



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

Metabolická a biofyzikální charakterizace bakteriálních buněk schopných akumulace PHA

Metabolic and biophysical characterization of bacterial cells capable of PHA accumulation

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doctoral thesis

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Eva Slaninová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

ŠKOLITEL SPECIALISTA

Consultant

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2021

ABSTRAKT

Předložená disertační práce se zabývá charakterizací bakteriálních buněk schopných akumulace polyhydroxyalkanoátů (PHA). Disertační práce je vypracovaná formou komentované diskuse publikovaných prací. Práce rozvíjí aktuální téma studia protektivních funkcí PHA a nově objasňuje některé protektivní mechanismy vůči vybraným stresorům. V rámci práce byly studovány protektivní účinky PHA granulí před UV zářením a osmotickým stresem, konkrétně hypotonickým prostředím. V případě expozice buněk UV zářením jsou buňky chráněny především díky rozptylu UV záření na granulích, které se vyskytují v těsné blízkosti nukleoidu. U osmotického stresu hraje klíčovou roli amorfni stav PHA granulí, který stabilizuje buněčné membrány při hypertonickém namáhání buněk, načež jsou bakteriální buňky lépe schopné odolávat přechodu do hypotonického prostředí a udržet si svoji buněčnou integritu. Obecně je možné konstatovat, že amorfni stav PHA granulí je klíčový pro zajištění správné biologické funkce PHA, ať už jako zásobního nebo protektivního polymeru. Proto jsme se v další části této práce věnovali objasnění podstaty stabilizačního mechanismu, který chrání nativní PHA granule před krystalizací a udržují tak intracelulární polymer v termodynamicky nevýhodném fázovém stavu. Na základě experimentálních poznatků, kde jsme aplikovali vybrané stresy, jsme navrhli nový model stabilizace amorfniho stavu PHA granulí *in vivo*. Jedná se o kombinaci dvou mechanismů, kdy je z důvodu malého objemu granulí snížena rychlost krystalizace a zároveň voda přítomná v granulích plní roli nízkomolekulárního plastifikátoru. Díky metabolickému aparátu buněk jsou PHA neustále syntetizovány a zároveň degradovány, což vede k navýšení intracelulární koncentrace monomerů, které rovněž figurují v protektivním efektu PHA. V tomto kontextu jsme se tudíž zaměřili na popis mechanismu kryoprotektivních účinků 3-hydroxybutyrátu, monomeru nejrozšířenějšího zástupce PHA, poly(3-hydroxybutyrátu). Byl sestaven rovnovážný a nerovnovážný fázový diagram systému 3HB-voda, díky kterému je možné konstatovat, že 3HB představuje velice efektivní kryoprotektant, což má fundamentální význam pro pochopení protektivních vlastností PHA, ale tato skutečnost může být také aplikačně využita například při úchově biologických vzorků anebo v potravinářském průmyslu.

Klíčová slova:

Polyhydroxyalkanoáty; *Cupriavidus necator* H16; stresová odpověď bakterií; UV záření; osmotický stres; amorfni stav; kryoprotektivní účinek; fázový diagram.

OBSAH

1	Úvod.....	4
2	Teoretická část.....	5
2.1	Polyhydroxyalakanóáty	5
2.1.1	Mechanické a chemické vlastnosti PHA.....	5
2.2	Metabolismus a regulace PHA	6
2.2.1	PHA cyklus	6
2.3	Fyziologie a biofyzikální vlastnosti PHA granulí	7
2.3.1	Amorfní charakter nativních PHA granulí.....	7
2.3.2	Protektivní vlastnosti PHA při stresové odpovědi bakterií.....	8
3	Výsledky a diskuze.....	9
3.1	Protektivní vliv PHA vůči stresům.....	9
3.1.1	Pozitivní vliv PHA granulí vůči UV záření	9
3.1.2	Osmoprotektivní efekt PHA granulí	14
3.2	Amorfní charakter PHA granulí <i>in vivo</i>	19
3.3	Objasnění protektivních vlastností monomerní jednotky PHB.....	24
3.4	Přínos disertační práce k současnému stavu problematiky	30
4	Literatura	33
5	Seznam zkratk	39
6	Publikační činnost autorky	40
7	Životopis.....	43

1 ÚVOD

Již v 19. století, jeden ze zakladatelů bakteriologie Louis Pasteur, francouzský chemik a všeobecně známý jako otec mikrobiologie pronesl: „A stejně jsou to mikrobi, kdo bude mít poslední slovo!“. A není divu. Bakterie jakožto mikroorganismy nám svojí všudypřítomností na planetě Zemi dokazují silnou schopnost adaptace, jelikož úspěšně přežívají v oblastech od polárního až k tropickému pásu, kde musí čelit různorodým nepříznivým podmínkám, v našich zeměpisných šířkách například i změnám ročních období. Jsou-li mikroorganismy déle exponovány určitému typu stresu nebo kombinaci více stresů, dochází u nich k rozvoji vlastního protektivního aparátu.

Jedny ze základních stresových faktorů jsou náhlé změny teplot, které mají dalekosáhlé následky projevující se ve struktuře a biologické aktivitě mikroorganismů, kdy extrémní teploty vzdálené od optimálních hodnot mají negativní až letální účinek. Vysoká teplota v první řadě povede k rozvolnění cytoplazmatické membrány či denaturaci proteinů, nízká teplota vyvolá mimo jiné i osmotický stres s ohledem na změnu skupenství jak intracelulární, tak extracelulární vody. Narušení osmotické rovnováhy souvisí s druhem mikroorganismu, který může disponovat libovolnou tolerancí ke koncentraci rozpuštěných látek. Dalším častým stresem je změna pH, která výrazně ovlivňuje mimo jiné i samotný metabolismus buněk prostřednictvím protonizace a deprotonizace ovlivňující uspořádání proteinů, a tudíž i jejich aktivitu. Mění se také membránový transport v důsledku odchýlení pH od optimální hodnoty. Mezi další univerzální stres, kterému se mikroorganismy ve volné přírodě jen těžko vyhnou, je expozice UV záření, které vyvolává mutagenní změny v DNA. Samotné přežití mikroorganismů při expozici rozličným stresům závisí často na schopnosti rychlé odpovědi ať už regulačním či protektivním mechanismem.

Jak už bylo výše uvedeno, mnohé mikroorganismy si prostřednictvím adaptace vytvořily rozličné protektanty a protektivní mechanismy, díky kterým jsou schopny přežít i obtížné podmínky, ať už náhlé či trvalé. Mezi hojně využívané protektivní látky, které jsou si některé mikroorganismy schopny nasyntetizovat patří takzvané nízkomolekulární kompatibilní látky. Tyto látky působí jednak jako osmoprotektanty a zároveň mají pozitivní vliv na životaschopnost buněk i při nízkých či vysokých teplotách, přičemž za účelem ochrany proteinů před denaturací jsou často využívány proteiny teplotního šoku. Také produkce pigmentů hraje zásadní roli s ohledem na míru expozice UV záření.

Jedním z nejdůležitějších zásobních polymerů u prokaryotických mikroorganismů jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA), jejichž obsah v buněčné biomase může odpovídat až 90 % hmotnosti suché biomasy. Avšak bylo zjištěno, že akumulace PHA v bakteriálních buňkách z pohledu základních fyziologických a fyzikálně-chemických vlastností mikrobiálních buněk má velký vliv i na životaschopnost samotných buněk, a to především díky zapojení PHA do stresové odpovědi bakterií. Cílem této práce je charakterizace jednotlivých protektivních mechanismů nativních PHA vůči různým stresům aplikovaným na bakteriální buňky obsahující PHA inkluze. Dále je v této práci zkoumána podstata amorfního charakteru intracelulárních granulí a optimalizována izolace PHA za účelem jejich dalšího studia a také aplikací především v oblasti potravinářských obalů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyhydroxyalakanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální polyestery hydroxykyselin, které jsou syntetizované a akumulované celou řadou mikroorganismů z domén bakterie a archea, v nichž jsou tyto polymery přírodního původu akumulovány ve formě intracelulárních granulí. Svými vlastnostmi jako jsou biodegradabilita a kompatibility, se PHA řadí mezi významné alternativy ke klasickým plastům vyrobených z ropy s velkým aplikačním potenciálem, navíc je lze biotechnologicky produkovat z obnovitelných zdrojů (Philip a kol., 2007; K. Sudesh a kol., 2000).

2.1.1 Mechanické a chemické vlastnosti PHA

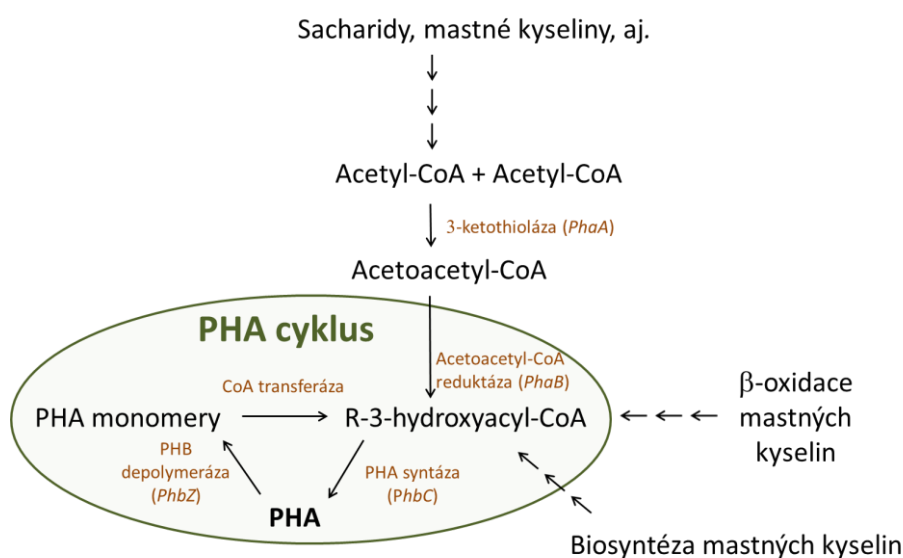
Z hlediska vlastností PHA, patří tyto ve vodě nerozpustné polymery mezi termoplasty a elastomery s ohledem na délku monomerních jednotek, kdy skupina scl-PHA vykazuje vysokou krystalinitu a svými dalšími vlastnostmi podobnými konvenčním termoplastům. Naopak skupina mcl-PHA vykazuje specifické vlastnosti elastomerů jako pružnost a nízká krystalinita. Avšak mechanické a chemické vlastnosti PHA se též mění v závislosti na daném složení homopolymeru či kopolymeru, konkrétně na zastoupení jednotlivých monomerních jednotek (Chen a kol., 2015; Muhammadi a kol., 2015). Je známo více než 150 druhů monomerních jednotek, které mohou být ve struktuře různě kombinovány a ovlivňují tak vlastnosti polymeru jako celku (Sudesh a kol., 2000). Monomerní jednotky ve všech PHA, které byly doposud charakterizované, se vyskytují v R konfiguraci důsledkem vysoké stereospecifity PHA syntázy. Tyto polymery jsou dále specifické svým vysokým stupněm polymerizace (přibližně 100–3 000), co se týče molekulové hmotnosti PHA, pohybuje se v rozmezí 200–3 000 kDa v závislosti na typu monomerní jednotky, mikroorganismu a podmínkách kultivace (Chen a kol., 2015; Muhammadi a kol., 2015). Fyzikální vlastnosti jsou přímo závislé na konkrétním složení daného polymeru, kdy nejlépe prostudovaným PHA je bezesporu první objevený homopolymer P3HB ze skupiny scl-PHA. Jedná se o vysoce krystalický polymer (55–80 %) v důsledku R konfigurace všech chirálních atomů uhlíku ve své struktuře. P3HB je některými svými vlastnostmi velmi podobný polypropylenu, ať už Youngovým modulem o hodnotě 3,5 GPa či pevností v tahu 40 MPa. Na druhou stranu prodloužení neboli elongace činí u P3HB pouze 5 % kdežto u polypropylenu dosahuje elongace až 400 %, v důsledku čehož je P3HB tuhý a křehký. Teplota skelného přechodu P3HB nastává při 4 °C, přičemž teplota tání je velice blízká teplotě tepelného rozkladu, konkrétně hodnoty teploty tání polymeru P3HB odpovídají 173 až 180 °C a teplota rozkladu 200 °C (Hazer a Steinbüchel, 2007). Jak již bylo zmíněno výše, ke změně vlastností polymeru, především teplot tání a rozkladu lze docílit pomocí inkorporace více druhů monomerních jednotek, lze tak získat kopolymery s lepšími či výhodnějšími vlastnostmi. Zatímco samotný P3HB má teplotu tání okolo 180 °C, v kopolymeru s 4-hydroxybutyrátem (4HB) se teplota sníží až na 91,8 °C či s 3-hydroxyvalerátem (3HV) na cca 116 °C, kdy míra změn vlastností kopolymerů je závislá na molárních poměrech monomerů (Savenkova a kol., 2000; Wen a kol., 2012).

2.2 Metabolismus a regulace PHA

Struktura PHA je přímo závislá na druhu substrátu určujícího dráhu biosyntézy PHA, která bude tvořit specifické monomerní jednotky pro tuto dráhu, a tak i samotnou strukturu PHA. Substráty vhodné jako zdroje uhlíku mohou být rozděleny na strukturně podobné (mastné kyseliny, alkoholy) a substráty, které nijak svojí strukturou nesouvisejí se strukturou PHA (glukóza), přičemž nedílnou součástí metabolických drah PHA jsou regulační mechanismy (Chen a kol., 2015; Kessler a Witholt, 2001).

2.2.1 PHA cyklus

V rámci PHA metabolismu, biosyntéza a degradace PHA jsou navzájem úzce propojeny, které probíhají současně. I za příznivých podmínek, jako je například nadbytek zdroje uhlíku, jsou PHA depolymerázy aktivní a dochází k současné syntéze a degradaci polymeru, i když syntéza je výrazně významnější. Z tohoto důvodu se PHA metabolismus často nahrazuje pojmem PHA cyklus (viz obr. 1) pro zdůraznění svého cyklického charakteru (Kadouri a kol., 2005). Důsledkem tohoto metabolismu je vysoký intracelulární pool PHA monomerních jednotek v PHA akumulujících buňkách. Jelikož jsou monomery PHA, především pak 3HB, považovány za chemické chaperony chránící proteiny a další biomolekuly vůči řadě stresových faktorů, je vysoký intracelulární pool monomerů fyziologicky velice důležitý faktor (Obruca a kol. 2016a).



Obr.1 Metabolismus a cyklus PHA (Obruca a kol., 2020).

2.2.1.1 Biosyntéza PHA

Biosyntéza PHA patří k dobře prozkoumaným metabolickým drahám, je rozdělena do tří hlavních drah v závislosti na povaze uhlíkatého zdroje. Pro syntézu scl-PHA je specifická první dráha odpovídající produkci PHB u modelového mikroorganismu *Cupriavidus necator* H16, zatímco druhou metabolickou dráhu vedoucí k syntéze mcl-PHA zastupuje modelové mikroorganismy rod *Pseudomonas*. Poslední metabolická dráha vede také k syntéze mcl-PHA, kdy meziprodukty biosyntézy mastných kyselin se stanou prekurzory pro biosyntézu mcl-PHA (Sudesh a kol., 2000). Tyto metabolické dráhy mohou být dále rozděleny do dalších

minimálně 12 drah různých typů PHA. Všechny tyto dráhy jsou propojeny buď s nativními, nebo uměle vytvořenými metabolickými drahami, které společně vytváří různorodé PHA (Chen a kol., 2015).

2.3 Fyziologie a biofyzikální vlastnosti PHA granulí

Intracelulární granule představují velký podíl bakteriálních buněk (až 90 % hmotnosti suché biomasy, maximálně cca 40 objemových % buňky), výrazně tak ovlivňují jejich fyzikálně chemické vlastnosti (Mravec et al., 2016). Intracelulární PHA jsou akumulovány různými mikroorganismy ve formě amorfních granulí sférického tvaru tvořené hydrofobním PHA polymerním jádrem obklopeným vnější proteinovou vrstvou (tzv. strukturní PHA proteiny) u bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16. Takto strukturované supramolekulární komplexy neboli karbonosomy dosahují velikostí 0,2 až 0,5 μm v průměru (Bresan a kol., 2016).

Doposud bylo identifikováno na devatenáct proteinů na povrchu PHB granulí u bakteriálního kmene *C. necator* H16: PHB syntáza (PhaC), sedm PHB depolymeráz (PhaZ1-PhaZ5, PhaZd1 a PhaZd2), dvě oligomerní hydrolázy PHB (PhaZb a PhaZc), sedm phasinů (PhaP1-PhaP7) a dva DNA a PHB vazné proteiny (PhaR a PhaM), přičemž phasiny pokrývají většinu povrchu PHB granulí (Jendrosseck a Pfeiffer, 2014). Jedná se o proteiny amfifilního charakteru s malou molekulovou hmotností (14–28 kDa) obsahující strukturní motiv leucinového zipu v sekvenci aminokyselin podporující domnělou oligomerizaci jako mechanismus formace těchto polypeptidů (Maestro a Sanz, 2017; Pötter a kol., 2005). Obecně phasiny hrají klíčovou roli nejen ve stabilizaci PHA granulí, ale také v samotné regulaci syntézy, distribuci během buněčného dělení a degradaci PHA granulí, důsledkem čehož je různá velikost a počet PHA granulí (Mezzina a Pettinari, 2016). Konkrétně u *Cupriavidus necator* H16 je povrch PHB granulí tvořen 27 až 54 % PhaP1, čímž dosahuje až 5 % celkové proteinové složky v buňce (Wieczorek a kol., 1995). Jestliže byla produkce PhaP1 omezena pomocí delece genů PhaP genu, docházelo k vytvoření jedné velké PHB granule v rámci buňky na rozdíl rekombinantních kmenů, kde byla naopak zvýšena produkce PhaP1, což vedlo k produkci velkého počtu malých PHB granulí. (Pötter a kol., 2002; Wieczorek a kol., 1995). Zatímco protein PhaM se váže na granuli PHB přes syntázu PhaC a zároveň je vázán s bakteriální DNA. Díky čemuž PhaM zajišťuje rozdělení PHB granulí z mateřské buňky do dvou dceřiných buněk během dělení. Nicméně bylo potvrzeno, že PhaM (32 kDa) je schopen přepnout neaktivní formu PhaC na aktivní, jejíž podíl byl podstatně vyšší než bez přítomnosti aktivátoru PhaM. Odhaduje se, že jedna molekula PhaM je dostatečná pro aktivaci přibližně 11 molekul PhaC (Cho a kol., 2012; Jendrosseck, 2009; Jendrosseck a Pfeiffer, 2014). Stejně jako u PhaP1 byla objevena závislost počtu a velikosti granulí PHB na množství PhaM, kdy s delecí genu *phaM* klesá počet granulí PHB až na jednu velkou oproti nadměrné expresi PhaM, kdy se naopak výrazně zvýší počet malých granulí PHB (Wahl a kol., 2012).

