

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie



Dominika Oláhová

Dynamika mikrodomén plazmatické membrány kvasinek
Dynamics of yeast plasma membrane domains

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: Mgr. Jakub Zahumenský, Ph.D.

Praha, 2022

Charles University
Faculty of Science

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, uvedla jsem všechny použité zdroje a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze 1. 8. 2022

Oláhová Dominika

.....

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé práce Mgr. Jakobovi Zahumenskému, Ph.D. za čas, který mi věnoval, a hlavně trpělivost při psaní této bakalářské práce.

Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract	6
1. Úvod	7
2. Mikrodomény plazmatické membrány kvasinek	10
A) MCC/eisosom	10
B) MCP	12
B) MCT	13
3. Dynamika Nce 102 a Sur7 v plazmatické membráně kvasinek.....	16
A) Sur7	16
B) Nce102	17
C) Mikrodomény vyšších organismů analogické MCC/eisosom	18
4. Konfokální fluorescenční mikroskopie	19
A) Konfokální fluorescenční mikroskop	19
B) Zelený fluorescenční protein (GFP).....	20
C) Obnova fluorescence po fotovybělení (FRAP)	21
5. Vlastní experiment	23
6. Závěr.....	25
7. Zdroje	26

Abstrakt

Plazmatická membrána buněk se skládá ze specializovaných domén, které se liší svým tvarem, funkcí a velikostí. Toto rozdělení umožňuje buňkám koordinovat a oddělit velké množství různorodých procesů. Poruchy organizace buňky na úrovni membránových domén je stále více spojováno se vznikem patologických poruch. Svou roli mají mikrodomény též ve virulenci patogenních organismů, např. některých druhů kvasinek.

Jednou z nejlépe popsaných mikrodomén plazmatické membrány kvasinek je MCC (membránový kompartment argininové permeázy Can1), jenž je stabilizován proteinovým komplexem zvaným eisosome. Složení této mikrodomény je detailně popsáno, dynamika jednotlivých komponent v bazálním stavu (tj. bez stresu) dosud popsána nebyla. Cílem této práce je podrobným přehledem dostupné literatury shrnout současné poznatky o dynamice proteinů této mikrodomény a jejím vztahu s ostatními doménami buněčných membrán. Práce zároveň prostřednictvím pokročilé fluorescenční metody FRAP (česky obnova fluorescence po fotovybělení) na vlastním experimentu ukazuje, že v bazálním stavu dochází k výměně jednotlivých molekul Nce102 v mikrodoméně MCC/eisosome.

Klíčová slova: kvasinky, plazmatická membrána, membránové domény, mikroskopie, FRAP, MCC, eisosome, Sur7, Nce102

Abstract

Plasmatic cellular mebrane consists of specialized domains which differ in shape, function and size. This compartmentalization allows cells to coordinate and separate a large number of diverse processes. Disorders of cell organization at the level of membrane domains are increasingly associated with the expansion of pathological disorders. Microdomains also play a role in the virulence of pathogenic organisms, e.g. some types of yeast.

One of the best described microdomains of the yeast plasma membrane is the MCC (membrane compartment of arginine permease Can1), which is stabilized by a protein complex called the eisosome. The composition of the MCC/eisosome is described in detail, the dynamics of the individual components in the basal state (i.e. without stress) has not yet been described. The aim of this thesis is to summarize current knowledge about the dynamics of the proteins of this microdomain and its relationship with other domains of cell membranes through a detailed review of the available literature.

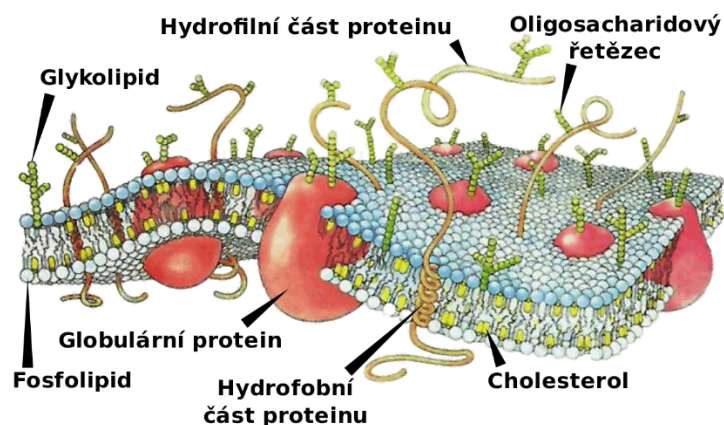
And at the same time by using the advanced fluorescence method FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) to show in my own experiment that in the basal state there is an exchange of individual Nce102 molecules in the MCC/eisosome microdomain.

Key words: yeast, plasma membrane, membrane domains, microscopy, FRAP, MCC, eisosome, Sur7, Nce102

1. Úvod

Plazmatická membrána je semipermeabilní obal oddělující buňku od vnějšího prostředí. Hraje velmi důležitou roli v regulaci řady buněčných procesů, mezi něž se řadí například buněčná signalizace, adheze a výměna iontů. Významnost plazmatické membrány dokazuje také to, že řada běžně užívaných léků cílí na komponenty plazmatické membrány (Douglas et al., 2011).

Plazmatická membrána (Obr. 1) je tvořena lipidovou dvojvrstvou, ve které se nacházejí membránové proteiny. V roce 1972 S. J. Singer a G. L. Nicolson představili tzv. model fluidní (tekuté) mozaiky, který pojednává o tom, že lipidová dvojvrstva je dvourozměrnou kapalinou a jednotlivé složky nejsou striktně vázány na jednu oblast, ale mohou zde různě difundovat a rotovat (Singer and Nicolson, 1972).



Obrázek 1 – Složení plazmatické membrány, zdroj:

https://www.ncnr.nist.gov/programs/reflect/rp/biology/cell_membrane.html

Modely, které byly představeny několik let po modelu z roku 1972 popisovaly plazmatickou membránu jako mnohem méně homogenní než původní model a obsahovaly navíc další informace, které v něm nebyly zahrnuty. Příkladem je shlukování proteinů a lipidů a jejich rozdělení do jednotlivých membránových domén (Nicolson, 1976).

Na tento model navázal popis lipidových raftů, tvořených asociací sfingolipidů a cholesterolu. Původní představa o lipidových raftech byla, že se jedná o struktury široké zhruba 100-500

nm, které jsou stabilní a drží pohromadě díky vzájemné interakci mezi lipidy. Lipidové rafty jsou tedy malé, heterogenní, vysoce dynamické domény bohaté na steroly a sfingolipidy (Pike, 2009).

Interakce mezi cholesterolem a jinými lipidy se podílejí na struktuře buněčné membrány a homeostázi cholesterolu v živých buňkách. Lipidové rafty, které těmito interakcemi vznikají, hrají klíčovou roli v řadě biologických procesů, například v regulaci membránového transportu a buněčné signalizaci v savčích buňkách. Též bylo prokázáno, že hrají významnou roli v uspořádání proteinů u kvasinek (Bagnat et al., 2000).

