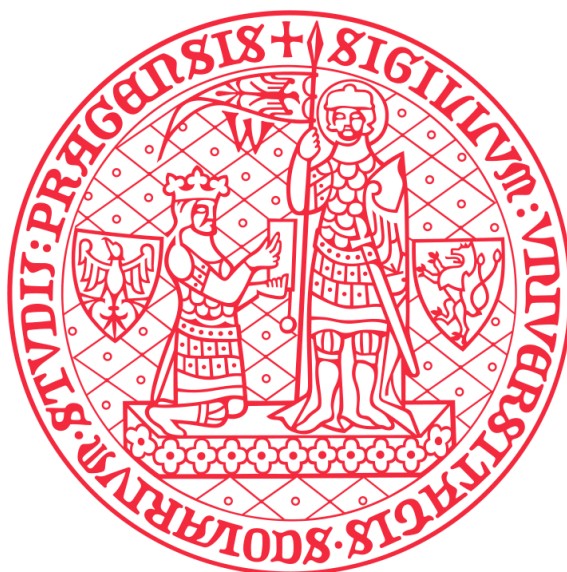


Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Mykhailo Streltsov

Úloha mikrodomén plasmatické membrány v regulaci transportérů živin a iontů

The role of plasma-membrane microdomains in the regulation of nutrient and ion transporters

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Olga Zimmermannová, Ph.D.

Praha, 2025

Poděkování

Děkuji své školitelce Ing. Olze Zimmermannové, Ph.D., za její trpělivost, podporu a odborné rady, které mi během tvorby této práce poskytovala. Děkuji Pánu Bohu za jeho milost a požehnání, které mě provázely po celou dobu mého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Při jazykové korektuře a stylistických úpravách textu jsem využil asistenci nástroje ChatGPT.

V Praze, 30.5.2025

Podpis:

Abstrakt

Cílem bakalářské práce je shrnout současné poznatky o výskytu a druzích strukturních mikrodomén v plasmatické membráně u jednobuněčných eukaryot (kvasinek) a v buňkách savců, včetně člověka. Práce charakterizuje jednotlivé typy mikrodomén, jejich formování, regulaci a složení. Dále se zabývá vztahem mezi konkrétními typy mikrodomén a transportními proteiny v plasmatické membráně. Je charakterizována lokalizace transportérů do mikrodomén a úloha těchto mikrodomén v regulaci transportérů živin a iontů za fyziologických podmínek. Dalším cílem bakalářské práce je poskytnout přehled o rolích mikrodomén v odpovědi na stresové podmínky. Práce také dává přehled a popisuje některé současné metodické postupy a jejich možné využití při zkoumání proteinového složení a funkcí mikrodomén. Zvláštní pozornost je věnována metodám využívajícím fluorescenční proteiny, včetně krátké charakteristiky vybraných fluoroforů, které se používají při studiu mikrodomén.

Klíčová slova: eukaryotní buňka, plasmatická membrána, mikrodoména, regulace transportérů, fluorescenční protein

Abstract

The aim of this bachelor thesis is to summarize current knowledge about the occurrence and types of structural microdomains in the plasma membrane of unicellular eukaryotes (yeasts) and mammalian cells, including humans. The thesis characterizes individual types of microdomains, their formation, regulation, and composition. It further explores the relationship between specific types of microdomains and transport proteins in the plasma membrane. The localization of transporters within microdomains and the role of these microdomains in regulating the transport of nutrients and ions under physiological conditions is described. Another goal of the thesis is to provide an overview of the role of microdomains in response to stress conditions. The thesis also reviews and describes some current methodological approaches and their possible applications in the investigation of the protein composition and functions of microdomains. Special attention is given to methods utilizing fluorescent proteins, including a brief characterization of selected fluorophores used in the study of microdomains.

Key words: eukaryotic cell, plasma membrane, microdomain, regulation of transporters, fluorescent protein

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Mikrodomény plasmatické membrány.....	2
2.1 Plasmatická membrána kvasinek a savčích buněk	2
2.2 Charakteristika mikrodomén	3
2.3 Typy mikrodomén a jejich složení.....	3
2.4 Experimentální přístupy ke zkoumání mikrodomén PM.....	7
2.5 Formování a regulace mikrodomén.....	10
3. Transportéry asociované s mikrodomény.....	13
3.1 Typy transportérů a jejich lokalizace v mikrodoménách PM	13
3.2 Jak mikrodomény regulují transportéry.....	16
4. Jak mikrodomény přispívají k odpovědi na stres	18
4.1 Osmotický stres.....	18
4.2 Lipidový stres	18
4.3 Role lipidových raftů	19
5. Závěr.....	22
Seznam použité literatury	23

Seznam zkratek

AMPK	AMP-aktivovaná protein kináza
DAT	dopaminový transportér
DGUC	density gradient ultracentrifugation (ultracentrifugace v hustotním gradientu)
DRM	detergent-resistant membrane
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopy (mikroskopie založená na době dohasínání fluorescence)
HDL	high density lipoprotein (vysokodenzitní lipoprotein)
MCC	membrane compartment of Can1
MCP	membrane compartment of Pma1
MCT	membrane compartment of TORC2
M β CD	metyl- β -cyclodextrin
PE	fosfatidyletanolamin
PI	fosfatidylinositol
PL	fosfolipid
PM	plasmatická membrána
PS	fosfatidylserin
SILAC	stable isotope labeling with amino acids in cell culture (stabilní izotopové značení aminokyselinami v buněčné kultuře)
TIRF	total internal reflection fluorescence microscopy (mikroskopie s totálním vnitřním odrazem fluorescence)
TORC1/2	target of rapamycin complex 1/2

1. Úvod

Pro správné fungování a zajištění homeostázy buňky je nezbytná komunikace s vnějším prostředím. Specifickou organelou, která tuto funkci plní, je plasmatická membrána, která jednak odděluje obsah buňky od vnějšího prostředí, a jednak představuje místo pro signální a transportní systémy buňky. Transportéry plasmatické membrány jsou transmembránové proteiny, které jsou zodpovědné za transport živin, iontů a dalších molekul přes membránu.

Mikrodomény jsou specifické útvary plasmatické membrány, které se liší od okolní membrány svým proteinovým a lipidovým obsahem, charakteristickou morfologií a biofyzikálními vlastnostmi (Athanasopoulos et al., 2019; Simons & Ikonen, 1997).

Kvasinky jsou jednobuněčná eukaryota, jejichž plasmatická membrána obsahuje tři dosud charakterizované typy mikrodomén: MCC (membrane compartment of Can1), MCP (membrane compartment of Pma1) a MCT (membrane compartment of TORC2) (Athanasopoulos et al., 2019; Malinsky & Opekarová, 2016). Tyto mikrodomény tvoří laterálně oddělené struktury, jež částečně mezi sebou komunikují. Specifický obsah proteinů v jednotlivých mikrodoménách posloužil k jejich objevení a umožňuje sledovat jejich vzájemnou lokalizaci v plasmatické membráně pomocí fluorescenčních značek (Malinska et al., 2003, 2004). MCP obsahuje H^+ -ATPázu Pma1, která vytváří protonový gradient přes plasmatickou membránu a umožňuje transport dalších látek a iontů pomocí sekundárních transportérů. Pět permeáz, které k transportu využívají protonmotivní sílu jsou lokalizovány do MCC (Lanze et al., 2020). Přítomnost transportérů v MCT zatím nebyla odhalena.

V buňkách mnohobuněčných eukaryot rozeznáváme dva typy mikrodomén: planární lipidové rafty a miskovité kaveoly (Palade, 1953; Simons & Ikonen, 1997). Planární lipidové rafty přítomné v různých tkáních se liší svým proteinovým obsahem. Lipidové rafty hrají pravděpodobně důležitou roli v komunikaci mezi neurony a gliovými buňkami (Butchbach et al., 2004) a reverzním transportu cholesterolu v periferních tkáních (Oram & Lawn, 2001), ale stále není jednoznačně určena úloha raftů v regulaci membránových transportérů. Miskovité lipidové rafty, tzv. kaveoly obsahují několik transportérů, které se podílejí na transportu mastných kyselin (Örtengren et al., 2006; Ring et al., 2006) a regulaci úrovně glukózy (Ribon et al., 2001).

Tato práce shrnuje nejnovější poznatky o typech, složení a funkcích mikrodomén plasmatické membrány u kvasinek a živočišných buněk. Zvláštní pozornost je věnována lokalizaci transportních proteinů do těchto mikrodomén a roli, kterou mikrodomény hrají v regulaci jejich aktivity.

2. Mikrodomény plasmatické membrány

Plasmatická membrána (PM) představuje dvourozměrnou fluidní mozaiku (Singer & Nicolson, 1972), která slouží jako rozhraní mezi buňkou a jejím okolím a je složena z lipidů, sterolů, proteinů, glykoproteinů a glykolipidů. Proteiny a lipidy nejsou homogenně rozprostřené podél plasmatické membrány, místo toho formují specifické mikrodomény, dříve označované jako «lipidové rafty» (Simons & Ikonen, 1997). Mikrodomény konají v buňce řadu důležitých funkcí, jako je například organizace membrány, transport a segregace membránových proteinů (Léon & Teis, 2018), zajištění homeostáze buňky. Mají vliv na buněčnou signalizaci (Simons & Toomre, 2000), polarizaci buňky a mohou být zapojené do virulence patogenních organismů a imunitních procesů (Rella et al., 2015).

2.1 Plasmatická membrána kvasinek a savčích buněk

Lipidy PM jsou rozloženy nerovnoměrně: na vnitřní straně dvojvrstvy jednobuněčného eukaryotního organismu kvasinky *S. cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*) jsou lokalizovány hlavně fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylinositol (PI) a fosfatidylserin (PS), zatímco sfingolipidy jsou hojnější ve vnější vrstvě membrány (Van Der Rest et al., 1995). Podobné rozložení lze pozorovat u savčích erytrocytů (Lorent et al., 2020). Na rozdíl od PM savčí buňky, kde cholesterol hraje roli hlavní steroidní látky (Langesq et al., 1989), PM kvasinek obsahuje ergosterol (Zinser et al., 1991). Prostřednictvím interakce mezi steroly a sfingolipidy vznikají tzv. uspořádané («liquid ordered») fázové domény membrány (Hjort Ipsen et al., 1987; J. Wang et al., 2004; Xu et al., 2001), které jsou separovány od neuspořádaných («liquid disordered») částí membrány, tvořených převážně fosfolipidy. Uspořádané domény jsou podstatnými pro formování lipidových raftů (Simons & Vaz, 2004).

Membránové proteiny podle lokalizace ve dvojvrstvě lze rozdělit na integrální a periferní. Integrální proteiny PM se lokalizují do mnoha koexistujících domén, které se částečně překrývají (Spira et al., 2012). Typické proteiny nacházející se v PM jsou například transportéry (permeázy, kanály, ATPázy), proteiny pro transmembránovou signální transdukcí, enzymy a receptory. Vzhledem k vícebuněčné organizaci se savčí buňky liší od kvasinek větší diverzitou a specializací membránových proteinů. Ale i přesto kvasinky sdílejí s mnohobuněčnými eukaryoty velké množství homologních proteinů a genů. Proto kvasinka *S. cerevisiae* je dobrým modelovým organismem pro studium buněčných procesů probíhajících i v mnohobuněčných eukaryotech, včetně člověka (Fujita et al., 2003; Laurent et al., 2016).

Na rozdíl od savčích buněk, buňky *S. cerevisiae* jsou obklopené buněčnou stěnou, tvořenou β -1,3-glukanem, β -1,6-glukanem, manoproteiny a chitinem (Mazán et al., 2006). Zajímavostí je, že degradace buněčné stěny nepřímou vede k shlukování proteinů PM (Spira et al., 2012).

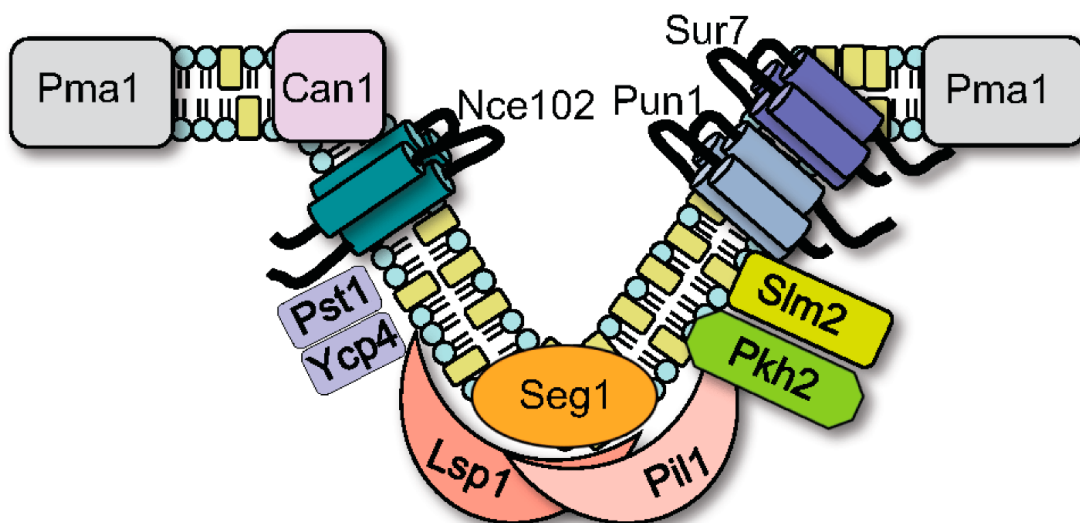
2.2 Charakteristika mikrodomén

Pro plnění svých fyziologických funkcí PM je laterálně organizována do různých mikrodomén lišících se svými biofyzikálními vlastnostmi a složením (Athanasopoulos et al., 2019; Frederick R Maxfield, 2002; Simons & Ikonen, 1997). Plasmatická membrána se organizuje do mozaiky (patchwork) tvořené četnými separovanými doménami. V těchto částečně překrývajících se doménách jsou uloženy membránové proteiny, které jsou buď lokalizované do malých shluků nebo tvoří «network-like patterns» (Spira et al., 2012). Podstatou membránové mozaiky je kombinace velkého množství silných a slabých interakcí mezi lipidy a proteiny (Mueller et al., 2012). Na rozdíl od savčích buněk mají kvasinky velmi pomalou difuzi lipidů (Greenberg & Axelrod, 1993) a proteinů (Valdez-Taubas & Pelham, 2003) v PM, proto mikrodomény v PM kvasinek jsou větší než v PM živočišných buněk. Je to jeden z důvodů proč kvasinky jsou vhodným modelovým organismem pro studium mikrodomén.