2.3.1 Amorfní charakter nativních PHA granulí

Jak bylo řečeno v předcházejících kapitolách, P3HB je ukládáno ve formě intracelulárních granulí v amorfním stavu. Jakmile jsou P3HB granule izolovány, dochází k alespoň částečné ztrátě amorfního charakteru a granule přechází do krystalického stavu s velmi odlišnými

vlastnostmi. Amorfni P3HB granule jsou často na základě vlastností přirovnávány k podchlazené vodě, která si zachovává strukturu kapaliny při prudkém snížení rychlosti difúze a nárůstu viskozity. Především díky mechanickým vlastnostem se amorfni P3HB granule liší od ostatních komponent, které se vyskytují v bakteriálních buňkách (Bontrone a kol., 1992). Vliv amorficity P3HB je v současné době velmi zkoumaným tématem, mnohé studie prokázaly spojitost mezi výjimečným charakterem P3HB *in vivo* a protektivními mechanismy vůči různým stresovým faktorům jako je osmotický šok, nízká teplota, aj. K překvapujícím zjištěním patří bezesporu udržení amorfního charakteru intracelulárních PHB granulí i za velmi nízkých teplot ($-140\text{ }^{\circ}\text{C}$), který byl prokázán díky snímkům z cryo-SEM (Sedlacek a kol., 2019b).

Mechanismus uchování amorfního charakteru P3HB granulí *in vivo* namísto termodynamicky výhodnější krystalické formy není zcela objasněn, ačkoli je známo několik teorií, které se snaží vysvětlit nativní charakter intracelulárních P3HB granulí. Jedna z nich je založena na účasti tzv. plastifikátorů (nízkomolekulárních či makromolekulárních látek), ale nebyl prokázán žádný přímý vliv jednotlivých sloučenin. Mezi navrhovanými sloučeninami byla i voda, neboť je součástí nativních granulí, a to až z 10 hmotnostních % (Lauzier, Marchessault, a kol., 1992; Lauzier, Revol, a kol., 1992; Mas a kol., 1985). Předpokládá se, že voda stabilizuje β -konformaci syntetizovaných řetězců PHA uvnitř granulí prostřednictvím vodíkových vazeb, a tudíž znemožní jejich krystalizaci. Tato teorie však nebyla prozatím experimentálně dokázána. Druhá teorie o amorficitě P3HB granulí vychází z kinetického mechanismu, který zohledňuje pokles rychlosti krystalizace z důvodu nižší frekvence spontánních nukleací v tak malém objemu (Bontrone a kol., 1992; de Koning a Lemstra, 1992). Později byl tento argument experimentálně vyvrácen vytvořením krystalického PHA za použití amorfni granule o velikosti submikronu (Horowitz a Sanders, 1994). Mezi další stabilizační mechanismy, které mohou hrát důležitou roli v amorficitě PHA granulí, je považována samotná proteinová povrchová vrstva granulí, která chrání granule před případnou koalescencí (Pötter a kol., 2002). V nynější době se čím dál více přiklání ke kombinaci těchto tří modelů, které alespoň částečně vysvětlují mechanismus amorfního charakteru PHB (Obruca a kol., 2017).

2.3.2 Protektivní vlastnosti PHA při stresové odpovědi bakterií

Většina mikroorganismů si vyvinula celou řadou protektivních mechanismů, aby dokázaly čelit různorodým podmínkám prostředí, v němž se vyskytují (dostupnost živin, změny teplot, pH, oxidace či různé koncentrace solí aj.). Schopnost bakterií přežít v některých případech až extrémní podmínky závisí především na rychlosti odezvy regulačních mechanismů a přizpůsobení metabolických drah mikroorganismů (změny v genové expresi, lokace) (Ron, 2013). Jedním z příkladů významných obranných nástrojů je i mimo jiných produkce a akumulace PHA ve formě intracelulárních granulí, které neslouží pouze jako zdroj energie a uhlíku, ale hrají významnou protektivní roli u mnohých mikroorganismů vůči různým stresům, jak je shrnuto v tab. 4 (Obruca a kol., 2020). Nicméně role nativních PHA granulí je mnohem komplexnější, než by se mohlo zdát, neboť byl prokázán i protektivní efekt monomerních a oligomerních jednotek PHA v bakteriích, jsou přitom často přirovnávány k tzv. kompatibilním látkám, chránící bakterie při nízkých teplotách, osmotickém šoku, oxidačním stresu atd. (da Costa a kol., 1998; Obruca a kol., 2016a; Obruca a kol., 2016b).

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci této kapitoly jsou shrnuty, komentovány a diskutovány experimentální výsledky shromážděné v průběhu doktorského studia, a to formou komentované kompilace článků, publikovaných nebo v současnosti podstupujících recenzní řízení v zahraničních odborných časopisech. Detailní popis použitých metodik a experimentálních postupů je součástí jednotlivých komentovaných publikací.

Disertační práce je zaměřena na metabolickou a biofyzikální charakterizaci bakteriálních buněk schopných akumulace PHA, a to především v kontextu snahy o objasnění mechanismů v současnosti široce diskutovaných protektivních účinků P3HB granulí vůči stresovým podmínkám. Proto jsme se zaměřili na podrobné studium protektivních účinků P3HB granulí vůči vybraným environmentálně relevantním stresům (podkapitola 3.1). Zdá se, že amorfni charakter P3HB granulí může představovat klíčový faktor přispívajícím k jejich protektivní funkci. Proto jsme se v této práci věnovali také tomuto fenoménu, konkrétně jsme se zaměřili na jednotlivé stabilizační mechanismy přispívající ke stabilizaci termodynamicky nevýhodné amorfni formy P3HB v bakteriálních buňkách a na experimentální posouzení efektivity jejich účinku za stresových podmínek (podkapitola 3.2). V rámci posouzení metabolických důsledků přítomnosti P3HB v buňkách jsme se zaměřili na podstatu protektivních účinků monomerních jednotek 3HB, které jsou v bakteriích schopných akumulace P3HB ve vysoké míře katabolicky produkovány. Právě popis a objasnění bioprotektivních efektů 3HB představuje nejen originální a velice zajímavý příspěvek k pochopení komplexní biologické role PHA v buňkách, ale také otevírá celou řadu potenciálních aplikací především v oblasti kryobiologie či v potravinářském průmyslu (viz podkapitola 3.3). Aktualizovaná představa o klíčových mechanismech protektivních účinků intracelulárních granulí P3HB a 3HB, vytvořená na základě originálních poznatků získaných v rámci této doktorské práce, je shrnuta a okomentována v podkapitole 3.4. A konečně, protože každá odpověď generuje další otázky, kapitola 3.5 představuje další možné směřování výzkumu navazujícího na tuto doktorskou práci.

3.1 Protektivní vliv PHA vůči stresům

Na základě předešlého výzkumu realizovaného na pracovišti doktorandky bylo zjištěno, že intracelulární PHA neslouží bakteriím pouze jako zásobní zdroj energie a uhlíku, ale také se řadí svými jedinečnými vlastnostmi mezi významné protektanty před škodlivými vlivy jako je zamrazování, vysoká teplota aj. (viz podkapitola 2.3.2). Proto byla v rámci experimentální části práce nejprve věnována pozornost studiu odolnosti mikrobiálních buněk schopných produkce a akumulace PHA vůči dalším experimentálně relevantním stresům (UV záření, osmotický stres).

3.1.1 Pozitivní vliv PHA granulí vůči UV záření

V rámci řešení disertační práce jsme se nejprve zaměřili na jeden z nejběžnějších přirozeně se vyskytujících stresů, a to na expozici UV záření, které způsobuje fatální změny v molekulární struktuře DNA, RNA, proteinů a dalších buněčných komponent (Gabani a Singh, 2012). Nejškodlivější složka UV záření UV-C (100–295 nm) je efektivně absorbována ozónovou vrstvou na rozdíl od záření ve spektrální oblasti UV-B (295–320 nm), které prochází atmosférou a dopadá na zemský povrch. Hlavní negativní účinky této složky UV záření

spočívají ve fotochemických změnách iniciovaných absorpcí tohoto záření molekulami DNA. Nejčastější poškození DNA UV zářením spočívá především v tvorbě pyrimidinových dimerů cyklobutanu a pyrimidinových dimerů kovalentně vázaných se dvěma sousedícími pyrimidiny. Další možné poškození u bází je nasycení dvojné vazby pyrimidinů, čímž vzniká hydrát cytosinu a thyminglykol (Goosen a Moolenaar, 2008). V důsledku expozice UV záření si mnohé mikroorganismy vyvinuly různé funkční fotoprotektivní mechanismy, který minimalizují jeho vliv a následky.

Obecně jsou mikroorganismy schopné přežívat v extrémním prostředí nazývány extremofilové, v kontextu UV záření jsou konkrétně označovány jako UV rezistentní mikroorganismy (UVR mikroorganismy). Tuto skupinu lze dále dělit dle zvolené strategie obrany vůči UV záření na UVR mikroorganismy využívající produkci různých metabolitů (pigmenty, mykosporinu podobné aminokyseliny, melanin aj.) (Gabani a Singh, 2012; Koller a kol., 2014) či využívající reparačních drah již pozměněné DNA za pomoci například tzv. fotolýz. Tyto enzymy jsou schopny štěpit kovalentní vazby mezi pyrimidinovými dimery v rámci procesu fotoreaktivace, který je aktivován zářením o vlnové délce 300–500 nm jakožto zdrojem energie. V důsledku této reparační dráhy tak vznikají původní pyrimidinové monomery (Takahashi a Ohnishi, 2009). Další enzymatická dráha nazývána excisní reparace bází (BER) je inicializována DNA glykosylázami, které rozpoznají a hydrolyzují glykosylovou vazbu mezi poškozenou bází a deoxyribózou. Mikroorganismy také často využívají při opravách DNA enzymy UV-endonukleázy, které rozpoznají a ihned vystříhnout příslušné fotoprodukty. Nicméně mezi nejčastěji využívanou reparační dráhu DNA patří dráha nukleotidové excisní reparace (NER), díky které dochází k úplnému odstranění poškozených oligonukleotidů (Ataian a Krebs, 2006; Goosen a Moolenaar, 2008).

Vlivem UV záření si řada mikroorganismů vyvinula alternativní strategie efektivní ochrany. Jednu z takovýchto strategií představuje také produkce a akumulace intracelulárních PHA granulí. Pozitivní vliv PHA granulí v mikrobiálních buňkách vůči UV-B záření byl již potvrzen v několika studiích. Například byl porovnáván protektivní efekt PHA u PHA produkujícího kmene *Azospirillum brasiliense* oproti jeho mutantu s absencí PHA syntázy (Kadouri a kol., 2003a). Stejný pozitivní vliv PHA granulí byl pozorován při porovnání mutantního kmene *Azospirillum brasiliense* neschopného degradace PHA s divokým kmenem (Kadouri a kol., 2003b). Podobného výsledku bylo dosaženo i při použití jiného mikroorganismu, konkrétně *Aeromonas hydrophila* a jeho mutantního kmene bez PHA syntázy (Zhao a kol., 2007). Přestože byl takto opakovaně experimentálně potvrzen pozitivní vliv PHA granulí při ochraně buněk před UV-B zářením, nebylo zatím uvedeno žádné vysvětlení, ani navržen mechanismus toho, jak jsou tyto buňky chráněny. Objasnění UV-fotoprotektivity PHA granulí by přitom mohlo mít v budoucnu velký význam, a to i vzhledem k ubývajícím ozónové vrstvě coby primární environmentální bariéře proti UV záření. Předpokládá se, že na konci 21. století dojde k markantnímu navýšení intenzity UV-B záření, a to až o 5–15 % v mírných zeměpisných šířkách a až o 20 % v polárních oblastech. Význam UV záření jako stresoru (stresového faktoru) pro prokaryotické buňky tedy ještě naroste (Zepp a kol., 2011). Proto jsme se rozhodli blíže experimentálně prozkoumat mechanismus UV protekce mikroorganismů PHA granulemi, a to s využitím ne zcela rutinních spektroskopických přístupů.

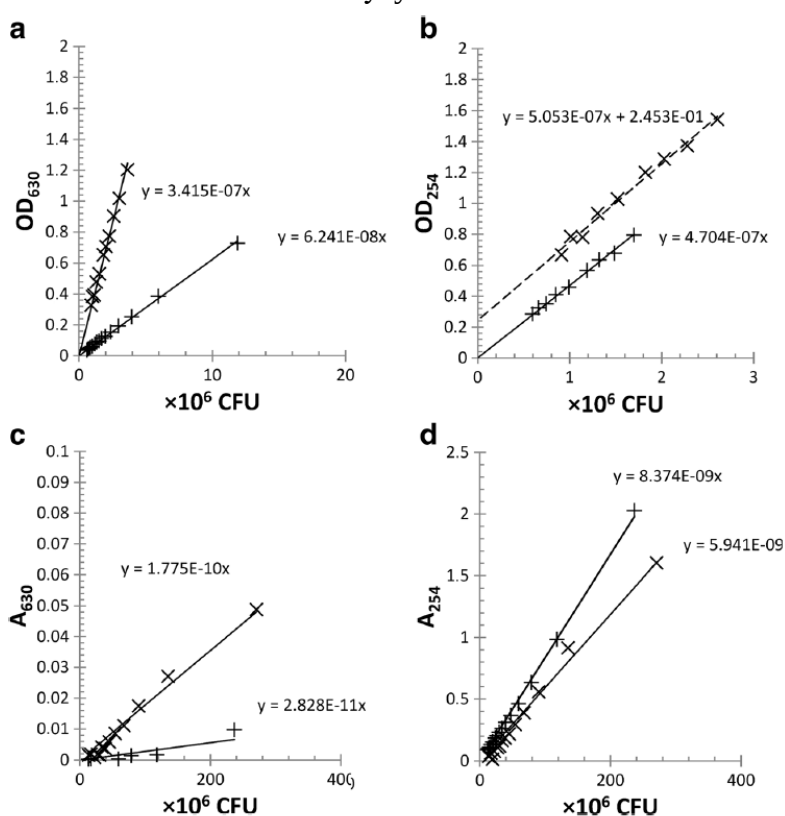
Nejprve jsme se zaměřili na potvrzení pozitivního vlivu P3HB granulí vůči UV záření u modelového bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 (s obsahem 74 hm. % P3HB na suchou biomasu) oproti jeho mutantnímu kmenu *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴ bez schopnosti produkce a akumulace P3HB. Obě kultury byly pro tento účel upraveny na stejnou koncentraci buněk (10^8 CFU/mL) a vystaveny expozici UV záření (UV-A lampa s přesahem do UV-B oblasti, emisní pás 400–300 nm, maximum emise 350 nm, sekundární emisní pás při 313 nm), kdy viabilita obou bakteriálních kmenů byla hodnocena po různé délce expozice UV záření. Výsledky této experimentální studie byly publikovány v časopise *Applied Microbiology and Biotechnology* v článku, uvedeném v **naší práci Slaninova a kol. 2019¹**. Výsledky studie jednoznačně potvrzují podstatně vyšší odolnost kultury obsahující PHB vůči UV záření, přičemž pokles viability u referenčního vzorku, vystaveného stejné manipulaci pouze s absencí UV expozice, byla nižší než 5 %. Z tohoto důvodu není pochyb o tom, že letální efekty pozorované v tomto experimentu jsou správně přisuzovány vlivu expozice UV záření.

Abychom pochopili, jak intracelulární P3HB granule interagují se světelným zářením, byly buněčné suspenze obou kmenů podrobeny komplexní spektroskopické charakterizaci, a to jak v ultrafialové, tak také ve viditelné oblasti záření. Nejprve byla provedena standardní turbidimetrická analýza v transmisním módu na standardním dvoupaprskovém UV-Vis spektrofotometru. Na základě změřených transmitančních spekter byly pro analyzované buněčné suspenze (obě testované buněčné kultury v různých stupních zředění) vypočítány optické hustoty pro konkrétní vybrané vlnové délky (630 nm, 254 nm). Vyjma oblasti blízké vlnové délce 200 nm vykazovala buněčná suspenze P3HB akumulujícího kmene o mnoho vyšší optickou hustotu ve srovnání s neakumulujícím kmenem. Je třeba zdůraznit, že takto naměřená spektra a hodnoty optických hustot kultur nerozlišují absorpci a rozptyl záření. Jinými slovy, naměřená optická hustota reprezentuje souhrnný příspěvek záření blokováného v průchodu vzorkem jak v důsledku jeho absorpce jednotlivými komponentami vzorku, tak rovněž rozptylem záření buňkami, resp. jejich vnitřní strukturou. A právě pochopení, zda se jedná převážně o rozptyl či absorpci světla je klíčové k pochopení fotoprotektivního mechanismu P3HB granulí. Absorpce světla iniciuje různé fyzikální či fotochemické procesy, které mohou mít často škodlivé až fatální účinky na vitalitu buněk, zejména jedná-li se o záření v UV oblasti. Naproti tomu rozptyl světla je charakterizován převážně ochranným účinkem, tzv. rozptylové stínění snižuje lokální intenzitu dopadajícího záření, a chrání tak fotolabilní komponenty buňky (Paunescu a kol., 2014). Jelikož klasická turbidimetrická analýza neposkytovala relevantní vysvětlení účinku záření na buňky obsahující P3HB, byla tato technika doplněna měřením difúzní transmitance buněčných suspenzí pomocí integrační koule. Tato technika je speciálně navržena pro analýzu absorpce záření zakalenými vzorky. Touto metodou bylo tedy možné minimalizovat signál odpovídající rozptylu světla, což bylo potvrzeno snížením vypočtených hodnot absorbance ve viditelné oblasti ve srovnání s hodnotami optické hustoty stanovené turbidimetricky o více než tři řády. Z tohoto důvodu lze přisoudit hodnotu optické hustoty naměřené pomocí klasické turbidimetrie téměř výhradně vlivu rozptylu světla. Jinými slovy

¹ SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; MÜLLEROVÁ, L.; SAMEK, O.; KOLLER, M.; HESKO, O.; KUČERA, D.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, roč. 102, č. 4, s. 1923–1931. ISSN: 1432-0614. 33

vyšší hodnoty optických hustot u suspenzí bakteriálního kmene *Cupriavidus necator* H16 jsou evidentně způsobeny rozptylem světla na vnitřním upořádání buněk, konkrétně na granulích P3HB přítomných v cytoplazmatickém prostoru.

