

UDC 576.314:577.352

## Сучасні уявлення про структуру і динаміку біологічних мембран

О. П. Демченко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України  
Вул. Леонтовича, 9, Київ, Україна, 01601

alexdem@ukr.net

*Останнім часом відбулися істотні зміни у поглядах на функціонування і структурно-динамічні властивості біологічних мембран. Переглянуто дані щодо ієрархічної кластерної будови мембран і ролі білкових і ліпідних компонентів. Встановлено факт драматичної різниці ліпідного складу між зовнішнім і внутрішнім моношарами плазматичних мембран, який має важливе значення для розуміння мембранних процесів. Зокрема, існують відмінності між моношарами у поверхневому заряді і потенціалі, зв'язуванні іонів, взаємодії з молекулами білків тощо. Гліколіпідний компонент зовнішнього моношару і взаємодія з цитоскелетом внутрішнього моношару дозволяють мембрані через поглиблення асиметрії набутти важливих функціональних властивостей. Необхідний більш критичний підхід до результатів, одержаних зі спрощеними аналогами біомембран – ліпідними і білково-ліпідними бішаровими структурами. У спробах описання і моделювання властивостей клітинних мембран існує потреба відходу від двовимірності (що зводить аналіз лише в площину мембрани) і переходу до більш реалістичних тривимірних моделей.*

*Ключові слова: біологічні мембрани, мікродомени і рафти, трансмембранний розподіл ліпідів, моделі біомембран.*

Біологічні мембрани є не лише бар'єрами, що обмежують об'єм клітин та їхніх органел, але й учасниками багатьох клітинних процесів, таких як адгезія, ендоцитоз, імунна відповідь, генерація потенціалу дії та апоптоз. Завдяки їм відбуваються селективний обмін речовинами, енергією і інформацією між внутрішнім і зовнішнім середовищами. Реалізація функцій рецепторів, іонних каналів, транспортних АТФаз та ін. забезпечується неоднорідною будовою мембран, які містять різні білки та ліпідні компоненти. Різноманіття складу та висока рухливість структурних компонентів не дозволяють визначати структуру мембран дифракційними методами. Тому для розуміння функції мембран використовують багатопланову інформацію, одержану в широкому комплексі біохімічних і біофізичних досліджень, а аналіз цих результатів не може обійтися без застосування моделей, які б давали спрощене, але адекватне уявлення про механізми мембранних процесів.

40 років тому запропоновано «рідинно-мозаїчну» модель мембран Сінгера-Ніколсона [1], яку вважають основою для розуміння мембранних про-

цесів. Робота належить до найзгадуваніших і найцитованіших у біології клітини (1400 цитувань у Scopus і 4950 – у Google Академія). Неодноразово пропонувалося переглянути цю модель та висувалися її альтернативні варіанти. Так з'явилися ґратчаста та супер-ґратчаста моделі [2], «динамічно-структурна модель» [3], модель «рафтів» [4, 5], модель ієрархічної організації мембран [6]. Є автори, які вважають модель Сінгера-Ніколсона цілком помилковою і неприйнятною, що не може слугувати базою для аналізу експериментальних даних. Проте роботи багатьох вчених узгоджуються з нею за результатами експериментів. У літературі останнього часу опубліковано багато дискусійних статей [7–9] і виникла нагальна потреба у їхньому неупередженому аналізі. Таке завдання й поставлене в цьому огляді.

Оцінка перспективи розвитку уявлень про структурно-динамічні властивості біомембран у світлі результатів, одержаних сучасними методами, є надзвичайно складною задачею. Моделювання – це завжди спрощення з виокремленням найсуттєвіших

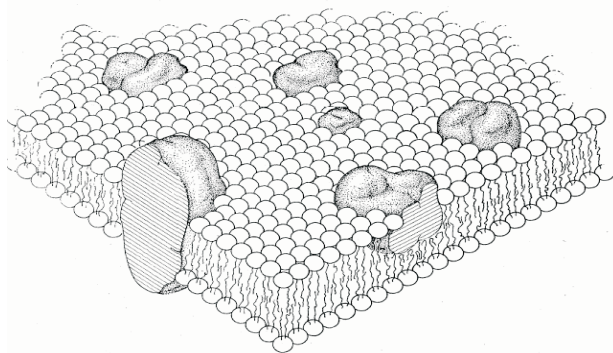


Рис. 1. Рідинно-мозаїчна модель мембран. Інтегральні білки хаотично розподілені в площині мембрани – бішарової структури, сформованої ліпідним компонентом [1]

рис того явища, що вивчається. Найзначнішим недоліком існуючих моделей біомембран є їхня двовимірність, що зводить аналіз структурно-динамічних процесів лише в площину мембрани. У представленому огляді звернено увагу саме на особливу роль структурної асиметрії мембрани та наявності стрімких градієнтів електростатичних полів і сегментарної рухливості компонентів, а також суттєвої різниці в міжмолекулярних взаємодіях зовнішнього і внутрішнього моношарів мембран.

**Результати структурно-динамічного моделювання.** Класичний експеримент, проведений ще в 1970 р. [10], яскраво продемонстрував, що мембранні антигени не мають статичного розподілу в площині мембрани, натомість їм притаманна значна просторова необмежена рухливість. Для пояснення таких результатів і запропоновано рідинно-мозаїчну модель [1] (рис. 1), що розглядає подвійний шар рухливих ліпідів як структурну основу мембрани, а інтегральні білки мембран – як розчинені в ньому рухливі частинки зі здатністю до вільної і структурно необмеженої дифузії у двовимірному просторі мембрани. Однак виявилися і суттєві неузгодженості моделі. Дифузія як хаотичний рух броунівських частинок завжди призводить до їхнього перерозподілу між областями з високою і низькою концентраціями. Чому ж тоді при взаємодії багатьох поверхневих рецепторів з гормонами відбувається їхній рух навпаки – асоціація в площині мембрани? Це явище добре вивчене, зокрема, для рецепторів тирозинкіназ [11, 12]. Після публікації [1] з'явилися прямі експериментальні дані, що суперечать рідинно-мозаїчній моделі. Найбільшого зна-

чення набули результати Карновського та ін. [13], у яких методом флуоресцентного зондування показано значну структурно-динамічну гетерогенність фосfolіпідного бішару мембран. Виникла ідея щодо фазового розшарування ліпідів у площині мембрани з утворенням їхніх структурно жорстких кластерів – «рафтів» [4, 5, 14]. Подібні фазові розшарування спостерігали і в модельних бішарових структурах, створених з ліпідних сумішей [14]. Встановлено, що при фрагментації мембран у розчинах неіонних детергентів зберігаються нерозчинні білково-ліпідні комплекси [15, 16], внаслідок чого з'явилася гіпотеза їхньої структурної відповідності рафтам.

Одночасно розвивалися оптичні методи дослідження інтактних клітин, використання яких дало можливість виявити значні відхилення характеру динаміки від очікуваних на основі рідинно-мозаїчної моделі. Системний аналіз усіх результатів дозволив групі Дам'яновича [3] сформулювати «динамічно-структурну мозаїчну модель» біомембрани. В ній мозаїчність розглядається як нехаотичний розподіл мембранних білків, що формують малорозмірні кластери на молекулярному рівні і кластери більшого розміру (групи кластерів, острівці) на субмікрометровому рівні. Концепція «рідинності» тут набуває нового значення як можливість для кластерів швидко перебудовуватися, трансформуватися і переміщуватися під впливом зовнішніх стимулів.

З наведеного опису рідинно-мозаїчної моделі вимальовується картина «вільного плавання» мембранних білків у двовимірному ліпідному розчиннику. Між тим, концентрація білків у мембрані є настільки значною, що в середньому лише декілька шарів ліпідів можуть оточувати молекулу білка. Модель «ліпідної оболонки» пропонує механізм організації ліпідних структур при взаємодії з білками [17]. Тут ключову організаційну роль відводять інтегральним білкам, що структурують оточуючі ліпіди (рис. 2).

**Методи мембранних досліджень, засновані на концепції двовимірності.** *Біохімічні методи. Виділення і характеристика фракцій, нерозчинних у неіонних детергентах.* Дезінтеграція живих клітин і фракціонування їхніх компонентів завжди викликають багато питань, оскільки одержані надмолекулярні комплекси можуть не відповідати тим, що існують у живій клітині. Проте багато дослідників

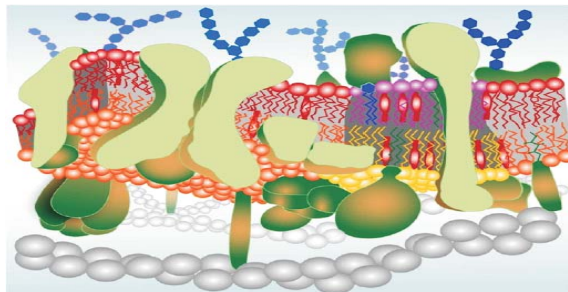


Рис. 2. Одна із схем, що відображає сучасне уявлення про структуру мембрани. Поряд з гетерогенним ліпідним компонентом показані досить щільно розташовані інтегральні білки. Гліканові компоненти (вгорі) виступають на поверхні клітини, а полімерні тяжі (внизу) ілюструють спржені з мембраною елементи цитоскелету [64]

вважає, що саме малорозмірні фрагменти мембранних структур, які не дезінтегруються в розчинах неіонних детергентів, мають властивості рафтів [16, 18]. Такі стійкі до дії детергентів мембранні фракції дійсно містять підвищені концентрації сфінголіпідів, формуючих рафти, і холестеролу, а також значну кількість інтегральних білків мембран. Однак солубілізувальна дія неіонних детергентів, таких як тритон X-100, не обмежується фрагментацією мембран. Тут може відбуватися і зміна складу та властивостей мембранних фрагментів [15]. Оскільки час життя рафтів постулюється в межах мілісекунд, незрозуміло, як вони можуть зберігати свої властивості під час виділення і маніпуляції з ними.

