



УДК 577.22

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ РАФТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

© 2020 г. В. А. Радюхин*, #, Л. А. Баратова*

*Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

Поступила в редакцию 01.10.2019 г.

После доработки 12.12.2019 г.

Принята к публикации 12.12.2019 г.

В обзоре суммируются и анализируются актуальные аспекты в исследовании механизмов формирования рафтов (плотов) модельных и биологических мембран, при этом делается акцент на дискриминации механизмов, определяющих формирование и поддержание рафтовых доменов как динамических структур в модельных и биологических мембранах и значении мембранных белков. Подробно рассматривается дискуссионный вопрос о роли специфических холестерин-распознающих аминокислотных консенсусных (CRAC) мотивов мембранных белков, а также роль на молекулярном уровне отдельных аминокислот в формировании рафтов и рафтовых биомембран в целом. Особое внимание уделяется структурной организации липидных мембран оболочечных вирусов с мембранами рафтовой природы как объектов, наглядно иллюстрирующих основные механизмы формирования и поддержания рафтов биологических мембран.

Ключевые слова: липидные мембраны, рафты, мембранные белки, холестерин-распознающие аминокислотные консенсусные (CRAC) мотивы, амфипатические элементы вторичной структуры белков

DOI: 10.31857/S0132342320030264

ВВЕДЕНИЕ

Биологические мембраны являются одним из важнейших структурных компонентов биологических систем, включая клетки, внутриклеточные органеллы, многие вирусы и др. Они представляют собой барьер, отделяющий внутреннюю среду любой биологической системы от внешнего окружения. Наличие такого уникального барьера является имманентным свойством высокоорганизованной живой системы, так как позволяет разделять и в то же время согласовывать множество биохимических реакций и процессов в ней. Принципиальной особенностью биологических мембран является то, что они состоят главным образом из липидов, в которых, как полагали, свободно движутся мембранные белки. Эта концепция “мозаичной модели” была выдвинута Сингером и Николсоном в 1972 г. [1]. Однако, по мере накопления новых данных возникла более сложная концепция существования в биомембранах динамичных упорядоченных микро- и нанодоменов, так называемых мембранных рафтов (плотов), обогащенных сфинголипидами и стеринами

соединениями, в первую очередь холестерином, а также мембранными белками.

В данном обзоре излагаются экспериментальные и концептуальные достижения последних лет в изучении и осмыслении феномена формирования липидных рафтов в биомембранах и критически рассматриваются проблемы, возникающие в этой области мембранологии.

ОБЩЕЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О РАФТАХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Концепция липидных рафтов, являющихся результатом латеральной сегрегации отдельных компонентов в липидных мембранах, появилась в биофизике более 40 лет назад в качестве объяснения с позиций термодинамики факта сосуществования более одной липидной фазы в модельных гидратированных фосфолипидных бислоях. Эти факты изначально были использованы для объяснения механизмов особенностей формирования апикальной мембраны эпителиальных клеток [2], а также передачи сигналов, модулирующих клеточную активность посредством мембранных рецепторов, и трансмембранного переноса. Концепция постулировала наличие липидных рафтов в биологических мембранах как более упорядоченных и плотно упакованных структур в окружающем флюидном слое липидов [3, 4].

Сокращения: CRAC — холестерин-распознающий аминокислотный консенсус.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 939-54-08; факс: +7 (495) 939-31-81; эл. почта: varvic@belozersky.msu.ru).

Сумма новых знаний и экспериментальных наработок в этой области мембранологии, полученных в последнее время, позволяет считать, что рафтовые липидные домены являются одним из всеобщих принципов, организующих функционирование биологических мембран.

Позднее взгляд на биологическую мембрану был также дополнен независимым представлением о присущей мембране “дефектности” и, соответственно, анизотропии вследствие значительных различий в структуре, форме, заряде и размерах молекул множества липидов, входящих в ее состав. Несмотря на то, что межмолекулярные взаимодействия между этими молекулами не столь велики, синэргетический эффект общей массы липидов способен привести к формированию нано- и микродоменов различной плотности как в природных, так и в модельных мембранах. Примечательно, что в данной концепции делается акцент на значительном вкладе амфипатических альфа-спиралей мембран-активных белков в механизмы структурного переформатирования биомембран [5].

Общие представления о существовании различных фаз в липидных бислоях были получены при экспериментальных исследованиях упрощенных модельных мембран физическими методами. На фосфолипидных модельных смесях было обнаружено их важное свойство: при определенной температуре, зависящей от липидного состава системы, липиды подвергаются фазовому переходу из гелевой фазы (S_0) в жидко-неупорядоченную фазу (L_d). Латеральная подвижность липидов, которая сильно ограничена в фазе S_0 , при повышении температуры значительно увеличивается, остатки жирных кислот становятся неупорядоченными и не удерживаются более в плотно упакованной жесткой конформации.

Если мембрана содержит также холестерин, возможно появление и третьей фазы, жидко-упорядоченной (L_0). Считается, что эта фаза характеризуется высокой степенью упорядоченности ацильных остатков жирных кислот в липидах, что типично для фазы S_0 , но с повышенной латеральной подвижностью, характерной для фазы L_d . В мембранах, состоящих из смесей сфингомиелина, ненасыщенных фосфолипидов и холестерина в определенных соотношениях, фазы L_0 и L_d могут сосуществовать [6, 7]. Липиды рафтовых микродоменов отличаются высокой степенью упорядоченности ацильных остатков высших жирных кислот (жидкоупорядоченная фаза L_0). Холестерин, как установлено, повышает упорядоченность ацильных остатков жирных кислот молекул фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в липидных бислоях, особенно в повышенных концентрациях порядка 45 мол. % [8].

По современным представлениям липидные рафты образуются спонтанно в природных мембранах. Они имеют размеры <10 нм и очень неустойчивы и динамичны. Большие по размеру и более устойчивые рафтовые домены (10–300 нм)

могут образовываться из нанодоменов только под влиянием межбелковых взаимодействий или при ассоциации белков. Липиды рафтовых микродоменов отличаются высокой степенью упорядоченности ацильных остатков высших жирных кислот (жидкоупорядоченная фаза L_0), а сами рафты функционируют как агенты для концентрирования мембранных и мембран-ассоциированных белков. Такие липид-белковые ансамбли рассматриваются в качестве своеобразных платформ, где разворачиваются различные биохимические процессы [9–11]. Предполагается, что именно активная концентрация белков в рафтах и способствует образованию межбелковых взаимодействий и активизации функций мембранных и мембран-ассоциированных белков.

Белки с трансмембранными (ТМ) доменами или другими якорными группами (прежде всего гликозилфосфатидилинозитола, GPI) концентрируются в рафтах, стабилизируя липиды в фазе L_0 , которая и придает рафтам в биомембране большую жесткость, плотность и толщину.

Кроме того, бислоидная липидная мембрана обладает транслатеральной асимметрией, и рафты могут существовать независимо друг от друга во внешнем и внутреннем листах биомембраны [12].

В последнее время с помощью разнообразных экспериментальных техник прямой визуализации (флуоресцентные методы), атомно-силовой микроскопии (АСМ), малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) и др., а также компьютерного моделирования и методов липидомики с применением количественной масс-спектрометрии достаточно убедительно показано наличие в плоскости природных и модельных мембран упорядоченных доменов, обогащенных сфинголипидами и холестерином [13–16].