Za účelem spolehlivější interpretace výsledků jsme navrhli originální kvantitativní přístup založený na porovnání závislosti optické hustoty (turbidimetrie) a absorpce (difúzně-transmisní spektrometrie) na hustotě buněčných suspenzí (viz obr. 2). Zaměřili jsme se především na naměřená data u dvou konkrétních vlnových délek; vlnovou délku 254 nm jsme zvolili proto, že odpovídá maximu absorpce molekulami DNA, zatímco vlnová délka 630 nm se rutinně využívá při charakterizaci buněčné hustoty. Jak lze vyčíst z grafu (obr. 15a), závislost optické hustoty na buněčné hustotě suspenzí vykazuje prakticky lineární průběh u obou kmenů. Dále lze na základě velmi dobré lineární závislosti usoudit, že rozptyl světla u buněk obsahujících P3HB je kumulativního rázu na rozdíl od naměřených hodnot při vlnové délce 254 nm (viz obr. 2b), kde spojnice trendu neprotíná počátek souřadnic. Výsledky nám tak potvrzují předpoklad, že buňky obsahující intracelulární granule P3HB rozptylují dopadající světlo (viz. obr. 2d). Na základě porovnání směrnice spojnice trendu jsme byli schopni odvodit 30% relativní pokles absorpčního koeficientu jedné buňky obsahující P3HB oproti P3HB negativním buňkám při vlnové délce 254 nm. To potvrzuje protektivní efekt rozptylu světla na vnitřní struktuře buněk, který se projevuje snížením efektivity absorpce UV záření. Na obr. 2c je patrná „zbytková“ absorpance ve viditelné oblasti světla, kterou je možné přisoudit rozptýlenému záření nezachycenému detektorem integrační koule (např. zpětně rozptýlené záření). Tato závislost nepřímo charakterizuje míru nejistoty rozlišení rozptylové a absorpční komponenty optické hustoty pro jednotlivé buněčné suspenze při použití uvedené kombinace turbidimetrické a difúzně-transmitanční analýzy.



Obr. 2: Souhrn výsledků naměřených optických hustot a absorbancí buněčných suspenzí *C. necator* H16 produkující PHB (×) a *C. necator* PHB⁻⁴ (+). **a, b** Závislost optické hustoty při 630 a 254 nm na hustotě buněk. **c, d** Závislost absorpance na 630 a 254 nm na hustotě buněk.

Naše další experimenty se zaměřily na metodicky nezávislé ověření předpokladu, že rozdíl v hodnotách optické hustoty a absorpance suspenzí bakteriálních buněk skutečně odpovídá intenzitě rozptýleného světla. Jako vhodnou metodu jsme pro tento účel vybrali nefelometrii, která se zaměřuje na přímé měření intenzity rozptýleného záření. Jelikož jsme neměli k dispozici nefelometr (zařízení konstruované jednoúčelově pro měření rozptýleného záření pod fixním nebo proměnlivým úhlem), využili jsme pro tento účel standardní fluorimetr, jehož konstrukce umožňuje měření intenzity záření emitovaného nebo rozptýleného vzorkem pod úhlem 90°. Abychom potlačili vliv kolísání intenzity emise zdroje světla fluorimetrem (xenonová výbojka), byly intenzity rozptýleného světla buněčných suspenzí *C. necator* H16 a *C. necator* PHB⁻⁴ normalizovány na jednotku CFU a vyneseny ve vzájemném poměru v závislosti na vlnové délce záření. Takto upravená spektra získaná prostřednictvím základních nefelometrických testů potvrdila, že intenzita rozptýleného záření u buněk obsahující P3HB granule je výrazně vyšší v UV oblasti ve srovnání s mutantním kmenem *C. necator* PHB⁻⁴. Lze tedy konstatovat, že nefelometrie nám potvrdila naše závěry z předchozích spektroskopických metod.

Jak už bylo popsáno na začátku této podkapitoly, UV záření neindukuje pouze strukturní změny DNA a dalších buněčných komponent, ale indukuje také oxidativní stres za vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) v mikrobiálních buňkách. Z toho důvodu jsme zkoumali, jestli fotoprotektivní účinek P3HB granulí, který spočívá v rozptylu UV světla, ovlivňuje intracelulární koncentraci ROS. Ke stanovení množství intracelulárních ROS před, resp. po UV expozici jsme využili průtokovou cytometrii v kombinaci s fluorescenční sondou CM-H2CFDA, u které je zelená fluorescence přímo aktivována reakcí s ROS (Dong a kol., 2015). Tímto způsobem jsme analyzovali oba bakteriální kmeny před a po UV expozici jak obarvené, tak i neobarvené. Z naměřených fluorescenčních intenzit byl patrný pouze mírný nárůst signálu u bakteriálních buněk obsahující P3HB po expozici UV (přibližně 10 %). Oproti tomu u kultury neobsahující granule P3HB, která byla vystavena UV záření, vzrostla intenzita zelené fluorescence až 3,6krát. Tím jsme potvrdili, že rozptyl P3HB granulí chrání bakteriální buňky před samotnou tvorbou ROS a následnými fotochemickými reakcemi.

Při diskusi efektu P3HB na produkci ROS v buňce je třeba podotknout, že pozitivní vliv vůči účinkům ROS byl v předchozí studii na pracovišti doktorandky potvrzen i u monomerních jednotek 3HB, které se vyskytují až v 16,5krát vyšší koncentraci v mikrobiálních buňkách schopných akumulace PHA než u mutantu téhož bakteriálního kmene bez schopnosti produkce a akumulace PHA (Obruca a kol., 2016a). Vysvětlení takto vysoké koncentrace intracelulárního 3HB spočívá v cyklické povaze PHA metabolismu, kdy jsou řetězce PHA na jednu stranu syntetizovány a zároveň degradovány právě na monomerní jednotky např. 3HB (viz kapitola 2.2.1). Omezení produkce 3HB, tedy jinými slovy omezení či delece intracelulárních depolymeráz, jak tomu bylo u mutantního kmene *Azospirillum brasiliense*, prokázalo vyšší citlivost vůči UV záření nežli jeho divoký kmen (Kadouri a kol., 2003b).

Výsledky naší experimentální studie potvrdily předpoklad, že fotoprotektivní role P3HB granulí je úzce spjata s ochranou molekul DNA před expozicí vysoké intenzitě záření ve spektrální oblasti UV-B. Z tohoto pohledu je klíčovým faktorem vzájemná lokalizace P3HB granulí a DNA v intracelulárním prostoru. Na rozdíl od monomerních 3HB, které se volně vyskytují v cytoplazmatickém prostoru, intracelulární granule P3HB jsou v bakteriálních buňkách vázány k DNA skrze protein PhaM podobný phasinům, který je schopen se navázat jak na DNA, tak na PHA syntázu. Díky této vazebné schopnosti je PhaM zapojen hned v několika procesech, mimo jiných i v distribuci P3HB granulí do dceřiných buněk během buněčného dělení u bakteriálního kmene *C. necator* H16 (Jendrossek a Pfeiffer, 2014).

3.1.2 Osmoprotektivní efekt PHA granulí

Další z podrobněji studovaných stresových faktorů – osmotická dysbalance – byl zvolen především na základě předešlé studie realizované na pracovišti autorky předložené práce (Obruca a kol., 2017). Tato studie se zabývala osmoprotektivním účinkem P3HB granulí v hypertonickém prostředí. Další motivací byl fakt, že se opět jedná o velice častý stres v přirozeném prostředí mikroorganismů, jelikož mikrobiální buňky se v přírodě musejí potýkat s opakovanými osmotickými výkyvy. Při hypertonických podmínkách způsobených vysokou extracelulární koncentrací rozpuštěných látek (především solí) dochází k rychlé dehydrataci cytoplazmy. Důsledkem intenzivního toku vody směrem ven z buňky dochází ke smrštění cytoplazmatické membrány a zmenšení celkového objemu buněk, což může vést až k oddělení vnějších buněčných obalů od cytoplazmatické membrány, tzv. plazmolýze. Poněvadž plazmatická membrána není schopna se smrstit o více než 2–5 %, intenzivní plazmolýza často způsobí narušení strukturního uspořádání či dokonce úplnou ztrátu integrity membrány (Schwarz a Koch, 1995). Rychlost i míra dehydratace bývá přímo úměrná osmotickému gradientu napříč plazmatickou membránou, přechod vody je ovšem rovněž limitován vlastní permeabilitou membrány (souvisí se složením a morfologií membrány), která je rovněž ovlivněna teplotou prostředí. Opačný případ nastává, jestliže se mikroorganismy ocitnou v hypotonickém prostředí, kde dochází naopak k přítoku vody do buňky. Při výraznějším porušení integrity cytoplazmatické membrány za těchto podmínek hrozí prasknutí, tzv. hypotonická lyze (Brown a Audet, 2008). Molekuly vody se mohou do buňky a ven dostávat dvěma způsoby. Prvním z nich je využití specifických membránových kanálků, tvořených transmembránovými proteiny, tzv. aquaporiny. Druhou možností je difúze přes lipidickou dvojvrstvu (Mazur, 2004), která je z kinetického hlediska výrazně bržděna energetickými bariérami spojenými se vstupem vody do silně nepolárního intramembránového prostředí.

Mnohé mikroorganismy si vyvinuly v závislosti na jejich optimální koncentraci rozpuštěných látek v prostředí celou řadu důmyslných protektivních mechanismů vůči osmotickým šokům. Jedním ze stěžejních ochranných mechanismů je bezesporu zapojení mechano-senzitivních kanálů a osmotických přenašečů, díky kterým jsou buňky schopné rozpoznat či detekovat osmotické změny ve vnějším prostředí. Další obrannou strategií bakterií je syntéza osmolytů, často také nazývaných jako kompatibilní soluty. Tyto malé organické molekuly (trehalóza, ektoiny a jiné) jsou velmi prospěšné při hypertonickém stresu, kdy vyrovnávají extracelulární osmotický tlak (Roberts, 2005). Naopak u hypotonického stresu buňky „pumpují“ vodu a

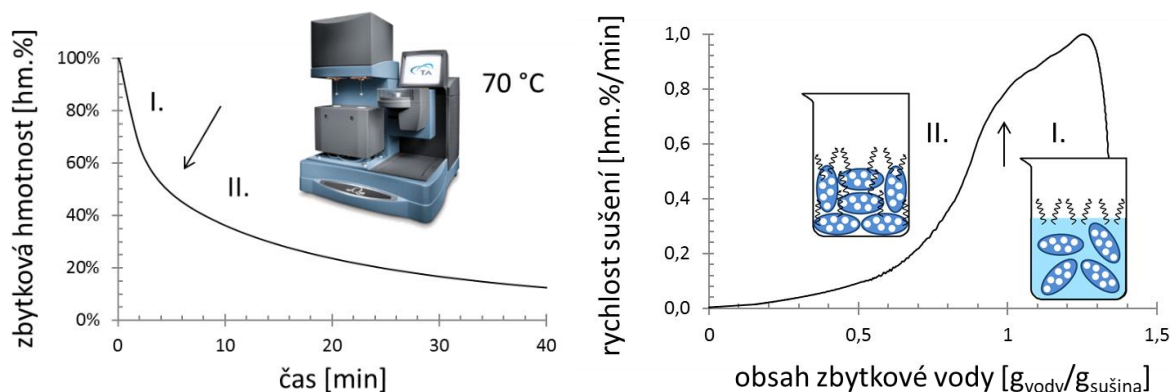
kompatibilní látky pomocí mechano-senzitivních kanálů do vnějšího prostředí tak, aby předešly hypotonické lyzi buňky (Kouwen a kol., 2009).

V této práci jsme se rozhodli experimentálně ověřit, zda je možné osmoprotektivní účinek PHA granulí rozšířit také na podmínky, při nichž jsou bakterie vystaveny náhlému hypotonickému šoku. Pro experimentální studii, která je v podobě publikace v časopise *New Biotechnology* prezentována v **publikaci Obruca a kol. 2019²**, jsme vybrali jak halofilní P3HB produkující kmen *Halomonas halophila*, tak také mezofilní bakteriální kmen *C. necator* H16. Důvodem pro zařazení halofilní kultury do naší studie byla skutečnost, že mnohé halofilní i extrémně halofilní bakterie a archea akumulují nemalé množství PHA, což opět podporuje hypotézu, že PHA granule neslouží pouze jako zásobní materiál, ale i jako osmoprotektant. Jak bylo popsáno výše, u bakteriálního kmene *C. necator* H16, který nepatří mezi halofilní mikroorganismy, je známo, že při hyperosmotickém šoku P3HB granule poskytují ochrannou funkci (Obruca a kol., 2017), a zároveň byl pozorován pozitivní vliv mírného osmotického tlaku (10 g/L NaCl) na biosyntézu P3HB (Obruca a kol., 2010). Jako referenční bakteriální kmen bez přítomnosti P3HB granulí byl opět využit mutantní kmen *C. necator* PHB⁻⁴ a taktéž *C. necator* H16 kultivovaný s nadbytkem dusíku, čímž byl obsah P3HB v buňkách minimalizován.

Nejprve jsme se zaměřili na viabilitu buněk vystavených hypertonickým podmínkám (200g/L NaCl) a následně výměně prostředí za deionizovanou vodu. Nejvyšší robustnost mikrobiálních buněk vůči takto intenzivnímu osmotickému namáhání jsme pozorovali u bakteriálního kmene *C. necator* H16 s nevyšším obsahem P3HB (74 % P3HB na suchou biomasu). Z výsledků je dále patrné, že i malý obsah P3HB v buňkách *C. necator* H16 (1,6 % PHB na suchou biomasu při kultivaci na komplexním médiu) pozitivně ovlivňuje schopnost bakteriální kultury udržet si při osmotickém namáhání integritu buněk. Rozpad buněk byl zřetelný mj. v úbytku celkového počtu naměřených stresovaných buněk oproti buněčným suspenzím, které nebyly vystaveny žádným osmotickým šokům. Naopak výrazná hypotonická lyze buněk i nejvyšší pokles buněčné viability byl pozorován u mikrobiální kultury neschopné syntézy a akumulace P3HB.

Pro bližší prozkoumání buněčné integrity jsme využili izotermální termogravimetrickou analýzu (iTGA), díky které jsme byli schopni monitorovat změny v množství intracelulární vody u jednotlivých vzorků bakteriálních kmenů. Metoda je založena na odlišení extracelulární a intracelulární vody ve vzorku prostřednictvím rozdílné rychlosti sušení. Zatímco v první fázi sušení je ze vzorku uvolňována téměř výhradně extracelulární voda, a to prakticky konstantní rychlostí, v druhé fázi sušení jsou buňky zbavovány intracelulární vody, přičemž rychlost jejího úbytku postupně klesá. Hranice mezi oběma fázemi, která se určuje jako průsečík závislosti rychlosti sušení v jednotlivých fázích, a která reprezentuje přibližný obsah intracelulární vody ve vzorku, je označována jako tzv. kritický obsah vody. Schéma metody je ilustrováno na obr. 3.

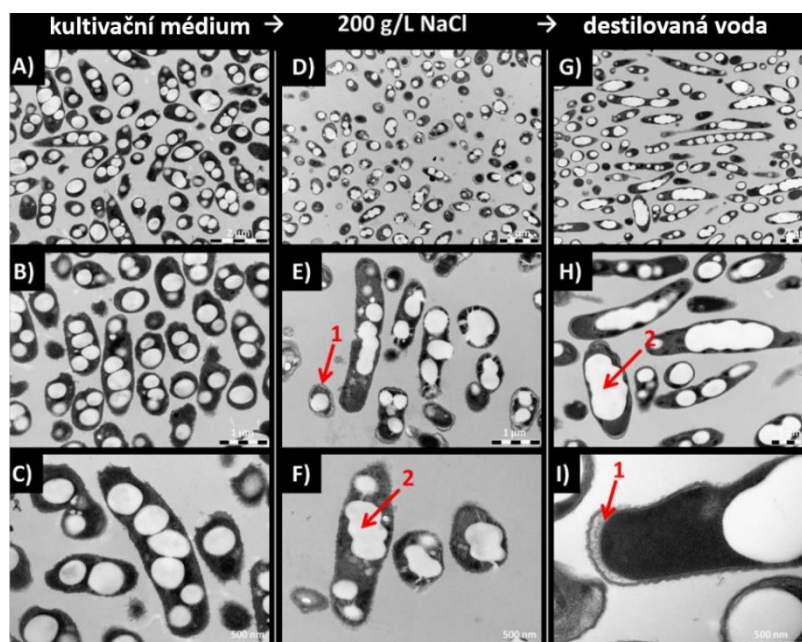
²SEDLACEK, P.; SLANINOVA, E.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; MAROVA, I.; KRZYZANEK, V.; OBRUCA, S. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology*, 2019, č. 49, s. 129-136. ISSN: 18764347



Obr. 3: Princip stanovení množství intracelulární vody pomocí izotermální termogravimetrie. **(nalevo)** Časová závislost zbytkové relativní hmotnosti vzorku při sušení při 70°C. **(napravo)** Termogram upravený do podoby závislosti rychlosti úbytku hmotnosti na zbytkové vodě ve vzorku. (I) První fáze sušení, kdy je uvolňována ze vzorku extracelulární voda. (II) Druhá fáze sušení, kdy buňky přicházejí o intracelulární vodu. Šipka označuje hranici mezi oběma fázemi, tzv. kritický obsah vody.

