficky znázorněné srovnání podobnosti kinetik lyze lipozomů různého složení. Černá je nejpodobnější, žlutá je nejodlišnější. Prokládá se vždy datová řada znázorněná na svislé ose funkcemi použitými pro popis kinetiky na horizontální ose. Převzato z (Pinkas et al. 2020).

Na matici odchylek můžeme učinit několik pozorování. Za prvé, kinetika lyze lipozomů z izolovaných lipidů SF+ s nejnižší koncentrací SF šla zdánlivě dobře proložit jakoukoliv funkcí kvůli velmi nízké amplitudě lyze a pomalému průběhu. Za druhé, kinetiky jsou si většinou nejpodobnější v rámci jednotlivých experimentů. Oproti tomu izolované lipidy a směsi připravené ze syntetických diolelyfosfolipidů mají výrazně odlišný průběh.

5.11 Permeabilizace živých bakterií

Abychom ověřili protektivní účinek kardiolipinu na živém systému, vystavili jsme působení surfaktinu přímo živé exponenciální kultury CL+ a CL-, které opět nebyly žádným způsobem adaptované na přítomnost surfaktinu. Jediným rozdílem byla přítomnost/nepřítomnost kardiolipinu v membráně. Jejich hynutí jsme sledovali pomocí fluorescenční sondy propidium

jodidu, který neprochází dovnitř intaktních buněk, ale tvoří fluorescenční produkt s DNA v buňkách permeabilizovaných. Testovali jsme tři koncentrace surfaktinu – 50, 100 a 200 $\mu\text{mol/l}$. Na Obr. V15 vidíme, že buňky kmene CL- (neobsahující v membránách kardiolipin) byly permeabilizovány výrazně rychleji než buňky divokého kmene CL+. Rychlost hynutí CL+ buněk s nejvyšší koncentrací SF byla srovnatelná s rychlostí hynutí CL- s koncentrací nejnižší. Při odstranění kardiolipinu z membrány tedy k dosažení srovnatelného účinku stačí čtvrtinové množství surfaktinu. Můžeme tedy konstatovat, že kardiolipin má zásadní vliv na ochranu membrány před permeabilizujícím účinkem surfaktinu i v komplexním prostředí membrány živé buňky.

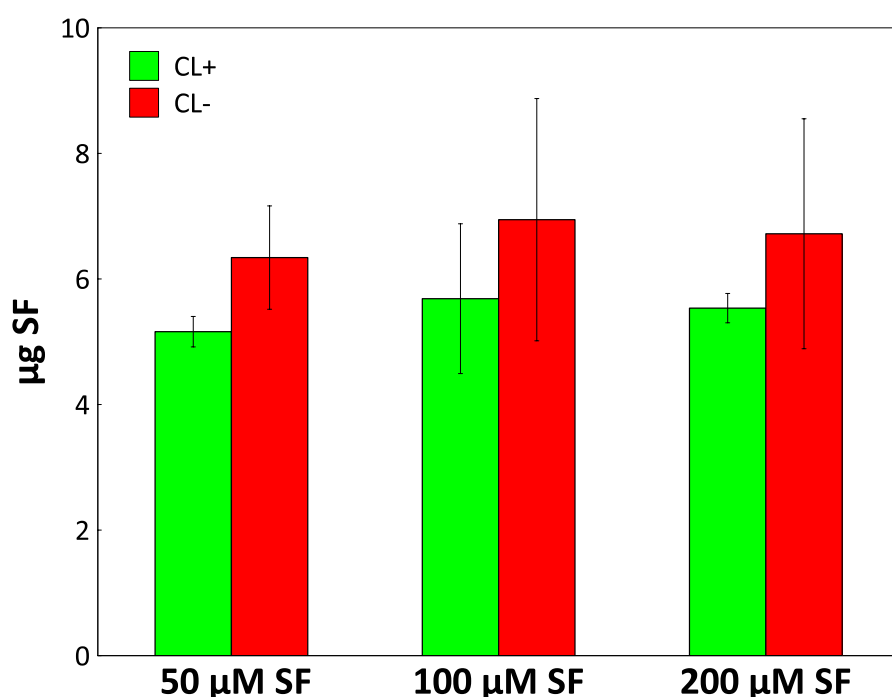


Obr. V15 Propidium iodidový test s živými buňkami CL+ a CL- kmenů *B. subtilis*.

Koncentrace buněk byla $2 \times 10^7/\text{ml}$. Surfaktin byl přidán v čase 0 na výslednou koncentraci 50, 100 a 200 $\mu\text{mol/l}$. 100% permeabilizace byla dosažena 2,5 $\mu\text{mol/l}$ melittinem.

5.12 Záchyt SF v membráně živých bakterií

Pro ověření, zda se ochranný účinek CL vůči pórotvorné aktivitě SF odehrává na úrovni snížení vazby na membránu nebo, v případě negativního výsledku v rozdílech vazby, na úrovni tvorby vlastních pórů jsme se ve spolupráci s doc. RNDr. Petrem Kozlíkem, PhD. z Katedry analytické chemie PŘF UK pokusili změřit a porovnat množství surfaktinu navázaného na membrány CL+ a CL- buněk pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Obr. V16). CL- buňky vázaly více SF, i když zaznamenané rozdíly byly minimální. Množství SF zachyceného v buňkách navíc nerostlo s koncentrací přidaného SF, což naznačuje nějakou formu saturace systému ať už na úrovni reálného záchytu SF v membráně nebo detekčního limitu metody.



Obr. V16 Záchyt SF v membráně CL+ a CL- buněk

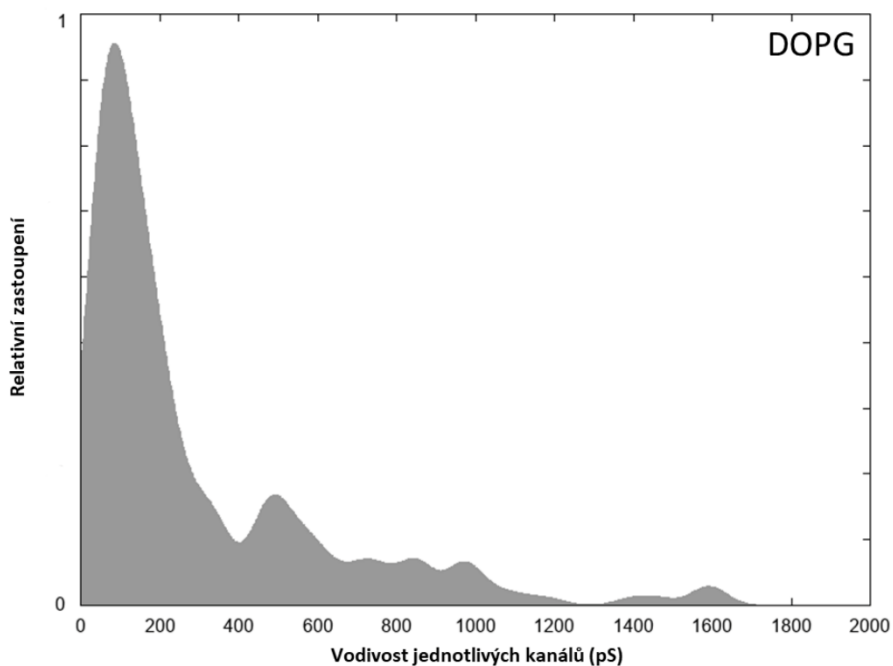
Množství SF izolované z 500 μl buněčné suspenze exponenciálních kultur CL+ a CL- buněk o koncentraci 2×10^7 /ml vystavené uvedené koncentraci SF po dobu 10 min.

5.13 Měření vodivosti jednotlivých transmembránových kanálů

Mimo pokusů s lipozomy, které sumarizují příspěvek velkého množství pórů na obrovské ploše membrán lipozomů, jsme zkoumali i jednotlivé kanály pomocí měření jejich vodivosti metodou černých lipidických membrán (BLM, kapitola 4.6). Cílem bylo podrobněji zmapovat

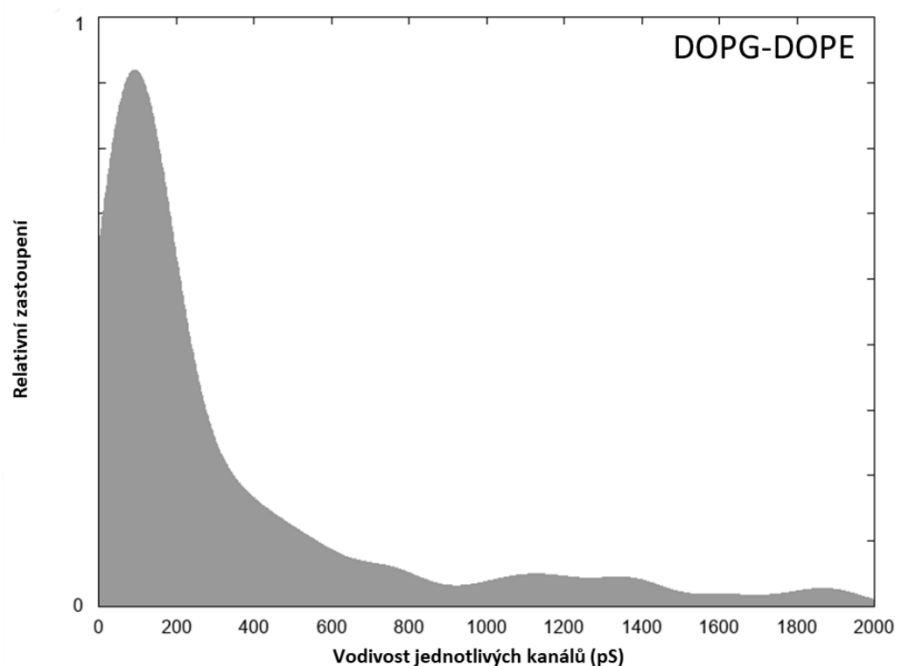
vlastnosti pórů tvořených surfaktinem jako velikost a stabilita a dále zjistit, zda na tyto vlastnosti má vliv lipidové složení membrány.

Navzdory původním očekáváním surfaktin netvoří diskrétní velikosti kanálů nebo pórů, ale velmi širokou distribuci napříč čtyřmi řády – od jednotek pS až po desítky nS, což jsou mimo jiné měřicí limity použité aparatury. Menší kanály se ztrácejí v šumu a větší kanály jsou mimo rozsah použitého zesilovače (Obr. V17.1-3). Prezentovaná data jsou souborem zaznamenaných skokových nárůstů vodivosti považovaných za otevření membránového póru.



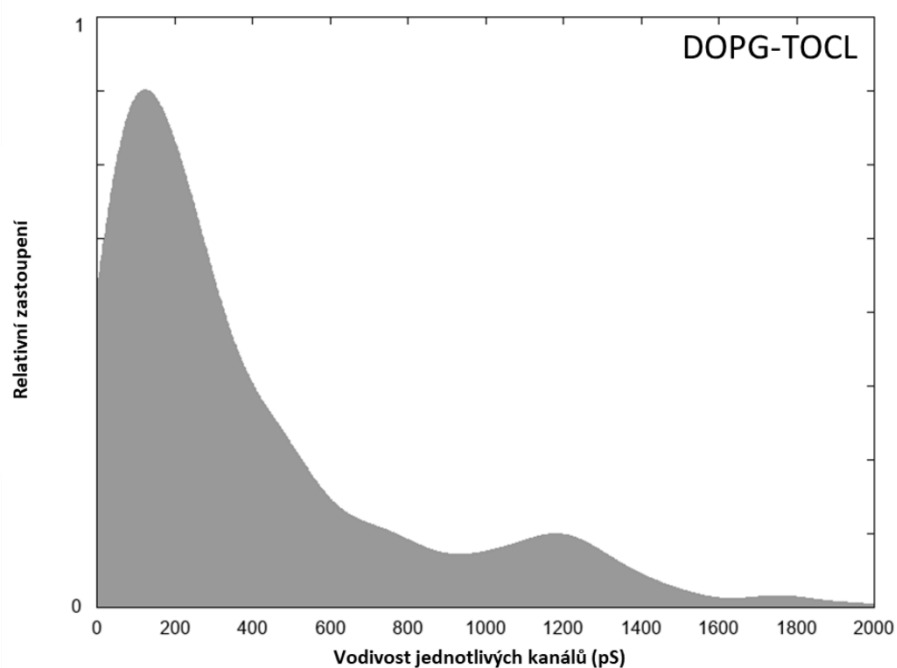
Obr. V17.1 Histogramy vodivosti SF kanálů v membránách složených z DOPG.

