

## Abstrakt

Membránové rafty (také často uváděny jako nanodomény) jsou membránové struktury, které jsou zodpovědné za spoustu buněčných procesů. Jejich charakterizace je velice složitá, protože nanodomény jsou opticky průhledné, jejich velikost je pod rozlišením optických mikroskopů a dynamika je velická. Navíc vysoká různorodost buněk ještě více komplikuje jejich studium. Pro zjednodušení buněk jsou velice často používány membránové modelové systémy jako obrovské unilamelární vezikuly (GUVs) nebo podporované fosfolipidové dvojvrstvy (SPBs). V mé disertační práci byly vyvinuty, testovány a vylepšovány různé fluorescenční techniky ke studiu těchto membránových domén v modelových systémech.

Fázorová analýza, metoda pro analýzu dat dob dohasínání fluorescence, byla teoreticky a experimentálně testována a následně použita k charakterizaci membránových nanodomén v GUVs. Nejdříve jsme využili fázorovou analýzu v lipidových vezikulech ke studiu procesů excitovaných stavů, jako je jev relaxace rozpouštědla a Försterův rezonanční přenos energie (FRET). Dále jsme aplikovali fázorovou analýzu k charakterizaci interakcí mezi proteiny a ligandy, ke studiu sbalování a denaturace proteinů. Nakonec jsme použili fázorovou analýzu dat z FRET v kombinaci s fluorescenční korelační spektroskopií (FCS) k charakterizaci membránových nanodomén z hlediska velikosti, mobility a mechanismu tvorby. Jako první jsme uspěli v určování velikosti a dynamiky nanodomén v GUVs, které jsou menší než je rozlišení optického mikroskopu. Z našich poznatků jsme nakonec byli schopni udělat obecné závěry ohledně mechanismu tvorby nanodomén. Laterální difúze slabě vázaných proteinů koagulační kaskády na podporovaných membránách byla druhým membránovým procesem, který jsme studovali. Vyvinuli jsme metodu z-scan FCS v dvoubarevném v alternačním modu excitace, pomocí které jsme byli schopni současně charakterizovat laterální difúzi proteinu a lipidu. Ačkoliv difúze proteinu je dvakrát pomalejší ve srovnání s lipidy v membráně, koncentrační závislosti ukazují jistou spojitost těchto dvou difúzních procesů.