

УДК 57.088.5

РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКОВЫЕ БИОСЕНСОРЫ ЛИПИДОВ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

© 2025 г. Е. М. Кольцова^{a,b,*}, Н. А. Колчин^{a,b}, Е. И. Николаева^{a,b}, К. Р. Бутов^{a,c}

^aНациональный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997 Россия

^bЦентр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, 109029 Россия

^cРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117513 Россия

*e-mail: ekaterina_koltsova@bk.ru

Поступила в редакцию 24.12.2024

После доработки 11.02.2025

Принята к публикации 12.02.2025

Специфические паттерны распределения различных липидов в клеточных мембранах определяют их структурные и сигнальные роли, а также обеспечивают целостность и функциональность цитоплазматической мембраны и клеточных органелл. Последние достижения в области создания рекомбинантных липидных биосенсоров и методов визуализации позволяют напрямую наблюдать распределение, перемещение и динамику липидов в клетке, что заметно продвинуло понимание функции липидов и реакций с их участием как на клеточном, так и на субклеточном уровнях. В данном обзоре мы обобщили данные, касающиеся разработок в области проектирования и применения рекомбинантных белковых сенсоров к различным липидам клеточных мембран.

Ключевые слова: липидные сенсоры, клеточные мембраны, рекомбинантные сенсоры

DOI: 10.31857/S0233475525020017, **EDN:** UGCPTI

ВВЕДЕНИЕ

Липиды выполняют в клетке множество функций. Матрица клеточных мембран образована полярными липидами, которые состоят из гидрофобной и гидрофильной частей. Склонность гидрофобных частей к самоассоциации и тенденция гидрофильных частей к взаимодействию с водной средой и друг с другом являются физической основой спонтанного образования мембран. Этот фундаментальный принцип позволяет клеткам отделить свои внутренние компоненты от внешней среды, а также обеспечивает компартментализацию внутриклеточных органелл. Помимо структурной функции, липиды могут выступать в качестве первичных и вторичных мессенджеров в процессах клеточной сигнализации. Некоторые липиды определяют существование специфических мембранных микродоменов, рекрутирующих белки из цитозоля, впоследствии реализующих свою функцию в качестве вторичных мессенджеров или

компонентов мультибелковых эффекторных комплексов.

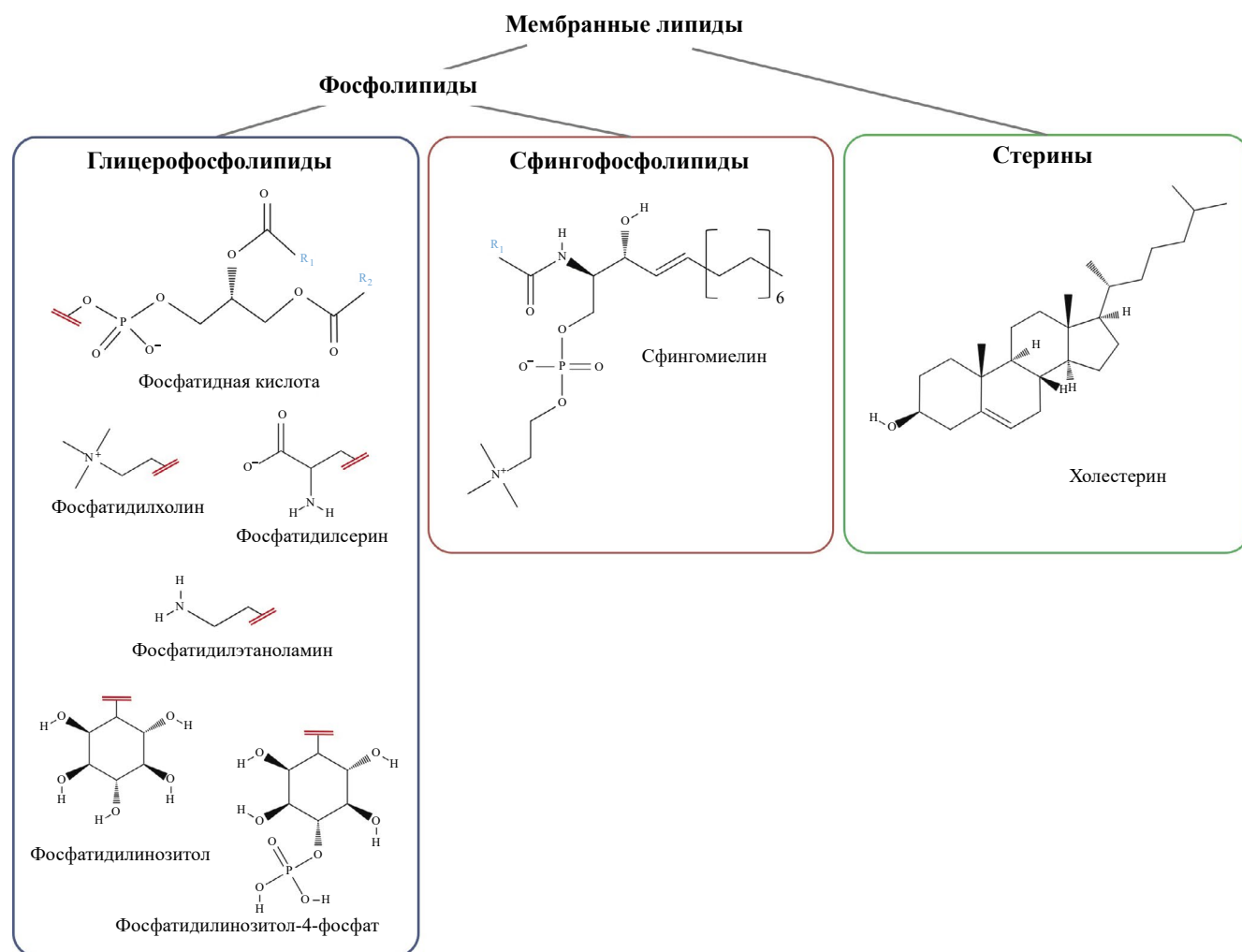
Основными структурными липидами в эукариотических мембранах являются глицерофосфолипиды: фосфатидилхолин, фосфатидиэтаноламин (PE), фосфатидилсерин (PS), фосфатидилинозитол (PI), фосфатидная кислота (PA) и фосфатидилглицерин. Их гидрофобная часть является диацилглицерином, который содержит насыщенные или *цис*-ненасыщенные жирные ацильные цепи различной длины. Сфингофосфолипиды представляют другой класс структурных фосфолипидов, составляющих клеточные мембраны, чей гидрофобный остов представлен керамидом. Основными сфингофосфолипидами в клетках млекопитающих являются сфингомиелин (SM) и гликофосфолипиды [1]. Вместе с холестерином (Chol) сфингофосфолипиды формируют специфические липидные домены в клеточных мембранах [2, 3], а также обеспечивают плотную упаковку липидов в мембране и тем самым делают ее устойчивой к механическому стрессу [4].

Химические структуры основных липидов, присутствующих в составе клеточных мембран млекопитающих, представлены на рис. 1. Фосфатидилглицерин (PG) и кардиолипин (CL) исключены из рассмотрения в рамках данного обзора ввиду специфичности локализации (в клетках млекопитающих обнаруживаются исключительно на внутренней поверхности мембран митохондрий, что нивелирует потребность в рекомбинантных сенсорах к данным липидам ввиду трудности доставки метки к целевому липиду) [5].

Дисрегуляция липидного метаболизма в клетке ассоциируется с различными заболеваниями, включая рак, сердечно-сосудистые заболевания, неврологические расстройства, диабет и нарушения развития [6–9]. Таким образом, получение всестороннего понимания субклеточного

распределения липидов в живых клетках необходимо для выяснения их функции в регуляции различных аспектов клеточного метаболизма, а также их роли в заболеваниях человека.

За прошедшие годы исследователи разработали множество молекулярных сенсоров для детекции липидов [10], что в сочетании с передовыми методами визуализации значительно расширило понимание субклеточного распределения, кинетики и метаболизма липидов в клетках. Большинство из этих сенсоров может быть как экспрессировано внутриклеточно в виде химерных белков с белковым флуорофором, так и синтезировано рекомбинантно в *Escherichia coli*, что позволяет использовать их для детекции в клетках, плохо поддающихся трансфекции (например, тромбоцитах), и для окраски фиксированных



препаратов. В рамках данного обзора литературы будет произведен анализ актуального спектра рекомбинантных белковых сенсоров к различным липидам клеточных мембран.

Фосфатидилхолин

Фосфатидилхолин (PC) является наиболее распространенным фосфолипидом клеточных мембран млекопитающих и составляет 40–60% от всех фосфолипидов. PC играет важную структурную роль в мембранах, а также участвует в передаче клеточных сигналов, выступая субстратом или активатором фосфолипаз [11, 12]. В большинстве клеток млекопитающих синтез PC осуществляется через цитидиндифосфатхолиновый (ЦДФ-холиновый) путь [13], альтернативный путь синтеза PC существует в гепатоцитах и состоит в последовательном метилировании фосфатидилэтаноламина фосфатидилэтаноламин-N-метилтрансферазой [14].

Высокое содержание PC в клеточных мембранах делает его привлекательной мишенью для использования в качестве общего маркера мембраны. Разработка сенсора к данному фосфолипиду также позволила бы решить один из важных вопросов в области биологии внеклеточных везикул — детекцию их общего пула. В настоящее

время универсально признанным маркером внеклеточных везикул является экспозиция фосфатидилсерина (PS) на их поверхности. Однако независимыми группами обнаруживается субпопуляция микровезикул, демонстрирующая отсутствие связывания маркеров PS на поверхности мембраны [15–18]. Существующие на данный момент гипотезы предполагают либо истинное существование микровезикул с низким содержанием PS, либо невозможность детекции везикул существующими метками за счет их низкой специфичности или других артефактов [19, 20].

Группа Zenisek и соавт. [21] разработала единственную на данный момент существующую рекомбинантную метку к PC на основе C2-домена фосфолипазы A2 (табл. 1). Связывание данной метки с PC в составе мембран является кальций-зависимым (EC50 1 мкМ), обратимым [21, 22], а также характеризуется внедрением гидрофобных остатков в составе кальций-связывающих петель (calcium-binding region, CBR) 1 (F35, L39, M38) и 3 (Y96, M98) в углеводородный остов мембраны (рис. 2) [23, 24]. Метка позволяет визуализировать синаптические везикулы методами электронной микроскопии, а также микроскопии суперразрешения (STED (Stimulated Emission Depletion) и FPALM (Fluorescence PhotoActivation Localization Microscopy)) [21].

Таблица 1. Белковые липидные сенсоры и их свойства

Липид	Метка	Фрагмент белка	Происхождение	Продуцент	Kd	Специфичность	Ссылка
PC	PLA2C2	17–141 C139A/ C141S	Крыса	<i>E. coli</i>	420 нМ	Да	[21, 22]
PS	Аннексин A5	1–320	Человек	<i>E. coli</i>	5 нМ	Да	[25]
	Дианнексин A5	1–320	Человек	<i>E. coli</i>	0.6 нМ	Да	[25]
	LactC2	270–427	Бык	<i>E. coli</i>	19 нМ	Да	[26, 27]
	2xPH evt-2	1–110	Человек	<i>E. coli</i>	?	Да	[28]
	Tim4	1–273	Мышь	293T	2 нМ	Да	[29, 30]
PI	BcPI-PLC ^{ANH}	32–329 H82A/ Y247N/ Y251H	Бактерия <i>Bacillus cereus</i>	<i>E. coli</i>	?	?	[31, 32]
PI(3)P	FYVE-HRSx2	160–224	Человек	<i>E. coli</i>	2.5 мкМ (мономер)	Да	[31, 33, 34]
	FYVE-EEA1x2	1307–1411	Человек	<i>E. coli</i>	45 нМ (мономер)	Да	[35, 36]
	PX-p40phox	2–149	Человек	<i>E. coli</i>	5 мкМ	Да	[35, 37]

