

ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛУМ: МЕМБРАННЫЕ КОНТАКТНЫЕ САЙТЫ

© Г. А. Великанов

*Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН;
электронный адрес: velikanov@mail.knc.ru*

Представлен обзор современных данных о функциональном назначении мембранных контактных сайтов (MCSs) эндоплазматического ретикулума. Рассмотрены проблемы передвижения липидов и кальция в MCSs. Необходимо подчеркнуть, что функция MCSs до сих пор до конца не ясна, а механизм, обеспечивающий контакт двух мембран (проблема «якорей») остается малоизученным. Обсуждаются данные в пользу того, что MCSs способны участвовать как в селективном трафике липидов, так и в свободной диффузии любых небольших молекул (предположительно до 1.5 кДа) и ионов между контактирующими клеточными компартментами.

Ключевые слова: эндоплазматический ретикулум, мембранные контактные сайты, функции.

Принятые сокращения: ЛПБ — липидпереносящие белки, ЭР — эндоплазматический ретикулум, MAMs — mitochondria-associated membranes, MCSs — membrane contact sites.

Эндоплазматический ретикулум (ЭР) — многофункциональная мембранная система клетки. С помощью электронной микроскопии были выявлены наиболее очевидные структурные различия между его шероховатой (гранулярной) и гладкой областями. На уровне светового микроскопа, при использовании флуоресцентных красителей или антител было показано, что интерфазный ЭР разделен на ядерный (ядерную оболочку) и периферический. В растительных клетках предлагается рассматривать до 16 функционально различающихся областей ЭР. Кроме гранулярного ЭР, связанного с синтезом, процессингом и сортировкой белков, гладкого ЭР, связанного с синтезом липидов и детоксикацией ксенобиотиков и ядерной оболочке, обсуждаются рецепторные, вакуоль-образующие, транзитные, актинсвязывающие и другие функциональные области ЭР (Staehelein, 1997). Структурные и другие особенности этих областей ЭР изучены пока недостаточно. Однако при наличии основной общей фракции белков ЭР в конечном счете различия между функциональными областями ЭР могут объясняться, возможно, небольшими, но все-таки существующими различиями в составе мембранных белков (Voeltz et al., 2002).

В последние годы особое внимание уделяется зонам ЭР, прикрепленным к другим мембранам клетки. При обычных химических способах фиксации живого материала для электронной микроскопии соответствующие близкие контакты наблюдали сравнительно редко. Однако в исследованиях с применением щадящей методики высокоскоростного замораживания-скальвания препаратов при высоком давлении было показано существование близких контактов ЭР практически со всеми другими мембранами как в животных (Voeltz et al., 2002), так и в растительных клетках (Staehelein, 1997). ЭР связан близкими контактами по существу со всеми органеллами в клетке, включая вакуоли, митохондрии, аппарат Гольджи, пе-

роксисомы, поздние эндосомы и лизосомы, а также с плазматической мембраной (Staehelein, 1997; Voeltz et al., 2002). Сайты близких контактов были выявлены между ЭР и внешней мембраной пластид (Moreau et al., 1998). Такие сайты существуют и внутри самого ЭР (Voeltz et al., 2002; Levine, 2004) и могут обеспечивать динамичное взаимодействие отдельных фрагментов ЭР.

Как устанавливаются близкие контакты между мембранами, до конца не выяснено (Toulmay, Prinz, 2011). Их коммуникационная функция также до конца не понята как в отношении обмена информационными сигналами (Franzini-Armstrong, Jorgensen, 1994; Levine, Loewen, 2006; Hayashi et al., 2009) и обмена компонентами мембран (Holthuis, Levine, 2005; Voelker, 2005; Hanada et al., 2007; Schulz et al., 2009; Stefan et al., 2011), так и в отношении обмена другими небольшими метаболитами между контактирующими внутриклеточными компартментами (Hayashi et al., 2009; Toulmay, Prinz, 2011; Velikanov et al., 2011).

Несмотря на существование функционально различающихся областей, ЭР принято считать единой мембранной системой с непрерывным для свободной диффузии внутриполостным пространством (Voeltz et al., 2002). Такое пространственное единство было доказано экспериментами с флуоресцентными красителями, внедряемыми в полость ЭР (Terasaki et al., 1994). Это было продемонстрировано также в экспериментах с GFP: когда один участок ЭР многократно обесцвечивали, флуоресценция быстро исчезала из всего ретикулума (Dayel, Verkman, 1999). Как обеспечивается единство мембранной системы функционально различающихся областей ЭР, пока непонятно.

Каких-либо ультраструктурных различий между контактными зонами ЭР с различными мембранами внутри клетки, а также между такими зонами в разных типах клеток не установлено. Это обстоятельство позволяет

рассматривать литературу по функциям близких контактов эндоплазматической мембраны с общей позиции. Результаты исследований, полученные с помощью оптического скальпеля, продемонстрировали наличие физического связывания между мембранами, вовлеченными в контакт. Сила в 400 пН не позволяла освободить хлоропласт от прикрепившегося ЭР, что, по мнению авторов, может отражать наличие белок-белкового взаимодействия в мембранном контактном сайте (Andersson et al., 2007a, 2007b). В специфических зонах таких контактов две мембраны находятся в непосредственной близости — на расстоянии около 10 нм (Levine, 2004; Holthuis, Levine, 2005).

