

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДИНА

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Пиршев Кирило Олександрович**

УДК: 57.085.23:577.115.7:577.352.336:57.012.5:57.033

**Дисертація**  
**ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ЛІПІДІВ**  
**ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ЗА АПОПТОЗУ ТА ЕРИПТОЗУ**

Спеціальність 03.00.04 – Біохімія

Галузь знань 091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Науковий керівник Демченко Олександр Петрович, доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник

КИЇВ-2019

## АНОТАЦІЯ

**Пиршев К.О. Особливості структурної організації ліпідів плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

**Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 «біохімія». – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2019.**

Дисертаційна робота присвячена вивченню особливостей складу та властивостей супрамолекулярної структури та біохімічних процесів на рівні плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу.

Ліпідні мембрани завдяки своєму різноманітному складу є основою для просторового розподілу процесів в клітині (Van Meer, Voelker, & Feigenson, 2008). Системні дослідження їх структури впродовж останніх десяти років призвели до розвитку теорії ліпідних рафтів (Levental & Veatch, 2016; Lingwood & Simons, 2010; Simons & Ikonen, 1997), яка, незважаючи на складності у візуалізації окремих ліпідних фаз у живій клітині (Levental & Veatch, 2016; A. S. Shaw, 2006), добре узгоджується з існуючою парадигмою функціонування та регуляції мембранних протеїнів (Luo, Wang, Liu, Li, & Zhao, 2008; Pani & Singh, 2009; Schieffer, Naware, Bakun, & Bamezai, 2014).

Окрім такої супрамолекулярної організації, суттєве значення для регуляції структури та функцій мембран мають індивідуальні ліпіди та фосфоліпіди, зокрема: PE та CL регулюють топологію деяких мембранних протеїнів (Bogdanov & Dowhan, 1999; Bogdanov, Dowhan, & Vitrac, 2014), PS та PI взаємодіють із цитоскелетом (Gorbatyuk et al., 2006; Mohandas & Gallagher, 2008), Cer, PI,PIP, PIP<sub>2</sub>, PIP<sub>3</sub> беруть активну участь в клітинному сигналінгу (Chang & Liou, 2016; Cremesti, Goni, & Kolesnick, 2002; Di Paolo & De Camilli, 2006; Erich Gulbins, Dreschers, Wilker, & Grassmé, 2004), тощо. Незважаючи на широкі дослідження мембранних структур, актуальним залишається вивчення впливу індивідуальних ліпідів та ліпідних фаз на властивості плазматичної мембрани за різних функціональних станів клітин.

Апоптоз, або запрограмована загибель клітини, – це еволюційно глибоко консервативний біологічний процес, що потребує регульованої активації кількома сигнальними каскадами, який призводить до типових біохімічних та морфологічних змін в клітинах (E. Gulbins, Jekle, Ferlinz, Grassmé, & Lang, 2000; Su, Yang, Xu, Chen, & Yu, 2015). Завдяки тому, що запрограмована загибель є процесом, який за рівнем значення важливий так само, як проліферація та поділ клітин, існує комплекс зовнішніх та внутрішніх сигнальних систем, в тому числі, факторів цитоплазми та плазматичної мембрани, які залучені до його регуляції (Chaabane et al., 2013; Elmore, 2007; Martinez, Reif, & Pappas, 2010; Thompson, 1995). Варто наголосити, що сигнальні рецептори загибелі, наприклад FAS/CD95, локалізуються у особливих ліпідних рафтах. Цей рафтовий підтип збагачений на керамід-сфінгомієлін-гангліозид-Fas/Ezrin та в цілому сприяє апоптозу (Patra, 2008).

Процес ериптозу (суїцидальна запрограмована загибель еритроцитів) є відповідальним за усунення старих (Ghashghaeinia et al., 2012) або пошкоджених червоних клітин крові та є залученим до різноманітних патофізіологічних станів, в тому числі, діабету (Maellaro et al., 2011), патологій нирок (Polak-Jonkisz, Purzyc, Szcepańska, & Makulska, 2013), хвороб Паркінсона (Pretorius et al., 2014) і Альцгеймера (Johansson, Westermarck, Ek, & Atroshi, 2014) та інших. Не зважаючи на відсутність мітохондрій та ядра в еритроцитах, ериптоз вважався подібним до апоптозу, залучаючи схожий рецепторний шлях активації (Lu et al., 2008; Mohandas & Gallagher, 2008). Схожим чином відбувається зниження внутрішньоклітинного калію, збільшення кальцію, зморщування клітин, зниження трансмембранної асиметрії фосфатидилсерину (PS) та процес везикуляції плазматичної мембрани (Kuypers et al., 1996; F. Lang & Qadri, 2012). Таким чином, ериптоз можна вважати моделлю запрограмованої загибелі клітин, яка в своїх перетвореннях фокусується на плазматичній мембрані.

Ґрунтуючись на даних попередніх досліджень не можна створити повну картину взаємозв'язку між структурними, біохімічними та морфологічними

властивостями у формуванні супрамолекулярної організації плазматичної мембрани. Саме тому, враховуючи системний характер змін в клітині за апоптозу та ериптозу, вивчення стану плазматичної мембрани за обох процесів залишається актуальним в контексті біохімічних та медико-біологічних досліджень, чому і була присвячена ця робота.

Метою дослідження було вивчення змін структурно-функціональних властивостей та біохімічних процесів на рівні мембран еритроцитів та ядерних клітин за запрограмованої загибелі.

Методи дослідження: культивування клітин, кінетика кислотного гемолізу, спектрофлуориметрія, конфокальна мікроскопія, протокова цитометрія, тонкошарова хроматографія, визначення активності ензиму за хромогенним субстратом, комп'ютерна обробка зображень мікроскопії та даних протокової цитометрії, статистичні методи.

Вміст впорядкованої ліпідної фази зовнішнього моношару плазматичної мембрани клітин HeLa за апоптозу відповідає значенням, що мають місце при зниженні вмісту холестеролу, збагаченні 7-кетохолестеролом або за гідролізу сфінгомієліну, тоді як підвищення вмісту холестеролу впорядковує ліпідні мембрани. Вперше показано, що зниження вмісту рідинно-впорядкованої фази у зовнішньому моношарі плазматичних мембран клітин HeLa відбувається в клітинах із активованою каспазою-3.

Вперше встановлено, що вміст фосфатидилсерину та фосфатидилетаноламіну збільшується в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за апоптозу клітин Jurkat та ериптозу, із меншими значеннями для еритроцитів. Відповідно до даних мікроскопії, на відміну від ядерних клітин Jurkat та HeLa, в еритроцитах не виявлено значного зниження вмісту рідинно-впорядкованої фази у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за ериптозу.

Вперше показано статистично достовірне підвищення вмісту рідинно-невпорядкованої фази в зовнішньому моношарі апоптотичних тілець клітин

HeLa, Jurkat та еритроцитів порівнянно з іншими ділянками плазматичної мембрани (більш впорядкованими на ранніх етапах запрограмованої загибелі). Продемонстрована статистично достовірні різниця у вмісті холестеролу та рідинно-впорядкованої фази між мембранами органел та плазматичною мембраною в нативних клітинах HeLa та Jurkat. Відповідно до даних флуоресцентної мікроскопії, вперше продемонстровано, що після індукції апоптозу ця різниця стає статистично менш вираженою та охоплює обидва моношари всіх мембран ядерних клітин, але в еритроцитах не було виявлено таких змін.

Вперше встановлено, що еритроцити за клітинної загибелі мають статистично більшу щільність пакування ліпідів плазматичної мембрани порівняно з ядерними клітинами HeLa та Jurkat. Вперше показано, що еритроцити мають подібну або меншу проникність плазматичної мембрани для карбонових наночасточок за запрограмованої загибелі в порівнянні з клітинами HeLa. Вперше виявлено збільшення стійкості плазматичної мембрани еритроцитів до гемолізу за ериптозу у порівнянні з інтактними клітинами.

Таким чином, відповідно до поставленої мети та завдань, були вирішені наукові задачі щодо вивчення структурно-функціональних властивостей плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу і було доведено суттєву різницю між цими процесами, що спостерігаються в ядерних клітинах та еритроцитах. Будучи обмеженими лише однією мембранною структурою та будучи під дією різного осмотичного тиску, еритроцити зберігають відносно високе упорядкування супрамолекулярної організації ліпідів за запрограмованої загибелі клітин.

**Ключові слова:** апоптоз, ериптоз, плазматична мембрана, ліпідні мікродомени, трансмембранна асиметрія, супрамолекулярна організація

## ABSTRACT

**Pyrshchak K.A. Structural features of plasma membrane lipid organization on apoptosis and eryptosis. – The manuscript is a qualification paper.**

**Thesis for Ph.D. degree by specialty – 03.00.04 «Biochemistry». – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.**

Current Ph.D. thesis is dedicated to the investigation of the composition and properties of supramolecular structures and biochemical processes on the level of plasma membrane on apoptosis and eryptosis.

The variation of the lipid composition within membranes is the basis of spatial distribution of different processes inside the cell (Van Meer, et al., 2008). In previous decades, the consistent studies of the membranous structures resulted in the development of the lipid raft hypothesis (Lingwood & Simons, 2010; Simons & Ikonen, 1997), which, despite the challenges with the lipid phases visualization within the live cell (Levental & Veatch, 2016; A. S. Shaw, 2006), cohere well with current paradigm describing the regulation and functioning of membrane proteins (Luo, et al., 2008; Pani & Singh, 2009; Schieffer, et al., 2014).

In addition to general supramolecular organization, the individual lipids and phospholipids influence dramatically membrane structure and functions, for example, PE and CL regulate topology of some membrane proteins (Bogdanov & Dowhan, 1999; Bogdanov, et al., 2014), PS and PI are responsible for interactions with cytoskeleton (Gorbatyuk, et al., 2006; Mohandas & Gallagher, 2008), Cer, PI, PIP, PIP<sub>2</sub>, PIP<sub>3</sub> participate in cellular signaling (Chang & Liou, 2016; Cremesti, et al., 2002; Di Paolo & De Camilli, 2006; Erich Gulbins, et al., 2004), etc. Despite the continuous studies in the field, characterization of the link between the individual lipids and lipid phases in plasma membranes during the cellular development and death is still not clear.

Apoptosis, also known as programmed cell death, is an evolutionary deeply conservative biological process, which is regulated by several signaling pathways and results in characteristic biochemical and morphological changes inside the cell (E. Gulbins, et al., 2000). Being a process as important as cell proliferation and division,

the numerous external and internal controlling systems, including cytoplasmic and plasma membrane factors, are involved into its regulation (Chaabane, et al., 2013; Elmore, 2007; Martinez, et al., 2010; Thompson, 1995). It is worth to notify that some of the signaling death receptors, such as FAS/CD95, are localized in special lipid rafts. This subtype of the lipid rafts is saturated by ceramide-sphingomyelin-ganglioside-Fas/Ezrin and generally contributes to apoptosis (Patra, 2008).

Eryptosis (erythrocytes' suicidal programmed death) is responsible for the elimination of aged (Ghashghaeinia, et al., 2012) and damaged red blood cells. Thus, this process is involved into various pathophysiological conditions, including diabetes (Maellaro, et al., 2011), kidney pathologies (Polak-Jonkisz, et al., 2013), Parkinson (Pretorius, et al., 2014) and Alzheimer (Johansson, et al., 2014) diseases, etc. Despite the absence of mitochondria and nucleus, eryptosis was considered as similar to apoptosis, involving the same death receptor pathway (Lu, et al., 2008; Mohandas & Gallagher, 2008). In line with this assertion, the increase of intracellular  $Ca^{2+}$ , a decrease of KCl, cellular shrinkage, drop of PS asymmetry and plasma membrane vesiculation are involved in this process (Kuypers, et al., 1996; F. Lang & Qadri, 2012). Thus, eryptosis may be considered as the suitable model of programmed cell death focusing on plasma membrane features.

Nevertheless, relying on previous studies, it is hard to create complete evidence of interactions between structural, biochemical and morphological properties in the formation of the plasma membrane supramolecular organization. Therefore, taking into account the systemic way of changes within the cell on apoptosis and eryptosis, the investigation of the plasma membrane during both processes is still important in the context of biochemical and medico-biological studies.

Thus, the aim of the current research was the investigation of changes in structural-functional properties of the nucleated and red blood cells' membranes on apoptosis and eryptosis.

The main applied methods: cell culturing, acid hemolysis kinetics, spectrofluorometry, confocal microscopy, flow cytometry, thin layer

chromatography, enzyme activity evaluation by chromogenic substrates cleavage, computer analysis of microscopy and flow cytometry data, statistical analysis.

In the presented work, for the first time, the link between caspase-3-associated signaling pathway and the decrease of the Lo-phase in outer plasma membrane leaflet on the early steps of apoptosis in HeLa cells was shown. PS-exposure in the plasma membrane of apoptotic cells appears at the same time or later in comparison to the lipid phases' distribution. It was shown that such changes may be prevented by the caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK, keeping them on the level similar to the intact cells.

Changes in plasma membrane hydration/polarity on apoptosis are similar to one caused by the cholesterol extraction, 7-ketocholesterol enrichment, and sphingomyelin hydrolysis, which signifies the essential plasma membrane reorganization on programmed cell death of nucleated cells. In a strong contrast, cholesterol enrichment increases the lipid order.

For the first time, the drop of PE asymmetry in plasma membrane on apoptosis and eryptosis was demonstrated. It was shown that in Jurkat cells and in human erythrocytes the exposure of both PS and PE to outer plasma membrane leaflet takes place on programmed cell death. Nevertheless, despite the strong visual similarities of apoptosis and eryptosis, essential differences were found on the level of the membranes: in contrast to nucleated cells, the red blood cells share the small but measurable decrease of Lo-phase in outer plasma membrane leaflet.

The features of plasma membrane supramolecular organization during its vesiculation on apoptosis and eryptosis were investigated. In all studied cells (HeLa, Jurkat, human erythrocytes), in contrast to the main area of the plasma membrane, the significant amount of Ld-phase in outer vesicles leaflet was observed. However, it is worth to mention, that the erythrocytes' vesicles are more ordered.

The difference between the properties of plasma and subcellular membranes in nucleated cells was shown. It is important that after apoptosis induction the difference in lipid order and cholesterol content between plasma and subcellular membranes becomes negligible. Such changes in lipid order and cholesterol content are



characteristic for both monolayers of the plasma membrane. In a strong contrast to nucleated cells, red blood cells did not share this dynamics. Moreover, the increase of the lipid order for both monolayers was observed on eryptosis.

For the first time, the structural-mechanical properties of plasma membrane on apoptosis and eryptosis were compared. In a strong contrast to nucleated cells, where the lipid packing density decreases on apoptosis (particularly, in the regions of apoptotic bodies), the red blood cells on eryptosis appear with denser lipid supramolecular structure.

Erythrocytes share similar or lower plasma membrane penetration ability for nanoparticles on eryptosis in comparison to intact cells, while HeLa cells accumulate their higher amount even on early steps of apoptosis. The increase of lateral and integral plasma membrane lipid packing density is confirmed by the decrease of the acid hemolysis velocity.

In summary, according to the aim and tasks of the research, the structural-functional properties of the plasma membrane on apoptosis and eryptosis were studied and the significant difference was found. Thus, in contrast to apoptosis in nucleated cells, on eryptosis, the loss of lipid order in biomembranes is almost negligible. We suggest that in nucleated cells the additional lipid exchange between the plasma and intracellular membranes, possessing much lower lipid order and cholesterol content, may contribute to such dramatic changes. Consequently, the apoptotic vesicles appear of different origin, being derived from different membrane structures. By contrast, erythrocytes are devoid of intracellular membranes and their relatively high level of lipid order is retained on eryptosis.

**Key words:** apoptosis, eryptosis, plasma membrane, lipid microdomains, transmembrane asymmetry, supramolecular organization.

1. Kreder R., **Pyrshv K. A.**, Darwich Z., Kucherak O. A., Mély Y. and Klymchenko A. S. (2015) Solvatochromic Nile Red Probes with FRET Quencher Reveal Lipid Order Heterogeneity in Living and Apoptotic Cells *ACS Chemical Biology*. 10(6), 1435-1442. Doi: 10.1021/cb500922m
2. Dekaliuk M., **Pyrshv K.A.**, Demchenko A. (2015) Visualization and detection of live and apoptotic cells with fluorescent carbon nanoparticles. *Journal of nanobiotechnology* 13(1), 86. Doi:10.1186/s12951-015-0148-7
3. Kreder, R. Oncul S., Kucherak O. A., **Pyrshv K. A.**, Real E., Mely Y. and Klymchenko A. S. (2015) Blue fluorogenic probes for cell plasma membranes fill the gap in multicolour imaging *RSC Advances*. 5(29), 22899-22905. Doi 10.1039/c4ra16225k,
4. **Pyrshv K.A.**, Yesylevskyy S., Mely Y., Demchenko A., Klymchenko A. (2017) Caspase-3 activation decreases lipid order in the outer plasma membrane leaflet during apoptosis: A fluorescent probe study *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860(10), 2123-2132 Doi: 10.1016/j.bbamem.2017.08.002
5. **Pyrshv K. A.**, Klymchenko A. S., Csúcs G., Demchenko A. P. (2018). Apoptosis and eryptosis: Striking differences on biomembrane level. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1860(6), 1362-1371. Doi: 10.1016/j.bbamem.2018.03.019
6. **Pyrshv K.A.**, Guzyk M. M., Manoilov K. Y. (2012 September) Red-shifted probe for apoptosis detection prospective for cryobiology - International conference “Actual Problems of Cryobiology and Cryomedicine”, Kharkiv, Ukraine, (Опубл. журнал Проблеми Кріобіології – Т.22, №3, 2012 – С.332)
7. **Pyrshv K.A.** (2013 червень) Нові методи детекції запрограмованої загибелі червоних клітин – в Тезах доповідей конференції-конкурсу молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, (Опубл. в *Укр. біохім. журн.*, Т.85, № 4, С. 145, 2013)
8. **Pyrshv K. A.**, Demchenko A. P. (2014 May) Lipid redistribution in the outer plasma membrane leaflet during suicidal death of erythrocytes and HeLa cells - в

Тезах доповідей конференції-конкурсу молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, С. 34

9. **Pyrshchak K. A.**, Csúcs G., Demchenko A. P. (2014 October) Plasma membrane lipid order on apoptosis and eryptosis - в Матеріалах XI Українського біохімічного конгресу, Київ, 2014, (Опубл. в *Укр. біохім. журн.*, Т. 86, № 5 (Suppl. 1.), С. 111, 2014) - ISSN 0201-8470

10. Dekaliuk M. O., **Pyrshchak K. A.**, Demchenko A. P. (2014 October) C-dots application in living cells experiments - в Матеріалах XI Українського біохімічного конгресу, Київ, 2014, (Опубл. в *Укр. біохім. журн.*, Т. 86, № 5 (Suppl. 2.), С. 185-186, 2014) - ISSN 0201-8470

11. **Pyrshchak K. A.**, Demchenko A. P. (2015 April) Lipids dynamics in plasma membrane on live and apoptotic cells - в Тезах доповідей конференції-конкурсу молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, (Опубл. в *Укр. біохім. журн.*, Т.87, № 4, С. 115, 2015)

12. **Pyrshchak K. A.**, Bugera A., Pivovarenko V.G., Demchenko A. P. (2015 June) Coupling of cytoplasmic and biomembrane mechanisms on suicidal cell death. International Conference of the Young Scientist (CYS-2015), Kyiv, Abstract book. - 2015. - P. 163 – best oral talk award

13. Dekaliuk M., **Pyrshchak K.**, Demchenko A. (2015 October) Carbon nanoparticles as fluorescent probes for apoptosis detection - 4-th International Conference NANOBIOPHYSICS 2015: fundamental and applied aspects, Kyiv. Book of abstracts. - 2015. - P. 93

14. **Pyrshchak K.A.**, Yesylevskyy S.O., Klymchenko A.S., Csucs G., Demchenko A.P. (2016 April) The lipids distribution and their dynamics in plasma membranes of living and apoptotic cells - International workshop “Asymmetry of biological membranes: physical, biological and biomedical aspects” (Université de Franche-Comté, Laboratoire ChronoEnvironnement CNRS UMR 6249 Besançon, France), Abstract book. - 2016. - P. 12

15. Dekaliuk M., **Pyrshchak K.A.**, Demchenko A. (2016 April) S, N – containing carbon dots: fluorescent properties and application in cell experiments. - RECOOP

HST Association. Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference Prague, Czech Republic. Український біохімічний журнал. - 2016. – Т. 88, Special Issue - С. 41. - ISSN 0201-8470

16. **Pyrshch K.A.** (2016 May) Динаміка розподілу ліпідів в мембранах ядерних клітин та еритроцитів - в Тезах доповідей конференції-конкурсу молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ (До 110-річчя з дня народження В.О. Беліцера) - С. 42 – 3<sup>rd</sup> place oral talk award

17. **Pyrshch K.A.**, Yesylevskyy S.O., Klymchenko A.S., Csucs G., Demchenko A.P. (2016, July) The lipids distribution and their dynamics in plasma membranes of living and apoptotic cells – in Abstract book of X Parnas Conference. Young Scientist Forum „Molecules in Living Cells and in Innovative Medicine”, Wroclaw, Poland, 2016, (Published in *Acta Biochemica Polonica*, V. 63, Suppl. 1/2016, P. 24). – best poster award

18. Dekaliuk M., **Pyrshch K.A.**, Demchenko A.P. (2016, September) New approach for cell imaging with fluorescent carbon nanoparticles. FEBS Journal. - 2016. - Vol. 283, Issue Supplement S1: Special Issue: 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life, Ephesus/Kuşadasi, Turkey, September 3-8, 2016. - С. P-07.01.3-004. - P. 313.

19. **Pyrshch K.A.**, Yesylevskyy S.O., Klymchenko A.S., Demchenko A.P. (2016 September) Apoptosis and eryptosis influence differently on plasma membrane lipid phases. - X International GDRI meeting “**From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies**” (Lviv), Biopolymers and Cell. 2016. Vol. 32. N 4. P 316 - ISSN 0233-7657

20. **Pyrshch K.A.**, Klymchenko A.S., Csucs G., Demchenko A.P. (2017 June) Fusion of the membranes influences plasma membrane lipid order on apoptosis. EMBO-FEBS Advanced Lecture Course “Molecular Architecture, Dynamics and Function of Biomembranes”- The book of Abstracts. – P. 119.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	15
ВСТУП.....	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Структура та функції мембран.....	23
1.1.1. Ліпідний склад та властивості мембран клітин.....	24
1.1.1.1. Метаболізм ліпідів та їх розподіл в клітині.....	24
1.1.1.2. Цикл Лендса.....	28
1.1.1.3. Ліпідні фази та їх властивості.....	31
1.1.1.4. Асиметрія між моношарами плазматичної мембрани та транспортери ліпідів.....	34
1.1.2. Біологічне значення ліпідних фаз та трансмембранної асиметрії.....	38
1.1.2.1. Фізіологічна роль асиметрії ліпідів.....	38
1.1.2.2. Роль ліпідних рафтів у транспорті субстратів.....	40
1.1.2.3. Ліпіди як компонент перетворень за запрограмованої загибелі...42	
1.2. Біохімічні та морфологічні концепції дослідження ліпідних фаз.....	46
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	
2.1. Везикули та умови їх отримання.....	50
2.2. Клітинні лінії та умови культивуваціі.....	51
2.3. Модифікація складу плазматичної мембрани клітин.....	52
2.4. Індуктори запрограмованої загибелі та умови інкубаціі.....	54
2.5. Метод кислотних еритрограм.....	55
2.6. Барвники, їх властивості, умови забарвлення та реєстраціі сигналу.....	55
Флуоресцентний барвник на фосфатиділсерин Анексин 5.....	56
2.6.2. Флуоресцентний барвник на активовану каспазу-3 FITC-DEVD-FMK..	56
2.6.3. Флуоресцентний барвник на кальцій Fluo-4.....	57
2.6.4. Флуоресцентний барвник на первинні аміни TNBS.....	57
2.6.5. Флуоресцентний зонд на мембрани PA.....	59
2.6.6. Флуоресцентні зонди для дослідження зовнішнього моношару мембран NR12S, bNR10S та NR12S+bQ10S.....	60

2.6.7. Флуоресцентні барвники для зовнішнього моношару мембран F2N12S, F2N12SM, FC12SM.....	68
2.6.8. Флуоресцентна FRET-сенсорна система для зовнішнього моношару мембран.....	72
2.7. Статистичний аналіз.....	74
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ</b>	
3.1. Дослідження структурної організації ліпідів на модельних мембранах..	75
3.1.1. Оцінка відповіді ратіометричних зондів, чутливих до полярності/гідратованості мікрооточення.....	75
3.1.2. Застосування FRET-системи для вивчення структурно-механічних властивостей ліпідного мікрооточення.....	81
3.2. Дослідження структурної організації ліпідів на моделях клітин.....	85
3.2.1. Вивчення кореляції між активністю каспази-3 та зміною властивостей плазматичної мембрани за апоптозу.....	85
3.2.2. Вивчення динаміки ліпідів за процесів апоптозу та ериптозу.....	95
3.2.2.1. Вивчення біохімічних та біофізичних змін в клітинах .....	95
3.2.2.2. Візуалізація змін порядку ліпідів зовнішнього моношару плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу.....	105
3.2.3. Вивчення зміни ліпідних фаз в плазматичній мембрані та в мембранах клітинних органел.....	113
3.2.4. Вивчення структурно-механічних властивостей мембрани.....	120
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	124
ВИСНОВКИ.....	128
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	130
ДОДАТОК 1.....	157

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

bNR10S – флуоресцентний зонд на основі барвника Nile Red з розгалуженим ацильним ланцюгом

bQ10S – гасій флуоресценції на основі молекули Black Hole Quencher-2 (BHQ-2) із розгалуженим ацильним ланцюгом

Cer – церамід (від англ. ceramide)

F2N12SM – флуоресцентний зонд на основі молекули 3-гідроксіфлавоу з нерозгалуженим ацильним ланцюгом та метильованим хромофором

GUV – гігантські одношарові везикули (від англ. giant unilamellar vesicles)

HeLa – клітинна лінія епітеліальних клітин, аденокарцинома 31 річної жінки

Jurkat - клітинна лінія Т-лімфоцитів, Т-клітинна лейкемія 14-річного чоловіка

Ld – рідинно-невпорядкована фаза (від англ. Liquid-disordered)

Lo – рідинно впорядкована фаза (від англ. Liquid-ordered))

LUV – великі одношарові везикули (від англ. large unilamellar vesicles)

NR12S – флуоресцентний зонд на основі барвника Nile Red з нерозгалуженим ацильним ланцюгом

PA – флуоресцентний зонд на основі молекули пірену

PC – фосфатидилхолін (від англ. phosphatidylcholine)

PE – фосфатидилетаноламін (від англ. phosphatidylethanolamine)

PG – фосфатидилгліцерол (від англ. phosphatidylglycerol)

PI – фосфатидилінозитол (від англ. phosphatidylinositol)

PIP – фосфатидилінозитолфосфат (від англ. phosphatidylinositolphosphate)

PS – фосфатидилсерин (від англ. phosphatidylserine)

SM – сфінгомієлін (від англ. sphingomyelin)

SUV – маленькі одношарові везикули (від англ. small unilamellar vesicles)

TNBS – тринітробензенсульфонова кислота (від англ. 2,4,6-

Trinitrobenzenesulfonic acid)

## ВСТУП

**Актуальність теми дослідження.** Ліпідні мембрани завдяки своєму різноманітному складу є основою для просторового розподілу процесів в клітині (Van Meer, et al., 2008). Системні дослідження їх структури впродовж останніх десяти років призвели до розвитку теорії ліпідних рафтів (Levental & Veatch, 2016; Lingwood & Simons, 2010; Simons & Ikonen, 1997), яка, незважаючи на складності в розділенні ліпідних фаз в живій клітині (Levental & Veatch, 2016; A. S. Shaw, 2006), добре узгоджується з існуючою парадигмою функціонування та регуляції мембранних протеїнів (Luo, et al., 2008; Pani & Singh, 2009; Schieffer, et al., 2014).

Окрім такої супрамолекулярної організації, суттєве значення для регуляції структури та функцій мембран мають індивідуальні ліпіди та фосфоліпіди, зокрема: PE та CL регулюють топологію деяких мембранних протеїнів (Bogdanov & Dowhan, 1999; Bogdanov, et al., 2014), PS та PI взаємодіють із цитоскелетом (Gorbatyuk, et al., 2006; Mohandas & Gallagher, 2008), Cer, PI,PIP, PIP<sub>2</sub>, PIP<sub>3</sub> беруть активну участь в клітинному сигналінгу (Chang & Liou, 2016; Cremesti, et al., 2002; Di Paolo & De Camilli, 2006; Erich Gulbins, et al., 2004), тощо. Незважаючи на широкі дослідження мембранних структур, актуальним залишається вивчення кореляції впливу індивідуальних ліпідів та ліпідних фаз на стан плазматичних мембрани за різних функціональних станів клітини.

Апоптоз, або запрограмована загибель клітини, – це еволюційно глибоко консервативний біологічний процес, що потребує регульованої активації кількома сигнальними каскадами, який призводить до типічних біохімічних та морфологічних змін в клітинах (E. Gulbins, et al., 2000; Su, et al., 2015). Завдяки тому, що запрограмована загибель є процесом, який за рівнем значення важливий так само, як проліферація та поділ клітин, існує комплекс зовнішніх та внутрішніх сигнальних систем, в тому числі, факторів цитоплазми та плазматичної мембрани, які залучені до його регуляції (Chaabane, et al., 2013; Elmore, 2007; Martinez, et al., 2010; Thompson, 1995). Варто наголосити, що



сигнальні рецептори загибелі, наприклад FAS/CD95, локалізуються у особливих ліпідних рафтах. Цей рафтовий підтип збагачений на керамід-сфінгомієлін-гангліозид-Fas/Ezrin та в цілому сприяє апоптозу (Patra, 2008).

Процес ериптозу (суїцидальна запрограмована загибель еритроцитів) є відповідальним за усунення старих (Ghashghaeinia, et al., 2012) або пошкоджених червоних клітин крові та є залученим до різноманітних патофізіологічних станів, в тому числі, діабету (Maellaro, et al., 2011), патологій нирок (Polak-Jonkisz, et al., 2013), хвороб Паркінсона (Pretorius, et al., 2014) та Альцгеймера (Johansson, et al., 2014) та інших. Не зважаючи на відсутність мітохондрій та ядра, початково, ериптоз вважався подібним до апоптозу, залучаючи схожий рецепторний шлях активації (Lu, et al., 2008; Mohandas & Gallagher, 2008). В ключі із цим твердженням відбувається зниження внутрішньоклітинного калію, збільшення кальцію, зморщування клітин, падіння фосфатидилсеринової (PS) трансмембранної асиметрії та процес везикуляції плазматичної мембрани (Kuipers, et al., 1996; F. Lang & Qadri, 2012). Таким чином, ериптоз можна вважати моделлю запрограмованої загибелі клітин, яка в своїх перетвореннях фокусується на плазматичній мембрані.

Таким чином, розподіл індивідуальних ліпідів та ліпідних фаз має значення для відображення структурних та функціональних взаємодій в клітинах. З огляду на літературні дані, не можна створити картину взаємозв'язку між структурними, біохімічними та морфологічними властивостями плазматичної мембрани у формуванні її супрамолекулярної організації за клітинної загибелі, що є актуальним у контексті біохімічних та медико-біологічних досліджень.

**Методи дослідження:** культивування клітин, кінетика кислотного гемолізу, спектрофлуорометрія, конфокальна мікроскопія, протокова цитометрія, тонкошарова хроматографія, визначення активності ензиму за хромогенним субстратом, комп'ютерна обробка зображень мікроскопії та даних протокової цитометрії, статистичні методи.

**Мета та задачі дослідження.** Метою дослідження є вивчення структурної організації ліпідів мембран еритроцитів та ядерних клітин за умов їх запрограмованої загибелі.

Відповідно до мети роботи було поставлено такі завдання:

1. Вивчити характер змін ліпідних фаз у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за апоптозу клітин HeLa.
2. Визначити взаємозв'язок між активацією каспази-3 та зміною властивостей плазматичної мембрани ядерних клітин HeLa, зокрема втратою трансмембранної асиметрії фосфатидилсерину (phosphatidylserine, PS) та зниженням вмісту Lo фази в зовнішньому моношарі, за апоптозу.
3. Дослідити порушення трансмембранної асиметрії PS та фосфатидилетаноламіну (phosphatidylethanolamine, PE) у плазматичній мембрані за апоптозу клітин Jurkat та ериптозу, а також зміни вмісту Lo фази в її зовнішньому моношарі у часі.
4. Охарактеризувати гетерогенність змін розподілу ліпідних фаз у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за апоптозу клітин HeLa та Jurkat та ериптозу.
5. Дослідити та провести порівняльний аналіз впливу клітинних органел на вміст ліпідних мікродоменів в моношарах плазматичної мембрани ядерних (HeLa, Jurkat) та без'ядерних (еритроцитів) клітин за умов запрограмованої загибелі.
6. Визначити зміни щільності упаковки ліпідів та проникності плазматичної мембрани за апоптозу клітин HeLa та Jurkat та ериптозу.

**Об'єкт дослідження.** Плазматична мембрана клітин HeLa, Jurkat та еритроцитів людини.

**Предмет дослідження.** Організація супрамолекулярної структури плазматичної мембрани еритроцитів та ядерних клітин в інтактному стані та за запрограмованої загибелі.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В роботі вперше доведено суттєву різницю між процесами, що визначають структурно-функціональні властивості плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу. Встановлено

зв'язок між сигнальним шляхом, пов'язаним з активністю каспази-3 та зниженням вмісту Lo (liquid-ordered; рідинно-впорядкована)-подібної фази ліпідів у зовнішньому моношарі плазматичних мембран на ранніх етапах запрограмованої загибелі клітин HeLa. Вперше встановлено порушення асиметрії розподілу PE у плазматичній мембрані клітин за апоптозу та ериптозу, яке відбувається одночасно із екстерналізацією PS. Вперше досліджено властивості супрамолекулярної організації ліпідів апоптотичних тілець та везикул за апоптозу та ериптозу. Вперше показано, що на склад ліпідних фаз обох моношарів плазматичної мембрани ядерних клітин можуть впливати мембрани їх органел, змінюючи тим самим вміст холестеролу та Lo-подібної фази за апоптозу. Вперше показано ущільнення упаковки ліпідів плазматичної мембрани еритроцитів за ериптозу, що робить їх стійкими до гемолізу.

**Практичне значення.** Розроблено та вперше застосовано підходи для вивчення зміни біохімічних та біофізичних властивостей мембран, зокрема: використання TNBS у протоковій цитометрії для вивчення асиметрії PE, створення аналітичної FRET-системи із нових мембранних флуоресцентних зондів для дослідження структурно-механічних властивостей ліпідних фаз зовнішнього моношару мембран, використання гасія флуоресценції та сольватохромних барвників для вивчення везикуляції плазматичної мембрани за запрограмованої загибелі клітин та застосування карбонових точок для вивчення проникності плазматичної мембрани.

**Особистий внесок здобувача.** Представлена робота є завершеним дослідженням, що виконане автором відповідно до індивідуального навчального плану аспіранта протягом 2011-2015 років. Автором дисертаційної роботи самостійно підбрано та проведено аналіз наукової літератури за темою дисертації; особисто виконано експериментальні дослідження, здійснена інтерпретація результатів та статистична обробка. Головна ідея та завдання досліджень були сформульовані спільно з науковим керівником – д.б.н. Демченком О.П. та к.х.н. Клімченком А.С. (співробітник відділу біофотоніки та

фармакології Страсбурзького Університету, Директор *CNRS*, Страсбург, Франція). Карбонові точки для вивчення проникності плазматичної мембрани за апоптозу були надані Декалюк М.О., н.с. відділу нейрохімії Інституту біохімії О.В. Палладіна НАНУ. Зразки великих та гігантських одношарових везикул надавалися співробітниками лабораторії Клімченка А.С., зокрема к.х.н. Кредер Р. Унікальні сольватохромні барвники були розроблені та люб'язно надані лабораторією Клімченка А.С. (к.х.н. Кучерак О.А. – NR12S, к.х.н. Ніко Й. – PA, к.х.н. Кредер Р. – bNR10S, bQ10S). Разом із професором, к.б.н. Богдановим М.В. (співробітник відділу біохімії та молекулярної біології медичної школи імені МакГоверна, Х'юстон, Техас, США) був розроблений метод реєстрації асиметрії PS/PE за допомогою тонкошарової хроматографії та протокової цитометрії. Дослідження за допомогою мікроскопії було виконано під керівництвом завідувача відділом світлової мікроскопії та скринінгу Вищої інженерної школи Цюріху, д.т.н. Г. Чутчем. Разом з науковим керівником проаналізовано отримані результати та сформульовано й обґрунтовано висновки. Всі розділи дисертації написано здобувачем особисто.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами лабораторії.** Робота виконувалась в рамках наукових тем лабораторії нанобіотехнологій відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ: «Розробка оптичних біосенсорів на основі сучасних нанотехнологій» (№ держреєстрації 0110U002699, 2010-2012 рр.), «Дослідження флуоресцентних наноконкомпозитів і їх взаємодія з клітинними мембранами» (№ держреєстрації 0113U003202, 2013-2015 рр), університет Страсбурга, *CNRS* та ANR JCJC (ANR-11-JS07-014-01), SCOPES 2012-2014, the SNF grant 2-77280-11, короткотривала стипендія EMBO (ATSF 461-2015), Fulbright Research and Development Program (PE Grantee ID E0579608).

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати та окремі положення дисертаційної роботи було представлено на конференції-конкурсі молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, Україна, 2013, 2014, 2015, 2016 рр.), Зимовій школі поглибленого вивчення мікроскопії.

Практичний курс: " Live cell imaging " (Цюрих, Швейцарія, 2013), Міжнародній конференції "Actual Problems of Cryobiology and Cryomedicine" (Харків, Україна, 2013), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014 р.), практичному курсі "Advanced biophysical methods" (Печ, Угорщина, 2014), Міжнародній конференції молодих науковців CYS (Київ, Україна, 2015), Зимовій школі поглибленого вивчення мікроскопії. Практичний курс: "Superresolution microscopy" (Цюрих, Швейцарія, 2016), X конференція імені Парнаса (Вроцлав, Польща, 2016 р.), The Bridges in Life Sciences 11<sup>th</sup> Annual Scientific Conference (Прага, Чехія, 2016), 41 FEBS конгрес – тези опубліковані в онлайн версії конгресу (2016 р.), X міжнародна конференція GDRI "From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies" (Львів, Україна 2016), EMBO-FEBS поглиблений лекційний курс "Molecular Architecture, Dynamics and Function of Biomembranes" (Корсика, Франція, 2017).

Експериментальні результати доповідалися та обговорювалися на наукових семінарах відділу молекулярної імунології та засіданнях Вченої ради Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (2011 - 2018 рр.), а також на наукових семінарах відділу Біохімії та Молекулярної біології, Медичної Школи ім. МакГоверна, Техаський медичний Університет (США, Г'юстон 2017-2018), лабораторії структурної та функціональної візуалізації тканин, Інституту експериментальної біології ім. Ненського (Польща, Варшава, 2016), Інститут фізіології ім. Богомольця НАНУ (Україна, Київ 2015), Інституту сцинтиляційних матеріалів НАНУ (Україна, Харків 2014), лабораторії біофотоніки та фармакології Страсбурзького Університету (Франція, Ількірх, 2013).

**Публікації.** Основні результати дисертації опубліковані у 20 наукових працях; з них - 5 статей у іноземних фахових рейтингових наукових журналах, що включені до міжнародних наукометричних баз даних (Web of Science, PubMed, SCOPUS – SJR Q1) та 15 тезах доповідей наукових конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Основні розділи дисертаційної роботи викладені на 156 сторінках, складаються зі вступу, огляду літератури, опису

матеріалів і методів, розділу результатів обговорення власних досліджень, узагальнення результатів дослідження, висновків; перелік посилань включає 260 найменувань, робота проілюстрована 54 рисунками.

.

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Структура та функції плазматичної мембрани.

Відома модель Зінгера-Нікельсона (Singer, 1972), згідно якої протеїни плавають в однорідному біліпідному шарі, за останні десятиріччя потерпіла значні зміни. На сьогоднішній день загальноприйнятим є те, що мембрана клітини неоднорідна: вона містить справжню ієрархію ліпід-протеїнових структур, які є учасниками різноманітних процесів, що відбуваються у живій клітині.

Найбільше розповсюдження здобула модель ліпід-протеїнових нанодоменів (рафтів), згідно якої навколо певних протеїнів розташовані збагачені сфінголіпідами та холестеролом ділянки, де ліпіди знаходяться у новому фазовому стані, рідинно-впорядкованному (Fantini, Garmy, Mahfoud, & Yahı, 2002; Gajate & Mollinedo, 2015; Gaus et al., 2003; Lingwood & Simons, 2010; Luo, et al., 2008; Schieffer, et al., 2014).

Дослідження, пов'язані з ліпідними рафтами, зараз переходять у цікаву фазу. Як вже стало відомо, ліпідні рафти являють собою універсальні утворення для просторового розподілу клітинних процесів мембрани, які є характерними для різного типу клітин, незалежно від функцій, що виконують, та локалізації. В неактивному стані вони вільно плавають, транспортують декілька протеїнів-пасажирів, але коли активуються – збираються для формування більших платформ, де протеїни зустрічаються щоб виконувати свої функції сигналінгу, процесингу та транспорту (Bamezai, 2008; Gajate & Mollinedo, 2015; Hiltbold, Poloso, & Roche, 2003; Levental & Veatch, 2016; Luo, et al., 2008; Schieffer, et al., 2014; Staubach & Hanisch, 2011). Тому вивчення функціонального стану ліпідних фаз є ключем до розуміння ролі рафтів в життєдіяльності клітин за нормальних та патологічних станів (Luo, et al., 2008; Michel & Bakovic, 2007; Schieffer, et al., 2014; Simons & Ehehalt, 2002).

### 1.1.1. Ліпідний склад та властивості мембран клітин.

#### 1.1.1.1. Метаболізм ліпідів та їх розподіл в клітині

Варіація груп ліпідних головок та аліфатичних ланцюгів створює підґрунтя для існування >1,000 різноманітних ліпідних молекул в кожній окремій еукаріотичній клітині (Sud et al., 2006). З біохімічної точки зору, супрамолекулярна організація ліпідів мембрани залежить від їх індивідуальної молекулярної структури (Рис. 1.1.).

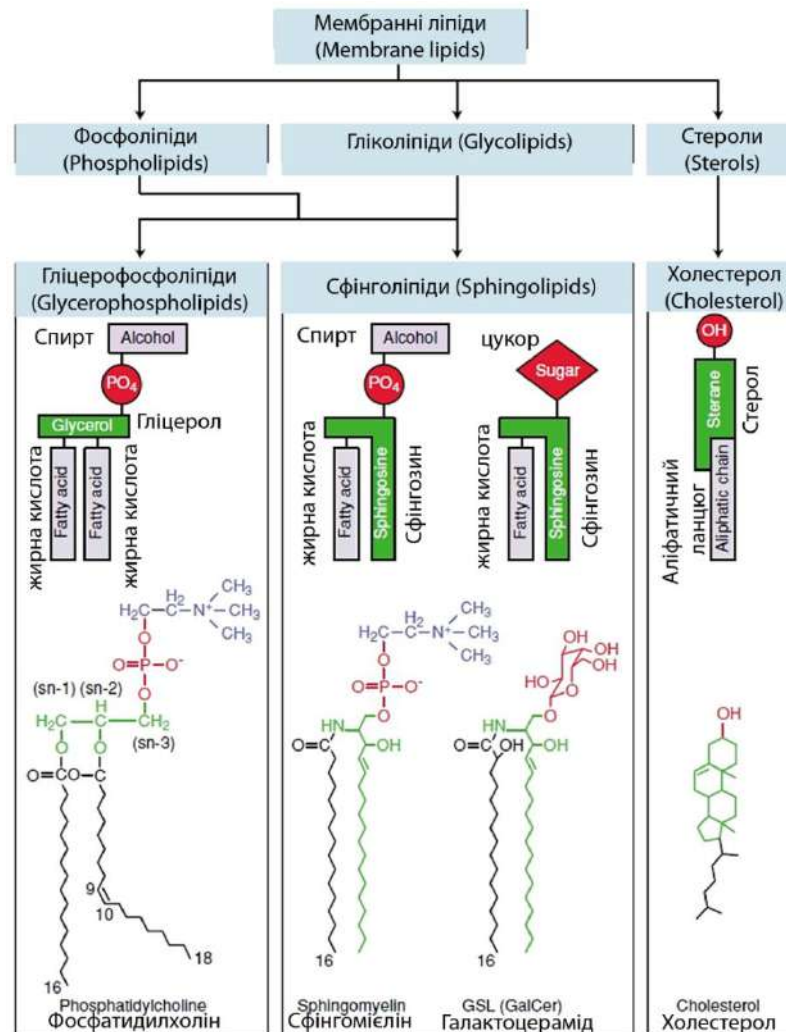


Рис. 1.1. Структурна класифікація основних мембранных ліпідів. Модифіковано з (Fantini, et al., 2002)

Цікавим є те, що фосфоліпіди, сфінголіпіди та стероли не розташовані рівномірно в основних органах ссавців та дріжджів (рис. 1.2.). В еукаріотичних клітинах синтез структурних ліпідів є просторово обмеженим.



Локальний ліпідний метаболізм є одним з основних визначальних факторів для створення унікального складу органел (Van Meer, et al., 2008).

#### *Ендоплазматичний ретикулум.*

Головною органелою, що бере участь в синтезі ліпідів є ендоплазматичний ретикулум (Bell, Ballas, & Coleman, 1981), який продукує переважну більшість структурних фосфоліпідів і холестерол (ергостерол в дріжджах) (рис. 1.2.), а також суттєву частину триацилгліцеролів та холестерілестерів, що несуть неструктурні функції. Ендоплазматичний ретикулум також виробляє Cer, який є попередником складних сфінголіпідів. GalCer синтезується в ендоплазматичному ретикулумі мієлінових та епітеліальних клітин, де він стабілізує мієлін та апікальні мембрани (Sprong et al., 1998). Як вже зазначалося, ендоплазматичний ретикулум є основним місцем синтезу холестеролу, який надалі швидко транспортується до інших органел. Однак, оскільки ендоплазматичний ретикулум розташований на початку секреторного шляху, він складається виключно з низьких концентрацій стеролів та складних сфінголіпідів. В результаті, таке нещільне пакування мембранних ліпідів відображається на більш ефективному виконанні функцій взаємодії та транспорту новосинтезованих ліпідів та протеїнів ендоплазматичним ретикулумом. (Van Meer, et al., 2008).