Таблица 1. Продолжение

Липид	Метка	Фрагмент белка	Происхождение	Продуцент	Kd	Специфичность	Ссылка
PI(4)P	P4C-SidC	609–783	Бактерия <i>Legionella longbeachae</i>	<i>E. coli</i>	71 нМ	Да	[31, 38]
	PH-FAPP1	1–99	Человек	<i>E. coli</i>	200 нМ	Нет, связывает также PI(4,5)P2	[39]
	P4M-SidM	544–647	Бактерия <i>Legionella pneumophila</i>	<i>E. coli</i>	?	Да	[40]
PI(5)P	ING2-PHDx3	200–281	Человек	<i>E. coli</i>	?	Нет, связывает также PI3P	[31, 41]
PI(3,4)P2	TAPP1 cPHx3	169–329	Человек	<i>E. coli</i>	80 нМ (мономер)	Да	[31, 42, 43]
PI(3,5)P2	SnxA-2xPH	61–175	Амеба <i>Dictyostelium discoideum</i>	<i>E. coli</i>	217.5 нМ	Да	[31, 44]
PI(4,5)P2	PLCδ1-PH	1–155	Человек	<i>E. coli</i>	2 мкМ	Нет, связывает также P(1,4,5)P3	[31, 45, 46]
PI(3,4,5)P3	BTK1-PH	1–165	Мышь	<i>E. coli</i>	80 нМ	Нет, связывает также PI(1,3,4,5)P4	[31, 42, 47]
	PH-Akt	1–123	Человек	<i>E. coli</i>	590 нМ	Нет, связывает также PI(3,4)P2 и PI(4)P	[35, 42]
	GRP1-PH	6–217	Мышь	<i>E. coli</i>	170 нМ	Нет, связывает также PI(1,3,4,5)P4	[35, 42]
PA	Spo20p	50–91	Дрожжи	<i>E. coli</i>	2.2 мкМ	Да	[48]
	Opi1p	103–191	Дрожжи	<i>E. coli</i>	4.5 мкМ	Да	[48]
	PDE4A1	1–40	Человек	<i>E. coli</i>	6.8 мкМ	Да	[48]
SM	Лизенин	161–297	Дождевой червь <i>Eisenia foetida</i>	<i>E. coli</i>	190 нМ	Да	[49, 50]
	EqtII	8-69 V8C/ K69C	Морской анемон <i>Actinia equina</i>	<i>E. coli</i>	26 нМ	Нет, связывает также D-эритро-сфин-го-сульфос-форилхолин	[49, 51]
	Nakanori	1–202	Гриб <i>Grifola frondosa</i>	Cell-free синтез [52]	140 нМ	Комплекс SM/Chol	[53]
	PlyA2	1–138	Гриб <i>Pleurotus eryngii</i>	<i>E. coli</i>	Слабая аффинность	Комплекс SM/Chol < CPE < CPE/Chol	[54]
	Oly	1–138	Гриб <i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>E. coli</i>	Слабая аффинность	SM/Chol << CPE/Chol	[54]

Таблица 1. Окончание

Липид	Метка	Фрагмент белка	Происхождение	Продуцент	Kd	Специфичность	Ссылка
Chol	PFO D4	363–472	Бактерия <i>Clostridium perfringens</i>	<i>E. coli</i>	52 нМ	Да	[55]
	PFO D4 YDA	363–472 Y415A/ D434W/ A463W	Бактерия <i>Clostridium perfringens</i>	<i>E. coli</i>	190 нМ	Да	[56]
	ALO D4	403–512	Бактерия <i>Bacillus anthracis</i>	<i>E. coli</i>	1.59 нМ	Да	[57]
	eOsh4	40–434 C68S/ C98S/ K108C/ K109A/ C229S	Дрожжи	<i>E. coli</i>	100 нМ	Да	[56]
	Maistero-2	1–93	Гриб <i>Grifola frondosa</i>	<i>E. coli</i>	60 нМ	Да	[58]
	GRAM-W	G187W	Человек	<i>E. coli</i>	?	Связывание в присутствии анионных липидов	[59]

Примечание. PC – фосфатидилхолин, PS – фосфатидилсерин, PI – фосфатидилинозитол, PI(3)P – фосфатидилинозитол-3-фосфат, PI(4)P – фосфатидилинозитол-4-фосфат, PI(5)P – фосфатидилинозитол-5-фосфат, PI(3,4)P2 – фосфатидилинозитол-3,4-бифосфат, PI(3,5)P2 – фосфатидилинозитол-3,5-бифосфат, PI(4,5)P2 – фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат, PI(3,4,5)P3 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат, PA – фосфатидная кислота, SM – сфингомиелин, Chol – холестерин, Kd – константа диссоциации.

Фосфатидилэтаноламин

Фосфатидилэтаноламин (PE) – второй по распространенности фосфолипид в клетках млекопитающих и основной фосфолипид в бактериях. В клетках млекопитающих биосинтез PE происходит преимущественно в эндоплазматической сети и на внутренней мембране митохондрий [4, 60]. В живых клетках он располагается на внутренней стороне клеточной мембраны. PE участвует в мембранном транспорте и выступает в качестве предшественника при синтезе других фосфолипидов [60–63]. Физико-химические свойства PE указывают на его роль в модуляции кривизны липидных монослоев, а также предположительно участвуют в поддержании правильного сворачивания мембранных белков [62, 64, 65]. Помимо этого, PE активирует окислительное фосфорилирование [66, 67], вовлечен в процессы апоптоза [68] и ферроптоза [69], является медиатором модификации прионов [70].

На данный момент не существует сведений о наличии рекомбинантного сенсора к PE,

несмотря на существование семейства белков РЕВР (phosphatidylethanolamine-binding proteins), экспрессирующихся в клетках широкого спектра биологических видов от дрожжей до человека [71]. Однако данные касаются связывания РЕВР с РЕ противоречивы. Показано, что РЕВР связывается с РЕ в экспериментах с использованием методов аффинной хроматографии [72] и кристаллографии [73], но, если РЕ включен в мембрану, связывания с РЕВР не наблюдается [74]. Также отмечают, что РЕВР не способен переносить РЕ между мембранами [75] и его связывание носит скорее электростатический характер [74].

Доступные сенсоры РЕ в настоящее время основаны на молекулах антибиотиков дурамицина и циннамицина [76], которые представляют собой 19-аминокислотные пептиды и связывают головную группу РЕ с высокой специфичностью и аффинностью [77–79]. Однако нативные дурамицин и циннамицин обладают цитотоксичностью и могут вызывать деформацию мембраны и провоцировать перемещение РЕ между слоями

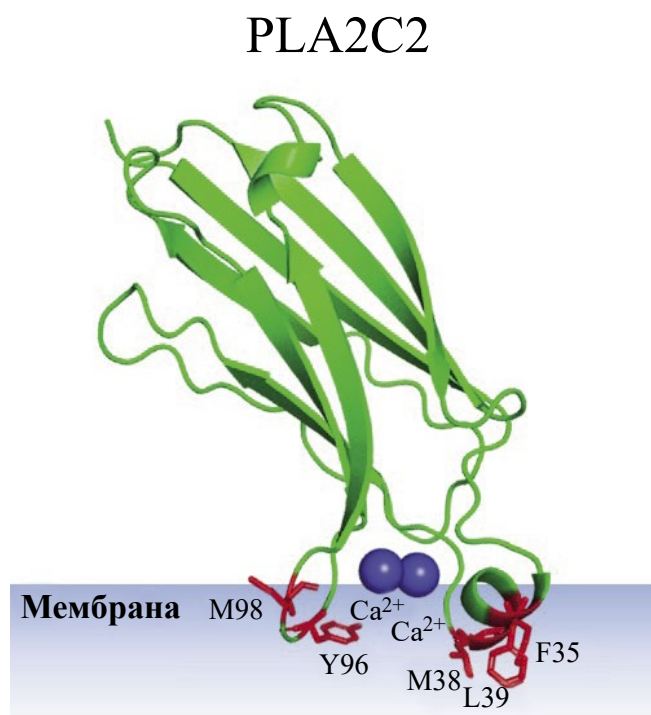


Рис. 2. Структура фосфатидилхолин-связывающего C2-домена фосфолипазы A2 (PLA2C2, Protein Data Bank (PDB) код 1RLW). Синим цветом отмечены ионы Ca²⁺, необходимые для связывания домена с мембраной. Красным цветом отмечены гидрофобные боковые цепи аминокислотных остатков, внедряющиеся в углеводородный остов мембраны при связывании домена с мембраной [23, 24].

мембраны [80]. Тем не менее показана возможность существенного снижения цитотоксичности сенсора на основе дурамицина без потери аффинности путем пришивки белкового флуорофора GFP на С-конец дурамицина [76].

Фосфатидилсерин

Фосфатидилсерин (PS) составляет до 10% от общего количества фосфолипидов в клетках [81], где он синтезируется двумя путями: либо с помощью замены холина на серин в фосфатидилхолине фосфатидилсериновой синтазой-1, либо путем замены этаноламина на серин фосфатидилсериновой синтазой-2 [82]. Данные ферменты локализуются на мембранах эндоплазматической сети, ассоциированных с митохондриями [82]. После синтеза PS транспортируется к другим клеточным мембранам. Наиболее изучена его роль во внеклеточной сигнализации, например, во время апоптоза и при свертывании

крови [83–85]. В здоровых живых клетках PS находится исключительно на внутренней стороне цитоплазматической мембраны благодаря работе АТФ-зависимых флиппаз [86]. Когда клетки подвергаются апоптозу, PS перемещается на внешнюю сторону мембраны, что является сигналом к фагоцитозу. PS также подвергается экспонированию на поверхности активированных тромбоцитов, что вызывает связывание и сборку комплексов факторов свертывания [83]. Помимо внеклеточных функций, PS играет важную роль внутри клетки: он требуется для правильной локализации и/или активации некоторых внутриклеточных белков. Список включает в себя: убиквитин-белковую E3-лигазу NEDD4, ряд изоформ протеинкиназы C, ряд изоформ фосфолипаз C и D, PTEN (фосфатидилинозитол (3,4,5)-трифосфат фосфатазу), дисферлин (белок мышечной репарации), а также ряд изоформ синаптогамина, которые важны для везикулярного транспорта [87]. Кроме того, в целом известно, что PS жизненно важен, поскольку мышцы с полной потерей способности к синтезу PS не жизнеспособны [88].

На сегодняшний день наиболее часто используемой меткой для детекции PS является аннексин A5, связывание которого с PS происходит кальций-зависимо и нековалентно. Аннексин A5 может быть рекомбинантно синтезирован в *E. coli* [89], конъюгирован с различными низкомолекулярными флуоресцентными метками, а также синтезирован в виде химерного белка с белковым флуорофором. В работах отмечаются значения K_d при связывании аннексина A5 с тромбоцитами и эритроцитами от 10^{-11} до 10^{-8} М [25, 90, 91]. Тандемный димер аннексина A5, дианнексин, демонстрирует еще более высокую аффинность к PS [25] (табл. 1). Специфическая третичная структура (так называемое «аннексиновое ядро») содержит четыре повтора аннексина A5 и состоит из сегментов длиной около 70 аминокислот, каждый из которых свернут в пять α -спиралей, соединенных короткими петлями или поворотами, которые обеспечивают координацию ионов Ca²⁺. Связанные ионы Ca²⁺ образуют «мостики» между поверхностью мембраны и поверхностью «аннексинового ядра» [92] (рис. 3).