РОЛЬ ЛИПИД-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ МЕМБРАННЫХ РАФТОВ

До настоящего времени остаются предметом дискуссий молекулярные основы формирования рафтов, поддержания их структуры в клеточных мембранах, а также роль в этом мембранных белков [6, 17]. Основным классическим биохимическим методом выделения рафтовых образований (структур) является холодовая солюбилизация неионными детергентами. Так, выделение GPI-заякоренных мембранных белков во фракции так называемых детергент-устойчивых (рафтовых) мембран [18, 19] исходно основывается на предположении, что такие мембранные домены, находясь в фазе L_0 , формируются/модулируются предпочтительными взаимодействиями белков с холестерином и сфинголипидами и устойчивы к солюбилизации при пониженной температуре неионными детергентами. В альтернативном подходе, при изучении поведения рафтовых маркеров в плазматических мембранах после обработки агентами, разрушающими цитоскелет, было по-

казано, что локализация GPI-заякоренных белков более зависима от структурной организации актинового кортекса клетки, чем от взаимодействия с холестерином в рафтах [20].

Наблюдение диффузии индивидуальных флуоресцентно меченых молекул сфинголипидов в мембране выявило, что удержание в рафтах сфинголипидов зависит не столько от холестерина, сколько от организации актина в цитоскелете; то есть, рафтовые структуры, вероятно, формируются в клеточной мембране преимущественно под влиянием белков, а не холестерина, как в модельных мембранах [21]. Приведенные данные хорошо согласуются с тем фактом, что мембрана клетки разделена на отсеки барьерами, образованными цитоскелетом, что ограничивает диффузию как мембранных белков, так и липидов [22].

На основании результатов, полученных методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии, также можно полагать, что диффузия мембранных белков зависит как от липидов, так и от цитоскелета [23]. Основательно подтверждают эту точку зрения замечательные результаты и недавнего исследования, в котором методом вторичной ионной масс-спектрометрии высокого разрешения (SIMS) на культуре фибробластов выявлено наличие кластеров сфинголипидных нанодоменов в плазматических мембранах размером ~200 нм, причем эти домены не были обогащены холестерином. Обращает особое внимание факт, что предварительная обработка препаратов метил-бета-циклодекстрином, экстрагирующим холестерин из мембран и разрушающим рафты, снижало содержание холестерина на 30%, но не уничтожало сфинголипидные рафты. Однако, разрушение актинового цитоскелета клеток латрункулином (latrunculin) приводило к их исчезновению [24, 25].

На основании других данных можно сделать вывод, что подвижность и устойчивость фазы Lo в мембране модулируется гибким перераспределением холестерина в мембране: методом SAXS на гидратированных мультиламеллярных везикулах в модельных смешанных липидных слоях с холестерином и фосфолипидами было продемонстрировано, что индуцируемое температурой плавление (т.е. разрушение) Lo доменов связано с диффузией холестерина в фазу Ld и контролируется разницей в толщине фаз Lo/Ld [26]. Принципиальный вопрос, как соотносится липидная фаза Lo модельных мембран с рафтовыми образованиями биологических мембран, разрешается до некоторой степени в ряде независимых исследований, в которых подчеркивается значение взаимосвязи длины остатков высших жирных кислот природных сфинголипидов с их функциональным вкладом в организацию биологической мембраны как динамичной биохимической системы. В модельных мембранах обычно используется минимальный набор сфинголипидов с относительно короткими жирными кислотами (C_{16}/C_{18}). В природной мембране, особенно рафтовой при-

роды, сфинголипиды характеризуются большим разнообразием за счет наличия в своей структуре высших жирных кислот с существенно большим числом звеньев — C_{24} и более [15, 27]. Такое разнообразие, как полагают, лежит в основе гибкого регулирования межмолекулярных взаимодействий в мембране как отдельных сфинголипидов между собой, так и с холестерином. При этом выявляется факт взаимозависимой транслатеральной асимметрии в распределении как холестерина, так и различных сфинголипидов между двумя липидными листами в биологической мембране. Комплексное исследование на модельных системах гигантских (GUV) и больших (LUV) везикул, симулирующих мембраны с рафтовым составом липидов, показывает, что в смеси сфингомиелины с остатками жирных кислот C_{24} и C_{16} проявляют различия при взаимодействии с холестерином в липидном бислое. C_{24} сфингомиелин, в отличие от C_{16} сфингомиелина, в присутствии холестерина имеет тенденцию к транслатеральным переходам в бислойной мембране благодаря большему несоответствию между усиленной гидрофобной частью молекул (т.е. увеличенной длиной жирнокислотного остатка) и размером полярной части сфингозинового основания, ведущему к образованию дефектов — гидрофобных полостей в липидном слое. Как результат, имеет место перераспределение холестерина во внутренний лист бислойной мембраны при преимущественной локализации C_{24} сфингомиелина во внешнем листе и размывании в нем фазы Lo. Примечательно, C_{24} сфингомиелин, в отличие от C_{16} сфингомиелина, при локализации во внешнем листе мембраны GUV полностью предотвращал образование микродоменов (фазы Lo) в нем в широком диапазоне температур (3–30°C) и концентраций холестерина (0–50%). Наблюдения на плазматических мембранах живых клеток HeLa также показали, что C_{24} сфингомиелин, присутствующий в природной мембране преимущественно во внешнем листе, ограничивает образование оптически разрешимых доменов. При этом предполагается, что наблюдаемые эффекты могут быть следствием перераспределения холестерина во внутренний лист мембраны [28].

При исследовании методами флуоресцентной спектроскопии и микроскопии модифицированной линии дрожжей также было показано, что около 80% стерина плазматической мембраны клеток сосредоточено во внутреннем листе, причем на асимметрию распределения стерина влияет транслатеральная асимметрия фосфолипидов и сфинголипидов [29]. Внутренний цитозольный лист в эритроцитах и в нуклеализированных клетках также обогащен холестерином [30]. Предпочтительная ко-локализация холестерина, сфинголипидов и фосфатидилсерина, которыми обогащен внутренний лист биомембраны была ранее продемонстрирована [31]. Полагают, что на молекулярном уровне одним из наиболее значимых эффектов холестерина является упорядочи-

вающее действие на ацильные остатки жирных кислот мембранных липидов. Холестерин представляет собой нейтральное соединение на основе холестереновой структуры с четырьмя жесткими конденсированными циклами, содержащими двойную связь, окси-группу и короткую алкильную цепь. В энергетически выгодном состоянии основная гидрофобная часть холестерина погружена вовнутрь углеводородного слоя из остатков жирных кислот липидов. В этом положении холестерин почти полностью пронизывает один лист бислоевой мембраны, внедряясь своей окси-группой в полярную пограничную область этого листа [32, 33]. Независимые исследования свидетельствуют, что холестерин способен образовывать стехиометрические комплексы с полярными липидами плазматических мембран [34]. В мультикомпонентных липидных смесях холестерин предпочитительно взаимодействует с насыщенными цепями жирных кислот сфинго- и фосфолипидов, которые сами по себе характеризуются высокой температурой фазового перехода из гелевой в жидко-кристаллическую фазу [35]. На гидратированных мультислойных везикулах было продемонстрировано сосуществование L_0 и L_d фаз в модельных смешанных липидных слоях с холестерином и фосфолипидами. L_0 домены оказались на $\sim 10 \text{ \AA}$ толще и латерально более плотными на $\sim 20 \text{ \AA}^2/\text{липид}$, чем L_d домены, и значительно более жесткими. Повышение концентрации холестерина в этой системе приводило к значительным изменениям в структуре фазы L_d , тогда как влияние на фазу L_0 было незначительным [26]. Очевидно, что постоянное перераспределение холестерина и сфинголипидов между двумя листами биомембран под влиянием физико-химических и стерических параметров самих липидов, а также и под направленным воздействием мембранных и мембран-ассоциированных белков и мембранных ферментов (флиппаз), является ключевым процессом в поддержании фазы L_0 в необходимом функциональном состоянии. В целом можно полагать, что холестерин и его аналоги, выступают в роли важнейших модуляторов структурной реорганизации биологической мембраны, гибко определяя ее базовые характеристики (жесткость, кривизна, проницаемость и др.) в процессе функционирования [36, 37].