2.3 Typy mikrodomén a jejich složení

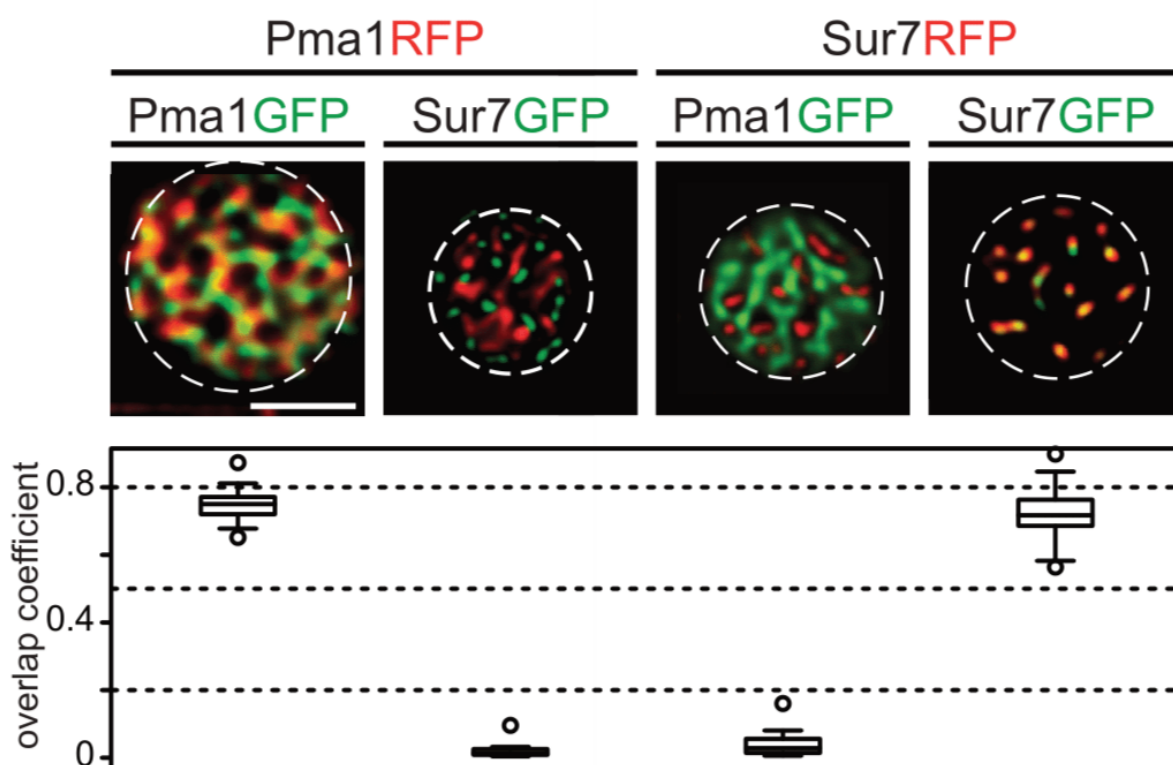
Nejprozkoumanějším typem mikrodomén *S. cerevisiae* je «membrane compartment of Can1» neboli MCC/eisosom (Obr. 1). Již v roce 2003 pomocí označení fluorescentním proteinem byly vizualizovány shluky argininové permeázy Can1, které vykazovaly přerušovanou distribuci v PM a byly asociované s lipidovými rafty (Malinska et al., 2003). MCC mají charakteristický tvar brázdovitých invaginací (Strádalová et al., 2009) dlouhých cca 200-300 nm, širokých 50 nm a 50 nm hlubokých. MCC představuje mikrodoménu PM obsahující integrální membránové proteiny, zatímco eisosom je komplex perifericky asociovaných cytosolických proteinů, které stabilizují brázdy PM. MCC/eisosomy jsou imobilní, jsou odlišné od míst endocytózy a proteiny nacházející se v této mikrodoméně jsou chráněny před degradací a nemohou volně difundovat do zbytku PM (Grossmann et al., 2008; Walther et al., 2006). Eisosom je tvořen paralogními proteiny Pil1 a Lsp1, které náleží do superrodiny proteinů BAR (Olivera-Couto et al., 2011). Proteiny obsahující BAR (Bin/amphiphysin/Rvs) doménu jsou známy svou schopností deformovat membránu (Peter et al., 2004). Organizace MCC závisí na integritě eisosomu: buňkám postrádajícím protein Pil1 (*pil1Δ*) chybí brázdovitá invaginace membrány (Strádalová et al., 2009) a všechny markery MCC u těchto buněk jsou rozprostřené homogenně podél PM (Grossmann et al., 2008). Absence Lsp1 za laboratorních podmínek neovlivňuje morfologii MCC/eisosomů (Walther et al., 2006), ale při

hyperosmostickém šoku eisosomy mohou být tvořeny pouze Lsp1 dokonce i bez Pil1 (Vesela et al., 2023).



Obr. 1: Zjednodušený model MCC/eisosomu. Proteiny Pil1 a Lsp1 tvoří žlábek PM, Seg1 a kináza Pkh2 reguluje stabilitu eisosomu, Slm2 může vystupovat z mikrodomény za stresových podmínek, Pst1 a Ycp4 slouží k odpovědi na oxidativní stres, Nce102 je negativním regulátorem Pkh2, Pun1 je senzorem poškození buněčné stěny, Sur7 pravděpodobně reguluje úroveň $PI_{4,5}P_2$, argininová permeáza Can1 je jedním z pěti symportérů (nejsou zobrazeny) přítomných v MCC/eisosomech (Lanze et al., 2020) (převzato a upraveno z (Foderaro et al., 2017))

Mikrodoména nazývaná se «membrane compartment of Pma1» (MCP) je odlišnou mikrodoménou od MCC (Malinska et al., 2003). Experimentálně stanovené koeficienty překrytí Pma1 a Sur7 (marker MCC) jsou velmi nízké (Obr. 2), což ukazuje že MCP a MCC jsou prostorově oddělené domény PM (Spira et al., 2012). Pma1 je esenciální protonová ATPáza typu P, která je zodpovědná za homeostázi cytosolického pH a tvorbu gradientu H^+ přes PM, který využívají sekundární transportní systémy (Serrano et al., 1986; Young et al., 2024). MCP vykazuje síťovou morfologii a pokrývá významnou část PM. Superrozlišovací mikroskopie odhalila, že MCP se pravděpodobně skládá z izolovaných ohnisek (Malinsky & Opekarová, 2016). Zajímavé je, že koncentrace fosfolipidů a sterolů je stejná pro MCC a MCP, zatímco MCP má větší obsah sfingolidipů (van 't Klooster et al., 2020). Příčinou je to, že sfingolipidy obsahující zbytek mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem jsou důležité pro správný transport Pma1 do PM a formování MCP domén (Gaigg et al., 2006).

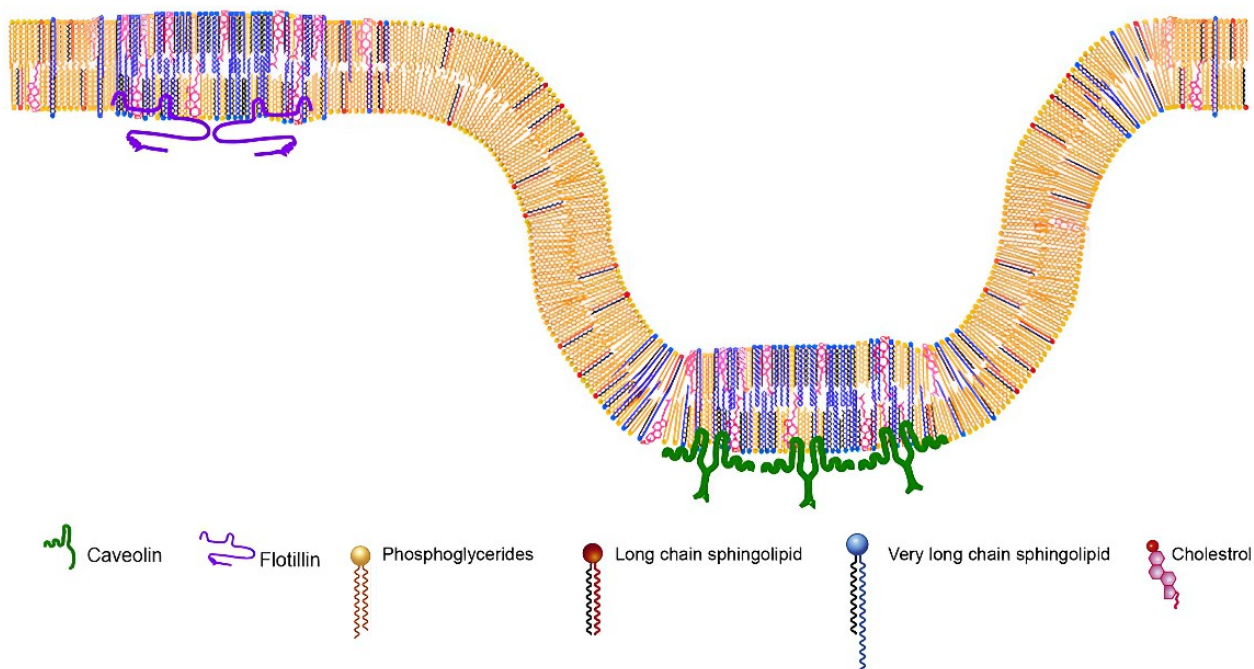


Obr. 2: Experimentálně stanovené hodnoty koeficientů překrytí Pma1 (marker MCP) a Sur7 (marker MCC). Předem zkonstruované kvasinkové kmeny exprimovaly Pma1 a Sur7 označené fluorescenčními značkami (GFP nebo RFP). Obrázky vytvořené pomocí TIRMF (total internal reflection fluorescence microscope) byly upraveny a byl z nich vypočten koeficient překrytí. Kvůli tomu, že Sur7 a Pma1 patří různým mikrodoménám jejich koeficient překrytí je <0.2 (převzato a upraveno z (Spira et al., 2012))

Důležitými regulátory fyziologie buňky jsou kinázy TOR (target of rapamycin), které se shromažďují do dvou multiproteinových komplexů: TORC1 a TORC2. Zatímco TORC1 se nachází pouze v membráně vakuoly, TORC2 definuje zvláštní typ mikrodomén PM zvaný MCT. Tento typ domén představuje velmi dynamická ohniska, která se v průběhu času mohou pohybovat, fúzovat a oddělovat se, objevovat se a mizet (Berchtold & Walther, 2009). MCT sousedí, ale nikdy se nepřekrývají s eisosomy. Integritu MCT negativně ovlivňuje narušení MCC/eisosomu, zatímco sestavení MCC/eisosomu nezávisí na přítomnosti MCT (Bartlett et al., 2015).

V živočišných buňkách jsou dobře charakterizovaným typem membránových mikrodomén tzv. lipidové rafty (Simons & Ikonen, 1997), které jsou v odborné literatuře dosud běžně takto označovány (Levental et al., 2020). Jsou to submikroskopické membránové domény bohaté na

sfingomyelin, cholesterol a GPI-vázané proteiny. Jejich vlastnostmi jsou rezistence vůči detergentům, rigidní struktura ve srovnání s okolní membránou a asociace s cytoskeletem. Tvorba a stabilita lipidových raftů je zajištěna specifickými lipid-lipid, lipid-protein a protein-protein interakcemi (Pralle et al., 2000; Simons & Gerl, 2010). Lipidové rafty jsou obohaceny o lipidy, které obsahují dlouhé satureované alifatické řetězce. Cholesterol v PM má vyšší afinitu k saturevaným lipidům s velkými hlavičkami a nižší afinitu k polynenasyceným lipidům (Engberg et al., 2016). Experimentálně bylo prokázáno, že cholesterol preferenčně interaguje s konkrétními typy fosfolipidů (PL): satureované molekuly fosfatidylcholinu (PC) mají významně nižší afinitu než molekuly sfingomyelinu (SM), které na základě funkčních skupin jsou schopny tvořit větší množství intra- a intermolekulárních vodíkových vazeb než PC (Lönnfors et al., 2011). Velikost a složení raftu závisí na prostředí buněčné membrány (Simons & Sampaio, 2011). Důležitým aspektem fungování raftů je dynamická regulace jejich složení. Třeba posttranslační modifikace proteinů může stimulovat nebo inhibovat afinitu lipidových raftů (Levental & Veatch, 2016). Charakteristickým případem je palmitoylace, která je nezbytná pro lokalizaci některých integrálních a periferních proteinů do lipidových raftů (Levental et al., 2010).