Связывание аннексина A5 не зависит от изначального агрегатного состояния мембраны в месте связывания, однако показано, что взаимодействие между двумерной решеткой, образованной тримерами аннексина A5, ионами Ca²⁺ и PS, модулирует упорядоченность мембраны и вызывает переход из жидкокристаллической

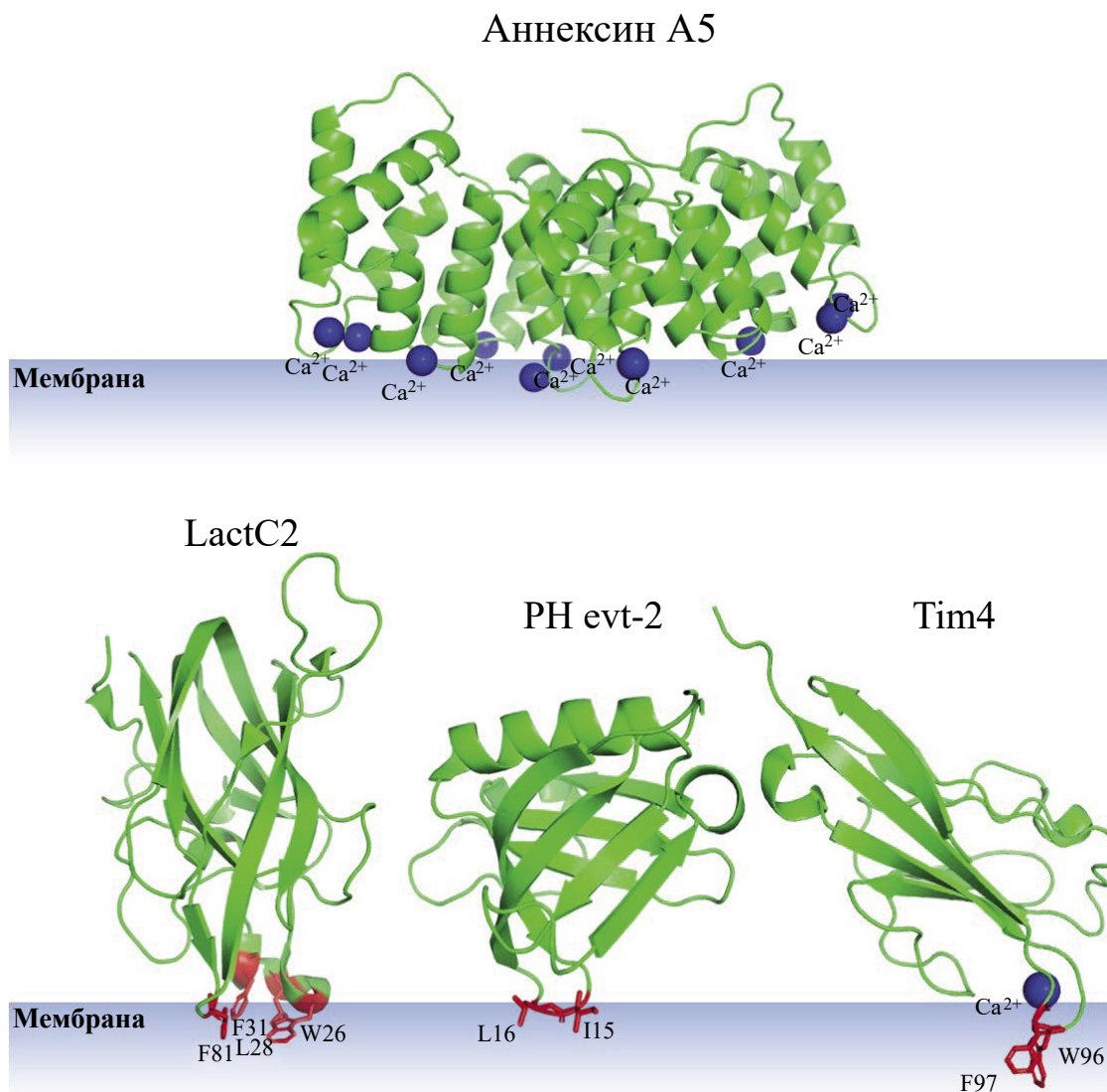


Рис. 3. Структура фосфатидилсерин-связывающих доменов и белков. Показано связывание «аннексинового ядра» аннексина А5 (PDB код 1A8A) с мембраной через десять координированных ионов Ca^{2+} (отмечено синим), образующих «мостики» между белком и мембраной [93, 94]. Связывание C2-домена лактадгерина (LactC2, PDB код 3BN6), PH-домена эвектина-2 (PH evt-2, PDB код 3VIA) и Tim4 (PDB код 3BIB) осуществляется путем внедрения гидрофобных боковых цепей аминокислотных остатков в углеводородный остов мембраны (обозначены красным) [26, 95, 96].

(Ld) в гелевую (Lo) фазу [97]. Связывание аннексина А5 специфично по отношению к PS, однако PE, включенный в фосфолипидный бислой, приводит к более низкому порогу связывания аннексина А5 [98]. Подобно большинству глобулярных белков, аннексин А5 находится в динамическом конформационном равновесии [99], и даже при отсутствии Ca^{2+} некоторые из конформаций будут демонстрировать слабое связывание с мембраной, рассчитанная K_d в отсутствие ионов Ca^{2+} составляет около 50 мМ [100].

Существуют также альтернативные маркеры на PS. Например, исследовательская группа Gilbert и соавт. [101] впервые выделила полно-размерный лактадгерин из молока крупного рогатого скота. Лактадгерин отличается от аннексина А5 более выраженным сродством к мембранам с повышенной кривизной [102], а также способностью успешно связываться с мембранами, содержащими менее 4% PS [103, 104]. Помимо этого, связывание лактадгерина не зависит от наличия в мембране фосфатидилэтаноламина [104] или наличия ионов кальция в растворе [26].

Важным является то, что связывание аннексина A5 приводит к его олигомеризации и образованию решетки на поверхности мембраны [97, 105], что делает его непригодным для использования в комбинации с другими липидными маркерами за счет стерических взаимодействий с ними. В то же время характер связывания лактадгерина с PS оставляет поверхность мембраны доступной для других липидных маркеров. В настоящее время лактадгерин успешно применяется для обнаружения прокоагулянтных тромбоцитов вместе с аннексином A5 [106, 107]. Однако отсутствие простого негативного контроля при использовании лактадгерина замедляет его активное внедрение как нового и универсального маркера PS. Метка на основе лактадгерина также доступна в виде изолированного C2-домена, который может быть рекомбинантно синтезирован в *E. coli* [108, 109] (табл. 1). Связывание C2-домена лактадгерина с мембраной осуществляется путем стереоспецифического распознавания головной группы PS при помощи положительно заряженных боковых цепей аминокислотных остатков K24, K45 и R146 [27] с последующей стабилизацией связывания посредством внедрения ароматических и разветвленных боковых цепей аминокислотных остатков в составе гидрофобных спайков 1 (W26, L28, F31) и 3 (F81) в мембрану (рис. 3).

Метка, разработанная Taguchi и Arai [28], основана на последовательности белка эвектин-2. Эвектин-2 — белок рециркулирующих эндосом [81], необходимый для осуществления ретроградного транспорта из рециркулирующих эндосом в аппарат Гольджи [28]. Плекстрин-гомологичный домен (РН-домен) эвектина-2 специфически связывается с PS. На данный момент метка существует как в виде генетического конструкта для имиджинга в живых клетках, так и в виде рекомбинантно синтезируемого химерного белка с белковым флуорофором [110] (табл. 1). Используется преимущественно тандемный димер (2xPH evt-2). Связывание РН-домена эвектина-2 осуществляется путем последовательного позиционирования домена относительно отрицательно заряженной головной группы PS при помощи положительно заряженных боковых цепей аминокислотных остатков R11, R18 и K20 и внедрения гидрофобных боковых цепей I15 и L16 в липидный бислой [96]. Показано, что 2xPH evt-2 связывается с PS в Ld-фазе и не связывается в Lo-фазе [110]. На данный момент в литературе присутствует ограниченное число исследований, посвященных рекомбинантной метке 2xPH evt-2, таким образом, потенциал данного сенсора для применения остается неясным.

Tim4 — трансмембранный протеин типа I, экспрессирующийся на поверхности макрофагов, который связывается с PS кальций-зависимо при помощи внеклеточного IgV-подобного домена [30]. Метка на основе Tim4 была создана группой Nagata [30] и представляет собой внеклеточный домен мышинового Tim4, слитый с Fc-фрагментом человеческого IgG. Аффинность данной метки к PS сравнима с аффинностью лактадгерина, Kd составляет около 2 нМ [30] (табл. 1). Связывание Tim4 с PS опосредовано ионами Ca^{2+} , в то время как окончательная стабилизация связывания с мембраной происходит вследствие проникновения гидрофобных боковых цепей аминокислотных остатков в углеводородный остов мембраны [95] (рис. 3). Хелатирование ионов Ca^{2+} EGTA снижает аффинность сенсора к липосомам, содержащим 30% PS в составе мембраны, примерно в 8 раз [95]. На основе метки Tim4 также создана аффинная смола для выделения внеклеточных везикул [29].

Фосфатидилинозитол

Фосфатидилинозитол (PI) является минорным фосфолипидом эукариотических клеточных мембран [61], он синтезируется в эндоплазматической сети и транспортируется к органеллам и мембране. Уникальность PI заключается в его роли в качестве предшественника для семи ключевых сигнальных фосфолипидов — фосфоинозитидов. Фосфоинозитиды (PPI) образуются путем фосфорилирования головной группы фосфатидилинозитола и имеют решающее значение для регулирования многих аспектов мембранного гомеостаза и сигнализации. Фосфолипиды данной группы вовлечены в процессы мембранной динамики, такие как миграция клеток, аутофагия, активация Т-клеток и регуляция мембранного контакта. Наиболее известна роль PPI в регуляции мембранного транспорта [111–115].

На данный момент единственный рекомбинантный биосенсор PI основан на последовательности PI-специфичной бактериальной фосфолипазы C (BcPI-PLC^{ANH}), полученной из *Bacillus cereus* [32]. Домены, осуществляющие специфическое распознавание фосфорилированных головных групп PPI, представляют собой консервативные домены гомологии плекстрина или Phox (РН- и РХ-домены соответственно), структурные домены GRAM, цинк-связывающие FYVE-домены, бета-пропеллерный домен WD40, обнаруженный в WIP1 и 2 [116]. При этом рекомбинантные метки основаны на последовательностях РН-, РХ- и FYVE-доменов

(табл. 1). Отдельную группу составляют метки на основе P4C- и P4M-доменов бактериальных белков SidC и SidM [38, 40]. Структурные исследования показывают, что PX- и FYVE-домены характеризуются комбинированным характером связывания с мембраной, основанном одновременно на специфичном связывании головной группы целевого липида, электростатическом притяжении и внедрении гидрофобных боковых цепей в мембрану [94], в то время как при связывании PH-доменов, а также P4C- и P4M-доменов исключен электростатический компонент [94, 117, 118] (рис. 4).

В составе цитоплазматической мембраны наиболее представлены фосфатидилинозитол-4-фосфат (PI4P) и фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PI(4,5)P2), которые

присутствуют как в Lo-доменах, так и в Ld-доменах [123]. Рекombинантные метки на основе P4M-домена SidC и PH-домена PLC δ 1 связываются в равной степени со своими целевыми липидами в Lo- и Ld-фазе [123].

При использовании рекомбинантных меток на PPI следует учитывать тот факт, что биологические образцы не могут быть фиксированы стандартными растворами, поскольку обработка мембраны детергентом экстрагирует PPI [124]. Также стоит отметить, что существует вероятность связывания самой пробы с внутриклеточными белками, что существенно снижает разрешающую способность меток [124]. Методики фиксации биоматериалов с максимальным сохранением PPI для флуоресцентной или электронной микроскопии обсуждены в [125] и [126].