Graf zobrazuje 251 zaznamenaných skokových nárůstů vodivosti v membránách tvořených DOPG vystavených $4\mu\text{mol/l}$ SF. Každý datový bod je reprezentovaný Gaussovou křivkou a zobrazená křivka je jejich sumou.



Obr. V17.2 Histogramy vodivostí SF kanálů v membránách složených z DOPG-DOPE.

Graf zobrazuje 151 zaznamenaných skokových nárůstů vodivosti v membránách tvořených směsí DOPG-DOPE 2:1 (w/w) vystavených 4 $\mu\text{mol/l}$ SF. Každý datový bod je reprezentovaný Gaussovou křivkou a zobrazená křivka je jejich sumou.



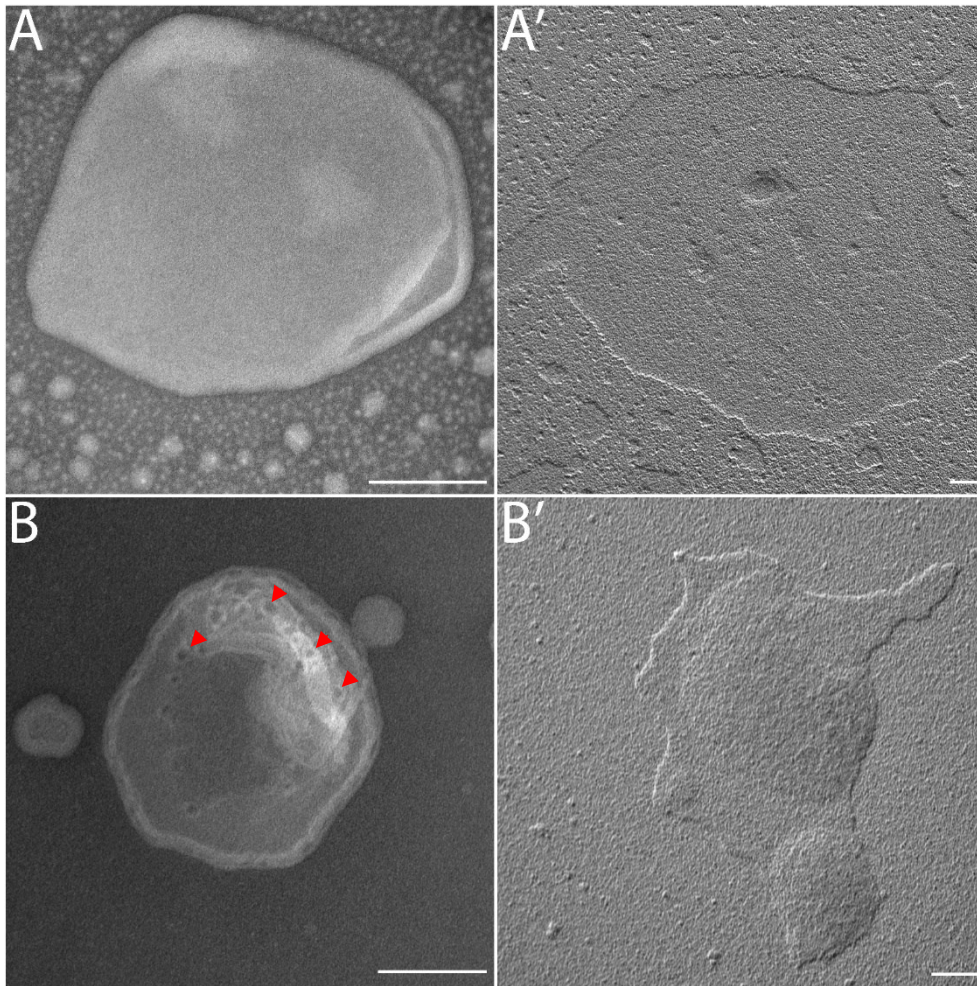
Obr. V17.3 Histogramy vodivostí SF kanálů v membránách složených z DOPG-TOCL.

Graf zobrazuje 384 zaznamenaných skokových nárůstů vodivosti v membránách tvořených směsí DOPG-TOCL 2:1 (w/w) vystavených 4 $\mu\text{mol/l}$ SF. Každý datový bod je reprezentovaný Gaussovou křivkou a zobrazená křivka je jejich sumou.

Z histogramů rozložení vodivosti kanálů je zřejmé, že stechiometrie pórů není ustálená a že se v membránách tvoří funkční jednotky čítající od několika jednotlivých molekul po klastry obsahující stovky nebo tisíce molekul. Membrány vystavené surfaktinu navíc vykazovaly výrazné kolísání vodivosti, které nebylo možné charakterizovat jako diskrétní otevírání a zavírání kanálů nebo pórů. To ztěžovalo identifikaci pórů a analýza definovaných pórů navíc nepostihuje značnou část zaznamenané vodivosti. Kanály/póry, které bylo možné identifikovat a charakterizovat měly nejčastěji vodivost mezi 120 a 200 pS, značné množství okolo 1 nS a zaznamenány byly i kanály větší než 2 nS. Jednoduché membrány tvořené pouze DOPG měly druhé maximum okolo 500 pS a další menší maxima v 700, 850, 1000 a 1600 pS. U obou binárních směsí byl viditelný druhý vrchol okolo 1200 pS, přičemž u čistého DOPG je v této vodivosti naopak znatelný propad ve frekvenci kanálů, naopak, okolo 1600 pS měly propad ve frekvenci obě binární směsi. Další mírné zvýšení lze u binárních směsí pozorovat okolo 1800-1900 pS, jedná se nicméně o jednotky kanálů. Pro podrobnou matematickou analýzu rozdílů by ovšem byl třeba řádově větší počet kanálů. Přesto, že v distribuci kanálů zaznamenaných na membránách různého složení můžeme pozorovat dílčí rozdíly, žádné zásadní závěry o změnách v charakteru pórotvorné aktivity z nich není možné vyvodit.

5.14 Vizualizace pórů surfaktinu v membráně pomocí elektronové mikroskopie

Nejnázornější informací o velikosti a struktuře póru je přímé pozorování. Vzhledem k předpokládaným měřítkům je jedinou možností přímého pozorování pórů surfaktinu v membráně vysokorezoluční elektronová mikroskopie. Suspenzi PC lipozomů vystavenou 10 mmol/l SF po dobu 10 min jsme vizualizovali v transmisním elektronovém mikroskopu pomocí negativního barvení 1% molybdenanem amonným (MoA) (Obr. V18 A a B) nebo pomocí pokrytí platinou pod úhlem (Obr. V18 A' a B'). Pomocí pokovování jsme nedosáhli potřebného rozlišení pro identifikaci kanálů, ale ukázali jsme na rozdíl v nasedání lipozomů na podklad (5nm uhlíková blána) v přítomnosti surfaktinu pravděpodobně v návaznosti na schopnost SF snižovat povrchové napětí. Na lipozomech obarvených MoA se podařilo identifikovat útvary o vnitřním průměru okolo 6 nm.



Obr. V18 Lipozomy vizualizované v TEM

Suspenze 400nm lipozomů tvořených sójovým PC (A, A' negativní kontrola) vystavená 10 mmol/l surfaktinu po 10 minut (B, B') a deponována na TEM síťky pokryté ultratenkou uhlíkovou blánou, aktivované žárovým výbojem; negativně kontrastováno roztokem 1% molybdenanu amonného a 0,1% trehalózy (A, B), alternativně naprášením 3nm vrstvy platiny (6 nm pod úhlem 30°) při tlaku 2×10^{-8} mbar (A', B'). Červenou šipkou zvýrazněné předpokládané SF kanály. Měřítka 100 nm.

6 Diskuse

Jak již bylo zmíněno, hlavním cílem disertační práce bylo zejména popsat roli lipidického složení membrány v toleranci *Bacillus subtilis* vůči surfaktinu a rozšířit poznání o mechanismu účinku surfaktinu obecně.

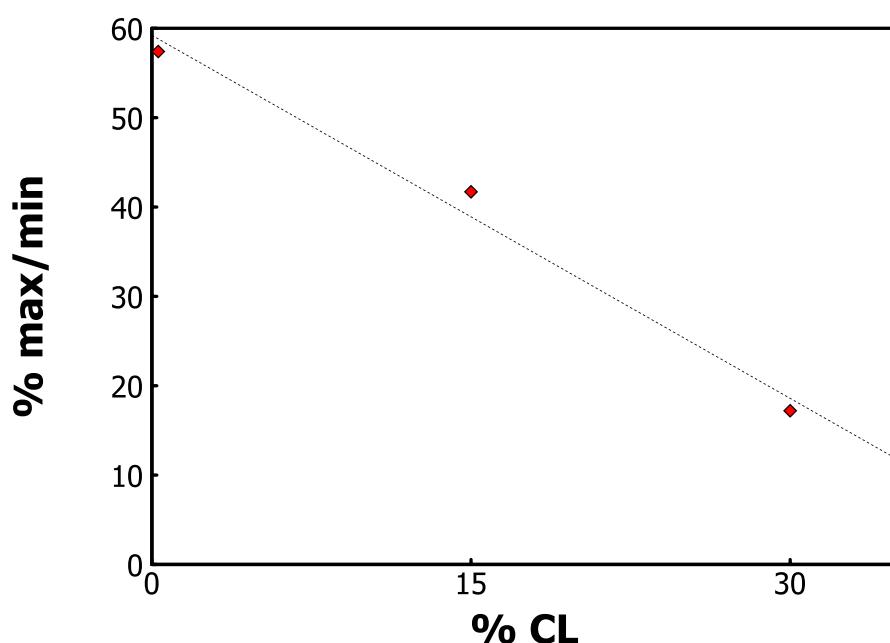
Z výše uvedených dat jasně vyplývá, že surfaktin je skutečně pórotvorná látka schopná permeabilizovat jak modelové membrány, tak membrány živých buněk. Z měření vodivosti dále vyplývá, že kanály nebo póry, které surfaktin tvoří, nejsou uniformní a dobře definované, ale naopak se jedná o velice heterogenní struktury s možná dynamicky proměnlivou stechiometrií, což se dále projevuje multimodálním průběhem kinetiky úniku sondy z modelových lipozomů. Vedle samotné účinné látky je druhou nezbytnou podmínkou vzniku póru samotná membrána, skrz kterou pór vede. Její lipidové složení a fyzikálně chemické vlastnosti při tvorbě póru také hrají velkou roli. Na rozdíl od daptomycinu (Seydlova et al. 2019) surfaktin pro svou aktivitu nevyžaduje membránový potenciál (Sheppard et al. 1991, Ostroumova et al. 2010) a může tak napadat i membrány metabolicky neaktivních buněk jako jsou například dormantní a perzistující stadia. Daptomycin navíc pro svou aktivitu vyžaduje v membráně přítomnost PG (Hachmann et al. 2011) podobně jako další antimikrobiální peptidy, jako je telomycin vyžadující CL (Johnston et al. 2016) nebo cinnamycin vyžadující PE (Machaidze and Seelig 2003). To vše otevírá cestu pro vývoj rezistence i vůči surfaktinu modifikací zásahového místa. Přesto, že se předpokládalo, že vývoj takové rezistence proti látkám cílícím membránu bude pro mikroorganismy relativně složitý, byly zachyceny kmeny *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium* nebo *B. subtilis* rezistentní k daptomycinu se zesílenou buněčnou stěnou, s nižší nebo naopak vyšší fluiditou membrány, s mutacemi v membránových proteinech, se sníženou koncentrací PG nebo zvýšenou koncentrací CL v membráně (Cui et al. 2006, Kaatz et al. 2006, Hachmann et al. 2011, Tran et al. 2013, Tran et al. 2015). Je tedy zjevné, že bytí může být vývoj rezistence vůči membránově aktivní látce složitější, zdaleka není nemožný. Je tedy důležité se této problematice více věnovat a lépe pochopit možnosti a limitace adaptace mikroorganismů proti antimikrobiálním látkám permeabilizujícím cytoplazmatickou membránu.