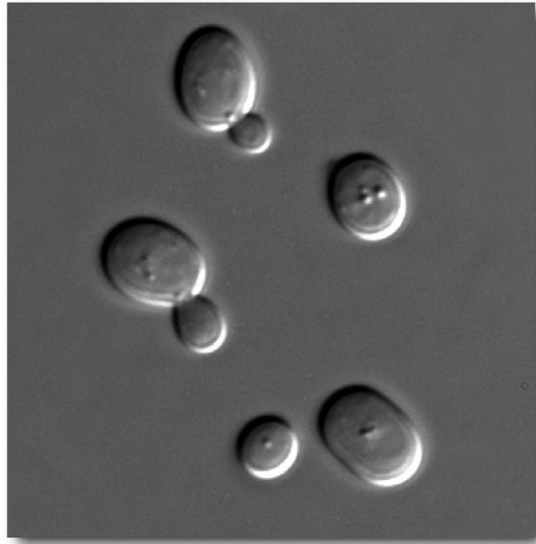
Experimenty, které rafty popisovaly však na jejich izolaci používaly detergenty, což mohlo vést k nepřírozenému shlukování různých lipidů vlivem detergentu.

V současnosti je představa rozdělení plazmatické membrány do specializovaných domén všeobecně akceptovaná. Tyto domény se liší svým tvarem, funkcí a velikostí. Tohle rozdělení je pro buňku velice výhodné, neboť umožňuje buňkám koordinovat a místně oddělit velké množství různorodých procesů.

Kvasinky (Obr. 2) jsou jednobuněčné organismy, většina z nich se řadí mezi vřeckovýtrusné houby. Mají významnou pozici zejména v potravinářském průmyslu, ať už při výrobě alkoholických nápojů nebo kynutého pečiva.

Avšak jednu z nejdůležitějších rolí převzala kvasinka (*Saccharomyces cerevisiae*) v molekulární biologii jakožto modelový organismus pro studium eukaryotních buněk. Je to pravděpodobně nejvyužívanější modelový organismus vůbec. Důvodem pro to je její krátká generační doba a s tím spojená snadná a levná kultivace a celková snadná manipulace s nimi (Sherman, 2002).

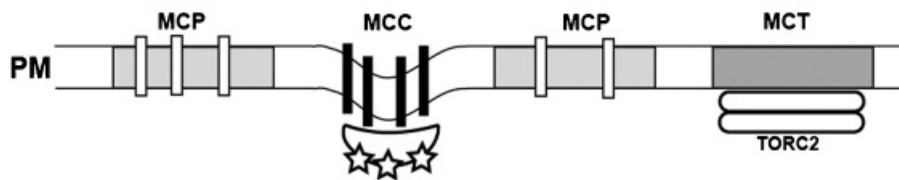
Kvasinky řadíme v rámci živočišné říše k nižším eukaryotům, ale i navzdory tomu u nich najdeme mnoho genů a proteinů, které sdílejí s vyššími eukaryoty, včetně člověka. Proto bylo a je na kvasinkách provedeno mnoho genetických a biochemických experimentů jejichž cílem je porozumět vyšším eukaryotům (Fujita et al., 2003). Velmi snadno se do nich vkládají geny a díky tomu, že dokážou růst jako haploidní buňky se ve výsledném fenotypu projeví recesivní i dominantní mutace. Můžeme proto snadno selektovat mutanty.



Obrázek 2 – *Saccharomyces cerevisiae* (Mellor, 2010)

2. Mikrodomény plazmatické membrány kvasinek

Glykosfingolipidy a proteinové receptory organizují plazmatickou membránu do malých kompartmentů nazývaných membránové domény. Jedná se o dynamické struktury obohacené o steroly a sfingolipidy nacházející se u většiny eukaryot (Malínská et al., 2003). U kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) jsou nejlépe popsány tři membránové domény (Obr. 3) a těmi jsou membránový kompartment argininové permeázy Can1 (MCC), membránový kompartment H^+ -ATPázy Pma1 (MCP) a membránový kompartment Tor komplexu 2 (MCT). Na základě lokalizace Can1-GFP a Pma1-GFP konfokálním mikroskopem byla velikost MCC odhadována na 300 nm (Malínská et al., 2003), což bylo později prokázáno prostřednictvím elektronové mikroskopie (Strádalová et al., 2009).



Obrázek 3 – mikrodomény u kvasinek (PM – plazmatická membrána, bílé pruhy – Pma1, hvězdičky – eisosomy, černé pruhy - Can1) (Bartlett and Kim, 2014)

A) MCC/eisosom

Mezi nejlépe prostudovaný kompartment u kvasinek patří membránový kompartment Can1 (MCC) (Obr. 4), který je na vnitřní straně plazmatické membrány stabilizovaný proteinovým komplexem zvaným eisosomom (Strádalová et al., 2009). To dává této mikrodoméně typický tvar žlábků, který je 300 nm dlouhý a 50 nm hluboký. Tyto mikrodomény jsou v plazmatické membráně buňky orientované náhodně a rovnoměrně rozložené, je jich cca 50-100 na buňku. Zabírají přibližně 10 % povrchu plazmatické membrány (Malínská et al., 2003). Žlábků najdeme téměř u všech hub, řas a lišejníků (Strádalová et al., 2009; Lee et al., 2015). V literatuře se termín MCC používá k popisu oblastí plazmatické membrány s integrálními proteiny, zatímco pojem eisosom se využívá k označení subkortikálního proteinového

komplexu. Ale vzhledem k tomu, že jejich funkce jsou na sobě navzájem závislé, tak se termín MCC/eisosom používá k popisu celé domény (Athanasopoulos et al., 2019).

Jádrem MCC domény jsou integrální membránové tetraspan proteiny Sur7 a Nce102 (Young et al., 2002; Fröhlich et al., 2009). Také se zde za absence jejich substrátů akumulují transportéry živin, např. Can1, Tat2, Fur4, Mup1. Tato akumulace je podmíněná přítomností Nce102 v MCC (Loibl et al. 2010). Na základě lokální akumulace barviva filipin v MCC je tato doména považována za bohatou na ergosterol (Grossmann et al., 2007).

Eisosomy jsou cytoplazmatické proteinové komplexy, které jsou tvořené zejména proteiny Pil1 a Lsp1 (Walther et al., 2006), které obsahují BAR (Bin/amphiphysin/Rvs) domény s typickým zakřivením. Každá buňka obsahuje přibližně 10^5 kopií Pil1 a Lsp1. Navzdory tomu, že si jsou velmi podobný jak stavbou, tak jejich zastoupením, každý z nich vykonává jinou funkci.

Mezi další významné proteiny nacházející se v eisosomech patří Eis1, Seg1/Ymr086w, Slm1 a Slm2 a proteinové kinázy Pkh1 a Pkh2 (Douglas and Konopka, 2014).

Vazba proteinů Pil1 a Lsp1 na PIP2 v plazmatické membráně indukuje její zakřivení (Karotki et al., 2011). Vazba Pil1 a Lsp1 na plazmatickou membránu je regulovaná fosforylací těchto proteinů prostřednictvím proteinových kináz Pkh1 a Pkh2 (Physiology and genetics, 2018; Luo et al., 2008).

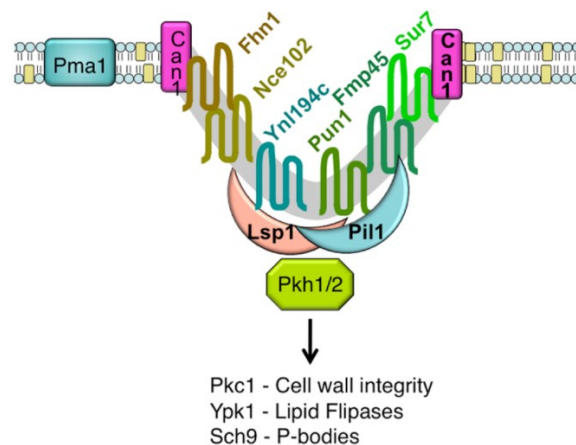
Pokud dojde k deleci Pil1, tak se velká část Lsp1 nepřipojí k plazmatické membráně a zůstane v cytoplasmě (Walther et al., 2006), což má za následek mnoho změn ve struktuře membrány. Oproti tomu při deleci Lsp1 k žádným výrazným změnám nedojde (Olivera-Couto et al., 2011).