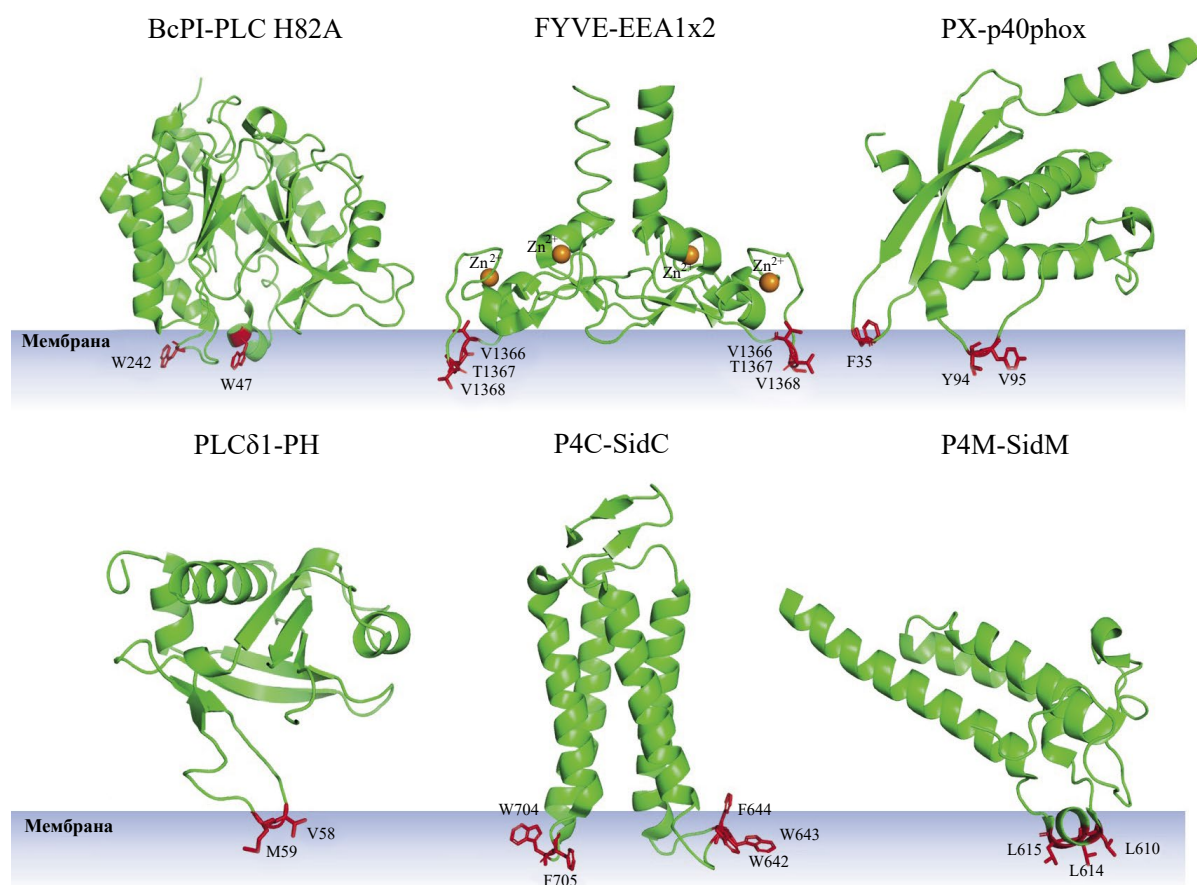


Рис. 4. Структура основных типов фосфатидилинозитол-связывающих доменов и белков. В качестве примеров для каждого типа приведены PI-специфичная бактериальная фосфолипаза C (BcPI-PLC H82A, PDB код 6S2A) [32, 119], димеризованный FYVE-домен раннего эндосомального антигена-1 (FYVE-EEA1x2, PDB код 1JOC), структурно необходимые ионы Zn^{2+} обозначены оранжевым [120], PX-домен NADPH-оксидазы p40phox (PX-p40phox, PDB код 1H6H) [121], PH-домен фосфолипазы C гамма 1 (PLC δ 1-PH, PDB код 1MAI) [122], P4C- и P4M-домены бактериальных белков SidC (P4C-SidC, PDB код 4TRH) [117] и SidM (P4M-SidM, PDB код 4MXP) [118]. Связывание осуществляется путем внедрения гидрофобных боковых цепей аминокислотных остатков в углеводородный остов мембраны (обозначены красным).

Фосфатидная кислота

Структурно фосфатидная кислота (РА) является простейшим глицерофосфолипидом и составляет около 1% от всех клеточных липидов [127]. Однако несмотря на свое низкое содержание, РА влияет на локальную кривизну липидного монослоя, поскольку аналогично РЕ обладает отрицательной спонтанной кривизной [128], а также выполняет функции вторичного мессенджера, модулирует везикулярный транспорт, процессы клеточной секреции и пролиферации [129]. Дрожжевые белки Spo20p, Opi1p и Raf1 обладают РА-связывающими доменами. Рекомбинантные химерные белки с белковым флуорофором, содержащие РА-связывающие домены этих белков, были получены в *E. coli* Vitale и соавт. [48] (табл. 1). Фагоцитирующие клетки, такие как макрофаги, нуждаются в РА для ремоделирования цитоплазматической мембраны и увеличения площади поверхности во время фагоцитоза за счет включения внутриклеточных везикул [130, 131]. Химерные белки, полученные слиянием GFP с РА-связывающими доменами Spo20p, Opi1p и белка млекопитающих PDE4A1, были использованы для оценки аффинности доменов к РА, исследования субклеточных компартментов, где происходит синтез РА в ходе фагоцитоза и процесса рекрутирования РА к цитоплазматической мембране [48].

Сфингомиелин

Сфингомиелин (SM), N-ацилсфингозин-1-фосфорилхолин, является основным липидным компонентом мембран клеток млекопитающих и составляет около 10% от всех липидов в клетках [132]. SM синтезируется путем переноса фосфохолина из фосфатидилхолина на церамид [133]. Помимо роли в качестве структурного компонента мембран, SM принимает участие в различных клеточных процессах. Например, SM является мишенью для внеклеточных агентов, таких как фактор некроза опухоли α , γ -интерферона и интерлейкина-1, которые активируют сфингомиелиназу, в результате чего производится церамид, выступающий в роли вторичного мессенджера и опосредующий действие этих внеклеточных агентов [134–136]. Благодаря высокому содержанию насыщенных цепей, SM наряду с гликофосфинголипидами и холестерином формирует микродомены цитоплазматической мембраны, называемые липидными рафтами [137]. Липидные рафты играют важную роль в трансдукции внутриклеточных сигналов, мембранном транспорте и защите клетки от патогенов [138].

Для мечения кластеризованных липидных доменов цитоплазматической мембраны используется В-субъединица холерного токсина, связывающая ганглиозид 1 (GM1) [139]. Однако не все клетки способны экспрессировать GM1 [53]. На данный момент существует несколько рекомбинантных меток для визуализации SM в клетках. Лизенин (lysenin) — SM-связывающий токсин, который был выделен из целомической жидкости земляного червя *Eisenia foetida* [140]. Лизенин специфично связывается с кластерами SM, состоящими из 5–6 липидных молекул [141]. В нативном виде лизенин токсичен, однако его токсичность зависит от способности к олигомеризации, которая, в свою очередь, может быть элиминирована путем отрезания участка с N-конца белка [50] (табл. 1).

Эквинатоксин II (EqтII) — другой SM-связывающий токсин, выделенный из морского анемона *Actinia equina* [142]. EqтII специфично взаимодействует с SM и не связывает PC, также показано связывание с D-эритро-сфингосульфосфорилхолином [142]. Отмечается, что химерный белок EqтII-GFP не связывается с доменами, обогащенными SM, однако взаимодействует с доменами, состоящими преимущественно из 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DOPC) в присутствии низкого содержания SM, что указывает на то, что EqтII, в отличие от лизенина, ассоциирован с пулом некластеризованного SM [49]. В то время как мечение лизенином качественно коррелирует с концентрацией SM на мембране, мечение EqтII-GFP не показало такой зависимости [49]. EqтII в нативном виде индуцирует лизис эритроцитов и модельных мембран путем формирования пор [143]. Данная проблема была решена путем введения дисульфидного мостика между N-концевым участком и β -складчатым участком белка, что сохраняет SM-связывающую активность белка при снижении токсичности [51, 144] (табл. 1).

Все прочие известные на данный момент сенсоры на SM связываются с кластерами, состоящими из SM и холестерина (Chol). Nakanori — белок, полученный из гриба *Grifola frondosa* [53]. Nakanori не связывается отдельно с SM, однако специфично взаимодействует со смесью SM/холестерин (SM/Chol) и не связывается с прочими сфинголипидами в смеси с Chol. Для взаимодействия с целевым липидом Nakanori требуется 40% холестерина в составе мембраны. Kd этого рекомбинантного белка составляет 140 нМ [53]. Также, помимо Nakanori, белки семейства эгеролизин: плеуролизин A2 (PlyA, из гриба *Pleurotus eryngii*) [54] и остреолизин A (OlyA,

из гриба *Pleurotus ostreatus*) [145], демонстрируют слабое связывание с комплексом SM/Chol в искусственных и нативных мембранах. Однако комплекс SM/Chol не является основной мишенью для белков семейства эгеролизинов, поскольку гораздо более сильное взаимодействие наблюдается для керамид фосфоэтаноламина (CPE), обнаруживаемого в клетках млекопитающих в следовых количествах [133] (табл. 1).

Холестерин

Холестерин (Chol) является основным компонентом клеточной мембраны млекопитающих и составляет до 40% от всех липидов мембраны [146–149]. Chol поддерживает биофизические свойства клеточной мембраны [148, 149], включая ригидность и проницаемость [150], служит предшественником стероидов [151] и желчных кислот [152]. Он также участвует в формировании мембранных микродоменов, включая липидные рафты [153]. Chol регулирует структуру и функцию различных интегральных мембранных белков [154], включая ионные каналы [155, 156] и рецепторы, сопряженные с G-белком [157]. Chol на внутренней стороне мембраны специфически взаимодействует с цитозольными белками, которые координируют различные клеточные сигнальные события [158–160]. При этом показано, что он распределен на мембране асимметрично — концентрация доступного Chol на внутренней стороне мембраны на порядок ниже, чем на внешней [161].

Филипин (filipin) на протяжении последних десятилетий активно использовался для локализации Chol в клетках и тканях [162]. Филипин является полиеновым макролидным антибиотиком, выделенным из бактерии *Streptomyces filipinensis* [163], и специфично связывается с неэтерифицированными стеринами. Однако использование пробы на основе филипина технически затруднено, поскольку он токсичен и склонен к быстрому фотообесцвечиванию [164].

Наиболее распространенная рекомбинантная метка на Chol основана на домене D4 холестерин-зависимых цитолизина перфринголизина O (PFO D4) из *Clostridium perfringens* и антролизина O (ALO D4) из *Bacillus anthracis* [165–167]. Связывание нативного PFO D4 с Chol происходит только при условии высокого (более 40 мольных % (мол.%)) содержания Chol в мембране [56, 168], что сильно ограничивает область его применения. В связи с этим с целью снижения порогового значения для связывания метки с Chol в последовательность PFO D4 были

внесены разнообразные точечные мутации (D4H (D434S), D434A, D434A/A463W, YDA (Y415A/D434W/A463W), YQDA (Y415A/Q433W/D434W/A463W)) [161]. Среди этого перечня наиболее перспективными являются мутантные варианты YDA (табл. 1) и YQDA, поскольку было показано, что они могут связываться с липосомами с содержанием Chol в мембране от 1 мол.%, что указывает на то, что данные маркеры могут быть использованы для детекции Chol на клеточных мембранах в широком диапазоне концентраций [161]. D4-домен антролизина O (ALO D4) обладает похожими свойствами [57] (табл. 1).

Osh4 — это дрожжевой цитозольный белок, связывающий Chol, 25-гидроксихолестерин (25HC) и фосфатидинозитол-4-фосфат (PI(4)P) [169], и осуществляющий фосфатидилинозитол-зависимый транспорт стерина [170]. Удаление N-концевого участка Osh4 аннулирует его стерин-транспортную активность и связывание с PI(4)P, а мутация K109 подавляет связывание 25HC [170]. Таким образом, был создан рекомбинантный сенсор на Chol на основе Osh4 (eOsh4) путем мутации внутренних цистеинов C68S/C98S/C229S, мутации K109A и введения мишени для мечения флуорофором K108C [56] (табл. 1). Данный рекомбинантный сенсор связывается с мембранами в присутствии низких концентраций Chol (менее 5 мол.%) [56].

Стерин-связывающий белок Maistero-2, полученный из гриба *Grifola frondosa*, имеет сниженный порог связывания с Chol по сравнению с нативным PFO D4 и связывается с мембранами в присутствии 30% Chol [58] (табл. 1). Отсутствие строго консервативной пары Thr-Leu, присутствующей в других связывающих Chol белках, таких как PFO и ALO, указывает на альтернативный способ распознавания стерина [58].

GRAM-домен белка GRAMD1b является детектором участков мембраны, обогащенных одновременно Chol и анионными липидами, включая PS [171]. GRAM-домен дикого типа связывается с Chol в мембране только в присутствии достаточно высоких концентраций Chol [171], в то время как мутация G187W (метка GRAM-W) снижает порог по содержанию Chol до 20% в присутствии 20% PS [172] (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методики визуализации липидных доменов, детекции распределения различных типов липидов сильно продвинулись за последние десятилетия, в значительной степени благодаря открытию

и совершенствованию липид-специфичных белковых сенсоров. На данный момент исследователям доступен широкий спектр таких сенсоров, которые могут быть рекомбинантно синтезированы в *E. coli*. Однако использование рекомбинантных белковых сенсоров к основным липидам мембраны не лишено некоторых ограничений, таких как неспецифичное связывание, не слишком высокая аффинность, порог по минимальному содержанию целевого липида на мембране, сложность сохранения распределения липидов на мембране при подготовке биологических образцов. Визуализация липидов в живых клетках ограничено внутриклеточной экспрессией биосенсоров, хотя существуют подходы, позволяющие вводить метки внутрь клетки путем инъекции [173, 174].