Dobrým modelem pro studium dostupných mechanismů rezistence jsou samotní producenti dané antimikrobiální látky. Kmeny *B. subtilis* produkující surfaktin dokáží tolerovat koncentrace o dva řády vyšší (Hu et al. 2019) než jiné mikroorganismy (Das et al. 2008). Byť jsou subpopulace *B. subtilis* nepochybně náchylné k permeabilizaci membrán surfaktinem (Danevcic et al. 2021), kultury v celku z produkce musí benefitovat a nebyt vlastním produktem eradikovány. Výzkum vedený naší skupinou již dříve prokázal, že produkční kmen SF+ (*B. subtilis* ATCC 21332) ve stacionární fázi zároveň s produkcí surfaktinu postupně navyšuje koncentraci CL v membráně z necelých 14 % až na maximálně zaznamenaných 22 % (Seydlova et al. 2013), čímž významně rigidizuje membránu (v kontrastu k fluidizujícímu účinku surfaktinu). U kmene SF- celková koncentrace CL naopak ve stejné fázi růstu kultury klesla na 8,4 %. Lipozomy připravené z lipidových extraktů těchto kmenů potvrdily naši hypotézu, že adaptovaná membrána SF+ kmene bude vůči účinku surfaktinu odolnější (Obr. V9). Zde je nutné zmínit, že experimenty tohoto typu s fosfolipidy izolovanými přímo z bakteriálních kultur jsou pro svou náročnost unikátní. Dosažení dostatečně stabilních lipozomů v dostatečném množství vyžadovalo značné úsilí a extenzivní optimalizaci procesu izolace fosfolipidů i přípravy samotných lipozomů. Zatímco intenzita fluorescence suspenze SF- lipozomů po přidavku narostla prudce na hodnotu (úměrnou výsledné koncentraci SF), ve které se relativně ustálila, SF+ lipozomy ve všech koncentracích uvolňovaly fluorescenční sondu postupněji, intenzita se nicméně v pozorovaném časovém úseku neustálila a pokračovala v nárůstu (Obr. V9). Na základě analýzy průběhu kinetik předpokládáme, že mechanismus lyze se mezi SF+ a SF- lipozomy liší zásadněji, než jen rychlostí identického děje – jak ukazuje komparativní analýza v kapitole 5.10 (Obr. V14), křivky kinetik lyze SF+ i SF- se zvlášť podobají jiným vlastním koncentracím, ale mezi sebou se výrazně liší. Pro úspěšný popis za účelem analýzy průběhu lyze bylo třeba pro všechny křivky využít dvě funkce, obě s kooperativitou nižší než 1 (výjimečně mírně vyšší), lišící se rychlostí průběhu i amplitudou. V obou případech s koncentrací surfaktinu zejména stoupala rychlost rychlejší z obou funkcí a zvyšoval se její podíl na celkové amplitudě. Celkově ovšem měly kinetiky SF+ a SF- odlišný průběh – u SF- byly obecně vyšší příspěvky a kratší poločasy u rychlejší z funkcí, zatímco většina lyze u nich byla způsobena pomalejší z obou funkcí. Počáteční rychlost lyze lipozomů připravených ze SF- extraktů tedy byla zřetelně vyšší, než lyze SF+.

Tento efekt se potvrdil i u lipozomů připravených ze syntetických směsí napodobujících složení SF+ a SF- lipidů (Obr.V9), jejichž smyslem bylo demonstrovat pozorovaný fenomén na jednodušším a definovanějším systému. Zde byl průběh kinetiky složitější a pro úspěšné fitování bylo potřeba použít tři funkce. Za zmínku stojí, že kinetika lyze těchto lipozomů byla, přes použití vyšší koncentrace surfaktinu, výrazně pomalejší, což na jednu stranu značně omezovalo množství podmínek, které bylo možné testovat, na druhou stranu ale efektivně zvyšovalo rozlišení pro sledování počátečních fází kinetik, které se v předchozím případě odehrály v rámci prvních několika sekund pokrytých vzhledem ke vzorkovací frekvenci jednotkami datových bodů. To umožnilo přesnější analýzu kinetik pomocí proložených funkcí a popsat jejich sigmoidální průběh. Použití vyšší koncentrace surfaktinu a vysokého poměru surfaktin-lipid není bezprecedentní (Carrillo et al. 2003, Uttlová et al. 2016). Vysoká odolnost těchto syntetických směsí se dá vysvětlit délkou mastných kyselin použitých lipidů – surfaktin působí nejsilněji, je-li délka jeho β -hydroxy mastné kyseliny shodná s délkou mastné kyseliny membránových lipidů (Grau et al. 1999). Podobný efekt je možné pozorovat i u LEGO-LPPO, kdy C18 mastné kyseliny s jednou nenasycenou vazbou vykazují největší odolnost proti permeabilizaci (Dugić et al. – nepublikovaná data). Zdá se tedy, že delší mastné kyseliny spolu s dezorganizací způsobenou nenasycenou vazbou poskytují ochranu proti alespoň některým mechanismům permeabilizace. Navíc se dá předpokládat, že směsi více druhů lipidů s různou geometrií se budou oproti jednoduchým nebo binárním membránám snáze vyrovnávat s pnutím způsobeným kónickým tvarem surfaktinu. Funkce použité k prokládání kinetik lyze byly v obou případech jedna nekooperativní, jedna slabě kooperativní a jedna silně kooperativní, jejich vzájemné poměry byly mezi oběma složeními obdobné. Lišily se v zásadě pouze rychlostí průběhu, z čehož usuzujeme, že mechanismus účinku je v obou případech stejný, u SF+ ovšem probíhá pomaleji nebo s menší účinností – lipozomy SF- dosáhly poloviny maximální intenzity téměř třikrát rychleji než SF+ systém.

Vzhledem k tomu, že majoritní změnou při adaptaci na přítomnost SF je nárůst koncentrace CL, měl další experiment za cíl odfiltrovat případné jiné efekty a jednoduše porovnat odolnost lipozomů s různým obsahem CL. Jako nosičový lipid jsme tentokrát použili DOPG a srovnávali čisté DOPG lipozomy a lipozomy s přídávkem 15 a 30 hmotnostních procent CL. Obr. V12 jasně ukazuje, že přídavek CL zvyšuje odolnost lipozomů a vyšší koncentrace CL má výraznější stabilizační účinek (Obr. D1). Srovnáváme zde jednoduchý a binární systém a vyšší odolnost

lipozomů s CL by se tak dala částečně vysvětit i tímto faktorem. S dalším přidavkem CL ovšem odolnost dále stoupá téměř lineárně. Všechny křivky mají na první pohled zjevně sigmoidální průběh a jejich popisu dostačovaly ve všech třech případech dvě funkce – jedna s kooperativitou kolem 1 a jedna funkce s vyšší kooperativitou a rychlejším průběhem. Hlavní rozdíl způsobený přidavkem CL bylo oddálení a snížení relativního příspěvku funkce s vyšší kooperativitou. Na základě toho můžeme spekulovat, že přítomnost CL oddaluje formování větších komplexů molekul SF.



Obr. D1 Graf závislosti rychlosti lyze na koncentraci CL

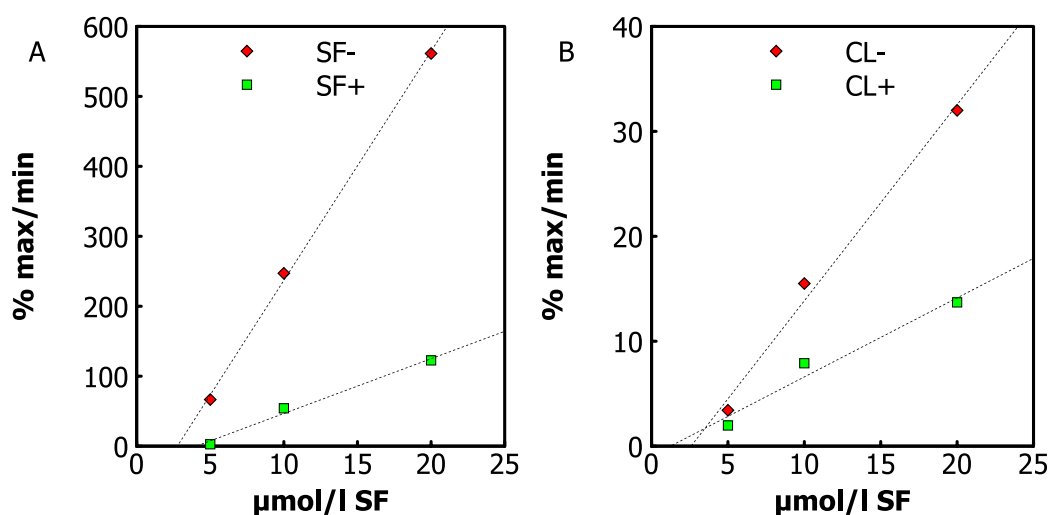
Graf, ve kterém je vynesena počáteční rychlost lyze tak, jak je uvedena v tabulce V1, proti koncentraci CL v lipozomech. Měřená rychlost lyze klesá téměř lineárně s narůstající koncentrací CL.

Stabilizační efekt CL proti účinku SF jsme zároveň potvrdili s využitím kmene *B. subtilis* defektního v produkci CL, jehož lipidový extrakt dal vzniknout znatelně náchylnějším lipozómům (Obr.V 12) než extrakt z divokého kmene obsahujícím 12,5% podíl CL v membráně (Sklenarova 2014). A dle očekávání, i živé buňky byly znatelně náchylnější k permeabilizaci surfaktinem, jak ukazuje Obr. V15. Nejenže tedy přidavek CL chrání jednoduchou modelovou membránu proti působení SF, ale naopak odebrání CL z komplexního prostředí izolovaného lipidového extraktu, a dokonce i bakteriální membrány živé bakterie, znatelně zvyšuje její

náchylnost. Rozbor průběhu kinetik lyze CL+ a CL- lipozomů opět ukázal pro každou křivku dvě funkce – jednu s kooperativitou ≤ 1 a (s výjimkou CL- při koncentraci SF 20 μM) amplitudou v rámci jednotek % max lyze, a druhou funkci s kooperativitou mírně vyšší než 1 zodpovědnou za většinu pozorované lyze. Tvar všech křivek byl tedy podobný, zásadně se lišila pouze rychlost.

Kinetiky lyze lipozomů, které se podařilo popsat pomocí funkcí, jsme mezi sebou porovnávali v kapitole 5.10. Z Obr. V14 je zřejmé, že kinetiky v rámci jednotlivých experimentů jsou si navzájem podobnější než mezi různými experimenty. Křivky lišící se pouze koncentrací surfaktinu si navzájem byly tvarově podobné, ale křivky lišící se lipidovým složením měly dramaticky odlišný průběh. Z toho můžeme usuzovat, že koncentrace surfaktinu, možná nepřekvapivě, ovlivňuje rychlost nebo amplitudu pozorovaných jevů, zatímco lipidové složení membrány mění přítomné mechanismy tvorby pórů nebo jejich relativní zastoupení.

Když srovnáme odpověď SF+/SF- a CL+/CL- lipozomů na různé koncentrace surfaktinu (Obr.D2) tak, jak jsou uvedené v tabulce V1 na základě obrázků křivek V8 a V12, zjistíme, že rychlost lyze ve všech případech roste téměř lineárně s koncentrací surfaktinu, ale že CL+ a SF+ reagují na změnu koncentrace lineární závislostí s nižší směrnicí, než CL- resp. SF-. Vzhledem k tomu, že mezi rychlostí CL+ a CL- je menší rozdíl, než mezi SF+ a SF-, můžeme spekulovat, že nárůst koncentrace CL není jediným adaptačním mechanismem vůči surfaktinu.



Obr.D2 Graf závislosti rychlosti lyze lipozomů na koncentraci surfaktinu.