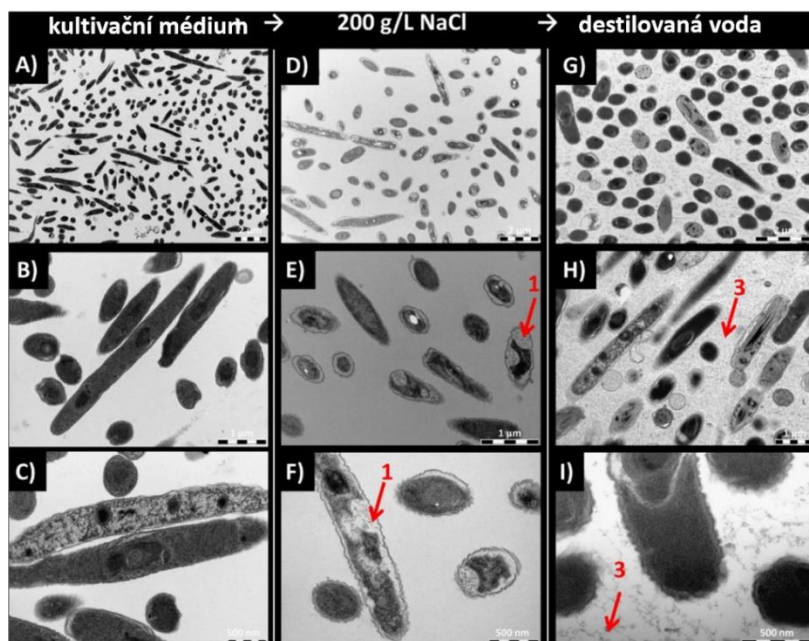
Tato metoda nám mimo jiné potvrdila, že buňky neakumulující P3HB (či akumulující P3HB jen v malé míře) obsahují skoro dvojnásobné množství intracelulární vody v cytoplazmě vztaheno na suchou hmotnost buněk. Při hyperosmotickém šoku vykazovaly vzorky pokles relativního množství intracelulární vody (známka osmotického vysoušení buněk). U všech vzorků bez ohledu na obsah P3HB byl u buněk vystavených hyperosmotickému a následně hypoosmotickému prostředí pozorován posun kritického bodu k vyšším hodnotám. Jinými slovy, buňky obsahovaly po fluktuaci osmotických prostředí více intracelulární vody nežli před expozici osmotickým stresům, což může být zapříčiněno strukturními změnami v cytoplazmatické membráně po již prodělaném hyperosmotickém šoku. Nicméně, v případě buněk s nízkým nebo žádným obsahem P3HB bylo po prodělaném hypoosmotickém šoku obtížné – případně zcela nemožné – určit kritický obsah vody. To naznačuje ztrátu integrity buněčné stěny a s tím spojené mazání rozdílů v rychlostech sušení intra- resp. extracelulární vody. Negativní dopady hypotonického šoku na bakteriální buňky s nízkým obsahem P3HB či bez přítomnosti intracelulárních P3HB granulí byly navíc závislé na intenzitě předešlého hypertonického stresu, kde bylo testováno hned několik koncentrací (50, 100 a 200 g/L NaCl).

Abychom si byli naprosto jistí, co se v průběhu osmotického namáhání s bakteriálními buňkami skutečně děje, doplnili jsme diskutovanou studii také o morfologickou analýzu buněk v jednotlivých stádiích jejich stresové expozice. Tato analýza, realizována prostřednictvím transmisní elektronové mikroskopie (TEM), potvrdila naše předešlé závěry vyvozené z výsledků dosažených průtokovou cytometrií a izotermální TGA. Přítomnost P3HB granulí má jednoznačně pozitivní vliv na zachování integrity buněk při osmotickém namáhání. Výrazné rozdíly byly pozorovány u kmene *C. necator* H16 s vysokým obsahem P3HB (viz obr. 4) a jeho mutantního kmene *C. necator* PHB⁻⁴ bez schopnosti akumulace P3HB (viz obr. 5).



Obr. 4: TEM snímky buněčných suspenzí *C. necator* H16 produkující P3HB, (A–C) po kultivaci v minerálním médiu, (D–F) po hyperosmotickém stresu (200 g/L NaCl), (G–I) po hypoosmotickém stresu, (1) mírná plazmolýza, (2) koalescence granulí.

Na TEM snímcích uvedených na obr. 4 d–f jsou vyobrazeny buňky *C. necator* H16 akumulující P3HB po hyperosmotickém šoku. U těchto buněk je pozorovatelná mírná plazmolýza a koagulace P3HB granulí, která je nejspíše zapříčiněna dehydratací v průběhu stresu a poškozením povrchové proteinové vrstvy, která agregaci granulí za fyziologických podmínek zabraňuje. Tento shluk granulí v jednu velkou granuli byl pozorován již dříve ve studii Obruča a kol. (2017). Zatímco v buňkách s vysokým obsahem P3HB se projevila symetrická plazmolýza, u buněk bez P3HB (viz obr. 5) se plazmolytická deformace buněk projevila několika způsoby. Nejčastější variantou plazmolytické deformace cytoplazmatické membrány u gram-negativních bakteriálních buněk je její odpojení od buněčné stěny a vnější membrány. V důsledku zmenšení intracelulárního objemu hypertonicky namáhaných buněk dochází k mechanické deformaci cytoplazmatické membrány, což vede k jejímu poškození a vzniku některých deformací jako jsou endo/exocytotické váčky či tvorba tubulárních nebo Scheieho struktur (blíže Koch, 1995). Pokud byly tímto způsobem buňky poškozeny při hypertonickém stresu, docházelo v případě buněk neobsahujících P3HB po následné expozici hypotonickému prostředí k masivní lyzi buněk a uvolnění cytoplazmy do extracelulárního prostředí. Oproti tomu, u buněk s vysokým obsahem P3HB byl negativní efekt komplexního osmotického namáhání minimální a buňky byly schopny uchovat svou integritu a celistvost.



Obr. 5: TEM snímky buněčných suspenzí *C. necator* PHB⁴ bez produkce P3HB, (A–C) po kultivaci v minerálním médiu, (D–F) po hyperosmotickém stresu (200 g/L NaCl), (G–I) po hypoosmotickém stresu (deionizovaná voda), (1) plazmolýza, (3) vylití cytoplazmatického obsahu.

Jak už bylo řečeno na začátku této podkapitoly, rozhodli jsme se prozkoumat vliv P3HB granulí také u halofilních kmenů, konkrétně u *Halomonas halophila*, které jsme kultivovali jak v minerálním (tato kultura obsahovala 82 hm.% PHB na suchou biomasu), tak v komplexním médiu (4 hm.% PHB na suchou biomasu). Hlavní motivací pro zařazení halofilní bakterie bylo eliminovat vliv hypertonického namáhání buněk a posoudit ochranný vliv P3HB granulí pouze z pohledu hypotonického stresu. I v případě halofilního bakteriálního kmene byl potvrzen pozitivní vliv P3HB granulí na buňky vystavené hypotonickému šoku (deionizovaná voda) přímo po kultivaci v minerálním médiu obsahující vysokou koncentraci soli (66 g/L). Naměřená viabilita buněk prokázala stejný protektivní účinek P3HB granulí jako u mezofilního kmene *C. necator* H16, i když metoda ke stanovení viability buněk (průtoková cytometrie) zde musela být nahrazena počítáním kolonií na miskách, jelikož vysoký obsah soli v referenčním vzorku vedl ke zhášení fluorescence viabilitní sondy.

Výstupy z iTGA a TEM potvrdily závažné poškození integrity buněk *H. halophila* kultivované v komplexním médiu oproti halofilním buňkám s vysokým obsahem P3HB. Vzhledem k halofilnímu charakteru *H. halophila* se dá předpokládat odlišný ochranný mechanismus P3HB granulí než u bakteriálního kmene *C. necator* H16. *H. halophila* patří mezi mírné halofily schopné akumulace značného množství osmolytů, které využívají k vyrovnávání osmotického gradientu. Vyskytnou-li se tyto halofilní buňky v hypotonickém prostředí, stanou se však nashromážděné osmolyty spíše nevýhodou. P3HB granule zaujímají významnou část intracelulárního prostoru buněk, což snižuje množství osmolytů nezbytné pro kompenzaci osmotického tlaku. A právě přítomnost P3HB granulí může být významným faktorem navyšujícím robustnost PHA akumulujících buněk vůči hypotonickému šoku.

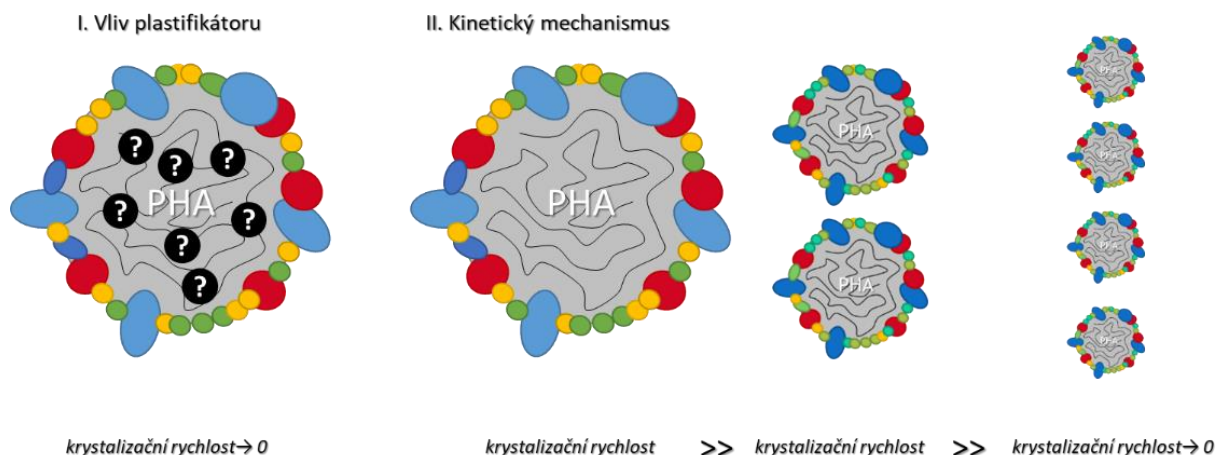
Prokázaný protektivní vliv PHB granulí v bakteriálních buňkách vůči osmotickým změnám představuje významný poznatek také v kontextu potenciálního využití v biotechnologickém průmyslu. A to jak při bioremediačních procesech (Obruca a kol., 2018), kde jsou využity i další protektivní účinky PHB granulí (odolnost vůči výkyvům pH, těžkým kovům, organickým látkám aj.), tak i v rámci průmyslové produkce PHA. V této oblasti by halofilní kmeny mohly najít široké uplatnění, jelikož kultivační podmínky by snižovaly jak pravděpodobnost kontaminace (Koller, 2015), tak i náklady na proces samotný za předpokladu využití levné mořské vody pro přípravu kultivačního média (Takahashi a kol., 2017).

3.2 Amorfnní charakter PHA granulí *in vivo*

Jak již bylo prokázáno, PHA granule nejsou pouze zdrojem uhlíku a energie, ale disponují celou řadou biologických a biofyzikálních specifíků, díky kterým zvyšují robustnost a rezistenci buněk vůči působení různých stresů (UV záření, osmotický stres, nízká teplota a jiné, viz kapitola 2.3.4). Na rozdíl od izolovaného P3HB, který je charakteristický svou vysokou krystalinitou, intracelulární neboli nativní granule P3HB se vyskytují v buňkách v amorfnní formě (Jendrossek, 2007 a další viz kapitola 2.3.3). Tento termodynamicky nevýhodný stav nativních granulí má však své opodstatnění nejen z hlediska jejich protektivního účinku, ale i z hlediska metabolismu. Udržování narůstajícího řetězce polymeru v amorfnní podobě je pravděpodobně nezbytně nutné již v okamžiku jeho syntézy, kdy je řetězec spolu s připojovaným monomerm (ve formě 3-hydroxyacyl-CoA) vázán v aktivním místě PHA syntázy PhaC. Jakmile amorfnní polymer dosáhne dostatečné délky, naváže se na N-konec PhaC, a tím urychlí polymerizační proces, jelikož se stále nachází v blízkosti aktivního místa a je tak dostupnější pro reakci (Kim a kol., 2017). Rovněž aktivita P3HB intracelulárních depolymeráz je přímo podmíněna amorfnním stavem polymeru v nativních granulích, jelikož vlivem svojí struktury a substrátové specifity nejsou schopné hydrolyzovat krystalické (tzv. „denaturované“) P3HB granule (Uchino a kol., 2008). Krystalizace intracelulárních granulí tak znemožňuje využití PHA jako zdroje uhlíku a energie v době hladovění a snižuje efektivitu protektivních mechanismů vůči stresovým podmínkám vázaných na plastickou povahu amorfnního polymeru. V neposlední řadě je krystalizací P3HB blokováno také jeho zapojení do PHA cyklu, a tudíž i produkce monomerních jednotek 3HB jako tzv. potenciálních chemických chaperonů, které chrání enzymy a další biomolekuly před vysokou teplotou a oxidativním stresem (Obruca a kol., 2016a).

Ačkoli amorfnní stav P3HB granulí a jeho vliv na buňky během stresových podmínek je v současnosti široce diskutovaným tématem, doposud nebyl jednoznačně objasněn mechanismus stabilizace P3HB v amorfnní podobě *in vivo*. Jak bylo uvedeno v teoretické části této práce, je známo několik teorií, které se snaží vysvětlit podstatu plastifikace P3HB v nativních intracelulárních granulích. První teorie se zakládá na přítomnosti specifických plastifikátorů v prostředí nativní granulí. Tyto plastifikační účinky byly přisuzovány například molekulám vody či některým nízkomolekulárním látkám (Ceccorulli a kol., 1992; Choi a Park, 2004). Alternativní teorie vychází čistě z chemicko-kinetického mechanismu, který vysvětluje extrémně nízkou rychlost krystalizace *in vivo* pouze na základě malého objemu P3HB granulí (Bonthrone a kol., 1992; de Koning a Lemstra, 1992), přičemž důležitá role při zamezení

agregace granulí a s tím spojeným nárůstem jejich objemu se přisuzuje proteinové povrchové vrstvě granulí (Bresan a kol., 2016) (více v podkapitole 2.3.1). Nicméně ani jedna z těchto teorií (viz obr. 6) není považována za definitivní a uspokojivě vysvětlující všechna dosud popsaná experimentální pozorování.



Obr. 6: Stabilizační hypotézy amorficity PHB granulí. **(I.)** Hypotéza založená na přítomnosti plastifikátoru v PHA granulích. **(II.)** Stabilizace PHA granule na základě malého objemu PHA granule s nízkou krystalizační rychlostí.

Další experimentální studie realizovaná v rámci předložené disertační práce byla proto navržena s cílem posoudit stabilizační mechanismy udržující intracelulární P3HB v amorfní formě, a to s ohledem na tematické zaměření práce opět v kontextu expozice buněk různým stresovým faktorům. Metodologicky studie vycházela z publikovaných prací týmu Portera a Yu (2011a), kteří úspěšně otestovali techniku infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) za účelem rozlišení krystalické a amorfí formy P3HB ve vzorcích celých buněk a korelovali kvantitativní výstupy této techniky s výsledky ze standardně využívané DSC metody. Stejní autoři následně využili tuto spektroskopickou techniku při pozorování kinetiky krystalizace P3HB v buňkách *C. necator* H16, které nejdříve ošetřili velmi nízkým pH (0,2 M kyselina sírová), aby zastavili případnou biologickou aktivitu. V průběhu měření vzorků byla zaznamenávána spektra dokládající různou míru krystalizace P3HB v čase v průběhu volného vysoušení vzorku (Porter a Yu, 2011b). V rámci experimentů byla také zpozorována jistá souvislost mezi rychlostí krystalizace P3HB granulí v buňkách a dalším ošetřením buněk (vysoká teplota, úprava pH). Jelikož pozorování rychlosti krystalizace nativních P3HB granulí pomocí FTIR bylo realizováno u buněk, které byly nejprve vystaveny nízkému pH, zůstávalo otázkou, zdali průběh krystalizace nebyl pouhým důsledkem fyziologických a morfologických změn buněk právě v důsledku jejich reakce na tento stres. Autory studie také nebyl navržen žádný konkrétní destabilizační mechanismus, kterým by vysvětlovali přechod amorfních granulí do krystalického stavu v průběhu prezentovaných experimentů. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli systematicky prozkoumat tuto problematiku se zvláštní pozorností věnovanou vlivu stresové expozice na míru a rychlost následné krystalizace P3HB *in vivo*. Výsledky této studie

byly publikovány v časopise *Applied Microbiology and Biotechnology*, přičemž příslušná publikace je přiložena k této disertační práci v podobě **publikace Sedlacek a kol 2019³**.