Биосенсоры с высокой аффинностью и специфичностью доступны только для ограниченного числа липидов. Однако благодаря развитию такой области, как дизайн белков *de novo* возможно создание новых белковых сенсоров [175], а также усовершенствование уже существующих. Благодаря успешному применению машинного обучения для дизайна биосенсоров с целью мониторинга белок-опосредованной внутриклеточной передачи сигнала [176] в будущем данный подход может быть использован и для дизайна липид-связывающих систем.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 23-75-01153.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Meer G., Lisman Q. 2002. Sphingolipid transport: Rafts and translocators. *J. Biol. Chem.* **277**, 25855–25858. doi 10.1074/jbc.R200010200
2. Marsh D. 2009. Cholesterol-induced fluid membrane domains: A compendium of lipid-raft ternary phase diagrams. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1788**, 2114–2123. doi 10.1016/j.bbamem.2009.08.004
3. London E. 2005. How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1746**, 203–220. doi 10.1016/j.bbamcr.2005.09.002
4. Van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. 2008. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124. doi 10.1038/nrm2330
5. Osawa T., Fujikawa K., Shimamoto K. 2024. Structures, functions, and syntheses of glycerol-glycophospholipids. *Front. Chem.* **12**, 1353688. doi 10.3389/fchem.2024.1353688
6. Korbecki J., Bosiacki M., Kupnicka P., Barczak K., Ziętek P., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I. 2024. Biochemistry and diseases related to the interconversion of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 10745. doi 10.3390/ijms251910745
7. Chen L., Chen X.-W., Huang X., Song B.-L., Wang Y., Wang Y. 2019. Regulation of glucose and lipid metabolism in health and disease. *Sci. China Life Sci.* **62**, 1420–1458. doi 10.1007/s11427-019-1563-3
8. Burke J.E. 2018. Structural basis for regulation of phosphoinositide kinases and their involvement in human disease. *Mol. Cell.* **71**, 653–673. doi 10.1016/j.molcel.2018.08.005
9. Billcliff P.G., Lowe M. 2014. Inositol lipid phosphatases in membrane trafficking and human disease. *Biochem. J.* **461**, 159–175. doi 10.1042/BJ20140361
10. Maekawa M., Fairn G.D. 2014. Molecular probes to visualize the location, organization and dynamics of lipids. *J. Cell Sci.* jcs.150524. doi 10.1242/jcs.150524
11. Eurtivong C., Leung E., Sharma N., Leung I.K.H., Reynisson J. 2023. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C as a promising drug target. *Molecules.* **28**, 5637. doi 10.3390/molecules28155637
12. Exton J.H. 1994. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1212**, 26–42. doi 10.1016/0005-2760(94)90186-4
13. Kennedy E.P., Weiss S.B. 1956. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids. *J. Biol. Chem.* **222**, 193–214. doi 10.1016/S0021-9258(19)50785-2
14. Vance D.E., Ridgway N.D. 1988. The methylation of phosphatidylethanolamine. *Prog. Lipid Res.* **27**, 61–79. doi 10.1016/0163-7827(88)90005-7
15. Eichner N.Z.M., Gilbertson N.M., Musante L., La Salvia S., Weltman A., Erdbrügger U., Malin S.K. 2019. An oral glucose load decreases postprandial extracellular vesicles in obese adults with and without prediabetes. *Nutrients.* **11**, 580. doi 10.3390/nu11030580
16. Jimenez J.J., Jy W., Mauro L.M., Soderland C., Horstman L.L., Ahn Y.S. 2003. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb. Res.* **109**, 175–180. doi 10.1016/S0049-3848(03)00064-1
17. Enjeti A., Lincz L., Seldon M. 2007. Detection and measurement of microparticles: An evolving research tool for vascular biology. *Semin. Thromb. Hemost.* **33**, 771–779. doi 10.1055/s-2007-1000369

18. Connor D.E., Exner T., Ma D.D.F., Joseph J.E. 2010. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb. Haemost.* **103**, 1044–1052. doi 10.1160/TH09-09-0644
19. Key N.S. 2010. Analysis of tissue factor positive microparticles. *Thromb. Res.* **125**, S42–S45. doi 10.1016/j.thromres.2010.01.035
20. Ridger V.C., Boulanger C.M., Angelillo-Scherrer A., Badimon L., Blanc-Brude O., Bochaton-Piallat M.-L., Boilard E., Buzas E.I., Caporali A., Dignat-George F., Evans P.C., Lacroix R., Lutgens E., Ketelhuth D.F.J., Nieuwland R., Toti F., Tuñón J., Weber C., Hoefler I.E., Lip G.Y.H., Werner N., Shantsila E., Ten Cate H., Thomas M., Harrison P. 2017. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases: Position paper of the European society of cardiology (ESC) working group on atherosclerosis and vascular biology. *Thromb. Haemost.* **117**, 1296–1316. doi 10.1160/TH16-12-0943
21. An S.J., Stagi M., Gould T.J., Wu Y., Mlodzianoski M., Rivera-Molina F., Toomre D., Strittmatter S.M., De Camilli P., Bewersdorf J., Zenisek D. 2022. Multimodal imaging of synaptic vesicles with a single probe. *Cell Rep. Methods.* **2**, 100199. doi 10.1016/j.crmeth.2022.100199
22. Hirano Y., Gao Y.-G., Stephenson D.J., Vu N.T., Malinina L., Simanshu D.K., Chalfant C.E., Patel D.J., Brown R.E. 2019. Structural basis of phosphatidylcholine recognition by the C2-domain of cytosolic phospholipase A2 α . *eLife.* **8**, e44760. doi 10.7554/eLife.44760
23. Ward K.E., Ropa J.P., Adu-Gyamfi E., Stahelin R.V. 2012. C2 domain membrane penetration by group IVA cytosolic phospholipase A2 induces membrane curvature changes. *J. Lipid Res.* **53**, 2656–2666. doi 10.1194/jlr.M030718
24. Perisic O., Paterson H.F., Mosedale G., Lara-González S., Williams R.L. 1999. Mapping the phospholipid-binding surface and translocation determinants of the C2 domain from cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* **274**, 14979–14987. doi 10.1074/jbc.274.21.14979
25. Rand M.L., Wang H., Pluthero F.G., Stafford A.R., Ni R., Vaezzadeh N., Allison A.C., Kahr W.H.A., Weitz J.I., Gross P.L. 2012. Diannexin, an annexin A5 homodimer, binds phosphatidylserine with high affinity and is a potent inhibitor of platelet-mediated events during thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 1109–1119. doi 10.1111/j.1538-7836.2012.04716.x
26. Shao C., Novakovic V.A., Head J.F., Seaton B.A., Gilbert G.E. 2008. Crystal structure of lactadherin C2 domain at 1.7 Å resolution with mutational and computational analyses of its membrane-binding motif. *J. Biol. Chem.* **283**, 7230–7241. doi 10.1074/jbc.M705195200
27. Ye H., Li B., Subramanian V., Choi B.-H., Liang Y., Harikishore A., Chakraborty G., Baek K., Yoon H.S. 2013. NMR solution structure of C2 domain of MFG-E8 and insights into its molecular recognition with phosphatidylserine. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* **1828**, 1083–1093. doi 10.1016/j.bbamem.2012.12.009
28. Uchida Y., Hasegawa J., Chinnapen D., Inoue T., Okazaki S., Kato R., Wakatsuki S., Misaki R., Koike M., Uchiyama Y., Iemura S., Natsume T., Kuwahara R., Nakagawa T., Nishikawa K., Mukai K., Miyoshi E., Taniguchi N., Sheff D., Lencer W.I., Taguchi T., Arai H. 2011. Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 15846–15851. doi 10.1073/pnas.1109101108
29. Nakai W., Yoshida T., Diez D., Miyatake Y., Nishibu T., Imawaka N., Naruse K., Sadamura Y., Hanayama R. 2016. A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Sci. Rep.* **6**, 33935. doi 10.1038/srep33935
30. Miyanishi M., Tada K., Koike M., Uchiyama Y., Kitamura T., Nagata S. 2007. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature.* **450**, 435–439. doi 10.1038/nature06307
31. Maib H., Adarska P., Hunton R., Vines J.H., Strutt D., Bottanelli F., Murray D.H. 2024. Recombinant biosensors for multiplex and super-resolution imaging of phosphoinositides. *J. Cell Biol.* **223**, e202310095. doi 10.1083/jcb.202310095
32. Pemberton J.G., Kim Y.J., Humpolickova J., Eisenreichova A., Sengupta N., Toth D.J., Boura E., Balla T. 2020. Defining the subcellular distribution and metabolic channeling of phosphatidylinositol. *J. Cell Biol.* **219**, doi 10.1083/jcb.201906130
33. Sankaran V.G., Klein D.E., Sachdeva M.M., Lemmon M.A. 2001. High-affinity binding of a FYVE domain to phosphatidylinositol 3-phosphate requires intact phospholipid but not FYVE Ddomain oligomerization. *Biochemistry.* **40**, 8581–8587. doi 10.1021/bi010425d
34. Burd C.G., Emr S.D. 1998. Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol. Cell.* **2**, 157–162. doi 10.1016/S1097-2765(00)80125-2
35. Hammond G.R.V., Balla T. 2015. Polyphosphoinositide binding domains: Key to inositol lipid biology. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids.* **1851**, 746–758. doi 10.1016/j.bbalip.2015.02.013
36. Gaullier J.-M., Rønning E., Gillooly D.J., Stenmark H. 2000. Interaction of the EEA1 FYVE Finger with phosphatidylinositol 3-phosphate and early endosomes. *J. Biol. Chem.* **275**, 24595–24600. doi 10.1074/jbc.M906554199