Контактные зоны между эндоплазматической мембраной еще изучены мало, немногие из их компонентов идентифицированы, а их функциональное назначение до конца еще не понято (Levine, 2004; Levine, Loewen, 2006; Schulz et al., 2009; Stefan et al., 2011; Toulmay, Prinz, 2011; Velikanov et al., 2011). В настоящем обзоре представлен анализ основных данных литературы и результатов собственных исследований о функциональном назначении контактных зон ЭР. В англоязычных текстах общепринята аббревиатура MCSs (membrane contact sites). Для обозначения близких контактов внутриклеточных мембран мы использовали эту же аббревиатуру (MCS или MCSs во множественном числе).

Мембранный контактный сайт как устройство для трафика липидов между контактирующими мембранами

Широко известно, что важным способом межмембранного переноса липидов является везикулярный транспорт. Однако некоторые органеллы не являются участниками везикулярного трафика. Поэтому в первую очередь возникло предположение о том, что близкие контакты между ЭР и другими мембранными системами могут быть посредниками быстрого переноса липидных молекул между двумя мембранами в отсутствие слияния последних. Такие переносы с учетом компартиментализации клетки, по-видимому, необходимы, и их существование хорошо доказано. Например, в животных клетках синтез митохондриального фосфатидилэтаноламина включает превращение фосфатидилсерина, который производится в ЭР, в фосфатидилэтаноламин с помощью фермента фосфатидилсерин-декарбоксилазы, внутреннего митохондриального мембранного фермента (Wirtz, 1991; Voelker, 2000). Существование быстрого и свободного обмена пулов различных фосфолипидов между ЭР и митохондрией в клетках животных было установлено ранее (Yaffe, Kennedy, 1983). Хотя митохондрии могут синтезировать некоторые фосфолипиды *de novo*, необходимость в быстром обмене липидов между ЭР и митохондриями еще более убедительно демонстрируется на примере производства некоторых стероидов, когда промежуточные посредники до момента получения конечного продукта по несколько раз переводятся в обоих направлениях между двумя мембранными системами (Black et al., 1994). Установлено, что липидпереносящие белки (ЛПБ) работают в узких щелях большинства внутриклеточных контактных зон (Voelker, 2000, 2005; Voeltz et al., 2002; Levine, 2004; Holthuis, Levine, 2005; Levine, Loewen, 2006; Schulz et al., 2009; Stefan et al., 2011).

Обширные данные о том, как образуются близкие контакты между ЭР и другими органеллами, о белках,

участвующих в образовании контактов, были получены для контактов ядро—вакуоль в дрожжах (Pan et al., 2000; Kohlwein et al., 2001; Levine, Munro, 2001). Такие контакты сравнительно легко можно было выделять и изучать биохимическими методами. Исследователи допускали, что контакты ядро—вакуоль имеют значительный потенциал, для того чтобы служить парадигмой для изучения структуры и функций других MCSs. Последовало дальнейшее изучение этого вида близких контактов (Kwan, Goldfarb, 2004, 2006; Levine, 2004; Holthuis, Levine, 2005). Был идентифицирован соединительный аппарат, ответственный за создание и поддержание стабильного контактного сайта ядро—вакуоль в дрожжах. Такой сайт формировался путем специфического взаимодействия между мембранным белком вакуоли (Vac8p) и белком ядерной мембраны (Nvj1p), т. е. за счет белок-белкового мостика (Pan et al., 2000). Было также обнаружено присутствие в зоне контакта других белков. Поначалу два таких белка, а именно Tsc13p и Osh1p, были выявлены и описаны в области близкого контакта ядро—вакуоль у дрожжей (Kohlwein et al., 2001; Levine, Munro, 2001). Osh1p является представителем семичленного (Osh1p, Osh2p, ..., Osh7p) семейства белков дрожжей, который имеет структурное и функциональное гомологическое сходство с оксистеринсвязывающим белком (OSBP) млекопитающих (Levine, Munro, 2001). В свою очередь OSBP входит в перечень ЛПБ цитоплазмы (Olkkonen, Levine, 2004). Возможно, именно это обстоятельство стимулировало предположительное изучение липидтранспортующей функции MCSs. Однако имеются и сомнения в том, что Osh-белки являются посредниками большей части процессов невезикулярного стирольного обмена между ЭР и другими компартаментами клетки (Beh et al., 2009).

Невезикулярный перенос липидов между двумя мембранами в клетке может существовать и параллельно с везикулярным переносом. Можно отметить по меньшей мере два примера невезикулярного липидного транспорта, существующего в дополнение к секреторному пути. Это перенос церамида из ЭР в комплекс Гольджи (Funato, Riezman, 2001), а также перенос некоторых фосфолипидов и стероидов из ЭР в плазматическую мембрану (DeGrella, Simoni, 1982; Sleight, Pagano, 1983; Kaplan, Simoni, 1985).

Поставка липидов извне (из ЭР) была зарегистрирована для хлоропластов, липидных капель и митохондрий (Levine, 2004). Невезикулярный липидный перенос был продемонстрирован также *in vitro* (Voelker, 1989). Особенно убедительно это было сделано для очищенных изолированных митохондрий с прикрепленными к ним остатками мембран ЭР (Vance, 1990). Такой конгломерат получил в литературе название «ассоциированных с митохондриями мембран ЭР» и аббревиатуру MAMs (mitochondria-associated membranes). Близкий контакт между двумя мембранами в конгломерате MAMs наблюдали с помощью ультраструктурных методов исследования. Было показано, что он играет специфическую роль в обмене фосфолипидов (Vance, 2003). На прикрепление MAMs к митохондрии и на перенос липидов *in vitro* влияла протеазная обработка, что наводило на мысль о роли белков в структуре и функции MCS.