На наш взгляд, значение роли холестерина как низкомолекулярного биорегулятора многих функций биологических мембран коррелирует с аналогичными функциями многих других родственных стероидных соединений на системном уровне, которые также регулируют и модулируют многие биохимические и физиологические процессы. Соответственно, перенос результатов, полученных на модельных мембранах и других искусственных системах, на живые биологические мембраны требует большой критичности и осторожности [13].

Таким образом, кратко упомянутые выше многочисленные экспериментальные подходы иссле-

дования липидных рафтов, как физико-химические, так и биохимические, часто дают не достаточно однозначные результаты, как полагают, вследствие высокой динамичности и малого размера рафтов в мембранах клеток. Однако можно привести ряд примеров изучения стабилизированных мембранных систем, обогащенных сфинголипидами, холестерином и мембран-активными белками. Рафтоподобные структуры на фиксированных мембранах эритроцитов [38] и на модельных мембранах [39] были прямо визуализированы методом АСМ высокого разрешения. Также неинвазивным химическим методом оказалось возможным специфически окрасить FITC-меченым гликоль-хитозаном рафтовые домены как модельных, так и природных мембран за счет, как полагают, электростатических и/или гидрофобных взаимодействий этого полимерного агента с рафтами [40]. Природными мембранами, в которых липиды организованы во множество рафтовых нанокластеров, стабилизированных взаимодействиями с мембран-активными белками и, очевидно, не представляющими собой динамические образования, являются также липидные оболочки вирионов IFV, вируса болезни Ньюкасла (NDV) и некоторых других оболочечных вирусов [41–43].

Структурная организация вирионов оболочечных вирусов, как и вирусов в целом, представляет собой яркий пример прекрасно аранжированных межмолекулярных взаимодействий белков, липидов и нуклеиновых кислот в составе надмолекулярных комплексов. При этом вирусы являются более простыми объектами, чем клетки и посему более пригодны для детализированных структурных исследований. Так, установлено, что мембрана вирионов ряда оболочечных вирусов существенно отличается по липидному составу от мембраны клетки, из которой они почкуются: она в значительной степени обогащена холестерином и сфинголипидами. Рафтовая природа оболочек ряда вирусов, включая вирус гриппа (IFV) и вирус иммунодефицита человека (HIV), была доказана методом масс-спектрометрии [26, 43]. При этом особенно важным является выявление большого количества сфинголипидов с необычной структурой и отличающихся наличием очень длинных ацильных остатков насыщенных высших жирных кислот в них (например, для вируса гриппа с количеством углеродных звеньев до C_{40} – C_{42} и выше [15]). В настоящее время существует представление, что интегральные мембранные белки многих оболочечных вирусов, находятся в тесной взаимосвязи с микродоменами рафтовой природы в клеточных мембранах. Это предположение подтверждается, в частности, на наблюдаемом группировании белков IFV в составе детергентоустойчивых мембран (рафтов). Структура вирусной оболочки поддерживается тесными взаимодействиями между трансмембранными (ТМ) доменами поверхностных гликопротеидов вирионов и слоем периферического мембранного мат-

риксного (M1) белка, ассоциированным в составе рафтовой мембраны [44].

Большинство интегральных мембранных белков пронизывают мембрану в виде ТМ сегментов, состоящих из пептидных спиралей, часто плотно упакованных в пучки [45, 46], и возможно являются наиболее важным фактором, определяющим толщину мембран [47]. В свою очередь, липидные бислоиные мембраны, в которую эти спирали внедрены, высоко анизотропны, и их физико-химические характеристики, как латеральные, так и транс-латеральные, сильно изменяются даже в пределах малых масштабов. Такая анизотропия влияет на распределение аминокислотных остатков в последовательности ТМ сегментов. Гипотеза гидрофобного соответствия предполагает, что интегральные мембранные белки перестраивают окружающие липиды таким образом, что толщина мембранного бислоя начинает подстраиваться к длине трансмембранного сегмента, а липидные мембраны, содержащие холестерин, имеют тенденцию к повышенной толщине бислоя, по сравнению с мембранами, не имеющими холестерина [48]. Специфический липидный состав рафтов обуславливает более плотную упаковку липидов в их структуре, придавая рафтам жесткость и большую толщину по сравнению с мембраной в целом. При этом межспиральные взаимодействия ТМ сегментов, как отмечается, могут определяться не только утолщением рафтовой мембраны за счет холестерина и высокой упорядоченности остатков жирных кислот: в ряде случаев само-ассоциация возможно происходит благодаря исключению α -спиральных ТМ сегментов из более плотной фазы L_0 в липидных бислоях, причем холестерин, как отмечается, способствует не только межспиральным взаимодействиям, но и инициирует искривление мембранной структуры [49].

Следует особо остановиться на свойствах так называемых бороздчатых (striated) доменов в модельных липидных бислоиных мембранах. Эти домены представляют собой высокоупорядоченные линейные агрегаты липидов и модельных гидрофобных пептидов (poly-LA) с фланкирующими концами из остатков триптофана (пептиды WALP). Тогда как модельные липидные бислои дипальмитоил-фосфатидилхлина являются равномерно гладкими и плоскими, внедрение в них пептидов WALP вызывает появление темных линейных депрессий (борозд), которые затем объединяются в небольшие бороздчатые домены с гексагональной структурой. Методом АСМ было показано, что борозды этих доменов пересекаются под углом $\sim 120^\circ$. Однако в фазе L_0 липидных бислоев, включающих сфингомиелин и холестерин, таких бороздчатых доменов не наблюдалось [45, 47, 49, 51]. Трансмембранные белки очевидно сами не встраиваются вовнутрь рафтовых платформ (липидная фаза L_0), а активно формируют их своими ТМ фрагментами и ассоциируются с их периферией [52], в частности,

встраивание меченого гемагглютиниона (НА) IFV исключительно в липидную фазу L_d было прямо визуализировано методом флуоресцентной микроскопии при встраивании его в гигантские везикулы, содержащие фазы L_0 и L_d [53], а также независимо подтверждено методом компьютерного моделирования [42]. Примечательно, что компьютерная симуляция не только показывает распределение НА в фазу L_d , но также выявляет роль тримерных шипов НА как агентов, активно формирующих фазу L_0 и общую положительную кривизну мембраны с помощью своих ТМ доменов. При этом удается оценить как форму такого образования, близкую к гексагональной, так и его размер (~ 10 – 20 нм) [42]. Эти результаты хорошо соотносятся с экспериментальными данными более ранних работ. Тонкая структура дегидратированных вирионов вируса IFV типа А, исследованных методом электронной микроскопии, как было показано, напоминает икосаэдр с шипами НА, расположенными на поверхности в виде равнобедренных треугольников, которые в свою очередь формируют правильные шести- и пятиугольные элементы с размерами в поперечнике ~ 20 нм [54]. Криоэлектронные микрофотографии вирионов кошачьего пенящего вируса также фиксируют вирионы с фрактальной структурой, образованной гексагональными элементами [55]. В следующей работе были визуализированы рафтоподобные структуры, получаемые при специфической холодовой (рафтовой) солиubilизации комбинацией неионных детергентов оболочек вирионов IFV в виде комплекса НА с липидами и периферическим белком M1. Эти дискретные структуры имели средний размер частиц ~ 28 нм и организовывались в процессе флотации при центрифугировании в градиенте плотности в стабильные везикулы [41].