Eisosomy jsou strukturálně a fyziologicky v těsném spojení s MCC. Jsou to velké nepohyblivé komplexy, jejichž přesná funkce stále vyvolává mnoho otázek (Bartlett and Kim, 2014).

Stejně jako v případě MCC jsou i eisosomy velmi stabilní komplexy. Původně se předpokládalo, že to je tím, že jsou propojeny s buněčnou stěnou, ale žádné další studie toto tvrzení nedokázaly potvrdit. Stabilita v eisosomálních komplexech je dána spíše vzájemnou interakcí jejich proteinů a případné mutace v nich ovlivňují strukturu samotného eisosomu (Douglas and Konopka, 2014).

Nejprve se předpokládalo, že eisosomy jsou místa, kde probíhá endocytóza (Walther et al., 2006), ale pozdější experimenty tuto domněnku vyvrátily. Zjistilo se totiž, že endocytóza probíhá primárně v MCP. Jedna z hlavních funkcí eisosomů je jejich odpověď na řadu stresorů jako je například narušení plazmatické membrány, oxidace nebo nedostatek živin. Objev protonových symportérů pro tryptofan, uracil a arginin lokalizovaných v MCC/eisosom vede ke spekulaci, že MCC/eisosom komplex se může podílet na organizaci proteinů s podobným tokem protonů (Malínská et al., 2003; Malinska et al., 2004).

Za bazálních podmínek jsou v MCC/eisosomu lokalizovány také Slm proteiny, u kterých se předpokládá též výskyt určitého typu BAR domény (Olivera-Couto et al., 2011; Berchtold et al., 2012). Během lipidového stresu způsobeného například inhibicí syntézy sfingolipidů dojde k migraci Nce102 z MCC (Fröhlich et al 2009, Zahumenský et al 2022). Tímto dojde k rozpadu eisosomu a destabilizaci celé mikrodomény. V důsledku toho se uvolní také Slm proteiny, které následně volně difundují a mohou tak fyzicky interagovat s TORC2, čímž tento komplex aktivují. Interakce mezi Slm1/2 a TORC2 vede k jejich fosforylaci a tím usnadní připojení serin/threonin kináz Ypk1/2 na TORC2. Ypk1/2 následně aktivují syntézu sfingolipidů. (Niles et al., 2012). Nedávno bylo navrženo, že nejenom Slm proteiny, ale i Nce102 by mohl napomáhat aktivaci TORC2 komplexu (Garcia-Marques et al., 2016).



Obrázek 4 – Organizace MCC komplexu (Douglas et al., 2011)

B) MCP

MCP doména obsahuje H⁺-ATPázu Pma1, což je nejvíce zastoupený enzym v plazmatické membráně hub. Jedná se o 100kDa velký polypeptid, který je ukotvený v membráně 10 hydrofobními α -helixy (Auer et al., 1998). Pma1 patří společně s MCC proteinem Sur7 mezi dlouhověkové membránové proteiny. Během experimentu vydržely tyto proteiny v mateřské buňce 7-8 buněčných dělení (Thayer et al., 2014).

Pomocí tohoto enzymu se dostávají H⁺ ven z buňky a vzniká tak elektrochemický gradient, který řídí aktivní příjem živin a anorganických iontů napříč plazmatickou membránou (Wolf et al., 2012). S objevem Pma1, který se podílí na vzniku protonového gradientu v plazmatické membráně a Can1, který ho využívá, vyvstala otázka, zda se nacházejí ve stejné membránové mikrodoméně. Bylo ale ukázáno, že oba dva se nacházejí v odlišných nepřekrývajících se doménách (Malínská et al., 2003). Na základě pozorování konfokálním mikroskopem se předpokládalo, že MCP se jeví jako rozsáhlá síť, ale elektronová mikroskopie ukázala, že se jedná o jednotlivé hexamerní struktury (Zhao et al., 2021; Malinsky a Opekarova, 2016).

Proč dochází k segregaci Pma1 do konkrétní domény místo toho, aby byl rovnoměrně distribuován není známo, ale bylo dokázáno, že pokud se pokusíme uměle vložit například Can1 do MCP, tak aktivita Can1 bude značně zpomalena, což naznačuje důležitost složení lipidového okolí pro správnou aktivitu proteinů (Spira et al., 2012). MCC je považovaný za bohatý na ergosterol, zatímco MCP na sfingolipidy.

MCP je stabilní v čase a bylo ukázáno, že udržování MCP není přímo ovlivněno aktinovým cytoskeletem a mikrotubuly (Malinska et al., 2004). Navzdory rozmanitému a neustále se měnícímu extracelulárnímu prostředí si houby udržují poměrně konstantní hodnotu intracelulárního pH. Pma1 patří společně s V-ATPázou k faktorům, které se podílejí na udržování tohoto vnitřního prostředí (Kane, 2016).

C) MCT

Během růstu a dělení buněk je potřeba koordinovat mnoho fyziologických procesů. Na této regulaci se významně podílí tzv. TOR kináza. Jedná se o konzervovanou serin/threonin kinázu, která je dnes známá téměř u všech eukaryotických organismů a je cílem inhibitoru proliferace nazývaným rapamycin (De Virgilio and Loewith, 2006).

TOR se nachází ve dvou odlišných multiproteinových komplexech: vakuolární TORC1 a TORC2 v plazmatické membráně. U savců nazývaných mTORC1 a mTORC2 (Inoki et al., 2005).

Komplexy TOR jsou konzervované v eukaryotech s několika výjimkami u některých parazitů a překvapivě se TORC2 téměř vůbec nevyskytuje u rostlin (Rexin et al., 2015).

TORC2 je součástí další důležité mikrodomény plazmatické membrány MCT (membránový kompartment TOR2 komplexu). TORC2 se skládá z Tor2 kinázy a Lst8 a proteinových podjednotek Avo1, Avo2 a Avo3 a Bit61 (Loewith et al., 2002).

Avo3 obsahuje tzv. armadillo (ARM) doménu, která má tvar α -helixu. Proteiny obsahující ARM domény vážou velké substráty, jako jsou proteiny nebo nukleové kyseliny (Javadi and Itzhaki, 2013). Avo3 je nutné pro strukturální integritu TORC2 (Wullschleger et al., 2005).

Avo3 je tedy jádrem tohoto komplexu. Vazba TORC2 komplexu na plazmatickou membránu je zabezpečena proteinem Avo1, který obsahuje PH doménu, která váže Ypk2p (Pan D and Matsuura Y, 2012).

Podílí se zejména na řízení buněčné polaridy, polymerizaci aktinu a endocytóze (Loewith et al., 2002).

TORC2 je klíčovým při syntéze lipidů (Gaubitz et al., 2015) a celkově pro fyziologii buňky. Dokazuje to to, že několik složek tohoto komplexu (Lst8, Avo1, Avo3 a Tor2) jsou nezbytné pro životaschopnost kvasinek. Delece Tor2 je pro buňky letální, dojde k zastavení v G1 fázi mitózy, buňka nemůže přejít do S fáze a je nucena přejít do stacionární G₀ fáze (Barbet et al., 1996).

U kvasinek je hlavním substrátem TORC2 AGC kináza Ypk1, její nadprodukce potlačuje všechny známé fenotypy spojené se ztrátou aktivity TORC2, včetně letality, která vzniká absencí základních složek tohoto komplexu (Niles et al., 2012).