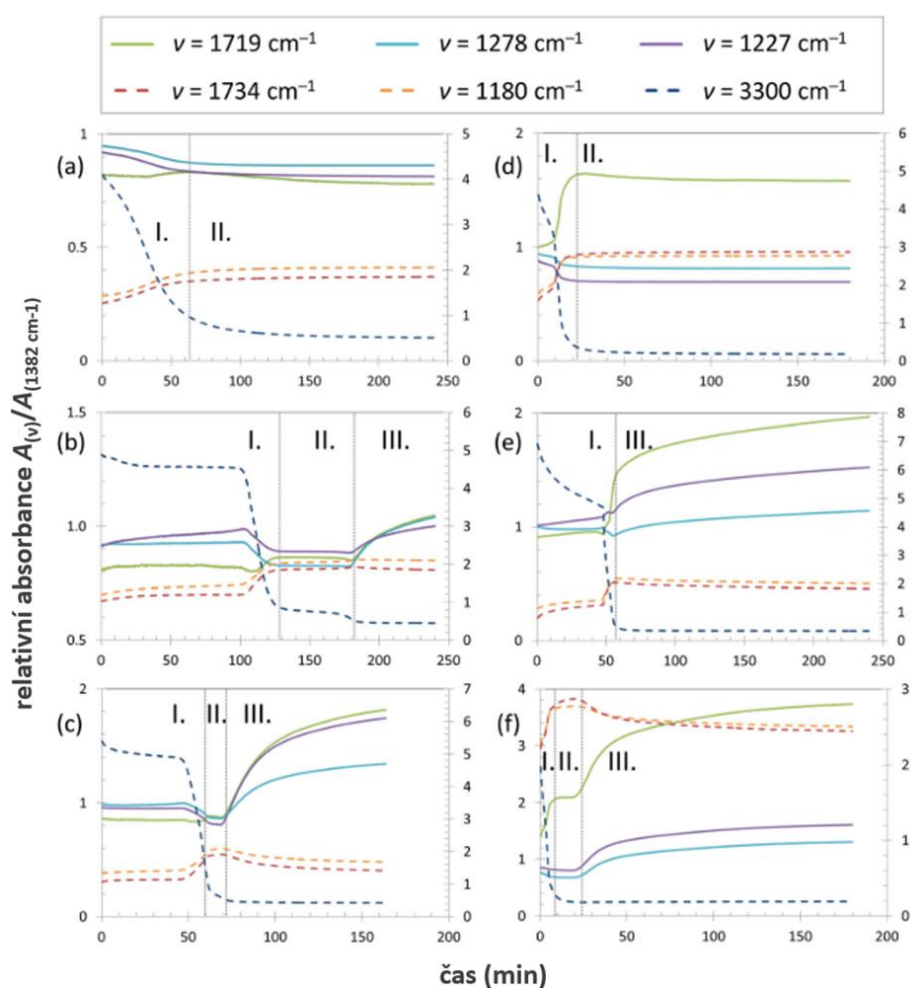
V rámci této studie bylo experimentálně prokázáno, že u bakteriálních buněk *C. necator* H16 nenastala v průběhu sušení ani po něm krystalizace P3HB granulí, pokud buňky nebyly nejprve vystaveny stresovým podmínkám. Bylo také dokázáno, že ne všechny testované stresy (vysoká teplota, osmotický tlak, rozmrazovací a zmrazovací cykly a nízké pH) musí nutně vést k iniciaci krystalizace amorfních granulí (viz obr 7). Krystalizaci iniciovala expozice buněk vysoké teplotě (50, 80°C), nízkému pH (pH = 1 nebo 2) a hyperosmotickému prostředí (200 g/L NaCl). Oproti tomu cyklické mražení a rozmrazování buněk, stejně jako expozice mírně kyselému prostředí (pH = 3 a 4) nevedly k pozorovatelné krystalizaci P3HB granulí *in vivo*. Abychom více porozuměli tomu, zda a jak spolu souvisí morfologické změny buněk způsobené jednotlivými testovanými stresy a míra krystalizace granulí P3HB daným stresem iniciovaná, vzorky buněk exponovaných jednotlivým stresům byly opět zobrazeny technikou TEM (viz obr. 8). Kombinací morfologické mikroskopické analýzy s FTIR analýzou krystalizace P3HB bylo zjištěno, že krystalizace nastává pouze u buněk, u kterých došlo v důsledku aplikace stresových podmínek ke koagulaci P3HB granulí. Míra obou projevů (koagulace granulí a krystalizace polymeru) je přitom závislá na intenzitě aplikovaného stresu (např. konkrétní teplota, hodnota pH).

Uvedená zjištění podporují argumentaci chemicko-kinetického modelu krystalizace, který je založen na nízké pravděpodobnosti spontánní nukleace a z toho plynoucí extrémně malé rychlosti krystalizace polymeru v submikronovém objemu granule (Bonthrone a kol., 1992). Jak už bylo zmíněno výše, koagulace P3HB granulí je nejspíše způsobena denaturací proteinů povrchové vrstvy P3HB granulí, která byla také zřetelně pozorovatelná ve FTIR spektrech vzorků, které vykazovaly jak koagulaci granulí, tak rovněž krystalizaci P3HB. Ačkoliv tato spektra pochopitelně nezaznamenávají denaturaci pouze proteinů navázaných na P3HB granule, ale všech proteinů vyskytujících se v buňkách, dá se přesto předpokládat, že denaturace proteinů a koagulace nativních P3HB granulí spolu úzce souvisí. Povrch P3HB granulí *C. necator* H16 pokrývá z 27–54 % phasin P1 (24 kDa), který svojí četností dosahuje až 5 % celkové proteinové složky v buňce (Wieczorek a kol., 1995). Proto by i částečná denaturace povrchových proteinů znamenala ztrátu jejich schopnosti plnit úlohu surfaktantů oddělujících od sebe hydrofobní jádra P3HB granulí a hydrofilní prostředí buněčné cytoplazmy. Tato domněnka byla rovněž experimentálně podložena, kdy jsme vycházeli ze zmrazovacích rozmrazovacích cyklů, při kterých se pomocí FTIR (prostřednictvím dekonvoluce amidového pásu) denaturace buněčných proteinů neprokázala a zároveň nebyla pomocí TEM pozorována koagulace P3HB granulí.

Další důležitý poznatek získaný pomocí FTIR spočíval ve zjištění, že krystalizace P3HB granulí nastává vždy až následně po dehydrataci vzorku. Na obrázku 7 si navíc lze povšimnout, že s

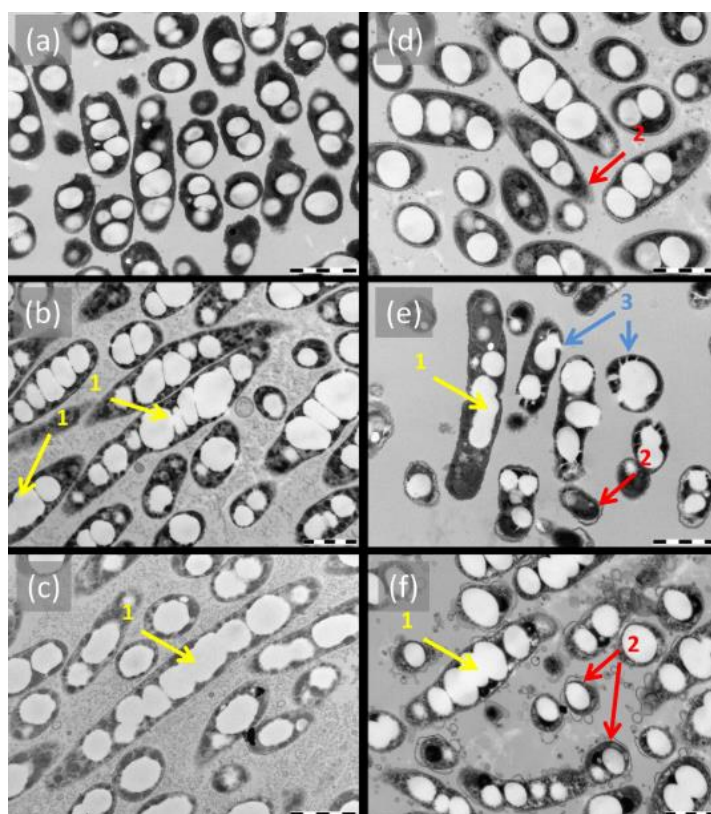
³ SEDLACEK, P.; SLANINOVA, E.; ENEV, V.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; MAROVA, I.; HRUBANOVA, K.; KRZYZANEK, V.; SAMEK, O.; OBRUCA S. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, r.4, č.103, s. 1905-1917. ISSN: 14320614

výjimkou osmotického stres (obr. 8e) se všude vyskytuje časová prodleva mezi dehydratací a počátkem krystalizace. Tento jev poukazuje na fakt, že koagulace nativních P3HB granulí jako taková nestačí k iniciaci krystalizace (morfologické TEM analýze byly podrobeny plně hydratované vzorky), ale musí být vždy spojena s dehydratací buněk. Toto zjištění naopak podporuje hypotézu plastifikačního účinku intragranulární vody (Lauzier a kol., 1992a,b). Výskyt vody v PHA granulích byl již dříve experimentálně ověřen, přičemž bylo zjištěno, že nativní PHA granule obsahují až 10 hm. % vody (Mas a kol., 1985). Jak už bylo nastíněno v teoretické části práce (podkapitola 2.3.3), voda hypoteticky stabilizuje β -konformaci syntetizovaných řetězců PHA uvnitř granulí prostřednictvím vodíkových vazeb, a tudíž znemožní jejich krystalizaci. Tato teorie však nebyla prozatím experimentálně dokázána, jelikož se ještě nepodařilo vytvořit uměle vytvořenou amorfni P3HB granuli stabilizovanou pouze pomocí vody. Výsledky naší experimentální studie ovšem naznačují, že právě voda doplňuje svými plastifikačními účinky kinetické efekty malého objemu nativních granulí, a přispívá tak ke stabilizaci amorfni stavu intracelulárního P3HB.



Obr. 7: Časový vývoj absorbancí při frekvencích souvisejících s dehydratací vzorku (3300 cm^{-1}) a krystalizací P3HB (1734 cm^{-1} , 1719 cm^{-1} , 1278 cm^{-1} , 1227 cm^{-1} , respektive 1180 cm^{-1}). Všechny sledované absorbance byly škálovány pomocí absorbance retenčního píku při 1382 cm^{-1} . Srovnání výsledků kultury *C. necator* H16: (a) kontrola, (b) při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, (c) $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, (d) $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, (e) 200 g/L NaCl a hodnota $\text{pH}=1$ (f). (I.) dehydratační fáze vzorku, (II.) dehydratované buňky s amorfni P3HB, (III.) krystalizační fáze. Přerušované křivky přísluší vedlejší ose podřadnic.

Jak lze vidět na obr. 7, časová prodleva (II.) mezi dehydratací a krystalizací amorfních P3HB granulí odpovídá s největší pravděpodobností době, která je nutná k dehydrataci intracelulární vody z nativních P3HB granulí. Mohlo by se zdát, že tato prodleva nutná k dehydrataci nativních granulí by měla být patrná u všech stresem indukovaných krystalizací. U vzorku exponovaného hypertonickému prostředí však tato časová prodleva chybí (viz obr. 7e). Tato odlišnost je důsledkem velmi rychlé ztráty intracelulární vody, kterou můžeme pozorovat jak na prudce klesající absorpenci při frekvenci související s dehydratací vzorku, tak také na pořízených TEM snímcích, kde je možné pozorovat poškození integrity nativních P3HB granulí, následkem čehož se obsah granule rozlévá do cytoplazmy. Takto poškozené amorfní granule P3HB tak významně urychlují samotnou dehydrataci granulí (viz obr. 8e).

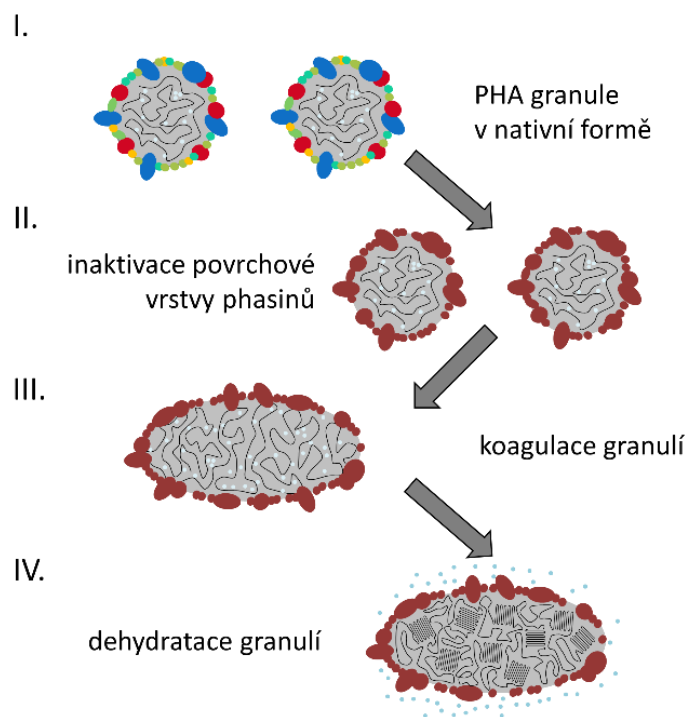


Obr. 8: TEM snímky *C. necator* H16: (a) kontrola, (b) při 50 °C, (c) 80 °C, (d) -30 °C, (e) 200 g/L NaCl a hodnota pH=1 (f). (1.) koagulace P3HB granulí, (2.) plazmolýza, (3.) zhroucení integrity granulí. Měřítka = 1 μ m.

Mezi další zajímavé výsledky zajisté patří i umístění agregovaných P3HB granulí, a to především v centrálních částech buněk, kde se obvykle iniciuje a probíhá buněčné dělení (Dvorak a kol., 2015). Je pravděpodobné, že agregace P3HB granulí má neblahý vliv na reprodukci bakteriálních buněk. Tento předpoklad byl v rámci prezentované studie experimentálně potvrzen provedením kultivačních viabilitních experimentů, které prokázaly, že schopnost reprodukce byla nejvíce ovlivněna právě u těch vzorků, které byly vystaveny stresům vyvolávajícím agregaci P3HB granulí (tj. vysoká teplota, nízké pH).

Na základě našich experimentů je tedy možné konstatovat, že obě původní hypotézy ve skutečnosti vysvětlují pouze část skutečného mechanismu plastifikace. Představa o tomto

mechanismu, aktualizovaná na základě prezentované experimentální studie, uvažuje amorfní stav P3HB granulí v buňkách stabilizovaný jak kineticky v důsledku malé velikosti P3HB granulí, tak i prostřednictvím plastifikátoru, kde tuto roli s největší pravděpodobností plní intracelulární voda. Náš revidovaný mechanismus stabilizace P3HB granulí je obsahem obrázku 9.



Obr. 9: Destabilizace přirozeného plastifikačního mechanismu a krystalizace P3HB granulí in vivo. (Obruca a kol., 2020)

3.3 Objasnění protektivních vlastností monomerní jednotky PHB

Významná role monomerních jednotek 3HB v mikrobiálních buňkách byla předmětem již několika studií, v nichž byly prokázány jejich překvapivé protektivní vlastnosti. Přítomnost monomerů v buňkách je zajištěn vlivem P3HB cyklu, kdy jsou granule P3HB současně syntetizovány a degradovány (Kadouri a kol., 2005). V posledním desetiletí bylo zjištěno, že monomery 3HB vykazují vlastnosti jak kompatibilních látek chránících bakterie před vysokým osmotickým tlakem prostředí (Soto a kol., 2012), tak chemických chaperonů chránících enzymy (lysozym, lipáza) před vysokou teplotou a oxidačním stresem (Obruca a kol., 2016b). Rovněž bylo potvrzeno, že 3HB slouží i jako potenciální kryoprotektant pro enzymy (lipáza), kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) a bakteriální buňky (*Cupriavidus necator* H16) (Obruca, a kol., 2016a). Nepřímým důkazem významu metabolismu P3HB pro adaptaci prokaryot vůči chladu a mrazení je také skutečnost, že mnoho producentů P3HB bylo identifikováno ve vzorcích exponovaných velmi nízkým teplotám jako je například arktická voda nebo permafrost (Ciesielski a kol., 2012; Goh a Tan, 2012).

Jak už bylo zmíněno výše, stabilizační efekt 3HB v P3HB akumulujících bakteriálních buňkách se uplatňuje při různých stresových podmínkách. Je tedy zřejmé, že protektivní mechanismus

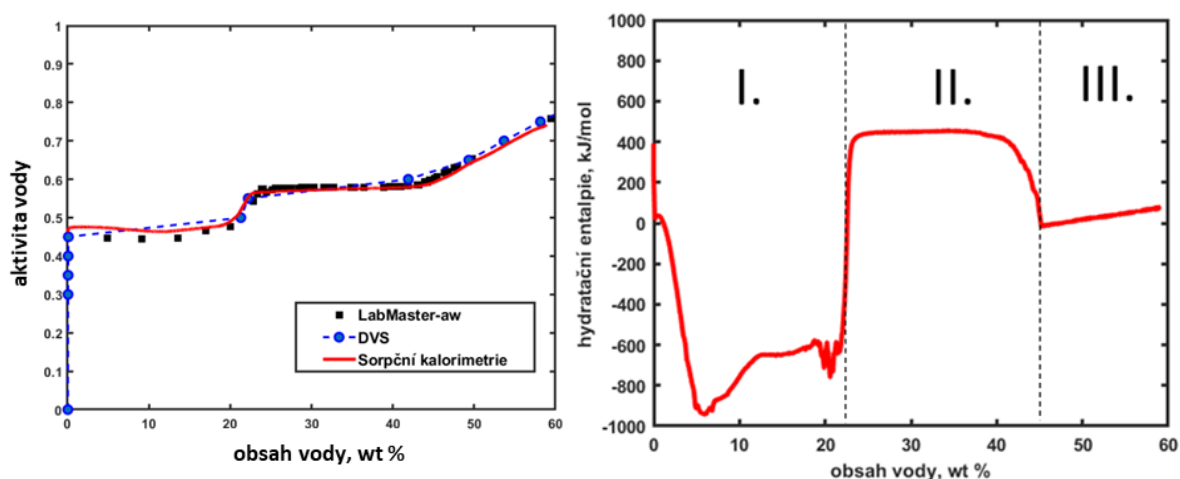
3HB a P3HB je velice komplexní a zahrnuje řadu mechanismů a zároveň je třeba mít na mysli, že protektivní funkci plní v buňkách celá řada dalších metabolitů a molekul. Pro lepší pochopení protektivního účinku 3HB jsme se zaměřili na interakce této molekuly s vodou. Pochopení tohoto fundamentálního vztahu nám může pomoci objasnit vliv 3HB na vlastnosti a chování intracelulární vody. V bakteriálních buňkách jsou proteiny a další buněčné komponenty stabilizovány a chráněny prostřednictvím tzv. kompatibilních látek, které ovlivňují hydrataci jednotlivých buněčných komponent (da Costa a kol., 1998; Jain a Roy, 2009). Zmíněná stabilizace je rovněž známá pod názvem preferenční stabilizační efekt, který je založen na poklesu aktivity vody v roztoku v důsledku preferenčního navázání právě ke kompatibilním látkám či na povrch proteinu, čímž dochází k exkluzi molekul kompatibilních látek z hydratační vrstvy proteinů (da Costa a kol., 1998). Na základě preferencí vody se tak často setkáváme v buňkách s rozlišením na „nizkohustotní“ a „vysokohustotní“ (Wiggins, 1990). A právě hodnota aktivity vody nám udává, v jaké formě se voda v daném systému nachází. Mohlo by se zdát, že termodynamický stav vody v buňce je stěžejní u dehydratace buněk především v kontextu s osmotickým stresem, avšak dehydratace buňky často nastává i v průběhu pomalého zmrazování, kdy v extracelulárním prostředí vznikají krystalky ledu a odstraňováním kapalné vody tak dochází ke zvyšování koncentrace rozpuštěných látek, což vede ke zvýšení gradientu chemických potenciálů vody v intracelulárním a extracelulárním prostředí. U vyšších rychlostí zamrazování se v závislosti na aktivitě vody v buňce tvoří krystalky ledu přímo v intracelulárním prostředí, kde poté fatálně ovlivňují fyziologický stav buňky. Je tedy zřejmé, že dostatečné množství intracelulární vody je stěžejní pro děje zajišťující viabilitu buňky (elektronový transfer systémů, metabolická aktivita enzymů aj.) (Mittler, 2002).

