

ABSTRAKT

Plazmatická membrána (PM) všech buněk hostí celou řadu důležitých buněčných funkcí. Tyto funkce musí být pečlivě koordinovány, a jak současný výzkum ukazuje, plazmatická membrána je za tímto účelem uspořádána do specializovaných domén. Naše laboratoř se zabývá výzkumem způsobu organizace plazmatické membrány u kvasinky pивní, kde bylo za použití fluorescenční mikroskopie popsáno několik nepřekrývajících se domén. Jednou takovou doménou je MCC (*Membrane Compartment occupied by transporter Can1*), která je tvořena stabilními izolovanými oblastmi PM o velikosti asi 300 nm. MCC domény obsahují několik přenašečů a proteinů o neznámé funkci (proteiny příbuzné Sur7 a Nce102) a jejich formování je organizováno z cytosolu proteinovými komplexy zvanými eisosomy, jež jsou tvořeny především proteiny Pil1 a Lsp1.

Tato práce navazuje na studie, které měly za cíl objasnit složení, strukturu a funkci MCC. V první části práce jsme se zaměřili na ultrastrukturální analýzu MCC, přičemž jsme nejdříve vyvinuli protokol pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM), který dobře zachovává strukturu PM. Zjistili jsme, že mrazová fixace pomocí vysokotlakého zamražení, kombinovaná s mrazovou substitucí a zalitím vzorku do pryskyřice za nízké teploty, vede k výrazně lepšímu zachování buněčné struktury a vyššímu signálu při imunoznačení než při použití chemických fixativ. Tyto poznatky jsme využili v hlavní části práce, která prokázala, že MCC domény odpovídají žlábkovým invaginacím v plazmatické membráně kvasinek, tedy strukturám pozorovaným již před téměř 50 lety pomocí mrazového lámání. My jsme ukázali, že kmeny *nce102Δ* a *pil1Δ*, ve kterých jsou MCC domény poškozené či chybí, tyto žlábkové invaginace postrádají. A naopak, kmen *mak3Δ*, ve kterém jsme pozorovali abnormálně prodloužené MCC domény, měl odpovídajícím způsobem prodloužené žlábkové invaginace. Detekce proteinů Sur7 a Pil1 pomocí protilátek pro TEM pak jednoznačně prokázala lokalizaci obou proteinů do oblastí žlábkových invaginací.

Jelikož jsme ukázali, že protein Nce102 je důležitý regulátor MCC domén, zaměřili jsme se dále na objasnění jeho role v upořádání MCC. Naše analýza nepotvrdila předpoklad, že Nce102 vlastní 4 transmembránové domény, ale spíše ukázala, že Nce102 zaujímá v membráně konformaci tzv. vlásenky (*hairpin*). Toto uspořádání by mohlo pomoci objasnit způsob zapojení Nce102 do tvorby žlábkové invaginace. Ukázali jsme rovněž, že blízcí i vzdálení příbuzní proteinu Nce102 mohou zastoupit Nce102 v jeho roli při umístování proteinu Can1 do MCC, což nás vedlo k závěru, že proteiny podobné Nce102 mají pravděpodobně stejnou funkci u všech druhů v kmeni *Ascomycota*.

Poslední část této disertační práce byla inspirována naším pozorováním, že MCC se nepřekrývá s hustou sítí kortikálního ER, jež se rozprostírá v těsné blízkosti plazmatické membrány. Delece Pil1, hlavního organizátoru MCC/eisosome, vedla k abnormálnímu rozmístění kortikálního ER pod membránou. Jelikož jsme zároveň zjistili, že kortikální ER přsměrovává vezikulární transport do oblastí plazmatické membrány nepokryté ER, je jasné, že: 1) kortikální ER přispívá k funkční organizaci plazmatické membrány a 2) MCC se tohoto funkčního rozdělení PM také účastní díky svému vlivu na distribuci kortikálního ER.

V souhrnu tato práce odhalila další podstatné detaily uspořádání plazmatické membrány kvasinek. Ukázali jsme, že MCC zaujímá specifickou trojrozměrnou strukturu, což pomohlo vysvětlit neobvyklou stabilitu této domény a zároveň vedlo k objasnění struktury eisosomu. Analýza Nce102 pak odhalila způsob, kterým tento protein může přispívat k formování MCC. A v neposlední řadě jsme ukázali, že MCC ovlivňuje rozprostření kortikálního ER pod membránou, což má vliv i na rozmístění dynamických procesů v plazmatické membráně.