**Маніпуляції з вмістом холестеролу.** Холестерол є необхідним компонентом при утворенні рафтів, тому важливу інформацію про структурну і функціональну роль останніх можна одержати, спостерігаючи ефекти видалення холестеролу з мембран клітин [19]. Простим прийомом є інкубація культивованих клітин з метил- $\beta$ -циклодекстрином, який хоча й не реагує з клітинною мембраною, однак «вимиває» з неї холестерол, формуючи з ним комплекс. Проте ці результати мають сприйматися з обережністю, оскільки роль холестеролу в мембранах не обмежується структуроутворенням [20].

**Дія мембранотропних факторів.** Багато речовин природного і синтетичного походження здатні включатися в біомембрани і модифікувати їхні властивості. Цікавою є дія довголанцюгових поліненасичених жирних кислот (типу Омега 3), які збільшують кластероутворення в холестерол-залежних мікродоменах мембран [21].

**Введення різноманітних міток і зондів.** Поширеним на сьогодні є введення в мембрани флуоресцентних міток і зондів [22–24]. Зокрема, це ковалентне мічення експонованих на клітинній поверхні доменів інтегральних білків та включення в мембрану мічених ліпідів або флуоресцентних зондів з подібними до ліпідів амфіфільними властивостями. Тестування таких мічених ліпідів на модельних фосфоліпідних везикулах є необхідним, оскільки приєднання до ліпідів флуоресцентної групи часто змінює специфіку вбудовування в  $L_0$ - чи  $L_b$ -фазу мембран [23]. Розроблено серію флуоресцентних аналогів холестеролу [24]. З використанням молекулярного дизайну вдається не лише вивчати розподіл флуоресцентних молекул у мембрані, а й помістити флуоресцентну групу в мембрану на певній глибині і в потрібній орієнтації [25].

Широко застосовують флуоресцентно мічені рекомбінантні фрагменти антитіл. Комбінація методів мічення з реєстрацією резонансного перенесення енергії дозволяє визначати взаємну локалізацію різних білкових і ліпідних компонентів і, зокрема, ідентифікувати рафти [26].

**Біофізичні методи.** При вивченні клітинних мембран часто використовують принцип двовимірного контрасту [27]. Серед оптичних методів найпопулярнішими є методи флуоресценції, що дають можливість досягати високої чутливості при одержанні зображень із застосуванням сучасних методів мікроскопії – конфокальної, двофотонної та еванесцентно-хвильової (evanescent-wave). Проте роздільна здатність зазначених методів лімітується явищем дифракції світла і не може бути вищою за  $\approx 200$  нм, а розміри фокальної площини не повинні бути меншими, ніж 500 нм. Застосування нових фізичних принципів і прогрес у приладобудуванні дозволяють обійти це обмеження [28–30], однак ще нереально досягти розділення, яке б перевищувало товщину мембрани – 3–5 нм.

Дослідження біомембран стимулювали розвиток і більш специфічних підходів, які умовно можна поділити на методи, що надають статистично усереднену інформацію про рух мічених нанооб'єктів (FRAP), дозволяють аналізувати їхній окремий рух (SDT і SPT), а також їхню взаємодію на відстані (FRET) [27, 31].

Відновлення флуоресценції після фотовицвітання (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP). Метод дає можливість визначити швидкість дифузії флуоресцентно мічених молекул у площині мембрани [27]. Інтенсивний лазерний промінь фокусується на малій ділянці поверхні мембрани і викликає вицвітання (незворотну фотохімічну інактивацію) освітлених міток. Далі зонduючий промінь низької інтенсивності освітлює той же об'єм і вже можна спостерігати зростання інтенсивності флуоресценції за рахунок дифузійного входження в нього неінактивованих мічених молекул. Аналіз такої кінетики дозволяє визначити коефіцієнт трансляційної дифузії мічених молекул або частинок.

Багаторічне застосування цього підходу виявило його істотні недоліки. Мембрана мусить бути непорушною, а процес заповнення досліджуваного об'єму має бути дифузійним, тоді результат не залежатиме від розміру освітленого об'єму. Встановлення подібної залежності [27] вказує на те, що динаміка мозаїчних структур у мембранах не підлягає закону простої дифузії.

Треки поодиноких молекул і частинок (Single Dye Tracking, SDT; Single Particle Tracking, SPT). Застосування цих методів дозволяє пряме спостереження дифузії молекул і частинок та є альтернативою FRAP [27]. На відміну від останнього сигнал флуоресценції не усереднюється за ансамблем випромінюючих молекул, а фіксується їхній поодинокий рух. У SPT використовують антитіла проти мембранного білка, навантажені флуоресцентними наночастинками або частинками колоїдного золота, що розсіюють світло. Із серії зображень, отриманих у часовому вимірі, обчислюють траєкторію руху і коефіцієнт дифузії. Проте суттєвим недоліком є значний розмір наночастинок. Розвиток експериментальної техніки дає можливість слідкувати за рухом поодиноких молекул [32], а також використовувати органічні барвники і аналоги зеленого флуоресцентного білка.

Флуоресцентна кореляційна спектроскопія (Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)). При освітленні дуже малого об'єму ( $\approx 1$  фл) реєструється флуктуація фотонів, яка виникає при входженні і виході з нього окремих молекул [33]. Спостерігаючи за цим рухом у часі, можна одержати автокореляційну функцію, що дає змогу оцінити коефіцієнт

дифузії. Чутливість цього методу незначна щодо повільного руху великих білкових молекул, однак дозволяє одержати важливу інформацію про характер дифузійних процесів завдяки варіаціям розміру освітленого об'єму [27, 33, 34].

Резонансне перенесення енергії електронного збудження (Forster Resonance Energy Transfer (FRET)). Цей метод не прив'язаний до певного об'єму і є чутливим до взаємодії між окремими молекулами [35]. Якщо дві мічені молекули знаходяться на близькій відстані (у межах до  $\approx 0,5-1$  нм), то при оптичному збудженні однієї молекули (донора) енергія збудження може передаватися до іншої молекули (акцептора), при цьому відбувається зміна кольору і поляризації флуоресценції. Таким чином, є можливість оцінити відстань між донором і акцептором. Акцептор не завжди випромінює флуоресценцію, в такому разі FRET реєструватиметься як падіння часу життя флуоресценції донора [36, 37]. FRET з міченням мембранних компонентів широко використовують у флуоресцентній мікроскопії клітин [38].

Варто наголосити, що гранична роздільна здатність описаних методів, які застосовують флуоресцентну мікроскопію (200–500 нм), на два порядки нижча, ніж товщина мембран, тому останні через призму цих методів виглядають як двовимірні структури. Це стосується і FRET [39]. Відстань між донором і акцептором може бути меншою за 1 нм, проте положення цієї пари з такою точністю визначити не можна.

*Фізичне моделювання взаємодій у мембранах.* Фізична теорія жодним чином не пояснює рівноважного співіснування динамічних нанорозмірних фаз. У модельних мембранах взаємодія  $L_0-L_d$ -фаз призводить до фазового розшарування з утворенням кластерів значної величини [40]. Чому ж цього не відбувається у мембранах живих клітин? Адже домени розміром менше 200 нм – це велика інтерфазна поверхнева енергія. Існує багато пояснень, але жодне з них не є задовільним [41]. Проблема полягає у тому, що латеральна взаємодія ліпідів досить слабка, щоб утримувати таке тонке розділення фаз. Стабілізація їх білками не може бути ефективною через рухливе ліпідне оточення. Найнезрозумілішою є динаміка кластерів, зокрема, їхня асоціація при стимуляції рецепторних білків. Тому з'яви-



лася гіпотеза про те, що великі рафти постійно інтерналізуються клітинними механізмами і замінюються на менші [42].

Зважаючи на відсутність у сучасному експерименті можливості одержати структурно-динамічну інформацію з усіма молекулярними деталями, дослідники велику надію покладають на розвиток комп'ютерних методів дослідження молекулярної динаміки. Значна складність систем вимагає нездійснено великих масивів обчислень, тому запропоновані і розвиваються спрощені «грубозернисті» моделі [43].

**Дослідження мембранних структур різної складності.** *Фосфоліпідні бішарові структури.* Матеріалом для побудови мембран слугують фосфоліпідні бішарові структури, тому предметом дослідження стали пласкі бішари на підкладці, а також мембранні везикули великого розміру [40]. У таких структурах можна в широких межах варіювати ліпідний склад і спостерігати зміни фізичних властивостей мембран. За низьких температур фосфоліпіди утворюють тверду або гелеву ( $S_0$ ) фазу, а за підвищеної температури відбувається перехід до «рідкої» фази ( $L_d$ ) з неупорядкованим розташуванням і швидкою динамікою сегментів ацильних ланцюгів. Однак за присутності в достатній кількості холестеролу може бути утворена так звана «рідка впорядкована» ( $L_0$ ) фаза, для якої характерна висока впорядкованість ланцюгів (як у  $S_0$ -фазі), але й досить висока трансляційна рухливість молекул (майже як у  $L_d$ -фазі). Оскільки  $L_0$ - і  $L_d$ -фази можуть співіснувати, утворюючи острівці однієї фази в іншій, виникло припущення стосовно структурної відповідності  $L_0$ -фази тим впорядкованим мікродоменам, які присутні в природних мембранах і одержали назву «рафти» [14]. Однак є достатньо підстав для критики подібного припущення, зокрема, фазові перетворення з трьох ліпідних компонентів важко зіставити із ситуацією в природних мембранах, де цих компонентів сотні. А чим більше компонентів, тим менш вираженими мають бути фазові переходи. Принциповим аргументом має бути й те, що ділянки  $L_0$ -фази в ліпідних бішарах є досить значного розміру, у той час як рафти в природних мембранах не досягають сотень нанометрів. Та й дифузія ліпідів відбувається тут у 5–100 разів швидше, ніж у природних мембранах [40].