37. Bravo J., Karathanassis D., Pacold C.M., Pacold M.E., Ellson C.D., Anderson K.E., Butler P.J.G., Lavenir I., Perisic O., Hawkins P.T., Stephens L., Williams R.L. 2001. The crystal structure of the PX domain from p40phox bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Mol. Cell*. **8**, 829–839. doi 10.1016/S1097-2765(01)00372-0
38. Dolinsky S., Haneburger I., Cichy A., Hannemann M., Itzen A., Hilbi H. 2014. The *Legionella longbeachae* Icm/dot substrate SidC selectively binds phosphatidylinositol 4-phosphate with nanomolar affinity and promotes pathogen vacuole-endoplasmic reticulum interactions. *Infect. Immun.* **82**, 4021–4033. doi 10.1128/IAI.01685-14
39. He J., Scott J.L., Heroux A., Roy S., Lenoir M., Overduin M., Stahelin R.V., Kutateladze T.G. 2011. Molecular basis of phosphatidylinositol 4-phosphate and ARF1 GTPase recognition by the FAPP1 pleckstrin homology (PH) domain. *J. Biol. Chem.* **286**, 18650–18657. doi 10.1074/jbc.M111.233015
40. Brombacher E., Urwyler S., Ragaz C., Weber S.S., Kami K., Overduin M., Hilbi H. 2009. Rab1 guanine nucleotide exchange factor SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of *Legionella pneumophila*. *J. Biol. Chem.* **284**, 4846–4856. doi 10.1074/jbc.M807505200
41. Gozani O., Karuman P., Jones D.R., Ivanov D., Cha J., Lugovskoy A.A., Baird C.L., Zhu H., Field S.J., Lessnick S.L., Villasenor J., Mehrotra B., Chen J., Rao V.R., Brugge J.S., Ferguson C.G., Payraastre B., Myszkowski D.G., Cantley L.C., Wagner G., Divecha N., Prestwich G.D., Yuan J. 2003. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell*. **114**, 99–111. doi 10.1016/S0092-8674(03)00480-X
42. Manna D., Albanese A., Park W.S., Cho W. 2007. Mechanistic basis of differential cellular responses of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate- and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding pleckstrin homology domains. *J. Biol. Chem.* **282**, 32093–32105. doi 10.1074/jbc.M703517200
43. Goulden B.D., Pacheco J., Dull A., Zewe J.P., Deiters A., Hammond G.R.V. 2019. A high-avidity biosensor reveals plasma membrane PI(3,4)P₂ is predominantly a class I PI3K signaling product. *J. Cell Biol.* **218**, 1066–1079. doi 10.1083/jcb.201809026
44. Vines J.H., Maib H., Buckley C.M., Gueho A., Zhu Z., Soldati T., Murray D.H., King J.S. 2023. A PI(3,5)P₂ reporter reveals PIKfyve activity and dynamics on macropinosomes and phagosomes. *J. Cell Biol.* **222**, e202209077. doi 10.1083/jcb.202209077
45. Klein P., Mattoon D., Lemmon M.A., Schlessinger J. 2004. A structure-based model for ligand binding and dimerization of EGF receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 929–934. doi 10.1073/pnas.0307285101
46. Garcia P., Gupta R., Shah S., Morris A.J., Rudge S.A., Scarlata S., Petrova V., McLaughlin S., Rebecchi M.J. 1995. The pleckstrin homology domain of phospholipase C- δ .1 binds with high affinity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in bilayer membranes. *Biochemistry*. **34**, 16228–16234. doi 10.1021/bi00049a039
47. Fukuda M., Kojima T., Kabayama H., Mikoshiba K. 1996. Mutation of the Pleckstrin Homology domain of bruton's tyrosine kinase in immunodeficiency impaired inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding capacity. *J. Biol. Chem.* **271**, 30303–30306. doi 10.1074/jbc.271.48.30303
48. Kassas N., Tanguy E., Thahouly T., Fouillen L., Heintz D., Chasserot-Golaz S., Bader M.-F., Grant N.J., Vitale N. 2017. Comparative characterization of phosphatidic acid sensors and their localization during frustrated phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **292**, 4266–4279. doi 10.1074/jbc.M116.742346
49. Makino A., Abe M., Murate M., Inaba T., Yilmaz N., Hullin-Matsuda F., Kishimoto T., Schieber N.L., Taguchi T., Arai H., Anderluh G., Parton R.G., Kobayashi T. 2015. Visualization of the heterogeneous membrane distribution of sphingomyelin associated with cytokinesis, cell polarity, and sphingolipidosis. *FASEB J.* **29**, 477–493. doi 10.1096/fj.13-247585
50. Kiyokawa E., Baba T., Otsuka N., Makino A., Ohno S., Kobayashi T. 2005. Spatial and functional heterogeneity of sphingolipid-rich membrane domains. *J. Biol. Chem.* **280**, 24072–24084. doi 10.1074/jbc.M502244200
51. Hong Q., Gutiérrez-Aguirre I., Barlič A., Malovrh P., Kristan K., Podlesek Z., Maček P., Turk D., González-Mañas J.M., Lakey J.H., Anderluh G. 2002. Two-step membrane binding by Equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. *J. Biol. Chem.* **277**, 41916–41924. doi 10.1074/jbc.M204625200
52. Yokoyama J., Matsuda T., Koshiba S., Tochio N., Kigawa T. 2011. A practical method for cell-free protein synthesis to avoid stable isotope scrambling and dilution. *Anal. Biochem.* **411**, 223–229. doi 10.1016/j.ab.2011.01.017
53. Makino A., Abe M., Ishitsuka R., Murate M., Kishimoto T., Sakai S., Hullin-Matsuda F., Shimada Y., Inaba T., Miyatake H., Tanaka H., Kurahashi A., Pack C., S. Kasai R., Kubo S., L. Schieber N., Dohmae N., Tochio N., Hagiwara K., Sasaki Y., Aida Y., Fujimori F., Kigawa T., Nishibori K., Parton R.G., Kusumi A., Sako Y., Anderluh G., Yamashita M., Kobayashi T., Greimel P., Kobayashi T. 2017. A novel sphingomyelin/cholesterol domain-specific probe reveals the dynamics of the membrane domains during virus release and in Niemann-Pick type C. *FASEB J.* **31**, 1301–1322. doi 10.1096/fj.201500075R

54. Bhat H.B., Ishitsuka R., Inaba T., Murate M., Abe M., Makino A., Kohyama-Koganeya A., Nagao K., Kurahashi A., Kishimoto T., Tahara M., Yamano A., Nagamune K., Hirabayashi Y., Juni N., Umeda M., Fujimori F., Nishibori K., Yamaji-Hasegawa A., Greimel P., Kobayashi T. 2015. Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates. *FASEB J.* **29**, 3920–3934. doi 10.1096/fj.15-272112
55. Shimada Y., Maruya M., Iwashita S., Ohno-Iwashita Y. 2002. The C-terminal domain of perfringolysin O is an essential cholesterol-binding unit targeting to cholesterol-rich microdomains. *Eur. J. Biochem.* **269**, 6195–6203. doi 10.1046/j.1432-1033.2002.03338.x
56. Buwaneka P., Ralko A., Liu S.-L., Cho W. 2021. Evaluation of the available cholesterol concentration in the inner leaflet of the plasma membrane of mammalian cells. *J. Lipid Res.* **62**, 100084. doi 10.1016/j.jlr.2021.100084
57. Cocklin S., Jost M., Robertson N.M., Weeks S.D., Weber H., Young E., Seal S., Zhang C., Mosser E., Loll P.J., Saunders A.J., Rest R.F., Chaiken I.M. 2006. Real-time monitoring of the membrane-binding and insertion properties of the cholesterol-dependent cytolysin anthrolysin O from *Bacillus anthracis*. *J. Mol. Recognit.* **19**, 354–362. doi 10.1002/jmr.784
58. Yamaji-Hasegawa A., Murate M., Inaba T., Dohmae N., Sato M., Fujimori F., Sako Y., Greimel P., Kobayashi T. 2022. A novel sterol-binding protein reveals heterogeneous cholesterol distribution in neurite outgrowth and in late endosomes/lysosomes. *Cell. Mol. Life Sci.* **79**, 324. doi 10.1007/s00018-022-04339-6
59. Koh D.H.Z., Naito T., Na M., Yeap Y.J., Rozario P., Zhong F.L., Lim K.-L., Saheki Y. 2023. Visualization of accessible cholesterol using a GRAM domain-based biosensor. *Nat. Commun.* **14**, 6773. doi 10.1038/s41467-023-42498-7
60. Wang S., Zhang S., Liou L.-C., Ren Q., Zhang Z., Caldwell G.A., Caldwell K.A., Witt S.N. 2014. Phosphatidylethanolamine deficiency disrupts α -synuclein homeostasis in yeast and worm models of Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, doi 10.1073/pnas.1411694111
61. Vance J.E. 2015. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic.* **16**, 1–18. doi 10.1111/tra.12230
62. Bogdanov M., Dowhan W., Vitrac H. 2014. Lipids and topological rules governing membrane protein assembly. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1843**, 1475–1488. doi 10.1016/j.bbamcr.2013.12.007
63. Tatsuta T., Scharwey M., Langer T. 2014. Mitochondrial lipid trafficking. *Trends Cell Biol.* **24**, 44–52. doi 10.1016/j.tcb.2013.07.011
64. Siegel D.P., Epand R.M. 2000. Effect of influenza hemagglutinin fusion peptide on lamellar/inverted phase transitions in dipalmitoleoylphosphatidylethanolamine: implications for membrane fusion mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1468**, 87–98. doi 10.1016/S0005-2736(00)00246-7
65. Yang L., Ding L., Huang H.W. 2003. New Phases of phospholipids and implications to the membrane fusion problem. *Biochemistry.* **42**, 6631–6635. doi 10.1021/bi0344836
66. Calzada E., Avery E., Sam P.N., Modak A., Wang C., McCaffery J.M., Han X., Alder N.N., Claypool S.M. 2019. Phosphatidylethanolamine made in the inner mitochondrial membrane is essential for yeast cytochrome bc1 complex function. *Nat. Commun.* **10**, 1432. doi 10.1038/s41467-019-09425-1
67. Shinzawa-Itoh K., Aoyama H., Muramoto K., Terada H., Kurauchi T., Tadehara Y., Yamasaki A., Sugimura T., Kurono S., Tsujimoto K., Mizushima T., Yamashita E., Tsukihara T., Yoshikawa S. 2007. Structures and physiological roles of 13 integral lipids of bovine heart cytochrome c oxidase. *EMBO J.* **26**, 1713–1725. doi 10.1038/sj.emboj.7601618
68. Ichimura Y., Kirisako T., Takao T., Satomi Y., Shimonishi Y., Ishihara N., Mizushima N., Tanida I., Kominami E., Ohsumi M., Noda T., Ohsumi Y. 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature.* **408**, 488–492. doi 10.1038/35044114
69. Kagan V.E., Mao G., Qu F., Angeli J.P.F., Doll S., Croix C.S., Dar H.H., Liu B., Tyurin V.A., Ritov V.B., Kapralov A.A., Amoscato A.A., Jiang J., Anthony-muthu T., Mohammadyani D., Yang Q., Proneth B., Klein-Seetharaman J., Watkins S., Bahar I., Greenberger J., Mallampalli R.K., Stockwell B.R., Tyurina Y.Y., Conrad M., Bayır H. 2017. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 81–90. doi 10.1038/nchembio.2238
70. Deleault N.R., Piro J.R., Walsh D.J., Wang F., Ma J., Geoghegan J.C., Supattapone S. 2012. Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 8546–8551. doi 10.1073/pnas.1204498109
71. Banfield M.J., Barker J.J., Perry A.C., Brady R.L. 1998. Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. *Structure.* **6**, 1245–1254. doi 10.1016/S0969-2126(98)00125-7
72. Bucquoy S., Jollès P., Schoentgen F. 1994. Relationships between molecular interactions (nucleotides, lipids and proteins) and structural features of the bovine brain 21-kDa protein. *Eur. J. Biochem.* **225**, 1203–1210. doi 10.1111/j.1432-1033.1994.1203b.x
73. Serre L., Vallée B., Bureaud N., Schoentgen F., Zelwer C. 1998. Crystal structure of the phosphatidylethanolamine-binding protein from bovine brain: A novel structural class of phospholipid-binding proteins. *Structure.* **6**, 1255–1265. doi 10.1016/S0969-2126(98)00126-9

74. Vallée B.S., Tauc P., Brochon J., Maget-Dana R., Lelièvre D., Metz-Boutigue M., Bureau N., Schoentgen F. 2001. Behaviour of bovine phosphatidylethanolamine-binding protein with model membranes: Evidence of affinity for negatively charged membranes. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5831–5841. doi 10.1046/j.0014-2956.2001.02528.x
75. Bernier I., Tresca J.-P., Jollès P. 1986. Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Protein Struct. Mol. Enzymol.* **871**, 19–23. doi 10.1016/0167-4838(86)90128-7
76. Hou S., Johnson S.E., Zhao M. 2015. A one-step staining probe for phosphatidylethanolamine. *ChemBioChem.* **16**, 1955–1960. doi 10.1002/cbic.201500127
77. Machaidze G., Ziegler A., Seelig J. 2002. Specific binding of Ro 09-0198 (Cinnamycin) to phosphatidylethanolamine: A thermodynamic analysis. *Biochemistry.* **41**, 1965–1971. doi 10.1021/bi015841c
78. Hayashi F., Nagashima K., Terui Y., Kawamura Y., Matsumoto K., Itazaki H. 1990. The structure of PA48009: The revised structure of duramycin. *J. Antibiot. (Tokyo).* **43**, 1421–1430. doi 10.7164/antibiotics.43.1421
79. Navarro J., Chabot J., Sherrill K., Aneja R., Zahler S.A., Racker E. 1985. Interaction of duramycin with artificial and natural membranes. *Biochemistry.* **24**, 4645–4650. doi 10.1021/bi00338a025
80. Makino A., Baba T., Fujimoto K., Iwamoto K., Yano Y., Terada N., Ohno S., Sato S.B., Ohta A., Umeda M., Matsuzaki K., Kobayashi T. 2003. Cinnamycin (Ro 09-0198) promotes cell binding and toxicity by inducing transbilayer lipid movement. *J. Biol. Chem.* **278**, 3204–3209. doi 10.1074/jbc.M210347200
81. Kay J.G., Fairn G.D. 2019. Distribution, dynamics and functional roles of phosphatidylserine within the cell. *Cell Commun. Signal.* **17**, 126. doi 10.1186/s12964-019-0438-z
82. Vance J.E. 2018. Historical perspective: Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine from the 1800s to the present. *J. Lipid Res.* **59**, 923–944. doi 10.1194/jlr.R084004
83. Zwaal R.F.A., Comfurius P., Bevers E.M. 1998. Lipid–protein interactions in blood coagulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Rev. Biomembr.* **1376**, 433–453. doi 10.1016/S0304-4157(98)00018-5
84. Leventis P.A., Grinstein S. 2010. The Distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 407–427. doi 10.1146/annurev.biophys.093008.131234
85. Fadok V.A., De Cathelineau A., Daleke D.L., Henson P.M., Bratton D.L. 2001. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **276**, 1071–1077. doi 10.1074/jbc.M003649200
86. Daleke D.L. 2007. Phospholipid flippases. *J. Biol. Chem.* **282**, 821–825. doi 10.1074/jbc.R600035200
87. Cho W., Stahelin R. 2006. Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Mol. Cell Biol. Lipids.* **1761**, 838–849. doi 10.1016/j.bbalip.2006.06.014
88. Ariketh D., Nelson R., Vance J.E. 2008. Defining the importance of phosphatidylserine synthase-1 (PSS1). *J. Biol. Chem.* **283**, 12888–12897. doi 10.1074/jbc.M800714200
89. Logue S.E., Elgendy M., Martin S.J. 2009. Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. *Nat. Protoc.* **4**, 1383–1395. doi 10.1038/nprot.2009.143
90. Yen T.-C., Wey S.-P., Liao C.-H., Yeh C.-H., Shen D.-W., Achilefu S., Wun T.-C. 2010. Measurement of the binding parameters of annexin derivative–erythrocyte membrane interactions. *Anal. Biochem.* **406**, 70–79. doi 10.1016/j.ab.2010.06.048
91. Thiagarajan P., Tait J.F. 1990. Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. *J. Biol. Chem.* **265**, 17420–17423. doi 10.1016/S0021-9258(18)38177-8
92. Gerke V., Gavins F.N.E., Geisow M., Grewal T., Jaiswal J.K., Nylandsted J., Rescher U. 2024. Annexins—a family of proteins with distinctive tastes for cell signaling and membrane dynamics. *Nat. Commun.* **15**, 1574. doi 10.1038/s41467-024-45954-0
93. Swairjo M.A., Concha N.O., Kaetzel M.A., Dedman J.R., Seaton B.A. 1995. Ca²⁺-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2**, 968–974. doi 10.1038/nsb1195-968
94. Lemmon M.A. 2008. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 99–111. doi 10.1038/nrm2328
95. Tietjen G.T., Gong Z., Chen C.-H., Vargas E., Crooks J.E., Cao K.D., Heffern C.T.R., Henderson J.M., Meron M., Lin B., Roux B., Schlossman M.L., Steck T.L., Lee K.Y.C., Adams E.J. 2014. Molecular mechanism for differential recognition of membrane phosphatidylserine by the immune regulatory receptor Tim4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, doi 10.1073/pnas.1320174111
96. Okazaki S., Kato R., Uchida Y., Taguchi T., Arai H., Wakatsuki S. 2012. Structural basis of the strict phospholipid binding specificity of the pleckstrin homology domain of human evectin-2. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 117–123. doi 10.1107/S0907444911051626
97. Lin Y.-C., Chipot C., Scheuring S. 2020. Annexin-V stabilizes membrane defects by inducing lipid phase transition. *Nat. Commun.* **11**, 230. doi 10.1038/s41467-019-14045-w