Примечательно, что похожие гексагональные структурные элементы были зафиксированы также на модельных бислоиных мембранах состава сфингомиелин/холестерин методом высокоскоростной АСМ при взаимодействии олигомеров порообразующего токсина лизенина с мембраной, на которой олигомеры и формируются [39].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ РАФТОВОЙ СТРУКТУРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Архитектура и структурная организация ТМ доменов интегральных мембранных белков и их спиральных ТМ сегментов в бислоиных мембранах подробно освещены в специальных обзорах [45, 47, 56]. В данном разделе целесообразно выделить те особо значимые структурные особенности, которые являются общими для большинства ТМ доменов. В первичной последовательности ТМ доменов аминокислотные остатки расположены характерным образом в профиле бислоиной липидной мембраны, отражающим их структурно-функциональный вклад в организацию липид-белкового ансамбля биологических

мембран [45, 56, 57]. ТМ сегменты этих доменов, как известно, состоят из 20–25 аминокислотных остатков, которые внутри липидного бислоя в основном представлены гидрофобными аминокислотами (**V**, **L**, **I**, **F**, **A**). При этом, остатки **V**, **L**, **I** в виде кластеров находятся преимущественно на внешней стороне пучка скрученных спиралей. Более компактные остатки аланина напротив локализуются преимущественно внутри, способствуя ассоциации α -спиралей в пучке.

Очевидно, именно такая архитектура наиболее надежно скрепляет трансмембранный пучок спиралей одновременно с двумя листами мембраны за счет гидрофобных взаимодействий с ацильными остатками жирных кислот липидов. Фенилаланин (**F**) со своим гидрофобным ароматическим кольцом, лишенным гетероатомов и поляризационных эффектов, также располагается предпочтительно в гидрофобной части ТМ доменов, хотя имеет и более широкое распространение, выполняя вероятно двойственную функцию как гидрофобной, так и ароматической аминокислоты [57, 58]. Тонкая межфазная пограничная область мембран на стыке гидрофобной области внутри мембраны и внешней высокополярной ионизированной и гидратированной среды, окружающей мембрану, обогащена ароматическими остатками **W**, **Y**, а иногда и **H**, которые имеют поляризованные ароматические циклы за счет наличия гетероатомов в **W** и **H** или полярных заместителей в **Y**. Этот тонкий слой мембран, непосредственно обращенный к водной фазе, представляет собой химически разнородную сложную среду, состоящую из структурных элементов глицирина, и поляризованных остатков холина/этанолamina фосфолипидов. Эти элементы образуют пограничную область биологических мембран вместе с полярными группами сфингозинового основания (глико)сфинголипидов, холестерина, и молекул воды. Молекулы сфинголипидов, в отличие от глицерофосфолипидов, обладают более высоким потенциалом взаимодействия как между собой, так и с холестерином за счет существенно большей длины углеводородных остатков жирных кислот (особенно в рафтовых доменах) и также за счет наличия большого количества полярных донорно-акцепторных групп ($-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $>\text{C}=\text{O}$), способных к образованию сложной сети многочисленных водородных связей [6, 59, 60], а также к π -взаимодействиям с ароматическими циклами аминокислот как раз в полярной области на межфазной границе мембранного листа.

Хорошо известно, что межмолекулярные взаимодействия с участием ароматических циклов (π/π , OH/π , NH/π , катион/ π взаимодействия) являются ключевыми процессами во взаимном распознавании молекул по принципу как биологического, так и химического родства. Эти взаимодействия контролируют кристаллическую структуру ароматических молекул, стабильность многих био-

логических систем и процессы молекулярного распознавания в них. Поэтому изучение силы таких взаимодействий и их физической природы очень важны для понимания структур и свойств многих надмолекулярных образований [61]. Наличие этих взаимодействий как раз и подтверждается характерным присутствием в большинстве ТМ доменов поляризованных гетероциклических ароматических остатков **W**, причем, как правило, именно в полярной пограничной области липидной мембраны и вблизи аминокислотных остатков **F**/**Y**. Изучение поведения гидрофобных синтетических пептидов с фланкирующими остатками триптофана (модельные пептиды WALP) в модельных липидных бислоях, а также многих мембранных белков, показывает, что гетероциклический остаток триптофана преимущественно располагается вблизи карбонильных остатков в фосфолипидных бислоях и не вовлекается ни в гидрофобный слой липидов, ни в водную полярную среду. Анализ поведения гидрофобных синтетических пептидов поли-лейцилаланил (poly **LA**) с фланкирующими остатками лизина (модельные пептиды KALP) в липидных бислоях показывает, что положительно заряженные остатки лизина предпочтительно локализуются дальше от полярного пограничного слоя мембран и фиксируются на значительно более полярной ионизированной поверхности мембраны, где они взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными и цвиттерионными группами фосфолипидов. Отмечается, что боковая функция **K** более эффективно связывается с этими группами, чем **R** [47, 56, 62, 63, 68]. Ароматический гетероцикл **H** также способен выступать в роли положительно заряженной аминокислоты при протонировании в диапазоне физиологических значений pH, аналогично **K** и **R**, выполняя функцию своего рода pH-зависимого переключателя и вызывая изменения в липид-белковых взаимодействиях при изменении pH: известно, что рКа имидазольного цикла сильно зависит от локального окружения [47]. Таким образом, положительно заряженные аминокислоты играют важную роль в топологии мембранных белков [45]. То есть, **H**, как и **F**, вероятно может выполнять двойственную функцию при взаимодействиях белков с липидами мембраны.

Компьютерное молекулярно-динамическое моделирование предоставляет дополнительную информацию о том, что гидрофобные углеводородные цепочки боковых остатков **K** и **R** вероятно погружены в гидрофобный слой мембраны, а положительно заряженные группы локализуются в пограничной полярной интерфазе, также как и ароматические циклы. Аналогичная локализация выявляется и для боковых остатков **M**, что можно объяснить наличием сульфометильной группы, характерной чертой которой является высокая поляризованность [58]; такая мембранная активность этой аминокислоты косвенно подтверждается и экспериментальными данными [64]. Несмотря на то, что использованный метод моделирова-

ния имел существенные ограничительные условия, полученные данные позволяют строить предположения о более значительном, чем представлялось, структурно-функциональном вкладе тонкой поляризованной пограничной интерфазы липидной слоя в консолидацию липидов в рафтах под действием мембраноактивных мотивов белков.

Суммируя известные экспериментальные данные и теоретические рассуждения, можно заключить, что липидная бислойная мембрана организована в три принципиальных латеральных макродомена: (i) внутренний гидрофобный, образованный углеводородными остатками жирных кислот липидов, (ii) межфазный пограничный, образованный полярными, но не заряженными, структурными элементами липидов и холестерина, склонными к π -взаимодействиям и формированию водородных связей, и (iii) ионизированная гидратированная поверхность мембраны, содержащая отрицательно заряженные фосфатные и цвиттерийонные группы фосфолипидов.

В соответствии с принципами концепции гидрофобного соответствия и адаптации, то есть согласно базовым свойствам трех принципиальных макродоменов биомембран, осуществляется встраивание ТМ сегментов, а также и других мотивов мембран-активных белков в бислойные мембраны; и это встраивание может модулироваться сродством ароматических и заряженных аминокислотных остатков к соответствующим специфическим межфазным сайтам мембраны. Это заключение подтверждается расчетом количественного вклада каждой из двадцати аминокислот в этот механизм при измерении кажущейся свободной энергии внедрения спиральных ТМ сегментов в биологическую мембрану (ΔG_{app}), и статистическим анализом распределения индивидуальных аминокислот внутри этих фрагментов для множества известных интегральных мембранных белков. На основании этих расчетов, а также и других компьютерных симуляций в сочетании с экспериментальными данными, удалось создать шкалу своего рода "биологической гидрофобности" и определить в виде кривых распределения Гаусса оптимальную позицию внутри липидного бислоя для каждой из 20 аминокислот [57, 58, 65]. Полученные распределения наглядно выявляют тяготение ароматических аминокислот к дислокации как раз у пограничного слоя между липидной мембраной и ионизированной средой, причем **F** имеет тенденцию к размещению внутри мембраны, а **Y** предпочтительно располагается вне мембраны. Функция ароматических остатков, прежде всего **W** и **Y**, заключается в фиксации (anchoring) ТМ сегментов на пограничных полярных интерфазах бислойной мембраны, обращенных к водной среде.