Многое из того, что известно о липидтранспортующей функции MCSs, пришло из исследований MAMs, а также из исследований мембран ЭР, ассоциированных с плазматическими мембранами. Зоны ЭР, вовлеченные в оба типа этих контактов, были изолированы, и показан

липидный перенос, равно как и белок-белковые взаимодействия между принимающими участие в создании контактов мембранами (Vance, 1990, 2003; Levine, 2004; Holthuis, Levine, 2005; Varnai et al., 2007).

Исходной концепцией для изучения липидного переноса в MCSs послужила концепция гидрофильных ЛПБ цитоплазмы, которые связывают специфичные липиды и переносят их между мембранами на расстояния, сопоставимые с размерами клетки, а в некоторых случаях и значительно превышающие эти размеры, например с потоком крови у животных. Поскольку ЛПБ высокоselectивны по отношению к переносимому липиду, резонно было предполагать селективность липидного трафика через узкую щель в конкретном MCS. Пространственная структура ЛПБ имеет глубокие гидрофобные карманы с гибкими «крышками», в которых молекулы липидов могут переноситься через цитоплазму (Wirtz, 1991, 1997; Olkkonen, Levine, 2004). Структура эндоплазматических ЛПБ и механизм транспорта липидов между донорными и акцепторными мембранами изучены *in vitro* (Tsujishita, Hurley, 2000).

Существуют два представления о том, как могут «работать» ЛПБ в MCSs. Первое базируется на уже упомянутых выше исследованиях близких контактов ядро—вакуоль в дрожжах. Комплекс двух белков (Nvj1p и Vac8p) образует в зоне контакта стабильный мостик (Pan et al., 2000), с которым могут взаимодействовать другие белки, в том числе ЛПБ, способные специфически участвовать в липидном обмене в MCS (Kohlwein et al., 2001; Levine, Munro, 2001; Levine, 2004). В рамках этого представления узкая щель MCSs является по существу гаванью для ЛПБ (Kvan, Goldfarb, 2006).

Другое представление о роли ЛПБ в формировании и функционировании MCSs исходит как раз из размеров щели. Во многих MCSs ультраструктурные исследования обычно выявляют межмембранное расстояние, соизмеримое с размером типичного ЛПБ. Возможно, последний прикрепляется к двум мембранам одновременно и сам по себе является структурой, формирующей MCS. Анализ этой идеи начался с того, что подобно другим периферическим мембранным белкам ЛПБ цитоплазмы действительно могут прочно связываться с мембранами (Munro, 2004). Данные о том, что в центре липидсвязывающей области многие ЛПБ имеют множественные домены для специфичного связывания по крайней мере двух различных мембран, представлены в работе (Olkkonen, 2004). Существуют также некоторые примеры — доказательства того, что ЛПБ могут прикрепляться в MCS к обеим мембранам, сохраняя при этом свою функцию по переносу липидов. Действительно, большим семейством ЛПБ, которые явно локализованы в MCSs, является вышеотмеченное семейство гомологов оксистеролсвязывающих белков (Osh-белки). Эти белки имеют по два связывающихся с мембранами домена и сохраняют при этом С-терминальную область, которая связывает липид (Levine, Munro, 2002; Loewen et al., 2003). Подобные гомологи действительно могут быть кандидатами на роль MCSs-формирующих белков с одновременной функцией липидного переноса. Заманчивость такой идеи двойной функции ЛПБ в MCSs отмечается в публикациях постоянно (Levine, 2004; Hanada et al., 2007; Schulz et al., 2009; Toulmay, Prinz, 2011). Однако показать напрямую, как ЛПБ функционируют в MCSs, довольно сложно. Дело здесь в том, что наличие у ЛПБ двух доменов для связывания с разными мембранами, которые (домены) по

существу являются рецепторами для «узнавания» соответственно донорной и акцепторной мембран, предопределено исходной функцией и структурой эндоплазматических ЛПБ.

Функция ЛПБ в зоне контакта строго не определена. Например, предполагают, что упоминавшиеся выше гомологи оксистеринсвязывающих белков, которые выявлены в разных MCSs и, возможно, участвуют в их составе в переносе стеринов (Kohlwein et al., 2001; Levine, Munro, 2001, 2002; Loewen et al., 2003; Raychaudhuri, Prins, 2010), могут регулировать функцию других ЛПБ в близких контактах мембран (Perry, Ridgway, 2006; Peretti et al., 2008; Schulz et al., 2009). А один из таких гомологов (Osh3) также предположительно может функционировать в зоне близкого контакта ЭР—плазмалемма как сенсор ферментов инозитольного цикла и принимать участие в регуляции фосфоинозитольного метаболизма (Stefan et al., 2011; Toulmay, Prinz, 2011).

Несмотря на фундаментальную важность вопроса, исследователи не обходятся без элементов предположений в окончательных формулировках, касающихся механизма переноса липидов в MCSs, равно как функции многих белков в сайтах близких контактов остаются неизвестными (Levine, 2004; Holthuis, Levine, 2005; Andersson et al., 2007a, 2007b; Schulz et al., 2009; Raychaudhuri, Prins, 2010; Stefan et al., 2011; Toulmay, Prinz, 2011).