Obr. 3: Model planárního lipidového raftu (vlevo) a miskovité kaveoly (vpravo). Zatímco nejvíce zastoupeným integrálním proteinem planárních raftů je flotillin (Rajendran et al., 2007; Salzer & Prohaska, 2001), hlavním strukturním proteinem kaveol je kaveolin (CAV-1) (Parton et al., 2006), který vytváří invaginace v PM. (převzato z (Garić et al., 2019))

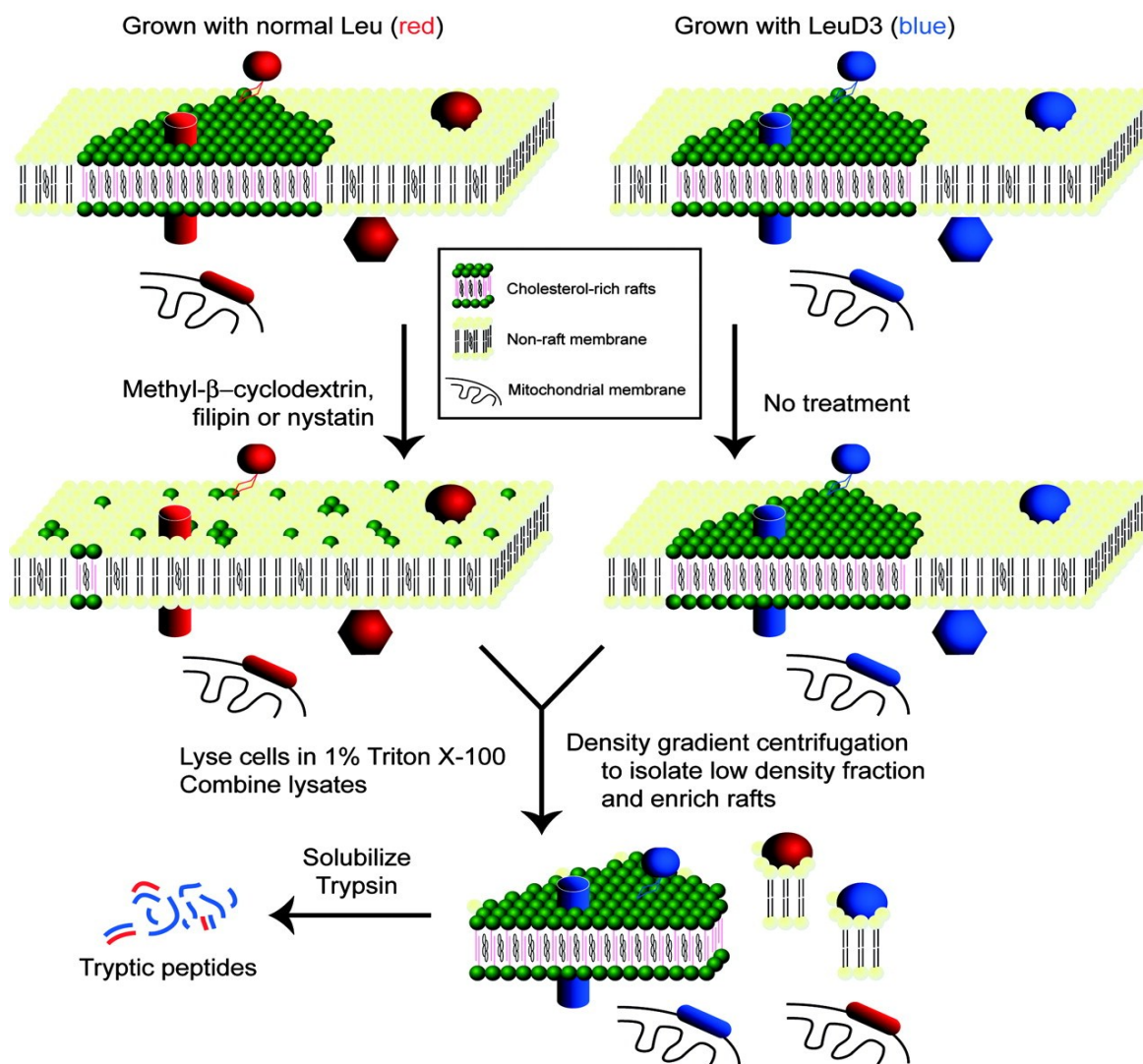
Kaveoly jsou specifickým typem lipidových raftů, které, na rozdíl od planárních raftů (Obr. 3), mají typický morfologický znak – tvoří malé (60–80 nm) invaginace PM ve tvaru misky (Palade, 1953). Tento typ mikrodomén je přítomen ve většině typů savčích buněk (Trushina et al., 2006). Hlavními proteinovými složkami kaveol jsou kaveoliny a kaviny. Kaveoliny jsou esenciálními molekulami pro tvorbu invaginací (Parton et al., 2006). Sestavení kaveoly zahrnuje tranzit kaveolinu 1 (CAV-1) přes sekreční dráhu a několik oligomerizačních kroků. Na konci formace mikrodomény kaviny, které jsou na rozdíl od kaveolinů periferními proteiny, stabilizují tvar kaveoly (Hayer et al., 2010). Oligomerizace kaveolinu a formování nové kaveoly probíhá v raftových doménách obohacených cholesterolem. Kaveoliny jsou vázány na molekuly cholesterolu (Murata et al., 1995). Deplece cholesterolu způsobí absenci kaveol v membráně, a tím pádem dochází k narušení procesů buněčné signalizace (Dreja et al., 2002; Parpal et al., 2001). Pomocí ultracentrifugace v hustotním gradientu (DGUC) byly rozlišeny tři subtypy kaveol: VHD (very high density), HD (high density) a LD (low density). Společným pro všechny subtypy je přítomnost kaveolinů, avšak subtypy kaveol se liší hustotou, přímostí nebo absencí některých membránových proteinů a koncentrací cholesterolu (Örtengren et al., 2006).

2.4 Experimentální přístupy ke zkoumání mikrodomén PM

Lipidové rafty byly prvním typem mikrodomén, které byly aktivně studovány (Simons & Ikonen, 1997). Rafty je velice obtížné studovat *in vivo* kvůli jejich vysoce dynamickému charakteru, malému rozměru a krátké době přetrvávání (Levental & Veatch, 2016). Proto výzkum těchto mikrodomén je v podstatě založen na membránových modelech a na izolování lipidových raftů z buněčné PM. Široce využívanou metodou pro jejich izolaci a analýzu je solubilizace pomocí chladných neionických detergentů (nejčastěji Triton X-100 při 4°C). Při této metodě vzniká fáze odolná k detergentům tzv. «detergent-resistant membrane», neboli DRM, která je bohatá na cholesterol, sfingolipidy a některé membránové proteiny. Hlavní problém této metody je však v tom, že DRM byla chybně ztotožněna s lipidovými rafty, které jsou tvořeny «liquid ordered» fází membrány, bohatou na cholesterol a sfingolipidy (Munro, 2003). Složení izolované DRM je odlišné od nativního složení živé buňky z několika příčin (Lichtenberg et al., 2005). Například závislost fázového chování lipidů je velmi senzitivní, co se týče teploty nebo přítomnosti detergentů. Proto snížení teploty membrány, stejně jako interakce detergentů a membrány, může indukovat alteraci organizace PM (Levental et al., 2020).

Částečně překonat problém kontaminace DRM neraftovými proteiny pomohla aplikace metody kvantitativní proteomiky zvané SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture) (Ong et al., 2002) v kombinaci s látkou narušující cholesterol. Metoda spočívá v tom, že polovina buněk roste v kultivačním mediu s přesně daným nízkým obsahem izotopově značené

esenciální aminokyseliny. Ve výsledku každý proteinový řetězec v buňkách dané kultury pak obsahuje izotopovou značku. U druhé neoznačené poloviny buněk použitím M β CD (metyl- β -cyclodextrinu) je indukována deplece cholesterolu. Kvůli tomu že cholesterol je esenciální pro integritu membránových raftů, buňky bez cholesterolu postrádají rafty (Kabouridis et al., 2000). Pak jsou obě populace buněk smíchány a pomocí metody solubilizace popsané výše jsou izolovány fragmenty DRM. Proteiny, které byly součástí raftů, vykazují vyšší těžké:lehké poměry SILAC, zatímco u ostatních proteinů tento poměr je blízko 1 (Foster et al., 2003; Zheng & Foster, 2009).



Obr. 4: Schéma izolace fragmentů DRM a membránových proteinů. U buněk u nichž proteiny nebyly označené izotopem (červeně) je indukována deplece lipidových raftů pomocí aplikace látky narušující cholesterol. U buněk rostoucích na mediu s izotopově značenou aminokyselinou jsou označeny všechny proteiny (modře). Buňky jsou smíchány dohromady a použitím detergentů jsou izolovány frakce DRM, ze kterých pak pomocí trypsinu jsou připraveny peptidy. Konkrétní peptid je součástí lipidových raftů, pokud má vysoký poměr označených:neoznačených molekul (převzato z (Foster et al., 2003))

U kvasinek byly mikrodomény MCC a MCP objeveny metodou značení proteinových markerů fluorescenční značkou a následnou vizualizací. Pomocí transformací integračních kazet obsahujících *GFP* (green fluorescent protein) nebo *RFP* (red fluorescent protein) byly zkonstruovány kmeny *S. cerevisiae* s fluorescenčně značenými markerovými proteiny MCC a MCP. Pak pomocí laseru nastaveného na vlnovou délku excitačního maxima GFP nebo RFP byla vizualizována lokalizace označených proteinů pomocí konfokálního mikroskopu. Následně stejnou metodou byla objevena řada dalších proteinů, které jsou součástí příslušných mikrodomén (Malínská et al., 2003; Malínská et al., 2004). V současnosti je k dispozici plejáda různých fluorescenčních proteinů jako například mCherry a mRuby (červené fluorescenční proteiny), YFP (yellow fluorescent protein) (Luo et al., 2008) či CFP (cyan fluorescent protein) (O’Connell & Tamkun, 2005; Rosa et al., 2023; L. Wang et al., 2015). Příklady fluorescenčních proteinů používaných v současné době pro studium mikrodomén jsou uvedeny v Tab. 1. Metoda značení fluorescenční značkou se využívá nejen ke studiu mikrodomén kvasinkových buněk, ale také mikrodomén rostlinných např. (L. Wang et al., 2015) a živočišných buněk např. (O’Connell & Tamkun, 2005; Rosa et al., 2023).

Název	λ_{ex}	λ_{em}	Jas	Doba maturace [min]
ECFP	434	477	13,0	49
EGFP	488	507	33,5	25
mNeonGreen	506	517	92,8	10
Hyperfolder YFP	514	529	71,7	21
mRuby	558	605	39,2	168
mRFP1	584	607	12,5	60
mCherry	587	610	15,8	15

Tab. 1: Srovnání excitačních (λ_{ex}) a emisních (λ_{em}) vlnových délek, jasů a doby maturace vybraných fluorescenčních proteinů. Data byla získána z online databáze FPbase (www.fpbases.org)

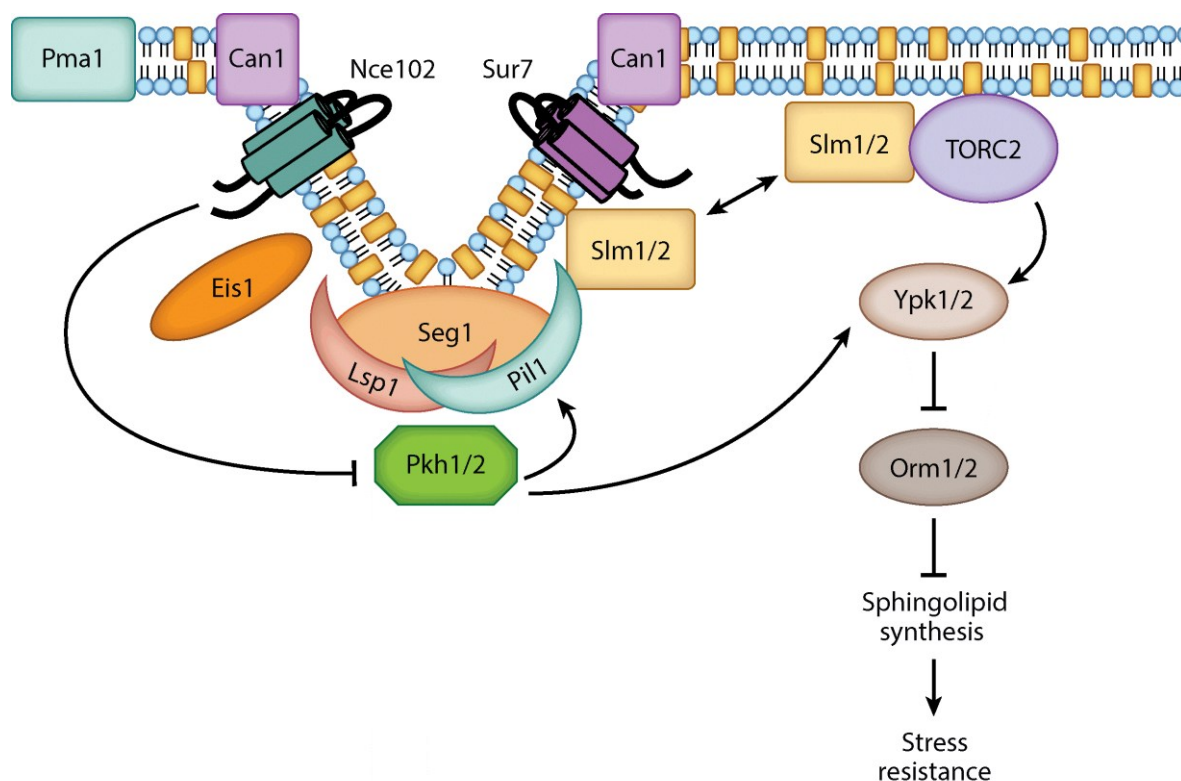
Další metoda pro pochopení funkcí mikrodomén je založena na indukci buněčného stresu a následné detekci změn ve struktuře mikrodomén vyvolaných stresovými podmínkami. Jako příklad může sloužit analýza mechanosenzitivní funkce kaveol. HeLa buňky byly vystavené hypoosmotickému šoku a protažení membrány. Strukturní protein kaveol CAV-1 označený GFP značkou byl pak detekován pomocí FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) a TIRF (total internal reflection fluorescence microscopy) (Sinha et al., 2011). Za stresových podmínek se kaveoly vyrovnávají, čímž poskytují PM dodatečnou plochu (Sinha et al., 2011). Strukturní

proteiny přitom vystupují z mikrodomény a zvýšený obsah proteinů CAV-1 volně difundujících v membráně lze pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu (Sinha et al., 2011). Tímto způsobem byla prokázána hypotéza, že kaveoly slouží jako membránové rezervoáry, které přispívají k regulaci mechanického napětí membrány (Sens & Turner, 2006).

