

## ПОРОСОМА: НОВАЯ ОРГАНЕЛЛА И УНИВЕРСАЛЬНЫЙ СЕКРЕТОРНЫЙ МЕХАНИЗМ КЛЕТКИ

© *И. Л. Лазришвили,<sup>1</sup> М. Г. Жвания*

*Институт физиологии им. И. С. Бериташвили, Тбилиси, Грузия;*

<sup>1</sup> *электронный адрес: nukrilaz@gmail.com*

Обзор посвящен открытой в 1990-х годах новой клеточной структуре — поросоме, функционирующей как универсальный секреторный механизм. В противоположность распространенному мнению о полном слиянии клеточной и везикулярной мембран во время секреции показано, что секреторные везикулы при помощи белков SNARE лишь кратковременно стыкуются и сливаются с основанием поросомы и высвобождают содержимое. Это происходит в результате внутривезикулярного давления, которое генерируется активным транспортом воды через водные каналы мембран секреторных везикул.

Ключевые слова: секреция, секреторные везикулы, поросома, мембранные белковые комплексы t-SNARE и v-SNARE.

Открытие в середине 1990-х годов новой клеточной структуры поросомы, которая сразу же была признана как универсальный секреторный механизм клетки, существенно трансформировало область клеточной биологии и значительно обогатило наше знание о секреторных процессах клетки. Это новое знание дало начало парадигме в объяснении секреции — одного из наиболее фундаментальных биологических процессов клетки. В противоположность распространенному мнению о том, что во время секреции мембрана секреторной везикулы полностью сливается с плазматической мембраной, мы начинаем осознавать, что посредством белков SNARE везикулы лишь мимолетно стыкуются и сливаются в основании поросомы, высвобождая содержимое везикул. Последнее происходит в результате внутривезикулярного давления, опосредованного активным транспортом воды через водные каналы, находящиеся в мембране секреторной везикулы. Аналогично открытию телец Паллада, т. е. рибосом, и определению их вовлечения в процесс белкового синтеза, а также протеосом, включая демонстрацию их участия в процессах белковой деградации клеток, открытие поросомы и доказательство ее значения как универсального секреторного механизма клетки, положили начало новому направлению в нанобиологии клетки. Изоляция «поросомного комплекса», его функциональное реконструирование в искусственной липидной мембране, а также определение его состава, структуры и динамики при нанометровом разрешении и в реальном времени открыли новые, интригующие молекулярные детали в секреторных процессах клетки.

### Поросома

Поросома представляет собой универсальный секреторный механизм клетки (Schneider et al., 1997; Cho et al., 2002a, 2002c, 2004, 2007, 2008; Jena et al., 2003; Jeremic et al., 2003; Jena, 2008). Еще 15 лет тому назад было непо-

нятно, почему при исследовании процесса секреции на электронных микрофотографиях видны лишь частично «истощенные» везикулы: если во время секреторного процесса для высвобождения содержимого везикулы мембрана секреторной везикулы полностью сливается с плазматической мембраной, тогда наполовину пустые везикулы не должны были появляться. Такое нелогичное «поведение» везикулы полностью игнорировалось учеными, работающими в этом направлении и продолжающими принимать догму о полном слиянии везикулярной и плазматической мембран во время секреции. Как это часто бывает в науке, догмы обычно жизнестойки и общепринятые мнения трудно изменить даже в случае очевидных доказательств. Так, например, случилось с NO — газом, описанным впервые как сигнальная молекула, или с протеин прионом — новой моделью заболевания центральной нервной системы, а также рядом других, новаторских и революционных открытий. С верификацией поросомы произошло то же, хотя уже в самом начале это открытие было визуализировано. Поросома вначале была обнаружена с помощью атомно-силового микроскопа — нетрадиционного метода, позволяющего изучать живые клетки с нанометровым разрешением, далее же — с применением традиционной электронной микроскопии. За этим последовали биохимические, электрофизиологические и молекулярные подходы, позволившие изолировать комплекс поросом, а также определить его функции, строение и реконструирование.