Перенос кальция через MCSs, специализация или многофункциональность MCSs

Впервые участие MCSs в обеспечении кальциевого обмена между компартментами клетки было описано для близкого контакта ЭР с сарколеммой в полосатых мышцах. Зона такого контакта обеспечивала связь деполяризации сарколеммы с выходом ионов кальция из ЭР в саркоплазму (Berridge, 1993; Franzini-Armstrong, Jorgensen, 1994). Дигидропиридиновые рецепторы плазмалеммы (сарколеммы) физически взаимодействовали с рианодиновыми рецепторами на мембране ЭР (Flucher, Franzini-Armstrong, 1996). Было также установлено, что одновременно с существованием физического взаимодействия в зонах соответствующего контакта между мембранами поддерживается щель постоянной ширины (приблизительно 10 нм) (Franzini-Armstrong, Jorgensen, 1994). Однако оказалось, что оба эти рецептора не нужны для формирования близкого контакта мембран. Для его формирования важнее были другие белки — джанктофилины (от junction), хотя и в этом случае неизвестно, являются ли джанктофилины основой для образования контакта или они вовлечены более специфично в кальциевый сигналинг (Takeshima et al., 2000; Ito et al., 2001). Существование связи между деполяризацией плазматической мембраны и поступлением кальция в цитоплазму, реализующейся в сайтах MCSs, характерно для многих легковозбудимых клеток (Levine, 2004).

В невозбудимых клетках также предполагается существование топологически и функционально похожих близких контактов ЭР—плазмалемма (Putney et al., 2001). Однако в этом случае вход кальция в цитоплазму реализуется посредством рецептора инозитолтрифосфата на мембране ЭР и потенциалзависимого рецептора кальциевого канала на плазмалемме (Ma et al., 2000). Взаимодействие между этими рецепторами не прямое, а устанавливается с помощью специального белка (Yuan et al., 2003).

Сайты близких контактов ЭР-митохондрия, которым выше уже приписывалась функция трафика липидов, рассматриваются также в качестве устройств, в которых поток Ca^{2+} через одну мембрану связан с потоком этого иона через вторую мембрану. Предполагается, что рецептор инозитолтрифосфата на мембране ЭР взаимодействует с митохондриальным кальциевым унипортером с образованием Ca^{2+} -туннеля между ЭР и митохондрией (Rizzuto et al., 1998; Csordas et al., 1999; Rapizzi et al., 2002; Hayashi et al., 2009). При этом было показано наличие физической связи мест выхода кальция на мембране ЭР с местами его поглощения на митохондриальной мембране, т. е. было продемонстрировано, что кальциевый туннель реализуется на стабильных контактных сайтах ЭР—митохондрия (Filippin et al., 2003; Csordas et al., 2006). Существование физических связей между ЭР и митохондрией было предположено еще раньше на основе исследований совместной седиментации частиц ЭР с митохондрией и данных электронной микроскопии о близких контактах между митохондрией и везикулами ЭР (Shore, Tata, 1977; Meier et al., 1981; Manella et al., 1998). Ограниченный протеолиз разрывал связь между ЭР и митохондрией и подавлял распространение опосредованного инозитолтрифосфатом высвобождения Ca^{2+} из ЭР в митохондрию (Csordas et al., 2006). Было выявлено несколько митохондриальных или связанных с ЭР белков, которые важны для поддержания пространственной взаимосвязи между ЭР и митохондрией и которые могут быть кандидатами на роль обуславливающих близкий контакт элементов. Приведем здесь аббревиатуры названий таких белков с той лишь целью, чтобы обозначить спектр неопределенности в проблеме связующего фактора в MCSs: DLP-1/DRP1-1 (Pitts et al., 1999; Varadi et al., 2004), TAFR (Wang et al., 2000), PACS-2 и VAP3 (Simmen et al., 2005).

Использование сайтов, где две органеллы находятся в непосредственной близости, для пополнения запасов кальция или для распространения Ca^{2+} -сигналов между органеллами является, возможно, способом предотвращения попадания «убийственных» концентраций Ca^{2+} в цитоплазму при этих процессах. По-видимому, целесообразность существования близких контактов эндомембран с функцией кальциевого туннеля не может вызывать существенных возражений. Вместе с этим в предыдущем разделе статьи мы представили экспериментальные данные, а также идентифицированные компоненты MCSs, непротиворечиво свидетельствующие в пользу липидпереносящей функции близких контактов внутриклеточных мембран. Перед исследователями возникает альтернатива: в каждом случае близкий контакт мембран специализирован на конкретную функцию или он способен иметь несколько функций, возможно даже помимо двух уже обозначенных. Набухший ЭР может близко контактировать с вакуолю на довольно значительной площади соприкосновения этих двух мембран (Великанов и др., 2008). На большой площади соприкосновения мембран нельзя исключать сосуществование сайтов, включающих в себя различные белки и соответственно наделенных различными функциями. Равно как нельзя исключать существование близких контактов с малой площадью соприкосновения (что наблюдается чаще), имеющих специализацию. Однако дополнительный диссонанс в такое решение отмеченной альтернативы вносит по обстоятельству, что полученные одним и тем же способом MAMs в одном случае используются для изучения трафика липидов через контакт (Vance, 1990, 2003; Levine, 2004; Hol-

thus, Levine, 2005; Toulmay, Prinz, 2011), а в другом — для изучения механизма кальциевого обмена в сайте ЭР—митохондрия (Filippin et al., 2003; Csordas et al., 2006; Hayasi et al., 2009). Предполагается также, что MAMs участвуют, выполняя функции посредников, в переносе липидов, кальция и, вероятно, других сигнальных молекул между внутриклеточными компартментами (Hayasi et al., 2009), т. е. являются транспортными каналами для многих, а возможно, и любых небольших молекул. Ранее эта мысль, распространенная на все MCSs, к сожалению, только в заключительной ремарке к статье и без доказательства была высказана в работе (Levine, 2004).