2.5 Formování a regulace mikrodomén

Pro zajištění homeostáze buňka reguluje tvorbu, složení, lokalizaci, velikost a tvar mikrodomén.

Eisosomy jsou cytoplasmatické proteinové komplexy lokalizované ve specializovaných doménách MCC v PM kvasinek (Obr. 1) (Moreira et al., 2009). Eisosomy nevznikají dělením již existujících domén, místo toho se formují *de novo* v membránách pupenů, které dosáhly určité kritické velikosti. Množství proteinu Pil1 hraje hlavní roli v regulaci velikosti a umístění eisosomu (Moreira et al., 2009). Snížení množství proteinu Pil1 vede k redukci počtu eisosomů v membráně beze změny jejich délky, což ukazuje, že MCC/eisosom musí mít určitou minimální velikost. Nadbytek tohoto proteinu stimuluje růst eisosomů, zatímco jejich hustota v PM zůstává stejná, což svědčí o omezeném počtu nukleárních míst (Moreira et al., 2009). Zatímco poloha MCC/eisosomu je statická, hloubka domény se může měnit. Například ztráta protonového gradientu přes PM způsobuje nabobtnání buňky, což zvyšuje membránové napětí. V důsledku se eisosomy zplošťují a transportéry nutrientů (např. Can1) opouštějí MCC a podléhají endocytóze (Appadurai et al., 2020). Na regulaci sestavení a rozložení MCC/eisosomu se podílejí některé membránové proteiny patřící do této mikrodomény a některé lipidy v PM. Bylo prokázáno, že Pil1/Lsp1 samy o sobě mohou formovat tubuly v liposomech *in vitro* (Karotki et al., 2011). V případě formování eisosomu *in vivo* invaginace membrány má tvar půlválce (Karotki et al., 2011). Formování domény začíná navázáním proteinu Seg1, který ohýbá membránu a tím připravuje místo pro vazbu Pil1/Lsp1 (Moreira et al., 2012). Lokalizace proteinu Nce102 do MCC závisí na přítomnosti sfingolipidů (Obr. 5) (Fröhlich et al., 2009). Sestavení MCC/eisosomu *in vivo* závisí také na přítomnosti PI(4,5)P₂ v PM (Karotki et al., 2011).



Obr. 5: Interakce mikrodomén MCC a MCT. Při absenci sfingolipidů vystupuje Nce102 z MCC a tím přestává inhibovat kinázy Pkh1/2, které jsou součástí mikrodomény (Fröhlich et al., 2009). Pkh1/2 v tomto případě hyperfosforyluje Pil1 a dochází k rozložení MCC/eisosomu (Walther et al., 2007). Protein Slm1/2 opouští MCC/eisosom a přesouvá se do MCT a kde aktivuje komplex Tor2 (Niles et al., 2014). Aktivovaný TORC2 fosforyluje kinázu Ypk1, která pak fosforyluje a deaktivuje proteiny Orm, čímž usnadňuje syntézu fosfolipidů pro obnovení PM (Berchtold et al., 2012). (převzato a upraveno z (Douglas & Konopka, 2014))

Vznik MCP začíná tím, že monomery H^+ -ATPázy Pma1 se sestavují do hexamerů v membráně ER (Young et al., 2024) (viz. (Obr. 6b), kap. 3.1), pro jejichž formování jsou esenciální sfingolipidy (Lee et al., 2002). Hexamery Pma1 pak pomocí COPII váčků obsahujících proteiny Exp1 nebo Lst1 jsou transportovány do Golgiho aparátu (Obr. 6b) (Geva et al., 2017). Pro transport do PM je zapotřebí asociace oligomerizace Pma1, která je závislá na přítomnosti sfingolipidů obsahujících zbytky mastných kyselin s velmi dlouhým (26C) acylovým řetězcem (Gaigg et al., 2005). Kromě toho je pro transport hexamerů Pma1 do PM důležitá asociace transportérů s lipidovými rafty v Golgiho aparátu (Obr. 6b) (Bagnat et al., 2001). Z toho je vidět že syntéza Pma1, a proto i MCP, je regulována syntézou sfingolipidů. Membránový kompartment Pma1 je stabilní v čase. Formování a stabilita MCP je nezávislá na součástích cytoskeletu

(Malinska et al., 2004). Na rozdíl od Can1, Pma1 je lokalizován pouze v MCP a nemůže difundovat do zbytku PM (Bianchi et al., 2018).

Lokalizace TORC2 do PM je esenciální pro životaschopnost kvasinkové buňky (Berchtold & Walther, 2009). Pro správnou lokalizaci a/nebo funkci TORC2 je nezbytný C-konec proteinu Avo1 (Berchtold & Walther, 2009). U kvasinek MCT představují velmi pohyblivé útvary. Každá mikrodoména je složená z několika proteinových komplexů Tor2 (Athanasopoulos et al., 2019). TORC2 obsahuje šest podjednotek sestavených do 1,4 MDa romboedru (Karuppasamy et al., 2017). O regulaci MCT a TORC2 je zatím známo velmi málo. Důležitým mechanismem regulace TOR aktivity může být oligomerizace TORC2 (Wullschlegel et al., 2005). MCT je regulovaná v závislosti na růstových podmínkách: membránový stres, vyvolaný buď protažením membrány nebo inhibicí syntézy sfingolipidů, způsobuje přemístění Slm1/2 z eisosomů do MCT, což aktivuje TORC2 (Obr. 5) (Niles et al., 2014).

Jak je zmíněno v kapitole 2.3, membrána savčí buňky obsahuje stovky lipidových subtypů, z nichž některé preferenčně mezi sebou interagují, což způsobuje heterogenní stav dvojvrstvy. Formování a regulace velice dynamických lipidových raftů je založeno na biofyzikálních vlastnostech PM. Různé typy PL umožňují segregaci PM živé buňky do dvou kapalných fází: obohacené nenasycenými lipidy a tedy více tekuté «liquid disordered» (Ld) fáze, a bohaté na cholesterol a sycené lipidy, tj. méně tekuté «liquid ordered» (Lo) fáze. Lo fáze je v živých buňkách často ztotožňována s lipidovými rafty. Z výše napsaného vyplývá, že regulace tvorby lipidových raftů je především založena na změnách lipidové kompozice PM. Kvůli obtížnosti, co se týče zkoumání raftů v živé buňce, regulace těchto mikrodomén je studována na membránových modelech. Například pokusy *in vitro* na unilamelárních a gigantických liposomech ukázaly, že ztráta asymetrie membránové dvojvrstvy a snížení teploty může indukovat syntézu lipidových raftů (Kaiser et al., 2009; St. Clair et al., 2020). Ale otázka relevance zjištěných informací pro živé buňky je diskutabilní.

Tvorba kaveoly v membráně živočišných buněk začíná syntézou a oligomerizací proteinu CAV-1 v ER a následným transportem oligomerů přes COPII váčky do Golgiho aparátu (Hayer et al., 2010). Úroveň cholesterolu jednak reguluje syntézu CAV-1 na úrovni transkripce (Hailstones et al., 1998) a zároveň reguluje výstup oligomerů CAV-1 z Golgiho aparátu (Pol et al., 2005). Formování invaginace probíhá v důsledku interakce oblastí PM obohacených CAV-1 s kaviny (Parton et al., 2021). Přičemž kaviny jsou esenciálními pro syntézu kaveol, jejich maturaci a stabilizaci (Hill et al., 2008; Liu & Pilch, 2008). Protahování membrány indukuje reverzibilní zploštění kaveol (Gervásio et al., 2011). Důležitou roli v organizaci kaveolových invaginací hraje cytoskeleton. Nadbytek kortikálních aktinových filamentů brání formování invaginací PM

(Echarri & Del Pozo, 2015). Disrupce aktinových vláken pomocí cytochalasinu D nebo jejich depolymerizace pomocí latrunculinu A podporuje formování jednotlivých kaveol a tzv. kaveolových rozet. Depolymerizace mikrotubulů pomocí nocodazolu až dvakrát zvyšuje četnost kaveol v PM (Mundy et al., 2002).

3. Transportéry asociované s mikrodoménami

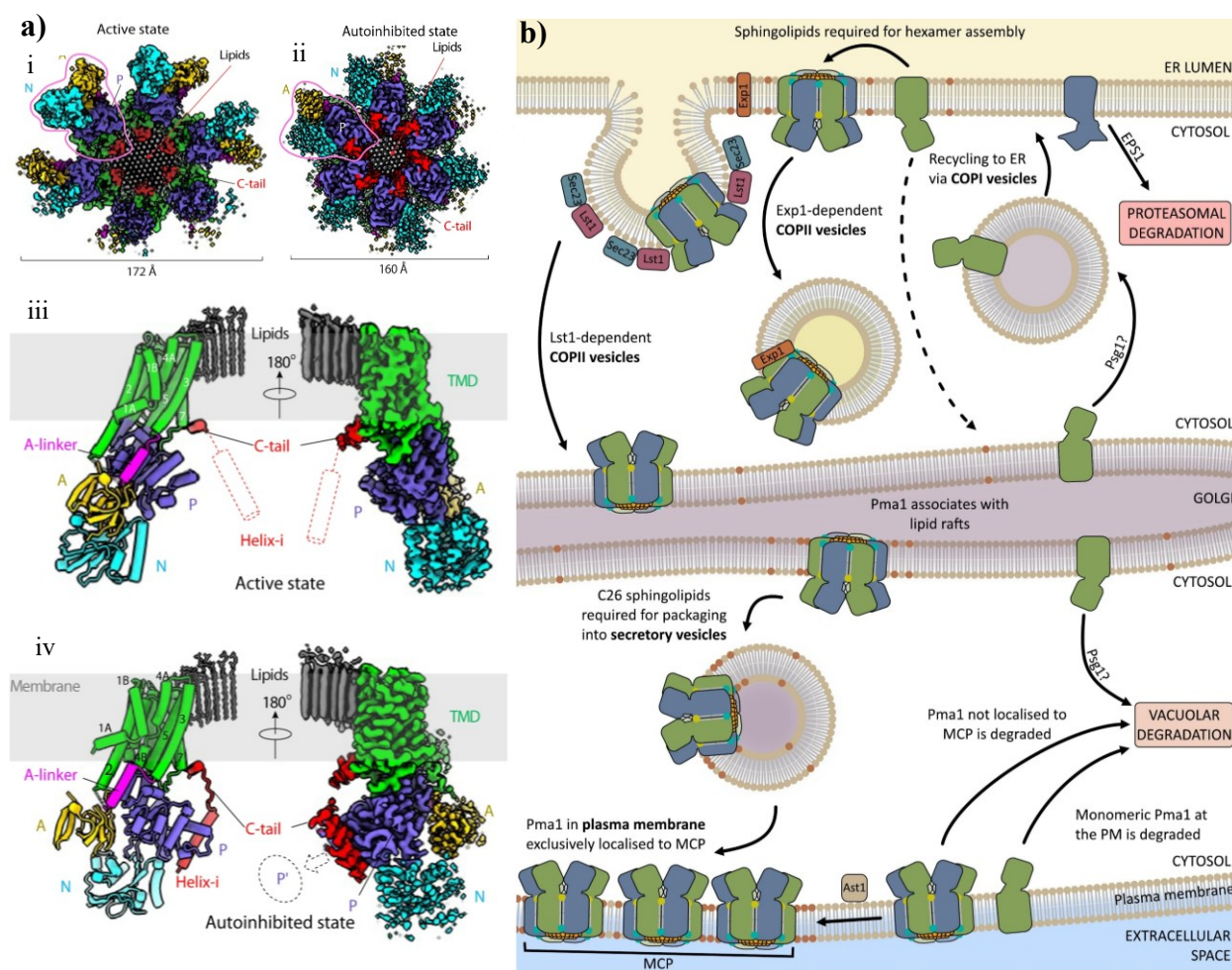
Transportéry živin a iontů jsou klíčové proteiny pro udržování homeostáze živé buňky. V závislosti na typu konkrétního transportéru mohou plnit různé funkce: udržování stabilního vnitrobuněčného pH, regulace výměny molekul a iontů mezi buňkou a okolím, zachování optimální koncentrace živin uvnitř buňky, interakce s okolím a odpovědi buňky na stresové podmínky. Pro efektivní plnění svých funkcí jsou transportéry často lokalizovány do mikrodomén, které tvoří specifické prostředí PM usnadňující regulaci přenašečů, čímž zvyšují efektivitu membránového transportu (Spira et al., 2012).

3.1 Typy transportérů a jejich lokalizace v mikrodoménách PM

Dosud nebyla odhalena přítomnost transportérů v MCT, zatímco MCC/eisosomy obsahují hlavně transportéry rodiny APC (amino acid-polyamine-organocation family). Výjimkou je uracilová permeáza Fur4, patřící k NCS1 rodině (nucleobase:cation symporter-1 family) (Lanze et al., 2020; Malinska et al., 2004). Objevení a pojmenování MCC bylo spojeno s pozorováním klastrů argininového transportérů Can1 (Malinska et al., 2003). Pomocí fluorescenčního značení a měření kolokalizace proteinu se značeným markerem mikrodomény byly nalezeny další transportéry MCC/eisosomů: Uracil- H^+ symportér Fur4, Trp nebo Tyr- H^+ symportér Tat2, Lys- H^+ symportér Lyp1 a Met- H^+ symportér Mup1 (Grossmann et al., 2007; Malinska et al., 2004; Moharir et al., 2018). Stejnou metodou bylo odhaleno, že Pma1 a Can1 tvoří prostorově oddělené kompartmenty (Malinska et al., 2003). Aktivita všech permeáz eisosomu je závislá na protonovém gradientu, který vytváří Pma1. I přestože kvasinka *S. cerevisiae* je schopná syntézy všech L-aminokyselin potřebných pro syntézu proteinů (Ljungdahl & Daignan-Fornier, 2012), kvasinková buňka stále potřebuje transportéry APC. Transport z okolí je ve srovnání se syntézou *de novo* energeticky výhodnější a rychlejší možnost, což umožňuje kvasinkám šetřit energii v prostředí bohatém na aminokyseliny.