### Комплекс поросомы

Поросомы — это постоянные, супрамолекулярные, липопротеиновые структуры клеточной мембраны, с которыми в процессе секреции мимолетно стыкуются и сливаются покрытые мембранами секреторные везикулы, высвобождая при этом свое содержимое. Открывающийся

наружу «рот» поросомы имеет диаметр 150 нм в ацинарных клетках экзокринного поджелудочной железы, а в нервной клетке — 12 нм. Во время секреции «рот» расширяется, а после завершения процесса возвращается к обычным размерам. Например, было показано, что в экзокринном поджелудочной железе и нейроэндокринных клетках в результате стыковки секреторных везикул диаметр поросомы увеличивается только на 20—30 %. Если бы мембрана секреторной везикулы, диаметр которой составляет 0.2—1.2 мкм, полностью поглотилась поросомой, тогда структура расширилась бы более чем на 20—30 %. Поэтому было предложено, что секреторные везикулы лишь временно стыкуются и соединяются с основанием комплекса поросомы, изливая при этом содержимое наружу. Кроме этого, с помощью атомно-силового микроскопа при высоком разрешении изучали живую ацинарную клетку, помещенную в раствор, близкий к физиологическому. Секреторные везикулы, так называемые зимогенные гранулы, были обнаружены непосредственно под апикальной плазматической мембраной (Cho, Jena, 2002; Kelly et al., 2004). Через несколько минут после действия физиологического секреторного стимула зимогенные гранулы внутри клетки набухают, затем их размеры уменьшаются, секреторный продукт выделяется и процесс секреции завершается. В течение эксперимента уменьшения числа секреторных везикул не наблюдалось. Это свидетельствует о том, что во время процесса секреции происходит лишь мимолетная стыковка («поцеловать и убежать») везикул с поросомой и имеет место лишь частичное высвобождение содержимого везикулы. Такие выводы подтверждаются современными данными: «единичные синаптические везикулы временно стыкуются с пресинаптической мембраной, не теряя при этом идентичности» (Aravantis et al., 2003); «в культивированных эндокринных клетках после стимулированного экзоцитоза секреторные гранулы почти интактными обычно захватываются назад» (Taraska et al., 2003); «экзоцитоз зимогенных гранул характеризуется открытием длинной стыкующейся поры и сохранностью липидной идентичности везикул» (Thorn et al., 2004).

### Кольцевой комплекс SNARE

Целостность между мембранами секреторной везикулы и поросомой отмечается на внутренней поверхности плазматической мембраны. Мембранные протеины SNAP-25 (Oyler et al., 1989) и синтаксин (Benett et al., 1992), формирующие комплекс t-SNARE, и мембранный протеин секреторной везикулы v-SNARE или VAMP (Trimble et al., 1988) являются составными частями протеинового комплекса, опосредующего в присутствии кальция процесс стыковки плазматической и везикулярной мембран (Cho et al., 2002b, 2005; Jeremic et al., 2004a, 2004b, 2006; Cho, Jena, 2007; Cook et al., 2008; Potoff et al., 2008). Для объяснения вызванного SNARE слияния мембран необходимо осмысление взаимодействия и сборки белков v-SNARE и t-SNARE. Еще более важно, что для создания подходящих и физиологически релевантных взаимоотношений необходимо, чтобы протеины v-SNARE и t-SNARE находились на противоположных мембранах. Проблемы растворимости предотвращают образование трехмерных кристаллов, ассоциированных с мембраной, — комплексов t-/v-SNARE. Согласно данным ранних работ (Sutton et al., 1998), ассоциированные с мембраной гидрофобные домены синтаксина (t-SNARE) и белка

VAMP (v-SNARE) усекаются, вследствие чего белки приобретают растворимость. При этом становятся возможными трехмерная кристаллизация такого комплекса и определение его структуры X-лучевой дифракцией на уровне 2.4 Å. Однако вскоре стало ясно, что в отсутствие мембран v-SNARE и t-SNARE взаимодействуют иным способом (Cho et al., 2002b, 2005; Jeremic et al., 2004a, 2004b, 2006; Cook et al., 2008). В частности, не образуется физиологически релевантный комплекс t-/v-SNARE. Впервые структура и устройство ассоциированного с мембраной комплекса t-/v-SNARE были идентифицированы с помощью атомно-силового микроскопа высокого разрешения (Cho et al., 2002b). Было показано, что, находясь в противоположных бислоях, v-SNARE и t-SNARE взаимодействуют циркулярным порядком, образуя кольцеподобные комплексы или каналы в несколько нанометров каждый. Величина комплекса прямо пропорциональна изгибу противостоящего бислоя (Cho et al., 2005), и в присутствии ионов кальция кольцевой комплекс SNARE способствует созданию континуума между противоположными бислоями (Cho et al., 2002b, 2005; Jeremic et al., 2004a, 2004b; Potoff et al., 2008). В противоположность этому при отсутствии мембранных ассоциаций v-SNARE и t-SNARE не способны создать ни такие организованные кольцевые комплексы, ни континуум противостоящих мембран. Однако когда находящиеся в противоположных слоях v-SNARE и t-SNARE встречаются, новообразованный комплекс SNARE преодолевает репульсивные силы между противоположными бислоями, сводя расстояние между ними до 2.8 Å (Jeremic et al., 2004a, 2004b). Это позволяет кальцию связываться с головными группами противостоящих фосфолипидов, вызывая локальную дегидратацию и слияние мембран (Potoff et al., 2008).