Окрім рафтів, значну увагу дослідників привертає існування так званих керамідних мікродоменів [44], які утворюються внаслідок асоціації холестеролу з керамідами – продуктами ферментного розщеплення сфінгомієліну (SM). Вважають, що такі структури локалізуються в клітинах, створюються сфінгомієліназою і мають сигнальні властивості.

**Білково-мембранні комплекси.** Мембранні білки після попереднього виділення і очищення можна вбудовувати у фосфоліпідні бішари. Вони не лише створюють навколо себе оболонку з найафінніших ліпідів, але й мають здатність змінювати характер фаз  $L_0/L_d$ . Як показано для білка N-ras [45], білки можуть локалізуватися в інтерфазі між  $L_0$  і  $L_d$ , зменшуючи ефекти поверхневого натягу між ними. Пептиди і білки здатні індукувати створення рафтів у таких системах [46]. Проте існують експериментальні свідчення того, що білки, виділені з рафтів, вбудовуються у фосфоліпідних мембранах зовсім не в фазу  $L_0$ , а в неупорядковану  $L_d$ -фазу [47]. Це викликає застереження при аналізі результатів подібних досліджень.

*Везикули з природних компонентів біомембран.* Оскільки фосфоліпідні бішари і маніпуляції з ними через включення нових ліпідних і білкових компонентів зазнають суттєвого спрощення, наразі створюють везикули з природних клітинних мембран. Такі дослідження проводять із застереженням, що досить жорсткі методи одержання цих об'єктів, наприклад, використання формальдегіду, здатні вплинути на їхній склад і властивості [48]. Показано, що в отриманих везикулах можна спостерігати розділення фаз, як і в модельних фосфоліпідних бішарових структурах [49]. Створюючи певний фазовий стан, ці ділянки структури спроможні специфічно зв'язувати певні білки. На основі спостережень за залежністю властивостей цих структур від температури висунуто ідею щодо існування за фізіологічних умов критичної області для співіснування окремих фаз [50].

*Мембрани при дослідженні живих клітин.* Методами FRAP і FCS в експериментах на клітинах встановлено значну відмінність трансляційного руху мічених мембранних білків від вільної дифузії [3], що вказує на істотні перешкоди. Однак цими методами, які мають просторову роздільну здат-

ність меншу, ніж розмір мікродоменів, не можна визначити молекулярної організації останніх. Зокрема, не вдається відповісти на питання, якою є ліпідна оболонка інтегрального білка і як такий комплекс включається в рафт [51]. Між тим, такі результати однозначно засвідчують ієрархічну організацію мікродоменів і динамічний характер їхнього формування і розпаду [6] та наявність декількох типів мікродоменів з різним включенням флуоресцентних аналогів ліпідів.

Різні клітини реагують на зовнішнє подразнення сегрегацією своїх рецепторів, тобто їхнім збиранням в одній із ділянок мембрани (capping). Наприклад, таке відбувається при зв'язуванні полівалентних антитіл, дослідженому на лімфоцитах [52], та при взаємодії мембранних гангліозидів з лігандами [53]. Мембранні рецептори структуруються, створюючи концентраційні градієнти у своєму русі. Цей процес вже не можна зрозуміти, виходячи з двовимірності мембрани.

Отже, результати експериментів останнього часу все більше віддаляють нас від колись революційної рідинно-мозаїчної моделі Сінгера-Ніколсона. Не можна стверджувати, що вона зовсім не вірна, адже в ній постулюється високий рівень молекулярної динаміки у мембранах, яку експеримент підтверджує. Проте ця динаміка суттєво відрізняється від броунівської дифузії. Мозаїчність структури і ієрархічний характер такої мозаїки виявляються найважливішими властивостями мембран.

Існуючі моделі оперують двовимірними координатами у площині мембрани. Біофізичні методи дослідження, які найширше використовують при вивченні як живих клітин, так і різних мембранних моделей, надають більшою мірою двовимірну інформацію (трансляційний рух мембранних компонентів та їхня взаємодія в площині мембрани) [27]. Тому найактуальніше питання звучить так: чи можуть функціонально значущі процеси у мембрані моделюватися структурно-динамічними змінами лише в її площині? Якщо так, то наведені в попередніх розділах результати, одержані на фосфоліпідних моделях і виділених мембранах, мають велику цінність. Якщо ні, то їхня цінність мінімальна і варто сконцентруватися на розвитку адекватних підходів до дослідження живих клітин.

*Тривимірність мембрани як структурна основа її функціонування.* Основні події в клітинній мембрані відбуваються не в її площині, а в напрямку, перпендикулярному до неї. Це і сигнальна дія, і обмін продуктами метаболізму, і створення іонних градієнтів. Різні класи оточених ліпідами білків розташовані в мембрані асиметрично. Фотосинтез у хлоропластах і енергетичні процеси в мітохондріях пов'язані з трансмембранними процесами. Усі ці процеси векторні і високоселективні, тому вважати мембрани двовимірними перегородками є величезним спрощенням. Найяскравішим підтвердженням необхідності аналізу тривимірності мембрани є різний ліпідний склад моношарів у бішаровій структурі, їхній неоднаковий поверхневий потенціал, відмінності у міцності зв'язування іонів і в енергії взаємодії з макромолекулами і надмолекулярними структурами.

*Методи вивчення структурної асиметрії біомембран.* Завдяки асиметрії в розподілі ліпідів між моношарами дві поверхні мембрани мають розбіжності у біофізичних властивостях та у виконанні своїх функцій. Розглянемо методи вивчення ліпідного складу моношарів і одержані результати.

Виділення мембранних фракцій разом з білками, локалізованими на зовнішньому або внутрішньому моношарах. У такий спосіб показано, що різні неіонні детергенти по-різному солюбілізують мембрани з виділенням рафтів [54]. Це узгоджується з локалізацією фосфатидилетаноламіну (PE) у внутрішньому моношарі плазматичних мембран.

Хімічна модифікація і мічення. Мічення на поверхні клітин ліпідів, що містять вільні аміногрупи, PE і фосфатидилсерин (PS), за допомогою реагентів, які не проникають у внутрішній моношар, відбувається просто і ефективно [55, 56]. Найпопулярнішим із цих реагентів є тринітробензолсульфонат (TNBS). Використання методів електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) чи флуоресценції вимагає відповідного мічення. Для ЕПР – це докисьні похідні. Якщо вони потрапляють на поверхню мембрани, то можуть відновлюватися аскорбатом [56]. При флуоресцентному міченні найчастіше використовують барвник 7-нітробенз-2-окса-1- $\alpha$ -3-діазол-4-іл (NBD). Якщо група NBD експонована на поверхні, вона може бути відновлена ди-

тіонітом із втратою флуоресценції [57]. Нині синтезовано багато мічених ліпідів, що можуть спонтанно вбудовуватися в мембрану і змішуватися з природними ліпідами, проте немає гарантії, що їхні властивості відповідатимуть ознакам природних ліпідів. Описано використання NBD-похідних холестеролу [58]. Дуже обнадійливим є застосування у мембранних дослідженнях так званого біртогонального мічення ліпідів, яке забезпечує високу селективність [59].

Застосування ліпід-зв'язувальних білків передбачає залучення антиліпідних антитіл і їхніх рекомбінантних фрагментів, а також білків, які специфічно взаємодіють з ліпідами. Найпоширенішим виявилось використання анексину V, що має дуже високу афінність до PS, координуючися з ним через іони кальцію. Розроблено багато варіантів цього методу, де анексин V модифікується ізотопним або флуоресцентним міченням [60]. Використовують антитіла проти фосфоліпідів і навіть проти холестеролу [61].

Деградація фосфоліпазами різної специфічності. Метод застосовують для визначення поверхневої локалізації ліпиду, проте він вимагає довгого часу інкубації і, крім того, утворені продукти (лізопохідні і жирні кислоти) можуть дестабілізувати мембрану [62].

Усі ці методи мають недоліки, однак їхнє системне використання дозволяє відтворити картину складної будови мембран.

Трансмембранний розподіл фосфоліпідів. Для багатьох типів мембран встановлено, що ліпідний склад зовнішнього моношару мембрани суттєво відрізняється від такого внутрішнього моношару [63, 64]. Ця відмінність виражена по-різному залежно від типу клітини або органели, до якої належить мембрана. Так, її не спостерігали в мембранах ендоплазматичного ретикулуму. Водночас, в апараті Гольджі, в ендосомах і плазматичних мембранах еукаріотів вона проявляється найяскравіше, що ілюструє рис. 3 з роботи [64]. SM і глікофінголіпиди знаходяться переважно на зовнішньому боці плазматичних мембран, а аніонні PS і фосфатидилінозитол (PI) та його фосфорильовані форми, а також PE сконцентровані в цитозольному моношарі. SM, який формує рафти, переважно перебуває у зовніш-

ньому моношарі і саме його асоціація з холестеролом дозволяє спостерігати сегрегацію  $L_0$ -фази в модельних мембранах, що є основою створення рафтів [65]. Така  $L_0$ -фаза не може сформуватися з аніонних фосфоліпідів у комбінації з PE в модельних бішарах [66]. Ключовим тут є розташування холестеролу. Оскільки вміст холестеролу часто корелює з вмістом сфінголіпідів, то слушно припустити, що холестерол локалізується переважно в зовнішньому моношарі, де формуються рафти. Проте чіткого експериментального підтвердження не існує й досі. До речі, у модельних мембранах холестерол надає перевагу ліпідам з полінасиченою структурою вуглеводневих «хвостів», він не створює рафтів, якщо там існують подвійні зв'язки [67].

