

ТРАНСПОРТ ИОНОВ Ca^{2+} МИТОХОНДРИЯМИ: МЕХАНИЗМЫ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СТРУКТУРЫ И ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ КЛЕТКИ

Обзор

© 2019 К.Н. Белослудцев^{1,2*}, М.В. Дубинин²,
Н.В. Белослудцева¹, Г.Д. Миронова¹

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук, 142290 Московская обл., Пущино;
электронная почта: bekonik@gmail.com

² Марийский государственный университет,
424000 Республика Марий Эл

Поступила в редакцию 19.02.2019

После доработки 18.03.2019

Принята к публикации 19.03.2019

Митохондрии являются одним из важнейших элементов клетки, участвующих в регуляции внутриклеточного Ca^{2+} гомеостаза. В последнее десятилетие был идентифицирован ряд структур, ответственных за кальциевый транспорт в митохондриях. Среди них митохондриальный Ca^{2+} унипортер (MCU), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник (NCLX), $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ антипортер (Letm1). В обзоре представлены сведения об их строении, регуляции и физиологической роли. Обсуждаются данные о таком патофизиологическом механизме Ca^{2+} транспорта, как циклоспорин-чувствительная митохондриальная пора. Также обсуждается альтернативный механизм порообразования в митохондриях – липидная пора, индуцированная насыщенными жирными кислотами и ее роль в транспорте Ca^{2+} в органеллах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, транспорт Ca^{2+} , Ca^{2+} унипортер, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник, митохондриальная пора, липидная пора.

DOI: 10.1134/S0320972519060022

Способность митохондрий поглощать и удерживать ионы кальция известна уже почти 60 лет [1, 2]. Из пионерских исследований 1960-х гг. сформировалось целое направление в клеточной биологии, посвященное изучению роли митохондрий в регуляции кальциевого гомеостаза в норме и патологии клетки. За этот период проведены многочисленные исследования, которые позволили предсказать и охарактеризовать системы входа и выхода кальция из митохондрий, найти ингибиторы входа кальция в митохондрии, понять термодинамику процесса транспорта иона через внутреннюю митохондриальную мембрану и доказать важность этого процесса

Принятые сокращения: MCU – митохондриальный Ca^{2+} унипортер; Letm1 – $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ обменник; NCLX – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник; MiCU – регуляторная воротная субъединица Ca^{2+} унипортера; MPT пора – митохондриальная белковая циклоспорин А-чувствительная пора; МАМ – мембраны, ассоциированные с митохондриями, ЭР – эндоплазматический ретикулум.

* Адресат для корреспонденции.

для физиологии и патологии клетки. Однако, несмотря на достаточно интенсивное изучение транспорта ионов Ca^{2+} через внутреннюю мембрану митохондрий, долгое время молекулярная структура систем, ответственных за эти процессы, оставалась неизвестной. Последнее десятилетие ознаменовалось важными открытиями в этой области митохондриологии – были установлены молекулярные структуры многих Ca^{2+} -транспортирующих систем. Так, в 2009 г. был идентифицирован $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ обменник (Letm1, также являющийся K^+/H^+ обменником) [3], год спустя $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник (NCLX) [4], опосредующий выброс Ca^{2+} из митохондрий и MiCU1, регулирующий вход иона Ca^{2+} в органеллы [5]. В 2011 г. сразу в двух лабораториях была идентифицирована канальная субъединица Ca^{2+} унипортера (MCU) – белок, который осуществляет рутений-чувствительный вход ионов Ca^{2+} митохондрии [6, 7]. В следующие два года были идентифицированы и охарактеризованы еще несколько регуляторов Ca^{2+} входа в митохондрии: MCUb,

MiCU2, MCUR1, EMRE, SLC25A23 (Mg^{2+} /ATP- P_i переносчик) [8–12]. Эти открытия позволили установить, что за поглощение Ca^{2+} митохондриями в живых клетках ответственна макромолекулярная структура (митохондриальный Ca^{2+} унипортер), количественное содержание тех или иных белков в которой зависит от типа ткани, а также от внешних и внутренних факторов.

Параллельно с открытием специфических Ca^{2+} транспортирующих систем были проведены идентификация и уточнение структуры неспецифических Ca^{2+} -зависимых систем выхода ионов Ca^{2+} из митохондрий – митохондриальных пор. В настоящее время можно говорить о том, что выброс Ca^{2+} из органелл помимо Na^+ / Ca^{2+} обменника могут осуществлять циклоспорин А-чувствительная белковая пора и циклоспорин А-нечувствительная липидная пора, индуцированная жирными кислотами и Ca^{2+} [13, 14]. Благодаря этому, появилась возможность по-новому оценить механизмы возникновения и развития многих патофизиологических процессов, связанных с митохондриями, и понять, как их можно регулировать.

Данный обзор посвящен анализу современных литературных данных о структуре Ca^{2+} -транспортирующих и Ca^{2+} -индуцируемых систем митохондрий и их физиологической и патологической роли для клетки.