98. Stuart M.C.A., Reutelingsperger C.P.M., Frederik P.M. 1998. Binding of annexin V to bilayers with various phospholipid compositions using glass beads in a flow cytometer. *Cytometry*. **33**, 414–419. doi 10.1002/(SICI)1097-0320(19981201)33:4<414::AID-CYTO4>3.0.CO;2-H
99. Tobi D., Bahar I. 2005. Structural changes involved in protein binding correlate with intrinsic motions of proteins in the unbound state. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 18908–18913. doi 10.1073/pnas.0507603102
100. Gauer J.W., Knutson K.J., Jaworski S.R., Rice A.M., Rannikko A.M., Lentz B.R., Hinderliter A. 2013. Membrane modulates affinity for calcium ion to create an apparent cooperative binding response by Annexin a5. *Biophys. J.* **104**, 2437–2447. doi 10.1016/j.bpj.2013.03.060
101. Shi J., Gilbert G.E. 2003. Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites. *Blood*. **101**, 2628–2636. doi 10.1182/blood-2002-07-1951
102. Carman C.V., Nikova D.N., Sakurai Y., Shi J., Novakovic V.A., Rasmussen J.T., Lam W.A., Gilbert G.E. 2023. Membrane curvature and PS localize coagulation proteins to filopodia and retraction fibers of endothelial cells. *Blood Adv.* **7**, 60–72. doi 10.1182/bloodadvances.2021006870
103. Shi J., Shi Y., Waehrens L.N., Rasmussen J.T., Heegaard C.W., Gilbert G.E. 2006. Lactadherin detects early phosphatidylserine exposure on immortalized leukemia cells undergoing programmed cell death. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **69**, 1193–1201. doi 10.1002/cyto.a.20345
104. Shi J., Heegaard C.W., Rasmussen J.T., Gilbert G.E. 2004. Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* **1667**, 82–90. doi 10.1016/j.bbamem.2004.09.006
105. Miyagi A., Chipot C., Rangl M., Scheuring S. 2016. High-speed atomic force microscopy shows that annexin V stabilizes membranes on the second timescale. *Nat. Nanotechnol.* **11**, 783–790. doi 10.1038/nnano.2016.89
106. Millington-Burgess S.L., Harper M.T. 2022. Maintaining flippase activity in procoagulant platelets is a novel approach to reducing thrombin generation. *J. Thromb. Haemost.* **20**, 989–995. doi 10.1111/jth.15641
107. Kaiser R., Escaig R., Kranich J., Hoffknecht M.-L., Anjum A., Polewka V., Mader M., Hu W., Belz L., Gold C., Titova A., Lorenz M., Pekayvaz K., Kääb S., Gaertner F., Stark K., Brocker T., Massberg S., Nicolai L. 2022. Procoagulant platelet sentinels prevent inflammatory bleeding through GPIIB/IIIa and GPVI. *Blood*. **140**, 121–139. doi 10.1182/blood.2021014914
108. Yeung T., Gilbert G.E., Shi J., Silvius J., Kapus A., Grinstein S. 2008. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science*. **319**, 210–213. doi 10.1126/science.1152066
109. Dirvelyte E., Bujanauskienė D., Jankaityte E., Daugelaviciene N., Kisieliute U., Nagula I., Budvytyte R., Neniskyte U. 2023. Genetically encoded phosphatidylserine biosensor for in vitro, ex vivo and in vivo labelling. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **28**, 59. doi 10.1186/s11658-023-00472-7
110. Wen Y., Dick R.A., Feigenson G.W., Vogt V.M. 2016. Effects of membrane charge and order on membrane binding of the retroviral structural protein Gag. *J. Virol.* **90**, 9518–9532. doi 10.1128/JVI.01102-16
111. Tremel S., Ohashi Y., Morado D.R., Bertram J., Perisic O., Brandt L.T.L., Von Wrisberg M.-K., Chen Z.A., Maslen S.L., Kovtun O., Skehel M., Rappsilber J., Lang K., Munro S., Briggs J.A.G., Williams R.L. 2021. Structural basis for VPS34 kinase activation by Rab1 and Rab5 on membranes. *Nat. Commun.* **12**, 1564. doi 10.1038/s41467-021-21695-2
112. Mesmin B., Bigay J., Moser von Filseck J., Lacas-Gervais S., Drin G., Antonny B. 2013. A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell*. **155**, 830–843. doi 10.1016/j.cell.2013.09.056
113. Jiménez C., Portela R.A., Mellado M., Rodríguez-Frade J.M., Collard J., Serrano A., Martínez-A C., Avila J., Carrera A.C. 2000. Role of the PI3k regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J. Cell Biol.* **151**, 249–262. doi 10.1083/jcb.151.2.249
114. Gulluni F., Prever L., Li H., Krafcikova P., Corrado I., Lo W.-T., Margaria J.P., Chen A., De Santis M.C., Cnudde S.J., Fogerty J., Yuan A., Massarotti A., Sarijalo N.T., Vadas O., Williams R.L., Thelen M., Powell D.R., Schueler M., Wiesener M.S., Balla T., Baris H.N., Tiosano D., McDermott B.M., Perkins B.D., Ghigo A., Martini M., Haucke V., Boura E., Merlo G.R., Buchner D.A., Hirsch E. 2021. PI(3,4)P2-mediated cytokinetic abscission prevents early senescence and cataract formation. *Science*. **374**, eabk0410. doi 10.1126/science.abk0410
115. Edwards-Hicks J., Apostolova P., Buescher J.M., Maib H., Stanczak M.A., Corrado M., Klein Geltink R.I., Maccari M.E., Villa M., Carrizo G.E., Sanin D.E., Baixauli F., Kelly B., Curtis J.D., Haessler F., Patterson A., Field C.S., Caputa G., Kyle R.L., Soballa M., Cha M., Paul H., Martin J., Grzes K.M., Flachsmann L., Mitterer M., Zhao L., Winkler F., Rafei-Shamsabadi D.A., Meiss F., Bengsch B., Zeiser R., Puleston D.J., O'Sullivan D., Pearce E.J., Pearce E.L. 2023. Phosphoinositide acyl chain saturation drives CD8+ effector T cell signaling and function. *Nat. Immunol.* **24**, 516–530. doi 10.1038/s41590-023-01419-y
116. Dooley H.C., Razi M., Polson H.E.J., Girardin S.E., Wilson M.I., Tooze S.A. 2014. WIPI2 Links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12–5–16L1. *Mol. Cell*. **55**, 238–252. doi 10.1016/j.molcel.2014.05.021

117. Luo X., Wasilko D.J., Liu Y., Sun J., Wu X., Luo Z.-Q., Mao Y. 2015. Structure of the Legionella virulence factor, SidC reveals a unique PI(4)P-specific binding domain essential for its targeting to the bacterial phagosome. *PLOS Pathog.* **11**, e1004965. doi 10.1371/journal.ppat.1004965
118. Del Campo C.M., Mishra A.K., Wang Y.-H., Roy C.R., Janmey P.A., Lambright D.G. 2014. Structural Basis for PI(4)P-specific membrane recruitment of the Legionella pneumophila effector DrrA/SidM. *Structure.* **22**, 397–408. doi 10.1016/j.str.2013.12.018
119. Roberts M.F., Khan H.M., Goldstein R., Reuter N., Gershenson A. 2018. Search and subvert: Minimalist bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C Enzymes. *Chem. Rev.* **118**, 8435–8473. doi 10.1021/acs.chemrev.8b00208
120. Kutateladze T.G., Capelluto D.G.S., Ferguson C.G., Cheever M.L., Kutateladze A.G., Prestwich G.D., Overduin M. 2004. Multivalent mechanism of membrane insertion by the FYVE Domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 3050–3057. doi 10.1074/jbc.M309007200
121. Stahelin R.V., Burian A., Bruzik K.S., Murray D., Cho W. 2003. Membrane binding mechanisms of the PX Domains of NADPH Oxidase p40 and p47. *J. Biol. Chem.* **278**, 14469–14479. doi 10.1074/jbc.M212579200
122. Lomize A.L., Pogozheva I.D., Lomize M.A., Mosberg H.I. 2007. The role of hydrophobic interactions in positioning of peripheral proteins in membranes. *BMC Struct. Biol.* **7**, 44. doi 10.1186/1472-6807-7-44
123. Myeong J., Park C.-G., Suh B.-C., Hille B. 2021. Compartmentalization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism into plasma membrane liquid-ordered/raft domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2025343118. doi 10.1073/pnas.2025343118
124. Godi A., Campli A.D., Konstantakopoulos A., Tullio G.D., Alessi D.R., Kular G.S., Daniele T., Marra P., Lucocq J.M., Matteis M.A.D. 2004. FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat. Cell Biol.* **6**, 393–404. doi 10.1038/ncb1119
125. Hammond G.R.V., Schiavo G., Irvine R.F. 2009. Immunocytochemical techniques reveal multiple, distinct cellular pools of PtdIns4 P and PtdIns(4,5) P 2. *Biochem. J.* **422**, 23–35. doi 10.1042/BJ20090428
126. Watt S.A., Kular G., Fleming I.N., Downes C.P., Lucocq J.M. 2002. Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C δ 1. *Biochem. J.* **363**, 657–666. doi 10.1042/bj3630657
127. Hoshino F., Sakane F. 2020. Polyunsaturated fatty acid-containing phosphatidic acids selectively interact with L-lactate dehydrogenase A and induce its secondary structural change and inactivation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids.* **1865**, 158768. doi 10.1016/j.bbalip.2020.158768
128. Zhukovsky M.A., Filograna A., Luini A., Corda D., Valente C. 2019. Phosphatidic acid in membrane rearrangements. *FEBS Lett.* **593**, 2428–2451. doi 10.1002/1873-3468.13563
129. Liu Y., Su Y., Wang X. 2013. Phosphatidic acid-mediated signaling. pp. 159–176. In: *Lipid-mediated Protein Signaling*, (Capelluto, Daniel G. S. eds.) Springer Netherlands, Dordrecht.
130. Touret N., Paroutis P., Terebiznik M., Harrison R.E., Trombetta S., Pypaert M., Chow A., Jiang A., Shaw J., Yip C., Moore H.-P., Van Der Wel N., Houben D., Peters P.J., De Chastellier C., Mellman I., Grinstein S. 2005. Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell.* **123**, 157–170. doi 10.1016/j.cell.2005.08.018
131. Gagnon E., Duclos S., Rondeau C., Chevet E., Cameron P.H., Steele-Mortimer O., Paiement J., Bergeron J.J.M., Desjardins M. 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell.* **110**, 119–131. doi 10.1016/S0092-8674(02)00797-3
132. Abe M., Makino A., Hullin-Matsuda F., Kamijo K., Ohno-Iwashita Y., Hanada K., Mizuno H., Miyawaki A., Kobayashi T. 2012. A Role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to the cleavage furrow during cytokinesis. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 1396–1407. doi 10.1128/MCB.06113-11
133. Hullin-Matsuda F., Murate M., Kobayashi T. 2018. Protein probes to visualize sphingomyelin and ceramide phosphoethanolamine. *Chem. Phys. Lipids.* **216**, 132–141. doi 10.1016/j.chemphyslip.2018.09.002
134. Spiegel S., Foster D., Kolesnick R. 1996. Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 159–167. doi 10.1016/S0955-0674(96)80061-5
135. Hannun Y.A. 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science.* **274**, 1855–1859. doi 10.1126/science.274.5294.1855
136. Hannun Y. 1995. Ceramide: An intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 73–77. doi 10.1016/S0968-0004(00)88961-6
137. Edidin M. 2003. The state of lipid rafts: From model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257–283. doi 10.1146/annurev.biophys.32.110601.142439
138. Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **387**, 569–572. doi 10.1038/42408
139. Haan L.D., Hirst T.R. 2004. Cholera toxin: A paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). *Mol. Membr. Biol.* **21**, 77–92. doi 10.1080/09687680410001663267
140. Yamaji A., Sekizawa Y., Emoto K., Sakuraba H., Inoue K., Kobayashi H., Umeda M. 1998. Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 5300–5306. doi 10.1074/jbc.273.9.5300