#### *Апарат Гольджі: сортувальна станція ліпідів.*

Важливу роль в синтезі ліпідів відіграє апараті Гольджі. В ссавців ця органела спеціалізується на синтезі сфінголіпідів, таких як сфінгомієлін (SM), глікозилцерамід, лактоцерамід та гліцеросфінголіпіди (Futerman & Riezman, 2005), які надалі експортуються до плазматичної мембрани. Продукція сфінголіпідів відіграє важливу роль в перерозподілі мембранних протеїнів та ліпідів між ендоплазматичним ретикулумом, плазматичною мембраною та ендосомами чи вакуолею через ліпідні рафти. Термінальний етап синтезу PC може відбуватися за участю ензимів, що містяться як в ендоплазматичному ретикулумі, так і в апараті Гольджі (Henneberry, Wright, & McMaster, 2002). Гольджі-специфічна холінфосфотрансфераза може відігравати роль в

регулюванні секреторних процесів за рахунок контролю рівнів DAG в органелі (Van Meer, et al., 2008).

#### *Плазматична мембрана та ендосоми.*

Ця структура є найбільш збагаченою на холестерол та сфінголіпіди (рис. 1.2.), які впорядковані щільніше за гліцероліпіди та є стійкими до механічного стресу. Незважаючи на те, що плазматична мембрана не залучена до автономного синтезу її структурних ліпідів, для неї було описано багато реакцій синтезу та деградації ліпідів, що залучені в сигнальних каскадах (Di Paolo & De Camilli, 2006; Van Meer, et al., 2008). Ранні ендосоми подібні за складом до плазматичних мембран, але при дозріванні до пізніх ендосом спостерігається зниження вмісту стеролів і PS та різке збільшення вмісту біс (моноацилгліцерол) фосфату (BmP) (Kobayashi et al., 2002). BmP відіграє роль в формуванні мультивезикулярних тілець, процесах синтезу та гідролізу сфінголіпідів (Kolter & Sandhoff, 2005; Matsuo et al., 2004). Спеціальна система кіназ і фосфатаз продукує і гідролізує специфічні фосфоінозитиди (Di Paolo & De Camilli, 2006), у тому числі PI (4,5) P<sub>2</sub> на плазматичних мембранах, PI-3P на ранніх ендосомах, PI (3,5) P<sub>2</sub> на пізніх ендосомах та PI-4P на (транс) -Гольджі мережі (рис. 1.2). Ці фосфоінозитиди ідентифікують ендосомальні мембрани та дозволяють їм отримувати білки з цитозолу, які беруть участь у везикулярному транспорті та інших аспектах клітинного гомеостазу. Ліпідні медіатори сигнальних процесів та розпізнавання є численними і працюють через специфічні білково-ліпідні взаємодії (Di Paolo & De Camilli, 2006). Хоча рівні цих сигнальних молекул надзвичайно малі в порівнянні з рівнями основних ліпідів у мембранах, одним з основних викликів сучасної біології мембран є вивчення регуляції цих систем (Chang & Liou, 2016; Van Meer, et al., 2008).

#### *Мітохондрії.*

Значні рівні синтезу ліпідів зустрічаються в мітохондріях. Мітохондрії синтезують лізофосфатидну кислоту (LPA) (Vance & Vance, 2008), з яких значна кількість використовується для утворення триацилгліцерину (Nagle et al., 2007). Вони також синтезують фосфатидну кислоту та фосфатидилгліцерол

(PG), який використовується для синтезу кадюліпіну, ліпиду, унікального для мітохондрій, а також PE. Декарбоксилування PS призводить до утворення мітохондріального PE, який експортується до інших органел як у ссавців, так і у дріжджів (Choi, Wu, & Voelker, 2005). Наявність PG і до 25 мольних відсотків CL у внутрішній мембрані (Daum, 1985), крім високого співвідношення PE/PC, нагадують бактеріальне походження цієї мембрани і, ймовірно, необхідні для окисного фосфорилування. Вміст стеролів мітохондрій зазвичай низький, за винятком клітин, які беруть участь у синтезі стероїдних гормонів, в яких мітохондрії імпортують та метаболізують холестерол з ендоплазматичного ретикулу (Strauss, Kishida, Christenson, Fujimoto, & Hiroi, 2003; Van Meer, et al., 2008).

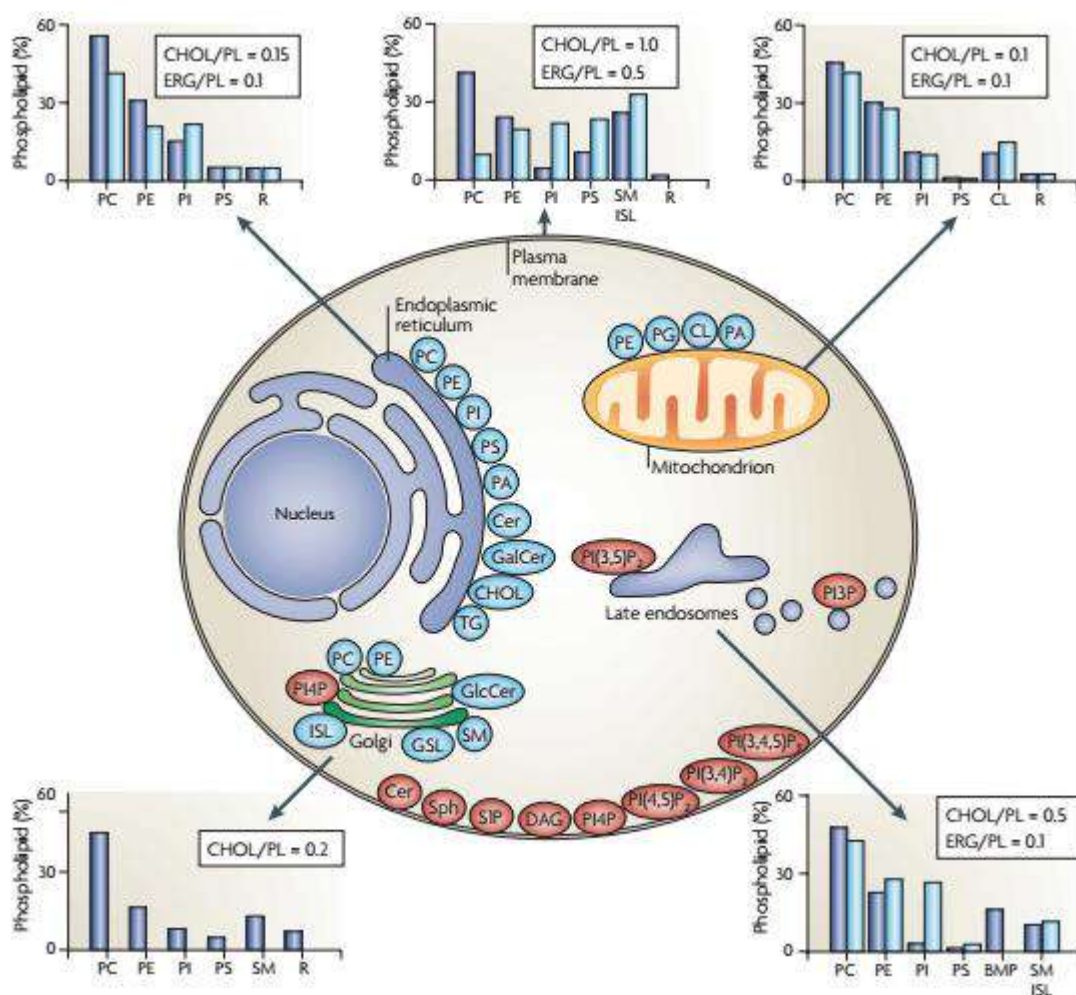


рис. 1.2. Схема розподілу ліпідів в різних структурах та компонентах клітини. Дані щодо складу ліпідів (показані на графіках) виражаються у відсотках від загального фосфоліпиду (PL) у ссавців (синій) та дріжджів (світло-блакитний).

Як міра вмісту стеролів також показане молярне співвідношення холестеролу (CHOL; у ссавців) та ергостеролу (ERG; у дріжджів) до фосфоліпідів. На малюнку показаний сайт синтезу основних фосфоліпідів (блакитний) та ліпідів, які беруть участь у сигнальних шляхах та шляхах розпізнавання органел (червоний колір). Фосфатидилхолін (PC), фосфатидилетаноламін (PE), фосфатидилінозитол (PI), фосфатидилсерин (PS) і фосфатидна кислота (PA), галактозилцерамід (GalCer), триацилгліцерол (TG), сфингомієлін (SM), глікосфинголіпіди (GSL), інозитол сфинголіпіди (ISL), діацилгліцерол (DAG), кардіоліпін (CL), фосфатидилгліцерин (PG), фосфатидилінозитол- (3,5) – бісфосфат (PI(3,5) P2), фосфатидилінозитол- (4,5) –бісфосфат (PI (4,5) P2), фосфатидилінозитол- (3,4,5) –трифосфат (PI (3,4,5) P3), фосфатидилінозитол-4-фосфат (PI4P), сфингозин-1-фосфат (S1P), сфингозин (SPh). Модифіковано з (Van Meer, et al., 2008).

#### 1.1.1.2. Цикл Лендса

Швидке деацилювання/реацилювання клітинних фосфоліпідів раніше описане як цикл Лендса (W.E. Lands, 1958; William EM Lands, 2000). У цьому циклі клітинні фосфоліпази генерують лізофосфоліпіди (LysoPL) і вільні жирні кислоти, які потім використовуються для отримання нових або змінених типів фосфоліпідів та жирних кислот (рис. 1.3.). Правильне регулювання цього циклу є важливим для контролю накопичення потенційно токсичних LysoPL та жирних кислот (Das, Castillo, & Stevens, 2001).

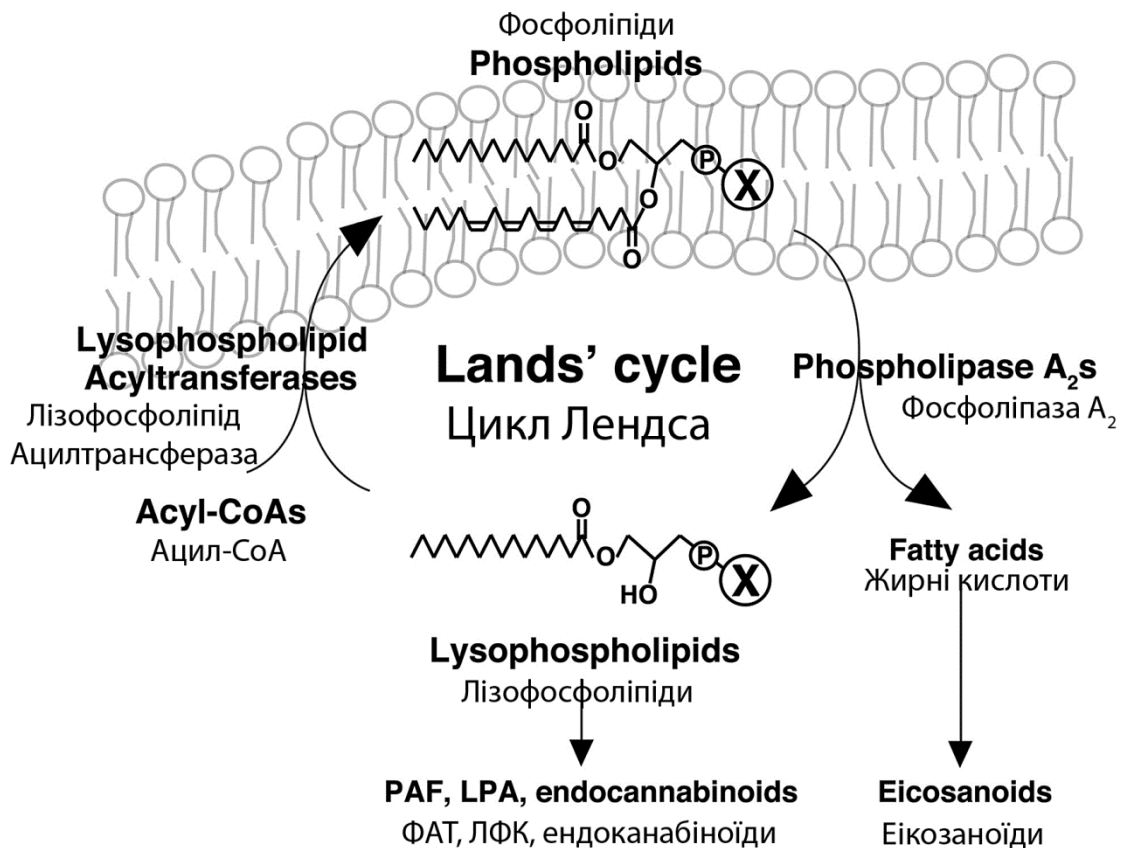


Рис. 1.3. Загальна схема циклу Лендса. Модифіковано з (Hishikawa et al., 2008)

Починаючи з концепції, яка з'явилася більш ніж 40 років тому, цикл Лендса (W.E. Lands, 1958; William EM Lands, 2000) привернув широку увагу серед дослідників, які зацікавлені в розумінні механізмів реконструкції фосфоліпідів та/або функціонального значення фосфоліпаз (PLA1 і PLA2) та ацилтрансфераз (АТ) у різних клітинах і тканинах (Reinhold, Zimmerman, Prescott, & McIntyre, 1989; Yamashita, Sugiura, & Waku, 1997). Цикл Лендса також є основним шляхом для включення та вивільнення вільної арахідонової кислоти (ненасиченої жирної кислоти C<sub>20:4</sub>) у клітинні фосфоліпідів, процес, який залежить від активності внутрішньоклітинної PLA2 (Balsinde, Bianco, Ackermann, Conde-Frieboes, & Dennis, 1995). Наприклад, стимуляція нейтрофілів людини за допомогою Ca<sup>2+</sup>-іонофору викликає синтез фактора активації тромбоцитів (PAF), а також призводить до появи вільної АА (Reinhold, et al., 1989). Крім того, в тканинах легень синтезується діпальмітоїл-РС (DPPC) через цей цикл, здійснений шляхом деацилювання РС в положенні

sn-2 і заміщуючи на цьому місці пальмітинову кислоту (PamA; C16:0) (Das, et al., 2001).

Також деякі дослідження дозволяють припустити, що лямблія використовує реакції обміну жирних кислот та головки фосфоліпідів, а не на їх синтез *de novo* (Das, et al., 2001; Jarroll, Muller, Meyer, & Morse, 1981). В цьому контексті також важливим є зв'язок між ліпідним обміном та патогенезом, що дозволяє розглядати ферменти циклу Лендса (тобто АТ, ТAs та PLAs) як потенційні мішені для розробки ліків проти лямбліозу (Das, et al., 2001).

Оскільки еритроцити ссавців позбавлені синтезу ліпідів *de novo*, то значення циклу Лендса для нормального метаболізму червоних клітин крові є вкрай важливим. Використовуючи високопродуктивний метаболічний скринінг, нещодавні дослідження показали, що вміст LysoPC та циркулюючого AA в еритроцитарній мембрані є найбільш підвищеними серед усіх ліпідів, виявлених у мишей із серповидно-клітинною анемією. Ці дослідження привели до подальшого виявлення того факту, що цикл Лендса незбалансований через незрівнянно підвищену LPCAT1, репаративного ферменту, для протидії надто активному sPLA2 в серповидних еритроцитах як людини, так і миші (Wu et al., 2016). Важливо, що в ранніх дослідженнях натякали, що збільшення LysoPC бере участь у формуванні кривизни клітинних мембран (W. J. Brown, Chambers, & Doody, 2003) та опосередкування утворення каналців, що з'єднують структури апарату Гольджі (De Figueiredo, Drecktrah, Katzenellenbogen, Strang, & Brown, 1998; de Figueiredo, Polizotto, Drecktrah, & Brown, 1999). Як повідомлялося, вміст арахідонової кислоти підвищується у хворих на серповидно-клітинну анемію і є попередником декількох імунних медіаторів, включаючи лейкотрієни та простагландин (Daak et al., 2011; Opene, Kurantsin-Mills, Husain, & Ibe, 2014). Використовуючи генетичні дослідження з нокаутом по sPLA2 або надмірною експресією LPCAT1 специфічно у мишей із серповидно-клітинною анемією, було показано виправлення дисбалансу циклу Лендса за рахунок зниження активності sPLA2 або індукування активності LPCAT1 зі значним зниженням кількості серповидних клітин, гемолізу,

розповсюдженням та пошкодженням тканин шляхом зменшення LysoPC, співвідношення LysoPC/PC та LysoPC/PL та циркулюючих рівнів арахідонової кислоти в мембранах еритроцитів (Wu, et al., 2016).

Інтригуючим є те, що гіпоксія є ключовим механізмом, відповідальним за незбалансований цикл Лендса в серповидних еритроцитах, переважно індукуючи активність cPLA<sub>2</sub>, але не активність LPCAT у культивованих мишей із серповидно-клітинною анемією та еритроцитах людини. Група професора Яанг показала (Wu, et al., 2016), що каскад MEK/ERK є раніше нерозпізнаним сигнальним шляхом, пов'язаним із активністю cPLA<sub>2</sub>, викликаній гіпоксією, в еритроцитах за серповидно-клітинної анемії. Подібно до S1P, MEK/ERK-залежна активація cPLA<sub>2</sub>-опосередкованої продукції LysoPC сприяє утворенню серповидної форми еритроцитів за рахунок гіпоксії. Таким чином, MEK/ERK є загальною сигнальною мережею, що лежить в основі активації SPHK1 (Sun et al., 2015) та cPLA<sub>2</sub>, викликаній гіпоксією, в серповидних еритроцитах.

#### 1.1.1.3. Ліпідні фази та їх властивості

Гліцерофосфоліпіди, такі як фосфатидилхолін, багаті на ненасичені ацильні ланцюги (де ланцюги вуглецю мають один чи більше подвійних зв'язків), в той час як сфінголіпіди, такі як сфінгомієлін та глікосфінголіпіди, містять насичені ацильні ланцюги (R. E. Brown, 1998). У більшості сфінголіпідів існує лише один подвійний зв'язок у транс положенні. Цей подвійний зв'язок розташований між четвертим та п'ятим атомами вуглецю 18-вуглецевої молекули. У той самий час, ацильний ланцюг, приєднаний до вуглецю sn-2 гліцеролу, завжди ненасичений з одним чи декількома подвійними зв'язками у цис положенні. Ці структурні риси можуть пояснити фізико-хімічні властивості цих ліпідів у біологічних мембранах (R. E. Brown, 1998; Fantini, et al., 2002).

За фізіологічних температур насичені ланцюги сфінголіпідів дозволяють їм щільно складатися разом завдяки Ван дер Ваальсовим взаємодіям, формуючи гелеподібну фазу (L $\beta$ ), з якої вилучені гліцерофосфоліпіди. На

додаток, сфінголіпіди можуть асоціюватися через водневі зв'язки між гідроксильними групами сфінгозину та  $\alpha$ -ОН групами, представленими в жирних кислотах багатьох сфінголіпідів. На відміну від цього, структура перегину поліненасичених ацильних ланцюгів у гліцерофосфоліпідів перешкоджає правильній та щільній упаковці ланцюгів, і при фізіологічній температурі гліцерофосфоліпіди знаходяться у нещільно упакованому нерегульованому стані, що зазвичай називають текучою рідинно-кристалічною ( $L_c$ ) фазою. Сфінголіпіди мають набагато більшу температуру плавлення ніж гліцерофосфоліпіди. Таким чином, щільна асоціація між сфінголіпідами може бути визначена завдяки високій температурі плавлення, потребуючи більшої енергії, необхідної для гель-невпорядкованих переходів (Fantini, et al., 2002).

Різні можливості упаковки сфінголіпідів та гліцерофосфоліпідів призводять до поділу фаз у мембрані. Нижче температури плавлення чисті гліцерофосфоліпіди знаходяться в рідинно-гелеподібній фазі ( $L_\beta$ ). За присутності холестеролу, гліцерофосфоліпіди формують гомогенну фазу із середніми властивостями між гелем та рідинно-кристалічною фазою: рідинно-мозаїчна модель біологічних мембран базується на цій фізико-хімічній особливості. Але варто зауважити, що холестерол переважно взаємодіє з сфінголіпідами та сприяє розділенню фаз гліцерофосфоліпідів та сфінголіпідів. В результаті, сфінголіпіди урівноважуються, переходячи у проміжну фазу, що називається рідинно-впорядкована ( $L_o$ ) фаза (D. A. Brown & London, 2000). В рідинно-впорядкованій фазі ацильні ланцюги ліпідів упаковані щільно як і в гелеподібній фазі, але мають більший ступінь мобільності завдяки інтеркаляції молекул холестеролу між сфінголіпідами. Також була запропонована думка, що холестерол може локалізуватися між рафтами сфінголіпідів та гліцерофосфоліпідами. Така організація холестеролу може створити енергетично вигідну область переходу між рідинно-кристалічною та рідинно-впорядкованою фазами в плазматичній мембрані (Fantini, et al., 2002; Simons & Ikonen, 1997).



У підсумку, мембранні ліпіди існують в різноманітних станах, які контролюються кількома фізико-хімічними параметрами, такими як температура, присутність холестеролу та хімічна природа гідровуглецевих ланцюгів. Завдяки тому, що вони виключені з рідинно-кристалічної фази гліцерофосфоліпідів, сфінголіпіди організовані в специфічну, збагачену холестеролом структуру, яка має назву мікродомени плазматичної мембрани, або ліпідні рафти. Ці мікродомени можуть бути розглянуті як маленькі напівтверді рафти, що плавають у більш рухомій масі гліцерофосфоліпідів плазматичної мембрани. Схематична модель ліпідів плазматичної мембрани запропонована на рис. 1.4 (Fantini, et al., 2002). Ця модель бере в розрахунок форму кожного мембранного ліпіду та консистенцію різних ліпідних фаз у мембрані (Israelachvili, Marčelja, & Horn, 1980). Хоча, таке представлення структури мембран добре описує існуючі уявлення про їх будову та функціонування, як супрамолекулярних структур, нема прямого підтвердження цієї гіпотези.

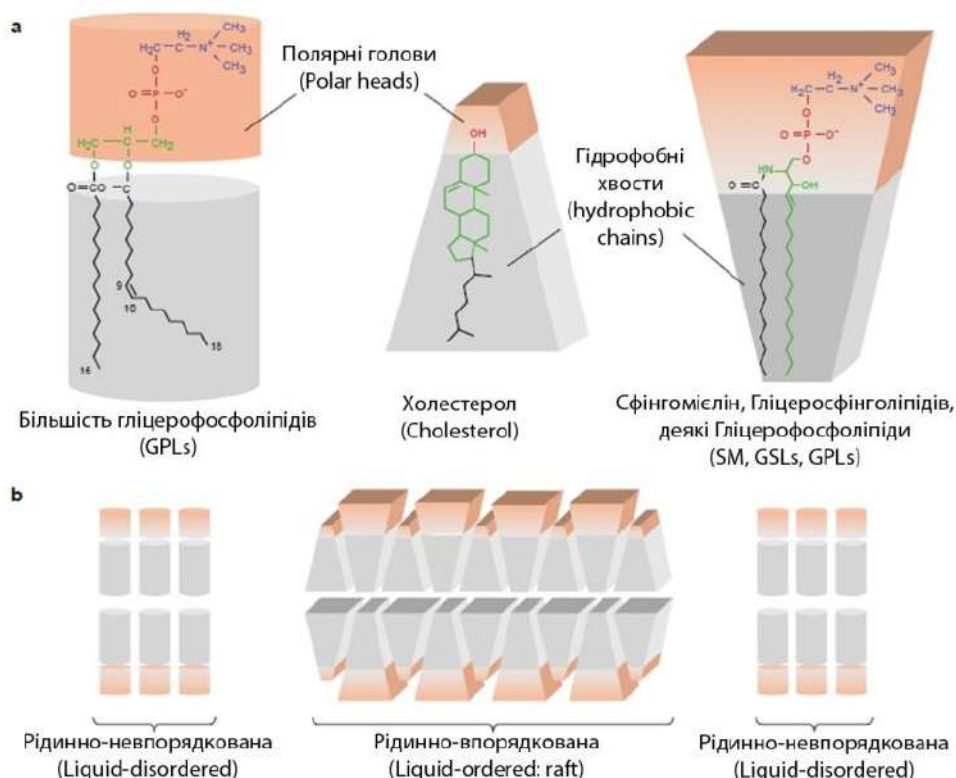


Рис. 1.4. Організація ліпідів у рафтові мікродомени: спрощена модель, яка базується на теоретичній формі мембранних ліпідів. Здатність мембранних ліпідів до формування базової бішарової структури є результатом певної

кількості властивостей, найбільш важлива з яких - їхній амфіфільний характер. Амфіфільні молекули мають полярні групи, або гідрофільні головки, та неполярні гідрофобні участки. В водних розчинниках амфіфільні молекули орієнтуються таким чином, щоб забезпечити полярним групам контакт з молекулами води, в той час як гідрофобні ланцюги взаємдіють один з одним таким чином, щоб молекули води були максимально вилучені з гідрофобної фази.

а) гліцерофосфоліпіди дійсно мають форму на зразок циліндричної; тим часом як, холестерол та сфінголіпіди мають конічну форму. У сфінголіпідів полярні головки займають більший об'єм ніж гідрофобна частина, а у холестеролу навпаки.

б) сфінголіпіди майже повністю знаходяться у зовнішньому шарі плазматичної мембрани. Завдяки цьому загальні форми сфінголіпідів та холестеролу чудово підходять одна до одної. У даному випадку холестерол виступає як молекулярний спейсер. (Fantini, et al., 2002).

#### 1.1.1.4. Асиметрія між моношарами плазматичної мембрани та транспортери ліпідів

Ліпідний склад окремих мембран може бути додатково регульований щодо орієнтації ліпиду до цитозолу, тоді як в інших всі ліпіди симетрично розподіляються між двома моношарами мембран. Апарат Гольджі, плазматичні та ендосомальні мембрани мають асиметричний розподіл ліпідів з SM і GSL на нецитозольній стороні, в той час як PS та PE знаходяться в цитозольному моношарі (Рис 1.5.) (Graham, 2004; Smith & Lambert, 2003). Асиметричний розподіл ліпідів має важливі функціональні наслідки. Наприклад, при екстерналізації на поверхню клітини, PS діє як сигнал для подальшого фагоцитозу цієї клітини і як сигнал активації в коагуляції крові. Крім того, транслокація ліпідів до цитозольного моношару спричиняє дисбаланс ліпідів, що може сприяти викривленню мембрани, яка необхідна для формування ендосом (Pomorski & Menon, 2006). Асиметрія ліпідів в мембранах є наслідком

багатьох факторів, включаючи біофізичні властивості, які обумовлюють здатність ліпідів перетинати бішар спонтанно, механізми стабілізації, які сприяють зосередженню ліпідів в одному моношарі мембрани та наявність транспортерів, які сприяють розподілу ліпідів.

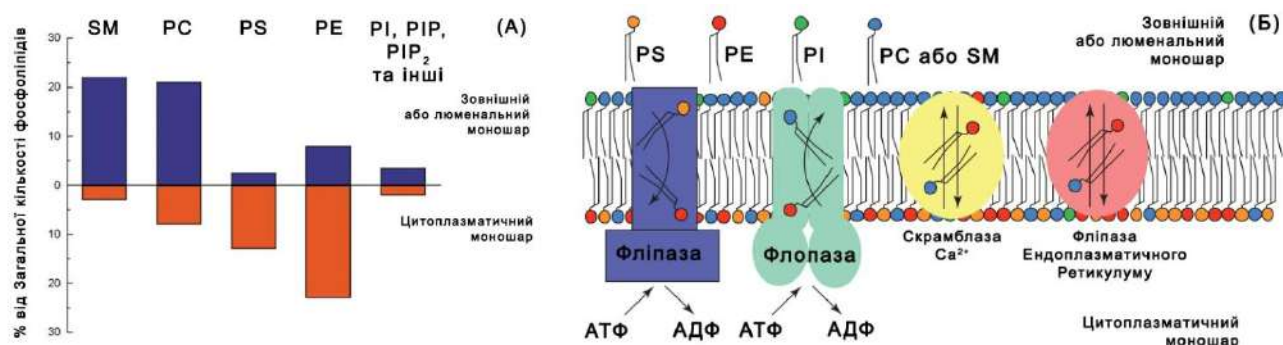


Рис. 1.5. (А) Розподіл ліпідів між моношарами в асиметричних мембранах клітин, Модифіковано з (Smith & Lambert, 2003). (Б) Загальні принципи роботи ліпідних транспортерів в мембранах клітин. Модифіковано з (Graham, 2004). фосфатидилхолін (PC), фосфатидилетаноламін (PE), фосфатидилінозитол (PI), фосфатидилсерин (PS), сфингомієліну (SM)

#### *Транспортування на внутрішній моношар.*

Раніше було виявлено, що в еритроцитах людини мічені аналоги амінофосфоліпідів (PS і PE) швидко переміщуються до цитозольного моношару, тоді як аналог PC залишається у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани (Seigneuret & Devaux, 1984). Така транслокація суттєво корелює з властивостями 115 kDa Mg<sup>2+</sup> -АТФази, виділеної з феохромних клітин бика (Moriyama & Nelson, 1988), або з еритроцитів людини, (Morrot, Zachowski, & Devaux, 1990). Пізніше був виділений ген з феохромних клітин бика, та виявлено, що він кодує білок підродино Р-тип АТФази, АТР8А I / АТФаза II (Tang, Halleck, Schlegel, & Williamson, 1996). Сімейство АТФази типу Р, яке широко представлено від прокаріотів до еукаріотів, генеалогічно поділяють на 5 підкласів. (Axelsen & Palmgren, 1998) АТР8АI належить до підсистем типу 4 / амінофосфоліпідної транслокази. Надлишок синтезу іншого білка, АТР8В 1, який був ідентифікований як ген, мутований у пацієнтів з

формами холестазу (захворювання, що пов'язане із порушенням надходження жовчі до дванадцятиперстної кишки) (Ikeda, Kihara, & Igarashi, 2006), також призвів до підвищеного включення NBD-PS. (Ujhazy et al., 2001).

#### *Транспортування на зовнішній моношар.*

В еукаріотичних клітинах ABC транспортери функціонують як АТР-залежні насоси для транспортування на зовнішній моношар (Sheps, Ralph, Zhao, Baillie, & Ling, 2004). Надмірна експресія деяких ABC-транспортерів забезпечує стійкість клітин до широкого спектру антибіотиків (multidrug resistance). Крім того, деякі ABC-транспортери функціонують як ліпідні транспортери/транслокази. ABC-транспортер ABC4 (mdr2 миші, MDR3 людини) активно експресується в мембранах жовчних протоків печінки і, за допомогою досліджень на нокаутних мишах, було показано, що вони беруть участь у вивільненні PC з печінки у жовчні протоки (Smit et al., 1993). Подальше дослідження показало, що ABCB4 це насправді PC-специфічний транспортер/транслоказа, який не може передавати PE (van Helvoort et al., 1996). На противагу ABCB I виявляє досить широку субстратну специфічність, а в клітинах, що продукують ABCB I, підвищення розподілу обох метаболічно-мічених PC та PE спостерігалось у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани (van Helvoort, et al., 1996). Третій транспортер, ABCA1, сприяє секреції холестеролу з клітин у ліпопротеїни високої щільності (ЛПВЩ). Мутація в ABCA1 викликає тангерську (tangier) хворобу, важкий синдром дефіциту ЛПВЩ (Alder-Baerens et al., 2005; Rust et al., 1999). Фоторецептор-специфічний ABCA4 (ABCR), як вважають, бере участь у транслокації N-ретініліден-PE, природного похідного PE, з внутрішньої на цитозольну сторону зовнішнього сегмента мембрани диска палички в очі ссавців (Weng et al., 1999). Мутації в гена ABCA4 відповідальні за хворобу Старгардта, найбільш поширену форму ювенільної макулярної дегенерації (Lewis et al., 1999). Таким чином, кілька членів родини ABC-транспортера є гліцерофосфоліпідними

транслоказами/транспортерами і їх функціонування пов'язане з різними хворобами.

У 1996 році із еритроцитів людини виділили 37 кДа,  $\text{Ca}^{2+}$ -залежний, інтегральний мембранний білок, і було встановлено, що він неселективно посилюють двонаправлену транслокацію NBD-гліцерофосфоліпідів (Stout, Sims, & Wiedmer, 1996). Ген PLSCR1 клонували з його пептидної послідовності в 1997 році та його скрамблазну активність було підтверджено, використовуючи протеоліпосоми, з очищеним рекомбінантним білком PLSCR1 (Zhou et al., 1997). Однак в еритроцитарних мембранах, одержаних з PLSCR1 нокаутних мишей,  $\text{Ca}^{2+}$ -залежна екстерналізація PS була нормальною (Zhou, Zhao, Wiedmer, & Sims, 2002). Цілком можливо, що інші члени сім'ї PLSCR (від PLSCR2 до PLSCR4) мають функції, що перекриваються (Wiedmer, Zhou, Kwoh, & Sims, 2000).

#### *Асиметрія сфінголіпідів.*

Сфінголіпіди також сприяють асиметрії плазматичної мембрани, тому що складні сфінголіпіди, такі як SM та глікосфінголіпіди, локалізуються виключно у зовнішньому моношарі. SM синтезується з цераміду в просвіті апарату Гольджі (Huitema, van den Dikkenberg, Brouwers, & Holthuis, 2004). Глюкозил-церамід, найпростіший глікосфінголіпід, що синтезується на цитозольній частині апарату Гольджі, проте подальша модифікація галактозою та іншими цукрами також відбувається на люменальній стороні (Nomura et al., 1998). Таким чином, глюкозил-церамід повинен перетнути мембрану апарату Гольджі, щоб стати субстратом для синтезу складних сфінголіпідів. Вважається, що ABCB1 є транслоказою в цій реакції (De Rosa, Silence, Ackerley, & Lingwood, 2004; van Helvoort, et al., 1996). Крім того, синтезовані в просвіті каналів апарату Гольджі SM і глікосфінголіпідні похідні, як вважають, доставляються до екстрацитозольного моношару плазматичної мембрани шляхом везикулярного транспорту, зберігаючи при цьому їхню мембранну топологію (Huitema, et al., 2004). Попередники сфінголіпідів, сфінгоїдної основи

(довголанцюгові основи) та кераміди синтезуються в ЕР (Mandon, Ehses, Rother, van Echten, & Sandhoff, 1992). Хоча точний розподіл попередників між моношарами ЕР невідомий, керамід, здається, локалізується як в просвітній так і в цитозольних моношарах мембрани ЕР. Церамід може бути перетворено в галактозил-церамід у просвітній стороні (Sprong, et al., 1998) або транспортуватися з цитозольного моношару ендоплазматичного ретикулуму до Гольджі за допомогою CERT, білка для переміщення керамідів (Hanada et al., 2003). Нещодавно Rsb 1 було описано в дріжджах як АТР-залежну транспортер-транслоказу з сфінгоїдною основою, де присутній один з двох гідрофобних ланцюгів кераміду. Надмірна експресія Rsb 1 сприяє "фліп" та пригнічує "флоп" NBD-PE та NBD-PC (Kihara & Igarashi, 2004). Ці результати свідчать про деякий перехресні розбіжності між сфінголіпідами та гліцерофосфоліпідами в підтримці функціональної ліпідної асиметрії плазматичної мембрани.

#### 1.1.2. Біологічне значення ліпідних фаз та трансмембранної асиметрії

Ліпідні рафти відіграють центральну роль в багатьох клітинних процесах, що включають клітинну поляризацію, сигнальну трансдукцію, яка найкраще вивчена у Т- (Janes, Ley, Magee, & Kabouridis, 2000) та В-клітин (Cherukuri, Dykstra, & Pierce, 2001), алергійну відповідь (Sheets, Holowka, & Baird, 1999), транспорт речовин та розподіл процесів мембрани. Церамід/сфінгомієліновий сигналінг, який регулює розвиток, життя та смерть клітин, також пов'язаний із кластерами рафтів (Kolesnick, 2002).

Найбільш вивчена функція рафтів – це надання середовища для сигнальних молекул і рецепторів, як, наприклад, для членів сімейства тирозин кіназ Src, G-протеїнів та різноманітних рецепторних білків, таких як рецептор тромбоцитів P2X, а також дозволяти специфічні регуляції, пов'язані з цими молекулами.

##### 1.1.2.1. Фізіологічна роль асиметрії ліпідів

Підтримка ліпідної асиметрії важлива для певних клітинних процесів. Наприклад, взаємодія між PS, що міститься у внутрішньому моношарі, та білками цитоскелету подібних до спектрину, покращує таким чином механічну стійкість мембран еритроцитів (Manno, Takakuwa, & Mohandas, 2002). У дріжджах, дослідження на мутантних моделях продемонстрували, що члени сімейства амінофосфоліпідної транслокази беруть участь у внутрішньоклітинному трафіку, підтримуючи структуру органел та полярність клітин (Hua, Fatheddin, & Graham, 2002; Ikeda, et al., 2006; Wicky, Schwarz, & Singer-Krüger, 2004). Місцеві або глобальні зміни асиметрії ліпідів також викликають різні клітинні реакції. Наприклад, тимчасова PE-експозиція та повна втрата поверхневого SM клітини спостерігаються при остаточному розділенні під час цитокінезу в культурах клітин (Emoto et al., 1996). Крім того, коли поверхневий PE був зафіксований PE-зв'язуючим пептидом, кон'югованим із стрептавідином, або за рахунок мутації в біосинтезі PE, поділ клітин зупинився на пізній стадії цитокінезу через інгібування дисоціації скорочувального кільця (Emoto & Umeda, 2000). Ці результати свідчать про те, що локальна і тимчасова регуляція експонування PE є суттєвим для проходження клітинного циклу. Подібним чином, у дріжджів, що брунькуються, PE переважно розташовується на екстрацитозольній стороні плазматичної мембрани біля перетину. Коли поверхневий PE зафіксований, актинові філаменти накопичувалися в перетині та новій бруньці, що свідчить про залучення перерозподілу PE в певних регіонах до полярності клітини (Iwamoto et al., 2004). В апоптотичних клітинах спостерігаються глобальні зміни асиметрії ліпідів. Вважається, що підвищена  $Ca^{2+}$ -залежна активність скрамблази або зменшення активності амінофосфоліпідної транслокази призводять до колапсу ліпідної асиметрії (Bever, Comfurius, Dekkers, & Zwaal, 1999). PS, що експонується на поверхню апоптотичних клітин в результаті колапсу, використовується як сигнал розпізнавання фагоцитами (V. Fadok et al., 1992). Кілька рецепторів для цього ліганду було зареєстровано, в тому числі PS рецептор (Valerie A Fadok et al., 2000), лектиновий окислений ліпопротеїновий

рецептор низької щільності I (Oka et al., 1998), рецептор сорбентів типу I (SRBI), глобул-EGF-фактор 8 (MFG-E8) та інші (Hanayama et al., 2002; Ikeda, et al., 2006). Хоча в більшості випадків фізіологічна роль цих рецепторів не є очевидною, лінії мишей із нокаутом гену PS рецептору демонструють порушення розвитку, пов'язані зі скупченнями апоптотичних клітин у легенях і головному мозку (Li, Sarkisian, Mehal, Rakic, & Flavell, 2003). Крім того, макрофаги, які не мають MFG-E8, не можуть ефективно поглинати апоптотичні лімфоцити (Hanayama et al., 2004).

PS-експозиція на фагоцитарних клітинах також є важливою. ABC-транспортер ABCA 1 сприяє фагоцитозу шляхом перерозподілу амінофосфоліпідів на поверхню мембрани макрофагів (Hamon et al., 2000). PS також виявляється на поверхні клітини в процесі згортання крові, і така екстерналізація є необхідною для формування прокоагулянтної поверхні. Клінічний стан, пов'язаний з дефектом активності прокоагулянтів, краще зрозумілий з досліджень синдрому Скотта, рідкісної успадкованої хвороби, пов'язаної з відсутністю експозиції PS в активованих тромбоцитах та інших клітинах крові (Albrecht et al., 2005; Ikeda, et al., 2006). Дослідження показали наявність невпорядкованого заміщення в гені ABCA1 та значне зменшення мРНК ABCA1 у хворих на синдром Скотта (Albrecht, et al., 2005). Також помічено, що транслокація PS на зовнішній моношар плазматичної мембрани є важливою для формування міофіламентів (van den Eijnde et al., 2001), капацитації сперми (Gadella & Harrison, 2002) та сигналіngu в Т-лімфоцитах (Elliott et al., 2005).

#### 1.1.2.2. Роль ліпідних рафтів у транспорті субстратів

За останні роки досліджень, з'ясована роль ліпідних рафтів у транспорті субстратів, таких як глюкоза та жирні кислоти всередину клітини, що характеризується локалізацією білків, асоційованих з транспортом субстратів, в ліпідних рафтах (Michel & Bakovic, 2007).



Транспортер GLUT4 переправляє глюкозу із внутрішньоклітинних везикул в плазматичну мембрану доки інсулін не зв'яжеться з інсуліновими рецепторами в скелетних м'язах та жирових клітинах (Saltiel & Kahn, 2001). Було відкрито багато низхідних сигнальних шляхів рецептору інсуліну, але механізми, завдяки яким спрацьовує транслокація GLUT4, до сих пір не уточнені. Були показані два головних шляхи, що стимулюють роботу GLUT4: один залучає інсулін-залежні елементи та PI3K, а другий сигнальний шлях працює завдяки G-протеїну TC10, особливо в адипоцитах, де TC10 розташовується в ліпідних рафтах та ко-локалізується з флотиліном (Chiang, Chang, & Saltiel, 2006). В недавніх дослідженнях було показано, що TC10 зв'язаний з екзоцистом, протеїновим комплексом, який приймає участь в екзоцитозі (Inoue, Chiang, Chang, Chen, & Saltiel, 2006). Протеїни цього комплексу локалізуються в ліпідних рафтах, у відповідь на стимуляцію інсуліну визивають транслокацію GLUT4 та його тимчасову локалізацію в ліпідному рафті в 3T3 адипоцитах, на що вказує мінлива наявність GLUT4 в цих доменах при присутності глюкози (Inoue, et al., 2006). Коли знижується концентрація позаклітинної глюкози, GLUT4 транспортери засвоюються, можливо, завдяки механізму пов'язаному з кавеолами та/або кавеоліном-1. В м'язових клітинах транслокація GLUT4 асоційована з протеїновими маркерами рафтів, оскільки GLUT4 ко-локалізується з флотиліном-1 та залежить від кавеоліну-3. Нестача флотиліну-1 або кавеоліну-3 в міофіломентах мишей провокує значне скорочення інсулін-стимульованого засвоєння глюкози (Fecchi, Volonte, Hezel, Schmeck, & Galbiati, 2006). Також недавні дослідження показали ко-локалізацію з кавеоліном-1 інших членів сімейства транспортерів глюкози GLUT – GLUT1 та GLUT3, а також гексокинази, важливого ензиму метаболізму глюкози (Rauch et al., 2006). Ці знахідки демонструють регулятивну роль ліпідних рафтів в інсулін-стимульованому поглинанні глюкози в м'язовій та жировій тканинах (Michel & Vukovic, 2007).

Поглинання LCFA (від англ. long-chain fatty acids, довголанцюгові жирні кислоти) в жировій тканині також може бути пов'язане з рафтовими доменами

ліпідів. Завантаження холестеролу ЗТЗ адипоцитів призводить до підвищення експресії кавеоліну-1, а також поглинання LCFA, в той час як гіперекспресія мутантного домінуючого кавеоліну-3 зменшує транспорт LCFA в ці клітини (Pohl, Ring, Korkmaz, Eehalt, & Stremmel, 2005). FAT (від англ. fatty acid translocase, транслоказа жирних кислот)/CD36 представлена зсередини та зовні детергент-стійких мембран, виділених з гомогенату адипоцитів, та виключно розташовуються в рафтах плазматичної мембрани, в той час як локалізація детергент-розчинних фрагментів вважається головним чином внутрішньоклітинною (Pohl, et al., 2005). Олеати переважно зв'язуються з FAT/CD36, локалізованими в рафтах. Останні дослідження показали залежність поглинання LCFA від цієї ко-локалізації. Ці дослідження демонструють кореляцію між ліпідними рафтами та поглинанням жирних кислот в адипоцитах, а також подальшу підтримку ролі ліпідних рафтів в субстратному транспорті (Michel & Vukovic, 2007; Pohl, et al., 2005).

#### 1.1.2.3. Ліпіди як компонент перетворень за запрограмованої загибелі

Запрограмована загибель, або апоптоз, це високо регульований добре організований процес позбавлення від непотрібних, пошкоджених, старих або інфікованих клітин, що має вирішальне значення для підтримки гомеостазу. Завдяки тому, що він є процесом, який за рівнем значення важливий так само як проліферація та поділ клітин, існує комплекс зовнішніх та внутрішніх сигнальних систем, в тому числі, факторів цитоплазми та плазматичної мембрани, які залучені до регуляції запрограмованої загибелі клітин (Chaabane, et al., 2013; Elmore, 2007; Martinez, et al., 2010; Thompson, 1995).

Зовнішні сигнальні шляхи залучають активацію так званих рецепторів смерті APO-1/Fas/CD-95, сімейств TRAILR та/або TNFR (Valerie A. Fadok, Bratton, & Henson, 2001), що представлені на поверхні клітин, в той час як внутрішні сигнальні шляхи є наслідком порушення внутрішньоклітинного гомеостазу в результаті пошкодження ДНК, зниження рівнів АТФ, окисного та теплового шоків, контактного стресу та іншого (Elmore, 2007).

Варто наголосити, що сигнальні рецептори загибелі, наприклад, FAS/CD95, локалізуються у особливих ліпідних рафтах. Цей рафтовий підтип збагачений на церамід-сфінгомієлін-гангліозид-Fas/Ezrin сприяє апоптозу. FAS містить домени смерті, які залучені до зв'язування Fas-асоційованих доменів смерті, та залучає каспазу 8 (аспартат-специфічні протеази) до активованого рецептору (Patra, 2008).

Існує чотири основних етапи підчас залучення до внутрішніх і зовнішніх сигнальних шляхів апоптозу. На самому початку відбувається ініціація загибелі за допомогою певних чинників. На наступному, етапі "приймання рішення" активуються системи репарації та апоптозу, і, в залежності від ступеня пошкодження, клітина може загинути або вижити. На етапі "виконання" протеолітична система стає активною, що призводить до апоптозу. Останнім є етап очистки, на якому апоптотичні тілця від клітин, що загинули, видаляються за допомогою макрофагів чи інших фагоцитуючих клітин (Jordan & Harrison, 2003; Ortiz, 2012).

Зовнішні та внутрішні шляхи апоптозу проявляють схожі ключові реакції, такі як активація каспаз (етапи приймання/виконання рішення) та перерозподіл мембранних ліпідів (етапи "виконання" та "очистки"). Активація каспази-3, також відома як "точка неповернення", є центральною подією апоптозу, що призводить до характерних наслідків: деградації органел та цитоскелету, фрагментації ДНК та блебінг (Elmore, 2007; Ortiz, 2012; Sebbagh et al., 2001a; Thompson, 1995; Thornberry & Lazebnik, 1998).

Процес зморщування клітин за апоптозу супроводжується везикуляцією (утворенням апоптотичних тілець), внаслідок якої відбувається її фрагментація та знешкодження макрофагами внутрішньоклітинних компонентів, які можуть становити загрозу для оточуючих клітин (Cosulich, Horiuchi, Zerial, Clarke, & Woodman, 1997; Häcker, 2000; Lane, Allan, & Woodman, 2005; Nakajima et al., 2004). Було показано, що на поверхні плазматичної мембрани апоптотичних клітин утворюються везикули, які мають походження не тільки самої плазматичної мембрани, але й з ядерного оточення та ендоплазматичного

ретикулуму (Bilyu et al., 2012; Lane, et al., 2005). Тим не менш, цей феномен не був описаний як шлях реорганізації ліпідного бішару.