Abychom porozuměli tak komplexní problematice, jakou je stabilizační efekt monomerních jednotek 3HB, rozhodli jsme se v této práci podrobně prozkoumat termodynamiku a fázové chování binárního systému 3-hydroxybutyrátu sodného (Na3HB) s vodou. Jinými slovy jsme se zaměřili na podstatu interakcí monomerních jednotek 3HB a vody a určení hydratační a kryoprotektivní účinnosti 3HB. Kromě vysvětlení přirozených stabilizačních efektů monomerní jednotky v P3HB produkujících buňkách tato studie cílí navíc také na posouzení potenciálu využití 3HB jako alternativního (kryo)protektantu v různých aplikacích. Manuskript článku (v současnosti podléhá recenznímu řízení v časopise *Biomolecules*), který shrnuje tuto experimentální práci je uveden v **naší práci Slaninova a kol. 2021⁴** Uvedené výsledky byly získány v rámci pětiměsíční zahraniční stáže pod vedením pana prof. Kocherbitova na univerzitě v Malmö ve Švédsku.

Nejprve jsme se v rámci experimentů zaměřili na posouzení hygroskopičnosti systémů 3HB/voda stanovením sorpční izotermie pro sorpci vodních par na 3HB. Pro tento účel jsme využili hned několik metod, dynamickou sorpční analýzu par (DVS), hygrometr LabMaster-aw (Novasina) a sorpční kalorimetrii. Všechny tyto tři metody jsou založeny na odlišném principu, kdy DVS patří ke gravimetrické metodě měřící rovnovážnou hmotnost vzorku při kontrolované relativní vlhkosti, zatímco vlhkoměr LabMaster-aw, často využívaný v potravinářských

⁴ SLANINOVA, E.; OBRUCA, S.; KOCHERBITOV, V.; SEDLACEK, P. On the bioprotective effects of sodium 3-hydroxybutyrate: thermodynamic study of binary Na3HB-water systems. V recenzním řízení v časopise *Biomolecules*, 2021

oborech, měří aktivitu vody u vzorků s konkrétním množstvím vody. Poslední zvolená technika, sorpční kalorimetrie, je kombinací předchozích dvou metod (měří aktivitu vodních par i její množství nasorbované vzorkem), a navíc nám udává při měření diferenciální adsorpční entalpii. Na základě experimentů při teplotě 25 °C jsme získali sorpční izotermy pro vodní páru, a právě tvar izoterem nám odhalil jednak sorpční afinitu vody na 3HB, jednak přítomnost několika fázových přechodů (viz obr. 10).

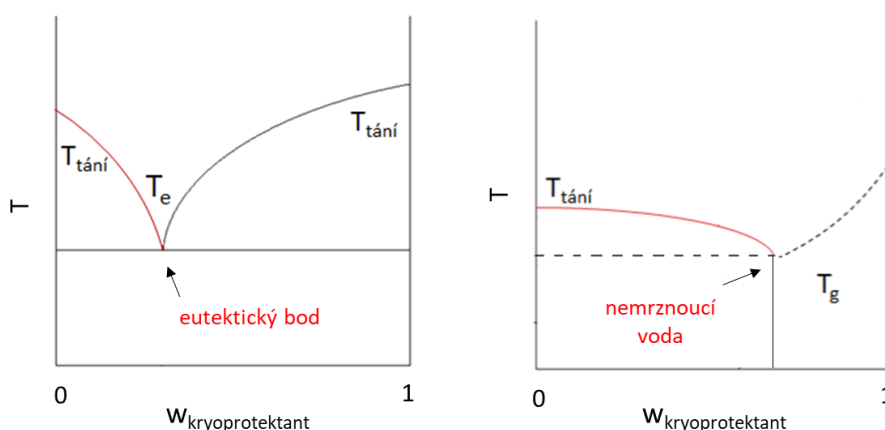


Obr. 10: (nalevo) Sorpční izotermy vodní páry u Na₃HB při 25 °C získané pomocí DVS, LabMaster-aw Novasina, a sorpční kalorimetrií. (napravo) Entalpie hydratace Na₃HB naměřená sorpčním kalorimetrem při 25 °C.

Ze sorpční izotermy uvedené na obr. 26 je patrné, že krystalický bezvodý Na₃HB neabsorbuje žádnou vodu, dokud relativní vlhkost (RH) nepřekročí kritickou hodnotu cca 48,55 hm. %. Toto chování je typické pro krystalické látky a liší se od chování amorfních kryoprotektantů. Takto např. u amorfni trehalózy (běžně využívaná kryoprotektivní látka) nasorbované množství vody roste prakticky lineárně se zvyšující se RH (Roe a Labuza, 2005), zatímco u krystalické α,α -trehalózy (protihrudkující aditivum) činí hodnota kritické RH hranice skoro dvojnásobek oproti 3HB (95 % RH) (Lammert a kol., 1998). Další změna tvaru sorpční izotermy nastává, jakmile je Na₃HB z 22,5 hm. % hydratován. To odpovídá přechodu 3HB z bezvodé krystalické formy do formy krystalického dihydrátu. Konkrétní stechiometrie hydrátu (dvě molekuly vody na jednu molekulu Na₃HB) byla určena právě z hraniční hmotnostní koncentrace v sorpční izotermě. Další fázová změna nastává při 45,2 hm. % vody ve směsi s Na₃HB, kdy je již veškerý krystalický dihydrát rozpuštěn do podoby nasyceného vodného roztoku. Pro vyšší RH je již 3HB pouze ve formě vodného roztoku. Z poměru rovnovážné aktivity a molárního zlomku vody v roztoku je možné pro touto oblast určit aktivitní koeficient vody, resp. jeho závislost na složení roztoku. Hodnota aktivitního koeficientu je v celém rozsahu koncentrací výrazně menší než 1 (v rozsahu od 0,7 do 0,9), což potvrzuje, že Na₃HB se ve vodném roztoku chová jako silně hydrofilní látka.

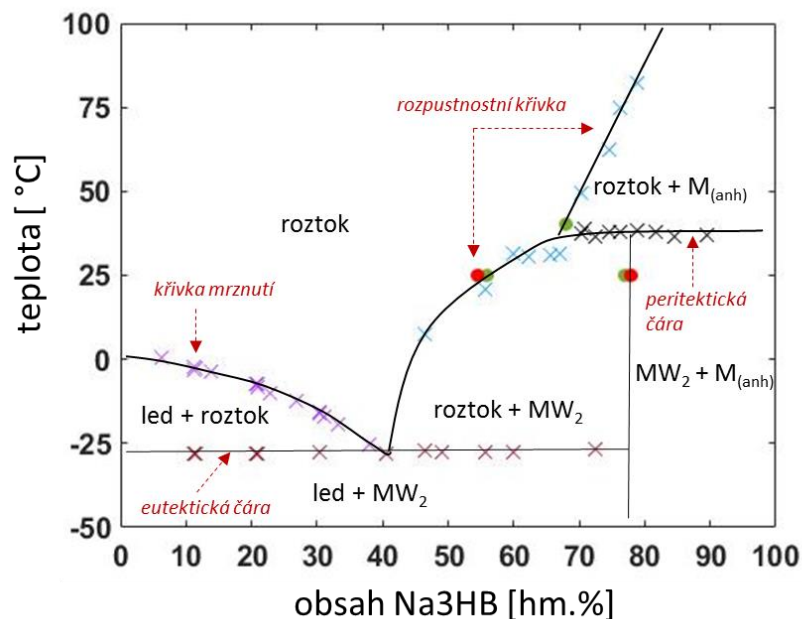
Kromě studia systému Na₃HB-voda při laboratorní teplotě jsme se dále zaměřili na kryoprotektivní efekt Na₃HB. V tomto případě jsme využili kalorimetrickou analýzu binárních směsí Na₃HB/voda o různém složení, která nám umožnila konstruovat binární rovnovážný a nerovnovážný fázový diagram systému a porozumět tak chování různě hydratovaného Na₃HB

v širokém rozpětí teplot. Při diskusi kryoprotektivních vlastností 3HB je u rovnovážného fázového diagramu pro nás nejvíce podstatná teplota, při které dochází k tání ledu, jinými slovy, jaký efekt má Na3HB na snížení rovnovážné teploty mrznutí vody. Kryoprotektivní účinky za rovnovážných podmínek se projevují snížením teploty tuhnutí vody, které lze vyčíst z křivky tání ledu, kdy strmost křivky (pokles teplot tání ledu) nám udává kryoprotektivní efektivitu dané látky (viz obr. 11 nalevo). Také pozice eutektického bodu, který odpovídá nejnižší teplotě, při které voda ve dvousložkovém systému mrzne, nám vypovídá o účinnosti kryoprotektantu z hlediska nejnižší možné koncentrace, která s klesajícím zastoupením kryoprotektantu v systému roste. Zato kryoprotektivní účinky za nerovnovážných podmínek se projevují jak množstvím nemrznoucí vody v systému, tak mírou amorfní fáze. Kryoprotektivní účinek látky je opět silnější, pokud zlom, kde již nedochází k tuhnutí vody, se nachází v co nejnižší koncentraci daného kryoprotektantu (viz obr. 11 napravo).



Obr. 11: Schematické fázové diagramy zobrazující kryoprotektivní účinky, **(nalevo)** rovnovážný fázový diagram kompatibilních látek s kryoprotektivním efektem vyjádřeným posunem bodu mrznutí vody a pozicí eutektického bodu (červená křivka), **(napravo)** zjednodušený nerovnovážný fázový diagram kryoprotektivní látky, kryoprotektivní účinky jsou reprezentovány posunem bodu mrznutí vody a množstvím nemrznoucí vody. T_e = eutektický bod, T_g = teplota skelného přechodu.

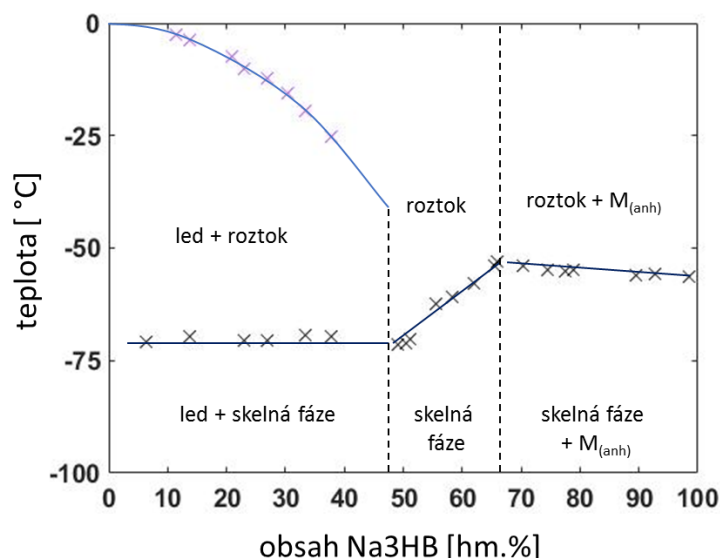
Z naměřených výsledků je patrné, že právě křivka diagramu oddělující pevnou fázi a kapalnou fázi vody má strmě klesající trend oproti známým kryoprotektantům a eutektický bod se nachází při 40,5 % Na3HB a $-28,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (viz obr. 12).



Obr. 12: Rovnovážný fázový diagram systému Na₃HB-voda, DSC (×); sorpční kalorimetrie (●), DVS (●).

To také znamená, že u vyšších koncentrací Na₃HB už v uvedeném dvojsložkovém systému nedochází k tvorbě ledu. Zároveň tento bod představuje maximální posun teploty mrznutí vody způsobený přítomností Na₃HB. Při porovnání s fázovými diagramy běžně využívaných kryoprotektantů, jakým je například trehalóza (Chen a kol., 2000), sacharóza (Mathlouthi a Reiser, 1995) či glycerol (Nakagawa a Oyama, 2019) je posun bodu mrznutí vody u systému Na₃HB-voda minimálně porovnatelný či ve většině případů dokonce větší, což je možné považovat za jednu z příčin popsané vysoké kryoprotektivní účinnosti Na₃HB. Pro lepší představu, konkrétní hodnoty eutektického bodu u trehalózy jsou v rozsahu od 2,5 do 18,8 °C (Miller a kol., 1997) a sacharózy –8,5 až 13,95 °C (Young a Jones, 1949). I když je bod tuhnutí vody v přítomnosti glycerolu snížen až na –45 °C, tak koncentrace glycerolu nutná k tomuto snížení činí 65 %. Použijeme-li stejné množství glycerolu jako u eutektického bodu Na₃HB, tzn. okolo 40%, teplota bodu tuhnutí vody se zvýší až na –15,4 °C (Lane, 1925). Z tohoto porovnání vyplývá, že Na₃HB ovlivňuje aktivitu vody přinejmenším stejně efektivně jako známé kompatibilní látky s kryoprotektivním účinkem. Další závěr, který byl potvrzen jak v sorpční analýze, tak na základě skenovací kalorimetrie, je tvorba dihydrátů Na₃HB.

Jak už bylo zmíněno výše, nejen množství, ale i termodynamický stav intracelulární vody je stěžejní pro zachování funkcí buňky při jejím ochlazení pod bod mrazu. Mobilita intracelulární vody je přímo závislá na jejím stavu, při prudkém podchlazení se mobilita molekul vody rapidně sníží, a proto je buňka méně náchylná k dehydrataci mrazem. Snížená mobilita molekul při prudkém ochlazení také znemožňuje systému zaujmout svoji termodynamicky nejvýhodnější podobu, a systém tak setrvává v kineticky stabilizovaném nerovnovážném stavu. Typickým případem takového stavu je stav skelný. Z toho důvodu jsme svoji pozornost upřeli také na skelné přechody dvousložkového systému Na₃HB-voda, jejichž kalorimetrická analýza nám umožnila zkonstruovat fázový diagram systému v nerovnovážném stavu (viz. obr.13).



Obr. 13: Nerovnovážný fázový diagram systému Na3HB-voda stanovený technikou DSC.

Z naměřených výsledků je zřejmé, že skelné přechody v celém rozsahu koncentrací Na3HB lze rozdělit do tří oblastí v závislosti na tepelných kapacitách vzorků, které se zvyšují s obsahem amorfni fáze. Je zajímavé, že dvě oblasti, v nichž se nachází vždy dvě fáze, konkrétně amorfni stav společně s ledem a amorfni stav s krystalickým Na3HB (tudiž na opačných stranách fázového diagramu), se liší ve stechiometrickém poměru vody a Na3HB. Při nižší koncentraci Na3HB (hraniční koncentrace 50 hm. %) připadá 7 molekul vody na jednu molekulu Na3HB, zatímco u vyšší (> 68 hm. %) se počet molekul vody sníží na 3, což opětovně dokazuje vysokou míru hydrofility Na3HB v porovnání například s amorfni trehalózou, která je schopna pojmout 2 molekuly vody na jednu molekulu (Green a Angell, 1989). Naproti tomu, střední část fázového diagramu je charakterizovaná vcelku konstantní tepelnou kapacitou, která poukazuje na fakt, že veškerý obsah vzorků se nachází v amorfni stavu. Toto tvrzení je podpořeno i absencí jakýkoliv naměřených endotermních píků odpovídající tání ledu v termogramu. V porovnání s trehalózou (cca 25 °C, 50 hm. %) je teplota skelných přechodů ve střední části diagramu výrazně nižší (Olgenblum a kol., 2020). Nicméně v případě trehalózy to není žádné velké překvapení, protože její vliv na skelný přechod vody je vskutku mimořádný. Porovnáme-li ale 3HB s dalšími kompatibilními látkami jako je sacharóza nebo fruktóza, jsou teploty skelných přechodů vody srovnatelné (Goff a Sahagian, 1996). Na rozdíl od rovnovážného fázového diagramu, ve fázovém diagramu zkonstruovaném na základě nerovnovážných měření není možné přímo určit konkrétní složení směsi Na3HB-voda, při kterém kapalná voda přestává mrznout. Proto jsme využili stanovené hodnoty entalpií tání ledu (vypočtené jako plochy odpovídajících endotermních píků tání ledu) a vynesli je v závislosti na obsahu vody ve vzorku. Extrapolací lineární regrese této závislosti na nulovou entalpii bylo poté stanoveno množství tzv. nemrzoucí vody, která odpovídá přibližně 1,35 g vody na g Na3HB (0,57 g vody na g vzorku). Toto množství nemrzoucí vody je bezkonkurenční v rámci ostatních popsanych biokompatibilních látek, konkrétně při porovnání s fruktózou (0,21 g vody/g), sacharózou (0,26 g vody/g) a trehalózou (0,31 g vody /g) (Xu a kol., 2017).

Naše výsledky ukazují, že protektivní efekt 3HB v biologických systémech je možné přisuzovat jeho unikátnímu fázovému chování ve vztahu k vodě. Biologické konsekvence tohoto zjištění jsou neoddiskutovatelné, 3HB se nevyskytuje pouze v mikroorganismech, jedná se o široce rozšířenou biomolekulu, kterou můžeme najít i v lidském těle, kde je syntetizována v játrech, a tudíž cirkuluje tělem v rámci krevního oběhu. Koncentrace 3HB v krvi u dospělých pohybuje od 5 až 335 $\mu\text{mol/L}$, v případě ketózy mohou koncentrace dosahovat až hodnot 1 mmol/L , za účelem poskytování potřebné energie buňkám při nedostatku glukózy. Zato výskyt 3HB u prokaryotických organismů přímo souvisí se schopností buněk akumulovat P3HB, kdy je tento polymer v buňkách zároveň syntetizován a degradován právě na monomerní jednotky 3HB. Z tohoto důvodu je u PHA produkujících mikroorganismů intracelulární koncentrace 3HB až 16,5krát vyšší (100 mmol/L) než u mikrobiálních buněk neschopných syntézy a akumulace P3HB. Nízkomolekulární 3HB se tedy nepodobá kompatibilním látkám pouze vlastnostmi, ale také koncentrací v buňkách.