Інозитолфосфоліпиди відомі своїми фосфорильованими формами [68], які відіграють важливу роль у регуляторних механізмах клітини. Вони локалізовані у внутрішньому моношарі цитоплазматичних мембран і беруть участь у передаванні сигналів між мембраною і цитоплазмою, а також у взаємодії мембрани з цитоскелетом.

Важливу, проте не до кінця досліджену функціональну роль має асиметричний розподіл нейтральних і аніонних ліпідів в мембранах. Відомо про його важливе значення у міжклітинних взаємодіях, активації каскаду зсідання крові, впізнаванні і елімінації апоптотичних клітин. Сигналом, що запускає такі процеси клітинного розпізнавання, є поява в поверхневому моношарі PS і PE [69].

Трансмембранний розподіл холестеролу. Стехіометричні комплекси холестеролу з ліпідами мають високу стабільність, а надлишковий холестерол легко вививається з мембрани. У цитоплазмі він стає субстратом холестеролоксидази, а в позаклітинному просторі зв'язується з ліпопротеїнами високої щільності [70, 71]. Це дозволяє регулювати вміст холестеролу в мембрані стосовно кількості афінних до нього фосфоліпідів і забезпечувати його відповідне (асиметричне?) співвідношення між зовнішнім і внутрішнім моношарами плазматичної мембрани. Рівноважний його розподіл між моношарами вивчали з використанням різних підходів, зокрема, методом гасіння флуоресценції введеного ззовні флуоресцентного дегідроергостеролу або флуоресцентних похідних холестеролу, мічених по

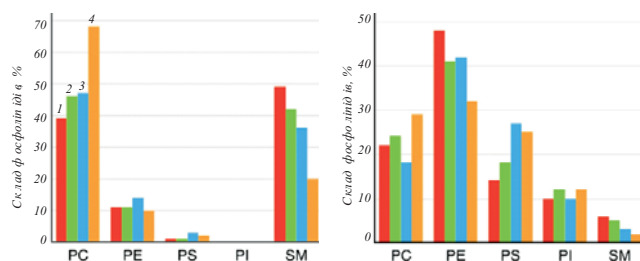


Рис. 3. Розподіл ліпідних компонентів мембран між зовнішнім (зліва) і внутрішнім (справа) моношарами плазматичних мембран. Результати для фосфатидилхоліну (PC), фосфатидилетаноламіну (PE), фосфатидилсерину (PS), фосфатидилінозитолу (PI) та сфінгомієліну (SM). Стовпчики ілюструють відносну концентрацію ліпідів (зліва направо) у мембранах еритроцитів і тромбоцитів людини, лімфоїдних ракових клітин та mucosal mast (RBL-2H3) клітин [64]

ОН-групі [24]. Проте однозначних результатів не отримано [71], і деякі дослідники вважають, що більшість молекул холестеролу знаходиться у внутрішньому моношарі. Оскільки він має високу афінність до ліпідів з полінасиченими ланцюгами, то, можливо, що фосфоліпіди розподіляються також і за цією ознакою. Холестерол виявляє значну афінність і до деяких інтегральних білків, що також може впливати на його розподіл [72] та стабілізувати білково-ліпідні домени, багаті на холестерол.

*Трансмембранна динаміка ліпідів.* Перескакування молекул ліпідів з одного моношару на інший («flip-flop») на відміну від майже безбар'єрного трансляційного руху ліпідів у площині мембрани вимагає перенесення полярної голівки ліпиду через гідрофобну частину мембрани. Спонтанно воно відбувається надзвичайно повільно (швидкість  $\sim 10^{-15} \text{ c}^{-1}$ ), так що рівноважний стан досягається за години або навіть дні [73]. У живих клітинах цей процес проходить значно швидше. Є низка ферментів, що створюють і підтримують структурну асиметрію мембран (фліпази) [74, 75]. Переносячи ліпіди, вони для створення нерівноважного розподілу останніх використовують енергію АТФ. Існують і інші транслокази – скрамбази, які здійснюють перенесення ліпідів у спряженні з іонами кальцію. Ці процеси дозволяють досягти контрольованої динамічної рівноваги у розподілі ліпідів за лічені хвилини. За деяких функціональних станів (активація тромбоцитів, апоптоз) асиметрія плазматичних мембран порушується і відбувається вихід у поверхневий моношар аніонних ліпідів [69].

Таким чином, відмінності у фізичних властивостях зовнішнього і внутрішнього моношарів мембран (зокрема, їхніх поверхневих електростатичних потенціалів [76]) забезпечуються динамічним підтриманням стабільних концентраційних градієнтів.

Для перескакування керамідів (похідних сфінголіпідів без полярних голівок) не існує високого енергетичного бар'єра, тому вони перерозподіляються надзвичайно швидко (за секунди) [77, 78]. Відомо, що кераміди можуть прискорювати перескакування інших ліпідів.

Трансмембранне перескакування ліпідів – дуже важливий механізм у біогенезі мембран. Особливо складним є перенесення гліколіпідів, полярні гліканові компоненти яких мають бути експонованими на зовнішньому моношарі [79].

*Кореляція між структурною організацією і динамікою моношарів.* Отже, існування драматичної різниці в ліпідному складі між моношарами одних і тих же мембран є незаперечним фактом. З цього випливають відмінності у таких властивостях, як поверхневий електростатичний потенціал, гідратованість, здатність до взаємодії на поверхні з молекулами та іонами. Між тим відомо, що реалізація сигнальних функцій мембрани вимагає синергізму у взаємодіях між моношарами. Таку функцію передавання сигналу можуть виконувати інтегральні білки. Однак відома і роль міночних ліпідів як первинних і вторинних передавачів сигналу через мембрану. То ж наскільки незалежні ліпідні моношари і як реалізується їхня взаємодія?

Якщо рафти існують в обох моношарах, а сфінгомієлін – найпотужніший утворювач рафтів – локалізований лише у зовнішньому моношарі, то не зрозуміло, які ліпіди і в якій комбінації відіграють цю роль у внутрішньому моношарі? У багатьох публікаціях рафти зображують симетричними в обох моношарах. Чи дійсно це так? (див. рис. 4). Тобто чи можуть рафти, утворені в зовнішньому моношарі, індукувати їхнє формування у внутрішньому моношарі? Це було б певним протиріччям до відомих даних про те, що моношари взаємодіють лише гідрофобними кінцями ацильних ланцюгів, а такі взаємодії дуже слабкі. Проте цікаво знати, що в модельних мембранах, де можна спостерігати розмежування  $L_0$ - і  $L_b$ -фаз, кластери цих фаз в обох моноша-



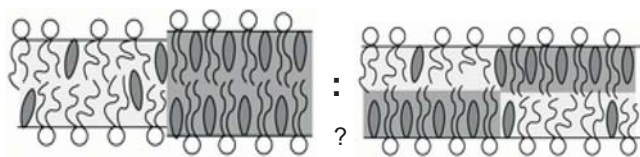


Рис. 4. Ілюстрація проблем, що виникають у рамках моделі рафтів. Чи корелюють і взаємодіють рафти (показані як затемнені структури), утворені в одному моношарі, з рафтами з іншого моношару? Чи відбувається перебудова рафтів з виникненням такої взаємодії під впливом зовнішніх стимулів?

рах збігаються [80]. Були спроби створення штучних асиметричних бішарів, що складаються лише з ліпідів. Одночасне формування рафтів в обох моношарах вказує на те, що вони можуть утворюватися без участі інтегральних білків [81].

Такі результати вимагають пояснення. Одне з них – це кореляція динаміки ацильних кінців, що можуть переплітатися всередині бішару [82]. Якщо це так, то роль холестеролу не є зрозумілою. З одного боку, він унеможливує переплітання (інтердигітацію) ацильних ланцюгів у  $L_0$ -фазі і не перешкоджає цьому в  $L_b$ -фазі. З іншого, – він легко мігрує між моношарами в ділянки, де його термодинамічна стабільність найбільша.

У пошуку відповіді на питання про механізми передавання сигналу між моношарами проведено експерименти із зв'язування катіонного пептиду полі-L-лізину. Без участі ліпідів, які формують рафти, таке зв'язування відчувається на протилежному боці мембрани. Більш того, молекули цього пептиду, нанесені з обох боків мембрани, мігрують в площині мембрани як одне ціле [83]. На кореляцію в динаміці між зовнішнім і внутрішнім моношарами вказують і дослідження Т-лімфоцитів з флуоресцентним білком, вбудованим у внутрішній моношар їхніх мембран [84]. Ці результати контрастують з іншими даними [85], де знайдено кореляцію мікродоменів у внутрішньому моношарі не з доменами зовнішнього моношару, а із взаємодією з актиновим цитоскелетом.

Отже, на сьогодні не зрозуміло, чи може асиметрія у складі фосфоліпідів не бути перешкодою для скорельованого симетричного фізичного стану моношарів у бішаровій структурі. Якщо це так, то повинні існувати чіткі механізми подібної кореля-

ції. Вона може мати важливу функціональну роль, наприклад, при векторному вбудовуванні у мембрану інтегральних білків.

*Гліколіпіди, експоновані на поверхні клітин.* Додатковим фактором, що відрізняє зовнішню поверхню багатьох клітинних мембран, є наявність інтегрованих з ліпідами вуглеводних компонентів (гліканів). Це передусім глікосфінголіпіди з гідрофобною керамідною частиною, інтегрованою в мембрану, і олігосахаридним ланцюгом, що виступає в позаклітинний простір. Такі повністю гідратовані ланцюги можуть займати значну частину клітинної поверхні. Вони легко асоціюються з SM та холестеролом і їх вважають характерними маркерами рафтів. Особливо висока їхня концентрація (до 10–12 % від усіх ліпідів) у мембранах нейронів. Наявність їх у великих кількостях лише в одному з моношарів ставить багато запитань щодо структурно-динамічної організації мембран [86, 87].