Фиксация полипептидных цепей ТМ сегментов на полярных интерфазах двух листов биомембраны часто необходима для регулирования угла наклона и/или угла вращения ТМ сегментов

внутри липидного бислоя к его нормали, в зависимости от длины ТМ сегмента [56, 65, 66]. При этом в рафтовых мембранах ТМ сегменты локализуются на границе двух липидных фаз, L_o и L_d , и ассоциированы с L_o (рафтовой) фазой, что способствует их олигомеризации.

Положительно заряженные остатки **K**, **R**, локализуясь вне мембраны, ассоциируются с внешней заряженной гидратированной поверхностью мембран, что способствует разрушению олигомерных ассоциатов ТМ доменов в этой области за счет отталкивания одноименных зарядов, что, например, наглядно иллюстрируется компьютерными предсказаниями разупорядоченности цепей эктодомена HA IFV как раз в этой примембранной области [67].

С учетом всего вышеизложенного становится возможным выдвинуть предположение, что важным фактором, формирующим рафтовые домены в биологических мембранах, является консолидирующий потенциал тонкой полярной интерфазы, который основан на синэргетическом взаимодействии множества полярных групп (глико)сфинголипидов. Последние обладают повышенным потенциалом взаимодействия как между собой, так и с холестерином, и таким образом концентрируют эти молекулы в уплотненных рафтовых структурах, что согласуется и с данными исследований модельных мембранных структур сфингомиелина методом ЯМР [68]. Наряду с этим консолидации рафтовых липидов также способствуют усиленные гидрофобные взаимодействия насыщенных углеводородных цепей жирных кислот сфинголипидов, которые имеют значительно большую длину, чем другие липиды мембраны [15]. Поддержание таких мультимолекулярных агрегатов в биомембране в стабильном состоянии, особенно при физиологических температурах [60], вероятно требует дополнительных стабилизирующих структур, своего рода внешних поддерживающих конструкций, в виде специфических мотивов/доменов мембранных и мембран-ассоциированных белков, которые специфически взаимодействуют с рафтовыми липидами.

Таким образом, можно полагать, что изложенные выше структурообразующие принципы на молекулярном уровне в основном реализуются при взаимодействиях как ТМ сегментов интегральных мембранных белков с липидами внутри биологической мембраны, так и периферических мембран-ассоциированных белков, примыкающих к ее поверхности. Эти взаимодействия являются инструментом для формирования и укрепления межфазных пограничных контактов между двумя фазами, L_o и L_d , внутри биологических мембран, а также и на границе мембран с внешней средой электролита.

CRAC МОТИВЫ КАК ВАЖНЕЙШИЙ СТРУКТУРНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ПОДДЕРЖАНИЯ ФУНКЦИЙ РАФТОВЫХ БИОМЕМБРАН

Также как и для интегральных мембранных белков электростатические, гидрофобные и π -взаимодействия, опосредуемые соответственно катионными, алифатическими, и ароматическими аминокислотными остатками, являются определяющими для поверхностного связывания периферических мембран-ассоциированных белков с мембраной. Эти белки или их домены сами по себе не включаются в рафтовые структуры, но могут вносить свой вклад в перераспределение холестерина в мембранах. Известны типы взаимодействия белков с липидами, которые фиксируют холестерин мембраны и таким образом стабилизируют обогащенные холестерином мембранные домены – рафты. Одним из основных аминокислотных консенсусных мотивов, которые способствуют взаимодействию белков с холестерином, является так называемый холестерин-распознающий аминокислотный консенсусный мотив (CRAC motif), $-(L/V)_{1-2}-(X)_{(1-5)}-Y-(X)_{(1-5)}-R/K-$, выявленный в первичной последовательности таких белков. Эта формула в действительности является более гибкой и может трактоваться более широко [69, 70]. Консенсус с приведенной формулой впервые был выявлен в C-концевой части так называемого периферического бензодиазепинового рецептора (теперь транслокаторный белок) [71]. Было показано, что этот небольшой белок, как и пептидные синтетические аналоги его консенсусного мотива, связывают холестерин, что и послужило основанием для введения данного термина. Подобные консенсусы были выявлены и во многих других белках. Они локализуются непосредственно в приграничной мембранной области, их длина в соответствии с алгоритмом может варьироваться примерно от 5 до 13 аминокислот [70]. Помимо CRAC мотива трансмембранные и мембран-ассоциированные белки могут включать в свою структуру и другие дополнительные группы, такие как миристоильные и пальмитоильные остатки и другие, которые также придают им способность вовлекаться в рафтовые домены [68, 69]. Анализ результатов многочисленных исследований позволяет предположить, что все CRAC мотивы можно разделить соответственно их топологии на две группы, несколько различающиеся по формуле мотивов, а именно трансмембранные и мембран-ассоциированные структурно-функциональные единицы [17]. Примерами таких структурных мотивов могут служить последовательность **LWYIK** в сегменте белка слияния Grp41 вируса иммунодефицита человека (HIV), примыкающего к спиральному ТМ сегменту и обогащенного остатками триптофана [69, 72] или заякоривающий мембранный фрагмент протонного канала IFV (белок M2), в первичной последовательности которого объединены обе эти структуры [73]. CRAC мотивы с участием ТМ до-

менов интегральных мембранных белков, чья биологическая активность является холестерин-зависимой (например, Fc γ RI, пуринорецептор P2X1, коннексыны Cx32 и Cx43 и др.), были выявлены при выравнивании их аминокислотных последовательностей, и соответствовали формуле $-(L/V)_{1-2}-X_{1-4}-Y/F-X_{1-3}-W-$ [74]. Позднее, мотивы с близкими формулами были обнаружены и во множестве других ТМ доменов интегральных мембранных белков, включая и НА вируса гриппа [75]. Схожая структура, представляющая собой холестерин связывающий сайт, была выявлена в α -спиралях IV и II β 2-адренорецептора человека, которая, в отличие от вышеописанных мотивов, была определена как составной холестеринный консенсусный мотив (cholesterol consensus motif, CCM), с формулой: $-R/K-(X)_{7-10}-W/Y-(X)_4-L/V/I-$ – на одной спирали, и **F/Y** – на другой [76]; CCM здесь образует пространственную щель для связывания холестерина. Другой CCM, приспособленный для поверхностного связывания с рафтами вирусной мембраны, был обнаружен на поверхности глобулы мембран-ассоциированного M1 белка IFV; в этом случае два аминокислотных остатка (**L** и **Y**) подмембранного консенсусного мотива располагались на одной спирали, а третий (**R**) – на другой [77].

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАФТОВЫХ МЕМБРАН НЕКОТОРЫХ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРУСОВ

Оболочечные вирусы с мембраной рафтовой природы, особенно те из них, структура и липидный состав оболочек которых достаточно подробно исследованы, являются наиболее ценными и информативными объектами для изучения структурных принципов и молекулярных механизмов формирования липидных рафтов в биологических мембранах в целом. В частности, данные о структуре интактных вирионов IFV и NDV с достаточно высоким разрешением получены методом криоэлектронной томографии [78, 79]. На основании биохимических и физико-химических исследований были выдвинуты предположения, что оболочку вирусов гриппа можно рассматривать как мозаичную смесь рафтовых и нерафтовых микродоменов или как некий ансамбль гибко сочлененных рафтовых платформ, разделенных узкими флюидными участками липидной мембраны. Такая мембрана являет собой образец сосуществования двух липидных фаз, при этом основная часть липидов присутствует в виде стабильных рафтовых кластеров, организуемых ТМ доменами трансмембранных мембранных белков совместно с мембран-ассоциированным матричным M1 белком [42, 80]. Сравнение данных криоэлектронной томографии вирионов IFV и NDV свидетельствует о том, что оболочка NDV принципиально устроена похожим образом. В недавних исследованиях этот взгляд нашел подтверждение и в отношении биологических мембран в

целом. Результаты этих исследований показывают, что холестерин в них составляет около 40 мол. % всех липидов плазматических мембран и, вероятно, и находится в соотношении 1 : 1 с фосфолипидами мембран [81], и позволяют предполагать, что около трех четвертей липидов бислоистой мембраны, окруженной минорной фазой Ld может пребывать в фазе Lo в конденсированном состоянии [82].