Процес ериптозу (суїцидальна запрограмована загибель еритроцитів) є відповідальним за усунення старих (Ghashghaeinia, et al., 2012) або пошкоджених червоних клітин крові та залучається до різноманітних патофізіологічних станів, зокрема, діабету (Maellaro, et al., 2011), патологій нирок (Polak-Jonkisz, et al., 2013), хвороб Паркінсона (Pretorius, et al., 2014) і Альцгеймера (Johansson, et al., 2014) та інших. Не зважаючи на відсутність мітохондрій та ядра, початково, ериптоз вважався подібним до апоптозу, залучаючи схожий рецепторний шлях активації (Lu, et al., 2008; Mohandas & Gallagher, 2008). В ключі із цим твердженням відбувається зниження внутрішньоклітинного калію, збільшення концентрації цитоплазматичного кальцію, зморщування клітин, падіння фосфатидилсеринової (PS) трансмембранної асиметрії та процес везикуляції плазматичної мембрани (Kuypers, et al., 1996; F. Lang & Qadri, 2012). На відміну від апоптозу, ериптоз в першу чергу пов'язаний з активацією  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного  $\mu$ -кальпаїну – цистеїнової ендопептидази, що і призводить до деградації протеїнів, в т.ч. цитоскелету з подальшою везикуляцією плазматичної мембрани (F. Lang & Qadri, 2012; Pretorius, et al., 2014). На додачу,  $\text{Ca}^{2+}$  активує  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливі  $\text{K}^+$  канали з подальшим вивільнення  $\text{K}^+$ , гіперполяризацією плазматичної мембрани та вивільненням  $\text{Cl}^-$  за рахунок зростання електричного градієнта (F. Lang & Qadri, 2012; K. S. Lang et al., 2005). Втрата  $\text{KCl}$  супроводжується виходом води за осмосом, що призводить до втрати об'єму та зморщування клітини. Паралельно із цим активується  $\text{Ca}^{2+}$ -залежна скрамблаза та експонує PS на зовнішній моношар, де той розпізнається макрофагами. В нормі такі еритроцити елімінуються в печінці клітинами Купфера (рис. 1.6.) Отже, за основними відомими з літератури ознаками, можна стверджувати про подібність апоптозу та ериптозу. Хоча, візуальна схожість може ховати відмінність, що відбувається на фоні основного процесу.

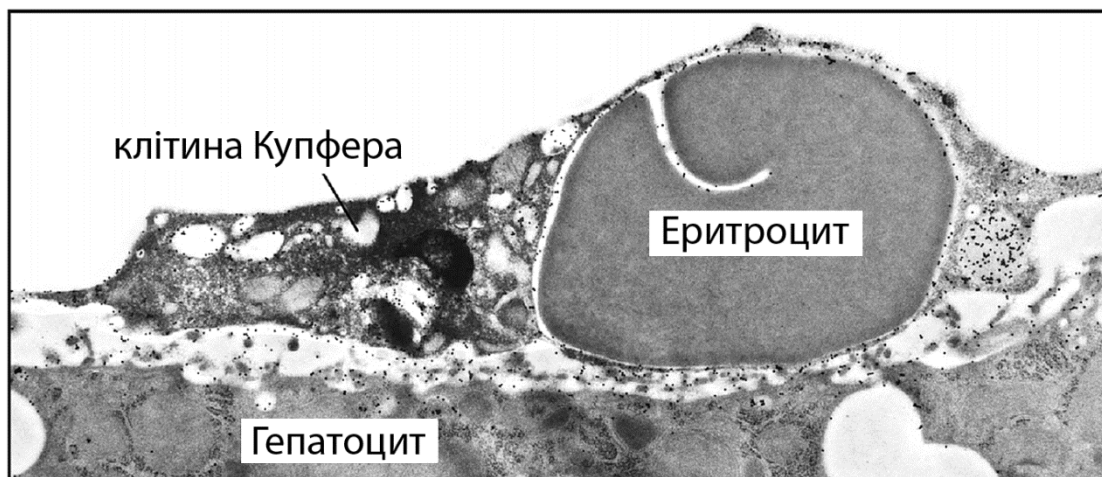


Рис. 1.6. Електронна мікроскопія еритроциту, який поглинений клітиною Купфера в печінці щура. Оригінал картинки міститься в (K. S. Lang, et al., 2005). Автор зображення Юурген Рот (відділ Клітинної та Молекулярної патології, Університет Цюріху).

### *Порушення трансмембранної асиметрії*

Важливі зміни за апоптозу також відбуваються на рівні плазматичної мембрани. Як було зазначено вище, в живих клітинах різноманітні АТФ-залежні системи контролюють асиметрію плазматичної мембрани (Van Meer, et al., 2008), що відіграє важливу роль в фолдингу та функціонуванні мембранних протеїнів (Bogdanov & Dowhan, 1999), взаємодії із цитоскелетом, впливаючи на механічні властивості клітин (Fantini, et al., 2002; Kay, Koivusalo, Ma, Wohland, & Grinstein, 2012; Mohandas & Gallagher, 2008; Simons & Ehehalt, 2002; Yeung et al., 2008), тощо. На властивостях плазматичної мембрани апоптоз позначається за рахунок активації (як каспаз-залежної, так і  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної) різноманітних скрамблаз-подібних та Хк-подібних транспортерів (Marino & Kroemer, 2013; Pászty et al., 2002; J. Suzuki, Denning, Imanishi, Horvitz, & Nagata, 2013), що призводить до виходу фосфатидилсерину (PS) на зовнішній моношар та дозволяє макрофагам розпізнавати такі клітини (Valerie A. Fadok, et al., 2001; Hanshaw & Smith, 2005; Kay & Grinstein, 2011; Martinez, et al., 2010; Narula & Strauss, 2003). Варто відзначити, що PS не єдиний ліпід, який змінює свою локалізацію за суїцидальної загибелі.

Сфінгомієлін (SM) переноситься із зовнішнього на внутрішній моношар, а потім піддається гідролізу до кераміду (Tepper et al., 2000). Утворення кераміду за рахунок гідролізу сфінгомієліну зазвичай залежить від активності каспази (D. R. Green, 2000), що призводить до значущих ефектів не лише на структурі та властивостях мембран, але і на всьому сигнальному шляху (Dekaliuk, Pyshev, & Demchenko, 2015; Gajate & Mollinedo, 2015; F. Lang, Gulbins, Lang, Zappulla, & Föller, 2010; Milhas, Clarke, & Hannun, 2010; Tepper, et al., 2000). Інгібітори каспаз можуть блокувати утворення керамідів під час апоптозу (Boesen-de Cock, Tepper, de Vries, van Blitterswijk, & Borst, 1999; Brenner et al., 1998). Хоча візуалізація і, таким чином, визначення латерального розподілу ліпідних фаз у живих клітинах залишається проблемою (Levental & Veatch, 2016), апоптотичні клітини мають широкий спектр механізмів, що впливають на ліпідний склад плазматичної мембрани (Marino & Kroemer, 2013; J. Suzuki, et al., 2013; Tepper, et al., 2000). Таким чином, було висунуто гіпотезу, що апоптоз значною мірою змінює ліпідну організацію зовнішнього моношару плазматичної мембрани (Laakko, King, & Fraker, 2002). Крім того, можна очікувати, що аналогічно значні зміни відбуваються і на без'ядерних клітинах, еритроцитах, хоча цього ще не було продемонстровано.

## 1.2. Біохімічні та морфологічні підходи до дослідження ліпідних фаз

Формування рафт-асоційованими ліпідами упорядкованих ліпідних фаз робить їх відносно нерозчинними в таких детергентах, як тритон X-100 при 4°C. Відповідно, рафти можуть бути легко виділені як детергент-нерозчинні, або детергент-стійкі, мембран ультрацентрифугуванням в градієнті щільності сахарози. За цих умов, детергент стійкі мембрани відтворюються як молекулярні комплекси з плавучих фракцій. Міграція детергент-стійких мембран у шари низької щільності узгоджується з відносно високим вмістом ліпідів у цих фракціях. Біохімічний аналіз детергент-стійких мембран виявив специфічне збагачення глікосфінголіпідами, сфінгомієліном та холестеролом. Однак, за винятком фосфатидилінозиту, фракції бідні на гліцерофосфоліпіди.

На додаток, гліцерофосфоліпіди детергент-стійких ліпідних фаз головним чином мають насичені та мононенасичені ацильні ланцюги, відповідно до концепції, що насичення ацильних ланцюгів сприяє формуванню рафтів.

Однак, цей метод вимагає ізоляції при 4°C, температури, яка може призвести до збільшення або навіть викликати формування рафтів в плазматичній мембрані, що ставить під сумнів існування рафтів в живих системах (Fantini, et al., 2002). Саме тому були розроблені підходи *in situ* для вивчення локалізації, біохімії та морфології ліпідних фаз та асоційованих протеїнів в інтактних клітинах, а також модельних мембранах. Напевно, найбільш простий прямиий спосіб вивчення ліпідних рафтів базується на моніторингу ліпідного складу мембран клітин за допомогою мас спектрометрії (Boxer, Kraft, & Weber, 2009; Lozano et al., 2013), але такий метод використовує вакуум та висушені заморожені зразки. Атомно-силовою мікроскопією дозволяє отримувати наноскопічне зображення мембран у водному розчині, та може із легкістю відрізнити рідинно-впорядковані домени через їх характерну товщину мембрани, яка на 0.5 нм більша ніж в рідинно-невпорядкованих доменах (Goksu, Vanegas, Blanchette, Lin, & Longo, 2009; J. E. Shaw et al., 2006). Тим не менш, атомно-силовою мікроскопією добре працює лише в модельних та ізольованих клітинних мембранах, що були іммобілізовані на поверхні. Ядерний магнітний резонанс дозволяє напряду вивчати порядок ліпідів по групам головок ліпідів та жирним кислотам хвостових груп, але такий підхід обмежений модельними мембранами із простим складом (Swamy et al., 2006). Оптичні техніки є набагато більш зручними для вивчення мембран через те, що вони дозволяють неінвазивним шляхом спостерігати чудове просторове та часове розділення. Наприклад, методом детектування поодиноких часточок (K. G. N. Suzuki et al., 2007), за рахунок Фьостерівського перенесення енергії (Bader et al., 2011; Goswami et al., 2008; Kenworthy, Petranova, & Edidin, 2000; Loura & Prieto, 2011), флуоресцентної кореляційної спектроскопії (Bacia, Scherfeld, Kahya, & Schwille, 2004; Lasserre et al., 2008; Lenne et al., 2006) та мікроскопії надроздільної здатності (Eggeling et al., 2009; D. M. Owen, Magenau, Williamson,

& Gaus, 2012; Sengupta et al., 2011; Wilmes et al., 2012) можна вивчати олігомеризацію, перехідні стани та дифузію мембранних протеїнів, що свідчить про їх нанорозмірне впорядкування в межах ймовірних ліпідних рафтів. Використання рафтових маркерів у комбінації із різними підходами до конфокальної мікроскопії, показали в різноманітних типах клітин наявність гетерогенності ліпідів плазматичної мембрани та дозволили вченим оцінити розмір рафтів, як невеликих ділянок близько 50-70 нм в діаметрі. За допомогою методів хімічних перехресних зв'язків було показано, що глікозилфосфатидилінозитол-зв'язані протеїни асоційовані з мембранними мікродоменами, що містять не менш 15 молекул, які набагато менші ніж ті, що спостерігалися після детергентної екстракції (Fantini, et al., 2002). Найбільш привабливим для досліджень мембран оптичними методами є використання чутливих до оточення сольватохромних зондів, що можуть за рахунок спектральної відповіді відрізняти рідинно-впорядковані та рідинно-невпорядковані ліпідні фази (Oleksandr A. Kucherak et al., 2010; Shynkar et al., 2007).

Ще один популярний підхід, що використовується для вивчення структури та функцій рафтів – це моделювання їх ліпідного складу. Молекули, що здатні очищувати плазматичну мембрану від холестеролу (наприклад, метил- $\beta$ -циклодекстрин), широко використовуються як агенти, що порушують структури рафтів. Вміст ліпідних рафтів також може бути зміненим завдяки метаболічним інгібіторам синтезу сфінголіпідів (L-цикосерин, фуmozинін В1, PDMP). В той же час, слід враховувати, що зменшення мембранного холестеролу може спровокувати серйозні ефекти, які не можуть бути виключно пов'язані з дисперсією рафтів. З цієї причини рекомендується комбінація біохімічних і морфологічних підходів для вивчення фізіологічних функцій рафтів та їхньої ролі в неінфекційних та інфекційних патологіях (Zidovetzki & Levitan, 2007).



Таким чином, розподіл індивідуальних ліпідів та ліпідних фаз має значення для відображення структурних та функціональних взаємодій в клітинах. Незважаючи на широкі дослідження мембранних структур, актуальним залишається вивчення впливу індивідуальних ліпідів та ліпідних фаз на властивості плазматичної мембрани за різних функціональних станів клітин. Варто зауважити, що ще менше відомо про ці процеси за фізіологічних температур, оскільки більшість попередніх досліджень спиралися на моделі фіксованих клітин, або за низьких температур. Оскільки запрограмована загибель клітин є процесом, що позначається на всіх структурах клітини, тому цілком логічно запропонувати гіпотезу, що активація внутрішніх механізмів апоптозу позначається не тільки на асиметрії плазматичної мембрани, але й на колективних властивостях її супрамолекулярної організації. Еритроцити в цьому контексті позбавлені внутрішньої мережі мембран та, на відміну від ядерних клітин, не мають синтезу ліпідів *de novo*, а їх ліпідний метаболізм суттєвою мірою залежить від циклу Лендса. Саме тому метою дисертаційного дослідження є вивчення змін структурно-функціональних властивостей супрамолекулярної організації мембран еритроцитів та ядерних клітин за запрограмованої загибелі. Для досягнення поставленої мети та вивчення біохімічних процесів на рівні плазматичної мембрани доцільним є застосування флуоресцентних підходів, оскільки вони характеризуються мінімальною інвазивністю з можливістю наблизити експериментальні умови до фізіологічних.

## 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

### 2.1. *Везикули та умови отримання*

Діолеїлфосфатидилхолін (від англ. Dioleoylphosphatidylcholine, DOPC), пальмітоїлолеїлфосфатидилхолін (від англ. palmitoyloleoylphosphatidylcholine, POPC), діолеїлфосфатидилсерин (від англ. dioleoylphosphatidylserine, DOPS), фосфатидилхолін з жовтка яйця (від англ. egg yolk phosphatidylcholine, EYPC), фосфатидилсерин з мозку теля (від англ. bovine brain phosphatidylserine, BBPS) та холестерол були отримані з Sigma-Aldrich. Сфінгомієлін з мозку теляти (від англ. Bovine brain sphingomyelin, SM) був отриманий з Avanti Polar Lipids (США).

Великі одношарові везикули (від англ. Large unilamellar vesicles, LUV) були отримані класичним методом екструзії як описано в (Hope, Bally, Webb, & Cullis, 1985). Суспензія багатшарових везикул підлягала екструзії з використанням екструдера Lipex Biomembranes (Канада). Розмір фільтрів був спочатку 0.2 мкм (7 пасажів), потім через 0.1 мкм (10 пасажів). Такій підхід призводить до утворення LUV із діаметром 0.11 мкм, як було показано за допомогою Malvern Zetamaster 300 (Велика Британія). 15 мМ фосфат-цитратний, рН 7.0 буфер був використаний в цих експериментах.

Гігантські одношарові везикули (від англ. Giant unilamellar vesicles, GUV) були отримані методом електроформації за допомогою модифікованої в лабораторії рідинної камери (Данія) з використанням протоколу, що був описаний раніше (M. Angelova & Dimitrov, 1988; Miglena I. Angelova, 2007; M. I. Angelova, Soléau, Méléard, Faucon, & Bothorel, 1992; Fidorra, Duelund, Leidy, Simonsen, & Bagatolli, 2006; Kahya, Scherfeld, Bacia, Poolman, & Schwille, 2003). 0.1 мМ розчин ліпідів в хлороформі був нанесений на платинові пластини та випарований під вакуумом впродовж 30 хвилин. Камера, термостатована при 55 °С, була наповнена 300 мМ розчином цукрози та 2-В, 10-Гц характеристики струму були застосовані впродовж 2 годин. Потім 50 мл аліквота отриманого стокового розчину GUV в цукрозі (охолоджений до кімнатної температури)

додавалася до 200 мл 300 мМ розчину глюкози для отримання кінцевої суспензії GUV, що використовувалися в експериментах мікроскопії.

## 2.2. *Клітинні лінії та умови культивуації:*

Ізольовані еритроцити були виділені із периферичної крові здорових донорів чоловічої статі віком 22-27 років (відповідності вимогам норм біоетики зазначених у "Рекомендації комітетам із етики, які здійснюють експертизу біомедичних досліджень" (ВОЗ, 2000)). Донори були проінформовані та дали згоду на використання матеріалу в дослідницьких цілях. До 9 частин крові додавалось 1 частина цитрату натрію (3.8%  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) в еквівалентному об'ємі 0.9% NaCl. Еритроцити відмивалися в 0.9% NaCl шляхом осадження суспензії за допомогою трьох центрифугувань в 1,5 мл пластикових пробірках в центрифугі Eppendorf MiniSpin (380 g, 450 g, 500 g відповідно). Надосад був видалений після кожного центрифугування.

Гомогенність суспензії еритроцитів перевірялась за допомогою протокового цитофлуориметра у відповідності до показників прямого і бічного розсіяння. Відсоток відмитих клітин становив  $96.59 \pm 1.23$  %. Надалі еритроцити були ресуспендовані в 96-лункові планшети в 200  $\mu\text{l}$  розчину Рінгера (мМ: 125 NaCl, 5 KCl, 1  $\text{MgSO}_4$ , and 32 HEPES/NaOH (pH 7.4), 5 глюкоза та 1  $\text{CaCl}_2$ ) та інкубовані при гематокриті 0.4%, 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  з високим рівнем вологості (Föller et al., 2010; F. Lang, et al., 2010; Mahmud, Föller, & Lang, 2009; Sopjani, Foller, Haendeler, Gotz, & Lang, 2009).

T-лімфоцитарні клітини гістоцитарної лімфоми людини (Jurkat) були обрані, оскільки вони є класичними для досліджень запрограмованої загибелі (Bratton et al., 1997; de Graaf et al., 2004; Tepper, et al., 2000). Відповідно до протоколу ATCC клітини культивувалися в ATCC- модифікованому середовищі RPMI 1640 (Gibco) з 10 % інактивованої теплою ендотеліальною телячої сироватки (FBS, Gibco), 1 % розчином антибіотику (пеніцилін-стрептоміцин, Nucleon) в термостатованому інкубаторі з високим рівнем зволоженості з 5%  $\text{CO}_2$  та температурою 37 °C.

Епітеліальні клітини аденокарциноми людини (HeLa) були культивовані в середовищі DMEM (Gibco) з 10 % інактивованої теплою ендотеліальною телячою сироватки (FBS, Lonza), 1 % розчином антибіотику (пеніцилін-стрептоміцин, Gibco-Invitrogen) в термостатованому інкубаторі з високим рівнем зволоженості з 5% CO<sub>2</sub> та температурою 37 °C.

Для експериментів протокової цитометрії або спектрофлуориметрії клітини висаджувалися в 24-лункові (Jurkat та HeLa) у кількості 25×10<sup>4</sup> клітин/лунку або в 96-лункові планшети (еритроцити, 4% гематокрит) та інкубувалися у відповідному середовищі впродовж зазначених проміжків часу. Для переведення клітин HeLa в суспензію, відмиті двічі в фосфатному буфері клітини інкубувалися із трипсином (Sigma-Aldrich) або ак'ютазою (Sigma-Aldrich) впродовж 2-5 хвилин. Після інкубації суспензійні клітини переносилися в 1.5 мл пробірки та двічі відмивалися розчином Рінгера на 750 g впродовж 5 хвилин Eppendorf MiniSpin.

### 2.3. *Модифікація складу плазматичної мембрани клітин*

Виснаження холестеролу виконувалося за допомогою метіл- $\beta$ -циклодекстину (M $\beta$ CD, Sigma-Aldrich) для індукції прямих змін впорядкування ліпідів плазматичної мембрани. Для досягнення цієї мети стоковий розчин M $\beta$ CD в фосфатному буфері (PBS) був виготовлений у зручній концентрації (50 мМ) та фільтрований за допомогою фільтрів Millipore (0.2  $\mu$ m). Розчин додавався до клітин в кінцевій концентрації 5 мМ (Oncul et al., 2010). Еритроцити та клітини Jurkat (або HeLa) інкубувалися при 37 °C впродовж 1 та 2 годин, відповідно. Відповідно до даних літератури такий підхід призводить до екстракції від 60 до 100 % холестеролу плазматичної мембрани з клітин CHO, телячих ендотеліальних клітин та фібробластів (Levitan, Christian, Tulenko, & Rothblat, 2000; Romanenko et al., 2004; Zidovetzki & Levitan, 2007).

Висока афінність M $\beta$ CD до холестеролу також може бути використана для збагачення ним плазматичної мембрани (Zidovetzki & Levitan, 2007). Насичення холестеролом (Chol, Sigma-Aldrich) плазматичної мембрани клітин

відбувалося за допомогою комплексу Chol:M $\beta$ CD (1:20). Стоковий розчин Chol:M $\beta$ CD в фосфатному буфері (PBS) був виготовлений у зручній концентрації (50 мМ за M $\beta$ CD) та фільтрований за допомогою фільтрів Millipore (0.2  $\mu$ m) та доданих до клітин в кінцевій концентрації 5 мМ (за M $\beta$ CD) (Zidovetzki & Levitan, 2007). Еритроцити та клітини HeLa інкубувалися при 37 °C впродовж 2 та 3 годин, відповідно. За наведених умов збагачення холестеролу відбувається на рівні від 30 до 300 відсотків в залежності від типу клітин (Zidovetzki & Levitan, 2007).

7-кетохолестерол відомий своєю здатністю призводити до деполіаризації мембран, що призводить до зниження впорядкування ліпідів плазматичної мембрани (Rentero et al., 2008). Кетонна група біля 7 атому вуглецю призводить до зміни орієнтації стеролу в плазматичній мембрані, що не дозволяє щільне пакування насичених ацильних ланцюгів сфінгомієліну, необхідних для формування впорядкованої фази (Telesford, Verreault, Reick-Mitrisin, & Allen, 2015). Таким чином пряме введення 7-кетохолестеролу в плазматичну мембрану призводить до дестабілізації рідинно-впорядкованої фази та порушення властивостей плазматичної мембрани (Schieffer, et al., 2014). Збагачення 7-кетохолестеролом (7KChol, Sigma-Aldrich) відбувалося за допомогою комплексу 7KChol:M $\beta$ CD (1:20). Стоковий розчин 7KChol:M $\beta$ CD в фосфатному буфері (PBS) був виготовлений у зручній концентрації (50 мМ за M $\beta$ CD) та фільтрований за допомогою фільтрів Millipore (0.2  $\mu$ m) та доданих до клітин в кінцевій концентрації 5 мМ (за M $\beta$ CD). Еритроцити та клітини HeLa інкубувалися при 37 °C впродовж 2 та 3 годин, відповідно.

Гідроліз сфінгомієліну, який залучений до формування ліпідних рафтів, проводився з використанням сфінгомієлінази (SMаза, Sigma-Aldrich). Таким чином застосування, ідея використання цієї речовини базується не тезі, що ензим суттєво впливає на впорядкування ліпідів плазматичної мембрани (Silva, Futerman, & Prieto, 2009) та частково імітує природні процеси, що відбуваються за апоптозу (Brenner, et al., 1998). Стоковий розчин SMази (20 Од/мл) був виготовлений в 50 мМ Тріс-НСl буфері, рН=7.5 з 10% гліцеролом, що був

добавлений до клітин в кінцевій концентрації 200 мОд/мл. Еритроцити та клітини HeLa інкубувалися при 37 °С впродовж 2 та 3 годин, відповідно.

#### 2.4. Індуктори запрограмованої загибелі та умови інкубації

Для індукції апоптозу були використані п'ять різних індукторів:

- IPA-3 (1,1'-Disulfanediyldinaphthalen-2-ol, Sigma-Aldrich) є аллостеричним інгібітором Pak1 (p21-активованої кінази) III (Christy C Ong et al., 2011);
- камптотецин (Sigma-Aldrich) є інгібітором ДНК топоізомерази I (Hsiang, Hertzberg, Hecht, & Liu, 1985);
- іономіцин (Sigma-Aldrich) є іонофором, що призводить до утворення пор, через які  $Ca^{2+}$  накопичується в цитоплазмі клітин та призводить до розвитку  $Ca^{2+}$ -залежної клітинної загибелі (Abed et al., 2012; Gil-Parrado et al., 2002);
- сфінгозин стимулює вхід  $Ca^{2+}$  в цитоплазму (Qadri et al., 2011);
- куркумін стимулює вхід  $Ca^{2+}$  в цитоплазму та сприяє утворенню кераміду (Bentzen, Lang, & Lang, 2007).

Для інгібування апоптозу застосовувався пептид Z-DEVD-FMK (BioVision). Пептидна послідовність DEVD (Аспарагінова кислота-Глутамінова кислота-Валін-Аспарагінова кислота) є специфічним сайтом розпізнавання для каспази-3, що був знайдений в полі (АДФ-рибозо) полімеразі (PARP). синтетичний пептидний інгібітор, що базується на цій послідовності зворотно інгібує каспазу-3 та блокує розвиток апоптозу (Rickers et al., 1998; Thornberry & Lazebnik, 1998).

Клітини HeLa були інкубовані із камптотецином (CPT, 5 мкг/мл) або IPA-3 (25 мкМ) відповідний проміжок часу. Для інгібування активності каспази-3, клітини були ко-інкубовані із 100 мкМ Z-DEVD-FMK. Інгібітор додавався за 30 хвилин до внесення індуктора апоптозу згідно з (Pastorino, Chen, Tafani, Snyder, & Farber, 1998; Rickers, et al., 1998).

Для подальших досліджень клітини були інкубовані із іономіцином в концентрації 2мкМ (еритроцити, 3 години) та 8мкМ (клітини Jurkat, HeLa, 6

годин) для кожного типу клітин відповідно при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> та високому рівні вологості. Для інкубації із ІРА-3 використовувалася 5 мкМ (еритроцити) та 25 мкМ (клітини Jurkat) концентрації індуктора впродовж 48 годин при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> та високому рівні вологості.

Для індукції ериптозу також застосовувалися сфінгозин (10 мкМ, 48 годин) та куркумін (1 мкМ, 24 години) при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> та високому рівні вологості.

## 2.5. *Метод кислотних еритрограм*

Для дослідження структурно-функціональних властивостей плазматичної мембрани еритроцитів був застосований метод кислотних еритрограм (Терсков & Гительзон, 1957). Інтактні та індуквані на клітинну загибель еритроцити були відмиті від розчину Рінгера та поміщені в мікрокювету в об'ємі 500мкл в 0.9% розчині NaCl. Для реєстрації зміни оптичної щільності при 670нм використовувався спектрофотометр LambdaBio+ із кінетичними налаштуваннями (вимірювання впродовж 30 хвилин з інтервалом в 10 секунд). Для індукції гемолізу використовували 0.4 мМ HCl.

Після реєстрації сигналу початкова точка приймалася за 0% гемолізу, а точка виходу на плато за 100%. Після цього дані були розраховані як приріст гемолізу, тобто  $\Delta H = H_{i+1} - H_i$  (де  $H_i$  – це відповідна точка на кривій гемолізу). Такий розрахунок дозволяє побудувати гістограму залежності приросту гемолізу від часу у вигляді гістограми, де  $V_{max}$  – буде відповідати середньому частотному значенню, яке було розраховане за допомогою програми Matlab.

## 2.6. *Барвники, їх властивості, умови забарвлення та реєстрації сигналу*

Для характеристики стану клітин використовувалися як комерційні барвники так і розроблені в співпраці із колегами з факультету фармації Страсбурзького університету.

### 2.6.1 *Флуоресцентний барвник на фосфатиділсерин Анексин 5*

Для детекції екстерналізованого PS на зовнішній моношар плазматичної мембрани використовувався GFP-мічений Анексин 5 (BioVision) у

відповідності до інструкцій, описаних в протоколі "Annexin V-EGFP Apoptosis Kit". Такий підхід є класичним для детекції запрограмованої загибелі, оскільки спрямований на моніторинг ознаки, що проявляється в усіх клітинах незалежно від їх типу (Bratton, et al., 1997; Demchenko, 2012; Kay, et al., 2012; Van Engeland, Nieland, Ramaekers, Schutte, & Reutelingsperger, 1998; Vermes, Haanen, & Reutelingsperger, 2000).

Клітини забарвлені із GFP-міченим Анексином 5 аналізувалися за допомогою прямого та бічного розсіяння на протокових цитометрах BD LSR II Beckman Coulter Epics XL. Для збудження флуоресценції барвника використовувався аргонний лазер із довжиною хвилі 488 нм. Для реєстрації сигналу був задіяний канал емісії FL1. Для кожного зразка реєструвалося 30,000 подій для отримання ефективного сигналу. Дані аналізувалися за допомогою програмного забезпечення FlowJo та FCS express V3.

#### 2.6.2. Флуоресцентний барвник на активовану каспазу-3 FITC-DEVD-FMK

Для детекції активованої каспази-3 використовувалась мітка FITC-DEVD-FMK (eBioscience), що була застосована у відповідності до інструкцій, описаних в протоколі CaspGlowGreen caspase-3 Staining Kit. Активація каспази-3 є одним з основних маркерів розвитку апоптозу в більшості ядерних клітин та є "точкою неповернення", після якої процес буде не зупинити (Budihardjo, Oliver, Lutter, Luo, & Wang, 1999; Rudel & Bokoch, 1997; Thornberry & Lazebnik, 1998; Vermes, et al., 2000).

Клітини забарвлені із FITC-DEVD-FMK аналізувалися за допомогою прямого та бічного розсіяння на протокових цитометрах BD LSR II та Beckman Coulter Epics XL. Для збудження флуоресценції барвника використовувався аргонний лазер із довжиною хвилі 488 нм. Для реєстрації сигналу був задіяний канал емісії FL1. Для кожного зразка реєструвалося 30,000 подій для отримання ефективного сигналу. Дані аналізувалися за допомогою програмного забезпечення FlowJo та FCS express V3.



### 2.6.3. Флуоресцентний барвник на кальцій Fluo-4

Для детекції внутріклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  клітини були забарвлені із Fluo-4 (Invitrogen). До відмитих клітин в розчині Рінгера додавався барвник в кінцевій концентрації 5мкМ (< 0.25% DMSO від об'єму) та інкубувався впродовж 40 хвилин (Lim et al., 2010). Підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в клітинах є одним з маркерів апоптозу (Gil-Parrado, et al., 2002; Kane, Young, Schanne, & Farber, 1980; Pászty, et al., 2002) незбудливих клітин та основним вторинним месенджером ериптозу (Föller, Huber, & Lang, 2008; Kempe et al., 2007; E. Lang, Qadri, & Lang, 2012).

Клітини забарвлені із Fluo-4 аналізувалися за допомогою прямого та бічного розсіяння на протоковому цитометрі Beckman Coulter Epics XL. Для збудження флуоресценції барвника використовувався аргонний лазер із довжиною хвилі 488 нм. Для реєстрації сигналу був задіяний канал емісії FL1. Для кожного зразка реєструвалося 30,000 подій для отримання ефективного сигналу. Дані аналізувалися за допомогою програмного забезпечення FlowJo та FCS express V3.

### 2.6.4. Флуоресцентний барвник на первинні аміни TNBS

Для дослідження зміни асиметрії PE в плазматичній мембрані клітин за запрограмованої загибелі, була застосована тринітробензенсульфонова кислота (від англ. 2,4,6 –trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS), яка зв'язує первинні аміни (Рис. 2.1.) в таких молекулах як PS, LPG та PE (Lee & Forte, 1979). За рахунок своєї значної гідрофільності ця молекула не спроможна проникати крізь бішар плазматичної мембрани. Оскільки наявність LPG характерна лише бактеріальним мембранам, тільки PS та PE зовнішнього моношару будуть помічені.

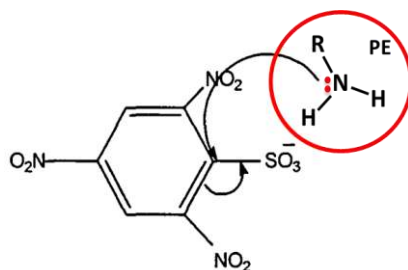


Рис. 2.1. Молекула тринітробензенсульфонової кислоти (від англ. 2,4,6 – trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS) при взаємодії із первинними амінами.

Для апробації підходу були створені SUV в HEPES буфері з рН=8.1, які склалися з DOPE та DLPS. До 300 мкМ розчину везикул додавався 1 мМ TNBS. Везикули інкубувалися при +4 °С впродовж години. Для зупинення реакції використовували розчин 0.5 М NaCl в 0.1 М HCl у співвідношенні 1:1 із розчином забарвлених везикул. Після перемішування впродовж 5 хв за допомогою вортексу до отриманої суміші додавався розчин хлороформу та метанолу (1:3) у співвідношенні 3:1 із початковою сумішшю. Після чергового етапу перемішування (30 хв за допомогою вортексу) до отриманої суміші додавався розчин 0.5 М NaCl в 0.1 М HCl у співвідношенні 0.25:1. Після останнього етапу перемішування (30 хв за допомогою вортексу) проводилося осадження (центрифуга Eppendorf, 14000g) таким чином, що ліпіди переходили в нижню хлороформну фракцію.

Для виявлення мічених та немічених ліпідів проводилась кисла тонкошарова хроматографія (хлороформ-метанол-оцтова кислота=65-25-8). Після випаровування розчинників з пластини, вона сканувалася та поміщалася в камеру, насичену кристалічним йодом, та після інкубації впродовж 2 годин сканувалася ще раз.

В клітинних дослідженнях, для запобігання міченню молекули PS, клітини були преінкубовані із Тихоокеанським синім (Pacific blue) Анексином 5 за відповідним протоколом (3мкл барвника додавалися до клітин в анексин-зв'язуючому буфері на 15 хв при +4 °С, Annexin V Apoptosis Kit), який є специфічним рецептором до цього ліпиду та за рахунок цього перешкоджає доступу для молекули TNBS. Для подальшої інкубації із TNBS, реакція з яким вимагає лужного рН, анексин-зв'язуючий буфер був доведений до рН=7.9-8.0. Інкубація із 200мкМ TNBS відбувалась впродовж 30 хвилин за +4 °С.

Реєстрація сигналу відбувалась на протоковому цитофлуориметрі BeckmanCoulter Gallios. При чому, реєстрація сигналу TNBS відбувалась при

збудженні 488 нм в каналі FL6, а реєстрація Тихоокеанського синього (Pacific blue) Анексину 5 при збудженні 405 нм в каналі FL9.

#### 2.6.5. Флуоресцентний зонд на мембрани PA

Для детекції інтегрального упорядкування ліпідів в мембранних структурах клітин був застосований зонд push-pull pyrene, PA (Niko, Didier, Mely, Konishi, & Klymchenko, 2016) (Рис. 2.2.).

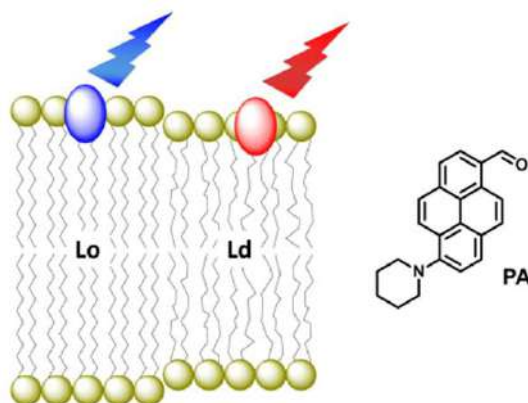


Рис. 2.2. Схематичне представлення кольорової відповіді сольватохромного флуоресцентного зонду на порядок ліпідів в мембранах та хімічні структури PA. Модифіковано з (Niko, et al., 2016)

Для забарвлення із PA, клітини HeLa були висаджені 2-лункові камери Labtek з щільністю  $5 \times 10^4$  клітин. Після промивання клітин розчином Рінгера, свіжо приготовлений розчин PA в розчині Рінгера додавався до клітин в кінцевій концентрації 100 нМ ( $< 0.25\%$  DMSO від об'єму), відповідно, та інкубувалися впродовж 10 хвилин в темряві за кімнатної температури.

Для роботи із суспензійними клітинами, клітини Jurkat та еритроцити висаджувалися в 2-лункові камери Labtek в щільності  $5 \times 10^4$  клітин або 100  $\mu$ L інкубованої суспензії на лунку, відповідно. Після промивання клітин розчином Рінгера, свіжеприготовлений розчин PA в розчині Рінгера додавався до клітин в кінцевій концентрації 100 нМ ( $< 0.25\%$  DMSO від об'єму), відповідно, та інкубувалися впродовж 10 хвилин в темряві за кімнатної температури.

SUV були забарвлені із додаванням стокового розчину зонду PA в DMSO до 1 мл везикул до кінцевої концентрації 0.1 мкМ ( $< 0.25\%$  DMSO від об'єму). В

експериментах використовувався 20 мМ HEPES буфер з рН 7.4. Концентрація ліпідів була 200 мкМ.

Експерименти конфокальної мікроскопії проводилися за допомогою приладу ZEISS LSM 780-FCS із 63x/1.4 об'єктивом з масляною імерсією за 37°C, 5% CO<sub>2</sub> та високій вологості.

Для візуалізації клітин із зондом RA, застосовувалось збудження діодним лазером довжиною хвилі 405 нм. Сигнал емісії був розділений на два канали : “синій” (450-540 нм) та “червоний” (550-650 нм). Ратіометрична відповідь розраховувалась як співвідношення інтенсивностей по кожному пікселю в двох каналах емісії ("червоного"/"синього") за допомогою плагіну до програми ImageJ, “Ratio\_Intensity\_color Version 2.5”.

Спектри флуоресценції записувалися за допомогою спектрофлуориметра PTI Quanta Master40 із збудженням 405 нм за кімнатної температури. Всі спектри нормалізувалися відповідно суспензії клітин (або ліпосом) без барвника. Для статистичного аналізу дані були розраховані як співвідношення "червоного"/"синього" (600/500 нм) ліній інтенсивності за допомогою програмного забезпечення OriginPro software.

#### 2.6.6. Флуоресцентні зонди для дослідження зовнішнього моношару мембран NR12S, bNR10S та NR12S+bQ10S

Флуоресцентні зонди F2N12S (Shynkar, et al., 2007) та NR12S (Oleksandr A. Kucherak, et al., 2010) є відносно новими інструментами для досліджень біомембран. Вони інкорпорується спонтанно в зовнішній моношар, залишаються там відносно довгий час та відповідають на структурні зміни в клітинах за апоптозу. Ця відповідь може бути задетектованою за допомогою спектрофлуориметрії, мікроскопії та протокової цитометрії (Oleksandr A. Kucherak, et al., 2010; Shynkar, et al., 2007).

Подібно до F2N12S (Shynkar, et al., 2007), Nile Red був модифікований із гідрокарбоним ланцюгом та сульфатною групою для отримання NR12S (Рис 2.3.). Використовуючи унікальну властивість NR12S "вимикатися" за

присутності йонів дітроніту, була показана властивість зонду залишатися в зовнішньому моношарі ліпідних мембран із незначним фліп-флопом впродовж наших ексериментальних спостережень (Darwich, Klymchenko, Dujardin, & Mély, 2014; Oleksandr A. Kucherak, et al., 2010). Таким чином цей зонд дозволяє спостерігати впорядкування ліпідів в мембранах після екстракції холестеролу, гідролізу SM та апоптозу (Darwich, Klymchenko, Kucherak, Richert, & Mély, 2012; Oleksandr A. Kucherak, et al., 2010).

Дизайн нового зонду bNR10S та bQ10S базується на структурі NR12S (Рис. 2.3). Для отримання зонду, що може специфічно забарвлювати Ld фазу (Рис. 2.3 В), дванадцятиатомний ланцюг молекули NR12S був замінений на об'ємну 3,7-діметилоктильну групу. Гасник флуоресценції bQ10S був розроблений як близький аналог bNR10S, у якого Black Hole Quencher-2 (BHQ-2) замість Nile Red. BHQ-2 був обраний, оскільки спектр його абсорбції перекриває спектр флуоресценції Nile Red. Це дозволяє ефективно FRET-гасіння флуоресценції Nile Red-зондів в ліпідних мембранах (Рис. 2.3 С) (Rémy Kreder et al., 2015).

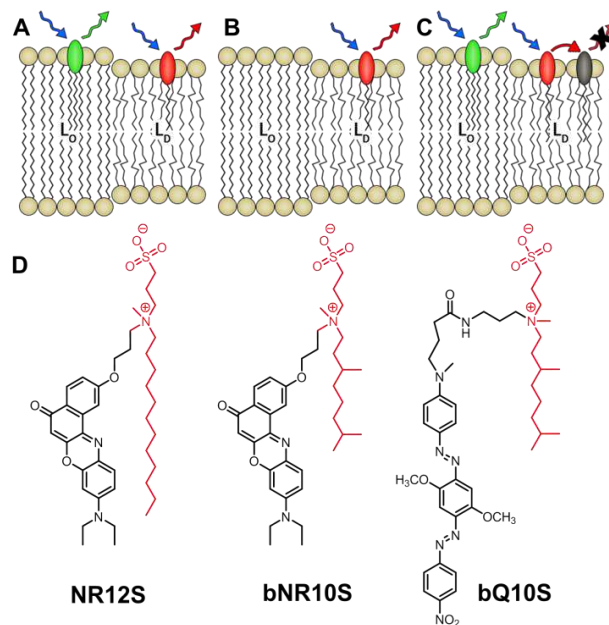


Рис. 2.3. Концепція зондування ліпідних фаз в клітинних мембранах. (А) Зонд чутливий до оточення, що забарвлює  $L_o$  та  $L_d$  фази в різних кольорах (як NR12S). (В) Фазо-селективний зонд, що вилучений з  $L_o$  фази. (С) Гасник вилучений з  $L_o$  фази, що гасить флуоресценцію зонду чутливого до оточення в

Ld фази. Таким чином, підходи (B) та (C) дозволяють мітити Ld та Lo фази, відповідно. (D) Хімічні структури зондів NR12S та bNR10S разом із гасником bQ10S. Ліпідний якір позначений червоним (Rémy Kreder, et al., 2015).

Подібно до попередньої молекули NR12S, новий зонд bNR10S проявляє сильну властивість зв'язуватися з модельними мембранами LUV, створених з DOPC, або Ld фази, що супроводжується >200-кратним підвищеннями інтенсивності флуоресценції для обох зондів. Більш того, квантові виходи для NR12S та bNR10S в везикулах DOPC є досить близькими: 39 та 41%, відповідно. Це свідчить, що принцип зв'язування NR12S та bNR10S із Ld фазою є подібним (Rémy Kreder, et al., 2015).

Фліп-флоп bNR10S між двома моношарами LUV зроблених з DOPC був перевірений з використанням вищеописаного підходу, що базується на гасінні із натрій дітіонітом (Darwich, et al., 2014). У відповідності до попередньо описаних результатів, додавання дітіоніту до LUV створених із домішками NR12S з DOPC дає ~40% гасіння (Рис. 2.4), що свідчить про те, що зонд в зовнішньому моношарі був "вимкнений" агентом. Подібний феномен спостерігався для bNR10S. Потім, зонди додавалися до вже приготовлених LUV та інкубувалися за кімнатної температури впродовж 1 години. В цьому випадку для обох зондів, гасіння було близько 100% відсотків (Рис. 2.4). Це свідчить, що bNR10S, подібно до NR12S, може зв'язуватися селективно із зовнішнім моношаром та знаходиться там без суттєвого фліп-флоп впродовж не менше години за кімнатної температури (Rémy Kreder, et al., 2015).

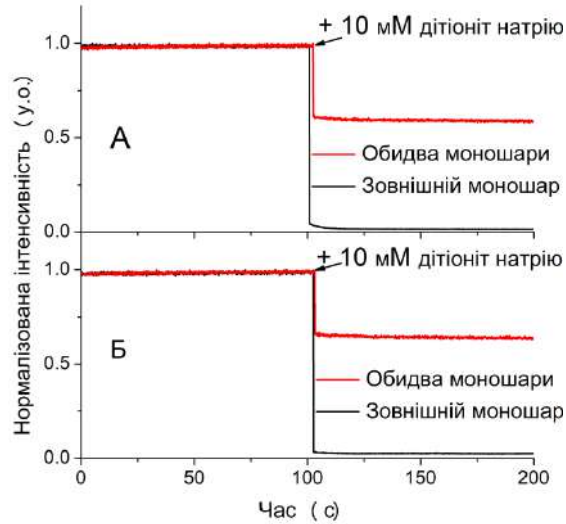


Рис. 2.4. Ефект дітіоніту натрію на інтенсивність флуоресценції NR12S (А) та bNR10S (Б), доданих до LUV в двох варіаціях: до приготування LUV (знаходиться в обох моношарах) та після приготування LUV (знаходиться тільки в зовнішньому моношарі) (Rémy Kreder, et al., 2015).

Використовуючи спектри зондів у чистих фазах (Рис 2.5.), можна розрахувати співвідношення їх розподілу між двома типами фаз шляхом обчислення внеску сигналу зонду з кожної фази в кінцевий спектр у суміші фаз. Припускаючи, що спостережуваний спектр суміші фаз є сумою двох спектрів фаз  $L_o$  та  $L_d$ , інтенсивність флуоресценції при 570 нм (максимальна для  $L_o$  фази) та 602 нм (максимум для  $L_d$  фази) спектру,  $I(570)$  та  $I(602)$ , відповідно, можуть бути виражені наступним чином:

$$(1) \quad I_{570} = I_{mo} + I_{md} * K_d$$

$$(2) \quad I_{602} = I_{md} + I_{mo} * K_o$$

Де  $I_{mo}$  та  $I_{md}$  - максимуми інтенсивностей в фазі  $L_o$  (570 нм) та  $L_d$  (602 нм),  $K_d$  та  $K_o$  - коефіцієнти, отримані з індивідуальних спектрів зонда в чистих фазах  $L_o$  та  $L_d$  наступним чином:  $K_o = I_{602(L_o)} / I_{570(L_o)} = 0,733$ ;  $K_d = I_{570(L_d)} / I_{602(L_d)} = 0,683$ , де  $I_{602(L_o)}$  та  $I_{570(L_o)}$  інтенсивності при 602 та 570 нм для спектра у чистій  $L_o$  фазі, тоді як  $I_{570(L_d)}$  та  $I_{602(L_d)}$  інтенсивність при 570 і 602 нм для спектра в чистій  $L_d$  фазі. Рішення рівнянь (1) та (2) дає:

$$(3) \quad I_{md} = \frac{I_{602} - I_{570} * K_o}{1 - K_d * K_o}$$

$$(4) \quad I_{m0} = I_{570} - I_{md} * K_D$$

Отже, використовуючи рівняння (3) та (4), ми можемо розрахувати інтенсивності піків спектрів у фазах Lo та Ld, що сприяють формуванню спектру в суміші. Ці інтенсивності забезпечують пряму інформацію про співвідношення розподілу зондів між фазами Lo і Ld (змішані в співвідношенні 1/1):

$$(5) \quad \frac{[Probe]_{Ld}}{[Probe]_{Lo}} = \frac{I_{md}}{I_{m0}} * \frac{I_{570}(Lo)}{I_{602}(Ld)}$$

Рівняння (5) перетворює співвідношення в коефіцієнт розподілення, беручи до уваги відношення інтенсивностей спектрів у чистих Lo та Ld фазах. Таким чином, для NR12S коефіцієнт розподілення Ld/Lo склав  $12 \pm 2$ , а для bNR10S -  $300 \pm 200$ , що свідчить про те, що bNR10S виявляв набагато більшу перевагу до фази Ld.