Диффузное единство внутриполостного пространства ЭР

Целостная гипотеза о едином эндопласте как непрерывном надклеточном (трансклеточном) объединении внутриполостных пространств ЭР и центральных вакуолей соседних клеток в единую транспортную систему у высших растений была сформулирована в работах Ю. В. Гамалея (1994, 1997, 2004, 2009). Существование такого квазиреального непрерывного сетевого «трубопровода» для свободной диффузии небольших молекул между органоидами в клетке и между клетками (по терминологии автора — эндопласта) было предсказано на основе изучения закономерностей функционирования транспортной системы у более чем 2000 видов высших растений и обобщения полученных закономерностей на основе гипотезы об эндосимбиогенетическом происхождении современных эукариот. Изящная по аргументации концепция Гамалея позволяла избежать многих трудностей, связанных с механизмами транспорта и распределения ассимилятов у растений, и подтверждалась рядом прямых экспериментальных фактов. В частности, тем, что внутренность некоторых элементов надклеточного «трубопровода» (транспортного русла у высших растений) имела то же содержимое, как и центральные вакуоли (Гамалей, 1997, 2004, 2009). Однако в классических представлениях центральная вакуоль растительных клеток является замкнутым внутриклеточным компартментом. Надо было понять природу кажущегося (квазиреального) единства эндопласта по Гамалею.

В серии работ мы экспериментально проверяли предсказываемую Гамалеем возможность свободной, не ограниченной мембранной системой диффузии между вакуолями соседних клеток. Так, в работах Великанова и соавторов (2005, 2007, 2008; Velikanov et al., 2012) изучали особенности ограниченной диффузии молекул воды в корнях проростков кукурузы (в направлении, параллельном радиальному сечению корня) методом спиновоего эха ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля. В предельно лаконичной форме суть этого эксперимента и полученный в работах результат можно сформулировать так. В начальный момент времени пространственная картина общего диффузионного «ансамбля» молекул тканевой воды была зафиксирована («сфотографирована») импульсом градиента магнитного поля. Оказалось, что к окончанию времени наблюдения за диффузионным процессом (ко времени подачи второго фиксирующего импульса) часть молекул «ансамбля», исходно локализованных в центральных вакуолях, прорифундировала в поперечном направлении корня на расстояния, превышающие поперечные размеры клеток, находясь и оставаясь

в течение всего времени наблюдения в составе вакуолярной (медленно релаксирующей) фракции исходного «ансамбля». Если руководствоваться тем соображением, что десмотрубочка, проходящая по центру поперечного сечения плазмодесма у растений, является трубчатый элемент ЭР и напрямую объединяет внутрисполостные пространства эндоплазматических ретикулов соседних клеток (Гамалей, 1997, 2004), то результат этого ЯМР-эксперимента можно перефразировать так: между внутренним пространством центральных вакуолей и внутрисполостным пространством ЭР существует какое-то русло для свободной диффузии (Великанов и др., 2008; Velikanov et al., 2012).

В ходе дальнейших исследований и соответствующего анализа литературы было показано, что выявляемое русло (или какой-то его фрагмент) может состоять из молекул белков, что ЭР в нормальных условиях способен близко контактировать со всеми мембранами внутри клетки и с вакуолью в частности, а также то, что мембранные контактные сайты как по ультраструктуре, так и по принципу регуляции со стороны клеточного метаболизма имели качественную аналогию с межклеточными высокопроницаемыми щелевыми контактами у животных. На основании этих экспериментов нами было сделано предположение о том, что диффузионное единство эндопласта по Гамалею может быть реализовано за счет MCSs, способных обеспечивать свободную диффузию ассимилятов, небольших по размеру (предположительно до 1.5 кДа), как через щелевые контакты между контактирующими компартаментами (Великанов и др., 2008; Velikanov et al., 2012). Здесь важно отметить, что контакты ЭР—пластиды, ЭР—вакуоль, ЭР—митохондрия, ЭР—ЭР реально существуют, и, судя по результатам наших исследований, а также руководствуясь парадигмой о принципиальном тождестве между всеми типами MCSs, можно предполагать, что MCSs являются (в дополнение к вышесказанному) еще и структурами, управляемыми клеточным сигналом.

Результаты представленного анализа литературы по функциям MCSs свидетельствуют о том, что на сегодняшний день какие-либо данные, противоречащие предположению о возможности свободной диффузии через MCS, отсутствуют. Более того, в заключительных предложениях предшествующего раздела мы отметили имеющиеся в литературе как робкие (Levine, 2004), так и более определенные (Hayasi et al., 2009) высказывания в пользу такого предположения. В настоящее время становится признанным, что большинство белков эукариот являются мультимодульными, в результате чего белок приобретает способность выполнять целый комплекс различных функций (Терентьев и др., 2009). Вполне вероятно, что белки, вовлеченные в обеспечение близкого контакта мембран, помимо селективного трафика липидов способны реализовывать свободную диффузию небольших молекул и ионов между контактирующими клеточными компартаментами. Придание MCSs такого свойства создает основу для понимания природы диффузионного единства мембранной системы ЭР, совмещенной с многофункциональностью последнего.