Graf, ve kterém je rychlost lyze lipozomů z obrázků V8 (A) a V12 (B) vynesena jako funkce koncentrace surfaktinu. Rychlost v obou případech stoupá téměř lineárně s koncentrací SF, jednotlivé lipozomy se liší pouze směrnicí této závislosti.

Na základě experimentů s lipozomy připravenými z izolovaných a syntetických lipidů i permeabilizace živých buněk ale můžeme tvrdit, že k adaptaci vůči surfaktinu kardiolipin nepochybně významnou měrou přispívá. Výsledky popsané v kapitole 5.6 a publikaci (Uttlová et al. 2016) ovšem jasně ukazují, že zvýšení odolnosti membrány je u neprodukčního kmene možné dosáhnout i bez příspěvku kardiolipinu a mechanismus je tedy pravděpodobně komplexní fyzikálně chemická souhra více faktorů spíš než jednoduchý vztah efektor-inhibitor.

Kromě permeabilizace buněk jsme se pokoušeli určit i rozdíly v citlivosti bakteriálních kultur testovaných kmenů *B. subtilis* vůči surfaktinu, ale vzhledem k omezenému množství dostupného surfaktinu a jeho povrchové aktivitě se nám nepodařilo rozdíly zaznamenat. Provedli jsme pokusy s kultivací různých kmenů vystavených různým koncentracím SF v mikrotitrační destičce. Velký specifický povrch pravděpodobně vede ke snížené efektivní koncentraci surfaktinu a ustálený stav po 12 hod tak byl navíc zatížený poměrně značnou chybou vzhledem k náchylnosti malého objemu k nestejněměrnému odparu. Experimenty na pevných médiích pro změnu byly ztěžovány faktem, že přítomnost surfaktinu podporuje „sliding“ motilitu (Kinsinger et al. 2003) buněk a vede tak k rozmývání bakteriálního nárůstu, což nám znemožnilo vyhodnocení inhibičních zón. Přes spotřebování značného množství surfaktinu jsme tedy přímé srovnání míry tolerance jednotlivých kmenů k surfaktinu nebyli schopni provést.

Další série experimentů měla za cíl přispět k lepšímu pochopení mechanismu, jakým kardiolipin brání permeabilizaci membrány. Předpokládáme, že buď brání samotnému vstupu surfaktinu do membrány například zvýšením celkového negativního náboje membrány (Seydlova et al. 2013), nebo blokuje tvorbu (Rocha-Roa et al. 2021) či omezuje efektivitu vodivého komplexu. Pomocí kapalinové chromatografie kombinované s hmotnostní spektrometrií jsme chtěli stanovit případné rozdíly v množství surfaktinu zachyceného v membránách kmenů CL+ a CL-. Hypotéza byla taková, že pokud kmen CL- zachytí větší množství SF než kmen CL+, znamená to, že protektivní účinek proti SF se manifestuje na úrovni vstupu do membrány. Pokud rozdíly nezaznamenejeme, snižuje se efektivita surfaktinu již v membráně integrovaného. Výsledky experimentů bohužel neprokazují ani jednu z předpokládaných variant. Přesto, že ve vzorcích CL- bylo ve všech použitých koncentracích zaznamenáno marginálně vyšší množství surfaktinu oproti kmenu CL+, nemůžeme vyvozovat žádné závěry, vzhledem k velkým odchylkám v technických replikátech. Systém prakticky

nereagoval na zvyšování koncentrace surfaktinu v průběhu inkubace buněk (Obr. V16) – množství detekovaného surfaktinu při koncentraci 100 μM bylo vyšší než při koncentraci 200 μM . Dochází tedy zřejmě k nějakému druhu nasycení systému. Například jevu, kdy se, po dosažení nějaké hraniční koncentrace, povrchově aktivní látka samouspořádá do segregovaných domén a membránu opustí v podobě směsných micel (Nazari et al. 2012), které nebudou zachyceny spolu s buňkami. Potenciálním řešením by bylo zkrácení intervalu, po který jsou kultury vystavené surfaktinu před izolací surfaktinu tak, abychom zachytili dynamiku děje, nikoliv konečný ustálený stav. To bohužel nebylo v použitém uspořádání experimentu prakticky proveditelné. Výsledky tedy naznačují určité snížení množství surfaktinu vstupujícího do membrány, přesvědčivou odpověď jsme ovšem nezískali. Alternativním přístupem k objasnění mechanismu vlivu CL na pórtvornou aktivitu SF by mohly být simulace molekulární dynamiky, které jsme již s úspěchem použili ke zkoumání chování SF v roztoku. V budoucnu zamýšlíme pokusit se nasimulovat interakce SF s membránami různého složení a zjistit, jestli CL omezuje již vstup SF do membrány nebo zda bude pozorovatelný nějaký efekt na chování SF již vloženého v membráně.

Původním záměrem projektu bylo, kromě globálního efektu na populaci buněk, sledovat a analyzovat jednotlivé události permeabilizace pomocí měření vodivosti membrány, jak ukazuje např. (Sheppard et al. 1991, Ostroumova et al. 2010). Konkrétní hodnoty vodivosti by nám v ideálním případě umožnily analyzovat stechiometrii kanálů (Seydlova et al. 2019). Z naměřených dat je zjevné, že surfaktin pouze jednoduché póry s ustálenou stechiometrií netvoří. Membrány vystavené surfaktinu v porovnání s čistou membránou nebo membránou vystavenou permeabilizujícím látkám tvořících stabilní definované póry, jako například fonticiny (Látrová et al. 2023), vykazují nadměrný „šum“ a kolísání vodivosti, které ztěžuje identifikaci jednotlivých vodivostních událostí a také prakticky znemožňuje přiřazování „otevření“ kanálu k odpovídajícímu „zavření“. Kanály navíc měly relativně dlouhou dobu otevření a na membráně se postupně akumulovaly. Toto chování jsme pozorovali na celé řadě lipidických systémů lišících se složením (různé polární hlavy, lipidové řetězce) i komplexitou (od jednosložkových syntetických lipidů po lipidové izoláty). Pro účely vodivostních měření jsme použili dioleilylglycerofosfolipidy obdobně jako v experimentech s lipozomy. Porovnávali jsme vodivost membrán tvořených čistým DOPG, DOPG s TOCL v poměru 2:1 a DOPG:DOPE v poměru 2:1 abychom vyloučili, že případné změny jsou pouze vlivem rozdílu

jednoduchý/binární systém. Od každého složení membrány bylo zaznamenáno několik měřících dnů, a na nízkých desítkách membrán identifikováno několik set jednotlivých nárůstů vodivosti. Měření a zejména vyhodnocování dat bylo velmi časově náročné, obzvláště vzhledem k výše zmíněnému výraznému kolísání vodivosti, což značně limitovalo celkový počet charakterizovaných kanálů. Abychom tuto limitaci obešli, pokoušeli jsme se ve spolupráci s Albertem Sokolem optimalizovat jím vyvinutý software pro analýzu vodivostních dat. Tento přístup fungoval uspokojivě pro vyhodnocování dobře definovaných kanálů jiných látek, pro surfaktin se bohužel algoritmus optimalizovat nepodařilo – otevření buď nebyla zaznamenána nebo nebyl detekován celý rozsah pozorovaných kanálů nebo algoritmus naopak produkoval velké množství falešně pozitivních detekcí. Výsledky tak bylo nutné validovat manuálně a úspora času oproti celo-manuálnímu vyhodnocování byla spíše negativní. Identifikované a charakterizované kanály měly rozsah vodivostí od přibližně 2 pS do 2 nS, tedy přes tři řády, s nejčastějšími kanály okolo vodivosti 120 pS. Tento rozsah je ale zatížený citlivostí samotné aparatury a charakterem dat – kanály větší než 2 nS byly mimo rozsah zesilovače a kanály menší než 2 pS se ztrácely v šumu elektrického signálu intaktní membrány. Vzhledem k tomu, že pozorované kolísání vodivosti membrány po přidání surfaktinu bylo většinu měřícího času podstatně výraznější, než šum intaktní membrány, předpokládáme, že počet menších kanálů je v datech výrazně podhodnocený. Obecně by se pozorovaný kolísavý nárůst vodivosti dal vysvětlit transientními selháními integrity membrány, která mohou mít charakter lokálního uvolnění geometrického stresu přelitím části obsahu cis strany na trans stranu za současného vytvoření vodivého spojení obou stran, jak předpokládají autoři práce (Heerklotz et al. 2004). Pro přesvědčivé potvrzení této domněnky ovšem zatím nemáme dost podkladů.

Významným zjištěním, učiněným již při vypracovávání diplomové práce, bylo popsání skutečnosti, že efekt surfaktinu na cílové membrány je ovlivněný použitým rozpouštědlem zásobního roztoku – konkrétně použitím zásobního roztoku surfaktinu v DMSO zvyšovalo a zrychlovalo permeabilizaci membrán indukovanou surfaktinem. Jako okrajovou část tohoto disertačního projektu jsme se tedy pokoušeli dále popsat a objasnit pozorovaný efekt, zejména vzhledem k tomu, že nezanedbatelná část historických dat publikovaných o účinku surfaktinu na membrány byla získána za použití roztoků v DMSO (Carrillo et al. 2003, Tsan et al. 2007) nebo dokonce nespécifikovaného zásobního roztoku. Zjistili jsme, že při použití

1 mmol/l zásobního roztoku surfaktinu v DMSO byla rychlost lyze lipozomů podstatně vyšší než při použití stejně koncentrovaného vodného roztoku. Přídavek DMSO na stejnou výslednou koncentraci (5 %) měl ovšem na lyzi tlumící efekt a únik fluorescenční sondy zpomaloval (Obr. V1). U dalších dvou testovaných pórtvorných látek, makrolidu DDHR a lipofosfonoxinu DR5047 (Obr. V2 a V3) se potencující efekt DMSO neprojevil. Z toho usuzujeme, že mechanismus musí být na úrovni formy SF v okamžiku přídavku. Vzhledem k tomu, že velká většina molekul SF ve vodném roztoku je v použitých koncentracích ve formě micel a předpokládáme, že v DMSO převládají monomery, můžeme spekulovat, že volné monomery ochotněji interagují s membránami, zatímco micelární formy jsou méně reaktivní. Abychom tuto hypotézu ověřili, pokusili jsme prozkoumat vliv DMSO na micelizaci surfaktinu. Vyzkoušeli jsme několik přístupů stanovení CMC a přes relativně velkou časovou investici jsme naráželi na problém s citlivostí metod. CMC surfaktinu ve vodném roztoku se podle podmínek obvykle udává nižší než 10 $\mu\text{mol/l}$ (Ishigami et al. 1995, Heerklotz and Seelig 2001, Shen et al. 2011), což je o několik řádů nižší než běžné detergenty typu SDS. Počet micel a objem jejich vnitřního prostoru je okolo CMC příliš nízký na to, aby projevila detekovatelnou změnou fluorescence nebo vodivost roztoku. Hodnotu se v našich podmínkách podařilo ověřit až s pomocí kapilární zónové elektroforézy. Při pokusu o stanovení CMC SF přidávaného z roztoku v DMSO (vždy na výslednou koncentraci 5 % DMSO) se mobilita sondy použité k detekci přítomnosti micel v kapilární zónové elektroforéze měnila plynule a ani v koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ jsme nepozorovali její ostrý pokles nebo ustálení (Obr. V7). Toto zjištění bylo dále podpořeno simulacemi molekulární dynamiky, ve kterých monomery SF v DMSO vzájemně neinteragovali na rozdíl od vodného prostředí, ve kterém se velmi rychle samouspořádaly do micely. Zdá se tedy, že DMSO má vliv na to, v jaké formě se SF v roztoku nachází a že s membránou skutečně přednostně reagují spíše monomery SF než micely. K tomu je nutné přihlížet při interpretaci literárních dat.