### Набухание секреторных везикул и высвобождение содержимого

Первое непосредственное наблюдение за увеличением объема секреторных везикул живых клеток, вызванным стимуляцией клеточной секреции, также было проведено посредством атомно-силового микроскопа (Kelly et al., 2004). В этой работе впервые продемонстрировано, что набухание секреторных везикул является необходимым условием для выталкивания содержимого везикулы в процессе секреции. В прошлом десятилетии молекулярные механизмы набухания секреторных везикул были подробно описаны (Jena et al., 1997; Cho et al., 2002d; Jeremic et al., 2005; Kelly et al., 2005; Shin et al., 2010). Секреция, клеточный процесс, наблюдается в каждом живом организме, включая простую дрожжевую клетку. Этот процесс ответствен за ряд физиологических активностей живых организмов, в том числе за нейротрансмиссию, выделение гормонов и пищеварительных ферментов. Поэтому секреторные дефекты клетки приводят к развитию различных болезней. Следовательно, молекулярное объяснение процесса секреции, связанное с открытием поросомы — универсального секреторного механизма клетки, имеет большое значение для человечества.

### Список литературы

Aravantis A. M., Pyle J. L., Tsien R. W. 2003. Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature*. 423 : 643—647.

- Bennett M. K., Calakos N., Schlerr R. H. 1992. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science*. 257 : 255—259.
- Cho S.-J., Jęftinija K., Glavaski A., Jęftinija S., Jena B. P., Anderson L. L. 2002a. Structure and dynamics of the fusion pores in live GH-secreting cells revealed using atomic force microscopy. *Endocrinology*. 143 : 144—148.
- Cho S.-J., Jena B. P. 2002. Number of secretory vesicles remaining unchanged following exocytosis. *Cell Biol. Int.* 26 : 29—33.
- Cho S.-J., Kelly M., Rognlien K. T., Cho J. A., Jena B. P. 2002b. Neuronal t- and v-SNARE in opposing bilayers interact in a circular array to form conducting pores. *Biophys. J.* 83 : 2522—2527.
- Cho S.-J., Quinn A. S., Stromer M. H., Dash S., Cho J. A., Taatjes D. J., Jena B. P. 2002c. Structure and dynamics of the fusion pore in live cells. *Cell Biol. Int.* 26 : 35—42.
- Cho S.-J., Satter A. K., Jeong E.-H., Satchi M., Cho J. A., Dash S., Mayes M. S., Stromer M. H., Jena B. P. 2002d. Aquaporin 1 regulates GTP-induced rapid gating of water in secretory vesicles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 99 : 4720—4724.
- Cho W. J., Jena B. P. 2007. N-ethylmaleimide sensitive factor is a right-handed molecular motor. *J. Biomed. Nanotech.* 3 : 209—211.
- Cho W. J., Jeremic A., Jena B. P. 2005. Size of supramolecular SNARE complex: membrane-directed self-assembly. *J. Amer. Chem. Soc.* 127 : 10 156—101 157.
- Cho W. J., Jeremic A., Jin H., Ren G., Jena B. P. 2007. Neuronal fusion pore assembly requires membrane cholesterol. *Cell Biol. Int.* 31 : 1301—1308.
- Cho W. J., Jeremic A., Rognlien K. T., Zhvania M. G., Lazrishvili I. L., Tamar B., Jena B. P. 2004. Structure, isolation, composition and reconstitution of the neuronal fusion pore. *Cell Biol. Int.* 28 : 699—708.
- Cho W. J., Ren G., Jena B. P. 2008. EM 3D contour maps provide protein assembly at the nanoscale within the neuronal porosome complex. *J. Microscopy*. 232 : 106—111.
- Cook J. D., Cho W. J., Stemmler T. L., Jena B. P. 2008. Circular dichroism (CD) spectroscopy of the assembly and disassembly of SNAREs: the proteins involved in membrane fusion in cells. *Chem. Phys. Lett.* 462 : 6—9.
- Jena B. P. 2008. Porosome: the universal molecular machinery for cell secretion. *Mol. Cells*. 26 : 517—529.
- Jena B. P., Cho S.-J., Jeremic A., Stromer M. H., Abu-Hamadi R. 2003. Structure and composition of the fusion pore. *Biophys. J.* 84 : 1337—1343.