С другой стороны, вышеописанная структурная организация липидных оболочек IFV и NDV ожидается предполагает наличие CRAC мотивов как в ТМ доменах, так и в последовательностях мембран-ассоциированных матриксных белков [75]. Матриксные белки IFV, HIV и NDV представляют собой небольшие молекулы, которые при выполнении своих множественных функций при инфицировании, находятся в постоянном взаимодействии с липид-белковыми надмолекулярными структурами [10, 80]. В связи с этим появляется все больше исследований по выявлению в их первичных последовательностях специфических мотивов и структурных доменов, определяющих взаимодействие с различными партнерами и влияющих на базовые характеристики вирусов (морфологию, репликацию, инфекционность и т.д.). Ранее CRAC мотив был описан на одной из α -спиралей M1 белка, которая содержит еще и сигнал ядерной локализации этого белка [83]. Оказалось, что некоторые из α -спиралей с CRAC мотивами в M1 IFV обладают и вторыми, ранее установленными, функциональными мотивами на противоположных сторонах α -спиралей (NLS, сигнал ядерной локализации и NES, сигнал ядерного экспорта); примечательно, что оба этих сигнальных мотива участвуют в трансмембранном переносе M1 через ядерную мембрану клетки. Таким образом, выяснилось, что эти спирали имеют двойную функциональную нагрузку, то есть являются амфипатическими [77, 17].

Вышеупомянутая консервативная последовательность ионного канала (M2 белка) IFV, примыкающая к его трансмембранному сегменту, параллельная поверхности мембраны и взаимодействующая с рафтовыми доменами, не только представляет собой сегмент перекрывающихся CRAC мотивов, но и организована в амфипатическую α -спираль [73].

Подробный анализ и моделирование пространственной структуры матриксных M белков IFV, NDV и HIV по данным рентгеноструктурного анализа в сочетании с биоинформатическим обработкой последовательностей, позволил идентифицировать в этих белках мотивы, соответствующие формуле CRAC, и также выявить амфипатический характер тех элементов вторичной структуры (α -спиралей и β -складчатых структур), на которых располагались CRAC мотивы, то есть функциональные аминокислотные остатки-компоненты CRAC мотивов выстраивались линейно на элементах вторичной структуры и экспонировались вовне. Такая пространственная конфигу-

рация как раз и позволяет этим структурным элементам располагаться параллельно поверхности мембраны и взаимодействовать с боковой поверхностью рафтовых платформ, внедряясь во флюидную фосфолипидную фазу Ld, окружающую рафт. Пространственное моделирование показало, что именно элементы вторичной структуры этих M белков с CRAC мотивами, экспонированными наружу, образуют попарно благоприятную пространственную конфигурацию на поверхности их глобул, потенциально пригодную для соединения посредством CRAC мотивов двух соседних рафтов и формирования таким образом рафтовых кластеров, формирующих вирусную мембрану на поверхности подмембранного матриксного слоя.

Методом обратной генетики ранее были осуществлены точечные мутации по аминокислотным остаткам – компонентам CRAC мотивов вируса гриппа А (A/WSN/33). Базовые характеристики полученных мутантов оказались подверженными радикальным изменениям, а многие мутационные варианты оказались нежизнеспособны [77]. С учетом этих структурных особенностей M белков становится возможным объяснить на молекулярном уровне тонкую структурную организацию оболочек M белков вирионов, которая согласуется с данными криоэлектронной томографии для вирионов IFV и NDV. Методом криоэлектронной томографии на вирионах IFV выявляется слой белка M1, прилегающий к мембране, который представляет собой сложную упорядоченную структуру из ассоциированных молекул белка, очевидно организованную в спиралеобразную сетку. Эта сеть (network) мономеров M1 белка под вирусной мембраной с регулярными полостями возможно специально предназначена для внедрения трансмембранных участков HA [84]. Данные криоэлектронной томографии также показывают, что липидная оболочка вирионов NDV организована принципиально сходным образом, но слой подмембранного матриксного M белка структурно представляет собой решетку с периодической “прямоугольной” упаковкой димеров M белка [79]. В целом, изложенные выше результаты позволяют сформулировать новый взгляд на структурно-функциональные свойства матриксных белков оболочечных вирусов с мембраной рафтовой природы и детализировать структурные аспекты функционирования рафтовых доменов в биологических мембранах на молекулярном уровне. В частности можно полагать, что CRAC мотивы поверхностных гликопротеидов и матриксных белков играют важнейшую роль в организации и поддержании фрактальной структуры липидной оболочки этих вирусов, составленной из множества нанокластеров рафтовой природы.

В заключение можно сказать, что наличие CRAC мотивов на элементах вторичной структуры как интегральных мембранных, так и мембран-ассоциированных белков характерно не только для вышеописанных объектов. Эти амфипатиче-

Таблица 1. Примеры амфипатических альфа-спиралей некоторых мембранных белков и пептидов, содержащих CRAC-мотивы

Пептидный фрагмент/пептид	Аминокислотная последовательность
α -Спираль 3 M1 белка IFV	NMDKAVKLWRKLR
α -Спираль 6 M1 белка IFV	NNMDKAVKLYRKLKR
α -Спираль 13 M1 белка IFV	GLKNDLLENLQAYQKR
α -Спираль 4 M (p17) белка HIV	SEELRSLYNTVATLYCVHQR
Пептид CADY	GLWRALWRLRLSLWRLWRA
Фрагмент N-концевого заякоривающего домена белка NS5A вируса гепатита С	SWLRDIWDWICEVLSDFK

Примечание. Аминокислоты, составляющие индивидуальные консенсусы, выделены одинаковым цветом.

ские элементы имеют более универсальную функциональную значимость во многих процессах с участием биологических мембран. Они выявляются на белках других оболочечных вирусов, а также на клеточно-проникающих пептидах (cell-penetrating peptides, CPP). Значимым примером может быть структура амфипатического пептида — производного консервативного N-концевого заякоривающего домена неструктурного белка вируса гепатита С (NS5A), который прилегает к внутреннему цитозольному листу параллельно мембране. Было показано, что синтетический аналог этого фрагмента ингибировал наработку вируса гепатита в культуре клеток, а также ингибировал инфицирование вирусом этих клеток при нетоксических концентрациях [85]. Как показали исследования, взаимодействие расширенного синтетического фрагмента этого же белка с гигантскими однослойными везикулами (GUV) с рафтовой липидной композицией индуцировало перераспределение липидов в модельной мембране с образованием оптически разрешимых доменов [86]. С точки зрения структурной организации в приведенной первичной последовательности этого пептида оказывается возможным выявить два отдельных (bipartite) CRAC мотива, то есть потенциальное формирование амфипатической α -спирали (табл. 1).

Аналогичный структурный принцип двух отдельных амфипатических CRAC мотивов выявляется также и в широко известных пептидах CADY, которые определяются как “умные” трансмембранные переносчики внутрь клетки широкого набора различных субстанций: пептидов, белков, малых РНК, липосом, лекарственных субстанций и т.д. Хорошо известно, что мембраноактивные пептиды при взаимодействии с мембранами легко адаптируются к ним, формируя вторичную структуру [87, 88]. Наличие в первичных последовательностях этих и некоторых других пептидных фрагментов двух разделенных CRAC мотивов, совмещенных на одной амфипатической структуре, подтверждает их функциональную значимость. Исходя из наших представлений, амфипатичность такого рода, как новый структурный феномен

может указывать на сложный и тонкий механизм взаимодействия таких пептидов с анизотропными биомембранами. Именно такой гибкий механизм потенциально способен индуцировать динамичное образование рафтов при транслокациях пептидов внутри биомембраны. Вероятным следствием таких структурных перестроек может явиться изменение локальных базовых характеристик мембран (кривизны, толщины, проницаемости и др.), которое регулируется динамичной пространственной перегруппировкой/транслокацией пептидных фрагментов в рафтовой биомембране.