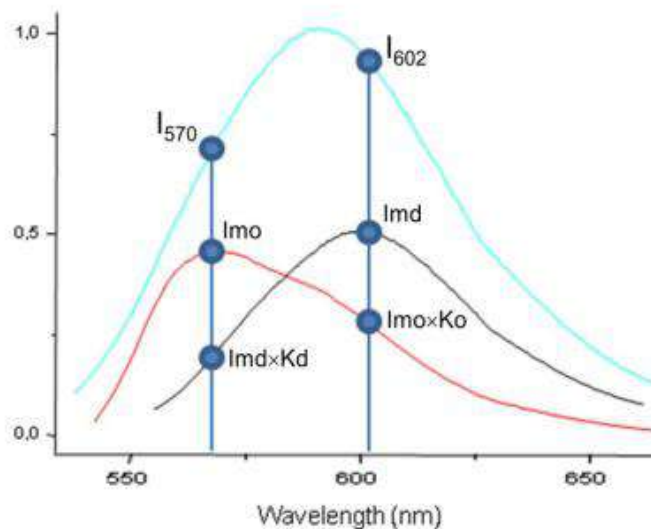


Рис 2.5. Представлення спектру зонда в суміші фаз як перекриття двох окремих спектрів фаз Lo (червоний) та Ld (чорний).

Для експериментів спектроскопії та протокової спектрофлуориметрії, клітини HeLa були висаджені в 24-лункові планшети в кількості  $25 \times 10^4$  клітин на лунку. Після інкубації культуральне середовище було видалене з лунок та клітини були відмиті двічі розчином Рінгера. Для ресуспензування адгезивних



клітин в суспензію використовувався розчин ак'ютази (Sigma-Aldrich) або трипсину (Sigma-Aldrich) впродовж 2-10 хвилин на 37 °С.

Розчин таких клітин HeLa з трипсином або ак'ютазою, клітини Jurkat або еритроцити в культуральному середовищі потім розчинялися в фосфатному буфері або розчині Рінгера, переносилися 1.5 мл пробірки та центрифугувалися за 500 g впродовж 5 хвилин двічі.

Для забарвлення суспензії відмитих клітин із зондами bNR10S, bQ10S або NR12S, відповідна аліквота його стокового розчину в DMSO додавалась в 0.5 мл розчину Рінгера та після швидкого піпетування/вортексування (<1 хвилини) розчин додавався до 0.5 мл суспензії клітин для отримання кінцевої концентрації барвників 0.02 мкМ та гасника 0.1 мкМ (<0.25% DMSO від об'єму) (Darwich, et al., 2012; Rémy Kreder, et al., 2015).

Для переходу до спектроскопічних досліджень, стабільність ратіометричного сигналу та вихід інтенсивності на плато були досліджені за допомогою спектрофлуориметра РТІ QuantaMaster 40 в кварцевій напівмікрокуветі. Додавання NR12S до суспензії клітин HeLa призводило до зростання інтенсивності флуоресценції та співвідношення хвиль 570/602 нм (зелений/червоний) з їх подальшою стабілізацією після 5 хвилин інкубації за кімнатної температури (Рис. 2.6). В свою чергу, інтенсивність та співвідношення хвиль bNR10S стабілізувалися одразу, що свідчить про більш високу швидкість зв'язування. Ця швидкість зв'язування може бути пов'язана селективністю bNR10S до Ld фази. Однак, NR12S в свою чергу, також зв'язується з Lo фазою, що може займати набагато більше часу. Таким чином, ці прості кінетичні експерименти показують, що зонди мають різне мікрооточення в плазматичній мембрані та стабілізуються там впродовж не більше ніж 5-7 хвилин. Цей час є оптимальним для забарвлення клітин за кімнатної температури при підготовці до експерименту (Rémy Kreder, et al., 2015).

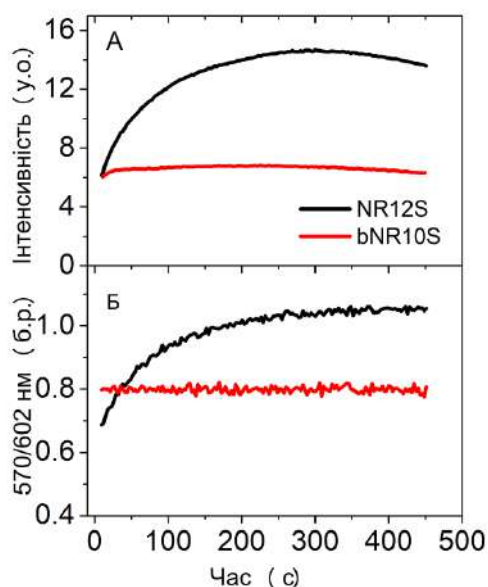


Рис. 2.6. Кінетика зв'язування зондів NR12S та bNR10S із клітинами HeLa досліджена за допомогою інтенсивності флуоресценції (А) та співвідношення зеленого/червоного каналів (Б). інтенсивність флуоресценції є сумою інтенсивностей зеленого (570 nm) та червоного (602 nm) каналів. Довжина хвилі збудження була 520 nm. Співвідношення інтенсивностей зеленого/червоного каналів вимірювалась між хвилями 570 nm та 602 nm (Rémy Kreder, et al., 2015).

Для забарвлення попередньо відмитих клітин із NR12S, bNR10S або bQ10S для експериментів протокової цитометрії або спектрофлуориметрії, відповідна аліквота стокового розчину барвників в DMSO додавалася до 0.5 мл розчину Рінгера та після вортексування отриманий розчин вносився до 0.5 мл суспензій відповідних клітин для отримання кінцевої концентрації барвників 20 нМ, а гасника 200 нМ (<0.25% DMSO) (Darwich, et al., 2012). Перед вимірюванням, суспензія клітин інкубувалася впродовж 7 хвилин за кімнатної температури у темряві.

Для досліджень мікроскопії, відмиті клітини HeLa, Jurkat або еритроцити висаджувалися в дволункові камери Labtek в кількості  $5 \times 10^4$  клітин або 100мкл інкубованої суспензії, відповідно. Свіжоприготовлений розчин bNR10S, bQ10S або NR12S (<1 хвилини) в розчині Рінгера (0.5 мл) додавався до клітин (0.5 мл)

для отримання кінцевої концентрації барвників 0.04 мкМ та гасника 0.2 мкМ (<0.25% DMSO від об'єму) (Darwich, et al., 2012) та інкубувалися впродовж 7 хвилин в темряві за кімнатної температури, у відповідності до кінетики зв'язування (Rémy Kreder, et al., 2015).

LUV були забарвлені із додаванням стокового розчину зондів bNR10S, NR12S в DMSO до 1 мл везикул до кінцевої концентрації 0.4 мкМ (<0.25% DMSO від об'єму). Концентрація гасника bQ10S варіювалася до 1.6 мкМ. Оскільки кінетика зв'язування барвників із ліпосомами була швидкою, то експерименти проводилися через декілька хвилин після додавання барвника. В експериментах використовувався 20 мМ фосфатний буфер з рН 7.4. Концентрація ліпідів була 200 мкМ.

Забарвлення GUV проводилось шляхом додавання стокового розчину зондів bNR10S, NR12S в DMSO до 1 мл везикул до кінцевої концентрації 0.1 мкМ (<0.25% DMSO від об'єму). Концентрація гасника bQ10S була 0.2 мкМ.

Експерименти конфокальної мікроскопії проводилися за допомогою приладу ZEISS LSM 780-FCS із 63x/1.4 об'єктивом з масляною імерсією за 37°C, 5% CO<sub>2</sub> та високій вологості.

Для візуалізації клітин із зондами NR12S та bNR10S, застосовувалось збудження аргоним лазером довжиною хвилі 488 нм. Сигнал емісії був розділений на два канали : “зелений” (550-580 нм) та “червоний” (590-620 нм). Ратіометрична відповідь розраховувалась як співвідношення інтенсивностей по кожному пікселю в двох каналах емісії ("зеленого"/"червоного") за допомогою плагіну до програми ImageJ, “Ratio\_Intensity\_color Version 2.5”.

Спектри флуоресценції записувалися за допомогою спектрофлуориметрів FluoroMax 4.0 (Jobin Yvon, Horiba) та PTI Quanta Master40 із збудженням 520 нм за кімнатної температури. Всі спектри нормалізувалися відповідно суспензії клітин без барвника. Для статистичного аналізу дані були розраховані як співвідношення "зеленого"/"червоного" (560/600 нм) ліній інтенсивності за допомогою програмного забезпечення OriginPro software.

Для експериментів протокової цитометрії з NR12S, забарвлені клітини аналізувалися за рахунок прямого та бічного розсіяння за допомогою протокових цитометрів BD LSR II та Beckman Coulter Epics XL. Для збудження використовувався аргоновий лазер із довжиною хвилі 488 нм. Сигнал флуоресценції реєструвався за допомогою двох фотофільтрів: жовтого (FL2, PE) – “зелений” канал та червоного (FL3, PE-Texas Red) – “червоний” канал. 30,000 було зібрано для отримання достатнього сигналу. Дані аналізувалися за допомогою програмного забезпечення FlowJo та FCS express V3.

#### 2.6.7. Флуоресцентні барвники для зовнішнього моношару мембран F2N12S, F2N12SM, FC12SM

Як було показано раніше, F2N12S може інтеркалювати в Lo та Ld фази та відображати різницю співвідношення двох довжин хвиль, що дозволяє візуалізувати ці фази в гігантських одношарових везикулах (Klymchenko et al., 2009), а також зміни, що відбуваються внаслідок впливу на впорядкування ліпідів в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани клітин внаслідок екстракції холестеролу або апоптозу (Oncul, et al., 2010; Shynkar, et al., 2007).

F2N12SM структурним аналогом F2N12S, де 3-гідрокси група є метильованою (Рис. 2.7) за протоколом описаним раніше (Remy Kreder et al., 2015). Для виготовлення FC12SM (Рис. 2.7), був застосований багатоетапний підхід описаний раніше (Remy Kreder, et al., 2015). Фінальні зразки підлягали тонкошаровій хроматографії, а їх структури були підтверджені на підставі ЯМР мас спектрометрії.

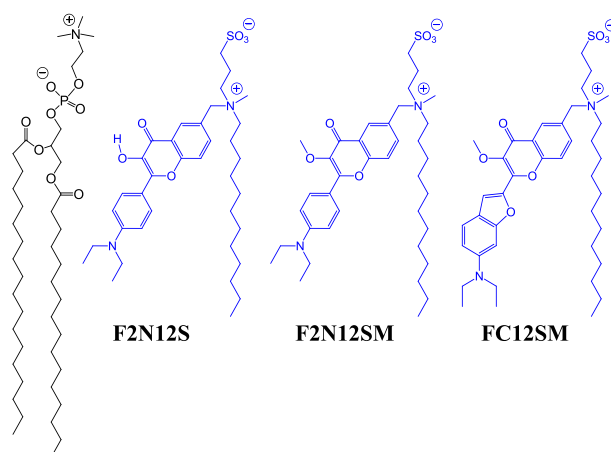


Рис. 2.7. Хімічні структури F2N12S та нових мембранних зондів F2N12SM і FC12SM та їх гіпотетичне розташування по відношенню до ліпіда (чорний) бішару мембрани.

В ліпідних везикулах створених з DOPC F2N12SM та FC12SM проявили максимуми абсорбції близько 400 та 450 нм, відповідно (Рис. 2.8). Таким чином, обидва зонди були сумісні із довжиною хвилі збудження 405 нм, що широко використовується в флуоресцентній мікроскопії. Хоча, для зонду FC12SM більш природною є хвиля збудження 488 нм. За збудження 405 нм зонди флуоресціюють з однією хвилею емісії на 470 та 535 нм (Рис. 2.8), що підтверджує успішний вплив метилювання 3-гідроксі групи на таутомерну форму, що властива для F2N12S (Shynkar, et al., 2007).

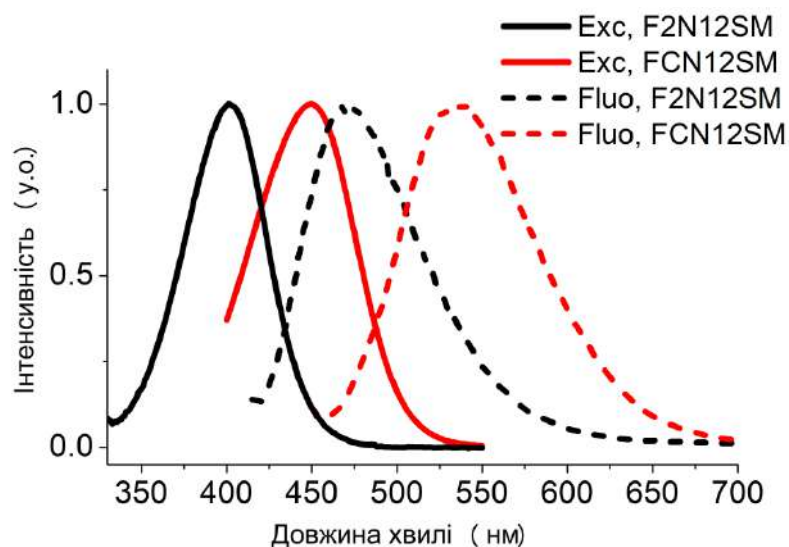


Рис. 2.8. Нормалізовані спектри абсорбції та флуоресценції зондів F2N12SM та FC12SM в ліпідних везикулах DOPC. Концентрація зондів та ліпідів була 0.4 та 200 мкМ, відповідно.

В порівнянні з комерційними синіми барвниками з груп кумаринів (aminomethylcoumarin acetate, AMCA) або піренів (Cascade Blue), ці барвники проявлять значно більші Стоксові зсуви, які є ключем для мінімізації автофлуоресценції в мікроскопії. Ці великі Стоксові зсуви є похідними від оригінальних хромонів, що свідчить про значні релаксаційні процеси барвника в розчині (Jurkiewicz, Sýkora, Olzyńska, Humpolíčková, & Hof, 2005). Оскільки

похідні хромонів проявляють суттєву сольватохромію, їх чутливість до ліпідного оточення була перевірена. Несподівано, нові барвники проявили відносно низьку варіативність максимуму емісії у відповідь на варіацію ліпідного складу мембран відносно рідинно-кристалічної (DOPC), рідинно-невпорядкованої (DOPC/cholesterol) та рідинно-впорядкованої фаз (sphingomyelin/cholesterol) (Рис. 2.9). Така низька чутливість до ліпідного оточення контрастує з F2N12S або інших сольватохромних зондів, що базуються на Nile Red (Oleksandr A. Kucherak, et al., 2010) або Laurdan (Kim et al., 2007; Parasassi, Krasnowska, Bagatolli, & Gratton, 1998). Така властивість є перспективною для застосуванні в звичайній флуоресцентній мікроскопії та FRET, що потребують стабільного положення максимуму емісії.

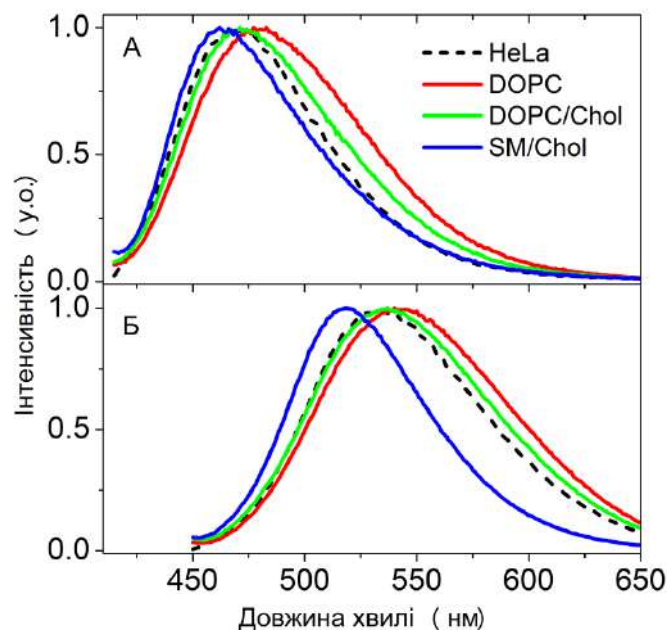


Рис. 2.9. Нормалізовані спектри флуоресценції зондів F2N12SM (А) та FC12SM (В) в ліпідних везикулах різного складу та клітинах HeLa. Концентрація зондів була 0.4 мкМ та 20 нМ в ліпідних везикулах та клітинах HeLa, відповідно.

Надалі фотостабільність нових зондів, зв'язаних із ліпідними мембранами була досліджена у порівнянні з їх попередником F2N12S. Після години опромінення (промінь світла  $\sim 1 \text{ mW/cm}^2$ ), флуоресценція F2N12SM та FC12SM

знижилась лише на 16 та 14%, відповідно, в той час як F2N12S втратив близько 88 % інтенсивності (Рис. 2.10). Покращення фотостабільності, що спостерігалася під час експерименту, є наслідком показаної попереднього на 3-метілхромонах (O. A. Kucharak, Richert, Mély, & Klymchenko, 2012) пригнічення внутрішньо-молекулярного перенесення протону, що генерує менш фотостабільну таутомерну форму.

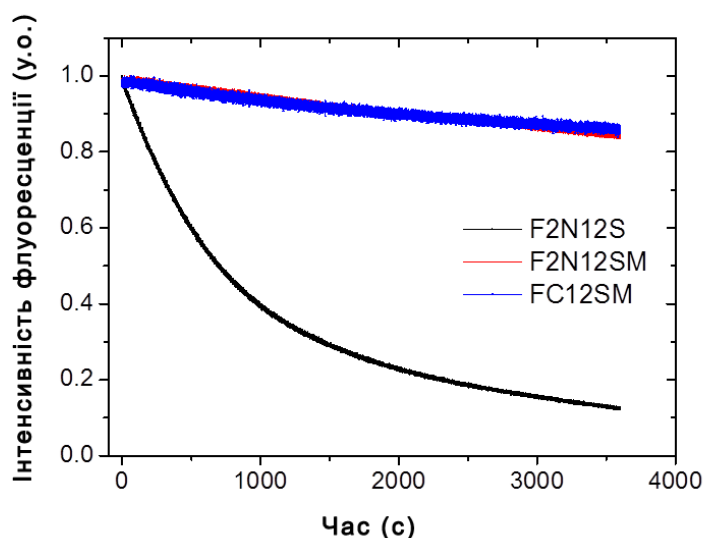


Рис. 2.10. Фотостабільність нових зондів F2N12SM та FC12SM в везикулах DOPC у порівнянні із батьківським F2N12S. Емісія флуоресценції на відповідному максимумі емісії була записана як функція часу опромінення. Довжина хвилі збудження було 410 нм, де коефіцієнт екстинкції для всіх барвників є близьким. Інтенсивність збуджуючого світла була  $\sim 1 \text{ mW/cm}^2$ . Зонди та ліпосоми застосовувалися в концентраціях 0.4 та 200 мкМ, відповідно.

#### 2.6.8. Флуоресцентна FRET-сенсорна система для зовнішнього моношару мембран

Як було описано вище, новий зонд F2N12SM (Remy Kreder, et al., 2015) відрізняється кращою фотостабільністю та лише одним піком флуоресценції в синьо-зеленій області. Із ацильним ланцюгом, подібним до F2N12S та NR12S є перспективним донором для червоних мембранних зондів.

Було описано, що за рахунок гетерогенності в мембранах зонд NR12S розповсюджується нерівномірно між ліпідними фазами із більшою інтенсивністю сигналу в рідинно-невпорядкованих доменах (Rémy Kreder, et al., 2015). Таким чином, було запропоновано, що FRET система, яка базується на перенесенні енергії від F2N12SM на NR12S (Рис. 2.11) буде мати різну ефективність в різних ліпідних доменах плазматичної мембрани, демонструючи вищий сигнал від F2N12SM в більш щільних ділянках, а NR12S – в розріджених.

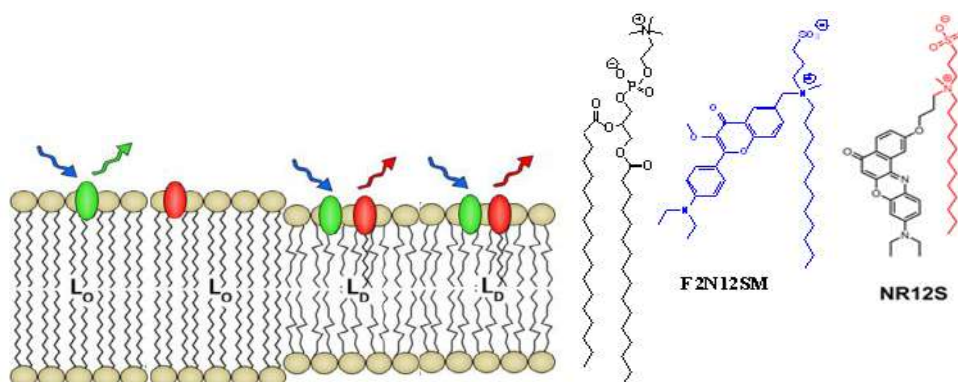


Рис. 2.11. Концепція зондування ліпідних фаз в клітинних мембранах за допомогою FRET системи, яка базується на перенесенні енергії від F2N12SM (донор) на NR12S (акцептор) та їх хімічні структури.

Мембранний зонд bNR10S був розроблений як модифікація NR12S, що спроможний взаємодіяти виключно з невпорядкованими фазами (Rémy Kreder, et al., 2015). Таким чином, було запропоновано, що FRET система, яка базується на перенесенні енергії від F2N12SM на bNR10S (Рис. 2.12) буде мати різну ефективність в різних ліпідних доменах плазматичної мембрани, демонструючи сигнал від F2N12SM виключно в рідинно-впорядкованих, а bNR10S – в рідинно-невпорядкованих. Такий підхід демонструє вищу чутливість до локальних змін в плазматичній мембрані, що були описані для окремих зондів F2N12S та NR12S.



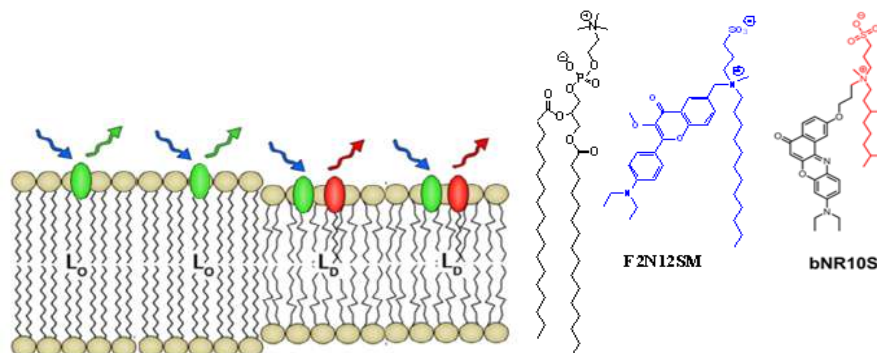


Рис. 2.12. Концепція зондування ліпідних фаз в клітинних мембранах за допомогою FRET системи, яка базується на перенесенні енергії від F2N12SM (донор) на bNR10S (акцептор) та їх хімічні структури.

Для підготовки зразків до мікроскопії клітини HeLa (за 24 години), Jurkat та еритроцити (безпосередньо перед експериментом) висаджувалися до 2-лункових камер Labtek в щільності  $5 \times 10^4$  клітин або  $100 \mu\text{L}$  інкубованої суспензії на лунку, відповідно. Після промивання клітин розчином Рінгера, свіжоприготовлений розчин відповідної FRET-пари в розчині Рінгера додавався до клітин в кінцевій концентрації  $0.04 \text{ mM}$  кожного зонду ( $< 0.25\%$  DMSO від об'єму), відповідно, та інкубувалися впродовж 10 хвилин в темряві за кімнатної температури.

Забарвлення GUV проводилось шляхом додавання стокового розчину кожного зонду компоненту FRET-пари в DMSO до 1 мл везикул до кінцевої концентрації  $0.15 \text{ мкМ}$  ( $< 0.25\%$  DMSO від об'єму). В експериментах використовувався  $20 \text{ mM}$  фосфатний буфер з рН 7.4. Концентрація ліпідів була  $200 \text{ мкМ}$ .

Експерименти конфокальної мікроскопії проводилися за допомогою приладу ZEISS LSM 780-FCS із  $63 \times / 1.4$  об'єктивом з масляною імерсією за  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  та високій вологості. Для візуалізації клітин із FRET системами, застосовувалось збудження діодним лазером довжиною хвилі  $405 \text{ нм}$ . Сигнал емісії був розділений на два канали: “донор” ( $450\text{-}540 \text{ нм}$ ) та “акцептор” ( $580\text{-}650 \text{ нм}$ ). Ратіометрична відповідь розраховувалась як співвідношення

інтенсивностей по кожному пікселю в двох каналах емісії ("акцептор"/"донор") за допомогою плагіну до програми ImageJ, "Ratio\_Intensity\_color Version 2.5".

## 2.7. *Статистичний аналіз*

Дані представлені як середні арифметичні значення  $\pm$  стандартне відхилення або як "коробчасті" діаграми із точками даних. Статистичний аналіз був зроблений парним критерієм Ст'юдента (t-тест), ANOVA або за допомогою корелятивного критерію Пірсона в програмному середовищі MatLab.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Дослідження структурної організації ліпідів на модельних мембранах

Незважаючи на велику кількість методичних підходів до дослідження мембран, не всі вони є однаково зручними та в більшості стосуються лише вузького кола завдань, що найкраще пов'язані із їх властивостями (Klymchenko, 2017; Klymchenko & Kreder, 2014). В модельних дослідженнях ми сфокусували свою увагу на залежності кольору випромінювання зондів від фазового стану мембрани.

##### 3.1.1 Аналіз відповіді ратіометричних зондів, чутливих до полярності/гідратованості мікрооточення

###### *Зонди, специфічні до моношару*

Для оцінки властивостей зондів NR12S та bNR10S були проведені дослідження на великих та малих одношарових везикулах. Було показано, що додавання холестеролу до DOPC спричиняло лише незначні зміни довжини хвилі максимальної емісії обох зондів (603 нм). На відміну від цього, у LUV, які складаються зі сфінгомієліну (з головного мозку рогатої худоби) та холестеролу, утворюючи фазу Lo, bNR10S показав, подібний до NR12S, зсув емісії до синього діапазону майже на 40 нм (рис. 3.1). Ми використовували молярне співвідношення фосфоліпідів/холестерол 1/0.9, щоб забезпечити DOPC та SM відповідними до фазових діаграм властивостями (Ld (Dietrich et al., 2001) та Lo (Sankaram & Thompson, 1990)). Таким чином, обидва зонди можуть відрізнити фази Ld від Lo за емісією, що, згідно з попередніми даними на NR12S (Oleksandr A. Kucherak, et al., 2010), пояснюється зниженням локальної полярності/гідратації, які позначаються на чутливому до оточення червоному флуорофорі Nile Red. Використовуючи цю властивість, ми дослідили спорідненість NR12S та bNR10S до певного фазового стану шляхом реєстрації спектрів флуоресценції цих зондів у LUV, що склалися з фаз Lo та Ld, змішаних у різному співвідношенні. При співвідношенні Lo/Ld 10/1 спектр

bNR10S відповідав одній червоно-зміщеній смузі, яка чітко співпадала зі смугою, що і в везикулах фази Ld (рис. 3.1А). Таким чином, у присутності обох фаз, bNR10S вбудовувався вибірково в Ld-фазу. Навпаки, спектр NR12S був дуже широким, являючи собою суперпозицію спектрів у фазах Lo та Ld (рис. 3.1Г). Поділ NR12S на фази Lo та Ld відповідав попереднім дослідженням (Oleksandr A. Kuchera, et al., 2010). Важливо, що форма спектра обох зондів швидко стабілізувалася і залишалася незмінною принаймні через 15 хвилин після додавання зонда, вказуючи на те, що рівновага їх розподілу між фазами досягається швидко.

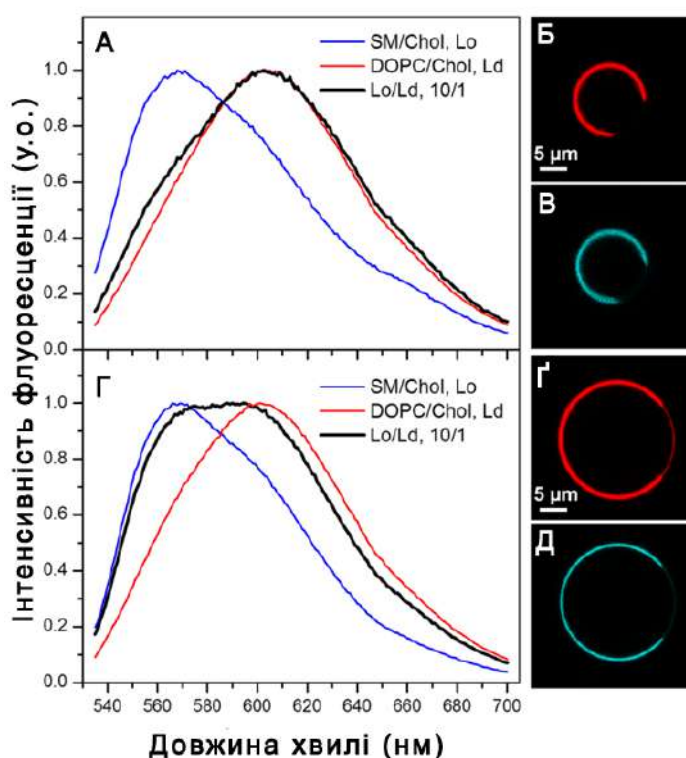


Рис. 3.1 Порівняння властивостей NR12S та bNR10S в модельних мембранах. (А, Г) Спектри флуоресценції bNR10S (А) та NR12S (Г) у суспензії везикул (LUV) на основі DOPC/Chol (1/0.9), SM/Chol (1/0.9), що представляють фази Ld та Lo, відповідно, і суміші цих везикул, які відповідають співвідношенню Lo/Ld фаз 10/1. (Б, Г) Зображення конфокальної мікроскопії червоного каналу (збудження 561нм) гігантських одношарових везикул (GUV), одержаної з суміші DOPC, Chol та SM (1/1/0.7), забарвлені bNR10S (Б) та NR12S (Г). (В, Д) Блакитний канал (збудження 488нм) зображення тих самих GUV, що

відповідають флуоресценції маркеру Ld-фази NBD-DOPE. Концентрація зондів становила 0,4 мкМ у LUV (200 мкМ ліпідів) та 0,1 мкМ у GUV.

Ці спостереження були підтвержені також зображеннями гігантських одношарових везикул (GUV), що складаються як з фаз Ld, так і з Lo. Яскрава флуоресценція bNR10S спостерігалася виключно з однієї частини мембрани, яка також була додатково забарвлена маркером фази Ld, NBD-DOPE (рис. 3.1Б, В) (Baumgart, Hunt, Farkas, Webb, & Feigenson, 2007), що вказує на чітку спорідненість цього зонду до фази Ld. На відміну від цього, NR12S забарвлював обидві фази, хоча перевагу віддавав Ld фазі (рис. 3.1 Г), колокалізуючись з NBD-DOPE (рис. 3.1Д). Ці дані відповідають прогнозованому співвідношенню Ld / Lo для зондів. Очікувано, що громіздка алкільна ланка ефективно витісняє bNR10S з Lo у бік фази Ld.

Крім того, у модельних експериментах (рис 3.2) при дослідженні впливу стеролів на властивості мембран, DOPC та SM везикули, насичені 7KChol або 7KChol+Chol, забезпечували подібний "червоний зсув" відповіді NR12S, на відміну від везикул SM:Chol з максимальною флуоресценцією в області більш коротких довжини хвиль.

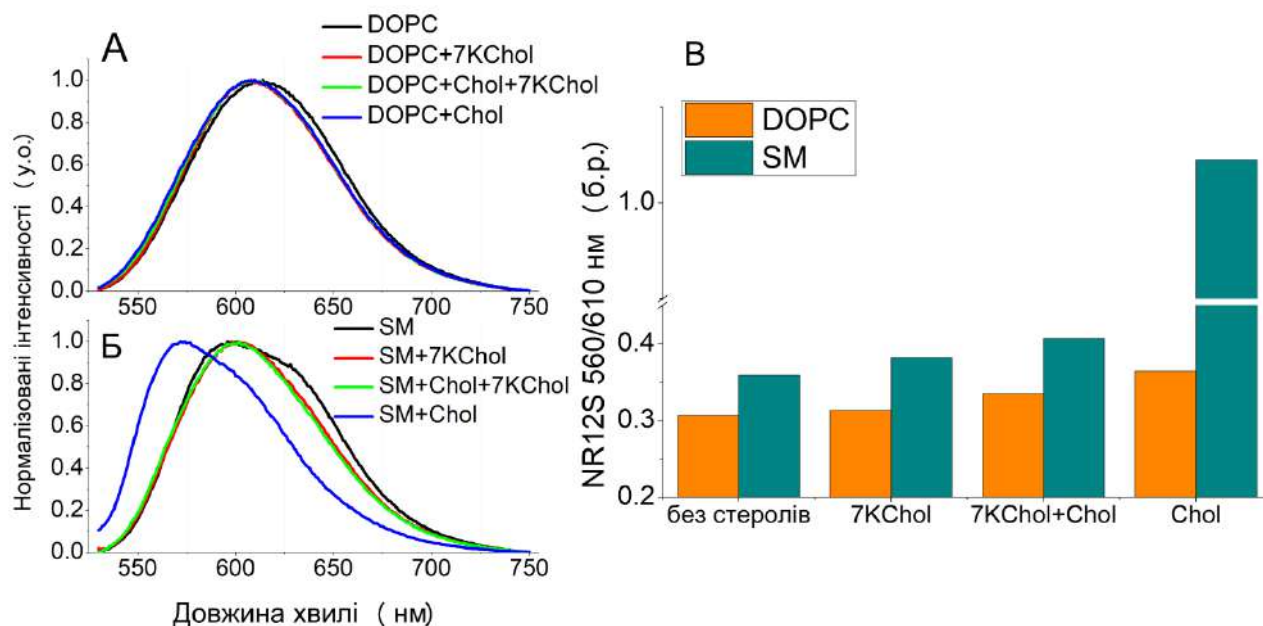


Рис 3.2. Спектри флуоресценції NR12S у малих одношарових везикулах (SUV) з різним вмістом стеролів. (А) Спектри флуоресценції DOPC без або з 7-KChol,

Chol або 7KChol+Chol. (Б) Спектри флуоресценції SM без або з 7-KChol, Chol або 7KChol+Chol. (В) Ратіометричний аналіз зонду NR12S (відношення інтенсивностей 560/600 нм) у відповідь на зміни у складі SUV. Дані представлені як арифметичні значення співвідношень  $\pm$  стандартне відхилення. Співвідношення DOPC:Steryl і SM:Steryl становило 2: 1. Загальна концентрація ліпідів становила 200мкМ. Концентрація NR12S становила 100 нМ.

Використовуючи такий самий набір великих везикул, ми вивчили новий гасій bQ10S у поєднанні з зондом NR12S. Для суміші Lo та Ld у співвідношенні 10/1, додавання гасія перетворювало широкий спектр на ідентичний тому, який спостерігався в чистій фазі Lo (Рис 3.4 А). Для характеристики ефекту гасія ми виміряли співвідношення зеленого/червоного каналів інтенсивностей флуоресценції зондів, використовуючи інтеграли під їхніми спектрами до і після 585 нм (рис 3.4Б). Додавання bQ10S до Lo-подібної фази LUV незначно вплинуло на співвідношення зеленого/червоного каналів інтенсивностей NR12S, тоді як у випадку змішаних фаз цей коефіцієнт збільшувався набагато сильніше з концентрацією гасія, досягаючи значень, близьких до значень фази Lo. Таким чином, bQ10S працює як високоспеціалізований гасій зондів у фазі Ld. Далі, специфічність гасіння bQ10S була безпосередньо візуалізована за рахунок конфокальної мікроскопії на гігантських одношарових везикулах (GUV). NR12S-зabarвлені GUV, що представляють як фази Lo, так і Ld, показали два домени, які можна чітко відрізнити за співвідношенням зеленого/червоного каналів інтенсивностей. Відповідно до попередніх робіт із зондом NR12S (Oleksandr A. Kucharak, et al., 2010), регіони високого співвідношення (зеленого кольору) можуть бути віднесені до фази Lo, а ті, що мають низькі значення (фіолетові) – до фази Ld. Після додавання гасія bQ10S зони низького співвідношення (фіолетові) зникли, а високі співвідношення (зелено-жовтий) залишалися так, що флуоресценція з Lo-подібної фази була збережена (рис 3.4В, Г). Таким чином, завдяки специфічності гасія bQ12S до фази Ld, вибіркоче зондування фази Lo може бути досягнуто.

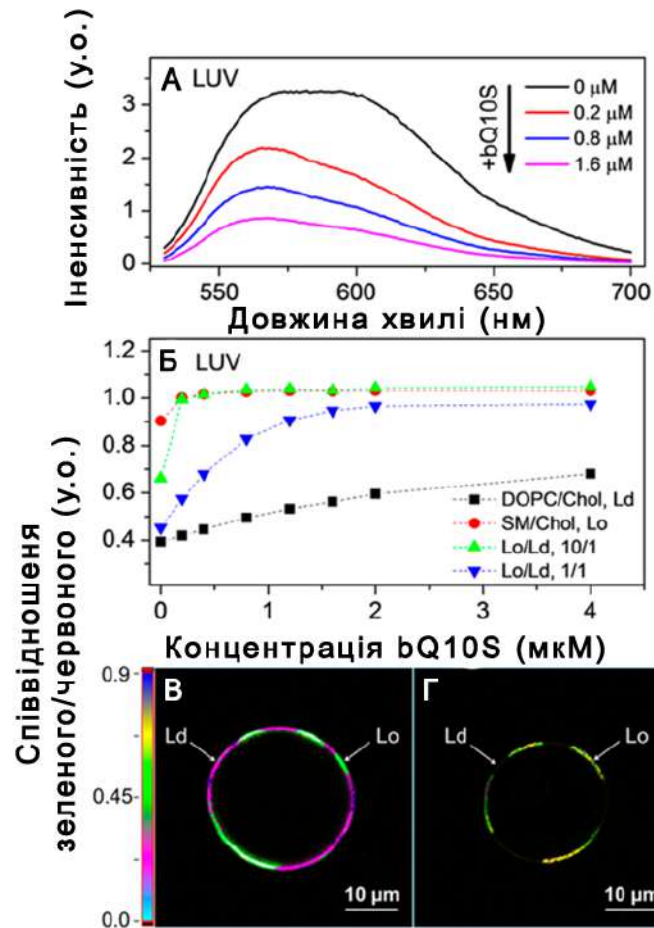


Рис 3.4. Застосування гасія флуоресценції bQ10S з мембранним зондом NR12S в LUV. (А) Спектри флуоресценції NR12S (0,4 мкМ) у суміші 10/1 Lo LUV та Ld LUV (200 мкМ ліпідів) з підвищенням концентрації гасія bQ10S. Lo і Ld LUV склалися з SM/Chol (1/0.9) та DOPC/Chol (1/0.9), відповідно. (Б) Співвідношення інтенсивностей зеленого / червоного каналів флуоресценції зонда NR12S в Lo та Ld LUV та їх сумішах (1/1 та 10/1) в залежності від концентрації bQ10S. (В, Г) Ратіометричні зображення GUV, забарвлених NR12S (0,1 мкМ) без (В) та (Г) bQ10S (0,2 мкМ) за допомогою мікроскопії двофотонного збудження. GUV створені з суміші DOPC, SM та Chol (1/1 / 0.7). Фіолетові частини відповідають фазі Ld, а зеленожовта частина відповідає фазі Lo.

Отже, порівняння даних спектрофлуориметрії та мікроскопії з моделюванням молекулярної динаміки (Pyrshch, Yesylevskyy, Mély, Demchenko, & Klumchenko, 2017) призводить до трьох можливих пояснень ефектів, що

спостерігалися: 1) холестерол підвищує упорядкування ліпідів у плазматичній мембрані; 2) підвищення концентрації холестеролу збільшує кількість взаємодій з NR12S; 3) окислена форма холестеролу; 7- кетохолестерол, зменшує упорядкування мембран, одночасно збільшуючи гідратацію/полярність.

### *Зонди, не специфічні до моношару*

Нещодавно був розроблений новий сольватохромний зонд на основі пірену, PA (Niko, et al., 2016). У порівнянні із іншими він показує найбільш привабливі властивості, такі як висока яскравість (коефіцієнт поглинання в етанолі  $25000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  і квантові вихідні флуоресценції,  $QY=0,93$  і  $0,77$  в гексані та етанолі відповідно), смуга абсорбції в видимій області ( $\sim 420 \text{ nm}$ ) і сильна сольватохромність (червоний зсув від  $480 \text{ nm}$  до  $598 \text{ nm}$  в залежності від розчинника чи ліпідної фази) (Niko, et al., 2016). Ці фотофізичні властивості PA в органічних розчинниках перевершують властивості широко відомих похідних Laurdan та Prodan (Niko, et al., 2016). Крім того, його гідрофобна природа робить його проникним до клітин, що дозволяє зондування як плазматичної, так і внутрішньоклітинних мембран.

Щоб поглибити наше розуміння функціонування зонду PA та визначити його чутливість до холестеролу в малих одношарових везикулах, були виміряні спектри флуоресценції зонду в DOPC та SM з різною концентрацією холестеролу (рис. 3.5). Було показано, що для обох ліпідів характерним є вплив холестеролу, зміщуючи максимум спектру флуоресценції в синю область. Таким чином, зонд PA чутливий не тільки до ліпідних фаз (Lo та Ld), а також до концентрації холестеролу в них.



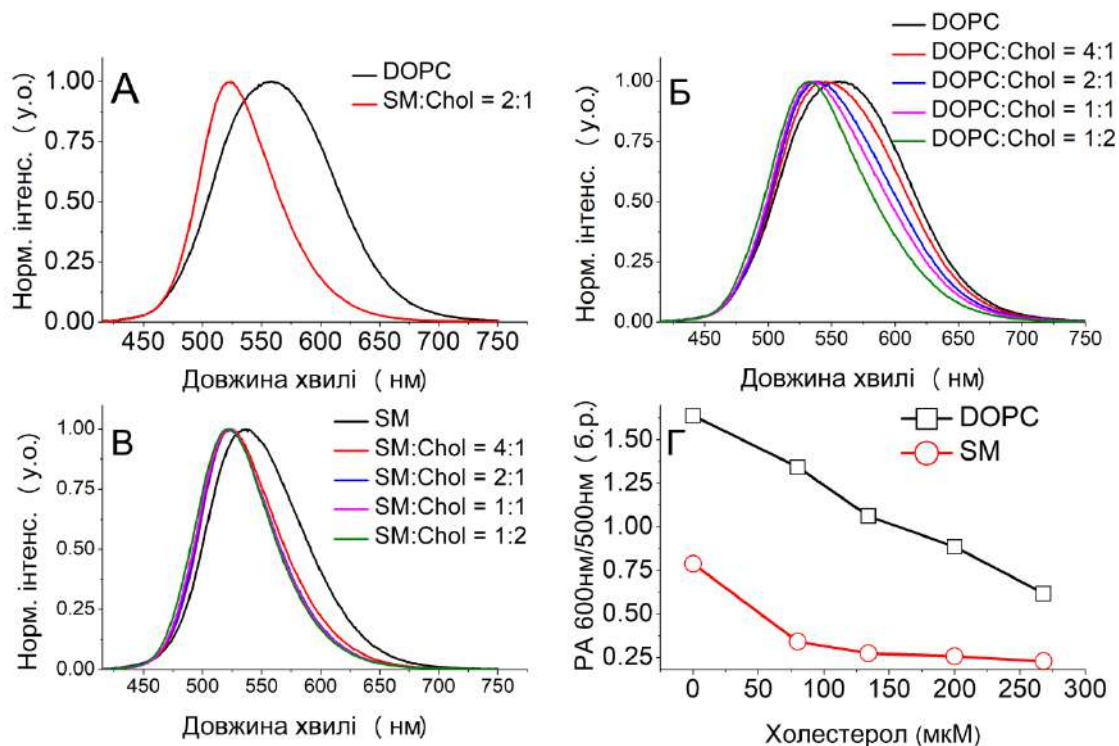


Рис 3.5. Спектри флуоресценції малих одношарових везикул, забарвлених зондом РА. (А) Везикули, що представляють чисту рідинно-впорядковану (SM:Chol = 2:1) та рідинно-невпорядковану фазу (DOPC). (Б) Вплив різної концентрації холестеролу в DOPC на відповідь РА. (В) Вплив різної концентрації холестеролу в SM на відповідь РА. (Г) Розраховані співвідношення інтенсивностей 600nm/500nm як для SM, так і для DOPC з різною концентрацією холестеролу. Загальна концентрація ліпідів у кожному зразку становила 400 мкМ. Концентрація зонду становила 500 нМ.

### 3.1.2. Застосування FRET-системи для вивчення структурно-механічних властивостей ліпідного мікрооточення

Новий синтезований зонд F2N12SM (Remy Kreder, et al., 2015) характеризується кращою фотостабільністю та єдиним піком флуоресценції в синьо-зеленій області у порівнянні із F2N12S (Shynkar, et al., 2007). З аналогічним ацильним ланцюгом він представлений як перспективний донор флуоресценції для мембранних зондів із збудженням в синьо-зеленій області та з червоною емісією.

Раніше було показано, що NR12S розподіляється неоднорідно у зовнішній плазматичній мембрані, що демонструє більш високу інтенсивність

флуоресценції в доменах фази Ld (Oleksandr A. Kucherak, et al., 2010). Отже, було висунуто гіпотезу, що FRET система на базі F2N12SM та NR12S буде мати різну ефективність у різних ліпідних доменах модельних чи клітинних мембран, що представляють вищий сигнал F2N12SM у регіонах з більш щільним пакуванням ліпідів та NR12S в меш щільних ділянках. Слід зазначити, що наразі немає конкурентних аналогів зондів в'язкості, які могли б визначити локальні зміни зовнішнього моношару модельних чи клітинних мембран, які можна застосовувати в конфокальній мікроскопії при низьких концентраціях зонду та відносно високій роздільній здатності.

Зонд bNR10S був розроблений як модифікація NR12S, де ацильний ланцюг був модифікований для інтеркалювання тільки в Ld фазу. Таким чином, було висунуто гіпотезу, що система FRET на основі F2N12SM та bNR10S буде мати різну ефективність у різних ліпідних фазах, подібно до іншої описаної вище системи. Варто зауважити, що FRET сенсорна система матиме більшу специфічність за рахунок особливостей структури молекули акцептора.