Tato doména na rozdíl od MCC a MCP není stabilní v čase a je pohyblivá. V časové škále několika vteřin neustále mizí a znovu se objevuje. Dochází k jejímu dělení, spojování a celkovému pohybu v membráně (Berchtold and Walther, 2009). MCT sice sousedí s eisosomy, ale nikdy se s nimi nepřekrývá. Jak už bylo řečeno výše eisosomy se podílejí na aktivaci TORC2 prostřednictvím Slm1 a Slm2 proteinů.

TORC2 má funkční analog na vakuolární membráně zvaný TORC1. TORC1 je spojen s vakuolární membránou prostřednictvím interakce s proteinem Gtr2, podjednotkou GTPázy stimuluje TORC1. Funkcí TORC1 je regulace buněčného cyklu v závislosti na dostupnosti

živin. Existuje mnoho podobností mezi lokalizací Nce102 v plazmatické membráně a ve vakuolární membráně. V obou najdeme Nce102 v oblastech bohatých na ergosterol. Jelikož byla dokázána souvislost mezi Nce102 a TORC2, tak se dá předpokládat, že by podobná souhra mohla existovat také na vakuolární membráně, mezi Nce102 a TORC1 (Vaskovicova et al., 2020).

Jak TORC1 a TORC2 získaly odlišné funkce není známo, také není známo jak přesně buňka reguluje to, že nedochází ke zkřížení signálů z jejich identických kináz (Berchtold and Walther, 2009).

3. Dynamika Nce102 a Sur7 v plazmatické membráně kvasinek

A) Sur7

Jednou z rodin membránových tetraspan proteinů v MCC je Sur7 a paralogní proteiny Fmp45, Pun1 a Ynl194c. Je to jeden z nejstabilnějších proteinů u kvasinek. Je v membráně od doby, kdy buňka vypočítá až do její smrti (Thayer et al., 2014).

Během pozorování fluorescenčně značeného Sur7 se zjistilo, že se tento protein lokalizuje do mikrodomén, konkrétně MCC (Young et al., 2002; Malínská et al., 2003) a setrvává zde i za absence membránového potenciálu (Grossmann et al., 2007). Jedná se o supresor mutací v Rvs161 a Rvs167 proteinech, což jsou proteiny uplatňující se v polarizaci aktinu, endocytóze a fúzi buněk (Young et al., 2002).

U *Saccharomyces cerevisiae* Sur7p rodina zahrnuje 3 integrální proteiny (Sur7, Ynl194 a Ydl222). Každý z nich má vlastní signální sekvenci a tři transmembránové helixy (Young et al., 2002). U *C. Albicans* bylo prokázáno, že mutací v tomto genu dojde k narušení množství sfingolipidů a k celkovému narušení osmotické rovnováhy buňky a dalším defektům v některých buněčných procesech jako například sporulaci (Douglas et al., 2012).

Dále bylo zjištěno, že v *C. albicans* Sur7 hraje roli například v regulaci polarizace aktinu, morfogenezi, syntéze buněčné stěny a především v odpovědi na stresové faktory. Jeho nepřítomnost vede k hrubší, ale slabší buněčné stěně. Sur7 má omezenou mobilitu a ta není závislá na aktinu, mikrotubulech ani buněčné stěně (Alvarez et al., 2009).

C. albicans je celkově zajímavý organismus pro analýzu funkce plazmatické membrány, zejména pro pochopení mechanismů běžně používaných antifungálních léků (Odds et al., 2003). *C. albicans*, kterým chyběl Sur7 se ukázaly jako mnohem náchylnější k napadení makrofágy a ukázaly výrazně sníženou virulenci oproti buňkám, které obsahovaly Sur7. Tudiž Sur7 a další MCC komponenty představují pole pro budoucí výzkum v boji proti infekcím (Douglas et al., 2012).

B) Nce102

Nce102 je membránový tetraspan protein, který je důležitou složkou MCC/eisosom mikrodomény a bylo prokázáno, že jeho přítomnost hraje významnou roli v udržování její stability. Absence Nce102 vede k celkovému poklesu počtu eisosomů v plazmatické membráně buňky (Fröhlich et al., 2009). Bylo ukázáno, že jeho C-konec je nezbytnou součástí pro lokalizaci Nce102 do MCC a pro tvorbu rýhovitých invaginací na povrchu plazmatické membrány (Loibl et al., 2010).

C. albicans bez Nce102 má problém tvořit pravé hyfy a invadovat do agaru o nízké hustotě, naopak do agaru s vysokou hustotou proniká velmi dobře, což není u mutantů s narušenou invazivitou běžné. Celková virulence *nce102Δ/Δ* stejně jako *sur7Δ/Δ*, je výrazně snížena (Douglas et al., 2013).

Hraje důležitou roli ve sfingolipidové signalizaci (Fröhlich et al., 2009; Zahumenský et al., 2022). Není nezbytný pro syntézu sfingolipidů, ale mění svou pozici v plazmatické membráně v reakci na změny jejich hladin. Se stárnutím buněčné kultury a nárůstem hladiny sfingolipidů též migruje do mikrodomén vakuolární membrány (Vaskovicova et al., 2020).

Nce102 je distribuován mezi dvě membránové domény, mezi MCC a zbytek plazmatické membrány. Nce102 negativně reguluje aktivitu Pkh kináz, v přítomnosti sfingolipidů blokuje jejich funkce. Naopak pokud je syntéza sfingolipidů potlačena, tak Nce102 opouští MCC a tím se dostává pryč od Pkh kináz a díky tomu ustává jejich inhibice (Fröhlich et al., 2009; Zahumenský et al., 2022).

To, že Nce102 opustí MCC vede k hyperfosforylaci Pil1 a tudíž tedy k rozpadnutí struktury eisosomů (Fröhlich et al., 2009). Tento proces vede k uvolnění Slm1 a Slm2 proteinů z MCC, které aktivují cíl rapamycinového komplexu 2 (TORC2), neboli důležitého lipidového biosyntetického regulátoru (Riggi et al., 2020) viz výše. Bylo navrženo, že Nce102 by mohl přímo interagovat s TORC2 a napomáhat k jeho aktivaci (Garcia-Marquez, et al., 2006).

Nce102 patří mezi proteiny obsahující MARVEL (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link) doménu. MARVEL doménu obsahující proteiny se vyskytují v oblastech membrány bohatých na cholesterol, jako jsou těsné spoje. Jejich úplně přesná funkce není známa, ale předpokládá se, že by se mohly podílet například na vzniku

transportních váčků v buňce. Proteiny obsahující MARVEL doménu se skládají ze čtyř transmembránových helixů, C a N konec mají orientovaný dovnitř cytoplazmatické membrány (Sánchez-Pulido et al., 2002).

C) Mikrodomény vyšších organismů analogické MCC/eisosom

S doménami MCC/eisosom jsou příbuzné mikrodomény savčí plazmatické membrány zvané kaveoly. Jedná se o 50-100 nm prohlubeniny, které jsou stabilizovány pomocí proteinu kaveolin. Kaveolin a kaveoly jsou odolné vůči vysokým koncentracím solí (Rothberg et al., 1992) a poprvé byly kaveoly identifikovány v endoteliálních buňkách před více než 60 lety (Yamada, 1955).