Глікосфінголіпіди  $GM_1$  і  $GM_3$  використовують як маркери рафтів і їхня сегрегація по поверхні клітини (яку можна спостерігати за ефектом зв'язування флуоресцентно міченої субодиниці В холерного токсину) свідчить про високу рухливість цих структур [85].

Важливість вивчення глікосфінголіпідів пов'язана з тією значною роллю, яку їм відведено не лише як антигенам і факторам міжклітинних взаємодій, а й активним учасникам сигнальних процесів, що вимагають трансмембранної інтегрованої відповіді [88].

*Взаємодія клітинної мембрани з цитоскелетом та іншими факторами цитоплазми.* Відомо, що інтегральні білки мембран здатні рухатися проти градієнта концентрації у двовимірному просторі мембрани, збираючись у кластери [89]. Це свідчить про наявність кореляції у їхньому русі, а також про існування рушійної сили за межами подвійного шару. На роль такої сили претендує взаємодія з цитоскелетом, проте як реалізується ця взаємодія, відомо мало [90, 91]. Дослідження взаємодії рафтів з актиновим цитоскелетом при активації Т-лімфоцитів підтверджують існування контролю з боку цитоскелету і, зокрема, актинових філаментів примембранного шару цитоплазми за створенням і сегрегацією мікродоменів [85, 92, 93]. Проте деталі меха-

нізму такої взаємодії досі не зрозумілі. Єдиним чітко встановленим фактом варто вважати взаємодію аніонних ліпідів і, зокрема PS, на внутрішній поверхні мембрани з фібрилами актину [94].

На моделі мембран еритроцитів показано, що вихід PS на поверхню послаблює зв'язок мембрани із спектрин-актиною системою і впливає на механічні властивості клітин [95]. Актиновий цитоскелет клітин є динамічною структурою, що модулює переміщення інтегральних білків по поверхні мембрани. Однак його вплив може поширюватися і на структуру ліпідів внутрішнього моношару.

**Інтегральні властивості біомембран.** Організація білкових і ліпідних компонентів у складну аперіодичну надмолекулярну структуру, якою є біологічна мембрана, призводить до появи нових інтегральних властивостей, насамперед електростатичного потенціалу мембрани [76]. Детальний аналіз його немонотонної зміни в перерізі мембрани дозволяє виділити компоненти, серед яких трансмембранний, дипольний і поверхневий потенціали [76]. Величезні градієнти (тобто зміни на коротких відстанях у долі нанометра) спостерігаються і для інших параметрів мембрани, таких як полярність, гідратація і в'язкість [96].

*Асиметрія поверхневих зарядів і електростатичних потенціалів.* Проблема виникнення і утримання мембранного потенціалу є ключовою для клітинної фізіології. Макроскопічні моделі досить задовільно описують цей процес, однак він ще мало зрозумілий на молекулярному рівні в термінах динаміки взаємодій іонів, води і ліпідів. Адсорбція іонів на поверхні мембран та їхній розподіл у примембранному шарі залежать від фосфоліпідного складу, а оскільки цей склад відрізняється між моношарами, то й розподіл має бути різним (рис. 5). Важливими у цьому розподілі мають бути і відмінності в концентраціях іонів у зовнішньому і внутрішньому об'ємах, що обмежуються мембраною (зокрема, відносно високі концентрації  $K^+$  в цитоплазмі і  $Na^+$  в зовнішньому об'ємі клітин) [97].

Розрахунки методами молекулярної динаміки (МД). Дослідження методами МД показали, що  $Na^+$ , зв'язуючись на рівні карбонільних груп ліпідів, демонструє вищу афінність до мембрани, ніж  $K^+$ , про-

те вища концентрація останнього призводить до його щільнішого зв'язування у внутрішньому моношарі. Важливу роль у зв'язуванні відіграє негативний заряд поверхні, створений голівками аніонних ліпідів [98]. Поряд із зарядами голівок ліпідів зв'язані іони визначають величину трансмембранного потенціалу [99]. Моделювання МД на простій моделі (однорідна фосфоліпідна мембрана фосфатидилхоліну з рівними концентраціями NaCl і KCl) несподівано замість нульового потенціалу показало значну різницю у потенціалах ( $-70$  мВ) [100] саме за рахунок щільного зв'язування іонів  $Na^+$ , але не  $K^+$  на рівні ліпідних карбонілів. Аніони ж по-іншому взаємодіють з мембраною. Так, хлориди створюють лише ефект протиіона до зв'язаного з мембраною катіона [101].

Використання флуоресцентних зондів. Для неінвазивного одержання результатів про електростатичні взаємодії на рівні груп атомів необхідні інструменти молекулярного і субмолекулярного розміру, висока чутливість відповіді яких дозволяла б їхнє неінвазивне застосування. Такими інструментами є флуоресцентні мітки і зонди [76, 96, 102]. Істотними перевагами цих молекул є їхня придатність для мікроскопічних досліджень, а також отримання від них мультипараметричної відповіді [103], яка може включати реакцію на міжмолекулярні взаємодії (електростатичні потенціали та ефекти гідратованості і полярності за спектральним зсувом спектрів збудження і емісії, появою нових смуг у спектрах), мікров'язкість (динаміка обертального руху за анізотропією емісії) та просторову близькість між міченими молекулами (FRET за флуоресценцією, розділеною в часі). Важливою є можливість застосування флуоресцентних молекул, які зв'язуються лише в одному з моношарів і за різного заглиблення чи орієнтації в мембрані [104].

Серед останніх досягнень вирізняється метод реєстрації другої оптичної гармоніки, що суттєво поліпшує роздільну здатність в анізотропній інтерфазі [105] і дозволяє візуалізувати домени, багаті на холестерол [106]. Флуоресцентні аналоги ліпідів створено для використання у двофотонній спектроскопії і мікроскопії [107, 108]. Синтезовано непроникні в клітину флуоресцентні молекули з реакцією на її поверхневий потенціал [109], за допомогою

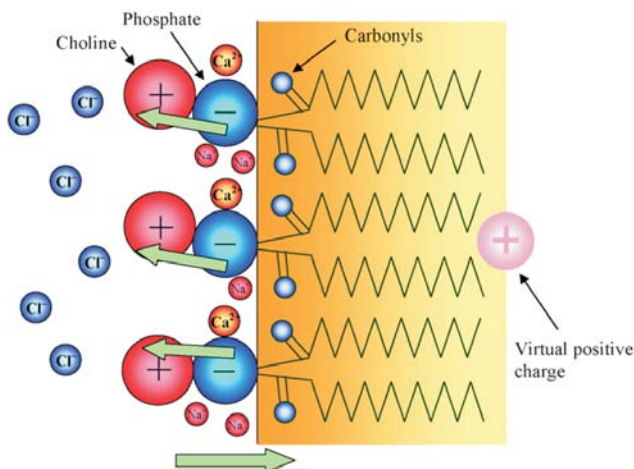


Рис. 5. Схематичне представлення електростатичних взаємодій у структурах, утворених впорядкованими фосfolіпідами. Катіони  $\text{Na}^+$  і  $\text{Ca}^{2+}$  взаємодіють з голівками ліпідів на рівні фосфатних груп, а аніони  $\text{Cl}^-$  спричиняють рухливу атмосферу біля мембрани. Диполі голівок і карбонільних груп разом з диполями води (не показано) генерують дипольний потенціал, проявом якого є виникнення віртуального заряду у центрі бішару [76]

яких одержано відповідь на вихід аніонних ліпідів на поверхню на початкових стадіях апоптозу. Електростатичні взаємодії катіонних ліпідів і позитивно заряджених доменів білків з негативно зарядженою поверхнею мембрани визначають їхнє вбудовування у мембрану і перенесення через неї [97, 110]. Вважають, що такий механізм діє в ендосомах і лізосомах, а викид іонів кальцію гальмує ці ефекти.

**Трансмембранне передавання сигналу** відбувається не лише за механізмом перенесення молекул-месенджерів, а й внаслідок індукування і поширення змін у мембранних структурах. Механізми такого передавання сигналу досі чітко не визначені і вони можуть бути різними. По-перше, – це алостерія, тобто скорельовані конформаційні зміни інтегрального білка, що наскрізь пронизує мембрану [111]. По-друге, – це індукція змін у скорельованій динаміці ліпідів, які належать прилеглим мікродоменам моношарів. По-третє, – це латеральна дифузія білкових рецепторів, що може призводити до кластеризації рафтів, і саме завдяки їй відбувається кореляція між зв'язуванням полівалентного ліганду на поверхні та внутрішньоклітинними змінами. Останні можуть реалізуватися через систему G-білків або за рахунок рецепторів тирозинкіназ. Можлива й перебудова актинового цитоскелету.

Для подальшого прогресу у цій галузі потрібен вибір адекватних моделей. Однією з них може бути імунологічний синапс – динамічна структура, сформована між Т-лімфоцитом і клітиною, що несе поверхневий антиген [112, 113]. При її утворенні відбувається сегрегація білків і ліпідів у контактуючих мембранах, що створює умови для багатоканального передавання інформації, необхідної клітині для вибору між активацією і толерантністю. І якщо сегрегація рафтів по мембрані створює трансмембранний сигнал, то який же механізм генерації цього сигналу?