V neposlední řadě jsme se pokusili přímo vizualizovat kanály tvořené surfaktinem pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Dosáhli jsme částečného úspěchu pomocí negativního barvení molybdenanem amonným, když se nám na části lipozomů vystavených působení SF podařilo objevit kruhové útvary s vnitřním průměrem okolo 6 nm (Obr. V18 B). Tato metoda nám může dát představu o velikosti, ale ne o struktuře pórů. Vzhledem k nestálé stechiometrii a tím způsobené variabilitě není možné vyřešení struktury surfaktinového póru klasickou kryo

elektronovou mikroskopií, která spoléhá na zprůměrování velkého množství objektů tak, jako se to podařilo například u MAC komplementového systému (Sharp et al. 2016). Přesto bychom se ještě v budoucnu rádi pokusili přinejmenším zobrazit surfaktinové póry v membránách lipozomů pomocí kryo elektronové tomografie, pokud se podaří zajistit přístup k dostatečně výkonnému mikroskopu.

7 Závěr

V rámci disertačního projektu se nám podařilo přesvědčivě prokázat, že membrány adaptované na surfaktin lépe odolávají jím způsobené permeabilizaci. Dále jsme ukázali, že nárůst koncentrace kardiolipinu je významnou částí adaptace producenta na surfaktin. Kardiolipin pravděpodobně není jediným faktorem, který k ní přispívá, ale *in vitro* experimenty potvrzují, že membrány se zvýšeným obsahem kardiolipinu jsou odolnější a membrány, ze kterých je kardiolipin odebrán jsou naopak náchylnější k permeabilizaci surfaktinem. Toto se potvrdilo jak na modelových membránách, tak na živých buňkách. Nepodařilo se prokázat, zda se popsaný stabilizační efekt odehrává na úrovni vstupu surfaktinu do membrány nebo na úrovni tvorby funkčních komplexů. Dále jsme ukázali, že použití DMSO jako rozpouštědla pro přípravu zásobních roztoků výrazně ovlivňuje výsledky pravděpodobně ovlivněním tendence surfaktinu tvořit micely.

8 Přehled publikací

8.1 Publikace související s tématem disertační práce

***Bacillus subtilis* alters the proportion of major membrane phospholipids in response to surfactin exposure.** Uttlová, P., D. Pinkas, O. Bechyňková, R. Fišer, J. Svobodová and G. Seydlová (2016). Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1858**(12): 2965-2971.

Příspěvek autora: 15%

Design a provedení experimentů s únikem fluorescenční sondy z lipozomů, část rešerše a tvorby textu.

Spoluautorská publikace předkládaná jako součást a diskutovaná v disertační práci zabývající se reakcí kmene neschopného produkce surfaktinu na externě dodaný surfaktin.

***Bacillus subtilis* cardiolipin protects its own membrane against surfactin-induced permeabilization.** Pinkas, D., R. Fiser, P. Kozlik, T. Dolejšova, K. Hryzakova, I. Konopasek and G. Mikusova (2020). Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1862**(10): 11.

Příspěvek autora: 70%

Hlavní prvoautorská publikace předkládaná jako součást a diskutovaná v disertační práci.

Outer membrane and phospholipid composition of the target membrane affect the antimicrobial potential of first-and second-generation lipophosphonoxins. Látrová, K., N. Havlová, R. Večeřová, D. Pinkas, K. Bogdanová, M. Kolář, R. Fišer, I. Konopásek, D. D. Do Pham, D. Rejman and G. Mikusova (2021). Scientific Reports **11**(1): 1-16.

Příspěvek autora: 5%

Zpracování a vyhodnocení dat z experimentů s únikem fluorescenční sondy z lipozomů.

Spoluautorská publikace zabývající se charakterizací pórtvorného účinku LPPO první a druhé generace obdobným metodickým přístupem jako zde předkládaná disertační práce.

8.2 Ostatní publikační aktivita

Francisella tularensis D-Ala D-Ala carboxypeptidase DacD is involved in intracellular replication and it is necessary for bacterial cell wall integrity. Spidlova, P., P. Stojkova, V. Dankova, I. Senitkova, M. Santic, D. Pinkas, V. Filimonenko and J. Stulik (2018). Frontiers in cellular and infection microbiology **8**: 111.

Příspěvek autora: 5%

Příprava vzorků, pořizování EM snímků a vyhodnocení EM dat.

Strong antioxidant capacity of horseradish hairy root cultures under arsenic stress indicates the possible use of Armoracia rusticana plants for phytoremediation. Kofroňová, M., A. Hrdinová, P. Mašková, P. Soudek, J. Tremlová, D. Pinkas and H. Lipavská (2019). Ecotoxicology and Environmental Safety **174**: 295-304.

Příspěvek autora: 5%

Design a provedení spektroskopických experimentů a zpracování dat.

The use of styrene-maleic acid copolymer (SMA) for studies on T cell membrane rafts. Angelisová, P., O. Ballek, J. Sýkora, O. Benada, T. Čajka, J. Pokorná, D. Pinkas and V. Hořejší (2019). Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1861**(1): 130-141.

Příspěvek autora: 5%

Příprava vzorků, pořizování EM snímků.

Molecular Responses in THP-1 Macrophage-Like Cells Exposed to Diverse Nanoparticles. Brzicova, T., E. Javorkova, K. Vrbova, A. Zajicova, V. Holan, D. Pinkas, V. Philimonenko, J. Sikorova, J. Klema, J. Topinka and P. Rossner (2019). Nanomaterials **9**(5): 687.

Příspěvek autora: 5%

Příprava vzorků, pořizování EM snímků.

Toxicity of TiO₂, ZnO, and SiO₂ Nanoparticles in Human Lung Cells: Safe-by-Design Development of Construction Materials. Remzova, M., R. Zouzelka, T. Brzicova, K. Vrbova, D. Pinkas, P. Rössner, J. Topinka and J. Rathousky (2019). Nanomaterials **9**(7): 968.

Příspěvek autora: 5%

Design experimentu, příprava vzorků, pořizování EM snímků

The most abundant maternal lncRNA Sirena1 acts post-transcriptionally and impacts mitochondrial distribution. Ganesh, S., F. Horvat, D. Drutovic, M. Efenberkova, D. Pinkas, A. Jindrova, J. Pasulka, R. Iyyappan, R. Malik, A. Susor, K. Vlahovicek, P. Solc and P. Svoboda (2020). Nucleic Acids Research **48**(6): 3211-3227.

Příspěvek autora: 5%

Příprava vzorků, pořizování EM snímků, zpracování a vyhodnocení EM dat.

Multi-Component Antioxidative System and Robust Carbohydrate Status, the Essence of Plant Arsenic Tolerance. Kofroňová, M., A. Hrdinová, P. Mašková, J. Tremlová, P. Soudek, Š. Petrová, D. Pinkas and H. Lipavská (2020). Antioxidants **9**(4): 283.

Příspěvek autora: 5%

Design a provedení spektroskopických experimentů a zpracování dat.

Understanding the toxicity mechanism of CuO nanoparticles: the intracellular view of exposed earthworm cells. Navarro Pacheco, N. I., R. Roubalova, J. Dvorak, O. Benada, D. Pinkas, O. Kofronova, J. Semerad, M. Pivokonsky, T. Cajthaml, M. Bilej and P. Prochazkova (2021). Environmental Science: Nano **8**(9): 2464-2477.

Příspěvek autora: 2%

Provedení EDS analýzy jako dodatečný experiment v reakci na připomínky oponentů.

Evidence of Au(II) and Au(0) States in Bovine Serum Albumin-Au Nanoclusters Revealed by CW-EPR/LEPR and Peculiarities in HR-TEM/STEM Imaging. Ostruszka, R., G. Zoppellaro, O. Tomanec, D. Pinkas, V. Filimonenko and K. Šišková (2022). Nanomaterials **12**(9): 1425.

Příspěvek autora: 15%

EM a EDS analýza.

Cisplatin-Cross-Linked DNA Origami Nanostructures for Drug Delivery Applications. Sala, L., T. Perecko, O. Mestek, D. Pinkas, T. Homola and J. Kočíšek (2022). ACS Applied Nano Materials **5**(9): 13267-13275.

Příspěvek autora: 15%

Design EM experimentů, pořizování a zpracování EM snímků a EDS analýza.

Macrophage-mediated tissue response evoked by subchronic inhalation of lead oxide nanoparticles is associated with the alteration of phospholipases C and cholesterol transporters. Smutná, T., J. Dumková, D. Kristeková, M. Laštovičková, A. Jedličková, L. Vrlíková, B. Dočekal, L. Alexa, H. Kotasová, V. Pelková, Z. Večeřa, K. Křůmal, J. Petráš, P. Coufalík, D. Všianský, S. Záchej, D. Pinkas, J. Vondráček, A. Hampl, P. Mikuška and M. Buchtová (2022). Particle and Fibre Toxicology **19**(1): 52.

Příspěvek autora: 5%

EM a EDS analýza.

Cellular uptake and fate of cationic polymer-coated nanodiamonds delivering siRNA: a mechanistic study. Majer, J., M. Kindermann, D. Pinkas, D. Chvátíl, P. Cigler and L. Libusova (2024). Nanoscale **16**(5): 2490-2503.

Příspěvek autora: 5%

Provedení EDS analýzy jako dodatečný experiment v reakci na připomínky oponentů.

Ion beam processing of DNA origami nanostructures. Sala, L., A. Zerolová, V. Vizcaino, A. Mery, A. Domaracka, H. Rothard, P. Boduch, D. Pinkas and J. Kocišek (2024). Beilstein Journal of Nanotechnology **15**: 207-214.

Příspěvek autora: 5%

FIB iradiace vzorků a pořizování EM snímků.

9 Seznam literatury

- Abraham, E. P. and E. Chain (1940). "An enzyme from bacteria able to destroy penicillin." Nature **146**(3713): 837-837.
- Ahmed, M., L. Lyass, P. N. Markham, S. S. Taylor, N. Vazquez-Laslop and A. A. Neyfakh (1995). "Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated." Journal of bacteriology **177**(14): 3904-3910.
- Alborn, W. E., N. E. Allen and D. A. Preston (1991). "Daptomycin disrupts membrane potential in growing *Staphylococcus aureus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **35**(11): 2282-2287.
- Allende, D. and T. J. McIntosh (2003). "Lipopolysaccharides in bacterial membranes act like cholesterol in eukaryotic plasma membranes in providing protection against melittin-induced bilayer lysis." Biochemistry **42**(4): 1101-1108.
- Anderson, D., T. C. Terwilliger, W. Wickner and D. Eisenberg (1980). "Melittin forms crystals which are suitable for high-resolution X-ray structural analysis and which reveal a molecular 2-fold axis of symmetry." Journal of Biological Chemistry **255**(6): 2578-2582.
- Aranda, F. J., J. A. Teruel and A. Ortiz (2005). "Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1713**(1): 51-56.
- Arima, K., A. Kakinuma and G. Tamura (1968). "Surfactin a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis* - isolation and characterization and its inhibition of fibrin clot formation." Biochemical and Biophysical Research Communications **31**(3): 488-494.
- Barthelemy, P., D. Autissier, G. Gerbaud and P. Courvalin (1984). "Enzymic hydrolysis of erythromycin by a strain of *Escherichia coli*." The Journal of antibiotics **37**(12): 1692-1696.
- Beranová, J., M. Jemiola-Rzeminska, D. Elhottová, K. Strzalka and I. Konopásek (2008). "Metabolic control of the membrane fluidity in *Bacillus subtilis* during cold adaptation." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1778**(2): 445-453.
- Besier, S., A. Ludwig, J. Zander, V. Brade and T. A. Wichelhaus (2008). "Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: gene dosage effect, stability, fitness costs, and cross-resistances." Antimicrobial agents and chemotherapy **52**(4): 1570-1572.
- Besson, F. and G. Michel (1984). "Action of the antibiotics of the iturin group on artificial membranes." Journal of Antibiotics **37**(6): 646-651.
- Beven, L. and H. Wroblewski (1997). "Effect of natural amphipathic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes." Research in Microbiology **148**(2): 163-175.
- Bouffieux, O., A. Berquand, M. Eeman, M. Paquot, Y. F. Dufrene, R. Brasseur and M. Deleu (2007). "Molecular organization of surfactin-phospholipid monolayers: effect of phospholipid chain length and polar head." Biochimica et Biophysica Acta **1768**(7): 1758-1768.
- Breukink, E. and B. de Kruijff (1999). "The lantibiotic nisin, a special case or not?" Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1462**(1-2): 223-234.
- Breukink, E., C. van Kraaij, A. van Dalen, R. A. Demel, R. J. Siezen, B. de Kruijff and O. P. Kuipers (1998). "The orientation of nisin in membranes." Biochemistry **37**(22): 8153-8162.
- Brown, M. F. (2012). "Curvature forces in membrane lipid-protein interactions." Biochemistry **51**(49): 9782-9795.
- Cao, X. H., A. H. Wang, R. Z. Jiao, C. L. Wang, D. Z. Mao, L. Yan and B. Zeng (2009). "Surfactin induces apoptosis and G(2)/M arrest in human breast cancer MCF-7 cells through cell cycle factor regulation." Cell Biochemistry and Biophysics **55**(3): 163-171.
- Carrillo, C., J. A. Teruel, F. J. Aranda and A. Ortiz (2003). "Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin." Biochimica et Biophysica Acta **1611**(1-2): 91-97.
- Coskun, U. and K. Simons (2010). "Membrane rafting: From apical sorting to phase segregation." Febs Letters **584**(9): 1685-1693.
- Cotter, P. D., C. Hill and R. P. Ross (2005). "Bacteriocins: Developing innate immunity for food." Nature Reviews Microbiology **3**(10): 777-788.