Заключение

Из клеток мезокотила кукурузы был выделен белок, идентифицированный как перекрестно реагирующий с аффинно-очищенными антителами, выращенными к жи-

вотному коннексину (Yahalom et al., 1991). Подобный результат в том же году был получен независимыми исследователями — в корневых клетках *Arabidopsis* был идентифицирован белок, гомологичный коннексину из печени мыши (Meiners et al., 1991). В постгеномную эру имеются основания для того, чтобы не идентифицировать исследованные в работах (Meiners et al., 1991; Yahalom et al., 1991) растительные белки с конкретными типами коннексинов животного происхождения. Надо иметь в виду, что в геноме человека идентифицирован 21 ген щелевых контактов, в геноме мыши — 20 генов. У позвоночных имеется другое, но также многочисленное семейство белков щелевых контактов (иннексины), сходных с коннексинами по структуре и функциям, но не гомологичных им. Позднее выяснилось, что у позвоночных кроме коннексинов имеются также белки, гомологичные иннексам (Panchin et al., 2000), которые были названы паннексами открывшими их российскими учеными. У кишечнорастворимых и иглокожих есть щелевые контакты, но нет генов ни одного из вышеназванных семейств. Все это означает, что среди большого числа белков, функции которых в растениях еще не идентифицированы, могут быть обнаружены специфические растительные коннексины (the plant connexins), входящие в MCSs. Равно с этим нельзя исключать, что помимо многообразия белков, способных формировать высокопроницаемые межклеточные контакты у животных, могут быть выявлены белки, способные реализовать подобную функцию и во внутриклеточных MCSs.

В мире животных и грибов неизвестно ни одного случая образования многоклеточной системы, в которой не был бы задействован сформированный белками щелевой контакт клеточных мембран (Архипенко и др., 1975). Образование стабильной системы, развивающейся как единый организм, в ходе эволюционного развития растений определено как следствие фагоцитоза прокариотной клеткой цианобактерий (цианелл) и пурпурных бактерий, ставших, соответственно, предшественниками хлоропластов и митохондрий (Гамалей, 1997). Нельзя исключать, что для совместного функционирования систем «клетка с клеткой» и «клетка в клетке» в ходе эволюции растений был задействован системообразующий фактор, функционально близкий таковому у животных.

Функция MCSs однозначно до сих пор не определена, а механизм, обеспечивающий контакт двух мембран (проблема «якорей»), и механизм неравномерного распределения липидов между мембранами в клетке не очень понятны. Представленный анализ литературы открывает перспективу изучения MCSs в качестве устройств, превращающих ЭР (помимо приписываемых ему функций) в транспортно-распределительный конвейер для липидов, ионов и любых небольших молекул.

Список литературы

- Архипенко В. И., Гербильский Л. В., Черченко Ю. П., Чуич Г. А. 1975. Структура и функции межклеточных контактов. В кн.: Структура и функции биологических мембран. М.: Наука. 77—95.
- Великанов Г. А. 2007. Вакуолярный симпласт и методический подход к контролю самодиффузии между вакуолями соседних клеток в корне. Физиол. раст. 54 (5) : 770—780.
- Великанов Г. А., Белова Л. П., Ливанов В. Ю. 2008. Вакуолярный симпласт формируется посредством высокопроницаемого щелевого контакта мембраны эндоплазматического ретикула с тонопластом. Физиол. раст. 55 (6) : 921—930.

