

Abstrakt

Komplexita buněčných membrán zdaleka není jen pouhé náhodné uskupení lipidů a proteinů, které odděluje buňku od okolního prostředí. Každá z tisíců různých složek membrán vykonává své specifické funkce důležité pro funkci celé buňky, neboť mnoho biologických procesů se odehrává právě na membránách. Pochopení těchto procesů na molekulové úrovni je cílem současného biologického výzkumu. Náš výzkum využívající detekci jednotlivých fluorescenčních molekul (např. FCS, FCCS, FLIM-FRET) přispěl k poznání laterální organizace membrán nebo mechanismu membránové fúze. Dále jsme odhalili mechanismus účinku membránově aktivního sekundárního metabolitu. Vzhledem k tomu, že je membránový systém živých buněk příliš složitý, byly naše experimenty prováděny na modelových lipidových membránách, které umožňují studium lipid-lipidových a lipid-proteinových interakcí na molekulové úrovni kontrolovaným způsobem. První část této práce se zabývá studiem mechanismu působení sekundárního metabolitu didehydroroflamycoinu (DDHR) v membránách. Zjistili jsme, že DDHR je molekula tvořící póry v membránách a že je tato schopnost ovlivněna přítomností cholesterolu. Přímá vizualizace vlastní fluorescence DDHR ukázala jeho preferenční lokalizaci do oblastí membrán s vyšší uspořádaností lipidů.

Druhá část práce je věnována studiu laterální heterogenity membrán v blízkosti fázového přechodu lipidů. Heterogenita membrán hraje významnou úlohu v mnoha buněčných procesech, její charakter však není dosud znám. Přestože konvenční fluorescenční mikroskopie neumožňuje přímou vizualizaci submikroskopických struktur, jejich existenci jsme zaznamenali pomocí různých technik založených na detekci jedné molekuly. Díky tomuto přístupu jsme identifikovali 9 nm velké fluidní nanodomény v GUV membránách o složení DOPC/Chol/SM a DOPC/SM. Dále jsme ukázali, že gangliosidy GM1 agregují a vytváří nanometrové domény a že je jejich přístupnost pro navázání ligandu B-podjednotky cholera toxinu ovlivněna denzitou GM1 molekul i přítomností cholesterolu.

Třetí část této práce je zaměřena na studium komplementárních lipopeptidů CP_nK_4 a CP_nE_4 , které mezi sebou vytváří tzv. "coiled-coil" vazbu a které slouží jako modelový systém pro fúzi membrán. Pokročilé fluorescenční metody nám umožnily studovat počáteční fáze membránové fúze zprostředkované těmito lipopeptidy. Ukázali jsme, že peptidová část lipopeptidu CP_nE_4 pouze přitáhne kladně nabitou peptidovou část lipopeptidu CP_nK_4 k membráně, což vede k přiblížení liposomů. Peptid K_4 interaguje s membránou a způsobuje její deformaci, což následně přispívá k membránové fúzi.