Pma1 (plasma membrane ATPase) je esenciálním a nejpočetnějším proteinem PM kvasinkové buňky, tvoří 20% proteinového obsahu membrány (Serrano et al., 1986). Je to tzv. housekeeping ATPáza typu P3A, která pumpuje H^+ ven a tím udržuje stálé intracelulární pH a vytváří elektrochemický protonový gradient, jehož využívají sekundární transportéry pro aktivní

transport živin. Aminokyselinová sekvence Pma1 obsahuje úseky, které jsou homologní jak k bakteriální K^+ -ATPáze, tak k Na^+/K^+ - a Ca^{2+} -ATPázám živočišné buňky (Serrano et al., 1986). Pma1 je asociována s lipidovými rafty, což usnadňuje transport ATPázy na povrch buňky (Obr. 6b) (Bagnat et al., 2001). Pomocí kryoelektronové mikroskopie (cryo-EM) s vysokým rozlišením bylo objeveno, že Pma1 tvoří hexamér, který uvnitř obsahuje uspořádané lipidy (Obr. 6a) (Zhao et al., 2021). Aktivita Pma1 je regulována autoinhibicí, což napomáhá buňce šetřit energii (Pma1 konzumuje minimálně 20% celkového ATP buňky) (Cyert & Philpott, 2013). Autoinhibice spočívá v konformační změně R-domény C-konce Pma1 (Obr. 6a)), což omezuje čerpání protonů. K opětovné aktivaci dochází například při detekci glukózy: kinázy kvasinek fosforylují aminokyselinové zbytky Ser a Thr R-domény, dochází k návratu nativní konformace enzymu a tím k obnovení jeho aktivity (Heit et al., 2021).



Obr. 6: Model hexameru Pma1 vytvořený na základě kryoelektronové mikroskopie a transportní dráha Pma1 z ER do PM. a) i, ii Cryo-EM mapy hexameru Pma1 v aktivním a autoinhibičním stavu s lipidy uprostřed. iii, iv Atomární modely podjednotky Pma1 v aktivním a autoinhibičním stavu. Podstatou autoinhibice je navázání R-domény (helix-i) C-konce (červeně) na P-doménu (fialově) (převzato z (Zhao et al., 2021)) b) Sestavení Pma1 do hexamerů probíhá v

ER, odkud jsou proteiny pomocí COPII váčků transportovány do Golgiho aparátu. Po asociaci s lipidovými rafty jsou hexamery doručeny do PM, kde tvoří MCP (převzato z (Young et al., 2024))

V živočišných buňkách detekce transportérů v planárních lipidových raftech je obtížná, jelikož různé metody izolace mají různý proteinový obsah. V případě využití chladných detergentů, obsah proteinů závisí na konkrétní použité látce. Izolační metody bez použití detergentů mají také svou určitou úroveň selektivity (Klappe et al., 2009). Bylo získáno následující pořadí selektivity (od nejvyššího po nejnižší): Triton X-100 – detergent-free metody – Lubor WX (Klappe et al., 2009). Například DRM izolovaná z makrofágů pomocí Lubor WX obsahuje transportér ABCA1, který ale není přítomen v DRM izolované pomocí Triton X-100 (Drobnik et al., 2002). Avšak DRM izolovaná z fibroblastů pomocí Lubor WX neobsahuje ABCA1. To ukazuje, že nejen použití různých detergentů, ale i typ buněčné kultury má vliv na proteinový obsah lipidových raftů (Klappe et al., 2009). Tento transportér hraje důležitou roli v reverzním transportu cholesterolu: v periferních tkáních ABCA1 transportuje buněčný cholesterol a fosfolipidy do Apolipoproteinu A1 a tím tvoří HDL (Oram & Lawn, 2001). Experimenty ukázaly, že P-glykoprotein (Pgp), protein patřící stejně jako ABCA1 do rodiny ABC, zprostředkovává aktivní přesun cholesterolu z cytosolické do exoplasmatické vrstvy PM, což může v kooperaci s aktivitou ABCA1 usnadňovat výstup cholesterolu z buňky (Garrigues et al., 2002). Kromě toho se předpokládá, že redistribuce cholesterolu hraje roli ve stabilizaci lipidových raftů (Garrigues et al., 2002). Pgp, kódovaný genem MDR1 (multidrug resistance protein 1), se podílí na transportu široké škály různých hydrofobních nebo amfifilních molekul, včetně mnoha cytotoxických xenobiotik (Gottesman et al., 1996). Závislost aktivity Pgp na přítomnosti cholesterolu a kolokalizace Pgp s markery lipidových raftů v epiteliálních buňkách tlustého střeva svědčí o asociaci Pgp s tímto typem mikrodomén (Ehehalt et al., 2006). Některé transportéry z rodiny EAAT (excitatory amino acid transporters) jsou lokalizovány v lipidových raftech astrocytů a neuronů (Butchbach et al., 2004). Jejich funkcí je vychytávání glutamátu, hlavního excitačního neurotransmiteru, ze synaptické štěrby, aby bylo zabráněno nadměrné excitaci neuronů (Amara & Fontana, 2002). Pro ukázaní přítomnosti transportérů EAA1-4 v mikrodoménách bylo použito několik metod včetně deplece cholesterolu a izolace DRM pomocí různých detergentů (Butchbach et al., 2004). V primárních neuronech mozku je s lipidovými rafty asociován transportér GLYT2, jehož funkcí je vychytávání molekul glycinu ze synaptické štěrby (Núñez et al., 2008). V somatických výbězcích ciliárních neuronů je asociace $\alpha 7$ nAChR ($\alpha 7$ -subunit nicotinic acetylcholine receptor) s lipidovými rafty zásadní pro udržování a prostorové uspořádání receptorů (Brusé et al., 2001). Deplece cholesterolu způsobuje fragmentaci velkých klastrů $\alpha 7$ nACh receptoru do mikroklastrů rozptýlených po celém výbězku (Brusé et al., 2001).

Kaveoly jsou důležitými mikrodomény pro transport mastných kyselin a glukózy. Hlavní proteinový komponent kaveol CAV-1 má schopnost s velkou afinitou saturačně vázat mastné kyseliny, což je podstatou pro transport a uložení mastných kyselin v buňce (Trigatti et al., 1999). Postprandiální hladina mastných kyselin v krvi u myši postrádající CAV-1 (*cav-1Δ*) je dvakrát vyšší než u myši s funkčním CAV-1 (Razani et al., 2002). Kromě toho CAV-1 stabilizuje na povrchu buňky protein FAT/CD36 (fatty acid translocase) důležitý pro transport mastných kyselin s dlouhým řetězcem. U buněk postrádajících CAV-1 se nachází FAT/CD36 výlučně intracelulárně a příjem mastných kyselin je redukován na 61% (Ring et al., 2006). Bylo prokázáno, že specifickými místy pro příjem mastných kyselin s dlouhým řetězcem jsou HD (high density) kaveoly, jelikož obsahují transportní proteiny FATP1 a FATP4 (Örtengren et al., 2006). FATP1 a FATP4 jsou acyl-CoA ligázy přeměňující mastné kyseliny na acyl-CoA, který nemůže opustit buňku. Za nepřítomnosti inzulinu kaveoly slouží také jako zásobárny glukózového transportéru GLUT4 regulovaného inzulinem, což pomáhá regulovat úroveň glukózy (Ribon et al., 2001). Pomocí immunogold labelingu a transmisní elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že cca. 85% všech GLUT4 se nachází v kaveolách, přičemž inzulin, který indukuje výstup GLUT4 z kaveol, zvyšuje množství GLUT4 v PM mimo kaveoly jenom 2,2krát (Karlsson et al., 2002). Navíc bylo zjištěno, že deplece cholesterolu pomocí β -cyclodextrinu vyvolává destrukci kaveol a tím pádem se tukové buňky (adipocyty) stávají rezistentními k inzulinu (Parpal et al., 2001).

3.2 Jak mikrodomény regulují transportéry

Dosud bylo zjištěno, že transportéry jsou lokalizovány do mikrodomén z několika důvodů:

a) Stabilizace transportérů v MCC/eisosomu

Bylo prokázáno, že endocytóza z PM kvasinky probíhá mimo MCC/eisosomy (Grossmann et al., 2008). MCC/eisosomy slouží jako skladiště pro transportéry a díky svým biofyzikálním vlastnostem stabilizují transportéry v inaktivním stavu a brání vystupování transportérů do zbytku PM (Bianchi et al., 2018; Busto et al., 2018). Lokalizace a výstup transportéru z mikrodomény závisí na konformačním stavu transportéru (Busto et al., 2018). V přítomnosti substrátu transportér podléhá konformační změně, což vede k tomu, že transportní protein opouští mikrodoménu, difunduje do více fluidní části membrány a zahajuje importní aktivitu (Bianchi et al., 2018; Busto et al., 2018). V případě aminokyselinového transportéru Can1 bylo zjištěno, že změna konformace umožňuje navázání arrestin-related trafficking adaptoru (ART) na N-konec transportéru (Gournas et al., 2017). Poté protein podléhá ubikvitinaci pomocí ubikvitin ligázy Rsp5, což vede k endocytóze a degradaci transportéru (Gournas et al., 2017). APC transportéry musí být strukturně flexibilní pro zajištění importní aktivity, ale zároveň musí být chráněny před degradací (Moharir

et al., 2018). Přesáhnout tento problém pomáhají MCC/eisosomy: udržují transportéry v inaktivním stavu a zabraňují tak jejich nadbytečné degradaci a syntéze (Moharir et al., 2018).

b) Omezení počtu transportéru v eisosomech

MCC/eisosomy mají omezenou kapacitu pro transportéry: při nadměrné expresi permeázy pro uracil Fur4-GFP, se protein lokalizuje vně MCC/eisosomů (Moharir et al., 2018). Lze také pozorovat zesílení signálu ve vakuolách, což ukazuje, že vně mikrodomény transportér podléhá endocytóze (Moharir et al., 2018). Omezení počtu transportérů v MCC/eisosomech spolu s faktem, že transportéry APC přítomné v MCC/eisosomech využívají k importu substrátu protonový gradient (Bianchi et al., 2019), naznačuje úlohu MCC/eisosomů ve vyrovnávání exportu protonů pumpou Pma1 a importu protonů sekundárními transportéry (Moharir et al., 2018). Kromě toho příliš vysoká celulární koncentrace některých nutrientů, jako jsou aminokyseliny, může být pro buňku toxická (Kaur & Bachhawat, 2007; Watanabe et al., 2014), čemuž buňka brání omezením počtů transportérů v PM.

c) Odpověď buňky na změny podmínek

Při zvýšení extracelulárního pH a snížení protonového gradientu přes PM dochází k vystoupení APC transportérů z MCC/eisosomů a rychle endocytóze (Moharir et al., 2018). Redukce protonového gradientu také vede ke zvýšení aktivity Pma1, což má za následek pokles koncentrace buněčného ATP a fosforylace AMP-dependentní kinázy (AMPK). Zatímco přítomnost substrátu reguluje výstup z mikrodomény konkrétního transportéru, bylo prokázáno, že aktivní AMPK přispívá k remodelaci celého MCC/eisosomu, a to nejspíše fosforylací proteinů Pil1 a Lsp1 (Moharir et al., 2018).

Změna membránového potenciálu také ovlivňuje složení MCC/eisosomů (Grossmann et al., 2007). Bylo prokázáno, že při depolarizaci PM pomocí FCCP (karbonylkyanid-p-trifluoromethoxyfenylhydrazon) nebo pomocí externího elektrického pole transportéry přítomné v MCC/eisosomech vystupují z mikrodomény, přičemž protein Sur7 zůstává v MCC/eisosomech (Grossmann et al., 2007). Vystupování je nejspíš způsobeno změnou konformace symportérů; po obnovení membránového potenciálu se uvolněné komponenty vracejí zpět do MCC/eisosomů (Kaur & Bachhawat, 2007).

Během pozdní exponenciální a stacionární fáze růstu MCC/eisosomy chrání část transportérů před endocytózou a degradací indukovanou hladověním (Gournas et al., 2018). Ve stacionární fázi se zvyšuje počet MCC/eisosomů a jejich hloubka (Gournas et al., 2018). Tím je umožněno efektivnější obnovení transportní aktivity, když živiny budou opět dostupné (Gournas et al., 2018).

4. Jak mikrodomény přispívají k odpovědi na stres

4.1 Osmotický stres

a) Hypoosmotický stres:

Dříve se předpokládalo, že MCC/eisosomové invaginace mohou sloužit jako membránové reservoáry, které chrání buňku před zvýšením mechanického napětí membrány. Nicméně, ukázalo se, že buňky *S. cerevisiae* postrádající MCC/eisosomy odpovídají na hypoosmotický stres stejně jako buňky divokého typu (Appadurai et al., 2020). Při osmotickém stresu MCC/eisosomy fungují spíše jako sensory membránového napětí (Lanze et al., 2020). Zvýšení membránového napětí a zvýšení teploty mají stejné účinky na MCC/eisosomy: dochází k rozložení mikrodomény a vystoupení APC transportérů (Appadurai et al., 2020).