- Великанов Г. А., Волобуева О. В., Белова Л. П., Гапоненко Е. М. 2005. Вакуолярный симпласт — регулируемое русло для водообмена у растений. Физиол. раст. 52 (3) : 372—377.
- Гамалей Ю. В. 1994. Эндоплазматическая сеть растений. Происхождение, структура, функции. СПб.: Наука. 80 с.
- Гамалей Ю. В. 1997. Надклеточная организация растений. Физиол. раст. 44 (6) : 819—846.
- Гамалей Ю. В. 2004. Транспортная система сосудистых растений. СПб.: Изд-во СПб. ун-та. 424 с.
- Гамалей Ю. В. 2009. Природа пищевого тракта сосудистых растений. Цитология. 51 (5) : 375—387.
- Терентьев А. А., Молдогазова Н. Т., Шайтан К. В. 2009. Динамическая протеомика в моделировании живой клетки. Успехи биол. хим. 49 : 429—480.
- Andersson M. X., Goksoor M., Sandelius A. S. 2007a. Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. J. Biol. Chem. 282 : 1170—1174.
- Andersson M. X., Goksoor M., Sandelius A. S. 2007b. Membrane contact sites. Physical attachment between chloroplast and endoplasmic reticulum. Revealed by optical manipulation. Plant Signal Behav. 2 : 185—187.
- Beh C. T., Alfaro G., Duamel G., Sullivan D. P., Kersting M. C., Dighe S., Kozminski K. G., Menon A. K. 2009. Yeast oxysterol-binding proteins: sterol transporter or regulators of cell polarization? Mol. Cell. Biochem. 326 : 9—13.
- Berridge M. J. 1993. Inositol triphosphate and calcium signaling. Nature. 361 : 315—325.
- Black S. M., Harikrishna J. A., Szkiar G. D., Miller W. 1994. The mitochondrial environment is required for activity of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, cytochrome P 450_{sc}. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 91 : 7247—7251.
- Csordas G., Renken C., Varnai P., Walter L., Weaver D., Buttle K., Balla T., Mannella C. A., Hajnoczky G. 2006. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. J. Cell Biol. 174 : 915—921.
- Csordas G., Thomas A. P., Hajnoczky G. 1999. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. EMBO J. 18 : 96—108.
- Dayel M. J., Verkman A. S. 1999. Diffusion of green fluorescent protein in the aqueous-phase lumen of the endoplasmic reticulum. Biophys. J. 76 : 2843—2851.
- DeGrella R. F., Simoni R. D. 1982. Intracellular transport of cholesterol to the plasma membrane. J. Biol. Chem. 257 : 14 256—14 262.
- Filippin L., Magalhaes P. J., Di Benedetto G., Collela M., Pozzan T. 2003. Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. J. Biol. Chem. 278 : 39 224—39 234.
- Flucher B. E., Franzini-Armstrong C. 1996. Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93 : 8101—8106.
- Franzini-Armstrong C., Jorgensen A. O. 1994. Structure and development of e-c coupling units in skeletal muscle. Annu. Rev. Physiol. 56 : 509—534.
- Funato K., Riezman H. 2001. Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to Golgi apparatus in yeast. J. Cell Biol. 155 : 949—959.
- Hanada K., Kumagai K., Tomishige N., Kawano M. 2007. CERT and intracellular trafficking of ceramide. Biochim. biophys. acta. 1771 : 644—653.
- Hayashi T., Rizzuto R., Hajnoczky G., Su T.-P. 2009. MAM: more than just a housekeeper. Trends Cell Biol. 19 : 81—88.
- Holthuis J. C. M., Levine T. P. 2005. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6 : 209—220.
- Ito K., Komazaki S., Sasamoto K., Yoshida M., Nishi M., Kitamura K., Takeshima H. 2001. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. J. Cell Biol. 154 : 1059—1067.
- Kaplan M. R., Simoni R. D. 1985. Intracellular transport of phosphatidylcholine to the plasma membrane. J. Cell Biol. 101 : 441—445.
- Kohlwein S. D., Eder S., Oh C. S., Martin C. E., Gable K., Bacikova D., Dunn T. 2001. Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 21 : 109—125.
- Kwan E., Goldfarb D. S. 2004. NVj1p is outer-nuclear-membrane receptor for oxysterol-binding protein homolog Osh1p in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Sci. 117 : 4959—4968.
- Kwan E., Goldfarb D. S. 2006. Nucleus-vacuole junction in yeast: anatomy of a membrane contact site. Biochem. Soc. Transact. 34 : 340—342.
- Levine T. P. 2004. Short-range intracellular trafficking of small molecules across endoplasmic reticulum junction. Trends Cell Biol. 14 : 483—490.
- Levine T. P., Loewen C. 2006. Inter-organell membrane contact sites: through a glass, darkly. Curr. Opin. Cell Biol. 18 : 371—378.
- Levine T. P., Munro S. 2001. Dual targeting of Osh1p, a yeast homologue of oxysterol-binding protein, to both the Golgi and the nucleus-vacuole junction. Mol. Biol. Cell. 12 : 1633—1644.
- Levine T. P., Munro S. 2002. Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and independent components. Curr. Biol. 12 : 695—704.
- Loewen C. J., Roy A., Levine T. P. 2003. A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. EMBO J. 22 : 2025—2035.
- Ma H. T., Patterson R. L., van Rossum D. B., Birnbaumer L., Mikoshiba K., Gill D. L. 2000. Requirement of the inositol triphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. Science. 287 : 1647—1651.
- Mannella C. A., Buttle K., Rath B. K., Marko M. 1998. Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum. Biofactors. 8 : 225—228.
- Meier P. J., Spycher M. A., Meyer U. A. 1981. Isolation and characterization of rough endoplasmic reticulum associated with mitochondria from normal rat liver. Biochim. biophys. acta. 646 : 283—297.
- Meiners S., Xu A., Schindler M. 1991. Gap junction protein homologue from *Arabidopsis thaliana*: evidence for connexin in plants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 88 : 4119—4122.
- Moreau P., Bessoule J. J., Mongrand S., Testet E., Vincent P., Cassagne C. 1998. Lipid trafficking in plant cell. Prog. Lipid Res. 37 : 371—391.
- Munro S. 2004. Organelle identity and the organization of membrane traffic. Nat. Cell Biol. 6 : 469—472.
- Olkkonen V. M. 2004. Oxysterol binding protein and its homologues: new regulatory factors involved in lipid metabolism. Curr. Opin. Lipidol. 15 : 321—327.
- Olkkonen V. M., Levine T. 2004. Oxysterol binding protein: is more than one place at one time? Biochem. Cell Biol. 82 : 87—98.
- Pan X., Roberts P., Chen Y., Kvan E., Shulga N., Huang K., Lemmon S., Goldfarb D. S. 2000. Nucleus-vacuole junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p. Mol. Biol. Cell. 11 : 2445—2457.
- Panchin Y., Kelmanson I., Matz M., Lukyanov K., Usman N., Lukyanov S. 2000. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. Curr. Biol. 10 : 473—474.
- Peretti D., Dahan N., Shimoni E., Hirschberg K., Lev S. 2008. Coordinated lipid transfer between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex requires the VAP proteins and is essential for Golgi-mediated transport. Mol. Biol. Cell. 19 : 3871—3884.
- Perry R. J., Ridgway N. D. 2006. Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein. Mol. Biol. Cell. 17 : 2604—2616.
- Pitts K. R., Yoon Y., Krueger E. W., McNiven M. A. 1999. The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. Mol. Biol. Cell. 10 : 4403—4417.
- Putney J. W., Jr., Broad L. M., Braun F.-J., Lievreumont J.-P., Bird C. St. J. 2001. Mechanisms of capacitative calcium entry. J. Cell Sci. 114 : 2223—2229.