Cui, L. Z., E. Tominaga, H. M. Neoh and K. Hiramatsu (2006). "Correlation between reduced daptomycin susceptibility and vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **50**(3): 1079-1082.

Danevcic, T., A. Dragos, M. Spacapan, P. Stefanic, I. Dogsa and I. Mandic-Mulec (2021). "Surfactin Facilitates Horizontal Gene Transfer in *Bacillus subtilis*." Frontiers in Microbiology **12**: 8.

Darby, E. M., E. Trampari, P. Siasat, M. S. Gaya, I. Alav, M. A. Webber and J. M. Blair (2023). "Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited." Nature Reviews Microbiology **21**(5): 280-295.

Das, P., S. Mukherjee and R. Sen (2008). "Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*." Journal of Applied Microbiology **104**(6): 1675-1684.

DeGrado, W., G. Musso, M. Lieber, E. Kaiser and F. Kezdy (1982). "Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by a synthetic melittin analogue." Biophysical journal **37**(1): 329-338.

Delcambe, L. (1952). "Studies on constitution of iturin." Recherches sur la constitution de l'iturine. **146**(21-22): 1808-1812.

Delcambe, L. and R. Devignat (1957). "L'iturine; nouvel antibiotique d'origine congolaise." Mémoires de l'Académie royale des sciences coloniales. Classe des naturelles et médicales: 1-79.

Deleu, M., J. Lorent, L. Lins, R. Brasseur, N. Braun, K. El Kirat, T. Nylander, Y. F. Dufrene and M. P. Mingeot-Leclercq (2013). "Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation." Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1828**(2): 801-815.

Deleu, M., H. Razafindralambo, Y. Popineau, P. Jacques, P. Thonart and M. Paquot (1999). "Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **152**(1-2): 3-10.

Desmyttere, H., C. Deweer, J. Muchembled, K. Sahmer, J. Jacquin, F. Coutte and P. Jacques (2019). "Antifungal Activities of *Bacillus subtilis* Lipopeptides to Two *Venturia inaequalis* Strains Possessing Different Tebuconazole Sensitivity." Frontiers in Microbiology **10**: 10.

Do Pham, D. D., V. Mojr, M. Helusová, G. Seydlová, R. Pohl, E. Dávidová, H. Sanderova, D. Vítovská, K. Bogdanová, R. Večeřová, M. Sedláková, R. Fišer, P. Sudzinova, J. Pospíšil, O. Benada, T. Krizek, A. Galandáková, M. Kolář, L. Krásný and D. Rejman (2022). "LEGO-Lipophosphonoxins: A Novel Approach in Designing Membrane Targeting Antimicrobials." Journal of Medicinal Chemistry **65**.

Dsouza, C., M. M. Nakano and P. Zuber (1994). "Identification of ComS, a gene of the SrfA operon that regulates the establishment of genetic competence in *Bacillus subtilis*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(20): 9397-9401.

Dugić, M., H. Brzobohatá, V. Mojr, T. Dolejšová, P. Lišková, D. D. Do Pham, D. Rejman, G. Seydlová and R. Fišer (2024). "LEGO-lipophosphonoxins: length of hydrophobic module affects permeabilizing activity in target membranes of different phospholipid composition." RSC Advances **14**: 2745-2756.

Eliopoulos, G. M., S. Willey, E. Reiszner, P. Spitzer, G. Caputo and R. Moellering Jr (1986). "In vitro and in vivo activity of LY 146032, a new cyclic lipopeptide antibiotic." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **30**(4): 532-535.

Epand, R. M. and R. F. Epand (2009). "Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents." Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1788**(1): 289-294.

Ernst, R., C. S. Ejsing and B. Antonny (2016). "Homeoviscous Adaptation and the Regulation of Membrane Lipids." Journal of Molecular Biology **428**(24, Part A): 4776-4791.

Fernandes, P. A. V., I. R. de Arruda, A. dos Santos, A. A. de Araujo, A. M. S. Maior and E. A. Ximenes (2007). "Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria." Brazilian Journal of Microbiology **38**(4): 704-709.

Fernández, L. and R. E. Hancock (2012). "Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance." Clinical microbiology reviews **25**(4): 661-681.

Gholamreza, D.-N., H. Mohammadreza and B. B. S. Fazly (2005). "Isolation, characterization, and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633." Journal of Microbiology **43**(3): 272-276.

Gilliard, G., T. Demortier, F. Boubsi, M. H. Jijakli, M. Ongena, C. De Clerck and M. Deleu (2024). "Deciphering the distinct biocontrol activities of lipopeptides fengycin and surfactin through their differential impact on lipid membranes." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces: 113933.

Gilliard, G., A. L. Furlan, W. Smeralda, J. Prsic and M. Deleu (2022). "Added Value of Biophysics to Study Lipid-Driven Biological Processes: The Case of Surfactins, a Class of Natural Amphiphile Molecules." International Journal of Molecular Sciences **23**(22): 14.

Goutelle, S., M. Maurin, F. Rougier, X. Barbaut, L. Bourguignon, M. Ducher and P. Maire (2008). "The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling." Fundamental & clinical pharmacology **22**(6): 633-648.

Grau, A., J. C. Gomez-Fernandez, F. Peypoux and A. Ortiz (2001). "Aggregational behavior of aqueous dispersions of the antifungal lipopeptide iturin A." Peptides **22**(1): 1-5.

Grau, A., J. C. Gomez Fernandez, F. Peypoux and A. Ortiz (1999). "A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1418**(2): 307-319.

Grau, A., A. Ortiz, A. de Godos and J. C. Gomez-Fernandez (2000). "A biophysical study of the interaction of the lipopeptide antibiotic iturin A with aqueous phospholipid bilayers." Archives of Biochemistry and Biophysics **377**(2): 315-323.

Gray, M., G. Szabo, A. S. Otero, L. Gray and E. Hewlett (1998). "Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin." Journal of Biological Chemistry **273**(29): 18260-18267.

Grein, F., A. Muller, K. M. Scherer, X. L. Liu, K. C. Ludwig, A. Klockner, M. Strach, H. G. Sahl, U. Kubitscheck and T. Schneider (2020). "Ca²⁺-Daptomycin targets cell wall biosynthesis by forming a tripartite complex with undecaprenyl-coupled intermediates and membrane lipids." Nature Communications **11**(1): 11.

Grunewald, J. and M. A. Marahiel (2006). "Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides." Microbiology and Molecular Biology Reviews **70**(1): 121-+.

Hachmann, A. B., E. Sevim, A. Gaballa, D. L. Popham, H. Antelmann and J. D. Helmann (2011). "Reduction in membrane phosphatidylglycerol content leads to daptomycin resistance in *Bacillus subtilis*." Antimicrob Agents Chemother **55**(9): 4326-4337.

Hamoen, L. W., G. Venema and O. P. Kuipers (2003). "Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators." Microbiology-Sgm **149**: 9-17.

Heerklotz, H. and J. Seelig (2001). "Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes." Biophysical Journal **81**(3): 1547-1554.

Heerklotz, H. and J. Seelig (2007). "Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin." European Biophysics Journal **36**(4-5): 305-314.

Heerklotz, H., T. Wieprecht and J. Seelig (2004). "Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by deuterium." Journal of Physical Chemistry B **108**(15): 4909-4915.

Henry, G., M. Deleu, E. Jourdan, P. Thonart and M. Ongena (2011). "The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses." Cellular Microbiology **13**(11): 1824-1837.

Hu, F. X., Y. Y. Liu and S. Li (2019). "Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures." Microbial Cell Factories **18**: 13.

Huber, F., R. Pieper and A. Tietz (1988). "The formation of daptomycin by supplying decanoic acid to *Streptomyces roseosporus* cultures producing the antibiotic complex A21978C." Journal of Biotechnology **7**(4): 283-292.

Huber, S., M. A. Knoll, M. Berkold, R. Würzner, A. Brindlmayer, V. Weber, A. E. Posch, K. Mrazek, S. Lepuschitz and M. Ante (2021). "Genomic and phenotypic analysis of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in a tertiary hospital in Innsbruck, Austria." Microorganisms **9**(5): 1023.

Humphrey, M. J. and P. S. Ringrose (1986). "Peptides and related drugs: a review of their absorption, metabolism, and excretion." Drug metabolism reviews **17**(3-4): 283-310.

Humphrey, W., A. Dalke and K. Schulten (1996). "VMD: visual molecular dynamics." Journal of molecular graphics **14**(1): 33-38.

Hurdle, J. G., A. J. O'Neill, I. Chopra and R. E. Lee (2011). "Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections." Nature Reviews Microbiology **9**(1): 62-75.

Chrzanowski, L., L. Lawniczak and K. Czaczyk (2012). "Why do microorganisms produce rhamnolipids?" World Journal of Microbiology & Biotechnology **28**(2): 401-419.

Isaksson, J., B. O. Brandsdal, M. Engqvist, G. E. Flaten, J. S. M. Svendsen and W. Stensen (2011). "A Synthetic Antimicrobial Peptidomimetic (LTX 109): Stereochemical Impact on Membrane Disruption." Journal of Medicinal Chemistry **54**(16): 5786-5795.

Ishigami, Y., M. Osman, H. Nakahara, Y. Sano, R. Ishiguro and M. Matsumoto (1995). "Significance of β -sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin." Colloids and Surfaces B-Biointerfaces **4**(6): 341-348.

Janmey, P. A. and P. K. J. Kinnunen (2006). "Biophysical properties of lipids and dynamic membranes." Trends in Cell Biology **16**(10): 538-546.

Jensen, M. O. and O. G. Mouritsen (2004). "Lipids do influence protein function - the hydrophobic matching hypothesis revisited." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1666**(1-2): 205-226.

Jentsch, J. and H.-W. Mücke (1977). "Bee venom peptides XVIII. Peptide-M and MCD-Peptide: isolation and characterization." International Journal of Peptide and Protein Research **9**(1): 78-79.

Johnston, C. W., M. A. Skinnider, C. A. Dejong, P. N. Rees, G. M. Chen, C. G. Walker, S. French, E. D. Brown, J. Berdy, D. Y. Liu and N. A. Magarvey (2016). "Assembly and clustering of natural antibiotics guides target identification." Nature Chemical Biology **12**(4): 233-+.

Jung, D., J. P. Powers, S. K. Straus and R. E. W. Hancock (2008). "Lipid-specific binding of the calcium-dependent antibiotic daptomycin leads to changes in lipid polymorphism of model membranes." Chemistry and Physics of Lipids **154**(2): 120-128.

Kaatz, G. W., T. S. Lundstrom and S. M. Seo (2006). "Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*." International Journal of Antimicrobial Agents **28**(4): 280-287.

Kakinuma, A., M. Hori, M. Isono, G. Tamura and K. Arima (1969b). "Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*." Agricultural and Biological Chemistry **33**(6): 971-&.

Kakinuma, A., H. Sugino, M. Isono, G. Tamura and K. Arima (1969a). "Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin." Agricultural and Biological Chemistry **33**(6): 973-976.

Kameda, Y., S. Ouhira, K. Matsui, S. Kanatomo, T. Hase and T. Atsusaka (1974). "Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311." Chemical & Pharmaceutical Bulletin **22**(4): 938-944.