**Перспективи: від удаваної двовимірності до реальної тривимірності.** Історично важливу і цікаву модель Сінгера-Ніколсона важко узгодити з сучасними експериментальними даними. Постулюючи високу рухливість як ліпідів, так і білків у площині мембрани, вона відіграла дуже важливу роль. Згідно з нею, мембрана є двовимірним в'язким розчином ліпідів, у якому дифундують інтегровані білки. Сьогодні ми усвідомлюємо, що ліпідний компонент важко назвати гомогенним двовимірним розчином. Він утворює мікродомени субнанометрового розміру (рафти), які організовані ієрархічно і мають складну динаміку. Рух білків не є вільною дифузисю, він радше має характер перескакувань через потенційні бар'єри в мікродоменному просторі і супроводжується реорганізацією цих мікродомнів. Але найважливішим є те, що мембрану навіть у першому наближенні не можна вважати двовимірною структурою, оскільки по осі  $Z$  (нормаль до мембрани) відсутня концентраційна рівновага ліпідів. Такий нерівноважний стан активно підтримується енергетично залежними процесами, через що відсутня еквівалентність моношарів у зв'язуванні іонів і малих молекул. Моношари по-різному гідратовані і мають неоднаковий заряд і поверхневий потенціал, а властивості внутрішнього моношару значною мірою визначаються взаємодією з білками цитоскелету. За участі цитоскелету забезпечується просторова кореляція рухів білків мембран. Без урахування цих важливих властивостей не можна зрозуміти механізмів багатьох мембранних процесів.

Біологічна мембрана – фантастично цікавий об'єкт для молекулярних і клітинних досліджень. Ця структура товщиною всього 4–5 нм є для клітини не



лише межею між життям і смертю. Її здатність до селективного обміну численними речовинами і багатоплановою інформацією, її надзвичайно складна організація та постійне самовідновлення вимагають від дослідника моделювання у просторі й часі з обов'язковим введенням координати Z. На сьогодні відчувається недосконалість моделей і концепцій, що базуються на експериментальному матеріалі. Чимало питань є дискусійними. Якщо може існувати штучна мембрана, складена лише з 1–2 компонентів, то навіщо клітина синтезує сотні різноманітних ліпідів, витрачаючи приблизно 5 % своїх генів [114]? Якщо однакова або схожа структурно-динамічна організація мікродоменів може бути реалізована в обох моношарах, то навіщо залучається суттєвий енергетичний ресурс клітини на постійну підтримку трансмембранної асиметрії ліпідів?

Врешті, що ж являє собою біологічна мембрана? Це передусім анізотропна структура в усіх трьох вимірах. Це структура нерівноважна, де створені і постійно підтримуються концентраційні градієнти. Завдяки цьому, а також включенню різних білків і небілкових компонентів моношари цієї бішарової структури драматично відрізняються за своїм складом, електростатичним потенціалом утвореної поверхні, зв'язуванням іонів. Плазматична мембрана взаємодіє з цитоскелетом. Окрім трансмембранного перенесення молекул, передавання функціонально важливих сигналів здійснюється за рахунок скорельованих структурних змін у самій мембрані. Усі ці особливості не можуть бути відтворені в жодній із спрощених модельних систем.

Наразі стверджує свої позиції синтетична біологія, основною задачею якої є штучне створення мінімальної клітини. Її реалізація навряд чи можлива без розуміння і практичного відтворення основних функцій біомембран.

*A. P. Demchenko*

Modern views on the structure and dynamics of biological membranes

Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine  
9, Leontovycha Str., Kyiv, Ukraine, 01601

Summary

*Essential changes have been recently observed in views on the functioning, structural and dynamic properties of biological membranes. The previous results on hierarchical cluster-type structure of mem-*

*branes and role of protein and lipid components are reconsidered. An established fact of dramatic difference in lipid composition between external and internal monolayers of plasma membranes is important for understanding membrane phenomena. In particular, there exist the differences between monolayers in surface charge and potential, ion binding, interaction with protein molecules, etc. A glycolipid component of outer monolayer and interaction of inner monolayer with cytoskeleton allow the membrane by expanding the asymmetry to attain its important functional properties. All that requires more critical approach to numerous data obtained with simplified biomembrane analogs – lipid and protein-lipid bilayer structures. In the attempts to describe and model the properties of cellular membranes there is a timely necessity to shift from two-dimensionality (which reduces the analysis to membrane plane only) to more realistic three-dimensional models.*

*Keywords: biological membranes, microdomains and rafts, transmembrane lipid distribution, biomembrane models.*

*A. П. Демченко*

Современные представления о структуре и динамике биологических мембран

Резюме

*В последнее время произошли существенные изменения во взглядах на функционирование и структурно-динамические свойства биологических мембран. Пересмотрены данные о иерархичном кластерном строении мембран и роли белковых и липидных компонентов. Установлен факт драматических различий липидного состава между наружным и внутренним монослоями плазматических мембран, имеющий большое значение для понимания мембранных процессов. В частности, существуют различия между монослоями в поверхностном заряде и потенциале, связывании ионов, взаимодействии с белковыми молекулами и т. д. Гликолипидный компонент внешнего монослоя и взаимодействие с цитоскелетом во внутреннем монослое позволяют мембране за счет углубления асимметрии приобрести важные функциональные свойства. Необходимо более критичный подход к многочисленным результатам, полученным с упрощенными аналогами биомембран – липидными и белково-липидными бислойными структурами. В попытках описания и моделирования свойств клеточных мембран существует актуальная потребность отхода от двухмерности (что сводит анализ лишь в плоскость мембраны) и перехода к более реалистичным трехмерным моделям.*

*Ключевые слова: биологические мембраны, микродомены и рафты, трансмембранное распределение липидов, модели биомембран.*

## REFERENCES

1. Singer S. J., Nicolson G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes // *Science*.–1972.–175, N 4023.–P. 720–731.
2. Somerharju P., Virtanen J. A., Cheng K. H. Lateral organisation of membrane lipids. The superlattice view // *Biochim. Biophys. Acta*.–1999.–1440, N 1.–P. 32–48.
3. Vereb G., Szollosi J., Matko J., Nagy P., Farkas T., Vigh L., Matyus L., Waldmann T. A., Damjanovich S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*.–2003.–100, N 14.–P. 8053–8058.
4. Hancock J. F. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*.–2006.–7, N 6.–P. 456–462.