- Jena B. P., Schneider S. W., Geibel J. P., Webster P., Oberleithner H., Sritharan K. C. 1997. Gi regulation of secretory vesicle swelling examined by atomic force microscopy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 94 : 13 317—13 322.
- Jeremic A., Cho W. J., Jena B. P. 2004a. Membrane fusion: what may transpire at the atomic level. *J. Biol. Phys. Chem.* 4 : 139—142.
- Jeremic A., Cho W. J., Jena B. P. 2005. Involvement of water channels in synaptic vesicle swelling. *Exp. Biol. Med.* 230 : 674—680.
- Jeremic A., Kelly M., Cho J.-H., Cho S.-J., Hörber J. K., Jena B. P. 2004b. Calcium drives fusion of SNARE-apposed bilayers. *Cell Biol. Int.* 28 : 19—31.
- Jeremic A., Kelly M., Cho S.-J., Stromer M. H., Jena B. P. 2003. Reconstituted fusion pore. *Biophys. J.* 85 : 2035—2043.
- Jeremic A., Quinn A. S., Cho W. J., Taatjes D. J., Jena B. P. 2006. Energy-dependent disassembly of self-assembled SNARE complex: observation at nanometer resolution using atomic force microscopy. *J. Amer. Chem. Soc.* 128 : 26—27.
- Kelly M., Abu-Hamdah R., Cho S.-J., Ilie A. L., Jena B. P. 2005. Patch clamped single pancreatic zymogen granules: direct measurement of ion channel activities at the granule membrane. *Pancreatol.* 5 : 443—449.
- Kelly M., Cho W. J., Jeremic A., Abu-Hamdah R., Jena B. P. 2004. Vesicle swelling regulates content expulsion during secretion. *Cell Biol. Int.* 28 : 709—716.
- Oyler G. A., Higgins G. A., Hart R. A., Battenberg E., Billingsley M., Bloom F. E., Wilson M. C. 1989. The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J. Cell Biol.* 109 : 3039—3052.
- Potoff J. J., Issa Z., Manke C. W., Jr., Jena B. P. 2008. Ca<sup>2+</sup>-dimethylphosphate complex formation: providing insight into Ca<sup>2+</sup> mediated local dehydration and membrane fusion in cells. *Cell Biol. Int.* 32 : 361—366.
- Schneider S. W., Sritharan K. C., Geibel J. P., Oberleithner H., Jena B. P. 1997. Surface dynamics in living acinar cells imaged by atomic force microscopy: identification of plasma membrane structures involved in exocytosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 94 : 316—321.
- Shin L., Basi N., Lee J.-S., Cho W.-J., Chen Z., Abu-Hamdah R., Oupicky D., Jena B. P. 2010. Involvement of vH<sup>+</sup>-ATPase in synaptic vesicle swelling. *J. Neurosci. Res.* 88 : 95—101.
- Sutton R. B., Fasshauer D., Jahn R., Brunger A. T. 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*. 395 : 347—353.
- Taraska J. W., Perrais D., Ohara-Imaizumi M., Nagamatsu S., Almers W. 2003. Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 100 : 2070—2075.
- Thorn P., Fogarty K. E., Parker I. 2004. Zymogen granule exocytosis is characterized by long fusion pore openings and preservation of vesicle lipid identity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 101 : 6774—6779.
- Trimble W. S., Cowan D. W., Scheller R. H. 1988. VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 85 : 4538—4542.

Поступила 14 XII 2009

## POROSOME: A NEW ORGANELLE AND THE UNIVERSAL SECRETION MACHINE IN CELLS

I. L. Lazrishvili,<sup>1</sup> M. G. Zhvania

I. S. Beritashvili Institute of Physiology, Tbilisi, Georgia;

<sup>1</sup> e-mail: nukrilaz@gmail.com

A new cell organelle, porosome, discovered in the mid 1990's and its demonstration as the universal secretory machinery in cells is described. In contrast to the generally accepted belief that the secretory vesicle membrane is totally incorporated into the plasma membrane during cell secretion, it has been shown that secretory vesicles transiently dock and fuse with the porosome base via SNARE proteins to expel vesicular contents under intravesicular pressure which is generated by active transport of water through water channels located at the secretory vesicle membrane.

Key words: secretion, secretory vesicles, porosome, membrane proteins t-SNARE and v-SNARE.