141. Ishitsuka R., Yamaji-Hasegawa A., Makino A., Hirabayashi Y., Kobayashi T. 2004. A lipid-specific toxin reveals heterogeneity of sphingomyelin-containing membranes. *Biophys. J.* **86**, 296–307. doi 10.1016/S0006-3495(04)74105-3
142. Bakrač B., Gutiérrez-Aguirre I., Podlesek Z., Sonnen A.F.-P., Gilbert R.J.C., Maček P., Lakey J.H., Anderluh G. 2008. Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin. *J. Biol. Chem.* **283**, 18665–18677. doi 10.1074/jbc.M708747200
143. Belmonte G., Pederzoli C., Maček P., Menestrina G. 1993. Pore formation by the sea anemone cytolytic toxin in red blood cells and model lipid membranes. *J. Membr. Biol.* **131**, 11–22. doi 10.1007/BF02258530
144. Kristan K., Podlesek Z., Hojnik V., Gutiérrez-Aguirre I., Gunčar G., Turk D., González-Mañas J.M., Lakey J.H., Maček P., Anderluh G. 2004. Pore formation by Equinatoxin, a eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable β -sandwich. *J. Biol. Chem.* **279**, 46509–46517. doi 10.1074/jbc.M406193200
145. Skočaj M., Resnik N., Grundner M., Ota K., Rojko N., Hodnik V., Anderluh G., Sobota A., Maček P., Veranič P., Sepčič K. 2014. Tracking cholesterol/sphingomyelin-rich membrane domains with the ostreolysin A-mCherry protein. *PLoS ONE*. **9**, e92783. doi 10.1371/journal.pone.0092783
146. Ikonen E. 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 125–138. doi 10.1038/nrm2336
147. Maxfield F.R., Tabas I. 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*. **438**, 612–621. doi 10.1038/nature04399
148. Yeagle P.L. 1991. Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie*. **73**, 1303–1310. doi 10.1016/0300-9084(91)90093-G
149. Yeagle P.L. 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* **822**, 267–287. doi 10.1016/0304-4157(85)90011-5
150. Demel R.A., Bruckdorfer K.R., Van Deenen L.L.M. 1972. The effect of sterol structure on the permeability of liposomes to glucose, glycerol and Rb^+ . *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **255**, 321–330. doi 10.1016/0005-2736(72)90031-4
151. Issop L., Rone M.B., Papadopoulos V. 2013. Organellar plasticity and interactions in cholesterol transport and steroid biosynthesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **371**, 34–46. doi 10.1016/j.mce.2012.12.003
152. Russell D.W. 2003. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 137–174. doi 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712
153. Lingwood D., Simons K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. **327**, 46–50. doi 10.1126/science.1174621
154. Fantini J., Barrantes F.J. 2013. How cholesterol interacts with membrane proteins: An exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Front. Physiol.* **4**, doi 10.3389/fphys.2013.00031
155. Levitan I., Singh D.K., Rosenhouse-Dantsker A. 2014. Cholesterol binding to ion channels. *Front. Physiol.* **5**, doi 10.3389/fphys.2014.00065
156. Jiang Q.-X. 2019. Cholesterol-dependent gating effects on ion channels. pp. 167–190. In: *Cholesterol Modulation of Protein Function*, (Rosenhouse-Dantsker, Avia and Bukiya, Anna N. eds.) Springer International Publishing, Cham.
157. Kiriakidi S., Kolocouris A., Liapakis G., Ikram S., Durdagi S., Mavromoustakos T. 2019. Effects of cholesterol on GPCR function: Insights from computational and experimental studies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1135**, 89–103. doi 10.1007/978-3-030-14265-0_5
158. Francis K.R., Ton A.N., Xin Y., O'Halloran P.E., Wassif C.A., Malik N., Williams I.M., Cluzeau C.V., Trivedi N.S., Pavan W.J., Cho W., Westphal H., Porter F.D. 2016. Modeling Smith-Lemli-Opitz syndrome with induced pluripotent stem cells reveals a causal role for Wnt/ β -catenin defects in neuronal cholesterol synthesis phenotypes. *Nat. Med.* **22**, 388–396. doi 10.1038/nm.4067
159. Sheng R., Kim H., Lee H., Xin Y., Chen Y., Tian W., Cui Y., Choi J.-C., Doh J., Han J.-K., Cho W. 2014. Cholesterol selectively activates canonical Wnt signaling over non-canonical Wnt signalling. *Nat. Commun.* **5**, 4393. doi 10.1038/ncomms5393
160. Sheng R., Chen Y., Yung Gee H., Stec E., Melowic H.R., Blatner N.R., Tun M.P., Kim Y., Källberg M., Fujiwara T.K., Hye Hong J., Pyo Kim K., Lu H., Kusumi A., Goo Lee M., Cho W. 2012. Cholesterol modulates cell signaling and protein networking by specifically interacting with PDZ domain-containing scaffold proteins. *Nat. Commun.* **3**, 1249. doi 10.1038/ncomms2221
161. Liu S.-L., Sheng R., Jung J.H., Wang L., Stec E., O'Connor M.J., Song S., Bikkavilli R.K., Winn R.A., Lee D., Baek K., Ueda K., Levitan I., Kim K.-P., Cho W. 2017. Orthogonal lipid sensors identify transbilayer asymmetry of plasma membrane cholesterol. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 268–274. doi 10.1038/nchembio.2268
162. Orci L., Perrelet A., Montesano R. 1983. Differential filipin labeling of the luminal membranes lining the pancreatic acinus. *J. Histochem. Cytochem.* **31**, 952–955. doi 10.1177/31.7.6854007
163. Gimpl G., Gehrig-Burger K. 2007. Cholesterol reporter molecules. *Biosci. Rep.* **27**, 335–358. doi 10.1007/s10540-007-9060-1
164. Wilhelm L.P., Voilquin L., Kobayashi T., Tomasetto C., Alpy F. 2019. Intracellular and plasma membrane cholesterol labeling and quantification using filipin and GFP-D4. pp. 137–152. In: *Intracellular Lipid Transport*, (Drin, Guillaume eds.) Springer New York, New York, NY.

165. Endapally S., Infante R.E., Radhakrishnan A. 2019. Monitoring and modulating intracellular cholesterol trafficking using ALOD4, a cholesterol-binding protein. pp. 153–163. In: *Intracellular Lipid Transport*, (Drin, Guillaume eds.) Springer New York, New York, NY.
166. Tweten R.K., Hotze E.M., Wade K.R. 2015. The unique molecular choreography of giant pore formation by the cholesterol-dependent cytolysins of Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 323–340. doi 10.1146/annurev-micro-091014-104233
167. Rossjohn J., Feil S.C., McKinsty W.J., Tweten R.K., Parker M.W. 1997. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell*. **89**, 685–692. doi 10.1016/S0092-8674(00)80251-2
168. Das A., Goldstein J.L., Anderson D.D., Brown M.S., Radhakrishnan A. 2013. Use of mutant¹²⁵I-Perfringolysin O to probe transport and organization of cholesterol in membranes of animal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 10580–10585. doi 10.1073/pnas.1309273110
169. Im Y.J., Raychaudhuri S., Prinz W.A., Hurley J.H. 2005. Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins. *Nature*. **437**, 154–158. doi 10.1038/nature03923
170. De Saint-Jean M., Delfosse V., Douguet D., Chicanne G., Payrastré B., Bourguet W., Antonny B., Drin G. 2011. Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J. Cell Biol.* **195**, 965–978. doi 10.1083/jcb.201104062
171. Naito T., Ercan B., Krshnan L., Triebl A., Koh D.H.Z., Wei F.-Y., Tomizawa K., Torta F.T., Wenk M.R., Saheki Y. 2019. Movement of accessible plasma membrane cholesterol by the GRAMD1 lipid transfer protein complex. *eLife*. **8**, e51401. doi 10.7554/eLife.51401
172. Ercan B., Naito T., Koh D.H.Z., Dharmawan D., Saheki Y. 2021. Molecular basis of accessible plasma membrane cholesterol recognition by the GRAM domain of GRAMD1b. *EMBO J.* **40**, e106524. doi 10.15252/embj.2020106524
173. Kay J.G., Koivusalo M., Ma X., Wohland T., Grinstein S. 2012. Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Mol. Biol. Cell*. **23**, 2198–2212. doi 10.1091/mbc.e11-11-0936
174. Liu S.-L., Wang Z.-G., Hu Y., Xin Y., Singaram I., Gorai S., Zhou X., Shim Y., Min J.-H., Gong L.-W., Hay N., Zhang J., Cho W. 2018. Quantitative lipid imaging reveals a new signaling function of phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate: Isoform- and site-specific activation of Akt. *Mol. Cell*. **71**, 1092–1104.e5. doi 10.1016/j.molcel.2018.07.035
175. Quijano-Rubio A., Yeh H.-W., Park J., Lee H., Langan R.A., Boyken S.E., Lajoie M.J., Cao L., Chow C.M., Miranda M.C., Wi J., Hong H.J., Stewart L., Oh B.-H., Baker D. 2021. De novo design of modular and tunable protein biosensors. *Nature*. **591**, 482–487. doi 10.1038/s41586-021-03258-z
176. Yang J.-M., Chi W.-Y., Liang J., Takayanagi S., Iglesias P.A., Huang C.-H. 2021. Deciphering cell signaling networks with massively multiplexed biosensor barcoding. *Cell*. **184**, 6193–6206.e14. doi 10.1016/j.cell.2021.11.005

Recombinant Protein Biosensors of Cell Membrane Lipids

E. M. Koltsova^{1,2,*}, N. A. Kolchin^{1,2}, E. I. Nikolaeva^{1,2}, K. R. Butov^{1,3}

¹ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 117997 Russia

² Center of Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 109029 Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117513 Russia

*e-mail: ekaterina_koltsova@bk.ru

Specific patterns of lipid distribution in cell membranes determine their structural and signaling roles, and ensure the integrity and functionality of the plasma membrane and cell organelles. Recent advances in the development of recombinant lipid biosensors and imaging techniques allow direct observation of the distribution, movement, and dynamics of lipids within cells, significantly expanding the understanding of lipid functions and their involvement in cellular and subcellular processes. In this review, we summarize the data related to the development and application of recombinant protein sensors for various lipids in cell membranes.

Keywords: lipid sensors, cell membranes, recombinant sensors