3.4 Přínos disertační práce k současnému stavu problematiky

Cílem předložené disertační práce je rozšířit současný stav poznání v oblasti biologické role PHA granulí v prokaryotických buňkách. Především jsme se zaměřili na protektivní roli PHA vůči environmentálně významným stresorům a také na pochopení protektivních mechanismů PHA, které nebyly doposud popsány. Obecně je možné konstatovat, že protektivní funkce PHA se na počátku 21. století stala široce diskutovaným tématem, viz. například review Kadouri a kol. 2003. Práce v těchto letech nastínily význam PHA v kontextu stresové odolnosti bakterií, nicméně protektivní mechanismus PHA granulí obvykle nebyl detailně studován. V posledních letech význam PHA v kontextu stresové robustnosti prokaryotických buněk zůstává stále aktuálním, jak dokládá řada publikací, které se protektivní funkci PHA také věnují. Za všechny je možné jmenovat například přehledový článek Müller-Santos a kol., 2020, který byl nedávno publikován prestižním časopise FEMS Microbiology Reviews. Tento článek v řadě aspektů navazuje a dále rozvíjí výsledky a myšlenky publikované výzkumným týmem školitele autorky.

V předložené disertační práci jsme se konkrétně zaměřili na studium protektivních účinků P3HB před UV zářením a osmotickým stresem, v případě druhého stresového faktoru především z hlediska expozice bakterií hypotonickému protředím. Abychom porozuměli jednotlivým protektivním mechanismům vůči daným stresům, zaměřili jsme se jednak na biofyzikální projevy přítomnosti P3HB granulí *in vivo*, ale také na metabolické důsledky spojené s produkcí monomerní jednotky 3HB v rámci metabolické dráhy zvané PHA cyklus. Konkrétní protektivní mechanismus P3HB granulí pochopitelně závisel na konkrétním stresovém faktoru.

Na základě našich výsledků je možné konstatovat, že v případě expozice buněk UV záření jsou buňky chráněny především díky rozptylu UV záření na P3HB granulích, které snižuje absorpci záření fotolabilními buněčnými komponentami lokalizovanými v jejich těsné blízkosti, konkrétně především molekulami DNA. Rozptyl záření také snižuje intracelulární koncentraci ROS specií, což přispívá k fotoprotektivnímu efektu potlačením sekundárního oxidativního stresu. Studie věnovaná protektivnímu účinku P3HB granulí byla publikována v časopise *Applied Microbiology and Biotechnology* a poster věnující se této tématice byl oceněn

odbornou komisí vítězstvím v soutěži pořádané v rámci posterové sekce na zahraniční konferenci 10th European Symposium on Biopolymers, která se konala v roce 2019 v německém Straubingu.

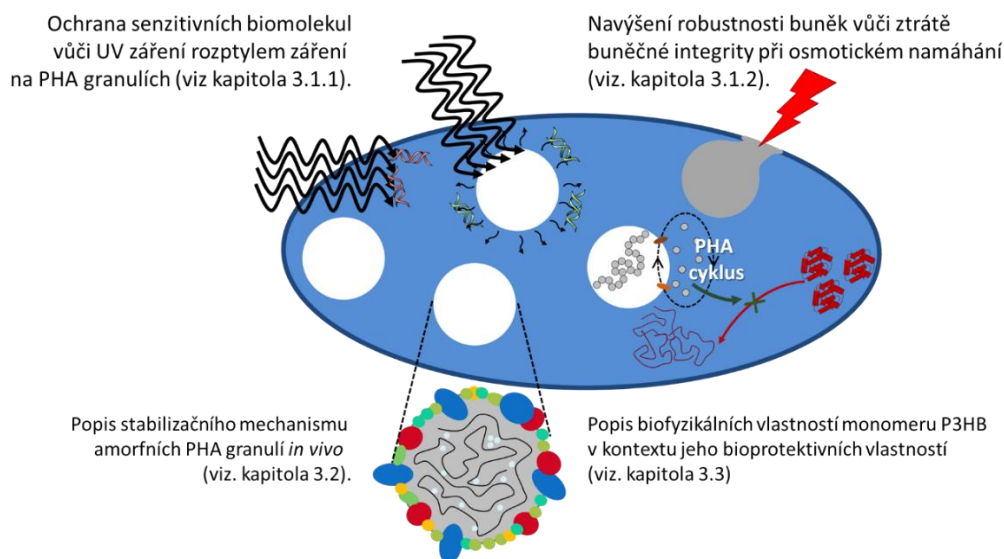
Naše práce také prokázala, že při expozici osmotickému stresu se na ochraně buňky podílí amorfni charakter P3HB granulí, který stabilizuje buněčné membrány hypertonicky namáhaných buněk. Při následném hypotonickém šoku jsou pak PHA granule obsahující buňky díky výrazně menší míře poškození cytoplazmatické membrány významně méně náchylné vůči hypotonické lyzi a jsou si schopny lépe udržet svou buněčnou integritu. Zároveň schopnost akumulace PHA snižuje náchylnost halofilních buněk vůči hypotonické lyzi, což může být jedním z důvodů, proč je schopnost akumulace PHA mezi halofolními prokaryoty široce rozšířená. Výsledky této studie byly publikovány v časopise *New Biotechnology*.

Amorfní stav nativních granulí hraje důležitou roli nejen v rámci jejich protektivních účinků, ale i z hlediska metabolické role P3HB v bakteriálních buňkách, protože buňky jsou schopné využít P3HB granule pouze v jejich nativním amorfním stavu. Z tohoto důvodu jsme se zabývali také stabilizačními mechanismy, které brání P3HB granulím v krystalizaci a udržují tak intracelulární polymer v termodynamicky nevýhodném, ale biologicky nepostradatelném amorfním stavu. Za tímto účelem jsme aplikovali několik vybraných stresů (vysoká teplota, vysoká salinita, nízké pH aj.) a studovali kinetiku krystalizace P3HB *in vivo* v průběhu dehydratace buněk. Na základě výsledků těchto experimentů jsme zjistili, že P3HB granule přechází do krystalické formy pouze, jestliže dojde k agregaci nativních granulí, které jsou následně dehydratovány. To nás vedlo k návrhu nového modelu stabilizace amorfní formy P3HB *in vivo*, který je založen na kombinaci dvou simultánních stabilizačních mechanismů, kdy k plastifikačnímu účinku přispívá jednak malý objem granulí a s tím spojená nízká frekvence nukleace, ale vedle toho také přítomnost vody v granulích, která přispívá k amorfní formě granulí v roli nízkomolekulárního plastifikátoru. Výsledky této studie byly publikovány v časopise *Applied Microbiology and Biotechnology*. Poznatky o stresem indukované krystalitaci P3HB *in vivo* mají také jednoznačný přesah do oblasti biotechnologické produkce tohoto polymeru. Ukazuje se, že vystavení buněk subletálními dávkami stresu, přestože se nemusí okamžitě fatálně projevit na množství životaschopných buněk, může indukovat změnu biofyzikálního stavu granulí, což ve svém důsledku vede nejen k poklesu produkce z důvodu omezení dělení buněk, ale krystalizace polymeru v buňkách může také negativně ovlivnit jeho rozpustnost a tím i účinnost následného izolačního procesu.

V další práci jsme se zaměřili na studium termodynamických parametrů a fázového chování monomeru P3HB ve vodných směsích. Díky unikátnímu charakteru metabolismu P3HB obsahují buňky schopné syntézy a degradace P3HB granulí významnou intracelulární koncentraci 3HB a i tato molekula přispívá k protektivnímu efektu P3HB granulí, protože 3HB se projevuje jako efektivní chemický chaperon a kryoprotektant. Abychom lépe porozuměli protektivním účinkům 3HB věnovala autorka disertační práce v rámci stáže u prof. Kocherbitova na univerzitě v Malmö studiu interakcí 3HB z vodou a vytvoření rovnovážného a nerovnovážného fázového diagramu systému Na3HB-voda. Získaná data potvrzují, že 3HB představuje velice účinný kryoprotektant, který svou účinností může konkurovat například

trehalóze nebo glycerolu. Kromě fundamentálního významu v kontextu biologické role P3HB granulí u prokaryot mohou mít tyto výsledky aplikační potenciál například v oblasti úchovy biologických vzorků nebo potravin. Manuskript věnující se této tematice je obsahem a v současné době podléhá recenznímu řízení.

Klíčové originální poznatky, které předložená disertační práce přináší v kontextu protektivních mechanismů a efektů P3HB v bakteriálních buňkách jsou shrnuty na obrázku 14.



Obr. 14: Souhrn protektivních mechanismů P3HB granulí a jeho monomerní jednotky 3HB.

Výsledky výše uvedených prací byly popsány nejen v původních vědeckých článcích uvedených výše, ale také v přehledovém článku, který byl publikován na základě pozvání od šéf-editora časopisu profesora Steinbuchela v časopise *Applied Microbiology and Biotechnology*⁵. V tomto přehledovém článku jsme shrnuli současný stav poznání a především jsme se zaměřili na popis unikátních biofyzikálních a biochemických vlastností PHA granulí, které vycházejí z jejich nativní amorfní povahy. Zároveň jsme se v přehledovém článku dále věnovali mechanismům stabilizujících amorfní stav granulí a představili jsme náš originální koncept, který synergicky propojuje obě stávající navržené teorie tzn. stabilizaci pomocí plastifikátoru a vliv malého objemu granulí na kinetiku krystalizace granulí.

Předložená disertační práce též přispěla v rámci rozvoje celé řady instrumentálních technik a metodik, které nepatří mezi standartně využívané metody v oblasti mikrobiologie, ale ukázaly se jako velmi užitečné při objasnění jak protektivních účinků P3HB, tak stabilizačního mechanismu amorfních P3HB granulí. Jedná se například o kombinaci turbidimetrie s difúzně transmittanční spektroskopií, díky které jsme byli schopni rozlišit mezi absorpcí a rozptylem světla u buněčných suspenzí. Tato technika, kterou jsme za uvedeným účelem doporučili v publikaci z roku 2018 našla v poslední době své uplatnění třeba v práci Tribelli a kol. 2020,

⁵ OBRUCA, S.; SEDLACEK, P.; SLANINOVA, E.; FRITZ, I.; DAFFERT, CH.; MEIXNER, K.; SEDRLOVA, Z.; KOLLER, M. Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, r.11, č. 104, s.4795-4810, ISSN: 14320614

kteřá se také věnovala studiu UV protektivní funkce P3HB u antarktické bakterie *Pseudomonas extremaustralis*. Další zajímavou nestandardní technikou použitou v této práci je izotermální termogravimetrie, která byla velmi prospěšná při stanovení množství intracelulární vody a také při analýze integrity buněk. Jako další spektroskopickou metodu, přitahující v poslední době rostoucí pozornost v oblasti charakterizace PHA produkujících bakterií, je možné vyzdvihnout infračervenou spektroskopii, díky které jsme byli v naší práci schopni určit míru krystalinity P3HB *in vivo* měřenou v reálném čase. Na základě právě této metody jsme byli schopni porozumět podstatě stabilizačního mechanismu amorfních P3HB granulí.

4 LITERATURA

- Ataian, Y., & Krebs, J. E. (2006). Five repair pathways in one context: Chromatin modification during DNA repair. *Biochemistry and Cell Biology*, 84(4), 490–504. <https://doi.org/10.1139/O06-075>
- Bonthrone, K. M., Clauss, J., Horowitz, D. M., Hunter, B. K., & Sanders, J. K. M. (1992). The biological and physical chemistry of polyhydroxyalkanoates as seen by NMR spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 103(2–4), 269–277. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90320-N](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90320-N)
- Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2016). Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. *Scientific Reports*, 6(May), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep26612>
- Brown, R. B., & Audet, J. (2008). Current techniques for single-cell lysis. *Journal of the Royal Society Interface*, 5(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0009.focus>
- Ceccorulli, G., Pizzoli, M., & Scandola, M. (1992). Plasticization of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate). *Macromolecules*, 25(12), 3304–3306. <https://doi.org/10.1021/ma00038a045>
- Chen, G. Q., Hajnal, I., Wu, H., Lv, L., & Ye, J. (2015). Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 33, Issue 10, pp. 565–574). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.07.007>
- Chen, T., Fowler, A., & Toner, M. (2000). Literature review: Supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. *Cryobiology*, 40(3), 277–282. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2244>
- Cho, M., Brigham, C. J., Sinskey, A. J., & Stubbe, J. (2012). Purification of polyhydroxybutyrate synthase from its native organism, *Ralstonia eutropha*: Implications for the initiation and elongation of polymer formation in vivo. *Biochemistry*, 51(11), 2276–2288. <https://doi.org/10.1021/bi2013596>
- Choi, J. S., & Park, W. H. (2004). Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate). *Polymer Testing*, 23(4), 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2003.09.005>
- Ciesielski, S., Górniak, D., Moć, J., Aleksander, P., Wiatkowski, S., Grzesiak, J., & Zdanowski, M. (2012). The Diversity of Bacteria Isolated from Antarctic Freshwater Reservoirs Possessing the Ability to Produce Polyhydroxyalkanoates. *Current Microbiology*, 69, 594–603. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0629-1>
- da Costa, M. S., Santos, H., & Galinski, E. A. (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 61, 117–153. <https://doi.org/10.1007/bfb0102291>
- de Koning, G. J. M., & Lemstra, P. J. (1992). The amorphous state of bacterial poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] in vivo. *Polymer*, 33(15), 3292–3294. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90249-V](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90249-V)

- Dong, T. G., Dong, S., Catalano, C., Moore, R., Liang, X., & Mekalanos, J. J. (2015). Generation of reactive oxygen species by lethal attacks from competing microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(7), 2181–2186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1425007112>
- Dvorak, P., Chrast, L., Nikel, P. I., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., Chaloupkova, R., Lorenzo, V., Prokop, Z., & Damborsky, J. (2015). Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0393-3>
- Gabani, P., & Singh, O. V. (2012). Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 993–1004. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4642-7>
- Goff, H. D., & Sahagian, M. E. (1996). Glass transitions in aqueous carbohydrate solutions and their relevance to frozen food stability. *Thermochimica Acta*, 280–281(SPEC. ISS.), 449–464. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(95\)02656-8](https://doi.org/10.1016/0040-6031(95)02656-8)
- Goh, Y. S., & Tan, I. K. P. (2012). Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island. *Microbiological Research*, 167(4), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.08.002>
- Goosen, N., & Moolenaar, G. F. (2008). Repair of UV damage in bacteria. In *DNA Repair* (Vol. 7, Issue 3, pp. 353–379). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.09.002>
- Green, J. L., & Angell, C. A. (1989). Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *Journal of Physical Chemistry*, 93(8), 2880–2882. <https://doi.org/10.1021/j100345a006>
- Hazer, B., & Steinbüchel, A. (2007). Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0732-8>
- Horowitz, D. M., & Sanders, J. K. M. (1994). *Amorphous, Biomimetic Granules of PHB*. 116(7).
- Jain, N. K., & Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science*, 18(1), 24–36. <https://doi.org/10.1002/pro.3>
- Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *Journal of Bacteriology*, 191(10), 3195–3202. <https://doi.org/10.1128/JB.01723-08>
- Jendrossek, D., & Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*, 16(8), 2357–2373. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12356>
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., & Okon, Y. (2003a). Involvement of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3244–3250. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3244-3250.2003>
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., & Okon, Y. (2003b). Poly β -hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a phaZ mutant. *Archives of Microbiology*, 180(5), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0590-z>
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y., & Castro-Sowinski, S. (2005). Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*, 31(2), 55–67. <https://doi.org/10.1080/10408410590899228>
- Kessler, B., & Witholt, B. (2001). Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology*, 86(2), 97–104. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00404-1)
- Kim, J., Kim, Y. J., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2017). Crystal structure of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms.