Karas, J. A., G. P. Carter, B. P. Howden, A. M. Turner, O. K. A. Paulin, J. D. Swarbrick, M. A. Baker, J. Li and T. Velkov (2020). "Structure-Activity Relationships of Daptomycin Lipopeptides." Journal of Medicinal Chemistry **63**(22): 13266-13290.

Karnovsky, M. J., A. M. Kleinfeld, R. L. Hoover and R. D. Klausner (1982). "The concept of lipid domains in membranes." Journal of Cell Biology **94**(1): 1-6.

Kaur Sodhi, K. and C. K. Singh (2022). "Recent development in the sustainable remediation of antibiotics: A review." Total Environment Research Themes **3-4**: 100008.

Khan, N., M. Maymon and A. M. Hirsch (2017). "Combating *Fusarium* infection using *Bacillus*-based antimicrobials." Microorganisms **5**(4): 75.

Kinsinger, R. F., M. C. Shirk and R. Fall (2003). "Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion." Journal of Bacteriology **185**(18): 5627-5631.

Kordel, M., F. Schüller and H.-G. Sahl (1989). "Interaction of the pore forming-peptide antibiotics Pep 5, nisin and subtilin with non-energized liposomes." Febs Letters **244**(1): 99-102.

Koukalova, A., S. Pokorna, R. Fiser, V. Kopecky, Jr., J. Humpolickova, J. Cerny and M. Hof (2015). "Membrane activity of the pentaene macrolide didehydroroflamycin in model lipid bilayers." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1848**(2): 444-452.

Lam, V., T. Meyer, A. A. Arias, M. Ongena, F. E. Oni and M. Hofte (2021). "*Bacillus* Cyclic Lipopeptides Iturin and Fengycin Control Rice Blast Caused by *Pyricularia oryzae* in Potting and Acid Sulfate Soils by Direct Antagonism and Induced Systemic Resistance." Microorganisms **9**(7): 25.

Lambris, J. D., D. Ricklin and B. V. Geisbrecht (2008). "Complement evasion by human pathogens." Nature Reviews Microbiology **6**(2): 132-142.

Látrová, K., T. Dolejšová, L. Motlová, G. Mikušová, J. Bosák, K. Snopková, D. Šmajš, I. Konopásek and R. Fišer (2023). "R-Type Fonticins Produced by *Pragia fontium* Form Large Pores with High Conductance." Journal of Bacteriology **205**(1): e00315-00322.

Latrova, K., N. Havlova, R. Vecerova, D. Pinkas, K. Bogdanova, M. Kolar, R. Fiser, I. Konopasek, D. D. D. Pham, D. Rejman and G. Mikusova (2021). "Outer membrane and phospholipid composition of the target membrane affect the antimicrobial potential of first- and second-generation lipophosphonoxins." Scientific Reports **11**(1): 16.

Leiris, S., A. Coelho, J. Castandet, M. Bayet, C. Lozano, J. Bougnon, J. Bousquet, M. Everett, M. Lemonnier, N. Sprynski, M. Zalacain, T. D. Pallin, M. C. Cramp, N. Jennings, G. Raphy, M. W. Jones, R. Pattipati, B. Shankar, R. Sivasubrahmanyam, A. K. Soodhagani, R. R. Juventhala, N. Pottabathini, S. Pothukanuri, M. Benvenuti, C. Pozzi, S. Mangani, F. De Luca, G. Cerboni, J. D. Docquier and D. T. Davies (2019). "SAR Studies Leading to the Identification of a Novel Series of Metallo- β -lactamase Inhibitors for the Treatment of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections That Display Efficacy in an Animal Infection Model." Acs Infectious Diseases **5**(1): 131-140.

Li, X., H. Yang, D. Zhang, X. Li, H. Yu and Z. Shen (2015). "Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in *Bacillus subtilis*." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **42**(1): 93-103.

Lilge, L., N. Ersig, P. Hubel, M. Aschern, E. Pillai, P. Klausmann, J. Pfannstiel, M. Henkel, K. Morabbi Heravi and R. Hausmann (2022). "Surfactin shows relatively low antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* and other bacterial model organisms in the absence of synergistic metabolites." Microorganisms **10**(4): 779.

Loiseau, C., M. Schlusselhuber, R. Bigot, J. Bertaux, J. M. Berjeaud and J. Verdon (2015). "Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-*Legionella* activity." Applied Microbiology and Biotechnology **99**(12): 5083-5093.

Lopez, D. and G. Koch (2017). "Exploring functional membrane microdomains in bacteria: an overview." Current opinion in microbiology **36**: 76-84.

Lopez, D. and R. Kolter (2010). "Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*." Fems Microbiology Reviews **34**(2): 134-149.

Maget-Dana, R. and M. Ptak (1995). "Interactions of surfactin with membrane models." Biophysical Journal **68**(5): 1937-1943.

Maget-Dana, R., M. Ptak, F. Peypoux and G. Michel (1985). "Pore-forming properties of Iturin-A, a lipopeptide antibiotic." Biochimica Et Biophysica Acta **815**(3): 405-409.

Machaidze, G. and J. Seelig (2003). "Specific binding of cinnamycin (Ro 09-0198) to phosphatidylethanolamine. Comparison between micellar and membrane environments." Biochemistry **42**(43): 12570-12576.

Małaczewska, J. and E. Kaczorek-Łukowska (2021). "Nisin—A lantibiotic with immunomodulatory properties: A review." Peptides **137**: 170479.

Marahiel, M. A. (2009). "Working outside the protein-synthesis rules: insights into non-ribosomal peptide synthesis." Journal of Peptide Science **15**(12): 799-807.

Markham, P. N. and A. A. Neyfakh (2001). "Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria." Current Opinion in Microbiology **4**(5): 509-514.

Matsumoto, K., J. Kusaka, A. Nishibori and H. Hara (2006). "Lipid domains in bacterial membranes." Molecular microbiology **61**(5): 1110-1117.

Menginlecreulx, D., N. E. Allen, J. N. Hobbs and J. Vanheijenoort (1990). "Inhibition of peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus megaterium* by daptomycin." Fems Microbiology Letters **69**(3): 245-248.

Menny, A., M. Serna, C. M. Boyd, S. Gardner, A. P. Joseph, B. P. Morgan, M. Topf, N. J. Brooks and D. Bubeck (2018). "CryoEM reveals how the complement membrane attack complex ruptures lipid bilayers." Nature communications **9**(1): 5316.

Mingeot-Leclercq, M.-P. and J.-L. Décout (2016). "Bacterial lipid membranes as promising targets to fight antimicrobial resistance, molecular foundations and illustration through the renewal of aminoglycoside antibiotics and emergence of amphiphilic aminoglycosides." MedChemComm **7**(4): 586-611.

Mishra, N. N., A. S. Bayer, T. T. Tran, Y. Shamoo, E. Mileykovskaya, W. Dowhan, Z. Q. Guan and C. A. Arias (2012). "Daptomycin Resistance in *Enterococci* Is Associated with Distinct Alterations of Cell Membrane Phospholipid Content." *Plos One* **7**(8): 10.

Morgan, B. P., C. Boyd and D. Bubeck (2017). "Molecular cell biology of complement membrane attack." *Seminars in Cell & Developmental Biology* **72**: 124-132.

Motin, M. A., M. A. Hafiz Mia and A. K. M. Nasimul Islam (2015). "Thermodynamic properties of Sodium Dodecyl Sulfate aqueous solutions with Methanol, Ethanol, n-Propanol and iso-Propanol at different temperatures." *Journal of Saudi Chemical Society* **19**(2): 172-180.

Mueller, P., D. O. Rudin, H. T. Tien and W. C. Wescott (1962). "Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system." *Nature* **194**(4832): 979-&.

Müller-Eberhard, H. J. (1985). "The killer molecule of complement." *Journal of Investigative Dermatology* **85**(1): S47-S52.

Mulligan, C. N., R. N. Yong, B. F. Gibbs, S. James and H. P. J. Bennett (1999). "Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin." *Environmental Science & Technology* **33**(21): 3812-3820.

Nazari, M., M. Kurdi and H. Heerklotz (2012). "Classifying surfactants with respect to their effect on lipid membrane order." *Biophysical Journal* **102**(3): 498-506.

Nicolai, C. and F. Sachs (2013). "Solving Ion Channel Kinetics with the QuB Software." *Biophysical Reviews and Letters* **08**(03n04): 191-211.

Nicoletti, I., G. Migliorati, M. Pagliacci, F. Grignani and C. Riccardi (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." *Journal of immunological methods* **139**(2): 271-279.

Okocha, R. C., I. O. Olatoye and O. B. Adedeji (2018). "Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture." *Public Health Reviews* **39**(1): 21.

Ongena, M., G. Henry and P. Thonart (2009). "The Roles of Cyclic Lipopeptides in the Biocontrol Activity of *Bacillus subtilis*". *Recent developments in management of plant diseases*: 59-69

Ostroumova, O. S., V. V. Malev, M. G. Ilin and L. V. Schagina (2010). "Surfactin activity depends on the membrane dipole potential." *Langmuir* **26**(19): 15092-15097.

Panova, N., E. Zbornikova, O. Simak, R. Pohl, M. Kolar, K. Bogdanova, R. Vecerova, G. Seydlova, R. Fiser, R. Hadravova, H. Sanderova, D. Viovska, M. Sikova, T. Latal, P. Lovecka, I. Barvik, L. Krasny and D. Rejman (2015). "Insights into the Mechanism of Action of Bactericidal Lipophosphonoxins." *Plos One* **10**(12): 28.

Park, S. Y. and Y. Kim (2009). "Surfactin inhibits immunostimulatory function of macrophages through blocking NK-kappa B, MAPK and Akt pathway." *International Immunopharmacology* **9**(7-8): 886-893.

Patel, H., C. Tscheka, K. Edwards, G. Karlsson and H. Heerklotz (2011). "All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713." *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1808**(8): 2000-2008.

Perez, J. J. (2018). "Designing Peptidomimetics." *Current Topics in Medicinal Chemistry* **18**(7): 566-590.

Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng and T. E. Ferrin (2004). "UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis." *Journal of computational chemistry* **25**(13): 1605-1612.

Peypoux, F., J. M. Bonmatin and J. Wallach (1999). "Recent trends in the biochemistry of surfactin." *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**(5): 553-563.

Phillips, J. C., R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale and K. Schulten (2005). "Scalable molecular dynamics with NAMD." *Journal of computational chemistry* **26**(16): 1781-1802.

Phillips, J. C., D. J. Hardy, J. D. Maia, J. E. Stone, J. V. Ribeiro, R. C. Bernardi, R. Buch, G. Fiorin, J. Héning and W. Jiang (2020). "Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD." *The Journal of chemical physics* **153**(4).

Pinkas, D., R. Fiser, P. Kozlik, T. Dolejsova, K. Hryzakova, I. Konopasek and G. Mikusova (2020). "*Bacillus subtilis* cardiolipin protects its own membrane against surfactin-induced permeabilization." *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1862**(10): 11.

Qiao, J., R. Borriss, K. Sun, R. Zhang, X. Chen, Y. Liu and Y. Liu (2024). "Research advances in the identification of regulatory mechanisms of surfactin production by *Bacillus*: a review." Microbial Cell Factories **23**(1): 100.

Raghuraman, H. and A. Chattopadhyay (2007). "Melittin: A membrane-active peptide with diverse functions." Bioscience Reports **27**(4-5): 189-223.

Ramirez, M. S. and M. E. Tolmasky (2010). "Aminoglycoside modifying enzymes." Drug Resistance Updates **13**(6): 151-171.

Razafindralambo, H., Y. Popineau, M. Deleu, C. Hbid, P. Jacques, P. Thonart and M. Paquot (1997). "Surface-active properties of surfactin iturin A mixtures produced by *Bacillus subtilis*." Langmuir **13**(23): 6026-6031.

Rejman, D., A. Rabatinová, A. R. Pombinho, S. Kovačková, R. Pohl, E. Zborníková, M. Kolář, K. Bogdanová, O. Nyč, H. Šanderová, T. Látal, P. Bartůněk and L. Krásný (2011). "Lipophosphonoxins: New Modular Molecular Structures with Significant Antibacterial Properties." Journal of Medicinal Chemistry **54**(22): 7884-7898.