Při buněčném bobtnání nebo natažení živočišných buněk se kaveoly v PM zplošťují a tím poskytují zvětšení plochy PM (Sinha et al., 2011). Zploštění kaveoly je pasivní proces, který nevyžaduje ATP, zatímco pro obnovení struktury je nezbytná přítomnost ATP a interakce s kortikálními aktinovými filamenty (Sinha et al., 2011). Velký počet kaveol je charakteristický například pro svalové nebo epiteliální buňky které často podléhají mechanickému stresu (Sinha et al., 2011). Pacienti s mutacemi P28L a P29Q v genu *CAV3* mají myotubuly s velmi sníženým počtem kaveol, což má za následek ztrátu mechanoprotekce a vyšší citlivost k prasknutí membrány mikrotubulu (Dewulf et al., 2019). Mutace *CAV3* mohou být zodpovědné za některé symptomy svalové dystrofie (Dewulf et al., 2019).

b) Hyperosmotický stres:

Snížení mechanického napětí membrány vede k prohloubení eisosomů (Appadurai et al., 2020). Na rozdíl od odpovědi na hypoosmotický stres, kdy APC transportéry vystupují z MCC/eisosomů a tím se zvýší jejich importní aktivita, při odpovědi na hyperosmotický stress jsou transportéry zachyceny v mikrodoméně a jejich transportní aktivita je tedy redukována (Appadurai et al., 2020). Z toho vyplývá, že mikrodomény slouží k regulaci množství i aktivity APC transportéru v závislosti na vnějších podmínkách.

4.2 Lipidový stres

Pro detekování a odpověď kvasinek na různé stresové podmínky je zásadní interakce MCC a MCT (Lanze et al., 2020). Membránový stres navozený inhibicí metabolismu sfingolipidů, ale i hypoosmotickými podmínkami nebo protažením membrány, vyvolává vystupování Slm proteinů z eisosomů, které aktivují TORC2 a tím spouští signální kaskádu (Obr. 5) (Berchtold et al., 2012).

Aktivovaný komplex TOR2 fosforyluje a aktivuje kinázy Ypk1/2, které pak fosforylují, a tím inaktivují proteiny Orm1/2 (Obr. 5) (Berchtold et al., 2012; Roelants et al., 2011). V hyperfosforylovaném stavu proteiny Orm1/2 přestávají inhibovat serin:palmytoyl-CoA transferázu, první enzym biosyntézy sfingolipidů, a tím je obnovena produkce sfingolipidů (Berchtold et al., 2012; Roelants et al., 2011). Delece obou genů (*slm1Δ slm2Δ*) je letální při restriktivních teplotách (Berchtold et al., 2012).

Kinázy Ypk1/2 mohou být aktivovány nejen komplexem TOR2 ale také kinázami Pkh1/2, které jsou součástí MCC/eisosomů (Casamayor et al., 1999; Roelants et al., 2004). Samotné Pkh1/2 kinázy jsou aktivovány buď pomocí prekursorů sfingolipidů – sfingolipidových bází s dlouhým řetězcem (Xiping Zhang et al., 2004) anebo pomocí vystupování proteinu Nce102 z MCC do zbytku PM (Obr. 5) (Fröhlich et al., 2009). Nce102 funguje jako lokální sensor PM, jehož lokalizace je dynamická a závisí na fluiditě membrány a zastoupení sfingolipidů (Zahumensky et al., 2022). Za normálních podmínek se protein Nce102 nachází v MCC/eisosomu v blízkosti kináz Pkh1/2 a inhibuje jejich aktivitu (Obr. 5) (Fröhlich et al., 2009; Zahumensky et al., 2022). Jakmile se zvýší fluidita membrány nebo dojde ke snížení koncentrace sfingolipidů, Nce102 vystupuje z MCC/eisosomů a přestává inhibovat kinázy Pkh1/2 (Fröhlich et al., 2009; Zahumensky & Malinsky, 2019), které fosforylují Pil1. To má za následek rozložení MCC/eisosomů, následný výstup proteinů Slm1/2 do MCT a aktivaci Ypk1/2 přes aktivovaný TORC2 (Walther et al., 2007). Zároveň aktivní Pkh1/2 samy o sobě mohou přímo aktivovat Ypk1/2 (Obr. 5) (Casamayor et al., 1999; Roelants et al., 2004). Nce102 vnímá také zvýšení koncentrace sfingolipidů a snížení fluidity PM: v tomto případě Nce102 rovněž vystupuje z MCC/eisosomů, ale tentokrát protein podléhá endocytóze a je internalizován v membráně vakuoly (Zahumensky et al., 2022). MCC/eisosomy mohou v tomto případě poskytnout ergosterol pro obnovení rovnováhy mezi sfingolipidy a steroly v membráně. Endocytóza Nce102 tak zabrání zbytečné aktivaci drah pro biosyntézu sfingolipidů popsaných výše (Zahumensky et al., 2022).

4.3 Role lipidových raftů

Raftové domény hrají esenciální roli v třídění proteinů a v různých signálních procesech (Staubach & Hanisch, 2011). Příkladem může sloužit ústřední role lipidových raftů v oxidativním stresu indukovaném etanolem v jaterních buňkách (Nourissat et al., 2008). Při stresu dochází k agregaci lipidových raftů prostřednictvím oxidace a tvorby S-S můstků mezi proteiny přítomnými v raftech a k peroxidaci lipidů za vzniku malondialdehydu, vysoce reaktivní molekuly, která se snadno váže na proteiny a fosfolipidy (Nourissat et al., 2008). Po agregaci raftů dochází k aktivaci fosfolipázy C, která spouští další signální kaskády, vedoucí ke zvýšení intracelulární koncentrace železa (Nourissat et al., 2008).

Nicméně, o roli lipidových raftů v reakci na stres ve vztahu k transportérům je známo velmi málo. V souvislosti s reakcí buněk na oxidativní stres bylo zjištěno, že hlavní protein kaveol – CAV-1 - stabilizuje transportér mědi ATP7A, který exportuje ionty mědi z buňky (Sudhahar et al., 2020). Úlohou ATP7A je především zabránit toxické akumulaci mědi v buňce (Ogórek et al., 2017) a zároveň poskytovat měděné ionty jako kofaktor pro extracelulární enzym superoxid dismutázu 3 (SOD3), která se nachází na povrchu endoteliálních buněk (Sudhahar et al., 2020). Z toho je vidět, že CAV-1 hraje důležitou roli při udržování endoteliální a vaskulární funkce (Sudhahar et al., 2020).

Lipidové rafty zřejmě mohou modelovat kinetiku proteinů v závislosti na lipidové kompozici membrány (Székely et al., 2007). Bylo objeveno, že draslíkový kanál Kv1.3 je lokalizován v lipidových raftech cytotoxických T-lymfocytů (Panyi et al., 2004). Později se ukázalo, že včlenění mastných kyselin s různou délkou uhlíkového řetězce a různým stupněm nenasycenosti moduluje aktivační a inaktivační kinetiku Kv1.3, což je pravděpodobně způsobeno změnou lipidové kompozice raftů (Székely et al., 2007).

Neuronální glutamátové transportéry EAA jsou lokalizovány v lipidových raftech (Butchbach et al., 2004). Předpokládá se, že lipidové rafty v tomto případě přispívají k tvorbě supramolekulárních proteinových komplexů v PM buňky, které mohou být důležité pro rychlou regulaci aktivity těchto transportérů (Butchbach et al., 2004). Bylo zjištěno, že dvě isoformy protein kinázy C (PKC) – PKC α a PKC ϵ jsou také asociovány s lipidovými rafty (Mineo et al., 1998; Park & Kim, 2009). Zároveň bylo objeveno že v gliomových buňkách C6 aktivovaná PKC α pozitivně reguluje expresi transportéru EAAC1 na povrchu buňky, zatímco PKC ϵ zvyšuje katalytickou účinnost transportéru, pravděpodobně přímou fosforylací EAAC1 (González et al., 2002). Další studie zabývající se signalizací mezi astrocyty a neurony ukázala, že obsah cholesterolu je klíčovým faktorem v mediu produkovaném gliemi pro regulaci extracelulární koncentrace glutamátu (Canolle et al., 2004). Cholesterol totiž zvyšuje transportní aktivitu EAAC1 v PM neuronu (Canolle et al., 2004). Všechna uvedená data spolu se skutečností, že cholesterol je hlavní složkou lipidových raftů, naznačují, že tyto mikrodomény pravděpodobně hrají důležitou roli v lokalizaci a regulaci glutamátových transportérů. Zatím však neexistují přímé důkazy pro toto tvrzení.

Nicméně, podle jiné studie zkoumající vliv cholesterolu na funkce dopaminových transportérů (DAT), lipidové rafty nemají esenciální vliv na transport substrátu (Jones et al., 2012). Deplece cholesterolu působením M β CD snižovala transport dopaminu dovnitř a ven z buňky, ale když byl použit nystatin, látka, která narušuje strukturu lipidových raftů, ale neodstraňuje

cholesterol z membrány, nebo desmosterol, analog cholesterolu, který nemá schopnost tvořit rafty, rychlost transportu se neměnila (Jones et al., 2012).

5. Závěr

Mikrodomény představují důležité funkční jednotky plasmatické membrány, které zajišťují prostorovou organizaci transportních proteinů, přispívají k jejich stabilizaci a hrají významnou roli v odpovědi na změny vnějších podmínek. U kvasinek se navíc ukazuje, že vzájemná komunikace mikrodomén přispívá k detekci a reakci na lipidový stres vyvolaný například zpomalením metabolismu sfingolipidů nebo hypoosmotickým stresem.

Zatímco u kvasinek je lokalizace konkrétních proteinů v jednotlivých mikrodoménách detailně popsána, informace o transportérech planárních lipidových raftů a caveol v plasmatické membráně mnohobuněčných eukaryot jsou stále relativně omezené. Podobně i význam lipidových raftů v regulaci transportérů vyžaduje další podrobný výzkum, zatímco důvody lokalizace transportních proteinů do mikrodomén v kvasinkách jsou poměrně dobře objasněny.

Z mé bakalářské práce je vidět, že mikrodomény jednobuněčných kvasinek jsou důležité pro stabilitu transportních systémů a rychlou odpověď na neustále se měnící podmínky, jako je změna pH prostředí, dostupnost živin a membránový stres. Mikrodomény savčích buněk jsou především důležité pro umístění komponent signálních kaskád. Planární a miskovité lipidové rafty zřejmě participují v procesech transportu mastných kyselin, cholesterolu, glukózy, glutamátů, iontů mědi a také hrají roli v odpovědi buňky na oxidativní stress.

Studium mikrodomén u kvasinek přispívá obecně k lepšímu porozumění principům fungování, segregace a regulace proteinů v plasmatické membráně v eukaryotních buňkách. Tyto poznatky mohou být využity i při vývoji látek cílených proti patogenním kvasinkám. Dosavadní znalosti o úloze mikrodomén v buňkách savců naznačují, že podrobnější výzkum by mohl vést k objevení nových regulačních mechanismů membránových proteinů na molekulární úrovni, proto si myslím, že tato oblast výzkumu má velký potenciál v biomedicině, v diagnostice, případně léčbě řady onemocnění.

Seznam použité literatury

- *Amara, S. G., & Fontana, A. C. K. (2002). Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochemistry International*, 41, 313–318. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00018-9](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00018-9)
- Appadurai, D., Gay, L., Moharir, A., Lang, M. J., Duncan, M. C., Schmidt, O., Teis, D., Vu, T. N., Silva, M., Jorgensen, E. M., & Babst, M. (2020). Plasma membrane tension regulates eisosome structure and function. *Molecular Biology of the Cell*, 31(4), 287–303. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-04-0218>
- *Athanasopoulos, A., André, B., Sophianopoulou, V., & Gournas, C. (2019). Fungal plasma membrane domains. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(6), 642–673. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz022>
- Bagnat, M., Chang, A., & Simons, K. (2001). Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 12, 4129–4138. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.12.4129>
- Bartlett, K., Gadila, S. K. G., Tenay, B., McDermott, H., Alcox, B., & Kim, K. (2015). TORC2 and eisosomes are spatially interdependent, requiring optimal level of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate for their integrity. *Journal of Biosciences*, 40(2), 299–311. <https://doi.org/10.1007/s12038-015-9526-4>
- Berchtold, D., Piccolis, M., Chiaruttini, N., Riezman, I., Riezman, H., Roux, A., Walther, T. C., & Loewith, R. (2012). Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nature Cell Biology*, 14(5), 542–547. <https://doi.org/10.1038/ncb2480>
- Berchtold, D., & Walther, T. C. (2009). TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 1565–1575. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Bianchi, F., Syga, L., Moiset, G., Spakman, D., Schavemaker, P. E., Punter, C. M., Seinen, A. B., Van Oijen, A. M., Robinson, A., & Poolman, B. (2018). Steric exclusion and protein conformation determine the localization of plasma membrane transporters. *Nature Communications*, 9(1), 501. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02864-2>

- *Bianchi, F., Van't Klooster, J. S., Ruiz, S. J., & Poolman, B. (2019). Regulation of amino acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 83(4), e00063-19. <https://doi.org/10.1128/membr.00024-19>
- Brusé, J. L., Chauvet, N., & Rutishauser, U. (2001). Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the 7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *The Journal of Neuroscience*, 21(1), 504–512. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-02-00504.2001>
- Busto, J. V., Elting, A., Haase, D., Spira, F., Kuhlman, J., Schäfer-Herte, M., & Wedlich-Söldner, R. (2018). Lateral plasma membrane compartmentalization links protein function and turnover. *The EMBO Journal*, 37(16), e99473. <https://doi.org/10.15252/emboj.201899473>
- Butchbach, M. E. R., Tian, G., Guo, H., & Lin, C. L. G. (2004). Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: Importance for excitatory amino acid transporter localization and function. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34388–34396. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403938200>
- Canolle, B., Masméjan, F., Melon, C., Nieoullon, A., Pisano, P., & Lortet, S. (2004). Glial soluble factors regulate the activity and expression of the neuronal glutamate transporter EAAC1: Implication of cholesterol. *Journal of Neurochemistry*, 88(6), 1521–1532. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02301.x>
- Casamayor, A., Torrance, P. D., Kobayashi, T., Thorner, J., & Alessi, D. R. (1999). Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Current Biology*, 9(1), 186–197. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80088-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80088-8)
- Cyert, M. S., & Philpott, C. C. (2013). Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 193(3), 677–713. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.147207>
- Dewulf, M., Köster, D. V., Sinha, B., Viaris de Lesegno, C., Chambon, V., Bigot, A., Bensalah, M., Negroni, E., Tardif, N., Podkalicka, J., Johannes, L., Nassoy, P., Butler-Browne, G., Lamaze, C., & Blouin, C. M. (2019). Dystrophy-associated caveolin-3 mutations reveal that caveolae couple IL6/STAT3 signaling with mechanosensing in human muscle cells. *Nature Communications*, 10(1), 1974. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09405-5>
- *Douglas, L. M., & Konopka, J. B. (2014). Fungal membrane organization: The eisosome concept. *Annual Review of Microbiology*, 68(1), 377–393. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103507>