Оскільки нові зонди взаємодіють саме з мембранами та аналогічно до вже описаних систем, вони мають локалізуватися лише на зовнішньому моношарі мембрани, а сигнали FRET повинні безпосередньо корелювати з фазовими властивостями модельних мембран та відповідати в першу чергу на їх структурно-механічну компоненту. Ми перевірили цю гіпотезу на ліпідних везикулах з різноманітним ліпідним складом, але з різними парами донорів та акцепторів: F2N12SM-NR12S і F2N12SM-bNR10S (Рис 3.6).

Дані мікроскопії демонструють чітку відмінність між сигналами в ліпосомах різного складу та дозволяють спостерігати окремі фази в мозаїчній системі DOPC/SM/Chol.

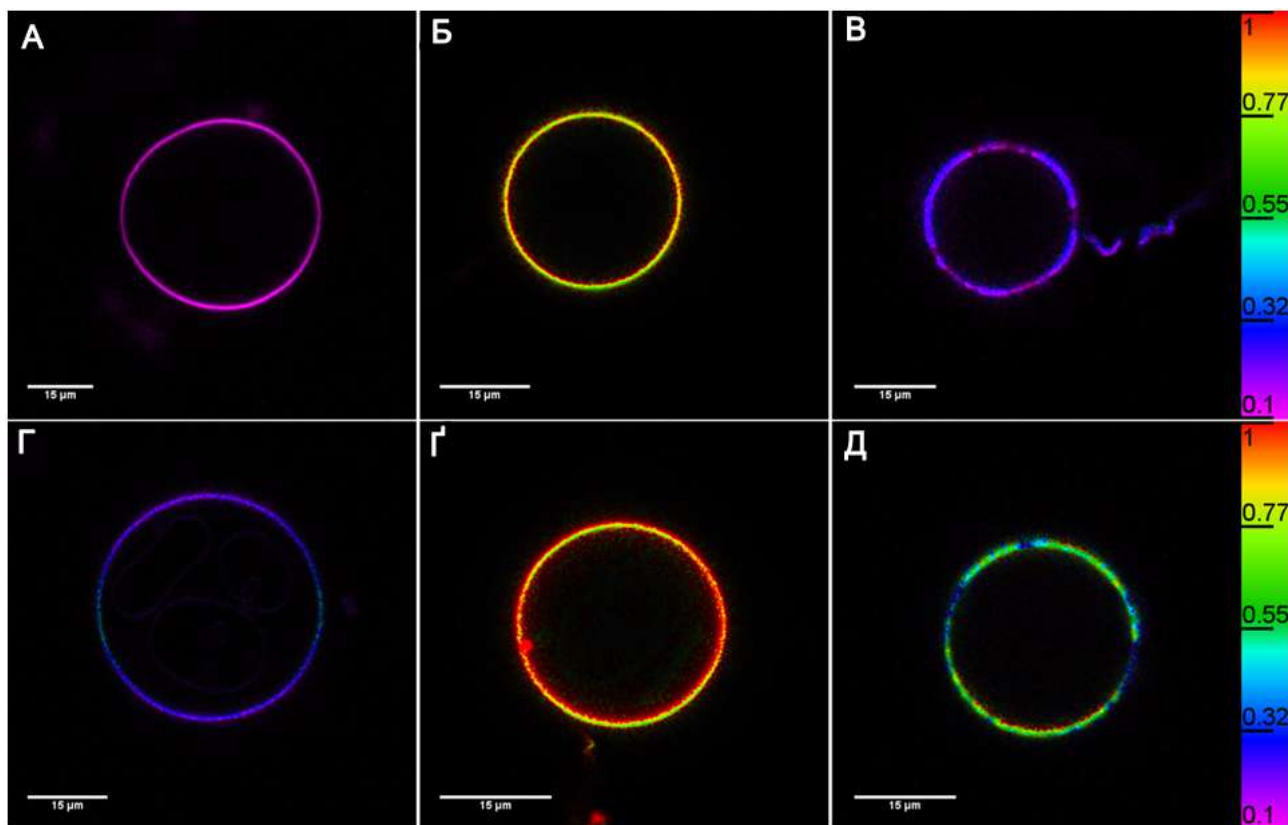


Рис 3.6. Ратіометричні зображення гігантських одношарових везикул, що склалися з SM/Chol (А, Г), DOPC (Б, Г), DOPC/SM/Chol (В, Д) та забарвлені із FRET-системами на основі F2N12SM-bNR10S (А-В) та F2N12SM-NR12S (Г-Д). Концентрація F2N12SM, NR12S і bNR10S становила 150 нМ. Псевдоколір кодує співвідношення акцептор/донор. Шкала розміру складає 15мкм.

Кількісний аналіз розрахований із гістограм співвідношення інтенсивностей сигналів відповідних акцептора/донора. Були розраховані середні геометричні значення цих співвідношень (Рис 3.7). В цілому, отримані дані добре узгоджуються із запропонованою гіпотезою та співпадають із представленими вище результатами мікроскопії. Таким чином, описані FRET-системи для вивчення змін механічних властивостей ліпідних фаз є перспективними для подальшого застосування в клітинних дослідженнях.

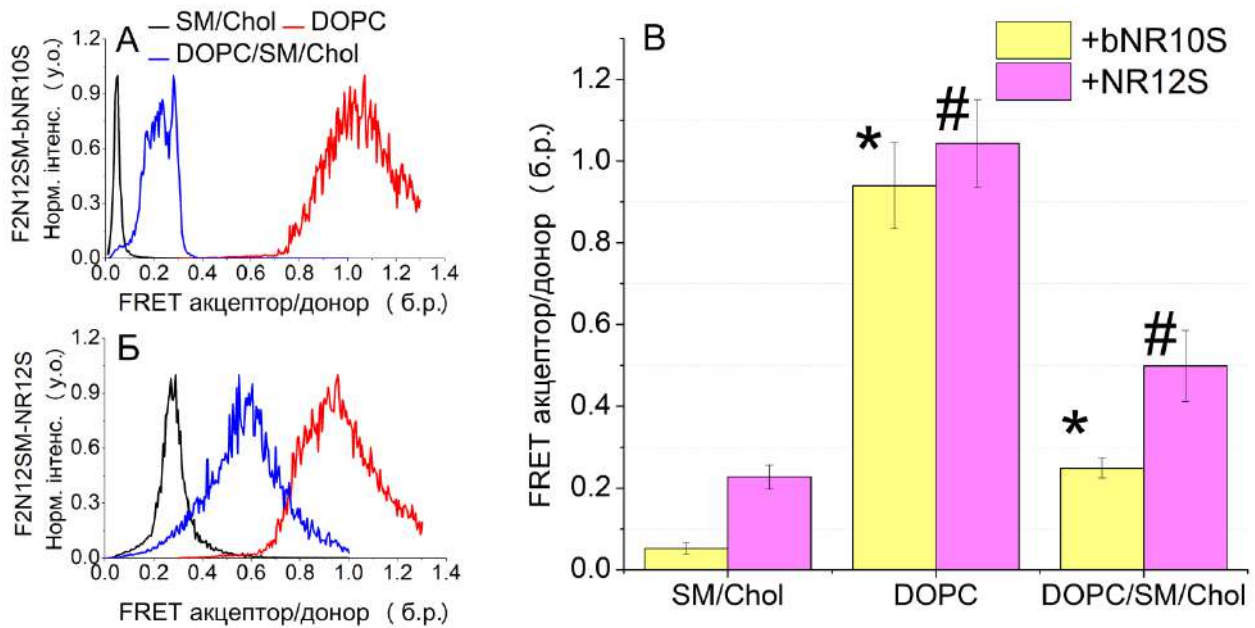


Рис 3.7. Гістограми співвідношення сигналів акцептора/донора FRET сенсорних систем bNR10S/F2N12SM (A) та NR12S/F2N12SM (Б). (B) Кількісний аналіз співвідношення інтенсивностей флуоресценції акцептора/донора FRET сенсорних систем в клітинних мембранах на основі даних мікроскопії  $n_{\text{везикул/група}} > 4$ ).

\*  $p < 0.05$  по відношенню до везикул SM/Chol забарвлених bNR10S/F2N12SM (ANOVA)

#  $p < 0.05$  по відношенню до везикул SM/Chol забарвлених NR12S/F2N12SM (ANOVA)

Щоб довести реакцію такої системи саме на механічні зміни в мембрані, спектри FRET-системи на основі F2N12SM-NR12S в везикулах DOPC були виміряні за різних температур. Оскільки фазовий перехід для DOPC відбувається при  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ , в діапазоні від  $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$  реєструватимуться в першу чергу зміни механічної напруги на мембрані. Як можна бачити з Рис. 3.8, спостерігається лінійна залежність збільшення ефективності перенесення енергії флуоресценції від збільшення температури розчину ліпиду.

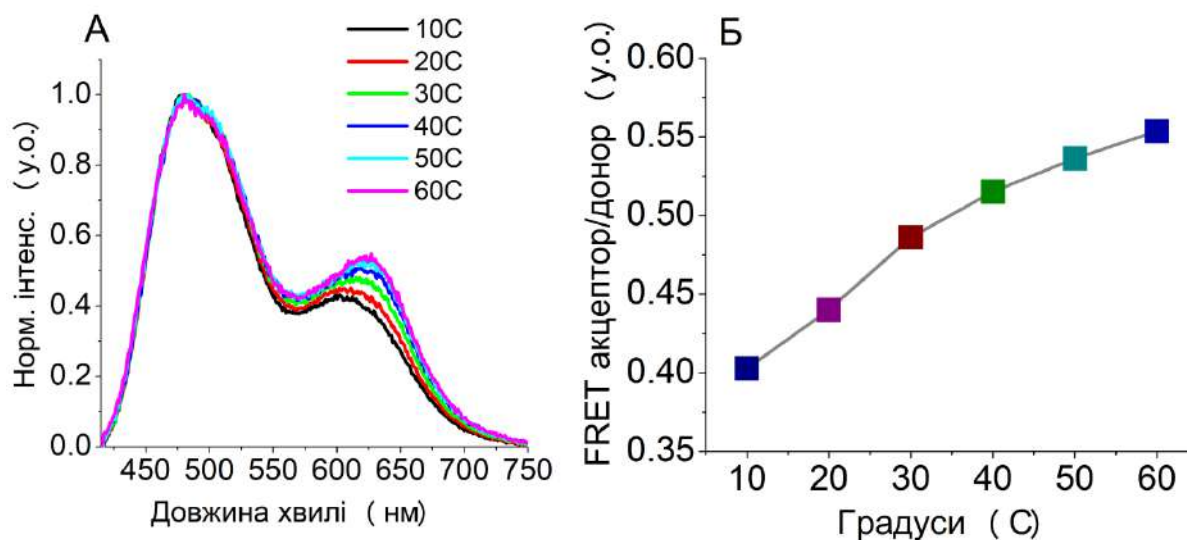


Рис. 3.8. Флуоресцентна відповідь FRET-системи на основі F2N12SM-NR12S в везикулах DOPC на зміну температури. (А) Спектри флуоресценції при збудженні 405 нм. (Б) Розраховане співвідношення сигналів акцептора до донора.

### 3.2. Дослідження структурної організації ліпідів на моделях клітин

#### 3.2.1. Вивчення кореляції між активністю каспази-3 та зміною властивостей плазматичної мембрани за апоптозу

Для підтвердження реакції зонду на зміни ліпідної організації плазматичної мембрани застосували реагенти для модифікації мембран. Екстракція холестеролу метил- $\beta$ -циклодекстрином залишається класичним підходом (Zidovetzki & Levitan, 2007) і використовувалася для безпосереднього індукування зміни ліпідного порядку мембрани. Вплив на рідинно-впорядковану фазу (Lo) плазматичної мембрани був досягнутий інкубацією клітин HeLa з 5 мМ метил- $\beta$ -циклодекстрином (M $\beta$ CD) протягом 2 годин, що, за даними літератури, екстрагує від 60 до 100% холестеролу з плазматичної мембрани лінії CHO, ендотеліальних клітин та фібробластів (Oleksandr A. Kucherak, et al., 2010; Levitan, et al., 2000; Romanenko, et al., 2004; Zidovetzki & Levitan, 2007). Слід зазначити, що виснажені на холестерол мембрани клітин можуть мати гелеподібні фази, які відокремлюються від рідинно-непорядкованої фази іншої частини мембрани. Про це раніше повідомлялося в

декількох незалежних дослідженнях (Hao, Mukherjee, & Maxfield, 2001; Nishimura, Vrljic, Klein, McConnell, & Moerner, 2006).

Висока спорідненість M $\beta$ CD до холестеролу (Chol) також може бути використана для створення комплексів включення холестеролу, які би переносили холестерол до мембрани та підвищували рівень його вмісту (Zidovetzki & Levitan, 2007). Як правило, Chol:M $\beta$ CD використовують при насиченні 1:20 і в концентраціях, подібних до "порожнього" M $\beta$ CD. Рівень збагачення Chol коливається від 30% до 300% в залежності від типу клітини (Zidovetzki & Levitan, 2007). Таким чином, клітини HeLa інкубували з Chol:M $\beta$ CD (1:20, 5мМ M $\beta$ CD) протягом 3 годин, щоб отримати необхідний рівень збагачення Chol.

7-кетохолестерол (7KChol) відомий як деполяризуючий агент для мембран, що знижує ліпідний порядок (Rentero, et al., 2008). Кетонна група вуглецю 7, що містить 7KChol, запобігає тісній упаковці насичених ацильних ланцюгів, необхідних для утворення фази L $\alpha$ , як це спостерігається в модельних мембранах (Telesford, et al., 2015). Пряме введення 7KChol в мембрану може змінити ліпідний порядок шляхом дестабілізації рафтової фази (Schieffer, et al., 2014). Оскільки нормальна і 7-кето-форма холестеролу мають близьку молекулярну вагу, 7KChol:M $\beta$ CD застосовувався за тих самих концентрацій, що й Chol:M $\beta$ CD.

Сфінгомієліназа (SMаза) гідролізує сфінгомієлін, який бере участь в утворенні ліпідних рафтів. Таким чином, цей ензим, як вважають, стимулює сильну реорганізацію мембран (Silva, et al., 2009). Інкубація із SMазою застосовувалась для часткової імітації реорганізації плазматичної мембрани за апоптозу (Brenner, et al., 1998).

Апоптоз був індукований двома різними агентами, а саме: IPA-3 (1,1'-дисульфандеїлдінафталін-2-ол) і камптотецином, які діють через різні механізми. IPA-3 є алостеричним інгібітором Pak1 (p21-активованої кінази) III (Christy C Ong, et al., 2011), тоді як камптотецин інгібує ДНК топоізомеразу I (Hsiang, et al., 1985).

Після інкубації з цими агентами клітинні мембрани забарвлювали NR12S, а спектри емісії реєстрували. Екстракція холестеролу призвела до червоного зсуву флуоресценції NR12S (Рис 3.9А). Подібна реакція з червоним зміщенням спостерігалася після інкубації із SМазою та збагачення на 7КChol. Ці червоні зсуви свідчать про збільшення гідратації мембран в результаті зниження впорядкування ліпідів у плазматичних мембранах клітин. Однак, у випадку інкубації із МβCD реакція NR12S ґрунтується на виключенні молекули зонду з гелеподібної фази, що дозволяє виявити практично чисту рідинно-невпорядковану фазу без холестеролу в плазматичній мембрані клітин. Збагачення холестеролом призводить до незначного зсуву емісії в короткохвильову область порівняно з інтактними клітинами.

Інкубація клітин з апоптоз-індукуючими агентами, такими як IPA-3 та камптотетин, позначається на червоному зсуві максимуму емісії NR12S (рис.3.9 Б, В). Відповідно до попередніх робіт (Kilin et al., 2015; Rémy Kreder, et al., 2015; Oleksandr A. Kucherak, et al., 2010; Oncul, et al., 2010), індукція апоптозу, незалежно від його механізму активації, призводить до зменшення ліпідного порядку (частка фази L<sub>o</sub>) в плазматичних мембранах клітини.

На наступному етапі апоптоз клітин HeLa інгібувався за допомогою пептидної похідної Z-DEVD-FMK. Пептидна послідовність DEVD (Aspartatic acid-Glutamic acid-Valine-Aspartatic acid) є специфічним місцем розпізнавання каспази-3, виявленої в полі (АДФ-рибоза) полімерази (PARP). Синтетичний пептидний інгібітор на основі цієї послідовності незворотно інгібує каспазу-3 і блокує апоптоз (Rickers, et al., 1998; Thornberry & Lazebnik, 1998). Інгібітор додавали за 30 хв до індуктора апоптозу в концентрації 100 мкМ, відповідно до описаного раніше (Pastorino, et al., 1998; Rickers, et al., 1998). Важливо відзначити, що у випадку, коли клітини HeLa, попередньо оброблені Z-DEVD-FMK, разом з IPA-3 або камптотетином не спостерігалось червоного зсуву максимуму емісії NR12S (Рис 3.9 Б, В).

Для кількісного контролю спектральних змін флуоресценції зонду були проведені розрахунки співвідношення зелених до червоних частин спектру, для



чого використовували значення інтенсивностей флуоресценції при 560 нм та 600 нм (Рис 3.9 Г). Цей аналіз підтвердив, що найсильніший ефект був викликаний збагаченням 7KChol, а ефекти SMази, M $\beta$ CD, IPA-3 і камптотецину були значними, але менш вираженими. Кількісний аналіз спектрів показав, що реакція зонду аналогічна для інтактних клітин та тих, що інкубувалися із інгібітором апоптозу (Рис 3.9 Г). Це означає, що реакція NR12S чутлива до концентрації холестеролу в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани та її окисленої форми (7-кетохолестерол), що впливає на упаковку фосфоліпідів і сфінголіпідів. Крім того, ми показали, що реорганізація зовнішнього моношару плазматичної мембрани за апоптозу очевидно пов'язана з активністю каспаз-3.

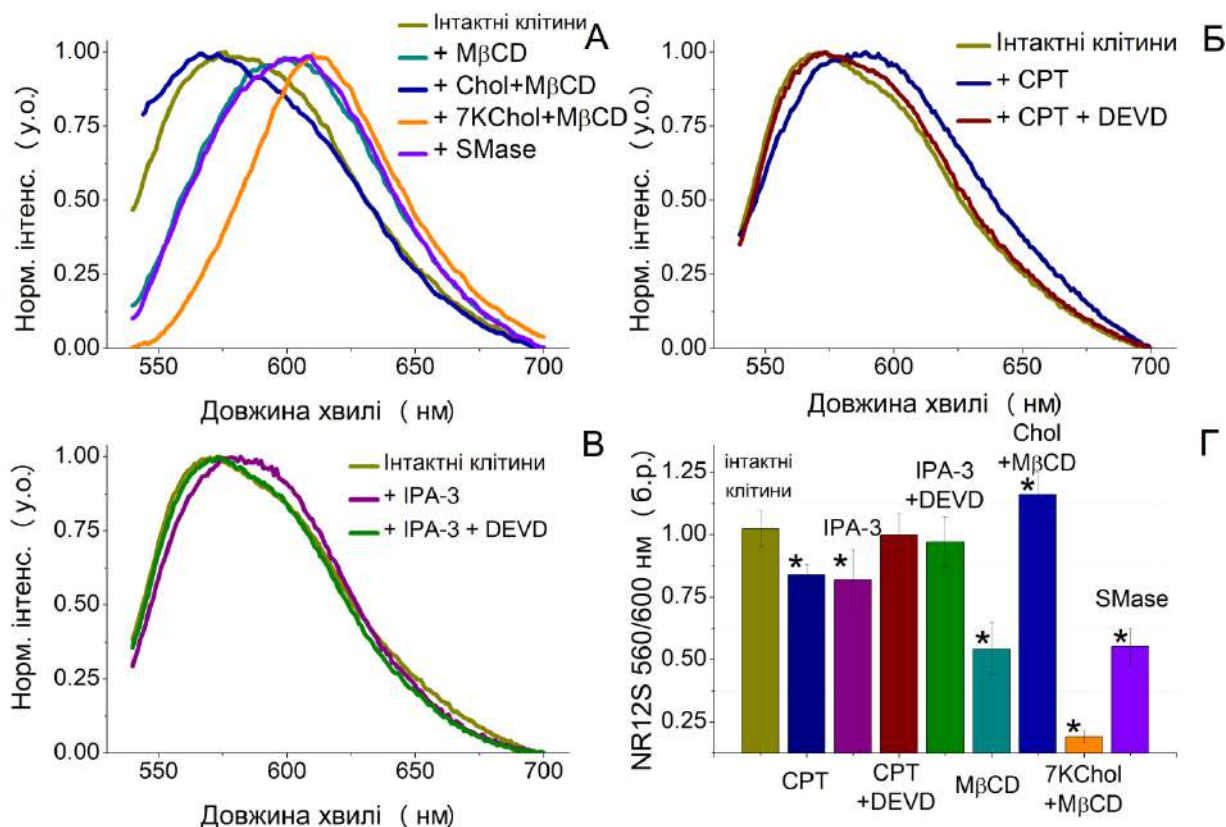


Рис 3.9. Нормалізовані спектри флуоресценції клітин HeLa, забарвлених 10 нМ NR12S. (А) клітини, оброблені метил- $\beta$ -циклодекстрином (M $\beta$ CD, 5 мМ, 2 години), холестеролом: M $\beta$ CD (Chol: M $\beta$ CD, 1:20, 5 мМ M $\beta$ CD, 3 год.), 7-кетохолестеролом: M $\beta$ CD (7KChol: M $\beta$ CD, 1:20, 5 мМ M $\beta$ CD, 3 год.), сфінгомеліназою (SMаза, 0.2 мОд, 2 год.). (Б) клітини, оброблені



камптотецином (СРТ, 5 мкг / мл, 18 год) і СРТ, що індукували разом із Z-DEVD-FMK (СРТ + DEVD, 100 мкМ, 30 хв до СРТ). (В) клітини, які обробляли IPA-3 (25 мкМ, 40 год) та IPA-3 разом із Z-DEVD-FMK (IPA-3 + DEVD, 100 мкМ, 30 хв. До IPA-3). (Г) Ратіометричний аналіз зонду NR12S (відношення інтенсивностей 560/600 нм) за модифікацій складу плазматичної мембрани, індукції апоптозу або його інгібування. Дані представлені як арифметичні середні значення співвідношень  $\pm$  стандартне відхилення ( $n = 4$ ). Концентрація NR12S становила 10 нМ.

\* свідчить про значну відмінність від значень контрольної групи клітин HeLa (ANOVA;  $P < 0.05$ );

Вимірювання активності каспаз-3 застосовується для виявлення та спостереження апоптозу в живих, лізованих та фіксованих клітинах (Köhler, Orrenius, & Zhivotovsky, 2002). Після досягнення «точки без повернення», каспаза-3 розщеплює велику кількість субстратів з послідовністю DEVD, що призводить до активації різних процесів, включаючи ліпідний скрамблінг та блеблінг (Nusbaum et al., 2005). Таким чином, активація каспази-3 є однією з центральних подій за апоптозу (Danial & Korsmeyer, 2004; D. Green & Kroemer, 1998).

Дія скрамблази та Xkr-8 активно регулюється каспазою-3. Таким чином, експозиція PS на зовнішній моношар плазматичної мембрани клітини також є універсальним процесом, що відбувається під час раннього апоптозу незалежно від типу клітин або індукційної системи апоптозу (Van Engeland, et al., 1998). Крім того, за апоптозу ліпідні транслокази стають інгібованими (Bratton, et al., 1997; Verhoven, Krahling, Schlegel, & Williamson, 1999). Це призводить до відновлення рівноваги між моношарами, що може також відбуватися пасивно, без участі скрамблази або Xkr-8, що призводить до втрати асиметрії плазматичної мембрани (Daleke, 2003; Nguyen et al., 2011; Volinsky et al., 2011). Протокова цитометрія є стандартним методом для ідентифікації та ізоляції нормальних та апоптотичних субпопуляцій клітин (Ormerod & Hamelik, 2011).

Для поглибленого розуміння процесу апоптозу, клітини HeLa обробляли камптотецином протягом 0, 3, 6, 12, 18 та 24 годин, і аналізували кореляцію збільшення активності каспази-3 та PS-експозиції до співвідношення L<sub>o</sub> (рідино-впорядкована) до L<sub>d</sub> (рідино-невпорядкована) фази. Відповідь NR12S порівнювали з флуоресцентно-міченим Анексином 5 та флуоресцентно-міченим DEVD-FMK за допомогою протокової цитометрії.

Дані протокової цитометрії клітин, забарвлених NR12S, показані як одномірні гістограми, яка відображає співвідношення інтенсивностей зеленого каналу до червоного (Рис 3.10 А). Одна субпопуляція з більш високим співвідношенням зеленого/червоного каналів спостерігалася з інтактними клітинами, забарвленими із NR12S. Друга субпопуляція, що демонструвала нижче співвідношення зеленого/червоного каналів, з'являлася по мірі інкубації з камптотецином. Оскільки FITC-DEVD-FMK та GFP-мічений Анексин 5 забарвлюють лише апоптотичні клітини, живі клітини з'являються в якості однієї субпопуляції з низькою інтенсивністю флуоресценції. Клітини, оброблені апоптоз-індукуючим агентом, демонстрували другу субпопуляцію з високим сигналом флуоресценції (Рис 3.10 Б, В). Після кількісного аналізу клітини, марковані FITC-DEVD-FMK, з'являлися з більшою кількістю апоптоз-позитивних клітин (позначених стрілками) у порівнянні як з NR12S, так і з GFP-міченим Анексином 5 протягом всього часу інкубації (окрім стартової точки) з камптотецином (Рис 3.10 Г). Коефіцієнт кореляції Пірсона між даними для NR12S та FITC-DEVD-FMK склав 0,9731, між GFP-Анексин 5 та FITC-DEVD-FMK - 0,9568, між NR12S та GFP-Анексином 5 - 0,9940. Таким чином, дані потокової цитометрії свідчать про тісну кореляцію між активацією каспази-3, загальним перерозподілом ліпідів та експозицією PS за весь часовий діапазон (0-24 год). Незважаючи на це, популяція клітин з вищою активністю каспази-3 з'явилася швидше, ніж це було виявлено при змінах трансмембранної ліпідної асиметрії.

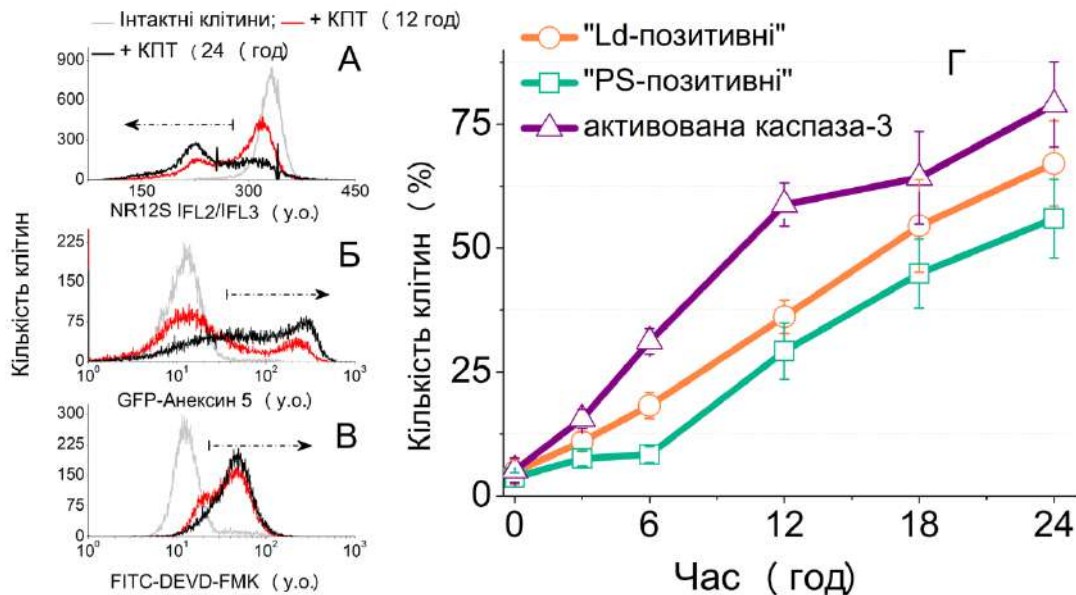


Рис 3.10. Вплив камптотецину на клітини HeLa, досліджуваний за допомогою протокової цитометрії. Гістограми клітин, забарвлених NR12S (А), GFP-міченого Анексину 5 (Б) та FITC-DEVD-FMK (В). (Г) Кількісний аналіз даних Протокової цитометрії. "Апоптоз-позитивні" клітини були вибрані як такі, що мають більш високу інтенсивність флуоресценції для GFP-мічених Анексином 5 та FITC-DEVD-FMK. Для NR12S вибір був застосований для субпопуляцій з меншим зеленим/червоним співвідношенням інтенсивностей в порівнянні з відповідним контролем. Дані представлені як арифметичні значення відсотку "апоптоз-позитивні" клітин  $\pm$  стандартне відхилення ( $n = 3$ ).

Для цих експериментів клітини HeLa обробляли ІРА-3 (протягом 45 годин) або камптотецином (протягом 18 годин) для індукції апоптозу. Щоб вивчити вплив активації каспаз-3 на ліпідний порядок плазматичної мембрани, цей фермент був інгібований за допомогою Z-DEVD-FMK.

Подібно до клітин, оброблених камптотецином, клітини, оброблені ІРА-3, забарвлені NR12S, GFP-марковані Анексин 5 та FITC-DEVD-FMK, виділяли дві субпопуляції з більш високим числом клітин, позначених як апоптотичні (Рис. 3.11 А, Б, В). Спільне введення ІРА-3 та камптотецину з інгібітором каспази-3, Z-DEVD-FMK, призвело до зменшення апоптотичної субпопуляції для маркерів апоптозу, а також для NR12S.

В свою чергу, кількісний аналіз Протокової цитометрії (Рис 3.11 Г) показує, що порядок ліпідів плазматичної мембрани за апоптозу корелює із активністю каспази-3 та динамікою PS

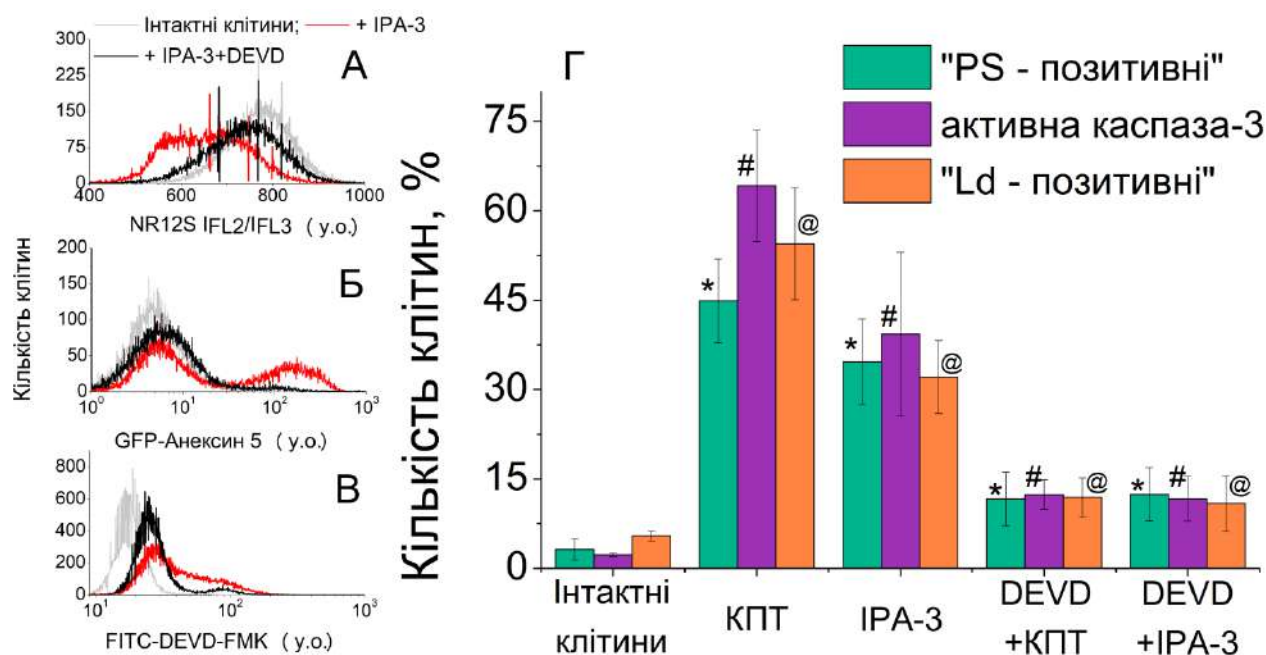


Рис 3.11. Вплив різних апоптоз-індукуючих та інгібуючих агентів на клітини HeLa досліджували за допомогою протокової цитометрії з використанням NR12S (А), GFP-міченого Анексину 5 (Б) та FITC-DEVD-FMK (В). (Г) Кількісний аналіз даних протокової цитометрії. "Апоптоз-позитивні" клітини були вибрані як такі, що мають більш високу інтенсивність флуоресценції для GFP-міченого Анексину 5 та FITC-DEVD-FMK. Для NR12S вибір був застосований для субпопуляцій з нижнім зеленим / червоним співвідношенням інтенсивностей в порівнянні з відповідним контролем. Дані представлені як середні арифметичні значення відсотку "апоптоз-позитивних" клітин  $\pm$  стандартне відхилення (n = 4).

\* свідчить про значну відмінність від значень контрольної групи клітин HeLa забарвлених із GFP-міченим Анексином 5 (ANOVA;  $P < 0.05$ );

# свідчить про значну відмінність від значень контрольної групи клітин HeLa забарвлених із FITC-DEVD-FMK (ANOVA;  $P < 0.05$ );

@ свідчить про значну відмінність від значень контрольної групи клітин HeLa забарвлених із NR12S (ANOVA;  $P < 0.05$ );

Виснаження холестеролу очікувано не підвищує активність каспази-3, але індукує збільшення сигналу флуоресценції GFP-міченого Анексину 5 порівняно з інтактними клітинами (Рис 3.12). Така реакція GFP-міченого Анексину 5 може бути результатом інгібування метил- $\beta$ -циклодекстрином ліпідних транспортерів (Klarpe, Hummel, Hoekstra, & Kok, 2009), що призводить до мінімального ефекту зниження асиметрії бішару без впливу на апоптотичний сигналінг.

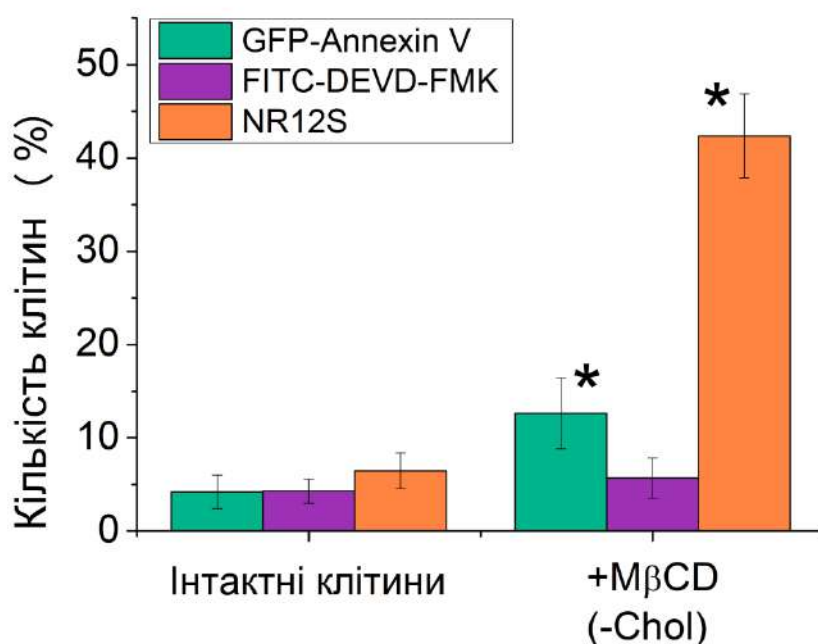


Рис 3.12. Ефект інкубації 5мМ метил- $\beta$ -циклодекстрину (2 години) на клітинах HeLa досліджували за допомогою Протокової цитометрії з використанням NR12S, GFP-міченого Анексину 5 та FITC-DEVD-FMK. Кількісний аналіз даних протокової цитометрії. Клітини були відібрані як такі, що мають більш високу інтенсивність флуоресценції для GFP-міченого Анексину 5 та FITC-DEVD-FMK. Для NR12S вибір був застосований для субпопуляцій з нижнім зеленим/червоним співвідношенням інтенсивностей в порівнянні з відповідним контролем. Дані представлені як середні арифметичні значення відсотку "апоптоз-позитивні" клітин  $\pm$  стандартне відхилення (n = 3).

Як було зазначено вище, холестерол-виснажені клітини, забарвлені NR12S, демонструють зсув емісії, подібний до апоптотичних, але в протоковій цитометрії клітини не розподіляються на дві різні групи. Однак у них виявлено загальне зменшення співвідношення зеленого / червоного інтенсивностей, що призводить до зміни всієї популяції до нижчих значень співвідношення (Рис 3.13). Ті ж ознаки спостерігались для клітин, оброблених 7KChol:MβCD та SMазою. Крім того, подібно до спектроскопічних досліджень в клітинних суспензіях, дані протокової цитометрії клітин, оброблених Chol:MβCD, показали збільшення співвідношення інтенсивності зеленого / червоного каналів клітин забарвлених NR12S (Рис 3.13). Ці результати показують, що варіація вмісту холестеролу та SM стосується всіх клітин, тоді як інкубація із апоптотичними агентами призводить до гетерогенності між популяціями інтактних та апоптотичних клітин.

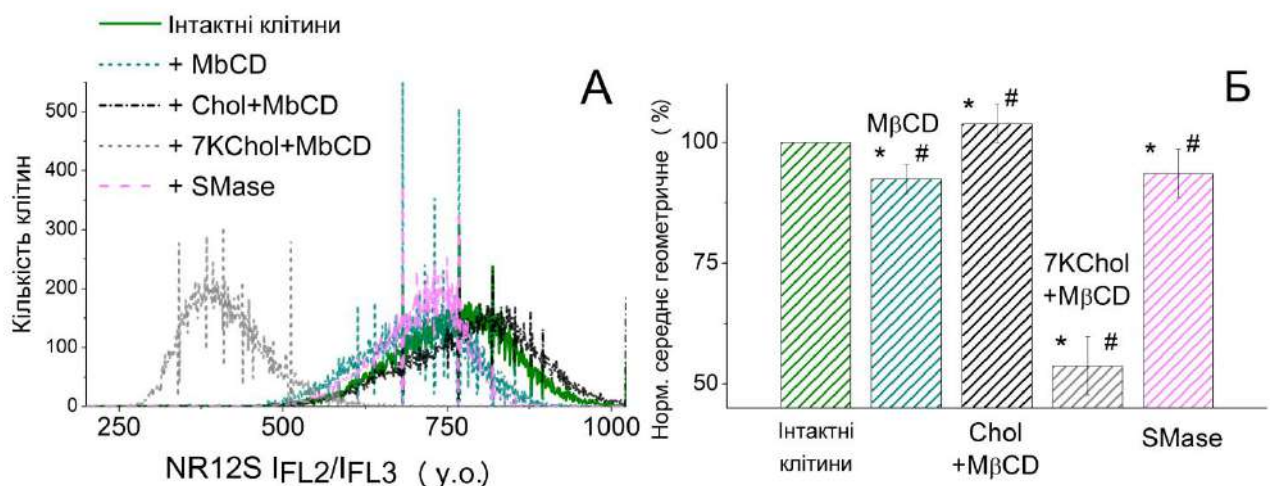


Рис 3.13. (А) Вплив MβCD, Chol: MβCD, 7KChol: MβCD та SMази на ліпідний порядок клітин HeLa з плазматичною мембраною, забарвлений NR12S. (Б) Кількісний аналіз даних протокової цитометрії. Дані представлені як середні частотні значення гістограм, розрахованих у відсотках по відношенню до контрольної групи ± стандартне відхилення (n = 3).

\* свідчить про значну відмінність від значень контрольної групи клітин HeLa (t-критерій Ст'юдента; P<0.05);

# свідчить про значну відмінність від значень контрольної групи клітин HeLa (ANOVA; P<0.05);

### 3.2.2. Вивчення динаміки ліпідів за процесів апоптозу та ериптозу

#### 3.2.2.1. Вивчення біохімічних та біофізичних змін в клітинах

Для того, щоб краще зрозуміти схожість або відмінності між апоптозом та ериптозом, ми проаналізували та порівняли характерні біохімічні події (маркери апоптозу). Зокрема, ми сконцентрувались на експозиції PS, зміні внутрішньоклітинних рівнів іонів  $Ca^{2+}$ , зменшення порядку ліпідів та морфології клітин.

Для цих досліджень ми обрали клітинну лінію Jurkat як встановлену модель для ядерних клітин, що демонструють апоптоз (Bratton, et al., 1997; de Graaf, et al., 2004; Terper, et al., 2000). Для вивчення змін ліпідного порядку ми застосували чутливий до мікрооточення флуоресцентний зонд NR12S (Oleksandr A. Kucherak, et al., 2010). Ця похідна барвника Nile Red показує сильну спорідненість до мембранних ліпідів, і за часом наших вимірювань NR12S забарвлює лише зовнішній моношар без перенесення на внутрішній. Це ратіометричний зонд, що показує зміну спектрів збудження та випромінювання, і ця зміна кольору випромінювання дозволяє спостерігати за змінами гідратації та полярності, які характеризують порядок ліпідів у біомембранних структурах у дослідженнях спектроскопії, мікроскопії та протокової цитометрії (Darwich, et al., 2012; Rémy Kreder, et al., 2015; Oleksandr A. Kucherak, et al., 2010).

Максимум емісії NR12S зонду (Рис 3.14 А) в еритроцитах дещо зсунутий в червону область по відношенню до максимуму в клітинах Jurkat без статистично значущої різниці. Крім того, ми порівняли ці дані з сигналом NR12S з малих одношарових везикул (SUV), що складаються з чистої рідино-впорядкованої (SM:Chol = 2:1) та невпорядкованої (DOPC) фаз. Положення максимального рівня емісії як клітин Jurkat, так і еритроцитів виявилось ближче до везикул SM:Chol, які поділяють високий вміст рідино-впорядкованої фази у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани, що відповідає попереднім



результатам щодо інших клітинних ліній (Rémy Kreder, et al., 2015; Dylan M Owen, Williamson, Magenau, & Gaus, 2012; Pырshev, et al., 2017).

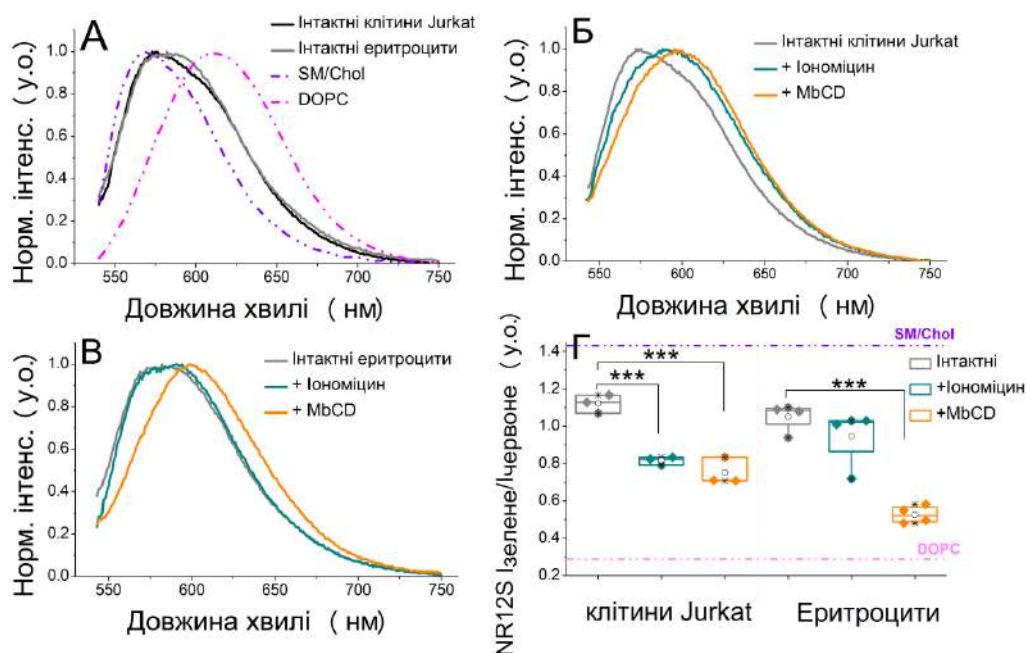


Рис 3.14. Нормалізовані флуоресцентні спектри NR12S в еритроцитах і клітинах Jurkat. (А) Інтактні клітини в порівнянні із Lo (SM:Chol = 2: 1) та Ld (DOPC) фазами. Клітини Jurkat (Б) та еритроцити (В) після інкубації з іономіцином та метил- $\beta$ -циклодекстрином. (Г) Кількісна ратіометрична відповідь флуоресценції (відношення інтенсивності 560/610 нм) зонду NR12S на індукцію запрограмованої загибелі клітин та зниження рівня холестеролу у порівнянні з ліпідними фазами Lo та Ld. (n > 3).

\*\*\* P < 0.0005 тест ANOVA

Апоптоз і ериптоз у двох типів клітин були індуковані іономіцином, що збільшує внутрішньоклітинну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  і тим самим активує  $\text{Ca}^{2+}$  - залежні етапи процесу загибелі (Abed, et al., 2012; Gil-Parrado, et al., 2002). Використовуючи Fluo-4 у протоковій цитометрії, ми порівняли зміни рівнів внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  в результаті обробки іономіцином клітин Jurkat та еритроцитів. В обох випадках (Рис 3.15) ми спостерігаємо характерне збільшення рівнів  $\text{Ca}^{2+}$ , що свідчить про подібну поведінку ядерних клітин та еритроцитів. Експозиція PS на зовнішній моношар плазматичної мембрани



досліджувалася за допомогою GFP-міченим Анексином 5. За результатами протокової цитометрії як інтактні клітини Jurkat, так і еритроцити спостерігаються як окремі популяції з низькою інтенсивністю флуоресценції, тоді як при індукції апоптозу іономіцином з'являється додаткова популяція з високим сигналом флуоресценції (Рис 3.16 і 3.17).