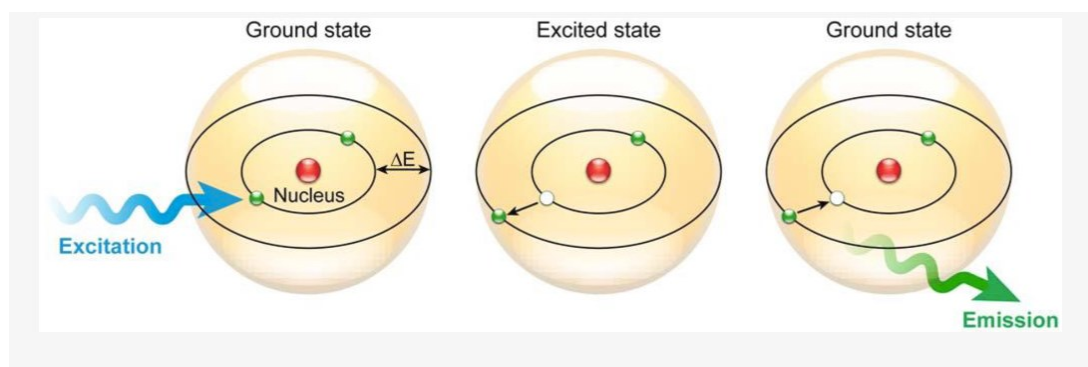
Kaveoly nejsou pravidelně uspořádány na buněčném povrchu. Nacházejí se v blízkosti aktinových vláken (Rothberg et al., 1992). Mají podobné lipidové a proteinové složení jako lipidové rafty a podílejí se zejména na přenosu membránových váčků a homeostázi cholesterolu (Ortegren et al., 2006). Vykazují celkově závislost na cholesterolu. Vystavení jejich membrán cholesterol-vázajícím lékům způsobilo vyhlazení invaginací na jejich povrchu a nakonec došlo i k jejich rozpadu (Rothberg et al., 1992). Kromě přenášení molekul přes endoteliální buňky, k jejich funkcím dále patří přijímání malých molekul a sekvestrování signálních molekul v doménách plazmatické membrány (Couet et al., 1997).

Další struktury, které slouží jako analogy MCC u živočichů, jsou těsná spojení (tight junctions), které se nacházejí v epitelech a slouží jako bariéra difúze rozpuštěných látek. Jedná se o dynamické struktury zajišťující přechod iontů a molekul. Jsou tvořeny specifickými proteiny nazývanými okludiny a kladiny. Tyto proteiny jsou schopné interagovat s komplementárními molekulami sousedních buněk a laterálně kopolymerovat, nebo-li ze dvou a více nízkomolekulárních látek tvořit látky makromolekulární (González-Mariscal et al., 2003).

4. Konfokální fluorescenční mikroskopie

A) Konfokální fluorescenční mikroskop

Principem fluorescence je absorpce fotonu molekulou chromoforu v základním stavu, čímž dojde k přenesení elektronu v elektronovém obalu do jedné z vyšších energetických vrstev, a tedy k přechodu molekuly do excitovaného stavu (Obr. 5). Elektron v tomto stavu zůstane nějaký čas a poté se vrátí na základní hladinu, přičemž dojde k uvolnění energie v podobě elektromagnetického záření. Toto emitované světlo má ve srovnání se světlem, které bylo absorbováno menší energii (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012).



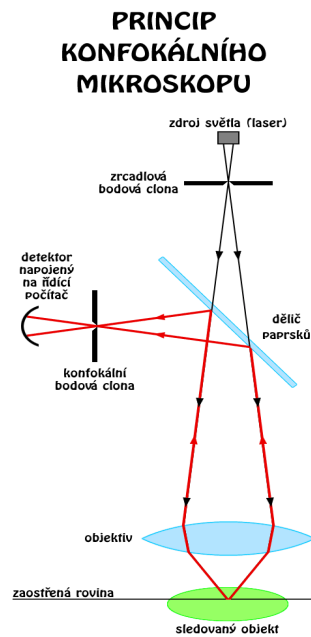
Obrázek 5 – princip fluorescence (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012)

Jako první se konfokální mikroskopií zabýval Marvin Minsky, který si konfokální mikroskop v roce 1957 nechal patentovat.

Nezávisle na něm si v polovině šedesátých let v tehdejší Československu M. Petráň a M. Hadravský nechali patentovat laserový rastrovací konfokální mikroskop. Ale i přesto se ve vědeckém odvětví začal více využívat až v 80. letech. V té době byl totiž na vzestupu elektronový mikroskop, který byl cenově mnohem lépe dostupný, jelikož konfokální mikroskop vyžadoval laser s vysokou intenzitou (Merchant et al., 2005).

Konfokální mikroskopie je mikroskopie jejíž výhodou je vysoká rozlišovací schopnost a možnost dosažení vyššího kontrastu. Důležitou vlastností je jeho schopnost potlačení neostrého signálu pocházejícího z rovin pod a nad rovinou zaostření a možnost snímání jednotlivých rovin (tzv. „optických řezů“), které lze posléze skládat a získat tak obraz preparátu s trojrozměrným rozlišením.

Jako zdroj světla v konfokálním mikroskopu slouží laser, který přes bodovou konfokální clonu a následně objektiv osvětluje preparát. Tento objektiv poté sbírá světlo, které vzorek odrazil, rozptýlil nebo vyzářil (například fluorescencí). Po zpětném průchodu objektivem je světlo pomocí děliče paprsků lokalizováno před fotonásobič na další konfokální clonku, jež filtruje signál pocházející z rovin mimo rovinu zaostření. Následně světlo dopadá na detektor, zpravidla fotonásobič (Plášek, 1995). (Obr. 6)



Obrázek 6 – princip konfokálního mikroskopu, zdroj: wikisripta.eu/w/konfokální_mikroskop

B) Zelený fluorescenční protein (GFP)

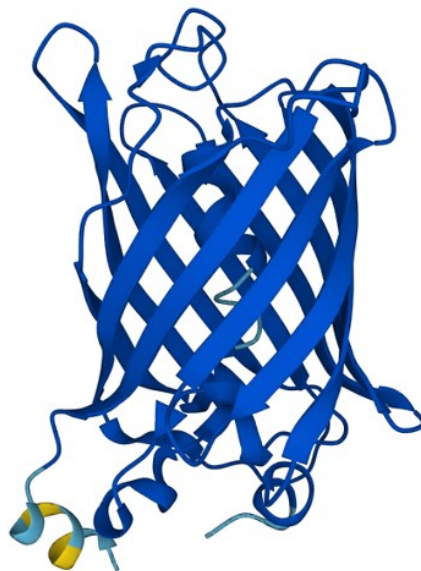
Zelený fluorescenční protein (GFP, z anglického green fluorescent protein) je protein, který pod ultrafialovým světlem vydává zelené fluorescenční záření. Poprvé ho izoloval Osamu Shimomura z mořské medúzy *Aequorea victoria* roku 1962 (Shimomura et al., 1962).

GFP je velmi stabilní protein skládající se z 238 aminokyselin. Tvoří tzv. β -barel, který je tvořen 11 β -skládanými listy obtočenými kolem jednoho centrálního helixu (Ormö et al., 1996). (Obr. 7)

Z 238 aminokyselin se 3 z nich podílejí na tvorbě struktury chromoforu, který má dvě excitační maxima – 395 nm (hlavní) a 475 nm (vedlejší). Po excitaci tento chromofor

vyzařuje viditelné zelené fluorescenční záření v okolí 509 nm. GFP interaguje uvnitř medúzy s dalším proteinem zvaným aequorin, který vyzařuje modré záření při interakci s vápníkem.

V buněčné biologii je využíván jako tzv. marker protein. Za využití DNA rekombinačního aparátu buňky se GFP gen vloží za gen kódující protein zájmu a tyto geny se následně exprimují jako jediný, tzv. fúzní, protein. To následně umožňuje studium lokalizace konkrétního proteinu a jeho dynamiku přímo v živé buňce ('Zou, Yawen, "Green Fluorescent Protein". Embryo Project Encyclopedia (2014-06-11)', n.d.).