- Dreja, K., Voldstedlund, M., Vinten, J., Tranum-Jensen, J., Hellstrand, P., & Swärd, K. (2002). Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(8), 1267–1272. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000023438.32585.A1>
- Drobnik, W., Borsukova, H., Böttcher, A., Pfeiffer, A., Liebisch, G., Schütz, G. J., Schindler, H., & Schmitz, G. (2002). Apo AI/ABCA1-dependent and HDL3-mediated lipid efflux from compositionally distinct cholesterol-based microdomains. *Traffic*, 3(4), 268–278. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.030404.x>
- Echarri, A., & Del Pozo, M. A. (2015). Caveolae - mechanosensitive membrane invaginations linked to actin filaments. *Journal of Cell Science*, 128(15), 2747–2758. <https://doi.org/10.1242/jcs.153940>
- Ehehalt, R., Füllekrug, J., Pohl, J., Ring, A., Herrmann, T., & Stremmel, W. (2006). Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane – Lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 284(1–2), 135–140. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-9034-1>
- Engberg, O., Hautala, V., Yasuda, T., Dehio, H., Murata, M., Slotte, J. P., & Nyholm, T. K. M. (2016). The affinity of cholesterol for different phospholipids affects lateral segregation in bilayers. *Biophysical Journal*, 111(3), 546–556. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.06.036>
- *Foderaro, J. E., Douglas, L. M., & Konopka, J. B. (2017). MCC/eisosomes regulate cell wall synthesis and stress responses in fungi. *Journal of Fungi*, 3(4), 61. <https://doi.org/10.3390/jof3040061>
- Foster, L. J., De Hoog, C. L., & Mann, M. (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Cell Biology Charles University Faculty of Science*, 100(10), 5813–5818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0631608100>
- Frederick R Maxfield. (2002). Plasma membrane microdomains. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(1), 483–487. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00351-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00351-4)
- Fröhlich, F., Moreira, K., Aguilar, P. S., Hubner, N. C., Mann, M., Walter, P., & Walther, T. C. (2009). A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *Journal of Cell Biology*, 185(7), 1227–1242. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811081>

- Fujita, K., Nagaoka, M., Komatsu, Y., & Iwahashi, H. (2003). Yeast pheromone signaling pathway as a bioassay to assess the effect of chemicals on mammalian peptide hormones. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(3), 358–366. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00116-1](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00116-1)
- Gaigg, B., Timischl, B., Corbino, L., & Schneider, R. (2005). Synthesis of sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase to the cell surface of yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), 22515–22522. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413472200>
- Gaigg, B., Toulmay, A., & Schneider, R. (2006). Very long-chain fatty acid-containing lipids rather than sphingolipids per se are required for raft association and stable surface transport of newly synthesized plasma membrane ATPase in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 281(45), 34135–34145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603791200>
- Garić, D., De Sanctis, J. B., Shah, J., Dumut, D. C., & Radzioch, D. (2019). Biochemistry of very-long-chain and long-chain ceramides in cystic fibrosis and other diseases: The importance of side chain. *Progress in Lipid Research*, 74(1), 130–144. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.03.001>
- Garrigues, A., Escargueil, A. E., & Phane Orłowski, S. (2002). The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *PNAS*, 99(16), 10347–10352. <https://doi.org/10.1073/pnas.162366399>
- Gervásio, O. L., Phillips, W. D., Cole, L., & Allen, D. G. (2011). Caveolae respond to cell stretch and contribute to stretch-induced signaling. *Journal of Cell Science*, 124(21), 3581–3590. <https://doi.org/10.1242/jcs.084376>
- Geva, Y., Crissman, J., Arakel, E. C., Gómez-Navarro, N., Chuartzman, S. G., Stahmer, K. R., Schwappach, B., Miller, E. A., & Schuldiner, M. (2017). Two novel effectors of trafficking and maturation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Wiley Traffic*, 18(10), 672–682. <https://doi.org/10.1111/tra.12503>
- Gonzalez, M. I., Kazanietz, M. G., & Robinson, M. B. (2002). Regulation of the neuronal glutamate transporter excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1) by different protein kinase C subtypes. *Molecular Pharmacology*, 62(1), 901–910. <https://doi.org/10.1124/mol.62.4.901>
- Gottesman, M. M., Pastant, I., & Ambudkar, S. V. (1996). P-glycoprotein and multidrug resistance. *Current Opinion in Genetics & Development*, 6(1), 61–61. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(96\)80091-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(96)80091-8)

- Gournas, C., Gkionis, S., Carquin, M., Twyffels, L., Tyteca, D., & André, B. (2018). Conformation-dependent partitioning of yeast nutrient transporters into starvation-protective membrane domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(14), E3145–E3154. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719462115>
- Gournas, C., Saliba, E., Krammer, E. M., Barthelemy, C., Prévost, M., & André, B. (2017). Transition of yeast Can1 transporter to the inward-facing state unveils an α -arrestin target sequence promoting its ubiquitylation and endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 28(21), 2819–2832. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-02-0104>
- Greenberg, M. L., & Axelrod, D. (1993). Membrane biology anomalously slow mobility of fluorescent lipid probes in the plasma membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membrane Biol*, 131(1), 115–127. <https://doi.org/10.1007/BF02791320>
- Grossmann, G., Malinsky, J., Stahlschmidt, W., Loibl, M., Weig-Meckl, I., Frommer, W. B., Opekarová, M., & Tanner, W. (2008). Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *Journal of Cell Biology*, 183(6), 1075–1088. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806035>
- Grossmann, G., Opekarová, M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I., & Tanner, W. (2007). Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO Journal*, 26(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601466>
- Hailstones, D., Sleer, L. S., Parton, R. G., & Stanley, K. K. (1998). Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *Journal of Lipid Research*, 39(2), 369–379. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)33898-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)33898-0)
- Hayer, A., Stoeber, M., Bissig, C., & Helenius, A. (2010). Biogenesis of caveolae: Stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic*, 11(3), 361–382. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.01023.x>
- Heit, S., Geurts, M. M. G., Murphy, B. J., Corey, R. A., Mills, D. J., Kühlbrandt, W., & Bublitz, M. (2021). Structure of the hexameric fungal plasma membrane proton pump in its autoinhibited state. *Science Advances*, 7(46), eabj5255. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj5255>
- Hill, M. M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S. J., Walser, P., Abankwa, D., Oorschot, V. M. J., Martin, S., Hancock, J. F., & Parton, R. G. (2008). PTRF-cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell*, 132(1), 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.042>

- Hjort Ipsen, J., Karlström, G., Mouritsen, O. G., Wennerström, H., & Zuckermann, M. J. (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 905(1), 162–172. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(87\)90020-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(87)90020-4)
- Jones, K. T., Zhen, J., & Reith, M. E. A. (2012). Importance of cholesterol in dopamine transporter function. *Journal of Neurochemistry*, 123(5), 700–715. <https://doi.org/10.1111/jnc.12007>
- Kabouridis, P. S., Janzen, J., Magee, A. L., & Ley, S. C. (2000). Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 30(3), 954–963. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200003\)30:3<954::AID-IMMU954>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200003)30:3<954::AID-IMMU954>3.0.CO;2-Y)
- Kaiser, H.-J., Lingwood, D., Levental, I., Kalvodova, L., Rajendran, L., & Simons, K. (2009). Order of lipid phases in model and plasma membranes. *Cell Biology Charles University Faculty of Science*, 106(1), 16645–16650. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908987106>
- Karlsson, M., Thorn, H., Parpal, S., Strålfors, P., & Gustavsson, J. (2002). Insulin induces translocation of glucose transporter GLUT4 to plasma membrane caveolae in adipocytes. *FASEB*, 16(2), 249–251. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0646fje>
- Karotki, L., Huiskonen, J. T., Stefan, C. J., Ziolkowska, N. E., Roth, R., Surma, M. A., Krogan, N. J., Emr, S. D., Heuser, J., Grünewald, K., & Walther, T. C. (2011). Eicosome proteins assemble into a membrane scaffold. *Journal of Cell Biology*, 195(5), 889–902. <https://doi.org/10.1083/jcb.201104040>
- Karuppasamy, M., Kusmider, B., Oliveira, T. M., Gaubitz, C., Prouteau, M., Loewith, R., & Schaffitzel, C. (2017). Cryo-EM structure of *Saccharomyces cerevisiae* target of rapamycin complex 2. *Nature Communications*, 8(1), 1729. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01862-0>
- Kaur, J., & Bachhawat, A. K. (2007). Yct1p, a novel, high-affinity, cysteine-specific transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 176(2), 877–890. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.070342>
- *Klappe, K., Hummel, I., Hoekstra, D., & Kok, J. W. (2009). Lipid dependence of ABC transporter localization and function. *Chemistry and Physics of Lipids*, 161(2), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.07.004>
- Langesq, Y., Swaisgoodllii, M. H., Ramoss, B. V, & Steckn, T. L. (1989). Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and Sphingomyelin in cultured

- human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 264(7), 3786–3793. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84918-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84918-9)
- *Lanze, C. E., Gandra, R. M., Foderaro, J. E., Swenson, K. A., Douglas, L. M., & Konopka, J. B. (2020). Plasma membrane MCC/eisosome domains promote stress resistance in Fungi. *Microbiology and Molecular Biology*, 84(4), 10–1128. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00063-19>
- *Laurent, J. M., Young, J. H., Kachroo, A. H., & Marcotte, E. M. (2016). Efforts to make and apply humanized yeast. *Briefings in Functional Genomics*, 15(2), 155–163. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elv041>
- Lee, M. C. S., Hamamoto, S., & Schekman, R. (2002). Ceramide biosynthesis is required for the formation of the oligomeric H⁺-ATPase Pma1p in the yeast endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22395–22401. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200450200>
- Léon, S., & Teis, D. (2018). Functional patchworking at the plasma membrane. *The EMBO Journal*, 37(16), e100144. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100144>
- *Levental, I., Levental, K. R., & Heberle, F. A. (2020). Lipid rafts: Controversies resolved, mysteries remain. *Trends in Cell Biology*, 30(5), 341–353. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.01.009>
- Levental, I., Lingwood, D., Grzybek, M., Coskun, Ü., & Simons, K. (2010). Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(51), 22050–22054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016184107/-/DCSupplemental>
- *Levental, I., & Veatch, S. L. (2016). The continuing mystery of lipid rafts. *Journal of Molecular Biology*, 428(24), 4749–4764. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.022>
- Lichtenberg, D., Goñi, F. M., & Heerklotz, H. (2005). Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(8), 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.06.004>
- Liu, L., & Pilch, P. F. (2008). A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. *Journal of Biological Chemistry*, 283(7), 4314–4322. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707890200>

- *Ljungdahl, P. O., & Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *190*(3), 885–929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>
- Lönnfors, M., Doux, J. P. F., Killian, J. A., Nyholm, T. K. M., & Slotte, J. P. (2011). Sterols have higher affinity for sphingomyelin than for phosphatidylcholine bilayers even at equal acyl-chain order. *Biophysical Journal*, *100*(11), 2633–2641. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.03.066>
- Lorent, J. H., Levental, K. R., Ganesan, L., Rivera-Longsworth, G., Sezgin, E., Doktorova, M., Lyman, E., & Levental, I. (2020). Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nature Chemical Biology*, *16*(6), 644–652. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0529-6>
- Luo, G., Gruhler, A., Liu, Y., Jensen, O. N., & Dickson, R. C. (2008). The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(16), 10433–10444. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709972200>
- Malinska, K., Malinsky, J., Opekarová, M., & Tanner, W. (2003). Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(1), 4427–4436. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-04>
- Malinska, K., Malinsky, J., Opekarova, M., & Tanner, W. (2004). Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *Journal of Cell Science*, *117*(25), 6031–6041. <https://doi.org/10.1242/jcs.01493>
- *Malinsky, J., & Opekarová, M. (2016). New insight into the roles of membrane microdomains in physiological activities of fungal cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *325*(1), 119–180. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.02.005>
- Mazán, M., Mazánová, K., & Farkaš, V. (2006). Bunková stena húb – výzva pre výskum nových antimykotík. *Chemické Listy*, *100*(1), 433–439.
- Mineo, C., Ying, Y.-S., Chapline, C., Jaken, S., & Anderson, R. G. W. (1998). Targeting of protein kinase C to caveolae. *The Journal of Cell Biology*, *141*(3), 601–610. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.3.601>