- Biotechnology Journal*, 12(1). <https://doi.org/10.1002/biot.201600648>
- Koch, A. L. (1995). The geometry and osmotic relations of plasmolysis spaces in bacteria and the role of endocytosis, tubular structures and schein structures in their formation. In *Journal of Theoretical Biology* (Vol. 176, Issue 4, pp. 471–492). [https://doi.org/10.1006/S0022-5193\(85\)90300-5](https://doi.org/10.1006/S0022-5193(85)90300-5)
- Koller, M. (2015). Recycling of waste streams of the biotechnological poly(hydroxyalkanoate) production by *Haloferax mediterranei* on whey. *International Journal of Polymer Science*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/370164>
- Koller, M., Muhr, A., & Braunnegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. In *Algal Research* (Vol. 6, Issue PA, pp. 52–63). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
- Kouwen, R. H. M., Antelmann, H., Van Ploeg, R. Der, Denham, E. L., Hecker, M., & Van Dijk, J. M. (2009). MscL of *Bacillus subtilis* prevents selective release of cytoplasmic proteins in a hypotonic environment. *Proteomics*, 9(4), 1033–1043. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800483>
- Lammert, A. M., Schmidt, S. J., & Day, G. A. (1998). Water activity and solubility of trehalose. *Food Chemistry*, 61(1–2), 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00132-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00132-5)
- Lane, L. B. (1925). Freezing Points of Glycerol and its Aqueous Solutions. *Industrial and Engineering Chemistry*, 17(9), 924. <https://doi.org/10.1021/ie50189a017>
- Lauzier, C., Marchessault, R. H., Smith, P., & Chanzy, H. (1992). Structural study of isolated poly(β -hydroxybutyrate) granules. *Polymer*, 33(4), 823–827. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90343-U](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90343-U)
- Lauzier, C., Revol, J. F., & Marchessault, R. H. (1992). Topotactic crystallization of isolated poly(β -hydroxybutyrate) granules from *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters*, 103(2–4), 299–310. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90323-G](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90323-G)
- Maestro, B., & Sanz, J. M. (2017). Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1323–1337. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12718>
- Mas, J., Pedrós-Alió, C., & Guerrero, R. (1985). Mathematical model for determining the effects of intracytoplasmic inclusions on volume and density of microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 164(2), 749–756. <https://doi.org/10.1128/JB.164.2.749-756.1985>
- Mathlouthi, M., Reiser, P. (1995). *Sucrose: properties and applications*. Springer Science a Business Media.
- Mazur, P. (2004). Principles Of Cryobiology. In *Life in the Frozen State*. <https://doi.org/10.1201/9780203647073.ch1>
- Mezzina, M. P., & Pettinari, M. J. (2016). Phasins, multifaceted polyhydroxyalkanoate granule-associated proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5060–5067. <https://doi.org/10.1128/AEM.01161-16>
- Miller, D. P., de Pablo, J. J., & Corti, H. (1997). Thermophysical Properties of Trehalose and Its Concentrated Aqueous Solutions. *Pharmaceutical Research*, 14.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Mravec, F., Obruca, S., Krzyzanek, V., Sedlacek, P., Hrubanova, K., Samek, O., Kucera, D., Benesova, P., & Nebesarova, J. (2016). Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 363(10), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw094>
- Nakagawa, H., & Oyama, T. (2019). Molecular Basis of Water Activity in Glycerol–Water Mixtures. *Frontiers in Chemistry*, 7(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00731>
- Obruca, S., Marova, I., Svoboda, Z., & Mikulikova, R. (2010). Use of controlled exogenous

- stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica*, 55(1), 17–22. <https://doi.org/10.1007/s12223-010-0003-z>
- Obruca, Stanislav, Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., & Pernicova, I. (2018). Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. In *Biotechnology Advances* (Vol. 36, Issue 3, pp. 856–870). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006>
- Obruca, Stanislav, Sedlacek, P., Krzyzanek, V., Mravec, F., Hrubanova, K., Samek, O., Kucera, D., Benesova, P., & Marova, I. (2016). Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLoS ONE*, 11(6), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157778>
- Obruca, Stanislav, Sedlacek, P., Mravec, F., Krzyzanek, V., Nebesarova, J., Samek, O., Kucera, D., Benesova, P., Hrubanova, K., Milerova, M., & Marova, I. (2017). The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnology*, 39, 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.008>
- Obruca, Stanislav, Sedlacek, P., Mravec, F., Samek, O., & Marova, I. (2016). Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1365–1376. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7162-4>
- Obruca, Stanislav, Sedlacek, P., Slaninova, E., Fritz, I., Daffert, C., Meixner, K., Sedrlova, Z., & Koller, M. (2020). Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4795–4810. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10568-1>
- Olgenblum, G. I., Sapir, L., & Harries, D. (2020). Properties of Aqueous Trehalose Mixtures: Glass Transition and Hydrogen Bonding. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 16(2), 1249–1262. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b01071>
- Paunescu, D., Mora, C. A., Puddu, M., Krumeich, F., & Grass, R. N. (2014). DNA protection against ultraviolet irradiation by encapsulation in a multilayered SiO₂/TiO₂ assembly. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(48), 8504–8509. <https://doi.org/10.1039/c4tb01552e>
- Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(3), 233–247. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jctb.1667>
- Porter, M., & Yu, J. (2011). Crystallization Kinetics of Poly(3-hydroxybutyrate) Granules in Different Environmental Conditions. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 02(03), 301–310. <https://doi.org/10.4236/jbnt.2011.23037>
- Pötter, M., Madkour, M. H., Mayer, F., & Steinbüchel, A. (2002). Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 148(8), 2413–2426. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2413>
- Pötter, M., Müller, H., & Steinbüchel, A. (2005). Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 151(3), 825–833. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27613-0>
- Roberts, M. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1(1), 1–30. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>
- Roe, K. D., & Labuza, T. P. (2005). Glass transition and crystallization of amorphous trehalose-sucrose mixtures. *International Journal of Food Properties*, 8(3), 559–574. <https://doi.org/10.1080/10942910500269824>
- Ron, E. Z. (2013). Bacterial Stress Response. In *The Prokaryotes* (pp. 589–603). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_79
- Savenkova, L., Gercberga, Z., Bibers, I., & Kalnin, M. (2000). Effect of 3-hydroxy valerate

- content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum*. *Process Biochemistry*, 36(5), 445–450. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00235-1)
- Schwarz, H., & Koch, A. L. (1995). Phase and electron microscopic observations of osmotically induced wrinkling and the role of endocytotic vesicles in the plasmolysis of the Gram-negative cell wall. *Microbiology*, 141(12), 3161–3170. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-12-3161>
- Sedlacek, P., Slaninova, E., Enev, V., Koller, M., Nebesarova, J., Marova, I., Hrubanova, K., Krzyzanek, V., Samek, O., & Obruca, S. (2019). What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(4), 1905–1917. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09584-z>
- Soto, G., Setten, L., Lisi, C., Maurelis, C., Mozzicafreddo, M., Cuccioloni, M., Angeletti, M., & Ayub, N. D. (2012). Hydroxybutyrate prevents protein aggregation in the halotolerant bacterium *Pseudomonas* sp. CT13 under abiotic stress. *Extremophiles*, 16(3), 455–462. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0445-0>
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. In *Progress in Polymer Science (Oxford)* (Vol. 25, Issue 10, pp. 1503–1555). Elsevier Science Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)
- Takahashi, A., & Ohnishi, T. (2009). Molecular mechanisms involved in adaptive responses to radiation, UV light, and Heat. *Journal of Radiation Research*, 50(5), 385–393. <https://doi.org/10.1269/jrr.09048S>
- Takahashi, R. Y. U., Castilho, N. A. S., da Silva, M. A. C., Miotto, M. C., & Lima, A. O. de S. (2017). Prospecting for marine bacteria for polyhydroxyalkanoate production on low-cost substrates. *Bioengineering*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030060>
- Uchino, K., Saito, T., & Jendrossek, D. (2008). Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1057–1063. <https://doi.org/10.1128/AEM.02342-07>
- Wahl, A., Schuth, N., Pfeiffer, D., Nussberger, S., & Jendrossek, D. (2012). PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC Microbiology*, 12(iv). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-262>
- Wen, X., Lu, X., Peng, Q., Zhu, F., & Zheng, N. (2012). Crystallization behaviors and morphology of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 109(2), 959–966. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1768-2>
- Wieczorek, R., Pries, A., Steinbuchel, A., & Mayer, F. (1995). Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 177(9), 2425–2435. <https://doi.org/10.1128/jb.177.9.2425-2435.1995>
- Wiggins, P. M. (1990). Role of water in some biological processes. *Microbiological Reviews*, 54(4), 432–449. <https://doi.org/10.1128/mmbr.54.4.432-449.1990>
- Xu, M., Chen, G., Zhang, C., & Zhang, S. (2017). Study on the Unfrozen Water Quantity of Maximally Freeze-Concentrated Solutions for Multicomponent Lyoprotectants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(1), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.05.007>
- Young, F. E., & Jones, F. T. (1949). Sucrose hydrates: The sucrose-water phase diagram. *Journal of Physical & Colloid Chemistry*, 53(9), 1334–1350. <https://doi.org/10.1021/j150474a004>
- Zepp, R. G., Erickson III, D. J., Paul, N. D., & Sulzberger, B. (2011). Effects of solar UV

radiation and climate change on biogeochemical cycling: interactions and feedbacks. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10(2), 261.
<https://doi.org/10.1039/c0pp90037k>

Zhao, Y. H., Li, H. M., Qin, L. F., Wang, H. H., & Chen, G. Q. (2007). Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 276(1), 34–41.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00904.x>

5 SEZNAM ZKRATEK

3HB	3-hydroxybutyrát
3HV	3-hydroxyvalerát
4HB	4-hydroxybutyrát
BER	excisní reparace bází
CoA	koenzym A
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dPHA	denaturované PHA
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
DVS	dynamická sorpční analýza par
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
i-nPHA	intracelulární nativní PHA
iTGA	izotermální termogravimetrická analýza
kryoSEM	kryo skenovací elektronová mikroskopie
lcl-PHA	long-chain-lenght
mcl-PHA	medium-chain-lenght
NER	nukleotidová excisní reparace
nPHA	nativní PHA
P3HB	poly(3-hydroxybutyrát)
PHA	polyhydroxyalkanoáty
RH	relativní vlhkost
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
scl-PHA	short-chain-lenght
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
T _g	teplota skelného přechodu
T _m	teplota tání
UV	ultrafialové záření
UVR	UV rezistence

6 PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORKY

a) Publikace v recenzovaných časopisech s impaktovaným faktorem

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; MÜLLEROVÁ, L.; SAMEK, O.; KOLLER, M.; HESKO, O.; KUČERA, D.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, roč. 102, č. 4, s. 1923-1931. ISSN: 1432-0614. 33

SEDLÁČEK, P.; SLANINOVÁ, E.; ENEV, V.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; KRZYZANEK, V.; SAMEK, O.; MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 2019, roč. 103, č. 4, s. 1905-1917. ISSN: 0175-7598.

SEDLÁČEK, P.; SLANINOVÁ, E.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; MÁROVÁ, I.; KRZYZANEK, L.; OBRUČA, S. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnology*, 2019, roč. 49, č. 3, s. 129-136. ISSN: 1871-6784.

PERNICOVÁ, I.; NOVÁČKOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; KOUŘILOVÁ, X.; KALINA, M.; KOVALČÍK, A.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVA, K.; MÁŠILKO, J.; SLANINOVÁ, E.; OBRUČA, S. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers-1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers*, 2020, roč. 12, č. 6, s. 1-13. ISSN: 2073-4360.

SEDLÁČEK, P.; PERNICOVÁ, I.; NOVÁČKOVÁ, I.; KOUŘILOVÁ, X.; KALINA, M.; KOVALČÍK, A.; KOLLER, M.; NEBESAROVA, J.; KRZYZANEK, V.; HRUBANOVA, K.; MÁŠILKO, J.; SLANINOVÁ, E.; TRUDIČOVÁ, M.; OBRUČA, S. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers-2. Material Study on the Produced Copolymers. *Polymers*, 2020, roč. 12, č. 6, s. 1-18. ISSN: 2073-4360.

OBRUČA, S.; SEDLÁČEK, P.; SLANINOVÁ, E.; FRITZ, I.; DAFFERT, C.; MEIXNER, K.; ŠEDRLOVÁ, Z.; KOLLER, M. Novel unexpected functions of PHA granules. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 2020, roč. 104, č. 11, s. 4795-4810. ISSN: 0175-7598.

b) Konferenční příspěvky

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; HESKO, O.; MÜLLEROVÁ, L.; OBRUČA, S. Accumulation of PHA granules protects bacterial cells from adverse effect of UV-irradiation. 6th Central European Congress of life Sciences Eurobiotech. Krakow: 2017. s. 166-166.

OBRUČA, S.; RUCKÁ, M.; MRÁZOVÁ, K.; **SLANINOVÁ, E.**; SAMEK, O.; KROUSKÁ, J.; KRZYZANEK, V. Role of polyhydroxyalkanoates in biofilm formation of *Burholderia cepacia* and *Burholderia sacchari*. EUROBIOTECH 6th Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech: Programme and abstract book. 1. Krakow: Targi w Krakowie, 2017. s. 163-163.

OBRUČA, S.; KUČERA, D.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK, V.; NEBESAROVA, J.; MÜLLEROVÁ, L.; CHYTILOVÁ, A.; **SLANINOVÁ, E.**; MÁROVÁ, I. Capability of polyhydroxyalkanoates accumulation enhances stress resistance and cell robustness of bacteria. Eurobiotech: Programme and Abstract Book. 1. Krakow: Targi w Krakowie, 2017. s. 154-154.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; NEBESÁŘOVÁ, J.; KRZYŤÁNEK, V.; OBRUČA, S. Utilization of TEM to observe morphological changes of bacterial cells containing PHA granules which were exposed to various stress factors. XVIII. setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova univerzita, 2017. s. 86-86. ISBN: 978-80-210- 8765-1.

OBRUČA, S.; KUČERA, D.; BENEŠOVÁ, P.; PERNICOVÁ, I.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; SAMEK, O.; KRZYZANEK, V.; MÜLLEROVÁ, L.; CHYTILOVÁ, A.; **SLANINOVÁ, E.** *Integrating production of PHA into bio-refinery concept: considering the impact of non-optimal cultivation conditions*. 9th European Symposium on Biopolymers: Book of Abstracts. 1. Toulouse, Francie: 2017. s. 28-29.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Mysterious Amorphous State of Native Granules of Polyhydroxyalkanoates and Its Transitions Into Crystalline State. 2018. ISBN: 978-80-86238-83-8.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Polyhydroxyalkanoates – microbial polyesters with multiple protective functions for bacterial cells. Czech chemical society symposium series. Hradec Králové: Česká společnost chemická, 2018. s. 1-48. ISSN: 2336-7202.

FRYŠOVÁ, E.; ČERNÁ, K.; **SLANINOVÁ, E.**; CHYTILOVÁ, A.; OBRUČA, S. Studium adsorpčních vlastností vybraných probiotických bakterií. Tomáškovy dny 2018 XXVII. konference mladých mikrobiologů. 2018. s. 74-74. ISBN: 978-80-210-8963-1.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S.; KOCHERBITOV, V. *Effects of hydration of sodium 3-hydroxybutyrate on phase transitions connected to cryoprotectivity of microorganisms*. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018. Book of abstracts. Purkyňova 464/118, 612 00 Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. s. 85-85. ISBN: 978-80-214-5488-0.

FRYŠOVÁ, E.; ČERNÁ, K.; **SLANINOVÁ, E.**; CHYTILOVÁ, A.; OBRUČA, S. *Characterization of adsorption properties of probiotic bacteria*. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018. Book of abstract. 2018. s. 135-135. ISBN: 978-80-214-5488-0.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Polyhydroxyalkanoates –microbial polyesters with a complex protective effect against diverse stress factors*. XIX. setkání biochemiků a molekulárních biologů. Trnkova 119, 628 00 Brno-Líšeň: Tiskárna Didot, spol. s. r. o., 2018. s. 44-44. ISBN: 978-80-210-9069-9.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; MRAVEC, F.; HESKO, O.; MÜLLEROVÁ, L.; OBRUČA, S. *Protective effect of PHA granules in bacterial cells against UV-irradiation investigated by various spectral techniques*. Straubing: C.A.R.M.E.V. e.V., 2019. s. 88-88.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. Causes and consequences of unique amorphous state of native granules of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its transitions into crystalline state. The Biomania Student scientific meeting - Eusynbios symposium 2019. 1th. 2019. s. 116-117. ISBN: 9788021093737.

NOVÁČKOVÁ, I.; CHATRNÁ, V.; SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; SAMEK, O.; OBRUČA, S. *Approaches of evolutionary engineering for adaptation of Cupriavidus necator H16 to biotechnologically relevant stressors*. XXIX. konference mladých mikrobiologů TOMÁŠKOVY DNY 2020. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2020. s. 45-45. ISBN: 978-80-210-9611-0.

ŠEDRLOVÁ, Z.; SLANINOVÁ, E.; FRITZ, I.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Mixotrophic growth and increased salinity – possible tools for increasing the PHB production in cyanobacteria?*. Studentská odborná konference CHEMIE JE ŽIVOT 2020. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2020. s. 134-135. ISBN: 978-80-214-592.

SLANINOVÁ, E.; SEDLÁČEK, P.; ČERNAYOVÁ, D.; ŠEDRLOVÁ, Z.; OBRUČA, S.; KRZYŽÁNEK, V.; NEBESÁŘOVÁ, J. *Production and Characterization of Polyhydroxybutyrate in Cyanobacteria*. Tomáškovy dny 2020XXIX. konference mladých mikrobiologů. 1. Brno: Masarykova Univerzita, 2020. s. 51-51. ISBN: 978-80-210-9611-0.

ŠEDRLOVÁ, Z.; SLANINOVÁ, E.; DRINKA, J.; SEDLÁČEK, P.; OBRUČA, S. *Cyanobakterie produkující PHA aneb může „zasolení“ zvýšit produkci PHA?*. XXIX. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2020. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2020. s. 53-53. ISBN: 978-80-210-9611-0.

c) Závěrečné práce:

SLANINOVÁ, E. Studium struktury a vlastností vody v blízkosti hydrofilních povrchů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

SLANINOVÁ, E. Využití fyzikálně-chemických analýz při studiu stresových odpovědí mikroorganismů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 73 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.



EVA SLANINOVÁ

KONTAKTNÍ INFORMACE

Mobil: +420 724514123
Email: xcslaninova@vutbr.cz
Adresa: Doubravník 77, 592 61

JAZYKY

Angličtina (aktivní znalost)
Španělština (mírně pokročilá)
Čeština (rodilý mluvčí)

SCHOPNOSTI

Software: MS Office, Matlab, Origin
Řidičský průkaz skupiny B
Prezentace
Čestné a kolegiální vystupování
Schopnost týmové práce
Samostatnost
Schopnost vedení lidí

ZÁJMY

plavání
běh
četba
horolezectví

PROFIL

Jsem studentkou doktorského programu chemie a technologie potravin na Vysokém učení technickém v Brně a můj výzkum se soustředí na fyzikálně-chemické vlastnosti bakteriálních polymerů polyhydroxyalkanoátů a jejich vlivu na produkující buňky. Během studia jsem získala pokročilé znalosti v oblasti analytické chemie, fyzikální chemie a biochemie.

VZDĚLÁNÍ

Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně

Doktorský studijní obor: Potravinářská chemie
Téma dizertační práce: Metabolická a biofyzikální charakterizace bakteriálních buněk schopných akumulace PHA 2016-současnost

Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně

Magisterský navazující program: Chemie pro medicínské aplikace
Téma diplomové práce: Využití fyzikálně-chemických analýz při studiu stresových odpovědí mikroorganismů 2014-2016

Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně

Bakalářský program: Chemie pro medicínské aplikace
Téma bakalářské práce: Studium struktury a vlastností vody v blízkosti hydrofilních povrchů 2011-2014

VĚDECKÁ PRAXE A ZAHRANIČNÍ STÁŽE

Centrum materiálového výzkumu

Výzkumný pracovník, 2015 - současnost
Zapojení PHA do stresové odpovědi mikrobiálních buněk

University of Stuttgart, Německo

Stáž, Březen - Srpen 2019
- molekulární biologie

Malmö University, Švédsko

Stáž, Únor - Červen 2017
- pokročilé metody termické analýzy (DSC, DVS, sorpční kalorimetrie)

NTNU University, Norsko

Erasmus+, Srpen 2014 - Červen 2015
- mikrobiophysikální analýzy

OCENĚNÍ

cena děkana za vynikající studijní výsledky

2018

oceněný poster

konferenci 10th European Symposium on Biopolymers
2019, Straubing, Německo