Obrázek 7 - struktura GFP proteinu, zdroj: <https://alphafold.com/entry/P42212>

C) Obnova fluorescence po fotovybělení (FRAP)

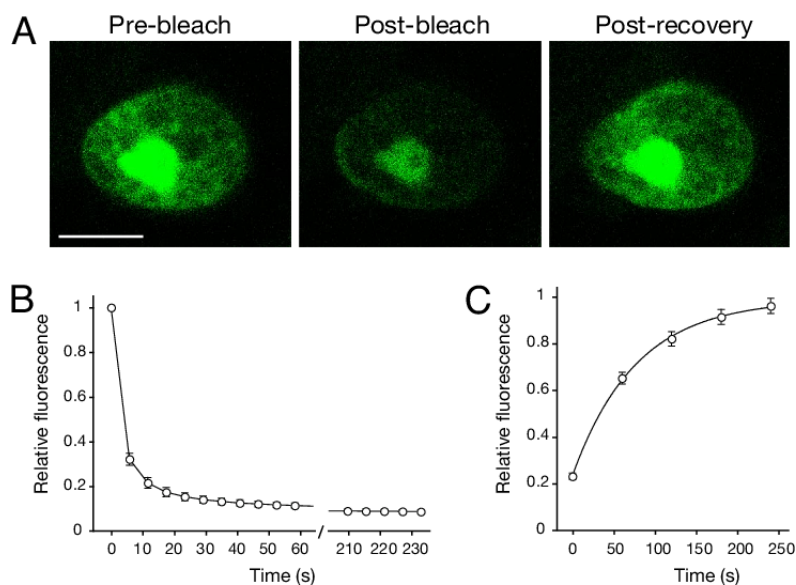
Metoda FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) se využívá ke studiu mobility proteinů v živých buňkách. Byla vynalezena v roce 1970. Nejdříve našla využití v pozorování difúze v buněčných membránách používáním fluorescenčních barviv, následně s rozvojem konfokální mikroskopie i v cytosolu. Dnes se jedná o jednu z nejpoužívanějších metod mikroskopie napříč biologií (Sprague and McNally, 2005).

Metoda FRAP je využitelná pro studium dynamiky molekul a proteinů, rychlosti jejich výměny a propojení mezi jednotlivými buněčnými kompartmenty. Její principem je, že

pulsem laserového záření vysoké intenzity se cíleně vybělí fluorescenční protein, např. GFP, v konkrétní oblasti živé buňky. Fotovybělení ve většině molekul fluorochromu vyžaduje přechod do excitovaného stavu a přítomnost molekulárního kyslíku. Vysoká intenzita světla a molekulární kyslík způsobí nevratné poškození molekul fluorochromu a tyto molekuly už nejsou schopny fluorescence. Následně se v čase sleduje postupná obnova fluorescence v této oblasti (Obr. 8). Jelikož je fotobělení nevratný proces, znamená obnova fluorescence difúzi molekul z okolí (Soumpasis, 1983).

Molekuly podílející se na výměně představují tzv. mobilní frakci (Y_M), zatímco ta část molekul, které se na výměně podílet nemůže je nazývána imobilní frakce (I_f). FRAP nám umožňuje náhled na vlastnosti a interakce ve vnitrobuněčném prostředí buňky. (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012).

Účelem experimentů je analýza snímků získaných z konfokálního mikroskopu a následné vytvoření grafu, který zobrazí změny intenzity fluorescence v čase v odbarvených oblastech pozorovaných buněk. Z tohoto grafu se dá poté vypočítat mobilní a imobilní frakce na základě poměrů mezi počátečním a koncovým stavem intenzity fluorescence, a též rychlost obnovy fluorescence (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012).



Obrázek 8 – obnovení fluorescence po vybělení (Chapman et al., 2008)

5. Vlastní experiment

V následujícím experimentu byly použity kvasinky *S. cerevisiae*, které byly pěstovány po dobu 24 hodin.

Kmen: Y240 (BY4742; NCE102::GFP::URA3; GFP byl do BY4742 vnesen pomocí plasmidu Ylp211; (Vaskovicova et al., 2020))

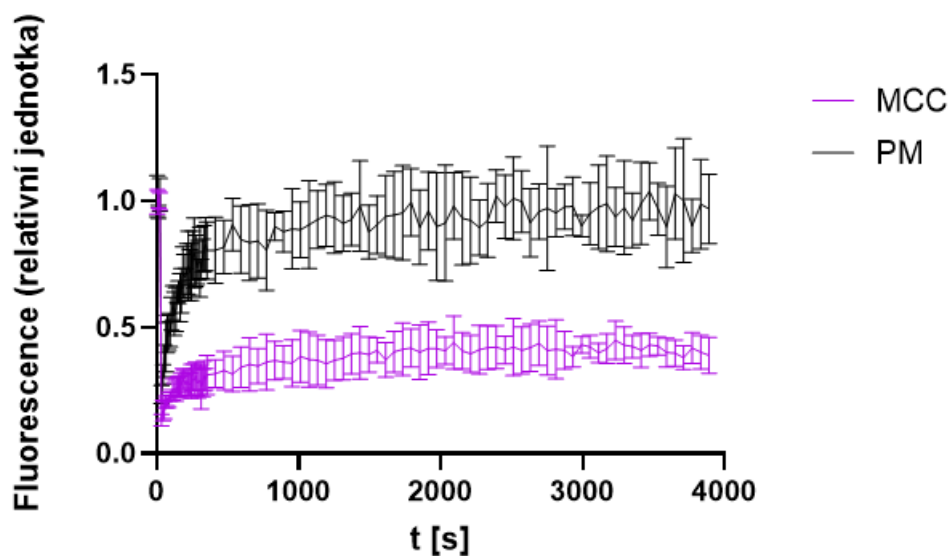
Po krátké centrifugaci (2 min při 2000g) bylo 1 μ l buněčné suspenze imobilizováno na 0.17 mm krycím sklíčku tenkou vrstvou 1% agarózy připravené v 50mM roztoku hydrogenfosforečnanu draselného.

K práci byl využit rastrovací konfokální mikroskop Zeiss LSM 880 vybaven 100 \times PlanApochromat imerzním objektivem s numerickou aperturou (NA) = 1.4.

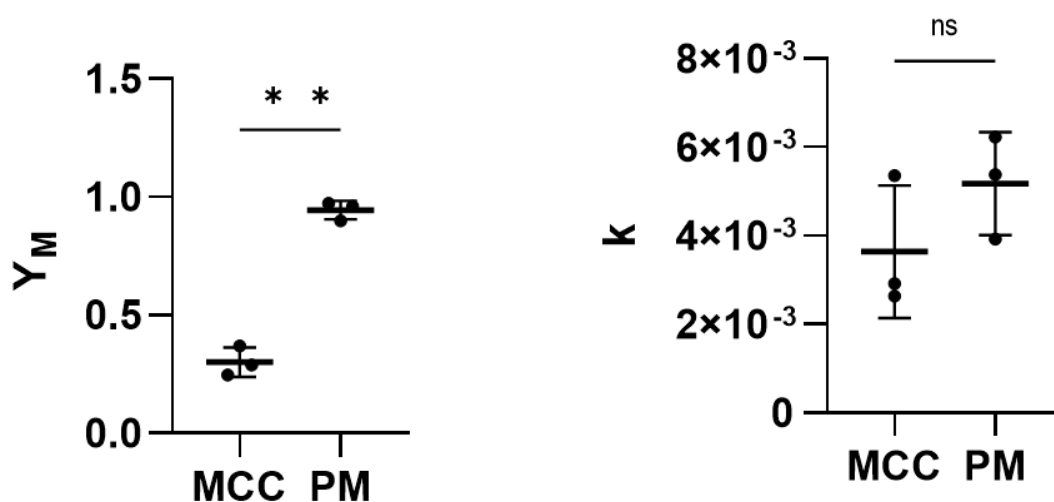
Fluorescenční signál GFP byl excitován argonovým laserem o vlnové délce 488 nm a detekován pomocí 500-545 nm emisního filtru.