- Rapizzi E., Pinton P., Szabadkai G., Wieckowski M. R., Vandecasteele G., Baird G., Tuft R. A., Fogarty K. E., Rizzuto R. 2002. Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *J. Cell Biol.* 159 : 613—624.
- Raychaudhuri S., Prins W. A. 2010. The diverse functions of oxysterol-binding proteins. *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* 26 : 157—177.
- Rizzuto R., Pinton P., Carrington W., Fay F. S., Fogarty K. E., Lifshitz L. M., Tuft R. A., Pozzan T. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*. 280 : 1763—1766.
- Schulz T. A., Choi M.-G., Raychaudhuri S., Mears J. A., Ghirlando R., Hinshaw J. E. 2009. Lipid-regulated sterol transfer between closely apposed membranes by oxysterol-binding protein homologues. *J. Cell Biol.* 187 : 889—903.
- Shore G. C., Tata J. R. 1977. Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. I. Recovery of rapidly sedimenting endoplasmic reticulum in association with mitochondria. *J. Cell Biol.* 72 : 714—725.
- Simmen T., Aslan J. E., Blagoveshchenskaya A. D., Thomas L., Wan L., Xiang Y., Feliciangeli S. F., Hung C. H., Crump C. M., Thomas G. 2005. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J.* 24 : 717—729.
- Sleight R. G., Pagano R. E. 1983. Rapid appearance of newly synthesized phosphatidylethanolamine at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 258 : 9050—9058.
- Staehelein L. A. 1997. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* 11 : 1151—1165.
- Stefan C. J., Manford A. G., Baird D., Yamada-Hanff J., Mao Y., Emr S. D. 2011. Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER—plasma membrane contact sites. *Cell*. 144 : 389—401.
- Takekuma H., Komazaki S., Nishi M., Iino M., Kangava K. 2000. Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol. Cell*. 6 : 11—22.
- Terasaki M., Slater N. T., Fein A., Schmidek A., Reese T. S. 1994. Continuous network of endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91 : 7510—7514.
- Toulmay A., Prinz W. A. 2011. Lipid transfer and signaling at organelle contact sites: the tip of the iceberg. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23 : 458—463.
- Tsujiyama Y., Hurlley J. H. 2000. Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nat. Struct. Biol.* 7 : 408—414.
- Vance J. E. 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265 : 7248—7256.
- Vance J. E. 2003. Molecular and cell biology of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine metabolism. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 75 : 69—111.
- Varadi A., Johnson-Cadwel L. I., Cirulli V., Yoon Y., Allan V. J., Rutter G. A. 2004. Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J. Cell Sci.* 117 : 4389—4400.
- Varnai P., Toth B., Toth D. J., Hunyady L., Balla T. 2007. Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1—Orai 1 complex. *J. Biol. Chem.* 282 : 29 678—29 690.
- Velikanov G. A., Belova L. P., Ponomareva A. A. 2011. Membrane contacts of the endoplasmic reticulum and their possible functions in the plant cell. *Biol. Bull.* 38 : 5—15.
- Velikanov G. A., Levanov V. Y., Belova L. P., Ponomareva A. A., Il'ina T. M. 2012. Adjustable channel for diffusion between vacuoles of next cells: vacuolar symplast. *Biol. Bull. Rev.* 2 : 306—317.
- Voelker D. R. 1989. Reconstitution of phosphatidylserine import into rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 264 : 8019—8025.
- Voelker D. R. 2000. Interorganelle transport of aminoglycophospholipids. *Biochim. biophys. acta.* 1486 : 97—107.
- Voelker D. R. 2005. Bridging gaps in phospholipid transport. *Trends Biochem. Sci.* 30 : 396—404.
- Voeltz G. K., Rolls M. M., Rapoport T. A. 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 3 : 944—950.
- Wang H. J., Guay G., Pogan L., Sauve R., Nabi I. R. 2000. Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 150 : 1489—1498.
- Wirtz K. W. A. 1991. Phospholipid transfer proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 60 : 73—99.
- Wirtz K. W. A. 1997. Phospholipid transfer proteins revisited. *Biochem. J.* 324 : 353—360.
- Yaffe M. P., Kennedy E. P. 1983. Intracellular phospholipid movement and the role of phospholipid transfer proteins in animal cells. *Biochemistry.* 22 : 1497—1507.
- Yahalom A., Warmbrodt R. D., Laird D. W. et al. 1991. Maize mesocotyl plasmodesmata proteins cross-react with connexin gap junction protein antibodies. *Plant Cell.* 3 : 407—417.
- Yuan J. P., Kiselyov K., Shin D. M., Chen J., Shcheynikov N., Kang S. H. 2003. Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors. *Cell.* 114 : 777—789.

Поступила 19 II 2013

ENDOPLASMIC RETICULUM: MEMBRANE CONTACT SITES

G. A. Velikanov

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center RAS;
e-mail: velikanov@mail.kcn.ru

The review of modern data about a functional purpose of membrane contact sites (MCSs) of endoplasmic reticulum is presented. Traffic problems of lipids and calcium in MCSs are discussed. The sufficient condition for giving MCSs of certain functional is not received till now; the problem of the «anchors» providing contact of two membranes, definitively is not solved. The question of ability of MCSs to realize free diffusion of any small molecules (presumably to 1.5 kDa) and ions between compartments is discussed.

Key words: endoplasmic reticulum, membrane contact sites, functions.