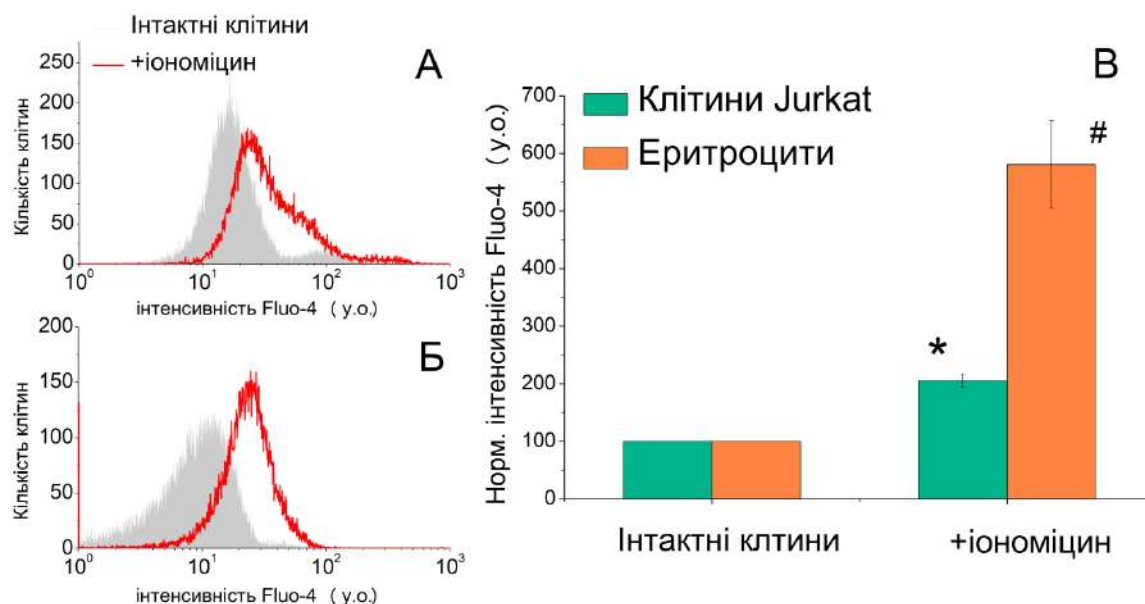


Рис 3.15, Дані протокової цитометрії та їх аналіз для інтактних та інкубованих з іономіцином клітин, забарвлених із Fluo-4. (А) клітини Jurkat і (Б) еритроцити. (В) Кількісний аналіз представлений як геометричне середнє значення флуоресценції Fluo-4, нормований до контрольної групи без обробки  $\pm$  СВ (n = 3).

\* вказує на значну різницю із значеннями інтактних клітин Jurkat (ANOVA;  $P < 0.05$ );

# вказує на значну різницю із значеннями інтактних еритроцитів (ANOVA;  $P < 0.05$ )

З іншого боку, іономіцин-індукований апоптоз у клітинах Jurkat дає значний червоний зсув в спектрі емісії NR12S, що свідчить про зниження порядку ліпідів у їх плазматичних мембранах (Рис 3.14 Б). Це спостереження відповідає попереднім дослідженням, продемонстрованими для інших клітинних ліній з NR12S (Darwich, et al., 2012; Rémy Kreder, et al., 2015; Pyrshev,

et al., 2017). Проте, на відміну від клітин Jurkat (Рис 3.14 Б), в еритроцитах не виявлено значного спектрального зсуву максимуму флуоресценції, що свідчить про відсутність значної зміни полярності / гідратації оточення застосованого зонда (Рис 3.14 Г).

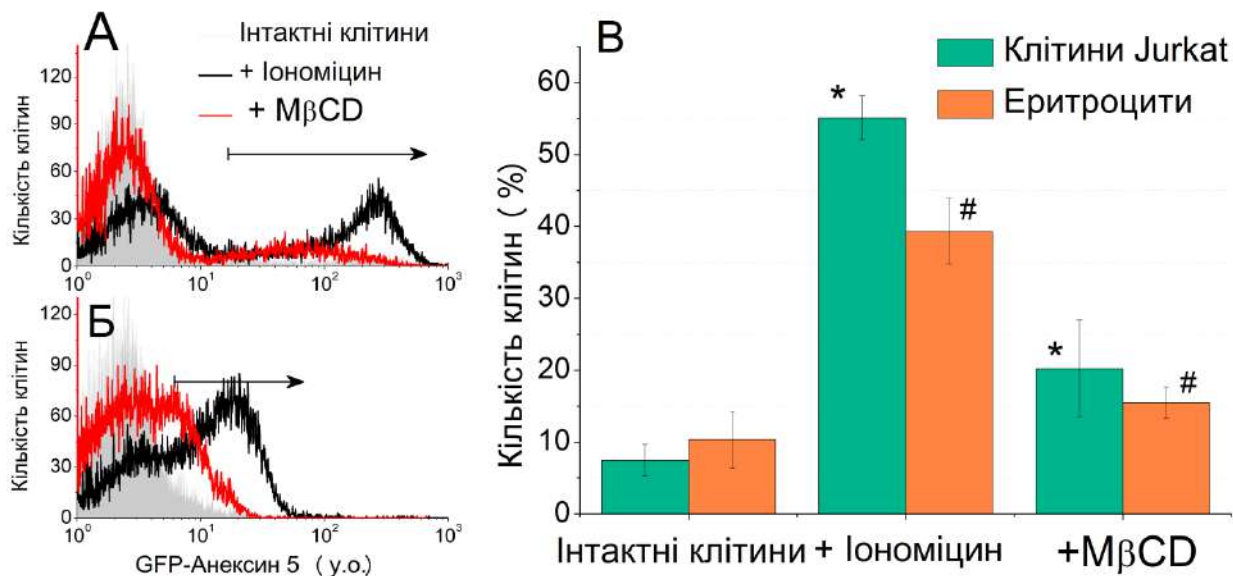


Рис 3.16. Дані протокової цитометрії та їх аналіз для інтактних, інкубованих з іономіцином та клітин, визначених на холестерол, забарвлених із GFP-Анексином 5. (А) клітини Jurkat та (Б) еритроцитами. (В) Кількісний аналіз позитивних за ознакою клітин. Дані представлені як арифметичні середні значення  $\pm$  СВ (n = 5).

\* вказує на значну різницю із значеннями інтактних клітин Jurkat (ANOVA; P <0,05);

# вказує на значну різницю із значеннями інтактних еритроцитів (ANOVA, P <0,05)

Здатність NR12S реагувати на зміни ліпідного порядку в плазматичній мембрані еритроцитів була перевірена в експериментах з виснаженням холестеролу, що, як відомо, різко знижує ліпідний порядок плазматичної мембрани відповідно до реакції NR12S (Oleksandr A. Kucherak, et al., 2010; Puryshch, et al., 2017) та інших зондів (Jin et al., 2006). У нашому експерименті клітини інкубували з 5 мМ метил-β-циклодекстрину, який міг екстрагувати від 60 до 90% холестеролу плазматичної мембрани (Levitan, et al., 2000;

Romanenko, et al., 2004; Zidovetzki & Levitan, 2007). Після інкубації з цим агентом та фарбування з NR12S ми спостерігаємо очікувані червоні зсуви спектрів випромінювання відповідно до попередніх робіт з іншими типами клітин (Darwich, et al., 2012; Oleksandr A. Kucherak, et al., 2010). У нашому випадку для обох типів клітин (Рис 3.14 Б, Г) зонд реагує на зниження холестеролу аналогічним чином.

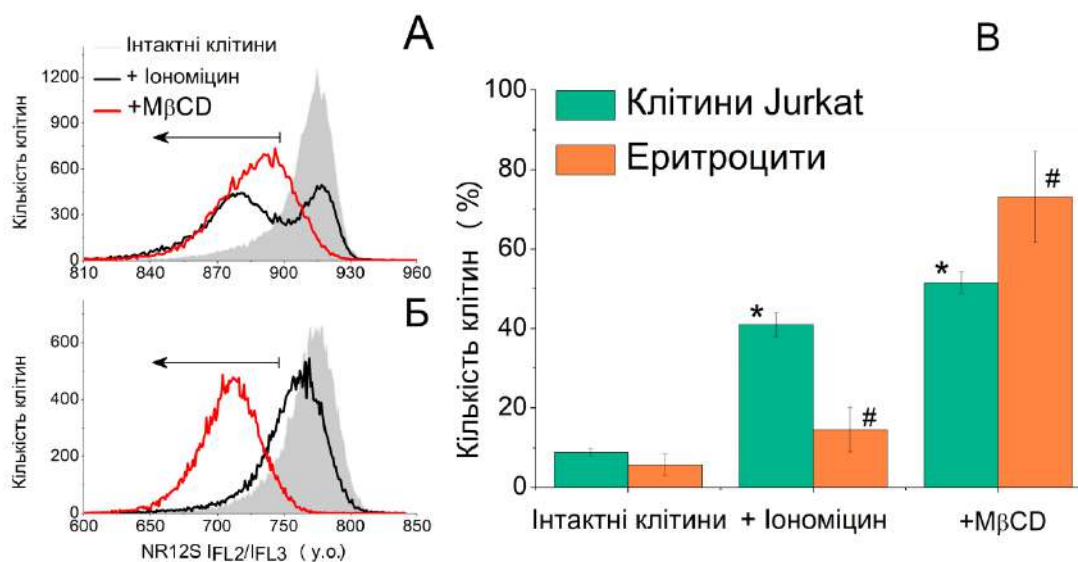


Рис. 3.17. Дані протокової цитометрії та їх аналіз для інтактних, інкубованих з іономіцином та клітин, визначених на холестерол, забарвлених зондом NR12S. (А) клітини Jurkat і (Б) еритроцити. (Г) Кількісний аналіз позитивних за ознакою клітин. Дані представлені як арифметичні середні значення  $\pm$  СВ ( $n = 5$ ). ICh2 / ICh3 відповідає співвідношенню інтенсивностей зеленого/червоного каналів детекції, помноженому на константу (виражене в у.о.).

\* вказує на значну різницю із значеннями інтактних клітин Jurkat (ANOVA;  $P < 0,05$ );

# вказує на значну різницю із значеннями інтактних еритроцитів (ANOVA,  $P < 0,05$ )

Для кількісного виміру спостережуваних спектральних змін/відмінностей у відповіді NR12S ми обрали дві точки в його спектрах випромінювання (при 560 нм і 610 нм) і розрахували співвідношення інтенсивностей на цих довжинах хвиль, які були статистично проаналізовані (Рис 3.14 Г). Цей аналіз

підтверджує, що в клітинах Jurkat зміни, пов'язані з апоптозом та екстракцією холестеролу, схожі, тоді як це не спостерігається в еритроцитах. Їх плазматична мембрана реагує на виснаження холестеролу, але не проявляє жодних змін при індукції ериптозу за допомогою іономіцину.

Як правило, вважається, що експозиція PS на зовнішній моношар плазматичної мембрани є індикатором загального перерозподілу ліпідів, і тому вони обумовлені тими ж механізмами реорганізації мембран (Kiessling, Wan, & Tamm, 2009; Pyshev, et al., 2017). У зв'язку з цим ми досліджували рівень кореляції між експозицією PS та загальним перерозподілом ліпідів при порівнянні даних про відповідь NR12S та GFP-міченого зв'язування Анексину 5. Як і очікувалося, в клітинах Jurkat спостерігається тісна кореляція (критерій Пірсона 0.9801) (рис. 3.18, (1)). На відміну від цього, еритроцити характеризуються зовсім іншою поведінкою (критерій Пірсона складає 0,3098), що вказує на те, що процес PS-експозиції дуже швидкий і не впливає значно на ліпідний порядок зовнішнього моношару плазматичної мембрани (рис. 3.18, (2)).

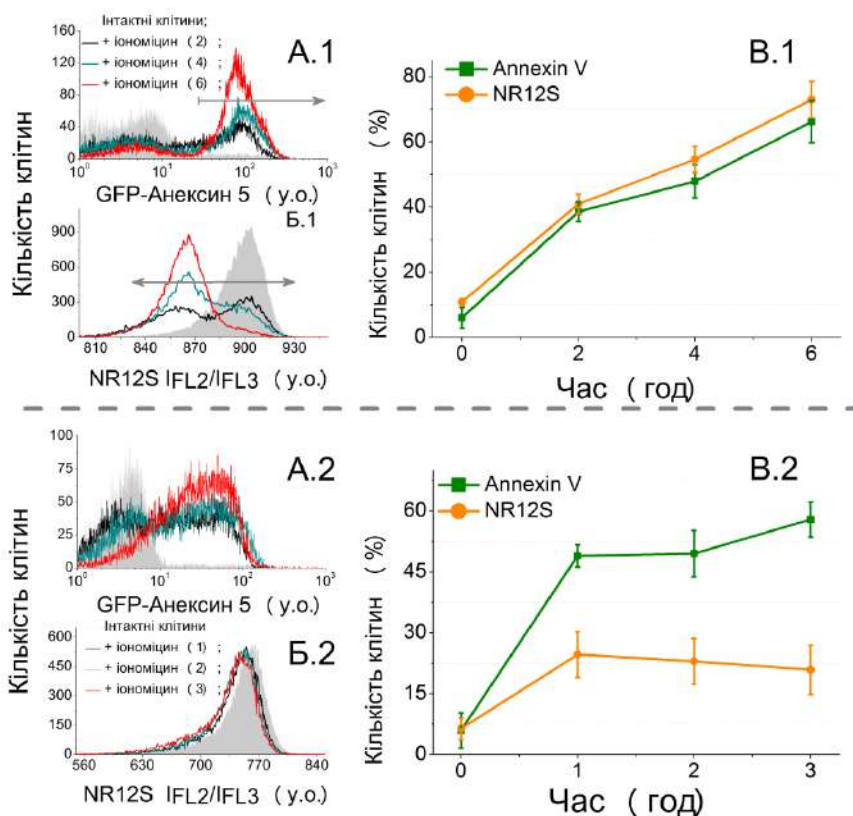


Рис. 3.18. Динаміка експозиції PS та перерозподілу ліпідів, проаналізована за допомогою GFP-міченого Анексину 5 (А) та NR12S (Б) за іономіцин-індукованого апоптозу (1) та еритрозу (2). ICh2 / ICh3 відповідає співвідношенню інтенсивностей зеленого/червоного каналів детекції, помноженому на константу (виражене в у.о.). (Г) Кількісний аналіз даних протокової цитометрії. Дані представлені як арифметичне середнє значення  $\pm$  СВ (n = 4).

Щоб уникнути неправильного тлумачення, NR12S застосовано одночасно з Тихоокеанським синім Анексином 5, а кореляцію між відповідями перевіряли на тому ж зразку з BeckmanCoulter Gallios (рис. 3.19). Дійсно, для клітин Jurkat сигнал Анексину 5 корелює з низьким співвідношенням зеленого/червоного каналів інтенсивності NR12S (рис. 3.18 А), тоді як для червоних кров'яних тілець ця кореляція слабка (рис. 3.18 Б). Слід зазначити, що більш чутливі детектори BeckmanCoulter Gallios в порівнянні з BeckmanCoulter Epics XL дозволили краще розділяти субпопуляції оброблених іономіцином клітин Jurkat з нижчим та вищим порядком ліпідів (рис. 3.18 В). У той же час відповідь NR12S у червоних кров'яних клітинах знову була значно нижчою (рис. 3.19 Г).

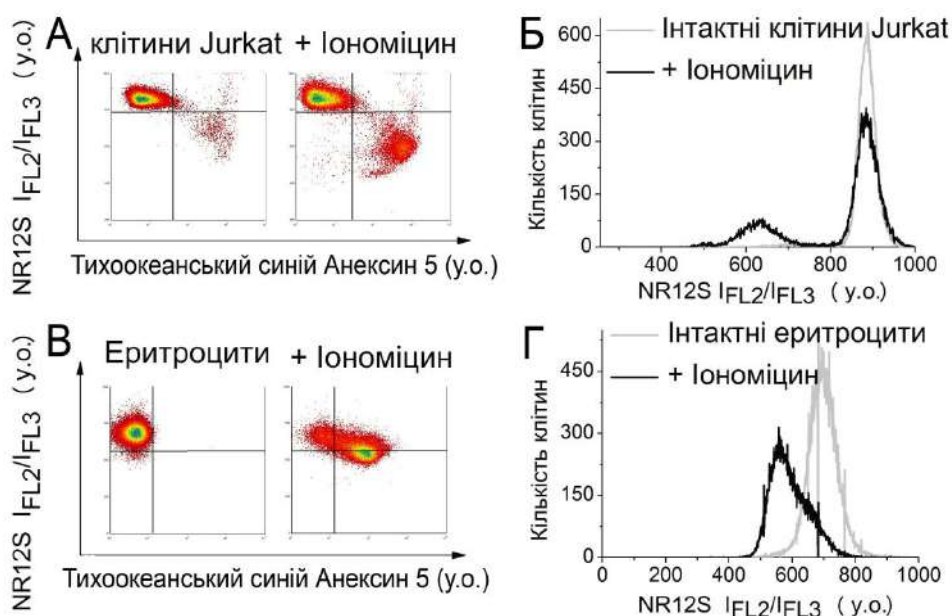


Рис. 3.19. Протокова цитометрія клітин Jurkat (А) та еритроцитів (В), інкубованих з іономіцином і забарвлених одночасно з NR12S (FL2 / FL3) і Тихоокеанським синім Анексином 5 (FL9).

Гістограми для інтактних клітин Jurkat (Б) та еритроцитів (Г) та тих, які були інкубовані з іономіцином протягом 2 годин, забарвлених NR12S, що представляє розділення між субпопуляціями з вищим і нижчим вмістом фази Lo (відповідно співвідношення інтенсивностей  $I_{FL2}/I_{FL3}$  NR12S).

Як було вже відмічено у розділі 1, асиметрія, вміст та динаміка PE впливає суттєвим чином на властивості мембранних ліпідів (Bogdanov, et al., 2014; Ikeda, et al., 2006). Незважаючи на таке підґрунтя, перерозподіл PE під час запрограмованої загибелі залишався не охарактеризованим. Перспективною молекулою для мічення PE є тринітробензенсульфонова кислота (TNBS). Ця молекула ковалентно зв'язується із первинним аміном PE. Однак, первинний амін, доступний для TNBS також присутній в молекулі PS. Принципи мічення та розділення синтетичних PE та PS за допомогою кислоти тонкошарової хроматографії представлені на рис. 3.20 А. Щоб заблокувати взаємодію TNBS із PS клітини преінкубувалися із Тихоокеанським синім Анексином 5 (для спектрального розділення двох молекул) у спеціальному кальцієвому буфері із більшим рН для кращої подальшої взаємодії із TNBS. Як і в попередніх експериментах, запрограмована загибель еритроцитів та клітин Jurkat була викликана за допомогою іономіцину. Виявилось, що в обох типах клітин порушується асиметрія PE під час запрограмованої загибелі (рис. 3.20 Б, В).



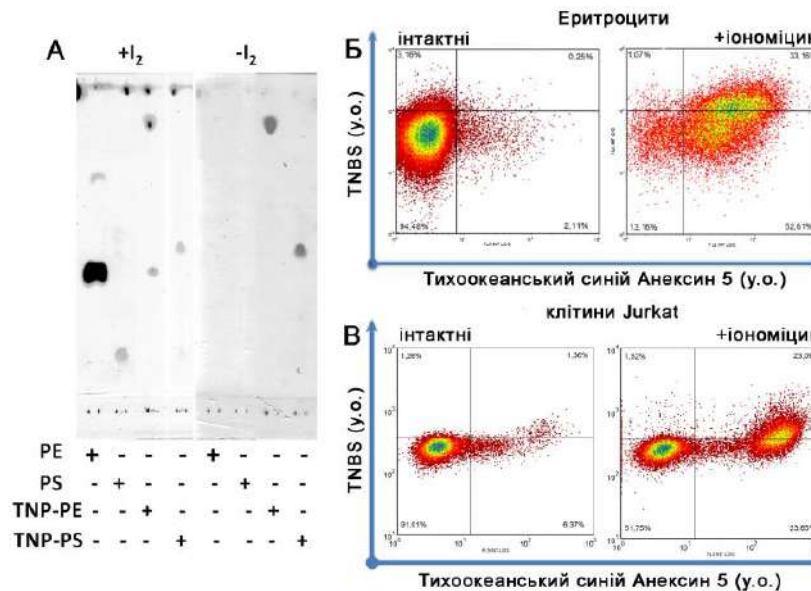


Рис. 3.20. Хроматограма мічених (TNP-PE, TNP-PS) та немічених (PE, PS) за допомогою тринітробензенсульфонової кислоти (TNBS) фосфоліпідів із йодним контрастом та без нього (А).

Дослідження вмісту PE та PS в зовнішньому моношарі еритроцитів (Б) та клітин Jurkat (В), мічених із TNBS та Тихоокеанським синім Анексином 5. Представлені дані для інтактних клітин та тих, які були інкубовані з іоніміцином протягом 3 годин. Вимірювання проводилися за допомогою приладу BeckmanCoulter Gallios.

Одномірна гистограма дійсно показала, що за запрограмованої загибелі збільшується інтенсивність флуоресценції TNBS (Рис. 3.21), що є наслідком більшої кількості PE в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани. Більш глибокий аналіз показав, що за наведених умов інтактні клітини та клітини із порушеною асиметрією PS (згідно сигналу Тихоокеанського синього Анексину 5) мають однакову інтенсивність флуоресценції TNBS, на відміну від субпопуляції, яка має порушену асиметрію обох PE та PS (Рис. 3.21).

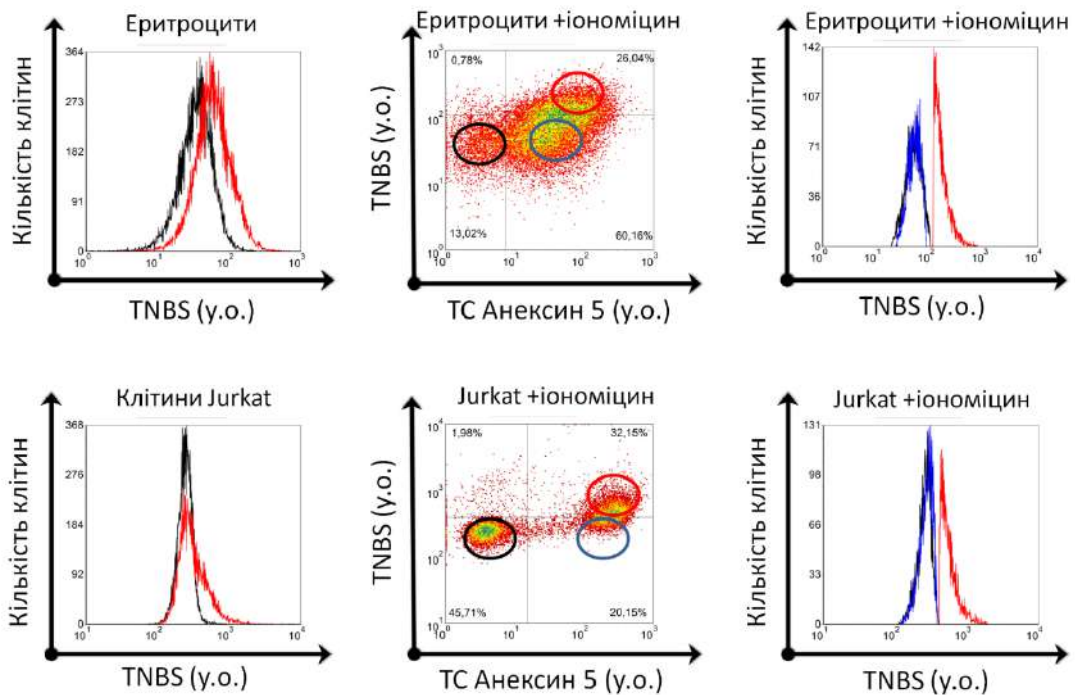


Рис. 3.21 Дослідження розподілу сигналу тринітробензенсульфонової кислоти (TNBS) в клітинах Jurkat та еритроцитах за іономіцин-індукованої клітинної загибелі.

Подальший статистичний аналіз показав, що на відміну від клітин Jurkat, де за апоптозу поява PE йде одночасно із PS, в еритроцитах за ериптозу ці процеси розділені в часі таким чином, що утворюються три субпопуляції: клітини, негативні за обома ознаками, ті що мають лише експонований PS та ті, що мають на поверхні PS та PE (Рис. 3.22). Варто відмітити, що клітин позитивних лише на PE в ході досліджень виявлено не було.



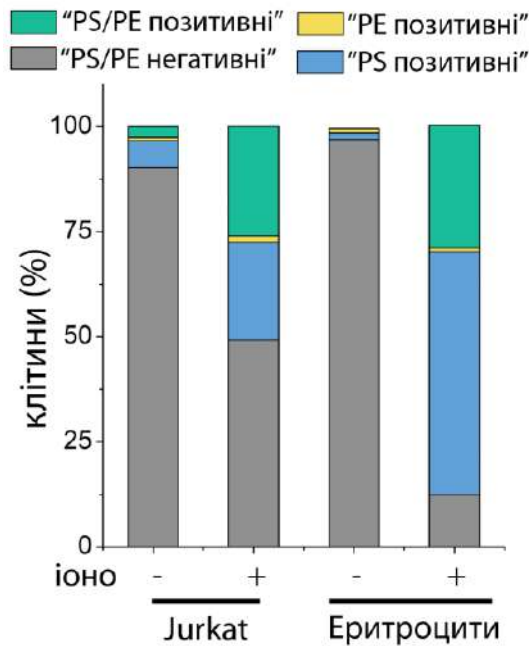


Рис. 3.22 Статистичний аналіз порушення асиметрії PE та PS в плазматичній мембрані за іономіцин-індукованих апоптозу та ериптозу. Кількісний аналіз представлений середніми значеннями відсотку “позитивних за ознакою” клітин (n = 3). Іоно – іономіцин.

Ці результати підтверджують, що незважаючи на втрату асиметрії PS та PE, зниження порядку ліпідів в плазматичних мембранах під час запрограмованої загибелі набагато менш виражена в еритроцитах у порівнянні з клітинами Jurkat.

### 3.2.2.2. Візуалізація змін порядку ліпідів зовнішнього моношару плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу

#### *Визначення загальних змін*

Для того, щоб візуалізувати результати протокової цитометрії на субклітинному рівні, ефекти індукування апоптозу та виснаження на холестерол досліджували конфокальною мікроскопією (Рис. 3.23). Відповідно

до попередніх досліджень, зондом NR12S забарвлювали виключно зовнішній моно шар плазматичної мембрани клітин (Darwich, et al., 2012; Oleksandr A. Kucharak, et al., 2010). Дані, зареєстровані за допомогою зеленого та червоного спектральних каналів, піддавалися обробці для представлення ратіометричного зображення у псевдокольорі. В інтактних клітинах Jurkat спостерігаються відносно однорідні жовто-зелені відтінки шкали (Рис. 3.23 А). Для порівняння, мембрани еритроцитів є більш зеленуватими, що відповідає дещо нижчому співвідношенню інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції NR12S, відповідно до червоного зсуву спектрів в цих клітинах (Рис. 3.23 А, В). У обох клітинах Jurkat та еритроцитах, оброблених метил- $\beta$ -циклодекстрином (Рис. 3.23 А, Б, В), зменшення цього співвідношення очевидне. У клітинах Jurkat, оброблених іономіцином (рис.3.23 А, Б), спостерігається також зменшення співвідношення інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції NR12S, подібно до виснажених на холестерол клітин, що відповідає очікуваному червоному зсуву спектру NR12S. При різкому контрасті, червоні кров'яні клітини, що індуковані на ериптоз, демонструють набагато менше, але все-таки статистично достовірне зменшення цього співвідношення (рис. 3.23 Г). Ці результати повністю співвідносяться з даними спектроскопії (Рис 3.14).

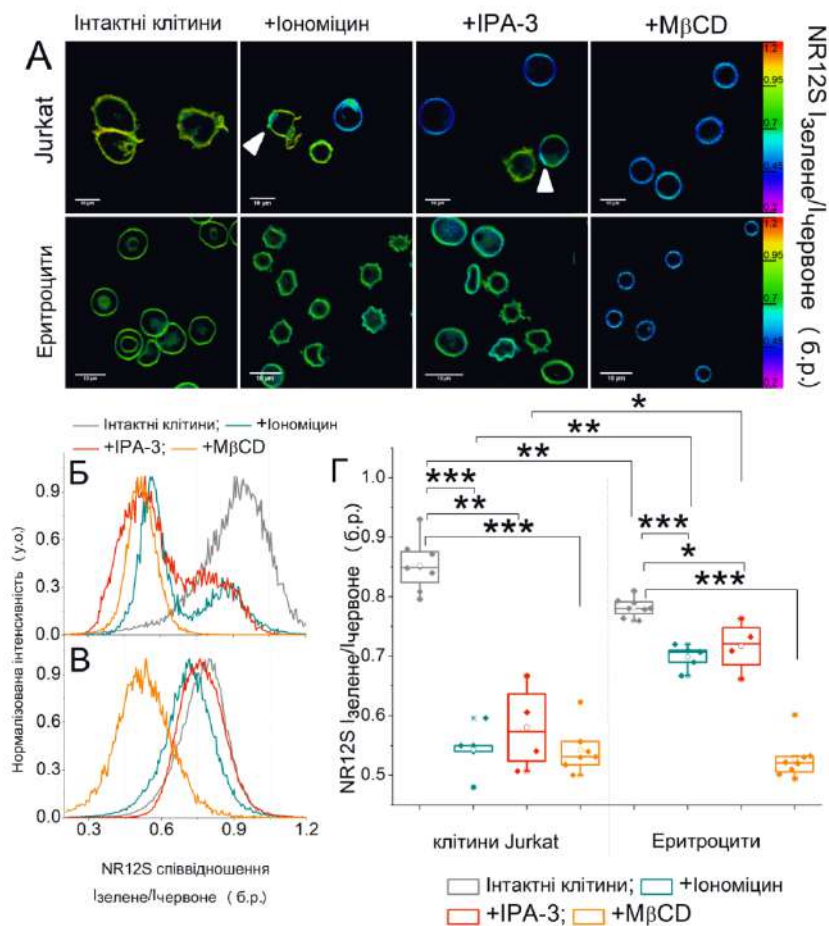


Рис. 3.23. Флуоресцентні ратіометричні зображення (А) клітин Jurkat та еритроцитів, забарвлених зондом NR12S. Інтактні клітини інкубували в середовищі без індуктора. Для стимуляції запрограмованої загибелі клітин застосовували іономіцин та IPA-3. Виснаження клітин на холестерол проводили шляхом інкубації 5 мМ MβCD. Стрілки вказують на везикули з різним співвідношенням інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції NR12S в плазматичній мембрані клітин Jurkat. Псевдоколір відповідає значенням співвідношення інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції NR12S. Шкала розміру складає 10 мкм.

Ратіометрична відповідь зонда NR12S (співвідношення інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції) у клітинах Jurkat (Б) та еритроцитах (В) на модифікацію ліпідного складу в плазматичній мембрані та індукції запрограмованої загибелі клітин. (Г) Кількісний аналіз співвідношення інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції NR12S в клітинних

мембранах на основі даних мікроскопії. Кожна точка представляє зображення, де  $n_{\text{клітин/група}} > 12$ ).

\*  $P < 0.05$  тест ANOVA

\*\*  $P < 0.005$  тест ANOVA

\*\*\*  $P < 0.0005$  тест ANOVA

Щоб ще більше підтвердити наші спостереження, ми застосували інший індуктор запрограмованої загибелі клітин IPA-3 (аллостеричний інгібітор Pak1 (p21-активізована кіназа III)) (Christy C Ong, et al., 2011; Zelenak et al., 2011). Як і очікувалося, ліпідний скрамблінг плазматичної мембрани чітко спостерігається в еритроцитах та клітинах Jurkat, що були інкубовані із IPA-3 (рис. 3.24). З іншого боку, подібно до даних на основі іономіцину, IPA-3 забезпечує лише невелику зміну співвідношення інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції NR12S у червоних клітинах крові (рис. 3.23 А).

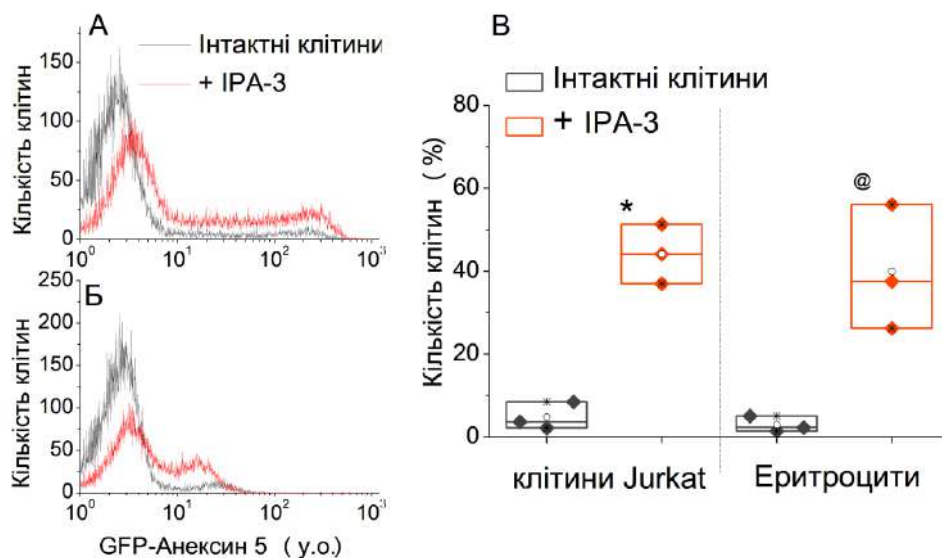


Рис. 3.24. Дані протокової цитометрії та їх аналіз для інтактних та клітин, що були інкубовані із IPA-3, забарвлених GFP-Алексин 5. (А) клітини Jurkat та (Б) еритроцити. (В) Кількісний аналіз даних, представлених як арифметичні середні значення  $\pm$  СВ ( $n = 3$ ).

\* вказує на значну різницю із значеннями інтактних клітин Jurkat (ANOVA;  $P < 0,05$ );

@ вказує на вірогідну різницю із значеннями інтактних еритроцитів (ANOVA,  $P < 0,05$ )

Відображаючи драматичні зміни в морфології клітинної мембрани, дані мікроскопії дозволяють спостерігати зморщування клітинної мембрани з появою характерних ознак - апоптотичних тілець. Роль такої везикуляції раніше була пов'язана з впізнаванням та подальшою елімінацією пошкоджених або непотрібних клітин (Croft et al., 2005). Примітно, що везикули, утворені на поверхні клітинних плазматичних мембран під час процесу везикуляції, переважно демонструють нижче співвідношення інтенсивностей зеленого/червоного каналів NR12S в клітинах Jurkat (рис. 3.23 А, позначені стрілками) та еритроцитами (рис. 3.25 А, Б).

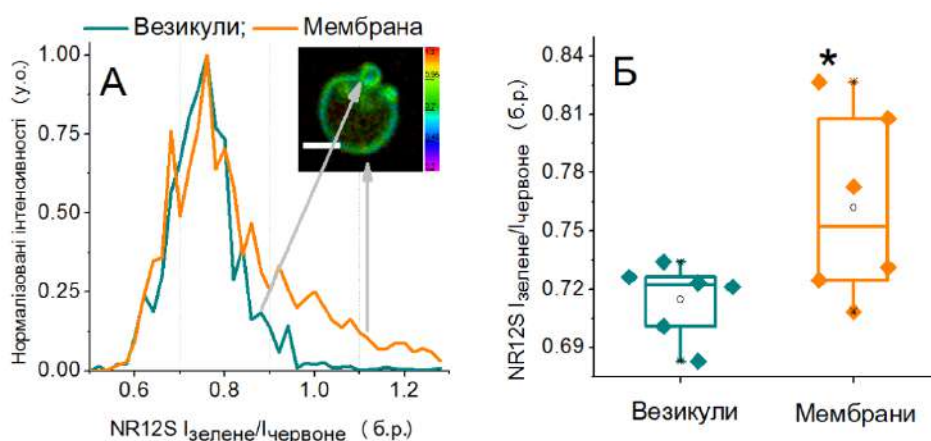


Рис. 3.25, Значення співвідношень інтенсивностей флуоресценції NR12S в везикулах та плазматичних мембранах еритроцитів за іоніміцин-індукованого ериптозу.

(А) Гістограма співвідношень інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції NR12S та зображення (псевдоколір відповідає значенням співвідношення інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції NR12S) ериптотичних еритроцитів з везикуляцією. Нижче співвідношення відповідає нижчому порядку ліпідів.

(Б) Статистичний аналіз співвідношень інтенсивностей флуоресценції NR12S ( $n_{\text{клітин}} = 6$ ).

\* вказує на істотну відмінність від значень мембранних везикул, забарвлених NR12S (ANOVA,  $P < 0,05$ );

Кількісний аналіз зображень був застосований аналогічно даним протокової цитометрії. Для різних експериментальних умов були розраховані середні значення співвідношень інтенсивностей зеленого/червоного каналів флуоресценції NR12S (рис. 3.23 Б-Г). У цілому вони добре узгоджуються з результатами спектроскопічних вимірювань для еритроцитів та клітин Jurkat, а саме: (1) відмінності мембран інтактних еритроцитів і клітин Jurkat, (2) сильний вплив апоптозу на клітини Jurkat, але слабкий для еритроцитів і (3) сильний ефект екстракції холестеролу для обох типів клітин.

#### *Визначення локальних змін*

Раніше було показано, що апоптоз, зумовлений втратою трансмембранної асиметрії та за рахунок гідролізу сфінгомієліну в церамід, може знизити впорядкування ліпідів плазматичної мембрани клітини. Тут, використовуючи нові зонди, ми вивчали просторовий розподіл ліпідного порядку в апоптотичних клітинах, що були інкубовані із IPA-3. Видно, що у порівнянні з інтактними клітинами, апоптотичні, забарвлені NR12S та bNR10S, містять невеликі везикули, що з'являються у кольорах (зелених) відмінних від основної частини плазматичної мембрани (червоний колір) (рис. 3.26 А-Г). Ці везикули були описані раніше як апоптотичні тільця (Mills, Stone, Erhardt, & Pittman, 1998; Sebbagh et al., 2001b), хоча їх ліпідний порядок залишався незрозумілим.

Оскільки зелений колір відповідає низькому співвідношенню інтенсивностей зеленого/червоного каналів, результати дозволяють припустити, що апоптотичні тільця характеризуються нижчим рівнем порядку ліпідів у порівнянні із плазматичною мембраною. У випадку зонду bNR10S, ці везикули були набагато яскравіші, ніж інша частина клітинної мембрани, що не спостерігається у випадку NR12S, де ці відмінності не були виражені. Таким чином, завдяки специфічності bNR10S до фази Ld, зонд взаємодіє більш

активно із апоптотичними тільцями, підтверджуючи низький порядок ліпідів у їхніх мембранах. Тому, крім змін кольорів, bNR10S демонструє сильне підвищення інтенсивності флуоресценції в апоптотичних клітинах. Додавання гасія bQ10S призвело до майже повного зникнення цих зелених везикул (рис. 3.26 Г, Д), що підтверджує наявність в цих везикулах великої кількості Ld-подібної фази. Дійсно, bQ10S, в силу своєї специфіки до фази Ld, переважно зв'язує апоптотичні тільця, забезпечуючи тим самим їх гасіння без сильного впливу на решту плазматичної мембрани. Таким чином, наш методичний арсенал забезпечує потрібні докази, що підтверджують утворення відокремлених доменів Ld-подібної фази у вигляді апоптотичних тілець під час апоптозу. Слід зазначити, що спостерігаються зміни ліпідних фаз, пов'язаних із зовнішнім моношаром плазматичної мембрани, оскільки обидва NR12S і bNR10S зонди не проникають на внутрішній моношар в модельних мембранах. У цьому зовнішньому моношарі, втрата трансмембранної асиметрії та гідролізу сфінгомеліну в ході виконавчої стадії апоптозу може генерувати великі домени Ld-фази, які далі можуть бути перетворені в екзосомальні структури, які спостерігаються в наших дослідженнях.

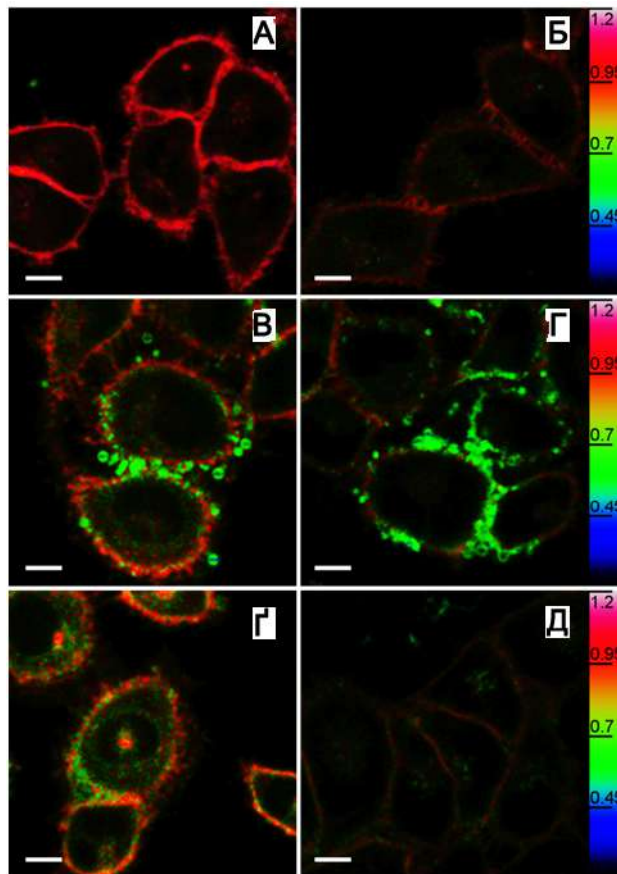


Рис. 3.26. Везикулярні домени Ld-фази в клітинних мембранах апоптотичних клітин, візуалізованих зондами. Ратіометричні зображення флуоресценції інтактних клітин HeLa (А і Б) та клітин, які інкубували з індуктором апоптозу IPA-3 (С. С. Ong et al., 2011) (25 мкМ) протягом 48 год (В і Г). Клітини забарвлювали із NR12S (А і В) і bNR10S (Б та Г) (40 нМ). Додавання гасія bQ10S (100 нМ) вимикала ділянки Ld-фази у зеленому кольорі для NR12S (Г) та bNR10S (Д). Шкала розміру 10 мкм. Псевдоколір кодує співвідношення інтенсивностей зеленого/червоного каналів детекції.

Аналогічно до клітин HeLa, візуалізація еритроцитів, забарвлених NR12S, показує гетерогенний розподіл інтенсивності флуоресценції (рис. 3.24 А). Додавання гасія bQ10S призвело до суттєвого зниження інтенсивності цих везикул (рис. 3.27 Б), що підтверджує, що в нових везикулах присутня Ld-подібна фаза. Варто зауважити, що на відміну від клітин HeLa, не відбулося повного зникнення сигналу від везикул в плазматичній мембрані еритроцитів, що свідчить про суттєвіший вміст Lo-подібної фази в цих структурах.



Кількісний аналіз демонструє, що bQ10S, завдяки своїй специфічності до фази Ld, вплинув на інтенсивність флуоресценції в апоптотичних везикулах еритроцитів без суттєвого впливу на решту плазматичної мембрани (рис. 3.27 В).

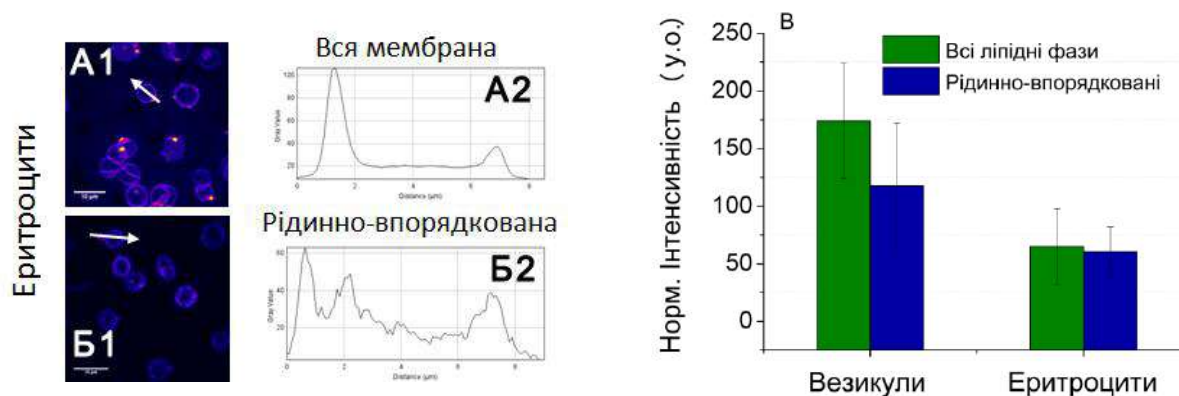


Рис. 3.27. Конфокальна мікроскопія еритроцитів, забарвлених NR12S без (A1) та із (B1) 100 нМ bQ10S. Розподіл інтенсивності флуоресценції NR12S в плазматичній мембрані клітини, що включає формування везикул на поверхні без (A2) і з (B2) 100 нМ bQ10S. (В) Кількісний аналіз даних мікроскопії, що представляють нормалізовану інтенсивність флуоресценції NR12S (з або без 100 мкМ bQ10S) у ділянках формування везикул та іншій частині плазматичної мембрани.

### 3.2.3. Вивчення зміни ліпідних фаз в плазматичній мембрані та в мембранах клітинних органел

Щоб охарактеризувати весь процес перерозподілу ліпідів у клітинах Jurkat та еритроцитах, клітини забарвлювали нещодавно синтезованим зондом PA (Niko, et al., 2016), а ратіометричні зображення отримували за допомогою конфокальної мікроскопії. Як було описано раніше (Niko, et al., 2016), зонд PA не розрізняє два моношари всіх мембранних структур клітин, а його колір випромінювання залежить від ліпідного порядку та вмісту холестеролу (3.1.1.2. Модельні дослідження, рис 3.5). Ми виявили, що плазматична мембрана клітин Jurkat забезпечує більш високий рівень ліпідного порядку, ніж внутрішньоклітинні мембрани, що видно з нижчого співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції PA (рис.3.28 Б). Це

спостереження узгоджується з поточним (рис.3.28 А) та попереднім повідомленням про клітини HeLa з використанням даного зонда (Niko, et al., 2016) та інших дослідженнях на основі барвника Laurdan (Gaus, et al., 2003; Dylan M Owen, Rentero, Magenau, Abu-Siniyeh, & Gaus, 2012). Вищий порядок ліпідів підтверджується високим вмістом холестеролу в плазматичній мембрані порівняно з субклітинними структурами (Van Meer, et al., 2008). Як очікувалось, зниження рівня холестеролу збільшує співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції PA у плазматичній мембрані всіх клітин HeLa, Jurkat та еритроцитів (рис.3.28 Г, Г , Д). Слід зазначити, що у вивчених ядерних клітинах вплив інкубації із метил- $\beta$ -циклодекстрином включає також внутрішні мембрани. Це можна пояснити безперервним транспортуванням холестеролу до плазматичної мембрани (Infante & Radhakrishnan, 2017; Lange, Ye, & Steck, 2004), що призводить до зниження вмісту холестеролу у всіх клітинних мембранних структурах, подібно до попередніх спостережень (Hao et al., 2002).