5. Shaikh S. R., Edidin M. A. Membranes are not just rafts // *Chem. Phys. Lipids.*—2006.—**144**, N 1.—P. 1–3.
6. Kusumi A., Shirai Y. M., Koyama-Honda I., Suzuki K. G., Fujiwara T. K. Hierarchical organization of the plasma membrane: investigations by single-molecule tracking vs. fluorescence correlation spectroscopy // *FEBS Lett.*—2010.—**584**, N 9.—P. 1814–1823.
7. Nichols B. Cell biology: without a raft // *Nature.*—2005.—**436**, N 7051.—P. 638–639.
8. Munro S. Lipid rafts: elusive or illusive? // *Cell.*—2003.—**115**, N 4.—P. 377–388.
9. Quinn P. J. A lipid matrix model of membrane raft structure // *Prog. Lipid Res.*—2010.—**49**, N 4.—P. 390–406.
10. Frye L. D., Edidin M. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons // *J. Cell Sci.*—1970.—**7**, N 2.—P. 319–335.
11. Stefanova L., Horejsi V., Ansotegui I. J., Knapp W., Stockinger H. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases // *Science.*—1991.—**254**, N 5034.—P. 1016–1019.
12. Brown D. The tyrosine kinase connection: how GPI-anchored proteins activate T cells // *Curr. Opin. Immunol.*—1993.—**5**, N 3.—P. 349–354.
13. Karnovsky M. J., Kleinfeld A. M., Hoover R. L., Klausner R. D. The concept of lipid domains in membranes // *J. Cell Biol.*—1982.—**94**, N 1.—P. 1–6.
14. London E. How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells // *Biochim. Biophys. Acta.*—2005.—**1746**, N 3.—P. 203–220.
15. Lichtenberg D., Goni F. M., Heerklotz H. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts // *Trends Biochem. Sci.*—2005.—**30**, N 8.—P. 430–436.
16. Morris R. J., Jen A., Warley A. Isolation of nano-meso scale detergent resistant membrane that has properties expected of lipid «rafts» // *J. Neurochem.*—2011.—**116**, N 5.—P. 671–677.
17. Anderson R. G., Jacobson K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains // *Science.*—2002.—**296**, N 5574.—P. 1821–1825.
18. Brown D. A. Analysis of raft affinity of membrane proteins by detergent-insolubility // *Methods Mol. Biol.*—2007.—**398**—P. 9–20.
19. Zidovetzki R., Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies // *Biochim. Biophys. Acta.*—2007.—**1768**, N 6.—P. 1311–1324.
20. Shvartsman D. E., Gutman O., Tietz A., Henis Y. I. Cyclodextrins but not compactin inhibit the lateral diffusion of membrane proteins independent of cholesterol // *Traffic.*—2006.—**7**, N 7.—P. 917–926.
21. Chapkin R. S., Wang N., Fan Y. Y., Lupton J. R., Prior I. A. Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains // *Biochim. Biophys. Acta.*—2008.—**1778**, N 2.—P. 466–471.
22. Marks D. L., Bittman R., Pagano R. E. Use of Bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells // *Histochem. Cell Biol.*—2008.—**130**, N 5.—P. 819–832.
23. Juhasz J., Davis J. H., Sharom F. J. Fluorescent probe partitioning in giant unilamellar vesicles of «lipid raft» mixtures // *Biochem. J.*—2010.—**430**, N 3.—P. 415–423.
24. Gimpl G., Gehrig-Burger K. Probes for studying cholesterol binding and cell biology // *Steroids.*—2011.—**76**, N 3.—P. 216–231.
25. Klymchenko A. S., Stoeckel H., Takeda K., Mely Y. Fluorescent probe based on intramolecular proton transfer for fast ratiometric measurement of cellular transmembrane potential // *J. Phys. Chem. B.*—2006.—**110**, N 27.—P. 13624–13632.
26. Kiss E., Nagy P., Balogh A., Szollosi J., Matko J. Cytometry of raft and caveola membrane microdomains: from flow and imaging techniques to high throughput screening assays // *Cytometry A.*—2008.—**73**, N 7.—P. 599–614.
27. Garcia-Saez A. J., Schwill P. Surface analysis of membrane dynamics // *Biochim. Biophys. Acta.*—2010.—**1798**, N 4.—P. 766–776.
28. Eggeling C., Ringemann C., Medda R., Schwarzmann G., Sandhoff K., Polyakova S., Belov V. N., Hein B., von Middendorff C., Schonle A., Hell S. W. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell // *Nature.*—2009.—**457**, N 7233.—P. 1159–1162.
29. Wenger J., Conchonaud F., Dintinger J., Wawrzyniec L., Ebbesen T. W., Rigneault H., Marguet D., Lenne P. F. Diffusion analysis within single nanometric apertures reveals the ultrafine cell membrane organization // *Biophys. J.*—2007.—**92**, N 3.—P. 913–919.
30. van Zanten T. S., Cambi A., Garcia-Parajo M. F. A nanometer scale optical view on the compartmentalization of cell membranes // *Biochim. Biophys. Acta.*—2010.—**1798**, N 4.—P. 777–787.
31. Day C. A., Kenworthy A. K. Tracking microdomain dynamics in cell membranes // *Biochim. Biophys. Acta.*—2009.—**1788**, N 1.—P. 245–253.
32. Ritchie K., Shan X. Y., Kondo J., Iwasawa K., Fujiwara T., Kusumi A. Detection of non-Brownian diffusion in the cell membrane in single molecule tracking // *Biophys. J.*—2005.—**88**, N 3.—P. 2266–2277.
33. He H. T., Marguet D. Detecting nanodomains in living cell membrane by fluorescence correlation spectroscopy // *Annu. Rev. Phys. Chem.*—2011.—**62**—P. 417–436.
34. Wawrzyniec L., Rigneault H., Marguet D., Lenne P. F. Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the sub-micron cell membrane organization // *Biophys. J.*—2005.—**89**, N 6.—P. 4029–4042.
35. Loura L. M., de Almeida R. F., Silva L. C., Prieto M. FRET analysis of domain formation and properties in complex membrane systems // *Biochim. Biophys. Acta.*—2009.—**1788**, N 1.—P. 209–224.
36. Rao M., Mayor S. Use of Forster's resonance energy transfer microscopy to study lipid rafts // *Biochim. Biophys. Acta.*—2005.—**1746**, N 3.—P. 221–233.
37. Levitt J. A., Matthews D. R., Ameer-Beg S. M., Suhling K. Fluorescence lifetime and polarization-resolved imaging in cell biology // *Curr. Opin. Biotechnol.*—2009.—**20**, N 1.—P. 28–36.
38. de Almeida R. F., Loura L. M., Prieto M. Membrane lipid domains and rafts: current applications of fluorescence lifetime spectroscopy and imaging // *Chem. Phys. Lipids.*—2009.—**157**, N 2.—P. 61–77.
39. Gavutis M., Lata S., Piehler J. Probing 2-dimensional protein-protein interactions on model membranes // *Nat. Protoc.*—2006.—**1**, N 4.—P. 2091–2103.
40. Bagatolli L. A., Ipsen J. H., Simonsen A. C., Mouritsen O. G. An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes // *Prog. Lipid Res.*—2010.—**49**, N 4.—P. 378–389.
41. Almeida P. F., Pokorny A., Hinderliter A. Thermodynamics of membrane domains // *Biochim. Biophys. Acta.*—2005.—**1720**, N 1–2.—P. 1–13.
42. Turner M. S., Sens P., Socci N. D. Nonequilibrium raftlike membrane domains under continuous recycling // *Phys. Rev. Lett.*—2005.—**95**, N 16.—P. 168301.
43. Perlmutter J. D., Sachs J. N. Interleaflet interaction and asymmetry in phase separated lipid bilayers: molecular dynamics simulations // *J. Am. Chem. Soc.*—2011.—**133**, N 17.—P. 6563–6577.

44. *Silva L. C., Futerman A. H., Prieto M.* Lipid raft composition modulates sphingomyelinase activity and ceramide-induced membrane physical alterations // *Biophys. J.*—2009.—**96**, N 8.—P. 3210–3222.
45. *Nicolini C., Baranski J., Schlummer S., Palomo J., Lumbierres-Burgues M., Kahms M., Kuhlmann J., Sanchez S., Gratton E., Waldmann H., Winter R.* Visualizing association of N-ras in lipid microdomains: influence of domain structure and interfacial adsorption // *J. Am. Chem. Soc.*—2006.—**128**, N 1.—P. 192–201.
46. *Marsh D.* Protein modulation of lipids, and vice-versa, in membranes // *Biochim. Biophys. Acta.*—2008.—**1778**, N 7–8.—P. 1545–1575.
47. *Bacia K., Schuette C. G., Kahya N., Jahn R., Schwille P.* SNAREs prefer liquid-disordered over «raft» (liquid-ordered) domains when reconstituted into giant unilamellar vesicles // *J. Biol. Chem.*—2004.—**279**, N 36.—P. 37951–37955.
48. *Lingwood D., Ries J., Schwille P., Simons K.* Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—2008.—**105**, N 29.—P. 10005–10010.
49. *Baumgart T., Hammond A. T., Sengupta P., Hess S. T., Holowka D. A., Baird B. A., Webb W. W.* Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—2007.—**104**, N 9.—P. 3165–3170.
50. *Veatch S. L., Cicuta P., Sengupta P., Honerkamp-Smith A., Holowka D., Baird B.* Critical fluctuations in plasma membrane vesicles // *ACS Chem. Biol.*—2008.—**3**, N 5.—P. 287–293.
51. *Fantini J., Barrantes F. J.* Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function // *Biochim. Biophys. Acta.*—2009.—**1788**, N 11.—P. 2345–2361.
52. *Loor F.* Plasma membrane and cell cortex interactions in lymphocyte functions // *Adv. Immunol.*—1980.—**30**.—P. 1–120.
53. *Spiegel S., Kassis S., Wilchek M., Fishman P. H.* Direct visualization of redistribution and capping of fluorescent gangliosides on lymphocytes // *J. Cell Biol.*—1984.—**99**, N 5.—P. 1575–1581.
54. *Delaunay J. L., Breton M., Trugnan G., Maurice M.* Differential solubilization of inner plasma membrane leaflet components by Lubrol WX and Triton X-100 // *Biochim. Biophys. Acta.*—2008.—**1778**, N 1.—P. 105–112.
55. *Boon J. M., Smith B. D.* Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes // *Med. Res. Rev.*—2002.—**22**, N 3.—P. 251–281.
56. *Seigneuret M., Devaux P. F.* ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—1984.—**81**, N 12.—P. 3751–3755.
57. *McIntyre J. C., Sleight R. G.* Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry // *Biochemistry.*—1991.—**30**, N 51.—P. 11819–11827.
58. *Ramirez D. M., Ogilvie W. W., Johnston L. J.* NBD-cholesterol probes to track cholesterol distribution in model membranes // *Biochim. Biophys. Acta.*—2010.—**1798**, N 3.—P. 558–568.
59. *Best M. D., Rowland M. M., Bostic H. E.* Exploiting bioorthogonal chemistry to elucidate protein-lipid binding interactions and other biological roles of phospholipids // *Acc. Chem. Res.*—2011.—**44**, N 9.—P. 686–698.
60. *van Engeland M., Nieland L. J., Ramaekers F. C., Schutte B., Reutelingsperger C. P.* Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure // *Cytometry.*—1998.—**31**, N 1.—P. 1–9.
61. *Ohno-Iwashita Y., Shimada Y., Hayashi M., Iwamoto M., Iwashita S., Inomata M.* Cholesterol-binding toxins and anti-cholesterol antibodies as structural probes for cholesterol localization // *Subcell. Biochem.*—2010.—**51**.—P. 597–621.
62. *Chap H. J., Zwaal R. F., van Deenen L. L.* Action of highly purified phospholipases on blood platelets. Evidence for an asymmetric distribution of phospholipids in the surface membrane // *Biochim. Biophys. Acta.*—1977.—**467**, N 2.—P. 146–164.
63. *Zachowski A.* Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement // *Biochem. J.*—1993.—**294**, Pt 1.—P. 1–14.
64. *Kiessling V., Wan C., Tamm L. K.* Domain coupling in asymmetric lipid bilayers // *Biochim. Biophys. Acta.*—2009.—**1788**, N 1.—P. 64–71.
65. *Rog T., Pasenkiewicz-Gierula M., Vattulainen I., Karttunen M.* Ordering effects of cholesterol and its analogues // *Biochim. Biophys. Acta.*—2009.—**1788**, N 1.—P. 97–121.
66. *Wang T. Y., Silvius J. R.* Cholesterol does not induce segregation of liquid-ordered domains in bilayers modeling the inner leaflet of the plasma membrane // *Biophys. J.*—2001.—**81**, N 5.—P. 2762–2773.
67. *Martinez-Seara H., Rog T., Pasenkiewicz-Gierula M., Vattulainen I., Karttunen M., Reigada R.* Interplay of unsaturated phospholipids and cholesterol in membranes: effect of the double bond position // *Biophys. J.*—2008.—**95**, N 7.—P. 3295–3305.
68. *Di Paolo G., De Camilli P.* Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics // *Nature.*—2006.—**443**, N 7112.—P. 651–657.
69. *Fadeel B., Xue D.* The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*—2009.—**44**, N 5.—P. 264–277.
70. *Mesmin B., Maxfield F. R.* Intracellular sterol dynamics // *Biochim. Biophys. Acta.*—2009.—**1791**, N 7.—P. 636–645.
71. *Lange Y., Steck T. L.* Cholesterol homeostasis and the escape tendency (activity) of plasma membrane cholesterol // *Prog. Lipid Res.*—2008.—**47**, N 5.—P. 319–332.
72. *Epanand R. M.* Proteins and cholesterol-rich domains // *Biochim. Biophys. Acta.*—2008.—**1778**, N 7–8.—P. 1576–1582.
73. *Contreras F. X., Sanchez-Magraner L., Alonso A., Goni F. M.* Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes // *FEBS Lett.*—2010.—**584**, N 9.—P. 1779–1786.
74. *Poulsen L. R., Lopez-Marques R. L., Palmgren M. G.* Flippases: still more questions than answers // *Cell. Mol. Life Sci.*—2008.—**65**, N 20.—P. 3119–3125.
75. *Devaux P. F., Herrmann A., Ohlwein N., Kozlov M. M.* How lipid flippases can modulate membrane structure // *Biochim. Biophys. Acta.*—2008.—**1778**, N 7–8.—P. 1591–1600.
76. *Demchenko A. P., Yesylevskyy S. O.* Nanoscopic description of biomembrane electrostatics: results of molecular dynamics simulations and fluorescence probing // *Chem. Phys. Lipids.*—2009.—**160**, N 2.—P. 63–84.
77. *Pohl A., Lopez-Montero I., Rouviere F., Giusti F., Devaux P. F.* Rapid transmembrane diffusion of ceramide and dihydroceramide spin-labelled analogues in the liquid ordered phase // *Mol. Membr. Biol.*—2009.—**26**, N 3.—P. 194–204.
78. *Bennett W. F., MacCallum J. L., Hinner M. J., Marrink S. J., Tieleman D. P.* Molecular view of cholesterol flip-flop and chemical potential in different membrane environments // *J. Am. Chem. Soc.*—2009.—**131**, N 35.—P. 12714–12720.
79. *Sanyal S., Menon A. K.* Flipping lipids: why an' what's the reason for? // *ACS Chem. Biol.*—2009.—**4**, N 11.—P. 895–909.
80. *Collins M. D.* Interleaflet coupling mechanisms in bilayers of lipids and cholesterol // *Biophys. J.*—2008.—**94**, N 5.—P. L32–34.
81. *Collins M. D., Keller S. L.* Tuning lipid mixtures to induce or suppress domain formation across leaflets of unsupported asym-