Анализ результатов исследований последних лет свидетельствует по существу о плодотворном развитии фундаментальных представлений о механизмах взаимодействия белков и липидов, участвующих в формировании специфических рафтовых комплексов, опосредующих многие биохимические процессы биологических мембран. Значимым научным результатом можно считать выявление и изучение структурных факторов, обеспечивающих образование белок-белковых и белок-липидных комплексов, которые могут быть использованы для целенаправленного поиска и разработки новых противовирусных препаратов, а также новых лекарственных иммуномодулирующих средств.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований (проекты РФФИ № 16-04-00563 и № 18-04-01363).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Singer S.J., Nicolson G. L.* // *Science*. 1972. V. 175. P. 720–731.
2. *Simons K., Van Meer G.* // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 6197–6202.
3. *Simons K., Ikonen E.* // *Nature*. 1997. V. 387. P. 569–572.
4. *Simons K., Toomre D.* // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 1. P. 31–39.
5. *Bigay J., Antonny B.* // *Developmental Cell*. 2012. V. 23. P. 886–895.
6. *Lingwood D., Simons K.* // *Science*. 2010. V. 327. P. 46–50.
7. *Quinn P. J.* // *Progress in Lipid Research*. 2012. V. 51. P. 179–198.
8. *Pare C., Lafleur M.* // *Biophys. J.* 1998. V. 74. P. 899–909.
9. *Marsh D.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1778. P. 1545–1575.
10. *Boulo S., Akarsu H., Ruigrok R.W.H., Baudin F.* // *Virus Res.* 2007. V. 124. P. 12–21.
11. *Mollinedo F., Gajate C.* // *Adv. Biol. Regulation*. 2015. V. 57. P. 130–146.
12. *Devaux P.F., Morris R.* // *Traffic*. 2004. V. 5. P. 241–246.
13. *Lorent J.H., Levental I.* // *Chem. Phys. Lipids*. 2015. V. 192. P. 23–32.
14. *Stone M.B., Shelby S.A., Nunez M.F., Wisser K., Veatch S.L.* // *elife*. 2017. V. 6.
15. *Gerl M.J., Sampaio J.L., Urban S., Kalvodova L., Verbavatz J.-M., Binnington B., Lindemann D., Lingwood C.A., Shevchenko A., Schroeder C., Simons K.* // *J. Cell. Biol.* 2012. V. 196. P. 213–221.
16. *Brügger B., Grass B., Haberkant P., Leibrecht I., Wieland F.T., Kräusslich H.-G.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 2641–2646.
17. *Radyukhin V.A., Dadinova L.A., Orlov I.A., Baratova L.A.* // *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2018. V. 36. P. 1351–1359.
18. *Brown D.A., Rose J.K.* // *Cell*. 1992. V. 68. P. 533–544.
19. *Hattersley K.J., Hein L.K., Fuller M.* // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2013. V. 442. P. 62–67.
20. *Gowrishankar K., Ghosh S., Saha S.C.R., Mayor S., Rao M.* // *Cell*. 2012. V. 149. P. 1353–1367.
21. *Mueller V., Ringemann C., Honigmann A., Schwarzmann G., Medda R., Leutenegger M., Polyakova S., Belov V.N., Hell S.W., Eggeling C.* // *Biophys. J.* 2011. V. 101. P. 1651–1660.
22. *Fujiwara T. K., Iwasawa K., Kalay Z., Tsunoyama T. A., Watanabe Y., Umemura H., Murakoshi Y.M., Suzuki K.G., Nemoto Y.L., Morone N., Kusumi A.* // *Mol. Biol. Cell*. 2016. V. 27. P. 1101–1119.
23. *Lenne P.F., Wawrzyniak L., Conchonaud F., Wurtz O., Boned A., Guo X.J., Rigneault H., He H.T., Marguet D.* // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 3245–3256.
24. *Frisz J.F., Kaiyan Lou, Klitzing H.A., Hanafin W.P., Lizunov V., Wilson R.L., Carpenter K.J., Kim R., Hutcheon I.D., Zimmerberg J., Weber P.K., Kraft M.L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 2701–2702.
25. *Frisz J.F., Klitzing H.A., Lou K., Hutcheon I.D., Weber P.K., Zimmerberg J., Kraft M.L.* // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 16855–16861.
26. *Heftberger P., Kollmitzer B., Rieder A.A., Amenitsch H., Pabst G.* // *Biophys. J.* 2015. V. 108. P. 854–862.
27. *Garner A.E., Smith D.A., Hooper N.M.* // *Mol. Mem. Biol.* 2007. V. 4. P. 233–242.
28. *Courtney K.C., Pezeshkian W., Raghupathy R., Zhang C., Darbyson A., Ipsen J.H., Ford D.A., Khandelia H., Presley J.F., Zha X.* // *Cell Reports*. 2018. V. 24. P. 1037–1049.
29. *Solanko L.M., Sullivan D.P., Sere Y.Y., Szomek M., Lunding A., Solanko K.A., Pizovic A., Stanchev L.D., Pomorski T.G., Menon A.K., Wüstner D.* // *Traffic*. 2018. V. 19. P. 198–214.
30. *Van Meer G.* // *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2011. V. 3:a004671.
31. *Fairn G.D., Schieber N.L., Ariotti N., Murphy S., Kuerschner L., Webb R.I., Grinstein S., Parton R.G.* // *J. Cell Biol.* 2011. V. 194. P. 257–275.
32. *Daly T.A., Minghui Wang, Regen S.L.* // *Langmuir*. 2011. V. 27. P. 2159–2161.
33. *Róg T., Vattulainen I.* // *Chem. Phys. Lipids*. 2014. V. 184. P. 82–104.
34. *Litz J.P., Thakkar N., Portet T., Keller S.L.* // *Biophys. J.* 2016. V. 110. P. 635–645.
35. *Sung-Tae Yang, Kreutzberger A.J.B., Jinwoo Lee, Kiessling V., Tamm L.K.* // *Chem. Phys. Lipids*. 2016. V. 199. P. 136–143.
36. *Langea Y., Steck T.L.* // *Chem. Phys. Lipids*. 2016. V. 199. P. 74–93.
37. *Marquardt D., Kucerka N., Wassall S.R., Harrounf T.A., Katsaras J.* // *Chem. Phys. Lipids*. 2016. V. 199. P. 17–25.
38. *Mingjun Cai, Weidong Zhao, Xin Shang, Jinguang Jiang, Hongbin Ji, Zhiyong Tang, Hongda Wang* // *Small*. 2012. V. 8. P. 1243–1250.
39. *Yilmaz N., Yamada T., Greimel P., Uchihashi T., Ando T., Kobayashi T.* // *Biophys. J.* 2013. V. 105. P. 1397–1405.
40. *Yao-Wen Jiang, Hao-Yue Guo, Zhan Chen, Zhi-Wu Yu, Zhifei Wang, Fu-Gen Wu.* // *Langmuir*. 2016. V. 32. P. 6739–6745.
41. *Radyukhin V., Fedorova N., Ksenofontov A., Serebryakova M., Baratova L.* // *Arch. Virol.* V. 153. P. 1977–1980.
42. *Parton D. L., Tek A., Baaden M., Sansom M.S.P.* // *PLoS Comput. Biol.* 2013. V. 9(4): e1003034. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003034>
43. *Laliberte J.P., McGinnes L.W., Morrison T.G.* // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 10636–10648.
44. *Ali A., Avalos R.T., Ponimashkin E., Nayak D.P.* // *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 8709–8719.
45. *Nyholm T.K.M., Özdirekcan S., Killian A.* // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 1457–1465.
46. *Pogozheva I.D., Mosberg H.I., Lomize A.L.* // *Prot. Sci.* 2014. V. 23. P. 1165–1196.
47. *De Kruijff B., Killian J.A., Ganchev D.N., Rinia H.A., Sparr E.* // *Biol. Chem.* 2006. V. 387. P. 235–241.
48. *Jensen M.O., Mouritsen O.G.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. V. 1666. P. 205–226.
49. *Kaiser H.-J., Orłowski A., Róg T., Nyholm T.K.M., Wengang C., Ten Feizi, Lingwood D., Vattulainen I., Simons K.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 16628–16633.
50. *Vidal A., McIntosh T.J.* // *Biophys. J.* 2005. V. 89. P. 1102–1108.
51. *Sparr E., Ash W.L., Nazarov P.V., Rijkers D.T., Hemminga M.A., Tieleman D.P., Killian J.A.* // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 39324–39331.
52. *Fastenberg M.E., Shogomori H., Xu X., Brown D.A., London E.* // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 12376–12390.
53. *Nicolaou J., Scolani S., Bayraktarov E., Jungnick N., Engel S., Pia Plazzo A., Stöckl M., Volkmer R., Veit M., Herrmann A.* // *Biophys. J.* 2010. V. 99. P. 489–498.
54. *Nermut M.V., Frank H.* // *J. Gen. Virol.* 1971. V. 1. P. 37–51.
55. *Briggs J.A.G., Wilk T., Fuller S.D.* // *J. Gen. Virol.* 2003. V. 84. P. 757–768.
56. *De Planque M.R.R., Killian, J.A.* // *Mol. Membr. Biol.* 2003. V. 20. P. 271–284.