Snímky byly analyzovány pomocí softwaru Fiji (ImageJ) a graf obnovy fluorescence byl vytvořený pomocí Graphpad Prism 9.

Cílem této práce bylo prostřednictvím metody FRAP dokázat, že navzdory tomu, že MCC/eisosom je stabilní mikrodoména, tak zde dochází k určité výměně komponent. Zaměřili jsme se konkrétně na protein Nce102. V experimentu byla naše hypotéza dokázána, jelikož došlo k výměně molekul Nce102 v mikrodoméně.



Graf 1 – obnova fluorescence v sekundách po fotovybělení. Byly snímány v čase tangenciální optické řezy buněk *S.cerevisiae* exprimujících *NCE102-GFP*. Na vybělení v čase $t=0s$ byl použit argonový laser o vlnové délce 488nm a intenzitě 100 %. Následně byla fluorescence snímána po 10 sekundách a po 10 minutách v intervale 60 sekund. Pro MCC i plazmatickou membránu (PM) bylo vybráno pro každý z nich 5 oblastí. Korekce laterálních pohybů a odečet intenzit jednotlivých oblastí byl provede pomocí software ImageJ. Po odečtu pozadí a korekci na bílení byla provedena normalizace na stav před bělícím pulsem. Získané hodnoty jsou vynesené v grafu jako střední hodnota se směrodatnou odchylkou. Graf je reprezentativní ze 3 nezávislých experimentů.



Graf 2 a 3 – levý graf ukazuje, že míra obnovy fluorescence (odpovídající mobilní frakci Y_M) v plazmatické membráně (PM) byla 100 % a v mikrodoméně cca 35 %, pravý graf ukazuje rychlostní konstantu k a popisuje, jak dlouho trvá, než nastane rovnováha po vybělení. Tato rychlost byla srovnatelná v obou oblastech. Pro určení signifikace jsme použili párový t-test, 2 hvězdičky jsou pro p menší než 0.01, ns znamená nesignifikantní.

6. Závěr

O plazmatické membráně toho dnes už spoustu víme. Je nezbytná pro životaschopnost buňky, protože se podílí na řadě důležitých procesů, zejména na oddělení intracelulárního prostředí buňky od jejího okolí. Její povrch je organizovaný do malých kompartmentů nazývaných membránové domény. Nejlépe prozkoumané domény u kvasinek jsou MCC, MCP a MCT. Navzdory ale spoustě experimentů, i tak spousta kompartmentů stále nemá přesně definovanou funkci. Je však ale jasné, že jejich studium nám otevírá spoustu potenciálních odpovědí zejména ve vývoji v oblasti léčiv.

MCC/eisosom komplex obsahuje několik tetraspan proteinů. Sur7 a Nce102 jsou nejvýznamnější z nich. U Sur7 se očekává hlavně strukturní funkce vzhledem k jeho interakcím s aktinem a celkově narušení buněčné morfologie při jeho absenci například u *C. albicans*. U Nce102 se naopak předpokládá, že má zejména regulační funkci, jelikož jeho absence v membránových doménách narušuje řadu fyziologických procesů v buňce, zejména se podílí na stabilitě MCC komplexu a též má vliv na Pkh kinázy, které hrají důležitou roli v sfingolipidové signalizaci. Avšak jejich přesná struktura a řada dalších funkcí je také stále neznámá.

Jelikož nebyly klasickými metodami konfokální mikroskopie v čase pozorovány změny ve stavbě MCC/eisosomu za bazálních podmínek, je tato mikrodoména považována za stabilní. Je však zcela oprávněné předpokládat, že k určité výměně jejích komponent v čase dochází. Tato hypotéza byla v rámci bakalářské práce potvrzena metodou FRAP pro protein MCC, kde jsme zjistili, že cca 40 % populace Nce102 v MCC je mobilní. Naproti tomu, v okolí té plazmatické membrány je mobilní všechen Nce102. Tento výsledek ukazuje, že abychom byli schopni kompletně popsat a pochopit mikrodoménové složení plazmatické membrány, je nutno uvažovat nejenom ustálený stav mikrodomén, ale taky výměnu jejích komponent, ke kterým dochází neustále.

7. Zdroje

- Alvarez, F. J. et al. (2009) The Sur7 protein resides in punctate membrane subdomains and mediates spatial regulation of cell wall synthesis in *Candida albicans*. *Communicative & Integrative Biology*. [Online] 2 (2), 76–77.
- Anon (2018) *Physiology and genetics: selected basic and applied aspects*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg.
- Anon (n.d.) Zou, Yawen, 'Green Fluorescent Protein'. *Embryo Project Encyclopedia (2014-06-11)*.
- Athanasopoulos, A. et al. (2019) Fungal plasma membrane domains. *FEMS Microbiology Reviews*. [Online] 43 (6), 642–673.
- Auer, M. et al. (1998) Three-dimensional map of the plasma membrane H⁺-ATPase in the open conformation. *Nature*. [Online] 392 (6678), 840–843.
- Bagnat, M. et al. (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [Online] 97 (7), 3254–3259.
- Barbet, N. C. et al. (1996) TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Molecular Biology of the Cell*. [Online] 7 (1), 25–42.
- Bartlett, K. & Kim, K. (2014) Insight into Tor2, a budding yeast microdomain protein. *European Journal of Cell Biology*. [Online] 93 (3), 87–97.
- Berchtold, D. et al. (2012) Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nature Cell Biology*. [Online] 14 (5), 542–547.
- Berchtold, D. & Walther, T. C. (2009) TORC2 Plasma Membrane Localization Is Essential for Cell Viability and Restricted to a Distinct Domain Carole Parent (ed.). *Molecular Biology of the Cell*. [Online] 20 (5), 1565–1575.
- Chapman, S. et al. (2008) The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [Online] 105 (50), 20038–20043.
- Couet, J. et al. (1997) Molecular and Cellular Biology of Caveolae. *Trends in Cardiovascular Medicine*. [Online] 7 (4), 103–110.
- De Virgilio, C. & Loewith, R. (2006) The TOR signalling network from yeast to man. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. [Online] 38 (9), 1476–1481.
- Douglas, L. M. et al. (2011) Membrane Compartment Occupied by Can1 (MCC) and Eisosome Subdomains of the Fungal Plasma Membrane. *Membranes*. [Online] 1 (4), 394–411.