- Moharir, A., Gay, L., Appadurai, D., Keener, J., & Babst, M. (2018). Eisosomes are metabolically regulated storage compartments for APC-type nutrient transporters. *Molecular Biology of the Cell*, 29(17), 2113–2127. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-11-0691>
- Moreira, K. E., Schuck, S., Schrul, B., Fröhlich, F., Moseley, J. B., Walther, T. C., & Walter, P. (2012). Seg 1 controls eisosome assembly and shape. *Journal of Cell Biology*, 198(3), 405–420. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202097>
- Moreira, K. E., Walther, T. C., Aguilar, P. S., & Walter, P. (2009). Pil1 controls eisosome biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 20(1), 809–818. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Mueller, N. S., Wedlich-Söldner, R., & Spira, F. (2012). From mosaic to patchwork: Matching lipids and proteins in membrane organization. *Molecular Membrane Biology*, 29(5), 186–196. <https://doi.org/10.3109/09687688.2012.687461>
- Mundy, D. I., Machleidt, T., Ying, Y. S., Anderson, R. G. W., & Bloom, G. S. (2002). Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 115(22), 4327–4339. <https://doi.org/10.1242/jcs.00117>
- Munro, S. (2003). Review Lipid Rafts: Elusive or Illusive? detection, resistance to solubilization by the nonionic. In *Cell* (Vol. 115).
- Murata, M., Peranen, J., Schreinert, R., Wielandt, F., Kurzchalia, T. V., & Simons, K. (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein (membrane microdomains/intracellular transport/membrane reconstitution). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(22), 10339–10343. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10339>
- Niles, B. J., Joslin, A. C., Fresques, T., & Powers, T. (2014). TOR Complex 2-Ypk1 signaling maintains sphingolipid homeostasis by sensing and regulating ROS accumulation. *Cell Reports*, 6(3), 541–552. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.040>
- Nourissat, P., Travert, M., Chevanne, M., Tekpli, X., Rebillard, A., Le Moigne-Müller, G., Rissel, M., Cillard, J., Dimanche-Boitrel, M. T., Lagadic-Gossmann, D., & Sergent, O. (2008). Ethanol induces oxidative stress in primary rat hepatocytes through the early involvement of lipid raft clustering. *Hepatology*, 47(1), 59–70. <https://doi.org/10.1002/hep.21958>
- Núñez, E., Alonso-Torres, P., Fornés, A., Aragón, C., & López-Corcuera, B. (2008). The neuronal glycine transporter GLYT2 associates with membrane rafts: Functional modulation by lipid environment. *Journal of Neurochemistry*, 105(6), 2080–2090. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05292.x>

- O'Connell, K. M. S., & Tamkun, M. M. (2005). Targeting of voltage-gated potassium channel isoforms to distinct cell surface microdomains. *Journal of Cell Science*, 118(10), 2155–2166. <https://doi.org/10.1242/jcs.02348>
- Ogórek, M., Lenartowicz, M., Starzyński, R., Jończy, A., Staroń, R., Doniec, A., Krzeptowski, W., Bednarz, A., Pierzchała, O., Lipiński, P., Rajfur, Z., Baster, Z., Gibas-Tybur, P., & Grzmil, P. (2017). Atp7a and Atp7b regulate copper homeostasis in developing male germ cells in mice. *Metallomics*, 9(9), 1288–1303. <https://doi.org/10.1039/c7mt00134g>
- Olivera-Couto, A., Graña, M., Harispe, L., & Aguilar, P. S. (2011). The eisosome core is composed of BAR domain proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 22(13), 2360–2372. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-12-1021>
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., & Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 1(5), 376–386. <https://doi.org/10.1074/mcp.M200025-MCP200>
- *Oram, J. F., & Lawn, R. M. (2001). ABCA1: The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *Journal of Lipid Research*, 42(8), 1173–1179. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)31566-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)31566-2)
- Örtengren, U., Yin, L., Öst, A., Karlsson, H., Nystrom, F. H., & Strålfors, P. (2006). Separation and characterization of caveolae subclasses in the plasma membrane of primary adipocytes; segregation of specific proteins and functions. *FEBS Journal*, 273(14), 3381–3392. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05345.x>
- Palade, G. E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1(4), 188–211. <https://doi.org/10.1177/1.4.188>
- Panyí, G., Vá Mosi †, G., Bacsó, Z., Bagdá Ny, M., Bodná, A., Varga, Z., Gá Spá, R., Má, L., & Damjanovich, S. (2004). Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 3(5), 1285–1290. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307421100>
- Park, Y., & Kim, K. T. (2009). Dominant role of lipid rafts L-type calcium channel in activity-dependent potentiation of large dense-core vesicle exocytosis. *Journal of Neurochemistry*, 110(2), 520–529. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06148.x>

- Parpal, S., Karlsson, M., Thorn, H., & Strålfors, P. (2001). Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 9670–9678. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007454200>
- Parton, R. G., Hanzal-Bayer, M., & Hancock, J. F. (2006). Biogenesis of caveolae: A structural model for caveolin-induced domain formation. *Journal of Cell Science*, 119(5), 787–796. <https://doi.org/10.1242/jcs.02853>
- Parton, R. G., Tillu, V., McMahon, K. A., & Collins, B. M. (2021). Key phases in the formation of caveolae. *Current Opinion in Cell Biology*, 71(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.01.009>
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Jonathan, P., Butler, G., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: The amphiphysin BAR structure. *Science*, 303(5657), 495–499. <https://doi.org/10.1126/science.1092586>
- Pol, A., Martin, S., Fernández, M. A., Ingelmo-Torres, M., Ferguson, C., Enrich, C., & Parton, R. G. (2005). Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Molecular Biology of the Cell*, 16(1), 2091–2105. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E.-L., Simons, K., & Hörber, J. K. H. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, 148(5), 997–1007. <https://doi.org/https://doi.org/10.1083/jcb.148.5.997>
- Rajendran, L., Le Lay, S., & Illges, H. (2007). Raft association and lipid droplet targeting of flotillins are independent of caveolin. *Biological Chemistry*, 388(3), 307–314. <https://doi.org/10.1515/BC.2007.034>
- Razani, B., Combs, T. P., Wang, X. B., Frank, P. G., Park, D. S., Russell, R. G., Li, M., Tang, B., Jelicks, L. A., Scherer, P. E., & Lisanti, M. P. (2002). Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8635–8647. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110970200>
- *Rella, A., Farnoud, A. M., & Del Poetam, M. (2015). Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence. *Progress in Lipid Research*, 61(1), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.11.003>

- Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P. E., Pessin, J. E., Saltiel, A. R., Chiang, S. H., Baumann, C. A., Watson, R. T., Neudauer, C. L., & Macara, I. G. (2001). Lipid rafts are required for GLUT4 internalization in adipose cells. *Nature*, *407*(1), 202–207. <https://doi.org/10.1073/pnas.211341698>
- Ring, A., Le Lay, S., Pohl, J., Verkade, P., & Stremmel, W. (2006). Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1761*(4), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.03.016>
- Roelants, F. M., Breslow, D. K., Muir, A., Weissman, J. S., & Thorner, J. (2011). Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(48), 19222–19227. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116948108>
- Roelants, F. M., Torrance, P. D., & Thorner, J. (2004). Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology*, *150*(10), 3289–3304. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27286-0>
- Rosa, J. B., Nassman, K. Y., & Sagasti, A. (2023). Sensory axons induce epithelial lipid microdomain remodeling and determine the distribution of junctions in the epidermis. *Molecular Biology of the Cell*, *34*(1), ar5. <https://doi.org/10.1091/mbc.E22-09-0396>
- Salzer, U., & Prohaska, R. (2001). Brief report Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *The Journal of the American Society of Hematology*, *97*(4), 1141–1143. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.4.1141>
- *Sens, P., & Turner, M. S. (2006). Budded membrane microdomains as tension regulators. *Physical Review Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, *73*(3), 031918. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.73.031918>
- Serrano, Kielland-Brandt M C, & Fink G R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature*, *319*(6055), 689–693. <https://doi.org/10.1038/319689a0>
- *Simons, K., & Gerl, M. J. (2010). Revitalizing membrane rafts: New tools and insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(10), 688–699. <https://doi.org/10.1038/nrm2977>

- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569–572. <https://doi.org/10.1038/35036052>
- *Simons, K., & Sampaio, J. L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004697>
- *Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 31–39. <https://doi.org/10.1038/35036052>
- *Simons, K., & Vaz, W. L. C. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33(1), 269–295. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803>
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
- Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., Parton, R. G., Raposo, G., Sens, P., Lamaze, C., & Nassoy, P. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, 144(3), 402–413. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.031>
- Spira, F., Mueller, N. S., Beck, G., Von Olshausen, P., Beig, J., & Wedlich-Söldner, R. (2012). Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nature Cell Biology*, 14(6), 640–648. <https://doi.org/10.1038/ncb2487>
- St. Clair, J. W., Kakuda, S., & London, E. (2020). Induction of ordered lipid raft domain formation by loss of lipid asymmetry. *Biophysical Journal*, 119(3), 483–492. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.06.030>
- *Staubach, S., & Hanisch, F. G. (2011). Lipid rafts: Signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert Review of Proteomics*, 8(2), 263–277. <https://doi.org/10.1586/epr.11.2>
- Strádalová, V., Stahlschmidt, W., Grossmann, G., Blažíková, M., Rachel, R., Tanner, W., & Malinsky, J. (2009). Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *Journal of Cell Science*, 122(16), 2887–2894. <https://doi.org/10.1242/jcs.051227>
- Sudhahar, V., Okur, M. N., O'Bryan, J. P., Minshall, R. D., Fulton, D., Ushio-Fukai, M., & Fukai, T. (2020). Caveolin-1 stabilizes ATP7A, a copper transporter for extracellular SOD, in

- vascular tissue to maintain endothelial function. *American Journal of Physiology*, 319(5), C933–C944. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00151.2020>
- Székely, A., Kitajka, K., Panyi, G., Márián, T., Gáspár, R., & Krasznai, Z. (2007). Nutrition and immune system: Certain fatty acids differently modify membrane composition and consequently kinetics of KV1.3 channels of human peripheral lymphocytes. *Immunobiology*, 212(3), 213–227. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.01.005>
- Trigatti, B. L., Anderson, R. G. W., & Gerber, G. E. (1999). Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255, 34–39. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.0123>
- Trushina, E., Du Charme, J., Parisi, J., & McMurray, C. T. (2006). Neurological abnormalities in caveolin-1 knock out mice. *Behavioural Brain Research*, 172(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.04.024>
- Valdez-Taubas, J., & Pelham, H. R. B. (2003). Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Current Biology*, 13(1), 1636–1640. <https://doi.org/10.1016/j>
- *Van Der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., & Konings, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, function, and biogenesis. *Microbiological Reviews*, 59(2), 304–322. <https://doi.org/10.1128/mr.59.2.304-322.1995>
- van 't Klooster, J. S., Cheng, T. Y., Sikkema, H. R., Jeucken, A., Moody, B., & Poolman, B. (2020). Periprotein lipidomes of *Saccharomyces cerevisiae* provide a flexible environment for conformational changes of membrane proteins. *Elife*, 9(1), e57003. <https://doi.org/10.7554/eLife.57003>
- Vesela, P., Zahumensky, J., & Malinsky, J. (2023). Lsp1 partially substitutes for Pil1 function in eisosome assembly under stress conditions. *Journal of Cell Science*, 136(3), jcs260554. <https://doi.org/10.1242/jcs.260554>
- Walther, T. C., Aguilar, P. S., Fröhlich, F., Chu, F., Moreira, K., Burlingame, A. L., & Walter, P. (2007). Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *EMBO Journal*, 26(24), 4946–4955. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601933>

- Walther, T. C., Brickner, J. H., Aguilar, P. S., Bernales, S., Pantoja, C., & Walter, P. (2006). Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature*, 439(7079), 998–1003. <https://doi.org/10.1038/nature04472>
- Wang, J., Megha, & London, E. (2004). Relationship between Sterol/Steroid structure and participation in ordered lipid domains (lipid rafts): Implications for lipid raft structure and function. *Biochemistry*, 43(4), 1010–1018. <https://doi.org/10.1021/bi035696y>
- Wang, L., Li, H., Lv, X., Chen, T., Li, R., Xue, Y., Jiang, J., Jin, B., Baluška, F., Šamaj, J., Wang, X., & Lin, J. (2015). Spatiotemporal dynamics of the BRI1 receptor and its regulation by membrane microdomains in living Arabidopsis cells. *Molecular Plant*, 8(9), 1334–1349. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.005>
- Watanabe, D., Kikushima, R., Aitoku, M., Nishimura, A., Ohtsu, I., Nasuno, R., & Takagi, H. (2014). Exogenous addition of histidine reduces copper availability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell*, 1(7), 241–246. <https://doi.org/10.15698/mic2014.07.154>
- Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W., & Hall, M. N. (2005). Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 30697–30704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505553200>
- Xiping Zhang, Robert L. Lester, & Robert C. Dickson. (2004). Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *EMBO Journal*, 20(23), 6783–6792. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6783>
- Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C., & London, E. (2001). Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33540–33546. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104776200>
- Young, M. R., Heit, S., & Bublitz, M. (2024). Structure, function and biogenesis of the fungal proton pump Pma1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1871(1), 119600. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2023.119600>
- *Zahumensky, J., & Malinsky, J. (2019). Role of MCC/eisosome in fungal lipid homeostasis. *Biomolecules*, 9(8), 305. <https://doi.org/10.3390/biom9080305>

- Zahumensky, J., Mota Fernandes, C., Vesela, P., Del Poeta, M., Konopka, J. B., & Malinsky, J. (2022). Microdomain protein Nce102 ss a local sensor of plasma membrane sphingolipid balance. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e01961-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01961-22>
- Zhao, P., Zhao, C., Chen, D., Yun, C., Li, H., & Bai, L. (2021). Structure and activation mechanism of the hexameric plasma membrane H⁺-ATPase. *Nature Communications*, 12(1), 6439. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26782-y>
- *Zheng, Y. Z., & Foster, L. J. (2009). Biochemical and proteomic approaches for the study of membrane microdomains. *Journal of Proteomics*, 72(1), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.09.003>
- Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C. D. M., Fasch, E.-V., Kohlwein, S. D., Paltauf, F., & Daum, G. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 173(6), 2026–2034. <https://doi.org/10.1128/jb.173.6.2026-2034.1991>