Rejman, D., A. b. Rabatinová, A. n. R. Pombinho, S. a. Kovačková, R. Pohl, E. Zborníková, M. Kolář, K. i. Bogdanová, O. Nyč and H. Šanderová (2011). "Lipophosphonoxins: new modular molecular structures with significant antibacterial properties." Journal of Medicinal Chemistry **54**(22): 7884-7898.

Ricklin, D., G. Hajishengallis, K. Yang and J. D. Lambris (2010). "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis." Nature immunology **11**(9): 785-797.

Richter, S., D. Kealey, C. Murray, K. Heilmann, S. Coffman and G. Doern (2003). "The in vitro activity of daptomycin against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **52**(1): 123-127.

Rimal, B., J. Chang, C. Liu, R. Rashid, M. Singh and S. J. Kim (2023). "The effects of daptomycin on cell wall biosynthesis in *Enterococcal faecalis*." Scientific Reports **13**(1): 12227.

Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. Hye Park, K. Bush and D. C. Hooper (2006). "Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase." Nature medicine **12**(1): 83-88.

Rocha-Roa, C., J. D. Orjuela, C. Leidy, P. Cossio and C. Aponte-Santamaría (2021). "Cardiolipin prevents pore formation in phosphatidylglycerol bacterial membrane models." Febs Letters **595**(21): 2701-2714.

Sabate, D. C. and M. C. Audisio (2013). "Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains." Microbiological Research **168**(3): 125-129.

Sahl, H.-G. and G. Bierbaum (1998). "Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria." Annual Reviews in Microbiology **52**(1): 41-79.

Sahl, H.-G., M. Kordel and R. Benz (1987). "Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin." Archives of Microbiology **149**: 120-124.

Sansinenea, E. and A. Ortiz (2011). "Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp." Biotechnology letters **33**: 1523-1538.

Sauermann, R., M. Rothenburger, W. Graninger and C. Joukhadar (2008). "Daptomycin: a review 4 years after first approval." Pharmacology **81**(2): 79-91.

Savado, A., A. C. Ouattara, H. I. Bassole and S. A. Traore (2006). "Bacteriocins and lactic acid bacteria- a minireview." African journal of biotechnology **5**(9).

Sepehri, A., L. PeBenito, A. Pino-Angeles and T. Lazaridis (2020). "What Makes a Good Pore Former: A Study of Synthetic Melittin Derivatives." Biophysical Journal **118**(8): 1901-1913.

Seydlova, G., R. Fiser, R. Cabala, P. Kozlik, J. Svobodova and M. Patek (2013). "Surfactin production enhances the level of cardiolipin in the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1828**(11): 2370-2378.

Seydlova, G., P. Halada, R. Fiser, O. Toman, A. Ulrych and J. Svobodova (2012). "DnaK and GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress." Journal of Applied Microbiology **112**(4): 765-774.

Seydlova, G., R. Pohl, E. Zbornikova, M. Ehn, O. Simak, N. Panova, M. Kolar, K. Bogdanova, R. Vecerova, R. Fiser, H. Sanderova, D. Vitovska, P. Sudzinova, J. Pospisil, O. Benada, T. Krizek, D. Sedlak, P. Bartunek,

L. Krasny and D. Rejman (2017). "Lipophosphonoxins II: Design, Synthesis, and Properties of Novel Broad Spectrum Antibacterial Agents." Journal of Medicinal Chemistry **60**(14): 6098-6118.

Seydlova, G., A. Sokol, P. Liskova, I. Konopasek and R. Fiser (2019). "Daptomycin Pore Formation and Stoichiometry Depend on Membrane Potential of Target Membrane." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **63**(1): 14.

Shao, C., L. Liu, H. Gang, S. Yang and B. Mu (2015). "Structural Diversity of the Microbial Surfactin Derivatives from Selective Esterification Approach." International Journal of Molecular Sciences **16**(1): 1855-1872.

Sharp, T. H., A. J. Koster and P. Gros (2016). "Heterogeneous MAC Initiator and Pore Structures in a Lipid Bilayer by Phase-Plate Cryo-electron Tomography." Cell Reports **15**(1): 1-8.

Shen, H. H., T. W. Lin, R. K. Thomas, D. J. F. Taylor and J. Penfold (2011). "Surfactin structures at interfaces and in solution: The effect of pH and cations." Journal of Physical Chemistry B **115**(15): 4427-4435.

Shen, H. H., R. K. Thomas, C. Y. Chen, R. C. Darton, S. C. Baker and J. Penfold (2009). "Aggregation of the Naturally Occurring Lipopeptide, Surfactin, at Interfaces and in Solution: An Unusual Type of Surfactant?" Langmuir **25**(7): 4211-4218.

Shen, H. H., R. K. Thomas, J. Penfold and G. Fragneto (2010). "Destruction and solubilization of supported phospholipid bilayers on silica by the biosurfactant surfactin." Langmuir **26**(10): 7334-7342.

Sheppard, J. D., C. Jumarie, D. G. Cooper and R. Laprade (1991). "Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer-membranes." Biochimica et Biophysica Acta **1064**(1): 13-23.

Shin, J. M., J. W. Gwak, P. Kamarajan, J. C. Fenno, A. H. Rickard and Y. L. Kapila (2016). "Biomedical applications of nisin." Journal of applied microbiology **120**(6): 1449-1465.

Schneider, J., K. Taraz, H. Budzikiewicz, M. Deleu, P. Thonart and P. Jacques (1999). "The structure of two fengycins from *Bacillus subtilis* S499." Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences **54**(11): 859-866.

Schwarz, S., J. Shen, K. Kadlec, Y. Wang, G. B. Michael, A. T. Feßler and B. Vester (2016). "Lincosamides, streptogramins, phenicols, and pleuromutilins: mode of action and mechanisms of resistance." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **6**(11): a027037.

Singer, S. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Day and Good Membranes and viruses in immunopathology: 7-47.

Sklenarova, P. (2014). "Ucinek surfaktinu na lipidovou slozku cytoplazmaticke membrany *Bacillus subtilis*." Diplomova prace.

Slavetinsky, C. J., A. Peschel and C. M. Ernst (2012). "Alanyl-Phosphatidylglycerol and Lysyl-Phosphatidylglycerol Are Translocated by the Same MprF Flippases and Have Similar Capacities To Protect against the Antibiotic Daptomycin in *Staphylococcus aureus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **56**(7): 3492-3497.

Stein, T. (2005). "*Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions." Molecular Microbiology **56**(4): 845-857.

Strahilevitz, J., G. A. Jacoby, D. C. Hooper and A. Robicsek (2009). "Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat." Clinical Microbiology Reviews **22**(4): 664-+.

Strahl, H. and J. Errington (2017). "Bacterial membranes: structure, domains, and function." Annual review of microbiology **71**: 519-538.

Stumpe, S., R. Schmid, D. L. Stephens, G. Georgiou and E. P. Bakker (1998). "Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **180**(15): 4002-4006.

Subbalakshmi, C., R. Nagaraj and N. Sitaram (1999). "Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity." FEBS letters **448**(1): 62-66.

Sur, S. and A. Grossfield (2022). "Effects of cholesterol on the mechanism of fengycin, a biofungicide." Biophysical Journal **121**(10): 1963-1974.

Then, R. L. (1982). "Mechanisms of resistance to trimethoprim, the sulfonamides, and trimethoprim-sulfamethoxazole." Reviews of infectious diseases **4**(2): 261-269.

Tran, T. T., J. M. Munita and C. A. Arias (2015). "Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance". Oxford, Blackwell Science Publ.

Tran, T. T., D. Panesso, N. N. Mishra, E. Mileykovskaya, Z. Guan, J. M. Munita, J. Reyes, L. Diaz, G. M. Weinstock and B. E. Murray (2013). "Daptomycin-resistant *Enterococcus faecalis* diverts the antibiotic molecule from the division septum and remodels cell membrane phospholipids." MBio **4**(4): 10.1128/mbio.00281-00213.

Tsan, P., L. Volpon, F. Besson and J. M. Lancelin (2007). "Structure and dynamics of surfactin studied by NMR in micellar media." Journal of the American Chemical Society **129**(7): 1968-1977.

Tsuge, K., Y. Ohata and M. Shoda (2001). "Gene yerP, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **45**(12): 3566-3573.

Ubukata, K., R. Nonoguchi, M. Matsushashi and M. Konno (1989). "Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the mecA gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein." Journal of bacteriology **171**(5): 2882-2885.

US Food and Drug Administration (1988). 21CFR184.1538 Nisin preparation. Code of Federal Regulations.

Uttlová, P., D. Pinkas, O. Bechyňková, R. Fišer, J. Svobodová and G. Seydlová (2016). "*Bacillus subtilis* alters the proportion of major membrane phospholipids in response to surfactin exposure." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1858**(12): 2965-2971.

Van Den Hooven, H. W., C. C. Doeland, M. Van De Kamp, R. N. Konings, C. W. Hilbers and F. J. Van De Ven (1996). "Three-dimensional structure of the lantibiotic nisin in the presence of membrane-mimetic micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate." European journal of biochemistry **235**(1-2): 382-393.

Vanittanakom, N., W. Loeffler, U. Koch and G. Jung (1986). "Fengycin - A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3." Journal of Antibiotics **39**(7): 888-901.

Vass, E., F. Besson, Z. Majer, L. Volpon and M. Hollosi (2001). "Ca²⁺-induced changes of surfactin conformation: A FTIR and circular dichroism study." Biochemical and Biophysical Research Communications **282**(1): 361-367.

Vitullo, D., A. Di Pietro, A. Romano, V. Lanzotti and G. Lima (2012). "Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*." Plant Pathology **61**(4): 689-699.

Vollenbroich, D., M. Ozel, J. Vater, R. M. Kamp and G. Pauli (1997a). "Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*." Biologicals **25**(3): 289-297.

Wan, C. P., X. Y. Fan, Z. X. Lou, H. X. Wang, A. Olatunde and K. R. R. Rengasamy (2022). "Iturin: cyclic lipopeptide with multifunction biological potential." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **62**(29): 7976-7988.

Whang, L. M., P. W. G. Liu, C. C. Ma and S. S. Cheng (2008). "Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil." Journal of Hazardous Materials **151**(1): 155-163.

Whitehead, H. R. (1933). "A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci." The Biochemical Journal **27**: 1793-1800.

Wiedman, G., S. Y. Kim, E. Zapata-Mercado, W. C. Wimley and K. Hristova (2017). "pH-Triggered, Macromolecule-Sized Poration of Lipid Bilayers by Synthetically Evolved Peptides." Journal of the American Chemical Society **139**(2): 937-945.

Wojdyr, M. (2010). "Fityk: a general-purpose peak fitting program." Journal of Applied Crystallography **43**(5 Part 1): 1126-1128.

World Health Organization, (2023). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.

Wright, G. D. (2005). "Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification." Advanced drug delivery reviews **57**(10): 1451-1470.

Yuan, L. F., S. A. Zhang, Y. H. Wang, Y. C. Li, X. Q. Wang and Q. Yang (2018). "Surfactin Inhibits Membrane Fusion during Invasion of Epithelial Cells by Enveloped Viruses." Journal of Virology **92**(21): 19.

Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." Nature **415**(6870): 389-395.

Zhang, Q.-Y., Z.-B. Yan, Y.-M. Meng, X.-Y. Hong, G. Shao, J.-J. Ma, X.-R. Cheng, J. Liu, J. Kang and C.-Y. Fu (2021). "Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential." Military Medical Research **8**: 1-25.

Zhang, Y., J. S. Qi, Y. Q. Wang, J. H. Wen, X. Y. Zhao and G. F. Qi (2022). "Comparative study of the role of surfactin-triggered signalling in biofilm formation among different *Bacillus* species." Microbiological Research **254**: 11.

Zou, A., J. Liu, V. M. Garamus, Y. Yang, R. Willumeit and B. Mu (2010). "Micellization activity of the natural lipopeptide [Glu1, Asp5] surfactin-C15 in aqueous solution." Journal of Physical Chemistry B **114**(8): 2712-2718.