- Douglas, L. M. et al. (2012) Sur7 Promotes Plasma Membrane Organization and Is Needed for Resistance to Stressful Conditions and to the Invasive Growth and Virulence of *Candida albicans* Judith Berman (ed.). *mBio*. [Online] 3 (1), e00254-11.
- Douglas, L. M. et al. (2013) The MARVEL Domain Protein Nce102 Regulates Actin Organization and Invasive Growth of *Candida albicans* Joseph Heitman (ed.). *mBio*. [Online] 4 (6), e00723-13.
- Douglas, L. M. & Konopka, J. B. (2014) Fungal Membrane Organization: The Eisosome Concept. *Annual Review of Microbiology*. [Online] 68 (1), 377–393.
- Fröhlich, F. et al. (2009) A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *Journal of Cell Biology*. [Online] 185 (7), 1227–1242.
- Fujita, K. et al. (2003) Yeast pheromone signaling pathway as a bioassay to assess the effect of chemicals on mammalian peptide hormones. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. [Online] 56 (3), 358–366.
- Gaubitz, C. et al. (2015) Molecular Basis of the Rapamycin Insensitivity of Target Of Rapamycin Complex 2. *Molecular Cell*. [Online] 58 (6), 977–988.
- González-Mariscal, L. et al. (2003) Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. [Online] 81 (1), 1–44.
- Grossmann, G. et al. (2007) Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *The EMBO Journal*. [Online] 26 (1), 1–8.
- Grossmann, G. et al. (2008) Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *Journal of Cell Biology*. [Online] 183 (6), 1075–1088.
- Inoki, K. et al. (2005) Signaling by Target of Rapamycin Proteins in Cell Growth Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. [Online] 69 (1), 79–100.
- Ishikawa-Ankerhold, H. C. et al. (2012) Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*. [Online] 17 (4), 4047–4132.
- Javadi, Y. & Itzhaki, L. S. (2013) Tandem-repeat proteins: regularity plus modularity equals design-ability. *Current Opinion in Structural Biology*. [Online] 23 (4), 622–631.
- Kane, P. M. (2016) ‘Proton Transport and pH Control in Fungi’, in José Ramos et al. (eds.) *Yeast Membrane Transport*. Advances in Experimental Medicine and Biology. [Online]. Cham: Springer International Publishing. pp. 33–68. [online]. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-25304-6_3 (Accessed 17 July 2022).
- Karotki, L. et al. (2011) Eisosome proteins assemble into a membrane scaffold. *Journal of Cell Biology*. [Online] 195 (5), 889–902.
- Kim, J. & Kim, E. (2016) Rag GTPase in amino acid signaling. *Amino Acids*. [Online] 48 (4), 915–928.

- Lee, J.-H. et al. (2015) Eisosome Ultrastructure and Evolution in Fungi, Microalgae, and Lichens. *Eukaryotic Cell*. [Online] 14 (10), 1017–1042.
- Loewith, R. et al. (2002) Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. *Molecular Cell*. [Online] 10 (3), 457–468.
- Loibl, M. et al. (2010) C Terminus of Nce102 Determines the Structure and Function of Microdomains in the *Saccharomyces cerevisiae* Plasma Membrane. *Eukaryotic Cell*. [Online] 9 (8), 1184–1192.
- Luo, G. et al. (2008) The Sphingolipid Long-chain Base-Pkh1/2-Ypk1/2 Signaling Pathway Regulates Eisosome Assembly and Turnover. *Journal of Biological Chemistry*. [Online] 283 (16), 10433–10444.
- Malinska, K. et al. (2004) Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *Journal of Cell Science*. [Online] 117 (25), 6031–6041.
- Malínská, K. et al. (2003) Visualization of Protein Compartmentation within the Plasma Membrane of Living Yeast Cells. *Molecular Biology of the Cell*. [Online] 14 (11), 4427–4436.
- Mellor, J. (2010) Epigenetics and aging. *The Biochemist*. [Online] 32 (5), 14–17.
- Merchant, F. A. et al. (2005) ‘Confocal Microscopy’, in *Handbook of Image and Video Processing*. [Online]. Elsevier. pp. 1291–XLI. [online]. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780121197926501352> (Accessed 18 July 2022).
- Nicolson, G. L. (1976) Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. [Online] 457 (1), 57–108.
- Niles, B. J. et al. (2012) Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [Online] 109 (5), 1536–1541.
- Odds, F. C. et al. (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology*. [Online] 11 (6), 272–279.
- Olivera-Couto, A. et al. (2011) The eisosome core is composed of BAR domain proteins David G. Drubin (ed.). *Molecular Biology of the Cell*. [Online] 22 (13), 2360–2372.
- Ormö, M. et al. (1996) Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science*. [Online] 273 (5280), 1392–1395.
- Ortengren, U. et al. (2006) Separation and characterization of caveolae subclasses in the plasma membrane of primary adipocytes; segregation of specific proteins and functions. *FEBS Journal*. [Online] 273 (14), 3381–3392.

- Pike, L. J. (2009) The challenge of lipid rafts. *Journal of Lipid Research*. [Online] 50S323–S328.
- Plášek, J. (n.d.) *Časopis Vesmír - Konfokální Mikroskopie*. 1995 (9), . [online]. Available from: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1995/cislo-9/konfokalni-mikroskop.html>.
- Rexin, D. et al. (2015) TOR signalling in plants. *Biochemical Journal*. [Online] 470 (1), 1–14.
- Riggi, M. et al. (2020) The flipside of the TOR coin – TORC2 and plasma membrane homeostasis at a glance. *Journal of Cell Science*. [Online] 133 (9), jcs242040.
- Rothberg, K. G. et al. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. [Online] 68 (4), 673–682.
- Sánchez-Pulido, L. et al. (2002) MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends in Biochemical Sciences*. [Online] 27 (12), 599–601.
- Sherman, F. (2002) ‘Getting started with yeast’, in *Methods in Enzymology*. [Online]. Elsevier. pp. 3–41. [online]. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007668790250954X> (Accessed 2 August 2022).
- Shimomura, O. et al. (1962) Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. [Online] 59 (3), 223–239.
- Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes: Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. *Science*. [Online] 175 (4023), 720–731.
- Soumpasis, D. M. (1983) Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal*. [Online] 41 (1), 95–97.
- Spira, F. et al. (2012) Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nature Cell Biology*. [Online] 14 (6), 640–648.
- Sprague, B. & McNally, J. (2005) FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends in Cell Biology*. [Online] 15 (2), 84–91.
- Strádalová, V. et al. (2009) Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *Journal of Cell Science*. [Online] 122 (16), 2887–2894.
- Thayer, N. H. et al. (2014) Identification of long-lived proteins retained in cells undergoing repeated asymmetric divisions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [Online] 111 (39), 14019–14026.
- Vaskovicova, K. et al. (2020) Plasma Membrane Protein Nce102 Modulates Morphology and Function of the Yeast Vacuole. *Biomolecules*. [Online] 10 (11), 1476.

- Walther, T. C. et al. (2006) Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature*. [Online] 439 (7079), 998–1003.
- Wolf, W. et al. (2012) Yeast Ist2 Recruits the Endoplasmic Reticulum to the Plasma Membrane and Creates a Ribosome-Free Membrane Microcompartment Christopher Beh (ed.). *PLoS ONE*. [Online] 7 (7), e39703.
- Wullschleger, S. et al. (2005) Molecular Organization of Target of Rapamycin Complex 2. *Journal of Biological Chemistry*. [Online] 280 (35), 30697–30704.
- Yamada, E. (1955) THE FINE STRUCTURE OF THE GALL BLADDER EPITHELIUM OF THE MOUSE. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. [Online] 1 (5), 445–458.
- Young, M. E. et al. (2002) The Sur7p Family Defines Novel Cortical Domains in *Saccharomyces cerevisiae* , Affects Sphingolipid Metabolism, and Is Involved in Sporulation. *Molecular and Cellular Biology*. [Online] 22 (3), 927–934.
- Zahumenský, J. et al. (2022) Microdomain Protein Nce102 Is a Local Sensor of Plasma Membrane Sphingolipid Balance Robert A. Arkowitz (ed.). *Microbiology Spectrum*. [Online] e01961-22.