57. Hessa T., Meindl-Beinker N.M., Bernsel A., Kim H., Sato Y., Lerch-Bader M., Nillson I.-M., White S.H., Von Heijne G. // *Nature*. 2007. V. 450. P. 1026–1030.
58. MacCallum J.L., Drew Bennett W.F., Tieleman D.P. // *Biophys. J.* 2008. V. 94. P. 3393–3404.
59. Björkbohm A., Rög T., Kaszuba K., Kurita M., Yamaguchi S., Lönnfors M., Nyholm T.K.M., Vattulainen I., Katsumura S., Slotte J.P. // *Biophys. J.* 2010. V. 99. P. 3300–3308.
60. Aritz B., Garcia-Arribas A.A., Goñi F.M. // *Chem. Phys. Lipids*. 2016. V. 199. P. 26–34.
61. Tsuzuki S. // *Struc. Bond*. 2005. V. 115. P. 149–193.
62. De Jesus A.J., Allen T.W. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1828. P. 864–876.
63. Cedric Grauffel C., Boqian Yang, Tao He, Roberts M.F., Gershenson A., Reuter N. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. P. 5740–5750.
64. Luz-Madrigal A., Asanov A., Camacho-Zarco A.R., Sampieri A., Vaca L. // *J. Virol.* 2013. V. 87. P. 11894–11907.
65. MacCallum J.L., Tieleman D.P. // *Trends Biochem. Sci.* 2011. V. 36. P. 653–662.
66. Pogozheva I., Tristram-Nagle S., Mosberg H.I., Lomize A.L. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1828. P. 2592–2608.
67. Serebryakova M.V., Kordyukova L.V., Semashko T.A., Ksenofontov A.L., Rudneva I.A., Kropotkina E.A., Filipova I.Yu., Veit M., Baratova L.A. // *Vir. Res.* 2011. V. 160. P. 294–304.
68. Matsumori N., Yamaguchi T., Maeta Y., Murata M. // *Biophys. J.* 2015. V. 108. P. 2816–2824.
69. Epand R.M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1778. P. 1576–1582.
70. Epand R.F., Thomas A., Brasseur R., Vishwanathan S.A., Hunter E., Epand R.M. // *Biochemistry*. 2006. V. 45. P. 6105–6114.
71. Li H., Papadopoulos V. // *Endocrinology*. 1998. V. 139. P. 4991–4997.
72. Vincenta N., Genina C., Malvoisin E. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. V. 1567. P. 157–164.
73. Shenstone Huang, Green B., Thompson M., Chen R., Thomaston J., De Grado W.F., Howard K.P. // *Prot. Sci.* 2015. V. 24. P. 426–429.
74. Dunina-Barkovskaya A. // *Protein Interactions* / Eds. Cai J., Wang R.E. Croatia: InTech Pub., 2010. P. 275–290.
75. De Vries M., Herrmann A., Veit M. // *Biochem. J.* 2015. V. 465. P. 305–314.
76. Hanson M.A., Cherezov V., Griffith M.T., Roth C.B., Jaakola V.P., Chien E.Y., Velasquez J., Kuhn P., Stevens R.C. // *Structure*. 2008. V. 16. P. 897–905.
77. Tsfasman T., Kost V., Markushin S., Lotte V., Koptiaeva I., Bogacheva E., Baratova L., Radyukhin V. // *Vir. Res.* 2015. V. 210. P. 114–118.
78. Harris A., Cardone G., Winkler D.C., Heymann J.B., Brecher M., White J.M., Steven A.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 19123–19127.
79. Battisti A.J., Geng Menga, Winkler D.C., McGinness L.W., Plevka P., Steven A.C., Trudy G., Morrison T.G., Rossmann M.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. P. 13996–13996.
80. Nayak D.P., Hui E.K.-W., Barman S. // *Virus Res.* 2004. V. 106. P. 147–165.
81. Steck T.L., Lange Y. // *Trends Cell Biol.* 2010. V. 20. P. 680–687.
82. Lange Y., Steck T.L. // *Chem. Phys. Lipids*. 2016. V. 199. P. 74–93.
83. Schroeder C. // *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins, Subcellular Biochemistry* / Ed. Harris J. B.: Springer Science + Business Media B. V., 2010. V. 51. P. 77–108.
84. Calder L.J., Wasilewski S., Berriman J.A., Rosenthal P.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 10685–10690.
85. Guofeng Cheng, Montero A., Gastaminza P., Whitten-Bauer C., Stefan F., Wieland S.F., Isogawa M., Fredericksen B., Selvarajah S., Gallay P.A., Ghadiri M.R., Chisari F.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 3088–3093.
86. Hanson J.M., Gettel D.L., Tabaei S.R., Jackman J., Min Chul Kim, Sasaki D.Y., Groves J.T., Liedberg B., Nam-Joon Cho, Parikh A.N. // *Biophys. J.* 2016. V. 110. P. 176–187.
87. Eiríksdóttir E., Konate K., Langel Ü., Divita G., Deshayes S. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1798. P. 1119–1128.
88. Bechara C., Sagan S. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 1693–1702.

Molecular Mechanisms of Rafts Organization in Biological Membranes

V. A. Radyukhin* and L. A. Baratova*

*Phone: +7 (495) 9395408; fax: +7 (495) 939-31-81; e-mail: varvic@belozersky.msu.ru

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Leninskie gory 1, Moscow, 119991 Russia

This review analyses and summarizes some actual models of raft organization as dynamic structural units in lipid membranes accenting on discrimination of mechanisms influencing raft nanodomains sustaining in biological and model membranes, and on roles of membrane proteins. Contentious issue of specific input of cholesterol recognizing/interacting amino acid consensus (CRAC) motifs in the membrane rafts and proteins interaction mechanism on molecular level is discussed in detail. Especially, lipid membrane raft-like structure of some enveloped viruses is considered as a manifested example demonstrating basic mechanisms of raft type membranes organization.

Keywords: lipid membranes, rafts, membrane proteins, cholesterol-recognizing amino acid consensus (CRAC) motifs, amphipathic elements of the secondary structure of proteins