- metric bilayers // Proc. Natl Acad. Sci. USA.–2008.–**105**, N 1.–P. 124–128.
82. *Putzel G. G., Schick M.* Phase behavior of a model bilayer membrane with coupled leaves // Biophys. J.–2008.–**94**, N 3.–P. 869–877.
  83. *Horner A., Antonenko Y. N., Pohl P.* Coupled diffusion of peripherally bound peptides along the outer and inner membrane leaflets // Biophys. J.–2009.–**96**, N 7.–P. 2689–2695.
  84. *Gri G., Molon B., Manes S., Pozzan T., Viola A.* The inner side of T cell lipid rafts // Immunol. Lett.–2004.–**94**, N 3.–P. 247–252.
  85. *Wu M., Holowka D., Craighead H. G., Baird B.* Visualization of plasma membrane compartmentalization with patterned lipid bilayers // Proc. Natl Acad. Sci. USA.–2004.–**101**, N 38.–P. 13798–13803.
  86. *Westerlund B., Slotte J. P.* How the molecular features of glycosphingolipids affect domain formation in fluid membranes // Biochim. Biophys. Acta.–2009.–**1788**, N 1.–P. 194–201.
  87. *Prinetti A., Loberto N., Chigorno V., Sonnino S.* Glycosphingolipid behaviour in complex membranes // Biochim. Biophys. Acta.–2009.–**1788**, N 1.–P. 184–193.
  88. *Mishra S., Joshi P. G.* Lipid raft heterogeneity: an enigma // J. Neurochem.–2007.–**103**, Suppl 1.–P. 135–142.
  89. *Valensin S., Paccani S. R., Ulivieri C., Mercati D., Pacini S., Patrussi L., Hirst T., Lupetti P., Baldari C. T.* F-actin dynamics control segregation of the TCR signaling cascade to clustered lipid rafts // Eur. J. Immunol.–2002.–**32**, N 2.–P. 435–446.
  90. *Chichili G. R., Rodgers W.* Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure // Cell. Mol. Life Sci.–2009.–**66**, N 14.–P. 2319–2328.
  91. *Meiri K. F.* Membrane/cytoskeleton communication // Subcell. Biochem.–2004.–**37**.–P. 247–282.
  92. *Andrews N. L., Lidke K. A., Pfeiffer J. R., Burns A. R., Wilson B. S., Oliver J. M., Lidke D. S.* Actin restricts FcεRI diffusion and facilitates antigen-induced receptor immobilization // Nat. Cell Biol.–2008.–**10**, N 8.–P. 955–963.
  93. *Kabouridis P. S.* Lipid rafts in T cell receptor signalling // Mol. Membr. Biol.–2006.–**23**, N 1.–P. 49–57.
  94. *Doherty G. J., McMahon H. T.* Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions // Annu. Rev. Biophys.–2008.–**37**.–P. 65–95.
  95. *Manno S., Takakuwa Y., Mohandas N.* Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability // Proc. Natl Acad. Sci. USA.–2002.–**99**, N 4.–P. 1943–1948.
  96. *Demchenko A. P., Mely Y., Duportail G., Klymchenko A. S.* Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes // Biophys. J.–2009.–**96**, N 9.–P. 3461–3470.
  97. *Yeung T., Gilbert G. E., Shi J., Silvius J., Kapus A., Grinstein S.* Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization // Science.–2008.–**319**, N 5860.–P. 210–213.
  98. *Gurtovenko A. A., Vattulainen I.* Effect of NaCl and KCl on phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine lipid membranes: insight from atomic-scale simulations for understanding salt-induced effects in the plasma membrane // J. Phys. Chem. B.–2008.–**112**, N 7.–P. 1953–1962.
  99. *Gurtovenko A. A., Vattulainen I.* Intrinsic potential of cell membranes: opposite effects of lipid transmembrane asymmetry and asymmetric salt ion distribution // J. Phys. Chem. B.–2009.–**113**, N 20.–P. 7194–7198.
  100. *Lee S. J., Song Y., Baker N. A.* Molecular dynamics simulations of asymmetric NaCl and KCl solutions separated by phosphatidylcholine bilayers: potential drops and structural changes induced by strong Na<sup>+</sup>-lipid interactions and finite size effects // Biophys. J.–2008.–**94**, N 9.–P. 3565–3576.
  101. *Vacha R., Jurkiewicz P., Petrov M., Berkowitz M. L., Bockmann R. A., Barucha-Kraszewska J., Hof M., Jungwirth P.* Mechanism of interaction of monovalent ions with phosphatidylcholine lipid membranes // J. Phys. Chem. B.–2010.–**114**, N 29.–P. 9504–9509.
  102. *Demchenko A. P.* Introduction to fluorescence sensing.– Amsterdam: Springer, 2009.–590 p.
  103. *Demchenko A. P.* The concept of lambda-ratiometry in fluorescence sensing and imaging // J. Fluoresc.–2010.–**20**, N 5.–P. 1099–1128.
  104. *Klymchenko A. S., Duportail G., Ozturk T., Pivovarenko V. G., Mely Y., Demchenko A. P.* Novel two-band ratiometric fluorescence probes with different location and orientation in phospholipid membranes // Chem. Biol.–2002.–**9**, N 11.–P. 1199–1208.
  105. *Millard A. C., Jin L., Wei M. D., Wuskell J. P., Lewis A., Loew L. M.* Sensitivity of second harmonic generation from styryl dyes to transmembrane potential // Biophys. J.–2004.–**86**, N 2.–P. 1169–1176.
  106. *Jin L., Millard A. C., Wuskell J. P., Dong X., Wu D., Clark H. A., Loew L. M.* Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains // Biophys. J.–2006.–**90**, N 7.–P. 2563–2575.
  107. *Kim H. M., Choo H. J., Jung S. Y., Ko Y. G., Park W. H., Jeon S. J., Kim C. H., Joo T., Cho B. R.* A two-photon fluorescent probe for lipid raft imaging: C-laurdan // ChemBiochem.–2007.–**8**, N 5.–P. 553–559.
  108. *Kim H. M., Jeong B. H., Hyon J. Y., An M. J., Seo M. S., Hong J. H., Lee K. J., Kim C. H., Joo T., Hong S. C., Cho B. R.* Two-photon fluorescent turn-on probe for lipid rafts in live cell and tissue // J. Am. Chem. Soc.–2008.–**130**, N 13.–P. 4246–4247.
  109. *Shynkar V. V., Klymchenko A. S., Kunzelmann C., Duportail G., Muller C. D., Demchenko A. P., Freyssinet J. M., Mely Y.* Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis // J. Am. Chem. Soc.–2007.–**129**, N 7.–P. 2187–2193.
  110. *Goldenberg N. M., Steinberg B. E.* Surface charge: a key determinant of protein localization and function // Cancer Res.–2010.–**70**, N 4.–P. 1277–1280.
  111. *Hynes R. O.* Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines // Cell.–2002.–**110**, N 6.–P. 673–687.
  112. *Chichili G. R., Westmuckett A. D., Rodgers W.* T cell signal regulation by the actin cytoskeleton // J. Biol. Chem.–2010.–**285**, N 19.–P. 14737–14746.
  113. *Yokosuka T., Saito T.* The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation // Curr. Top. Microbiol. Immunol.–2010.–**340**.–P. 81–107.
  114. *van Meer G.* Cellular lipidomics // EMBO J.–2005.–**24**, N 18.–P. 3159–3165.

Received 07.06.11