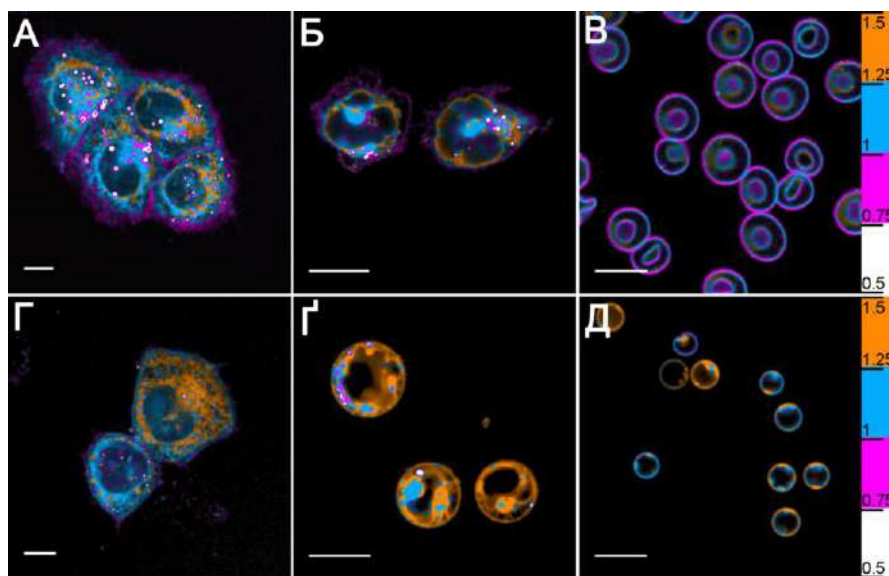


Рис.3.28. Ратіометричні зображення флуоресценції клітин HeLa (А, Г), Jurkat (Б, Г) та еритроцитів (В, Д), забарвлених зондом PA. Інтактні клітини (А-В) інкубували у середовищі без індуктора. Для виснаження холестеролу клітини інкубували з 5 мМ М $\beta$ CD (Г-Д). Псевдоколір кодує співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції PA. Розмірна шкала складає 10 мкм.

Індукція апоптозу іономіцином в клітинах Jurkat і HeLa на ранніх етапах призводить до утворення везикул (рис.3.29). Асоційовані із плазматичними мембранами везикули демонструють співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції РА, що подібне до решти плазматичної мембрани, оскільки зонд не є специфічним для моношарів. Таким чином, незважаючи на зниження асиметрії між моношарами плазматичної мембрани та зниження рівня порядку ліпідів у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани, загальний склад обох моношарів залишається незмінним. На відміну від цього, ліпідні структури, зафіксовані всередині деяких везикул, мають значно нижчий порядок ліпідів в цілому для обох моношарів.

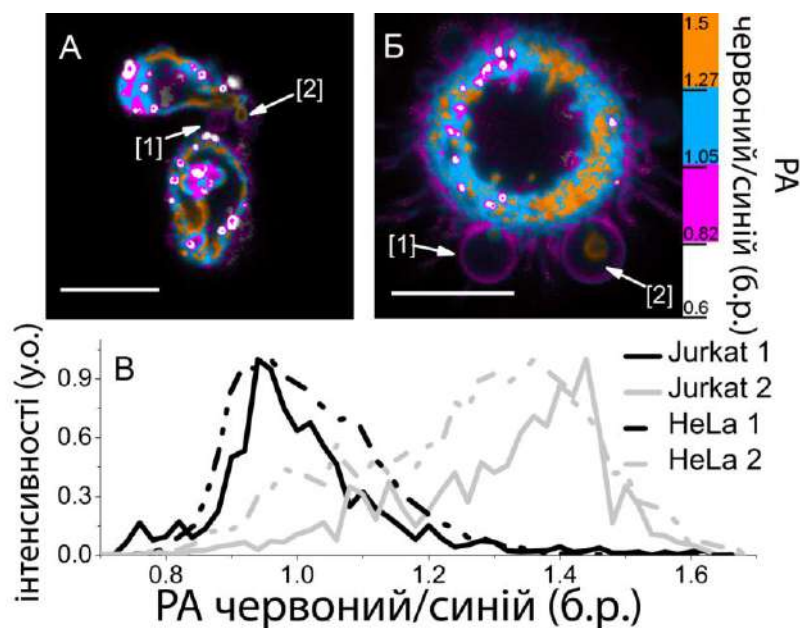


Рис. 3.29. Ратіометрична відповідь зонда РА (псевдоколір кодує для співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції РА) в клітинах Jurkat (А) та HeLa (Б), інкубованих з іономіцином. Стрілки вказують на везикули, які представлені у вигляді гістограм співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції (В). Шкала розміру складала 10 мкм.

Для того, щоб диференціювати сигнали РА з субклітинних та плазматичних мембран, було створено алгоритм на базі Matlab, що дозволяє розділити сигнали між плазматичною мембраною та внутрішніми клітинними мембранами на основі різниці інтенсивностей флуоресценції зонду. Таким чином отримується зображення в обох каналах (синій і червоний) для внутрішніх та зовнішніх сигналів, що дозволяє незалежно розраховувати співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції зонду РА для внутрішніх та плазматичних мембран (рис.3.30).

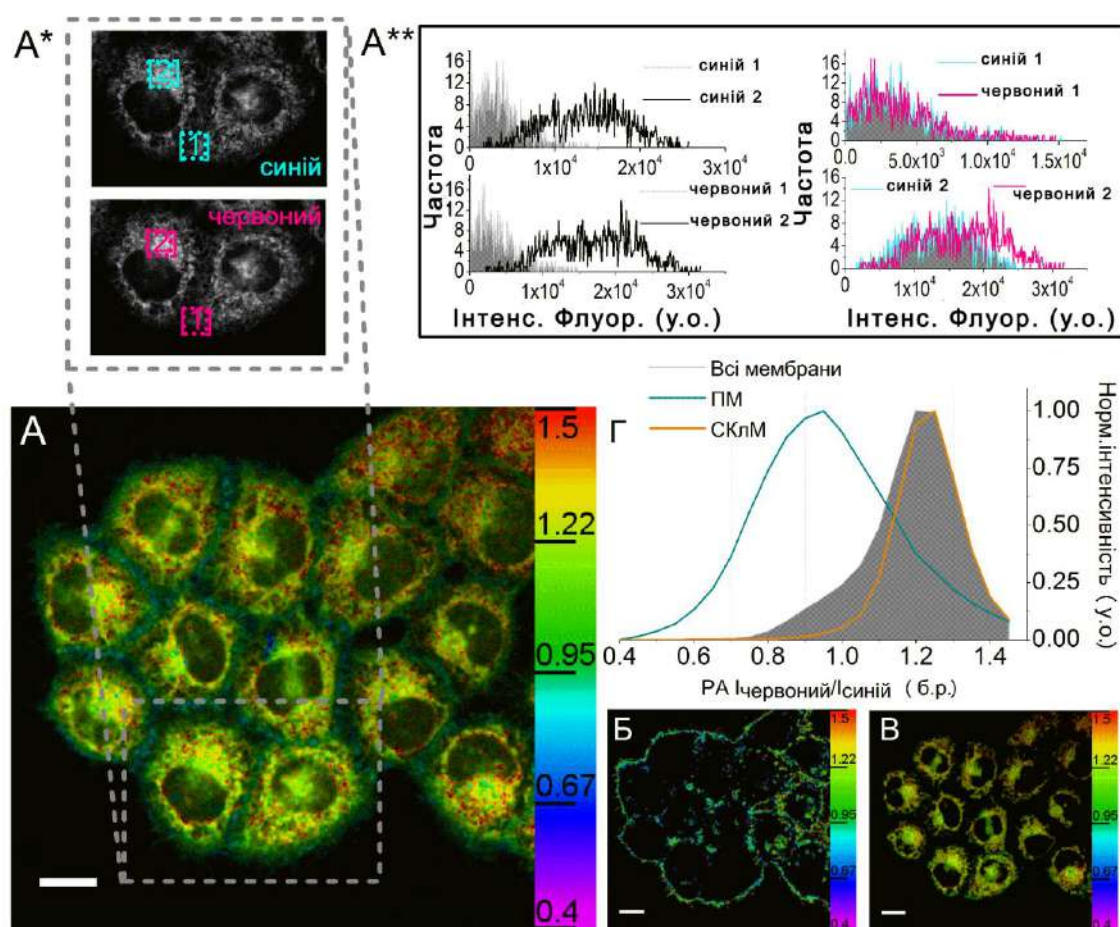


Рис. 3.30. Різниця в ратиометричній відповіді зонду РА, що забарвлює плазматичну мембрану та внутрішньоклітинні мембранні мережі. Дані мікроскопії представлені у вигляді співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції РА в інтактних клітинах HeLa (A), їх

плазматичній (Б) та субклітинних мембранах (В). Шкала розміру складала 15 мкм.

(Г) Гістограми, що відображають дані співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції РА на зображенні в клітинах HeLa, субклітинних (СКЛМ) та плазматичних мембранах (ПМ).

Для детального опису принципу аналізу таких зображень:

(А\*) вирізаний елемент зображення (А), представлений у вигляді сигналу з синього і червоного каналів, відповідно. Прямокутники були позначені елементи внутрішньоклітинних (2) та плазматичних (1) мембран.

(А\*\*) показує сильну різницю в інтенсивності флуоресценції зонду РА між мембранними елементами з внутрішньоклітинних та плазматичних мембран. Вища інтенсивність сигналу від внутрішньоклітинних мембран пояснюється наявністю більшої концентрації мембран і, таким чином, забезпечує більше ділянок зв'язування для зонда РА у порівнянні з плазматичною мембраною. Така різниця дозволяє створювати образи для відокремлювання необхідних елементів від початкового зображення. Слід зазначити, що для синіх і червоних каналів застосовуються однакові образи для повного перекриття пікселів на обох зображеннях. Нарешті, різниця в інтенсивності подібних елементів між синім і червоним каналами ілюструє різницю складу мембран, а, отже, мікрооточення зонду РА, яке представлено на (Б) та (В) відповідно.

Цей аналіз дозволяє спостерігати різницю між властивостями плазматичних мембран інтактних еритроцитів та клітин Jurkat (рис.3.31 А, В). Важливо, що після індукції апоптозу відмінності між ліпідним порядком плазматичної та внутрішніми мембранами стають менш вираженими в порівнянні з інтактними клітинами, що підтверджується кількісним аналізом (рис.3.31 А, Б, Г).



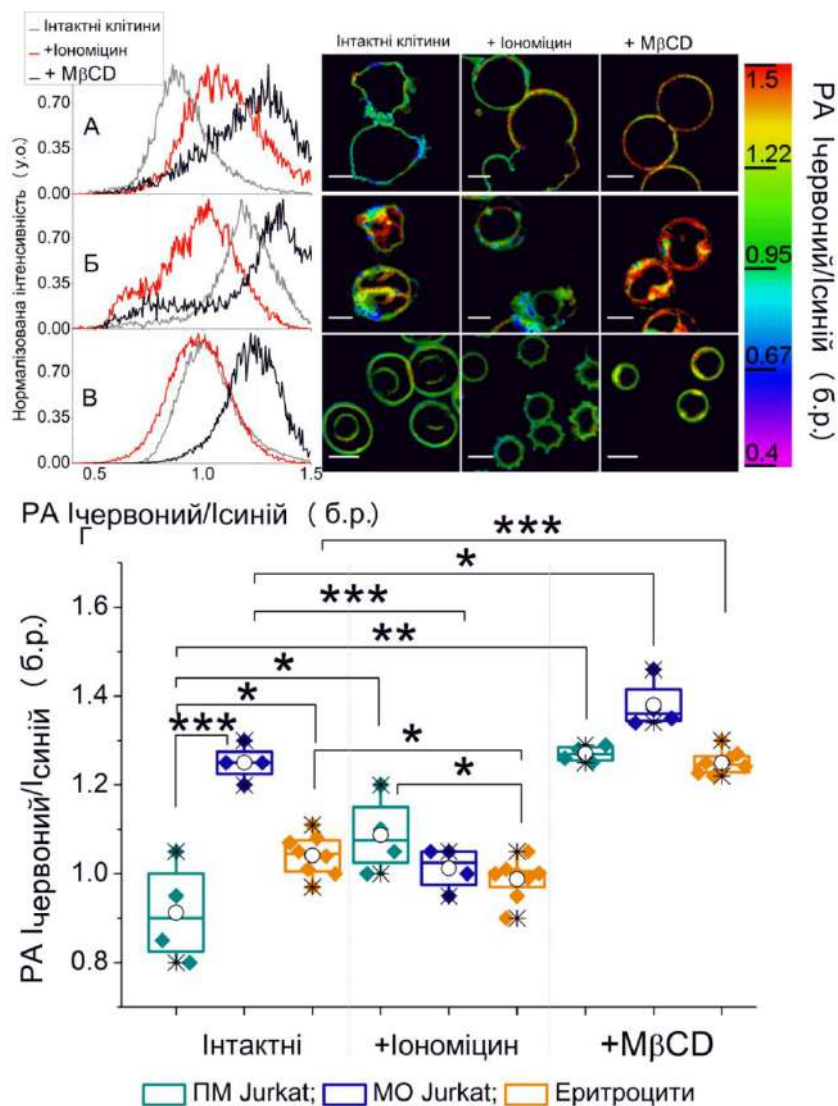


Рис. 3.31. Ратіометрична відповідь зонда РА (псевдоколір кодує для співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції) у плазматичній мембрані (рядок А) та субклітинних мембранах (рядок Б) клітин Jurkat, а також еритроцитів (рядок В) на індукцію запрограмованої загибелі клітин та екстракцію холестеролу. (Г) Кількісний аналіз ратіометричних зображень. Дані представлені у вигляді геометричних середніх значень гістограм (кожна точка є зображенням,  $n_{\text{клітин/група}} > 25$ ). ПМ - плазматична мембрана, СКМ - субклітинна мембрана. \*  $P < 0.05$  тест ANOVA; \*\*  $P < 0.005$  тест ANOVA; \*\*\*  $P < 0.0005$  тест ANOVA

Ці спостереження дозволяють припустити, що крім обміну ліпідами між моношарами плазматичної мембрани за допомогою скрамблази, може мати

місце обмін ліпідними компонентами між плазматичною та внутрішніми мембранами за апоптозу. Натомість, ериптоцитні еритроцити, які не мають внутрішньоклітинних мембран, демонструють співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції РА, що є досить схожою з тим, що спостерігається в інтактних клітинах (Рис.3.31 В, Г) для основної зони плазматичної мембрана з шипами (ехіноцитоз) та більш високі значення для ділянок везикуляції (Рис.3.32 А, Б), що свідчить про ймовірний взаємозв'язок між властивостями мембрани та її кривизною (Chiantia, Klymchenko, & London, 2012; S. Yesylevskyy, Demchenko, Kraszewski, & Ramseyer, 2013).

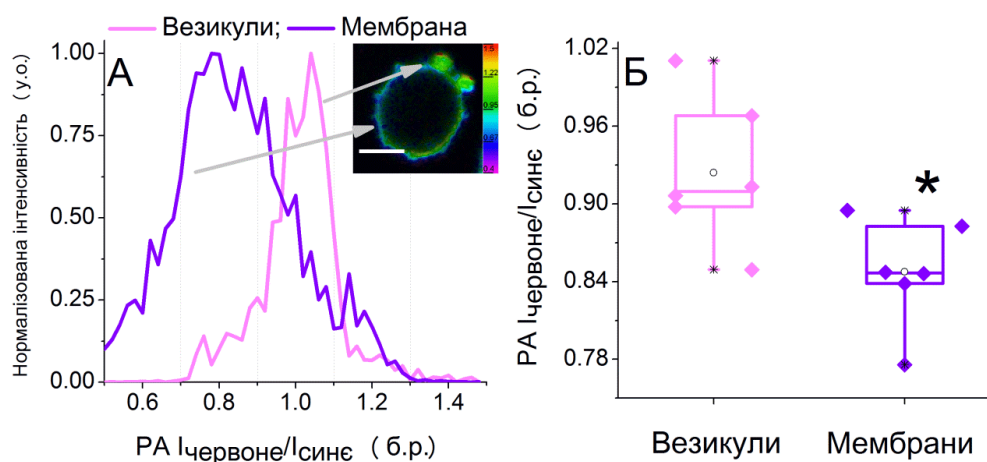


Рис. 3.32. Співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції зонду РА в везикулах та плазматичних мембранах еритроцитів за іономіцин-індукованого ериптозу.

(А) Гістограма, що відображає співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції зонду РА та зображення (псевдоколір кодує співвідношення інтенсивностей червоного/синього каналів флуоресценції) ериптоцитних еритроцитів з везикуляцією. Вище співвідношення відображає нижчий порядок ліпідів.

(В) Статистичний аналіз співвідношення інтенсивностей флуоресценції. Дані представлені у вигляді середніх геометричних значень ( $n_{\text{клітин}} = 6$ ).

\* вказує на істотну відмінність від значень мембранних везикул забарвлених зондом РА (ANOVA;  $P < 0.05$ );

### 3.2.4. Вивчення структурно-механічних властивостей мембрани

Для опису механічного впливу на ліпідного порядку живих та апоптотичних (або ериптотичних) клітин розроблена FRET-система F2N12SM: bNR10S. Оскільки F2N12SM (метильований аналог F2N12S) забарвлює обидві ліпідні фази зовнішньої плазматичної мембрани листівки (Remy Kreder, et al., 2015), вона залишається придатним донором флуоресценції для bNR10S (аналог NR12S з громіздким ацильним ланцюгом), який забарвлює переважно Ld фази (Rémy Kreder, et al., 2015). Таким чином, ефективність FRET буде суттєвою лише в Ld фазі.

Дійсно, навіть при підвищеному сигналі, розділена гетерогенність ліпідних фаз плазматичної мембрани не була візуалізована (Рис.3.33). Однак FRET-сенсорна система показала сильну різницю між сигналами в апоптотичних тілах та іншою частиною плазматичної мембрани, що свідчить про зниження рівня механічної напруги при впорядкуванні ліпідів у фрагментованих структурах. Проте це явище не відбувалося в еритроцитах, які проявляли нижчу ефективність FRET за ериптозу.

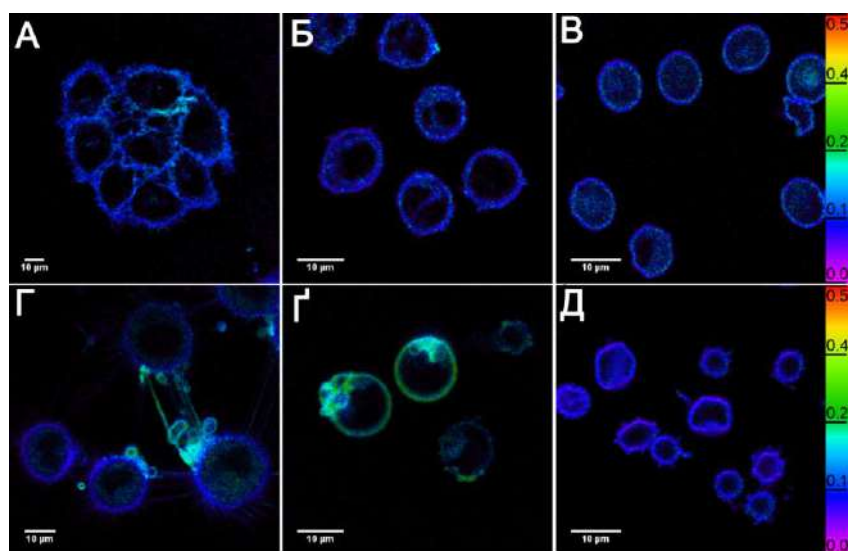


Рис. 3.33. Флуоресцентні ратиометричні зображення клітин HeLa (А, Г), Jurkat (Б, Г) та еритроцитів (В, Д), забарвлених 20 нМ F2N12SM та bNR10S. Інтактні клітини (А-В) інкубували в середовищі, вільному від індуктора. Для індукції запрограмованої загибелі клітин був застосований іономіцин (Г-Д). Псевдоколір кодує співвідношення інтенсивностей флуоресценції акцептора/донора F2N12SM-bNR10S. Шкала розміру складала 10 мкм.



Для детальної оцінки отриманих результатів був проведений кількісний аналіз подібно розділу модельних досліджень (Рис. 3.34). Показано, що клітини Jurkat та HeLa мають суттєво нижчу щільність пакування ліпідів, що і призвело до збільшення ефективності перенесення енергії на акцептор. Натомість еритроцити мають суттєве збільшення щільності пакування ліпідів. Ймовірно, як і у випадку мембранного зонду PA, результати, що спостерігаються, є наслідком зміни відношення площі поверхні мембрани еритроциту (яка залишається сталою) до його об'єму (який знижується). Також цей феномен може бути пов'язаним із втратою функції циклу Лендса, активації фосфоліпази A2 (F. Lang & Qadri, 2012) та збільшенні складу лізофосфоліпідів, що також впливають на зміну механічних властивостей мембран.

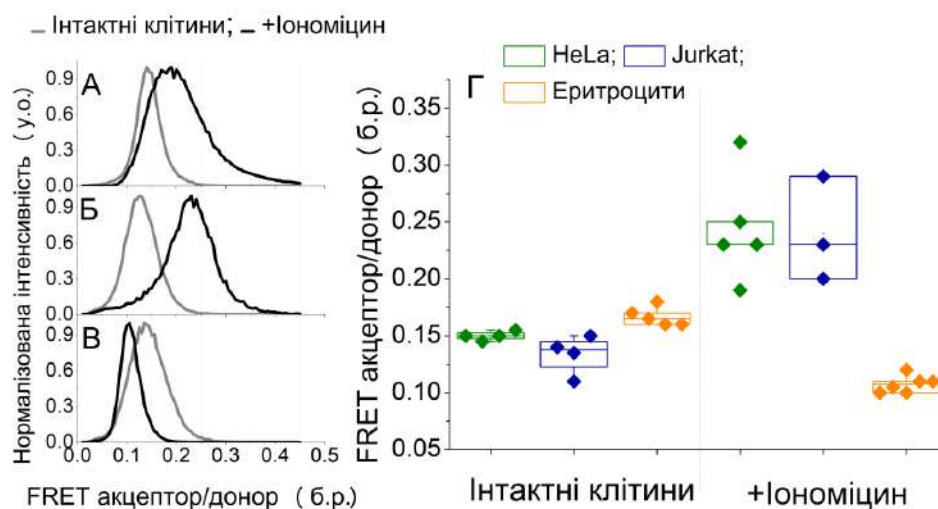


Рис. 3.34. Ратіометрична відповідь FRET-сенсорної системи на базі барвників F2N12SM та bNR10S в клітинах HeLa (A), Jurkat (B) та еритроцитах (C) на зміну структурних властивостей порядку ліпідів зовнішнього моношару плазматичної мембрани внаслідок запрограмованої загибелі клітин. (D) Кількісний аналіз даних співвідношення інтенсивностей флуоресценції акцептора/донора F2N12SM-bNR10S на основі даних мікроскопії ( $n_{\text{клітин/група}} > 16$ ).

\*  $P < 0.05$  тест ANOVA; \*\*  $P < 0.005$  тест ANOVA; \*\*\*  $P < 0.0005$  тест ANOVA

Щоб підтвердити зміну структурно-механічних властивостей мембран клітин за апоптозу та ериптозу, була досліджена проникність плазматичної мембрани за допомогою карбонових точок. Клітини до та після індукції запрограмованої загибелі інкубувалися із блакитними карбоновими точками впродовж 30 хвилин, після чого відмивалися в буфері кілька разів та записувалися спектри флуоресценції. Оскільки карбонові точки є гідрофільними, тільки ті, що проникли до цитоплазми залишаються після відмивання, а їх флуоресценція є ознакою проникності плазматичної мембрани. Очікувано, що клітини HeLa мають вищу інтенсивність флуоресценції після індукції апоптозу (рис.3.35), в той час як еритроцити за ериптозу мають значення подібні до інтактних клітин.

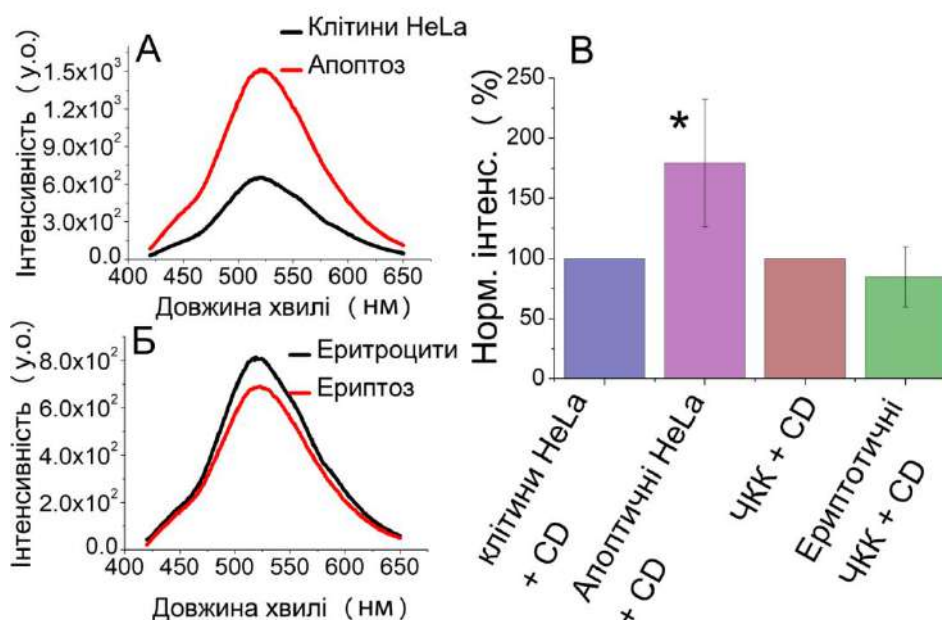


Рис. 3.35. вивчення проникності плазматичної мембрани інтактних та тих, що зазнали запрограмованої загибелі, клітин HeLa та еритроцитів за допомогою синіх карбонових точок. Спектри флуоресценції інтактних та інкубованих з іономіцином клітин HeLa (А) та еритроцитів (Б) забарвлених за допомогою карбонових точок. (В) Кількісний аналіз представлений як нормалізований сигнал флуоресценції карбонових точок, нормований до контрольної групи без індукції ± СВ (n = 3).

Враховуючи отримані результати, цілком логічним рішенням для подальших досліджень та підтвердження отриманих даних є вивчення впливу індукції ериптозу на швидкість кислотного гемолізу. Раніше було показано, що плазматична мембрана еритроцитів різного складу від різних тварин, може відмінно реагувати на гемоліз (Montes et al., 2008). Саме тому очікувано припустити, що порушення асиметрії плазматичної мембрани та зміна інтегральних властивостей за рахунок втрати об'єму клітиною при сталій площі поверхні вплине на швидкість гемолізу. Для вирішення поставленої задачі ми користувалися методом кислотних еритрограм, що був розроблений раніше (Терсков & Гительзон, 1957).

Подібно до попередніх даних та інших структурно-функціональних властивостей, індукція ериптозу призводить до ущільнення супрамолекулярної організації плазматичної мембрани, яке призводить до зниження максимальної швидкості кислотного гемолізу еритроцитів (рис. 3.36).

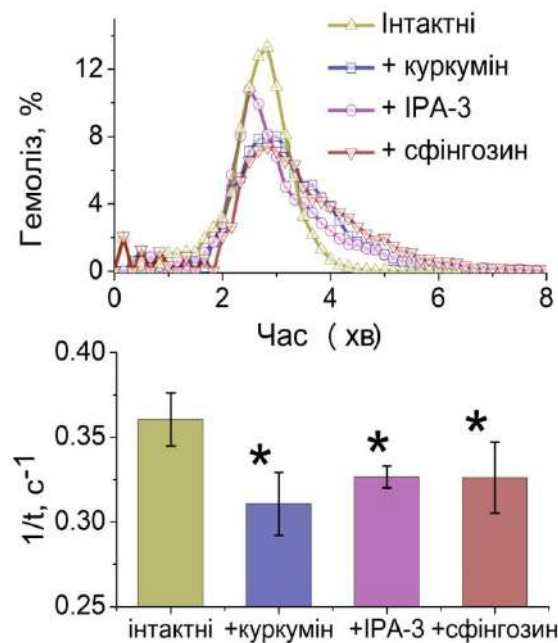


Рис. 3.36. Кислотні еритрограми інтактних клітин та за індукції ериптозу сфінгозином, куркуміном та IPA-3. (А) Гістограма розподілу гемолізу в часі. (Б) Кількісний аналіз максимальної швидкості гемолізу ( $n_{\text{клітин/група}} > 4$ ).

\*  $P < 0.05$  ANOVA

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

В результаті проведених досліджень виявлено суттєву різницю в структурі та динаміці ліпідів плазматичної мембрани та механізмах їх біохімічної регуляції за апоптозу та ериптозу.

Дослідження на клітинах HeLa показали, що за апоптозу, індукованого ІРА-3 та камптотецином, зміна гідратованості/полярності плазматичної мембрани відповідає таким, що спостерігаються після зменшення ліпідного порядку, індукованого зниженням холестеролу, збагаченням 7-кетохолестеролом або гідролізом сфінгомієліну, тоді як більш високий вміст холестеролу збільшує ліпідний порядок. На зміну властивостей мембрани також може впливати інгібітор каспази-3 Z-DEVD-FMK, залишаючи їх на рівні, подібному до інтактних клітин. Дані протокової цитометрії вказують на те, що порядок ліпідів плазматичної мембрани за індукції апоптозу камптотецином корелює із активністю каспази-3 та динамікою PS протягом всього часового діапазону (0-24 год).

Вперше продемонстрований зв'язок між сигнальним шляхом, пов'язаним із каспазою-3, та втратою порядку ліпідів у клітинних плазматичних мембранах на ранніх етапах запрограмованої загибелі клітин. Більш того, в плазматичній мембрані апоптотичних клітин PS-експозиція виявляється одночасно або пізніше, ніж загальні зміни трансмембранної асиметрії ліпідів.

Результати цієї роботи вперше продемонстрували, що, незважаючи на візуальну схожість запрограмованої загибелі ядерних клітин та еритроцитів, яскрава різниця може бути виявлена на рівні їхніх мембран. Ми показали, що включення клітин Jurkat в процес апоптозу викликає реорганізацію ліпідів, що призводить не тільки до втрати трансмембранної ліпідної асиметрії, але й до різкого зниження впорядкованості плазматичної мембрани. Відомо також, що як у клітинах еритроцитів, так і лінії Jurkat спостерігається PS-експонування на клітинну поверхню (Bao & Ju, 2009; Orrenius & Nicotera, 1994), і наші результати підтверджують цю спільну ознаку.

Окрім того, вперше була продемонстрована зміна асиметрії PE в плазматичній мембрані клітин за апоптозу та ериптозу. Було показано, що в клітинах Jurkat та еритроцитах відбувається збільшення вмісту PE в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за запрограмованої загибелі. Цей феномен не тільки може мати значення для подальшого вивчення зміни властивостей мембранних протеїнів (Bogdanov, et al., 2014; Bogdanov, Xie, Neasock, & Dowhan, 2008), але й слугувати новим маркером клітинної загибелі.

Вперше була досліджена зміна локальних властивостей плазматичної мембрани під час її везикуляції за апоптозу та ериптозу. В усіх досліджених типах клітин (HeLa, Jurkat та еритроцитах) спостерігається присутність суттєво збільшеної концентрації рідинно-невпорядкованої фази в зовнішньому моношарі апоптотичних тілець та везикул порівняно з іншими ділянками плазматичної мембрани, більш впорядкованими на ранніх етапах запрограмованої загибелі.

Проте, на пізніх етапах досліджуваних процесів в еритроцитах зменшення порядку ліпідів є менш вираженим порівняно з ядерними клітинами, де до такої зміни залучаються обидва моношари плазматичної мембрани, що є свідченням відсутності значного перерозподілу ліпідів в червоних клітинах крові.

Пояснення цих відмінностей можна знайти в різних морфологіях еритроцитів у порівнянні з ядерними клітинами. Еритроцити не мають мережі внутрішньоклітинних мембран, яка може бути реорганізована під час апоптозу з можливим обміном ліпідних компонентів з плазматичною мембраною. Важливо, що мембрани, які входять до складу клітинних органел, мають значно нижчий рівень холестеролу, ніж плазматична мембрана (Mesmin & Maxfield, 2009; Van Meer, et al., 2008). Недавні дослідження чітко показали роль субклітинних мембранних структур у формуванні апоптотичних маркерів, в яких було показано, що глікопротеїни, одержані EP, з десіальованими глікотопами (Bilyu, et al., 2012), протеїн мембрани лізосом LAMP-1 (Mirnikjoo, Balasubramanian, & Schroit, 2009) або кардіоліпін мітохондріального походження (Manganelli et al., 2015), можна знайти в плазматичній мембрані

макрофагів або фібробластів під час апоптозу. Наші спостереження відповідають цим результатам, показуючи різні типи везикул (апоптотичних тілець) в клітинах Jurkat і HeLa, що свідчить про їхнє різне походження - утворення з різних мембранних структур клітин.

Крім того, на розподіл холестеролу може впливати блокування його неvesicularного транспортування до плазматичної мембрани (Iaea, Mao, Lund, & Maxfield, 2017), оскільки вміст холестеролу у плазматичній мембрані може падати при пасивному (фізичному) обміні з внутрішніми мембранами, таким чином забезпечуючи різкі зміни ліпідного порядку. Ми очікуємо, що везикуляція, котра включає як плазматичну мембрану, так і внутрішні мембрани, може прискорити обмін ліпідів. На відміну від ядерних клітин, в еритроцитах неможливо істотно змінити ліпідний склад за ериптозу через відсутність внутрішньоклітинних мембран. Тим не менше, деякі зміни латеральної організації та морфології плазматичної мембрани за ериптозу можуть сприяти зниженню ліпідного упорядкування в везикулах. Вплив кривизни мембран на ліпідне упорядкування і навпаки було описано раніше в моделюванні молекулярної динаміки (S. Yesylevskyu, et al., 2013; S. O. Yesylevskyu, Rivel, & Ramseyer, 2017) та модельних експериментах (Chiantia, et al., 2012).

Подальші дослідження вперше показали зміну структурно-механічних властивостей плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу. На відміну від клітин Jurkat та HeLa, де за апоптозу зменшується щільність пакування ліпідів (в особливості в ділянках утворення апоптотичних тілець), еритроцити ущільнюють організацію ліпідів в мембрані. На підтвердження цього еритроцити мають подібну або меншу проникність плазматичної мембрани для наночасточок у порівнянні із клітинами HeLa, які починають їх накопичувати більш активно. На додачу, еритроцити за ериптозу стають більш стійкими до кислотного гемолізу, що є додатковим свідченням зміцнення структурно-механічних властивостей їх плазматичної мембрани.

Такі структурно-функціональні властивості еритроцитів мають біологічне значення для сприяння максимальному захисту організму від токсичних продуктів розпаду гему. Маючи підвищену інтегральну стабільність мембрани, еритроцити можуть циркулювати судинами до того, як фагоцитуючі клітини (наприклад, клітини Купфера) їх елімінують. Однак, варто зауважити, що за системних порушень в організмі баланс між нормоцитами та еритроцитами може бути зміненим в бік останніх (Bester, Buys, Lipinski, Kell, & Pretorius, 2013; Johansson, et al., 2014; Nicolay, Gatz, Liebig, Gulbins, & Lang, 2007; Polak-Jonkisz, et al., 2013). Збільшення вмісту менш пластичних еритроцитів в кров'яному руслі призведе до блокування судин, в першу чергу, артеріол та венул. Таким чином, ці спостереження мають значення не тільки для розуміння взаємозв'язку біохімічних та біофізичних властивостей мембран, але й для подальшого застосування цих знань в фармакології, медицині та адресній доставці препаратів крізь мембрану клітин.

Окрім того, був розроблений та вперше застосований інструментарій, що дозволяє вивчати зміну біохімічних та біофізичних властивостей мембран, зокрема: застосування TNBS в протоковій цитометрії для вивчення асиметрії PE, розробка та застосування FRET-системи для дослідження структурно-механічних властивостей ліпідних фаз зовнішнього моношару мембран, застосування гасія флуоресценції та сольватохромних барвників для вивчення везикуляції плазматичної мембрани за запрограмованої загибелі та застосування карбонових точок для вивчення проникності плазматичної мембрани.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, відповідно до поставленої мети та завдань, вирішені наукові задачі щодо вивчення структурно-функціональних властивостей плазматичної мембрани за апоптозу та ериптозу і доведено суттєву різницю між процесами, що спостерігаються в ядерних клітинах та еритроцитах. Будучи обмеженими лише однією мембранною структурою, що призводить до низької динаміки ліпідів, еритроцити зберігають відносно високий вміст Lo-подібної фази за запрограмованої загибелі клітин.

1. Розроблені та вперше застосовані методи для вивчення зміни біохімічних та біофізичних властивостей мембран, зокрема: а) комбінація барвників тринітробензенсульфогової кислоти та флуоресцентно-міченого Анексином 5 у протоковій цитометрії для одночасного визначення асиметрії фосфатидилетаноламіну та фосфатидилсерину; б) аналітична FRET-система із нових мембранних зондів для дослідження структурно-механічних властивостей ліпідних фаз зовнішнього моношару мембран; в) адаптовані підходи із використанням гасія флуоресценції та сольватохромних барвників для вивчення везикуляції плазматичної мембрани; г) застосування карбонових точок для дослідження проникності плазматичної мембрани за запрограмованої загибелі.

2. Вміст впорядкованої ліпідної фази зовнішнього моношару плазматичної мембрани клітин HeLa за апоптозу відповідає значенням, що мають місце при зниженні вмісту холестеролу, збагаченні 7-кетохолестеролом або за гідролізу сфінгомієліну, тоді як підвищення вмісту холестеролу впорядковує ліпіди мембрани. Вперше показано, що зниження вмісту рідинно-впорядкованої фази у зовнішньому моношарі плазматичних мембран клітин HeLa відбувається в клітинах із активованою каспазою-3.

3. Вперше встановлено, що вміст фосфатидилсерину та фосфатидилетаноламіну збільшується в зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за апоптозу клітин Jurkat та ериптозу (із меншими значеннями динаміки фосфатидилетаноламіну для еритроцитів). Відповідно до даних



мікроскопії, на відміну від ядерних клітин Jurkat та HeLa, в еритроцитах не виявлено значного зниження вмісту рідинно-впорядкованої фази у зовнішньому моношарі плазматичної мембрани за ериптозу.

4. Вперше показано статистично достовірне підвищення вмісту рідинно-невпорядкованої фази в зовнішньому моношарі апоптотичних тілець клітин HeLa, Jurkat та еритроцитів порівняно з іншими ділянками плазматичної мембрани (більш впорядкованими на ранніх етапах запрограмованої загибелі).

5. Продемонстрована статистично достовірна різниця у вмісті холестеролу та рідинно-впорядкованої фази між мембранами органел та плазматичною мембраною в нативних клітинах HeLa та Jurkat. Відповідно до даних флуоресцентної мікроскопії, вперше показано, що після індукції апоптозу ця різниця стає статистично менш вираженою та охоплює обидва моношари всіх мембран ядерних клітин, але в еритроцитах не було виявлено таких змін.

6. Вперше встановлено, що еритроцити за клітинної загибелі мають статистично більшу щільність пакування ліпідів плазматичної мембрани порівняно з ядерними клітинами HeLa та Jurkat. Вперше показано, що еритроцити мають подібну або меншу проникність плазматичної мембрани для карбонових наночасточок за запрограмованої загибелі в порівнянні з клітинами HeLa. Вперше виявлено збільшення стійкості плазматичної мембрани до гемолізу за ериптозу у порівнянні з інтактними клітинами.

## ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

- Abed, M., Towhid, S. T., Mia, S., Pakladok, T., Alesutan, I., Borst, O., . . . Lang, F. (2012). Sphingomyelinase-induced adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 303(9), C991-C999.
- Albrecht, C., McVey, J. H., Elliott, J. I., Sardini, A., Kasza, I., Mumford, A. D., . . . Higgins, C. F. (2005). A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood*, 106(2), 542-549.
- Alder-Baerens, N., Müller, P., Pohl, A., Korte, T., Hamon, Y., Chimini, G., . . . Herrmann, A. (2005). Headgroup-specific exposure of phospholipids in ABCA1-expressing cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26321-26329.
- Angelova, M., & Dimitrov, D. S. (1988). A mechanism of liposome electroformation. In V. Degiorgio (Ed.), *Trends in Colloid and Interface Science II* (pp. 59-67). Darmstadt: Steinkopff.
- Angelova, M. I. (2007). Liposome Electroformation *Perspectives in Supramolecular Chemistry* (pp. 26-36): John Wiley & Sons, Ltd.
- Angelova, M. I., Soléau, S., Méléard, P., Faucon, F., & Bothorel, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. In C. Helm, M. Lösche & H. Möhwald (Eds.), *Trends in Colloid and Interface Science VI* (pp. 127-131). Darmstadt: Steinkopff.
- Axelsen, K. B., & Palmgren, M. G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *Journal of molecular evolution*, 46(1), 84-101.
- Bacia, K., Scherfeld, D., Kahya, N., & Schwille, P. (2004). Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. *Biophys. J.*, 87(2), 1034-1043.
- Bader, A. N., Hoetzl, S., Hofman, E. G., Voortman, J., Van Bergen En Henegouwen, P. M. P., Van Meer, G., & Gerritsen, H. C. (2011). Homo-FRET imaging as a tool to quantify protein and lipid clustering. *ChemPhysChem*, 12(3), 475-483.

- Balsinde, J., Bianco, I. D., Ackermann, E. J., Conde-Frieboes, K., & Dennis, E. A. (1995). Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8527-8531.
- Bamezai, A. (2008). Lipid rafts and signaling. *Immunol Endo and Met Agents in Med Chem*, 8.
- Bao, G.-Q., & Ju, A.-Z. (2009). Signal pathways of eryptosis-review. *Journal of experimental hematology*, 17(4), 1097-1100.
- Baumgart, T., Hunt, G., Farkas, E. R., Webb, W. W., & Feigenson, G. W. (2007). Fluorescence probe partitioning between L<sub>o</sub>/L<sub>d</sub> phases in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1768(9), 2182-2194.
- Bell, R., Ballas, L., & Coleman, R. (1981). Lipid topogenesis. *Journal of Lipid Research*, 22(3), 391-403.
- Bentzen, P. J., Lang, E., & Lang, F. (2007). Curcumin Induced Suicidal Erythrocyte Death. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 19(1-4), 153-164.
- Bester, J., Buys, A. V., Lipinski, B., Kell, D. B., & Pretorius, E. (2013). High ferritin levels have major effects on the morphology of erythrocytes in Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 5.
- Bevers, E. M., Comfurius, P., Dekkers, D. W., & Zwaal, R. F. (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1439(3), 317-330.
- Bilyy, R. O., Shkandina, T., Tomin, A., Muñoz, L. E., Franz, S., Antonyuk, V., . . . Herrmann, M. (2012). Macrophages discriminate glycosylation Patterns of apoptotic cell-derived microparticles. *Journal of Biological Chemistry*, 287(1), 496-503.
- Boesen-de Cock, J. G. R., Tepper, A. D., de Vries, E., van Blitterswijk, W. J., & Borst, J. (1999). Common Regulation of Apoptosis Signaling Induced by CD95 and the DNA-damaging Stimuli Etoposide and  $\gamma$ -Radiation Downstream from Caspase-8 Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 14255-14261.

- Bogdanov, M., & Dowhan, W. (1999). Lipid-assisted protein folding. *Journal of Biological Chemistry*, 274(52), 36827-36830.
- Bogdanov, M., Dowhan, W., & Vitrac, H. (2014). Lipids and topological rules governing membrane protein assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1475-1488.
- Bogdanov, M., Xie, J., Heacock, P., & Dowhan, W. (2008). To flip or not to flip: lipid-protein charge interactions are a determinant of final membrane protein topology. *The Journal of cell biology*, 182(5), 925-935.
- Boxer, S. G., Kraft, M. L., & Weber, P. K. (2009). Advances in imaging secondary ion mass spectrometry for biological samples. *Annual Review of Biophysics*, 38(1), 53-74.
- Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A., & Henson, P. M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26159-26165.
- Brenner, B., Ferlinz, K., Grassme, H., Weller, M., Koppenhoefer, U., Dichgans, J., . . . Gulbins, E. (1998). Fas/CD95/Apo-I activates the acidic sphingomyelinase via caspases. *Cell death and differentiation*, 5(1), 29-37.
- Brown, D. A., & London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid-and cholesterol-rich membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17221-17224.
- Brown, R. E. (1998). Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *Journal of Cell Science*, 111(1), 1-9.
- Brown, W. J., Chambers, K., & Doody, A. (2003). Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic*, 4(4), 214-221.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., & Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and developmental biology*, 15(1), 269-290.

- Chaabane, W., User, S., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., & Łos, M. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: Interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *61*(1), 43-58.
- Chang, C.-L., & Liou, J. (2016). Homeostatic regulation of the PI (4, 5) P<sub>2</sub>-Ca<sup>2+</sup> signaling system at ER-PM junctions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1861*(8), 862-873.
- Cherukuri, A., Dykstra, M., & Pierce, S. K. (2001). Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity*, *14*(6), 657-660.
- Chiang, S. H., Chang, L., & Saltiel, A. R. (2006). TC10 and Insulin-Stimulated Glucose Transport. *Methods in enzymology*, *406*, 701-714.
- Chiantia, S., Klymchenko, A. S., & London, E. (2012). A novel leaflet-selective fluorescence labeling technique reveals differences between inner and outer leaflets at high bilayer curvature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1818*(5), 1284-1290.
- Choi, J.-Y., Wu, W.-I., & Voelker, D. R. (2005). Phosphatidylserine decarboxylases as genetic and biochemical tools for studying phospholipid traffic. *Analytical Biochemistry*, *347*(2), 165-175.
- Cosulich, S. C., Horiuchi, H., Zerial, M., Clarke, P. R., & Woodman, P. G. (1997). Cleavage of rabaptin-5 blocks endosome fusion during apoptosis. *The EMBO Journal*, *16*(20), 6182-6191. doi: 10.1093/emboj/16.20.6182
- Cremesti, A. E., Goni, F. M., & Kolesnick, R. (2002). Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS letters*, *531*(1), 47-53.
- Croft, D. R., Coleman, M. L., Li, S., Robertson, D., Sullivan, T., Stewart, C. L., & Olson, M. F. (2005). Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *The Journal of cell biology*, *168*(2), 245-255.
- Daak, A., Ghebremeskel, K., Elbashir, M., Bakhita, A., Hassan, Z., & Crawford, M. (2011). Hydroxyurea therapy mobilises arachidonic acid from inner cell membrane

- aminophospholipids in patients with homozygous sickle cell disease. *Journal of lipids*, 2011.
- Daleke, D. L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *Journal of Lipid Research*, 44(2), 233-242. doi: 10.1194/jlr.R200019-JLR200
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- Darwich, Z., Klymchenko, A. S., Dujardin, D., & Mély, Y. (2014). Imaging lipid order changes in endosome membranes of live cells by using a Nile Red-based membrane probe. *RSC Advances*, 4(17), 8481-8488.
- Darwich, Z., Klymchenko, A. S., Kucherak, O. A., Richert, L., & Mély, Y. (2012). Detection of apoptosis through the lipid order of the outer plasma membrane leaflet. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(12), 3048-3054.
- Das, S., Castillo, C., & Stevens, T. (2001). Phospholipid remodeling/generation in *Giardia*: the role of the Lands cycle. *Trends in parasitology*, 17(7), 316-319.
- Daum, G. (1985). Lipids of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 822(1), 1-42.
- De Figueiredo, P., Drecktrah, D., Katzenellenbogen, J. A., Strang, M., & Brown, W. J. (1998). Evidence that phospholipase A2 activity is required for Golgi complex and trans Golgi network membrane tubulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 8642-8647.
- de Figueiredo, P., Polizotto, R. S., Drecktrah, D., & Brown, W. J. (1999). Membrane tubule-mediated reassembly and maintenance of the Golgi complex is disrupted by phospholipase A2 antagonists. *Molecular Biology of the Cell*, 10(6), 1763-1782.
- de Graaf, A. O., van den Heuvel, L. P., Dijkman, H. B. P. M., De Abreu, R. A., Birkenkamp, K. U., de Witte, T., . . . Jansen, J. H. (2004). Bcl-2 prevents loss of mitochondria in CCCP-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*, 299(2), 533-540. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.06.024

- De Rosa, M. F., Sillence, D., Ackerley, C., & Lingwood, C. (2004). Role of multiple drug resistance protein 1 in neutral but not acidic glycosphingolipid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7867-7876.
- Dekaliuk, M., Pyrshev, K., & Demchenko, A. (2015). Visualization and detection of live and apoptotic cells with fluorescent carbon nanoparticles. *Journal of nanobiotechnology*, 13(1), 86. doi: 10.1186/s12951-015-0148-7
- Demchenko, A. (2012). Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology*, 1-16. doi: 10.1007/s10616-012-9481-y
- Di Paolo, G., & De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443(7112), 651.
- Dietrich, C., Bagatolli, L., Volovyk, Z., Thompson, N., Levi, M., Jacobson, K., & Gratton, E. (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical journal*, 80(3), 1417-1428.
- Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., . . . Hell, S. W. (2009). Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature*, 457(7233), 1159-1162.
- Elliott, J. I., Surprenant, A., Marelli-Berg, F. M., Cooper, J. C., Cassady-Cain, R. L., Wooding, C., Higgins, C. F. (2005). Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nature cell biology*, 7(8), 808.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337
- Emoto, K., Kobayashi, T., Yamaji, A., Aizawa, H., Yahara, I., Inoue, K., & Umeda, M. (1996). Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(23), 12867-12872.
- Emoto, K., & Umeda, M. (2000). An essential role for a membrane lipid in cytokinesis: regulation of contractile ring disassembly by redistribution of phosphatidylethanolamine. *The Journal of cell biology*, 149(6), 1215-1224.

- Fadok, V., Voelker, D., Campbell, P., Cohen, J., Bratton, D., & Henson, P. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*, *148*(7), 2207-2216.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (2001). Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *Journal of Clinical Investigation*, *108*(7), 957-962.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. B., & Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, *405*(6782), 85.
- Fantini, J., Garmy, N., Mahfoud, R., & Yahi, N. (2002). Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *4*(27), 1-22.
- Fecchi, K., Volonte, D., Hezel, M. P., Schmeck, K., & Galbiati, F. (2006). Spatial and temporal regulation of GLUT4 translocation by flotillin-1 and caveolin-3 in skeletal muscle cells. *The FASEB Journal*, *20*(6), 705-707.
- Fidorra, M., Duelund, L., Leidy, C., Simonsen, A. C., & Bagatolli, L. A. (2006). Absence of Fluid-Ordered/Fluid-Disordered Phase Coexistence in Ceramide/POPC Mixtures Containing Cholesterol. *Biophysical journal*, *90*(12), 4437-4451.
- Föller, M., Braun, M., Qadri, S. M., Lang, E., Mahmud, H., & Lang, F. (2010). Temperature sensitivity of suicidal erythrocyte death. *European Journal of Clinical Investigation*, *40*(6), 534-540. doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02296.x
- Föller, M., Huber, S. M., & Lang, F. (2008). Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*, *60*(10), 661-668. doi: 10.1002/iub.106
- Futerman, A. H., & Riezman, H. (2005). The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends in Cell Biology*, *15*(6), 312-318.
- Gadella, B., & Harrison, R. (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of reproduction*, *67*(1), 340-350.



- Gajate, C., & Mollinedo, F. (2015). Lipid rafts and raft-mediated supramolecular entities in the regulation of CD95 death receptor apoptotic signaling. [journal article]. *Apoptosis*, 20(5), 584-606. doi: 10.1007/s10495-015-1104-6
- Gaus, K., Gratton, E., Kable, E. P. W., Jones, A. S., Gelissen, I., Kritharides, L., & Jessup, W. (2003). Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15554-15559. doi: 10.1073/pnas.2534386100
- Ghashghaieinia, M., Cluitmans, J. C. A., Akel, A., Dreischer, P., Toulany, M., Köberle, M., . . . Bosman, G. J. C. G. M. (2012). The impact of erythrocyte age on eryptosis. *British Journal of Haematology*, 157(5), 606-614. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09100.x
- Gil-Parrado, S., Fernández-Montalván, A., Assfalg-Machleidt, I., Popp, O., Bestvater, F., Holloschi, A., . . . Reed, J. C. (2002). Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis A probable role for Bcl-2 family members. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 27217-27226.
- Goksu, E. I., Vanegas, J. M., Blanchette, C. D., Lin, W. C., & Longo, M. L. (2009). AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1788(1), 254-266.
- Gorbatyuk, V. Y., Nosworthy, N. J., Robson, S. A., Bains, N. P., Maciejewski, M. W., Dos Remedios, C. G., & King, G. F. (2006). Mapping the phosphoinositide-binding site on chick cofilin explains how PIP2 regulates the cofilin-actin interaction. *Molecular cell*, 24(4), 511-522.
- Goswami, D., Gowrishankar, K., Bilgrami, S., Ghosh, S., Raghupathy, R., Chadda, R., . . . Mayor, S. (2008). Nanoclusters of GPI-Anchored Proteins Are Formed by Cortical Actin-Driven Activity. *Cell*, 135(6), 1085-1097.
- Graham, T. R. (2004). Flippases and vesicle-mediated protein transport. *Trends in Cell Biology*, 14(12), 670-677.
- Green, D., & Kroemer, G. (1998). The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends in Cell Biology*, 8(7), 267-271.

- Green, D. R. (2000). Apoptosis and sphingomyelin hydrolysis: The flip side. *The Journal of Cell Biology*, 150(1), F5-F8. doi: 10.1083/jcb.150.1.F5
- Gulbins, E., Dreschers, S., Wilker, B., & Grassmé, H. (2004). Ceramide, membrane rafts and infections. *Journal of Molecular Medicine*, 82(6), 357-363.
- Gulbins, E., Jekle, A., Ferlinz, K., Grassmé, H., & Lang, F. (2000). Physiology of apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279, F605–F615.
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. [journal article]. *Cell and Tissue Research*, 301(1), 5-17. doi: 10.1007/s004410000193
- Hamon, Y., Broccardo, C., Chambenoit, O., Luciani, M.-F., Toti, F., Chaslin, S., . . . Marguet, D. (2000). ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nature cell biology*, 2(7), 399.
- Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., & Nishijima, M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature*, 426(6968), 803.
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (2002). Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*, 417(6885), 182.
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M., Uchiyama, Y., & Nagata, S. (2004). Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science*, 304(5674), 1147-1150.
- Hanshaw, R. G., & Smith, B. D. (2005). New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(17), 5035-5042.
- Hao, M., Lin, S. X., Karylowski, O. J., Wüstner, D., McGraw, T. E., & Maxfield, F. R. (2002). Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 609-617.
- Hao, M., Mukherjee, S., & Maxfield, F. R. (2001). Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 13072-13077.

- Henneberry, A. L., Wright, M. M., & McMaster, C. R. (2002). The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(9), 3148-3161.
- Hiltbold, E. M., Poloso, N. J., & Roche, P. A. (2003). MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J Immunol*, *170*.
- Hishikawa, D., Shindou, H., Kobayashi, S., Nakanishi, H., Taguchi, R., & Shimizu, T. (2008). Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(8), 2830-2835.
- Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., & Cullis, P. R. (1985). Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *812*(1), 55-65.
- Hsiang, Y.-H., Hertzberg, R., Hecht, S., & Liu, L. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(27), 14873-14878.
- Hua, Z., Fatheddin, P., & Graham, T. R. (2002). An essential subfamily of Drs2p-related P-type ATPases is required for protein trafficking between Golgi complex and endosomal/vacuolar system. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(9), 3162-3177.
- Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J. F., & Holthuis, J. C. (2004). Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *The EMBO Journal*, *23*(1), 33-44.
- Iaea, D. B., Mao, S., Lund, F. W., & Maxfield, F. R. (2017). Role of STARD4 in sterol transport between the endocytic recycling compartment and the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell*, *28*(8), 1111-1122.
- Ikeda, M., Kihara, A., & Igarashi, Y. (2006). Lipid Asymmetry of the Eukaryotic Plasma Membrane: Functions and Related Enzymes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *29*(8), 1542-1546.

- Infante, R. E., & Radhakrishnan, A. (2017). Continuous transport of a small fraction of plasma membrane cholesterol to endoplasmic reticulum regulates total cellular cholesterol. *eLife*, 6, e25466.
- Inoue, M., Chiang, S.-H., Chang, L., Chen, X.-W., & Saltiel, A. R. (2006). Compartmentalization of the exocyst complex in lipid rafts controls Glut4 vesicle tethering. *Molecular Biology of the Cell*, 17(5), 2303-2311.
- Israelachvili, J., Marčelja, S., & Horn, R. G. (1980). Physical principles of membrane organization. *Quarterly reviews of biophysics*, 13(2), 121-200.
- Iwamoto, K., Kobayashi, S., Fukuda, R., Umeda, M., Kobayashi, T., & Ohta, A. (2004). Local exposure of phosphatidylethanolamine on the yeast plasma membrane is implicated in cell polarity. *Genes to Cells*, 9(10), 891-903.
- Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I., & Kabouridis, P. S. (2000). The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol*, 12.
- Jarroll, E. L., Muller, P. J., Meyer, E. A., & Morse, S. A. (1981). Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. *Molecular and biochemical parasitology*, 2(3-4), 187-196.
- Jin, L., Millard, A. C., Wuskell, J. P., Dong, X., Wu, D., Clark, H. A., & Loew, L. M. (2006). Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains. *Biophysical journal*, 90(7), 2563-2575.
- Johansson, E., Westermarck, T., Ek, P., & Atroshi, F. (2014). Metabolism Changes as Indicated by the Erythrocytes of Patients with Alzheimer's Disease *Pharmacology and Nutritional Intervention in the Treatment of Disease*: InTech.
- Jordan, L. B., & Harrison, D. J. (2003). Apoptosis and cell senescence. In J. Crocker & P. G. Murray (Eds.), *Molecular Biology in Cellular Pathology* (2 ed., pp. 153-192): John Wiley & Sons.
- Jurkiewicz, P., Sýkora, J., Olzyńska, A., Humpolíčková, J., & Hof, M. (2005). Solvent relaxation in phospholipid bilayers: Principles and recent applications. *J. Fluoresc.*, 15(6), 883-894.

- Kahya, N., Scherfeld, D., Bacia, K., Poolman, B., & Schwille, P. (2003). Probing Lipid Mobility of Raft-exhibiting Model Membranes by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 28109-28115.
- Kane, A. B., Young, E. E., Schanne, F. A., & Farber, J. L. (1980). Calcium dependence of phalloidin-induced liver cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(2), 1177-1180.
- Kay, J. G., & Grinstein, S. (2011). Sensing phosphatidylserine in cellular membranes. *Sensors*, 11(2), 1744-1755.
- Kay, J. G., Koivusalo, M., Ma, X., Wohland, T., & Grinstein, S. (2012). Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Molecular Biology of the Cell*, 23(11), 2198-2212.
- Kempe, D., Akel, A., Lang, P., Hermle, T., Biswas, R., Muresanu, J., . . . Lang, F. (2007). Suicidal erythrocyte death in sepsis. *Journal of Molecular Medicine*, 85(3), 273-281.
- Kenworthy, A. K., Petranova, N., & Edidin, M. (2000). High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI- anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol. Biol. Cell*, 11(5), 1645-1655.
- Kiessling, V., Wan, C., & Tamm, L. K. (2009). Domain coupling in asymmetric lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(1), 64-71.
- Kihara, A., & Igarashi, Y. (2004). Cross talk between sphingolipids and glycerophospholipids in the establishment of plasma membrane asymmetry. *Molecular Biology of the Cell*, 15(11), 4949-4959.
- Kilin, V., Glushonkov, O., Herdly, L., Klymchenko, A., Richert, L., & Mely, Y. (2015). Fluorescence Lifetime Imaging of Membrane Lipid Order with a Ratiometric Fluorescent Probe. *Biophysical journal*, 108(10), 2521-2531.
- Kim, H. M., Choo, H. J., Jung, S. Y., Ko, Y. G., Park, W. H., Jeon, S. J., Cho, B. R. (2007). A two-photon fluorescent probe for lipid raft imaging: C-laurdan. *ChemBioChem*, 8(5), 553-559.

- 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.
- Klymchenko, A. S. (2017). Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Accounts of Chemical Research*.
- Klymchenko, A. S., & Kreder, R. (2014). Fluorescent Probes for Lipid Rafts: From Model Membranes to Living Cells. *Chemistry & Biology*, *21*(1), 97-113.
- Klymchenko, A. S., Oncul, S., Didier, P., Schaub, E., Bagatolli, L., Duportail, G., & Mély, Y. (2009). Visualization of lipid domains in giant unilamellar vesicles using an environment-sensitive membrane probe based on 3-hydroxyflavone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1788*(2), 495-499.
- Kobayashi, T., Beuchat, M.-H., Chevallier, J., Makino, A., Mayran, N., Lebrand, C., Gruenberg, J. (2002). Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(35), 32157-32164.
- Köhler, C., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2002). Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *Journal of immunological methods*, *265*(1-2), 97-110.
- Kolesnick, R. (2002). The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *The Journal of clinical investigation*, *110*(1), 3-8.
- Kolter, T., & Sandhoff, K. (2005). Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *21*, 81-103.
- Kreder, R., Oncul, S., Kucherak, O. A., Pyrshev, K. A., Real, E., Mely, Y., & Klymchenko, A. S. (2015). Blue fluorogenic probes for cell plasma membranes fill the gap in multicolour imaging. *RSC Advances*, *5*(29), 22899-22905.
- Kreder, R., Pyrshev, K. A., Darwich, Z., Kucherak, O. A., Mély, Y., & Klymchenko, A. S. (2015). Solvatochromic Nile Red probes with FRET quencher reveal lipid order heterogeneity in living and apoptotic cells. *ACS Chemical Biology*, *10*(6), 1435-1442.

- Kucherak, O. A., Oncul, S., Darwich, Z., Yushchenko, D. A., Arntz, Y., Didier, P., . . . Klymchenko, A. S. (2010). Switchable Nile Red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes. *Journal of American Chemical Society*, *132*(13), 4907-4916.
- Kucherak, O. A., Richert, L., Mély, Y., & Klymchenko, A. S. (2012). Dipolar 3-methoxychromones as bright and highly solvatochromic fluorescent dyes. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *14*(7), 2292-2300.
- Kuypers, F., Lewis, R., Hua, M., Schott, M., Discher, D., Ernst, J., & Lubin, B. (1996). Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood*, *87*(3), 1179-1187.
- Laakko, T., King, L., & Fraker, P. (2002). Versatility of merocyanine 540 for the flow cytometric detection of apoptosis in human and murine cells. *Journal of immunological methods*, *261*(1), 129-139.
- Lands, W. E. (1958). Metabolism of glycerolipides; a comparison of lecithin and triglyceride synthesis. *J Biol Chem*, *231*(2), 883-888.
- Lands, W. E. (2000). Stories about acyl chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1483*(1), 1-14.
- Lane, J. D., Allan, V. J., & Woodman, P. G. (2005). Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells. *Journal of Cell Science*, *118*(17), 4059-4071.
- Lang, E., Qadri, S. M., & Lang, F. (2012). Killing me softly – Suicidal erythrocyte death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *44*(8), 1236-1243.
- Lang, F., Gulbins, E., Lang, P. A., Zappulla, D., & Föllner, M. (2010). Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *26*(1), 21-28.
- Lang, F., & Qadri, S. M. (2012). Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purification*, *33*(1-3), 125-130.

- Lang, K. S., Lang, P. A., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S. M., & Lang, F. (2005). Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*, *15*, 195-202.
- Lange, Y., Ye, J., & Steck, T. L. (2004). How cholesterol homeostasis is regulated by plasma membrane cholesterol in excess of phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(32), 11664-11667.
- Lasserre, R., Guo, X. J., Conchonaud, F., Hamon, Y., Hawchar, O., Bernard, A. M., . . . He, H. T. (2008). Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nat. Chem. Biol.*, *4*(9), 538-547.
- Lee, H. C., & Forte, J. G. (1979). Asymmetric labeling of amino lipids in liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *554*(2), 375-387.
- Lenne, P. F., Wawrezynieck, L., Conchonaud, F., Wurtz, O., Boned, A., Guo, X. J., Marguet, D. (2006). Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *EMBO J.*, *25*(14), 3245-3256.
- Levental, I., & Veatch, S. L. (2016). The Continuing Mystery of Lipid Rafts. *Journal of Molecular Biology*, *428*(24), 4749-4764.
- Levitan, I., Christian, A. E., Tulenko, T. N., & Rothblat, G. H. (2000). Membrane cholesterol content modulates activation of volume-regulated anion current in bovine endothelial cells. *The Journal of general physiology*, *115*(4), 405-416.
- Lewis, R. A., Shroyer, N. F., Singh, N., Allikmets, R., Hutchinson, A., Li, Y., . . . Dean, M. (1999). Genotype/phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease. *The American Journal of Human Genetics*, *64*(2), 422-434.
- Li, M. O., Sarkisian, M. R., Mehal, W. Z., Rakic, P., & Flavell, R. A. (2003). Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science*, *302*(5650), 1560-1563.
- Lim, K.-M., Kim, S., Noh, J.-Y., Kim, K., Jang, W.-H., Bae, O.-N., Chung, J.-H. (2010). Low-level mercury can enhance procoagulant activity of erythrocytes: a



- new contributing factor for mercury-related thrombotic disease. *Environmental health perspectives*, 118(7), 928-935.
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961), 46-50.
- Loura, L. M. S., & Prieto, M. (2011). FRET in membrane biophysics: An overview. *Front. Physiol.*, 2 NOV, art. no. 82.
- Lozano, M. M., Liu, Z., Sunnick, E., Janshoff, A., Kumar, K., & Boxer, S. G. (2013). Colocalization of the ganglioside GM1 and cholesterol detected by secondary ion mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, 135(15), 5620-5630.
- Lu, S. J., Feng, Q., Park, J. S., Vida, L., Lee, B. S., Strausbauch, M., . . . Lanza, R. (2008). Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood*, 112(12), 4475-4484.
- Luo, C., Wang, K., Liu, D., Li, Y., & Zhao, Q. (2008). The Functional Roles of Lipid Rafts in T Cell Activation, Immune Diseases and HIV Infection and Prevention. *Cell Mol Immunol*, 5(1), 1-7.
- Maellaro, E., Leoncini, S., Moretti, D., Del Bello, B., Tanganelli, I., De Felice, C., & Ciccoli, L. (2011). Erythrocyte caspase-3 activation and oxidative imbalance in erythrocytes and in plasma of type 2 diabetic patients. *Acta Diabetologica*, 1-7.
- Mahmud, H., Föllner, M., & Lang, F. (2009). Arsenic-induced suicidal erythrocyte death. *Archives of Toxicology*, 83(2), 107-113. doi: 10.1007/s00204-008-0338-2
- Mandon, E. C., Ehses, I., Rother, J., van Echten, G., & Sandhoff, K. (1992). Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*, 267(16), 11144-11148.
- Manganelli, V., Capozzi, A., Recalchi, S., Signore, M., Mattei, V., Garofalo, T., . . . Sorice, M. (2015). Altered traffic of cardiolipin during apoptosis: exposure on the cell surface as a trigger for “antiphospholipid antibodies”. *Journal of immunology research*, 2015.
- Manno, S., Takakuwa, Y., & Mohandas, N. (2002). Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein

- interactions modulate membrane stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 1943-1948.
- Marino, G., & Kroemer, G. (2013). Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. *Cell Research*, 23(11), 1247-1248.
- Martinez, M. M., Reif, R. D., & Pappas, D. (2010). Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods*, 2(8), 996-1004.
- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Fauré, J., . . . Sadoul, R. (2004). Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science*, 303(5657), 531-534.
- Mesmin, B., & Maxfield, F. R. (2009). Intracellular sterol dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(7), 636-645.
- Michel, V., & Bakovic, M. (2007). Lipid rafts in health and disease. *Biology of the Cell*, 99(3), 129-140.
- Milhas, D., Clarke, C. J., & Hannun, Y. A. (2010). Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids. *FEBS letters*, 584(9), 1887-1894.
- Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J., & Pittman, R. N. (1998). Apoptotic Membrane Blebbing Is Regulated by Myosin Light Chain Phosphorylation. *The Journal of cell biology*, 140(3), 627-636.
- Mirnikjoo, B., Balasubramanian, K., & Schroit, A. J. (2009). Suicidal membrane repair regulates phosphatidylserine externalization during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34), 22512-22516.
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939-3948.
- Montes, L.-R., López, D. J., Sot, J., Bagatolli, L. A., Stonehouse, M. J., Vasil, M. L., . . . Alonso, A. (2008). Ceramide-Enriched Membrane Domains in Red Blood Cells and the Mechanism of Sphingomyelinase-Induced Hot– Cold Hemolysis. *Biochemistry*, 47(43), 11222-11230.

- Moriyama, Y., & Nelson, N. (1988). Purification and properties of a vanadate- and N-ethylmaleimide-sensitive ATPase from chromaffin granule membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 263(17), 8521-8527.
- Morrot, G., Zachowski, A., & Devaux, P. F. (1990). Partial purification and characterization of the human erythrocyte Mg<sup>2+</sup>-ATPase A candidate aminophospholipid translocase. *FEBS letters*, 266(1-2), 29-32.
- Nagle, C. A., An, J., Shiota, M., Torres, T. P., Cline, G. W., Liu, Z.-X., Newgard, C. B. (2007). Hepatic overexpression of glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 in rats causes insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 282(20), 14807-14815.
- Nakajima, K.-i., Hirose, H., Taniguchi, M., Kurashina, H., Arasaki, K., Nagahama, M., Tagaya, M. (2004). Involvement of BNIP1 in apoptosis and endoplasmic reticulum membrane fusion. *The EMBO Journal*, 23(16), 3216-3226.
- Narula, J., & Strauss, H. W. (2003). P.S. I Love You: Implications of phosphatidylserine (PS) reversal in acute ischemic syndromes. *Journal of Nuclear Medicine*, 44(3), 397-399.
- Nguyen, D. B., Wagner-Britz, L., Maia, S., Steffen, P., Wagner, C., Kaestner, L., & Bernhardt, I. (2011). Regulation of Phosphatidylserine Exposure in Red Blood Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28(5), 847-856.
- Nicolay, J. P., Gatz, S., Liebig, G., Gulbins, E., & Lang, F. (2007). Amyloid Induced Suicidal Erythrocyte Death. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 19(1-4), 175-184.
- Niko, Y., Didier, P., Mely, Y., Konishi, G.-i., & Klymchenko, A. S. (2016). Bright and photostable push-pull pyrene dye visualizes lipid order variation between plasma and intracellular membranes. *Scientific Reports*, 6, 18870.
- Nishimura, S. Y., Vrljic, M., Klein, L. O., McConnell, H. M., & Moerner, W. (2006). Cholesterol depletion induces solid-like regions in the plasma membrane. *Biophysical journal*, 90(3), 927-938.
- Nomura, T., Takizawa, M., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., Wakisaka, E., Takio, K. (1998). Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-Gal: glucosylceramide

- $\beta$ -1, 4-galactosyltransferase from rat brain. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13570-13577.
- Oka, K., Sawamura, T., Kikuta, K.-i., Itokawa, S., Kume, N., Kita, T., & Masaki, T. (1998). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9535-9540.
- Oncul, S., Klymchenko, A. S., Kucherak, O. A., Demchenko, A. P., Martin, S., Dontenwill, M., Mély, Y. (2010). Liquid ordered phase in cell membranes evidenced by a hydration-sensitive probe: Effects of cholesterol depletion and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1798(7), 1436-1443.
- Ong, C. C., Jubb, A. M., Haverty, P. M., Zhou, W., Tran, V., Truong, T., Harris, A. L. (2011). Targeting p21-activated kinase 1 (PAK1) to induce apoptosis of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17), 7177-7182.
- Ong, C. C., Jubb, A. M., Haverty, P. M., Zhou, W., Tran, V., Truong, T., Hoeflich, K. P. (2011). Targeting p21-activated kinase 1 (PAK1) to induce apoptosis of tumor cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 108(17), 7177-7182.
- Opene, M., Kurantsin-Mills, J., Husain, S., & Ibe, B. O. (2014). Sickle erythrocytes and platelets augment lung leukotriene synthesis with downregulation of anti-inflammatory proteins: relevance in the pathology of the acute chest syndrome. *Pulmonary circulation*, 4(3), 482-495.
- Ormerod, M. G., & Hamelik, R. M. (2011). Flow cytometry in the study of proliferation and apoptosis. In A. Krishan, H. Krishnamurthy & S. Totey (Eds.), *Applications of Flow Cytometry in Stem Cell Research and Tissue Regeneration* (pp. 45-60): John Wiley & Sons.
- Orrenius, S., & Nicotera, P. (1994). The calcium ion and cell death. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 43, 1-11.
- Ortiz, L., Miguel, Guamán (2012). Chronicles of a Silent Death: Apoptosis. *Research in Cell Biology*, 1(1), 1-7.

- Owen, D. M., Magenau, A., Williamson, D., & Gaus, K. (2012). The lipid raft hypothesis revisited - new insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy. *BioEssays*, 34(9), 739-747.
- Owen, D. M., Rentero, C., Magenau, A., Abu-Siniyeh, A., & Gaus, K. (2012). Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. *Nature protocols*, 7(1), 24-35.
- Owen, D. M., Williamson, D. J., Magenau, A., & Gaus, K. (2012). Sub-resolution lipid domains exist in the plasma membrane and regulate protein diffusion and distribution. *Nature Communications*, 3, 1256.
- Pani, B., & Singh, B. B. (2009). Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell calcium*, 45.
- Parasassi, T., Krasnowska, E. K., Bagatolli, L., & Gratton, E. (1998). Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes. *J. Fluoresc.*, 8(4), 365-373.
- Pastorino, J. G., Chen, S.-T., Tafani, M., Snyder, J. W., & Farber, J. L. (1998). The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7770-7775.
- Pászty, K., Verma, A. K., Padányi, R., Filoteo, A. G., Penniston, J. T., & Enyedi, Á. (2002). Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase Isoform 4b Is Cleaved and Activated by Caspase-3 during the Early Phase of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 6822-6829.
- Patra, S. K. (2008). Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1785(2), 182-206.
- Pohl, J., Ring, A., Korkmaz, Ü., Eehalt, R., & Stremmel, W. (2005). FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in adipocytes requires plasma membrane rafts. *Molecular Biology of the Cell*, 16(1), 24-31.
- Polak-Jonkisz, D., Purzyc, L., Szcepańska, M., & Makulska, I. (2013). Erythrocyte caspase-3 levels in children with chronic kidney disease. *Clinical Biochemistry*, 46(3), 219-224.

- Pomorski, T., & Menon, A. (2006). Lipid flippases and their biological functions. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(24), 2908-2921.
- Pretorius, E., Swanepoel, A. C., Buys, A. V., Vermeulen, N., Duim, W., & Kell, D. B. (2014). Eryptosis as a marker of Parkinson's disease. *Aging (Albany NY)*, 6(10), 788.
- Pyrshchev, K. A., Yesylevskyy, S. O., Mély, Y., Demchenko, A. P., & Klymchenko, A. S. (2017). Caspase-3 activation decreases lipid order in the outer plasma membrane leaflet during apoptosis: A fluorescent probe study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1989(10), 2123-2132.
- Qadri, S. M., Bauer, J., Zelenak, C., Mahmud, H., Kucherenko, Y., Lee, S. H., Lang, F. (2011). Sphingosine but not Sphingosine-1-phosphate Stimulates Suicidal Erythrocyte Death. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28(2), 339-346.
- Rauch, M. C., Ocampo, M. E., Bohle, J., Amthauer, R., Yáñez, A. J., Rodríguez-Gil, J. E., Concha, I. I. (2006). Hexose transporters GLUT1 and GLUT3 are colocalized with hexokinase I in caveolae microdomains of rat spermatogenic cells. *Journal of cellular physiology*, 207(2), 397-406.
- Reinhold, S., Zimmerman, G., Prescott, S., & McIntyre, T. (1989). Phospholipid remodeling in human neutrophils. Parallel activation of a deacylation/reacylation cycle and platelet-activating factor synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 264(36), 21652-21659.
- Rentero, C., Zech, T., Quinn, C. M., Engelhardt, K., Williamson, D., Grewal, T., . . . Gaus, K. (2008). Functional implications of plasma membrane condensation for T cell activation. *PloS one*, 3(5), e2262.
- Rickers, A., Brockstedt, E., Mapara, M. Y., Otto, A., Dörken, B., & Bommert, K. (1998). Inhibition of CPP32 blocks surface IgM-mediated apoptosis and D4-GDI cleavage in human BL60 Burkitt lymphoma cells. *European journal of immunology*, 28(1), 296-304.
- Romanenko, V. G., Fang, Y., Byfield, F., Travis, A. J., Vandenberg, C. A., Rothblat, G. H., & Levitan, I. (2004). Cholesterol sensitivity and lipid raft targeting of Kir2.1 channels. *Biophysical journal*, 87(6), 3850-3861.

- Rudel, T., & Bokoch, G. M. (1997). Membrane and Morphological Changes in Apoptotic Cells Regulated by Caspase-Mediated Activation of PAK2. *Science*, 276(5318), 1571-1574. doi: 10.1126/science.276.5318.1571
- Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J.-C., . . . Denèfle, P. (1999). Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nature genetics*, 22(4), 352.
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799.
- Sankaram, M. B., & Thompson, T. E. (1990). Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry*, 29(47), 10670-10675.
- Schieffer, D., Naware, S., Bakun, W., & Bamezai, A. K. (2014). Lipid raft-based membrane order is important for antigen-specific clonal expansion of CD4+ T lymphocytes. *BMC Immunology*, 15(1), 58.
- Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J., & Breard, J. (2001a). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology*, 3(4), 346-352.
- Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J., & Breard, J. (2001b). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*, 3(4), 346-352.
- Seigneuret, M., & Devaux, P. F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(12), 3751-3755.
- Sengupta, P., Jovanovic-Talisman, T., Skoko, D., Renz, M., Veatch, S. L., & Lippincott-Schwartz, J. (2011). Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis. *Nat. Methods*, 8(11), 969-975.
- Shaw, A. S. (2006). Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nat Immunol*, 7.
- Shaw, J. E., Epand, R. F., Epand, R. M., Li, Z., Bittman, R., & Yip, C. M. (2006). Correlated fluorescence-atomic force microscopy of membrane domains: Structure of fluorescence probes determines lipid localization. *Biophys. J.*, 90(6), 2170-2178.

- Sheets, E. D., Holowka, D., & Baird, B. (1999). Membrane organization in immunoglobulin E receptor signaling. *Current opinion in chemical biology*, 3(1), 95-99.
- Sheps, J. A., Ralph, S., Zhao, Z., Baillie, D. L., & Ling, V. (2004). The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome biology*, 5(3), R15.
- Shynkar, V. V., Klymchenko, A. S., Kunzelmann, C., Duportail, G., Muller, C. D., Demchenko, A. P., . . . Mely, Y. (2007). Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis. *Journal of American Chemical Society*, 129(7), 2187-2193.
- Silva, L. C., Futerman, A. H., & Prieto, M. (2009). Lipid Raft Composition Modulates Sphingomyelinase Activity and Ceramide-Induced Membrane Physical Alterations. *Biophysical journal*, 96(8), 3210-3222.
- Simons, K., & Ehehalt, R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 110(5), 597-603.
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569.
- Singer, S. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science of The Total Environment*, 175, 720-731.
- Smit, J., Schinkel, A. H., Elferink, R. O., Groen, A., Wagenaar, E., Van Deemter, L., Van Roon, M. (1993). Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*, 75(3), 451-462.
- Smith, B. D., & Lambert, T. N. (2003). Molecular ferries: membrane carriers that promote phospholipid flip-flop and chloride transport. *Chemical Communications*(18), 2261-2268.
- Sopjani, M., Foller, M., Haendeler, J., Gotz, F., & Lang, F. (2009). Silver ion-induced suicidal erythrocyte death. *Journal of applied toxicology (JAT)*, 29(6), 531-536.



- Sprong, H., Kruithof, B., Leijendekker, R., Slot, J. W., van Meer, G., & van der Sluijs, P. (1998). UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(40), 25880-25888.
- 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.
- Stout, J. G., Sims, P. J., & Wiedmer, T. (1996). Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca<sup>2+</sup>-dependent transbilayer movement of phospholipid. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(29), 17205-17210.
- Strauss, J. F., Kishida, T., Christenson, L. K., Fujimoto, T., & Hiroi, H. (2003). START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. *Molecular and cellular endocrinology*, *202*(1-2), 59-65.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*, *14*(1), 1-14.
- Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Brown, A., Dennis, E. A., Glass, C. K., Russell, D. W. (2006). Lmsd: Lipid maps structure database. *Nucleic acids research*, *35*(suppl\_1), D527-D532.
- Sun, K., Zhang, Y., Bogdanov, M. V., Wu, H., Song, A., Li, J., Molina, J. G. (2015). Elevated adenosine signaling via adenosine A2B receptor induces normal and sickle erythrocyte sphingosine kinase 1 activity. *Blood*, *125*(10), 1643-1652.
- Suzuki, J., Denning, D. P., Imanishi, E., Horvitz, H. R., & Nagata, S. (2013). Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science*, *341*(6144), 403-406.
- Suzuki, K. G. N., Fujiwara, T. K., Sanematsu, F., Iino, R., Edidin, M., & Kusumi, A. (2007). GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and G $\alpha$  for temporary cluster immobilization and Lyn activation: Single-molecule tracking study 1. *J. Cell Biol.*, *177*(4), 717-730.
- Swamy, M. J., Ciani, L., Ge, M., Smith, A. K., Holowka, D., Baird, B., & Freed, J. H. (2006). Coexisting domains in the plasma membranes of live cells characterized by spin-label ESR spectroscopy. *Biophys. J.*, *90*(12), 4452-4465.

- Tang, X., Halleck, M. S., Schlegel, R. A., & Williamson, P. (1996). A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science*, *272*(5267), 1495-1497.
- Telesford, D.-M., Verreault, D., Reick-Mitrisin, V., & Allen, H. C. (2015). Reduced Condensing and Ordering Effects by 7-Ketocholesterol and 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Epoxycholesterol on DPPC Monolayers. *Langmuir*, *31*(36), 9859-9869. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b02539
- Tepper, A. D., Ruurs, P., Wiedmer, T., Sims, P. J., Borst, J., & van Blitterswijk, W. J. (2000). Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *The Journal of Cell Biology*, *150*(1), 155-164.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, *267*(5203), 1456.
- Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, *281*(5381), 1312-1316.
- Ujhazy, P., Ortiz, D., Misra, S., Li, S., Moseley, J., Jones, H., & Arias, I. M. (2001). Familial intrahepatic cholestasis 1: studies of localization and function. *Hepatology*, *34*(4), 768-775.
- van den Eijnde, S. M., van den Hoff, M. J., Reutelingsperger, C. P., van Heerde, W. L., Henfling, M. E., Vermeij-Keers, C., Ramaekers, F. C. (2001). Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *Journal of Cell Science*, *114*(20), 3631-3642.
- Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, *31*(1), 1-9.
- van Helvoort, A., Smith, A. J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A. H., Borst, P., & van Meer, G. (1996). MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*, *87*(3), 507-517.

- Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(2), 112-124.
- Vance, J. E., & Vance, D. E. (2008). *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (5 ed.). Amsterdam: Elsevier.
- Verhoven, B., Krahlting, S., Schlegel, R. A., & Williamson, P. (1999). Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes. *Cell death and differentiation*, 6(3), 262-270.
- Vermes, I., Haanen, C., & Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of immunological methods*, 243(1–2), 167-190.
- Volinsky, R., Cwiklik, L., Jurkiewicz, P., Hof, M., Jungwirth, P., & Kinnunen, Paavo K. J. (2011). Oxidized Phosphatidylcholines Facilitate Phospholipid Flip-Flop in Liposomes. *Biophysical journal*, 101(6), 1376-1384.
- Weng, J., Mata, N. L., Azarian, S. M., Tzekov, R. T., Birch, D. G., & Travis, G. H. (1999). Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell*, 98(1), 13-23.
- Wicky, S., Schwarz, H., & Singer-Krüger, B. (2004). Molecular interactions of yeast Neolp, an essential member of the Drs2 family of aminophospholipid translocases, and its role in membrane trafficking within the endomembrane system. *Molecular and cellular biology*, 24(17), 7402-7418.
- Wiedmer, T., Zhou, Q., Kwoh, D. Y., & Sims, P. J. (2000). Identification of three new members of the phospholipid scramblase gene family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1467(1), 244-253.
- Wilmes, S., Staufenbiel, M., Liße, D., Richter, C. P., Beutel, O., Busch, K. B., Piehler, J. (2012). Triple-color super-resolution imaging of live cells: Resolving submicroscopic receptor organization in the plasma membrane. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51(20), 4868-4871.
- Wu, H., Bogdanov, M., Zhang, Y., Sun, K., Zhao, S., Song, A., Yang, X. (2016). Hypoxia-mediated impaired erythrocyte Lands' Cycle is pathogenic for sickle cell disease. *Scientific Reports*, 6.

- Yamashita, A., Sugiura, T., & Waku, K. (1997). Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. *The Journal of Biochemistry*, 122(1), 1-16.
- Yesylevskyy, S., Demchenko, A., Kraszewski, S., & Ramseyer, C. (2013). Cholesterol Induces Uneven Curvature of Asymmetric Lipid Bilayers. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Yesylevskyy, S. O., Rivel, T., & Ramseyer, C. (2017). The influence of curvature on the properties of the plasma membrane. Insights from atomistic molecular dynamics simulations. *Scientific Reports*, 7(1), 16078.
- Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A., & Grinstein, S. (2008). Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science*, 319(5860), 210-213.
- Zelenak, C., Föllner, M., Velic, A., Krug, K., Qadri, S. M., Viollet, B., . . . Macek, B. (2011). Proteome Analysis of Erythrocytes Lacking AMP-Activated Protein Kinase Reveals a Role of PAK2 Kinase in Eryptosis. *Journal of Proteome Research*, 10(4), 1690-1697.
- Zhou, Q., Zhao, J., Stout, J. G., Luhm, R. A., Wiedmer, T., & Sims, P. J. (1997). Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase a protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 272(29), 18240-18244.
- Zhou, Q., Zhao, J., Wiedmer, T., & Sims, P. J. (2002). Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1. *Blood*, 99(11), 4030-4038.
- Zidovetzki, R., & Levitan, I. (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(6), 1311-1324.

## ДОДАТОК 1

### Внесок здобувача у публікації за темою дисертації

1. Kreder R., **Pyrshv K. A.**, Darwich Z., Kucharak O. A., Mély Y. and Klymchenko A. S. (2015) Solvatochromic Nile Red Probes with FRET Quencher Reveal Lipid Order Heterogeneity in Living and Apoptotic Cells *ACS Chemical Biology*. 10(6), 1435-1442. Doi: 10.1021/cb500922m – *Культивування клітин, дослідження клітинної загибелі, вимірювання спектрів, експерименти на потоковому цитометрі та мікроскопі, аналіз та інтерпретація даних*
2. Dekaliuk M., **Pyrshv K.A.**, Demchenko A. (2015) Visualization and detection of live and apoptotic cells with fluorescent carbon nanoparticles. *Journal of nanobiotechnology* 13(1), 86. Doi:10.1186/s12951-015-0148-7 – *Культивування клітин, дослідження клітинної загибелі, вимірювання спектрів, експерименти на потоковому цитометрі та мікроскопі, аналіз та інтерпретація даних*
3. Kreder, R. Oncul S., Kucharak O. A., **Pyrshv K. A.**, Real E., Mely Y. and Klymchenko A. S. (2015) Blue fluorogenic probes for cell plasma membranes fill the gap in multicolour imaging *RSC Advances*. 5(29), 22899-22905. Doi: 10.1039/c4ra16225k – *Культивування клітин, вимірювання спектрів, експерименти на мікроскопі, аналіз та інтерпретація даних*
4. **Pyrshv K.A.**, Yesylevskyy S., Mely Y., Demchenko A., Klymchenko A. (2017) Caspase-3 activation decreases lipid order in the outer plasma membrane leaflet during apoptosis: A fluorescent probe study *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1989(10), 2123-2132 Doi: 10.1016/j.bbamem.2017.08.002 – *Планування експериментів, виготовлення ліпосом, культивування клітин, дослідження клітинної загибелі, вимірювання спектрів, експерименти на потоковому цитометрі та мікроскопі, аналіз та інтерпретація даних, підготував статтю до публікації, брав участь у листуванні із редактором журналу та рецензентами*
5. **Pyrshv K. A.**, Klymchenko A. S., Csúcs G., Demchenko A. P. (2018). Apoptosis and eryptosis: Striking differences on biomembrane level. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1860(6), 1362-1371. Doi:

10.1016/j.bbamet.2018.03.019 – *Планування експериментів, виготовлення ліпосом, культивування клітин, дослідження клітинної загибелі, вимірювання спектрів, експерименти на протоковому цитометрі та мікроскопі, аналіз та інтерпретація даних, підготував статтю до публікації, брав участь у листуванні із редактором журналу та рецензентами*

Форма участі у концеренціях:

1. **Pyrshchak K.A.**, Guzyk M. M., Manoilo V. Y. (2012 September) Red-shifted probe for apoptosis detection prospective for cryobiology - International conference “Actual Problems of Cryobiology and Cryomedicine”, Kharkiv, Ukraine, (Опубл. журнал Проблеми Кріобіології – Т.22, №3, 2012 – С.332) – *очна, постер*
2. **Pyrshchak K.A.** (2013 червень) Нові методи детекції запрограмованої загибелі червоних клітин – в Тезах доповідей конференції-конкурсу молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, (Опубл. в *Укр. біохім. журн.*, Т.85, № 4, С. 145, 2013) – *очна, доповідь*
3. **Pyrshchak K. A.**, Demchenko A. P. (2014 May) Lipid redistribution in the outer plasma membrane leaflet during suicidal death of erythrocytes and HeLa cells - в Тезах доповідей конференції-конкурсу молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, С. 34 – *очна, доповідь*
4. **Pyrshchak K. A.**, Csúcs G., Demchenko A. P. (2014 October) Plasma membrane lipid order on apoptosis and eryptosis - в Матеріалах XI Українського біохімічного конгресу, Київ, 2014, (Опубл. в *Укр. біохім. журн.*, Т. 86, № 5 (Suppl. 1.), С. 111, 2014) - ISSN 0201-8470 – *очна, доповідь*
5. Dekaliuk M. O., **Pyrshchak K. A.**, Demchenko A. P. (2014 October) C-dots application in living cells experiments - в Матеріалах XI Українського біохімічного конгресу, Київ, 2014, (Опубл. в *Укр. біохім. журн.*, Т. 86, № 5 (Suppl. 2.), С. 185-186, 2014) - ISSN 0201-8470 – *очна (співавтор), доповідь*
6. **Pyrshchak K. A.**, Demchenko A. P. (2015 April) Lipids dynamics in plasma membrane on live and apoptotic cells - в Тезах доповідей конференції-конкурсу

молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, (Опубл. в *Укр. біохім. журн.*, Т.87, № 4, С. 115, 2015) – очна, доповідь

7. **Pyrshch K. A.**, Bugera A., Pivovarenko V.G., Demchenko A. P. (2015 June) Coupling of cytoplasmic and biomembrane mechanisms on suicidal cell death. International Conference of the Young Scientist (CYS-2015), Kyiv, Abstract book. - 2015. - P. 163 – очна, доповідь – *краща доповідь в секції*

8. Dekaliuk M., **Pyrshch K.**, Demchenko A. (2015 October) Carbon nanoparticles as fluorescent probes for apoptosis detection - 4-th International Conference NANOBIOPHYSICS 2015: fundamental and applied aspects, Kyiv. Book of abstracts. - 2015. - P. 93 – очна (*співавтор*), доповідь

9. **Pyrshch K.A.**, Yesylevskyy S.O., Klymchenko A.S., Csucs G., Demchenko A.P. (2016 April) The lipids distribution and their dynamics in plasma membranes of living and apoptotic cells - International workshop “Asymmetry of biological membranes: physical, biological and biomedical aspects” (Université de Franche-Comté, Laboratoire ChronoEnvironnement CNRS UMR 6249 Besançon, France), Abstract book. - 2016. - P. 12 – очна, доповідь

10. Dekaliuk M., **Pyrshch K.A.**, Demchenko A. (2016 April) S, N – containing carbon dots: fluorescent properties and application in cell experiments. - RECOOP HST Association. Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference Prague, Czech Republic. *Український біохімічний журнал.* - 2016. – Т. 88, Special Issue - С. 41. - ISSN 0201-8470 – очна (*співавтор*), *постер*

11. **Pyrshch K.A.** (2016 May) Динаміка розподілу ліпідів в мембранах ядерних клітин та еритроцитів – в Тезах доповідей конференції-конкурсу молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ (До 110-річчя з дня народження В.О. Беліцера) - С. 42 – очна, доповідь – *3-тя краща доповідь*

12. **Pyrshch K.A.**, Yesylevskyy S.O., Klymchenko A.S., Csucs G., Demchenko A.P. (2016, July) The lipids distribution and their dynamics in plasma membranes of living and apoptotic cells – in Abstract book of X Parnas Conference. Young Scientist Forum „Molecules in Living Cells and in Innovative Medicine”, Wrocław,

Poland, 2016, (Published in *Acta Biochemica Polonica*, V. 63, Suppl. 1/2016, P. 24).

– очна, постер – крацій постер

13. Dekaliuk M., **Pyrshch K.A.**, Demchenko A.P. (2016, September) New approach for cell imaging with fluorescent carbon nanoparticles. FEBS Journal. - 2016. - Vol. 283, Issue Supplement S1: Special Issue: 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life, Ephesus/Kuşadası, Turkey, September 3-8, 2016. - C. P-07.01.3-004. - P. 313. – заочна

14. **Pyrshch K.A.**, Yesylevskyy S.O., Klymchenko A.S., Demchenko A.P. (2016 September) Apoptosis and eryptosis influence differently on plasma membrane lipid phases. - X International GDRI meeting “From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies” (Lviv), Biopolymers and Cell. 2016. Vol. 32. N 4. P 316 - ISSN 0233-7657 – очна, доповідь

15. **Pyrshch K.A.**, Klymchenko A.S., Csucs G., Demchenko A.P. (2017 June) Fusion of the membranes influences plasma membrane lipid order on apoptosis. EMBO-FEBS Advanced Lecture Course “Molecular Architecture, Dynamics and Function of Biomembranes”- The book of Abstracts. – P. 119. – очна, постер