ТРАНСПОРТ Ca^{2+} ИЗ ЦИТОПЛАЗМЫ В МИТОХОНДРИИ. МАМ КОНТАКТЫ

В настоящее время общепринято, что митохондрии, наряду с эндоплазматическим ретикулумом (ЭР), являются важным элементом внутриклеточного кальциевого гомеостаза и одной из основных буферных систем клетки для ионов кальция. Они обладают способностью транспортировать высокие концентрации кальция в митохондриальный матрикс, где этот ион формирует комплексы с неорганическими и другими фосфатами. Однако роль митохондрий в регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза долгое время подвергали сомнению. Связано это с тем, что несмотря на достаточно высокую скорость транспорта ионов Ca^{2+} по кальциевому унипортеру, *in vitro* сродство переносчика к этому иону очень низкое (полумаксимальная эффективная концентрация ~ 10 мкМ). Это значение намного превышает концентрацию иона в цитоплазме клеток (10^{-7} М) [15, 16]. Позднее было показано, что митохондрии и ЭР способны образовывать микродомены [17]. Содержание Ca^{2+} в ЭР может достигать 0,5 мМ, что в 1000 раз больше, чем в цитоплазме клетки [18]. Поэтому

кратковременный резкий выброс Ca^{2+} из ретикулума может приводить к увеличению локальной концентрации Ca^{2+} до микромолярного уровня. Это, в свою очередь, будет активировать Ca^{2+} унипортер и поглощение Ca^{2+} митохондриями.

Установлено, что мембрана ЭР и внешняя мембрана расположенных рядом митохондрий образуют общие участки, т.н. МАМ контакты, в которых Ca^{2+} , высвобождаемый из ЭР, может быть легко поглощен митохондриями [18, 19]. ЭР и митохондрии в этих контактных сайтах соединены белковыми линкерами (расстояние между мембранами 10 или 20 нм в зависимости от того, гладкий или шероховатый ретикулум взаимодействует с митохондриями) [19]. МАМ контакты являются динамическими структурами, которые чувствительны к изменениям условий внутри клетки. Эта динамическая природа обуславливает высокую вариабельность состава МАМ контактов – согласно протеомным исследованиям, более 1000 белков входят в состав этой структуры [20]. Однако обязательными, всегда присутствующими в МАМ контактах, можно считать ~ 70 белков [18]. За высвобождение ионов Ca^{2+} из ретикулума в МАМ контактах отвечает, в основном, IP_3 рецептор (рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата) (в меньшей степени рианодиновый рецептор (RyR)) (рис. 1). Вышедший из ретикулума Ca^{2+} свободно проникает в митохондрии через VDAC канал (порин) внешней митохондриальной мембраны. Стоит отметить, что МАМ контакты обогащены IP_3R и VDAC. Более того, взаимодействие IP_3R и VDAC обеспечивается белком – шапероном GRP75 (*glucose-regulated protein 75*), который не только физически связывает IP_3R с VDAC1 в комплекс, но также необходим для их функционального сопряжения, облегчающего поступление Ca^{2+} в митохондрии [21]. Помимо этих белков необходимо упомянуть еще два, которые могут быть ответственны за формирование МАМ контактов и регулировать Ca^{2+} транспорт между органеллами – это митофузин 2 (MFN2) и белок 8, содержащий домен PDZ (PDZD8 – PDZ domain-containing protein 8) [22, 23].

Транспорт Ca^{2+} из ретикулума в митохондрии определяется не только непосредственным контактом кальциевых переносчиков ретикулума и VDAC внешней митохондриальной мембраны, но и окислительно-восстановительным состоянием этих белков. Митохондрии и ЭР – две органеллы, ответственные за продукцию активных форм кислорода. Поэтому неудивительно, что многие регуляторы окислительного состояния, среди которых шапероны (кальнексин и кальретикулин) и редокс-активные белки (ERp57, ERp44, ERO1 α , NADPH оксидаза 4 (NOX4), се-

ленопротеин N1 (SEPN1), тиоредоксин-связанный трансмембранный белок 1 (TMX1) и ERdj5) локализованы в МАМ контактах [18, 24]. Рианодиновый и IP_3 рецепторы содержат достаточно большое количество цистеиновых остатков, которые в нормальных условиях (при закрытом состоянии канала) находятся в восстановленном состоянии. Поэтому активация оксидаза NOX4 или ERO1 α (ER oxidoreductin-1 α) с последующим увеличением активных форм кислорода в зоне МАМ контактов приводит к окислению как рианодинового рецептора, так и IP_3 рецептора [24]. Это, в свою очередь, будет приводить к активации этих каналов, выбросу Ca^{2+} из ретикулула и поглощению его митохондриями.

Следует отметить, что помимо ретикулула, митохондрии могут образовывать контакты с плазматической мембраной клеток (РАМ – *plasma membrane associated mitochondria*). При этом, вследствие активации Ca^{2+} каналов плазматической мембраны концентрация ионов кальция в таких контактах может быть значительно выше, чем в случае МАМ контактов [25].

Ca^{2+} УНИПОРТЕР ВНУТРЕННЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ

Основным путем транспорта иона Ca^{2+} через внутреннюю мембрану митохондрий является Ca^{2+} -унипортер. Несмотря на то, что долгое время молекулярная структура этого переносчика была не определена, его функциональные, кинетические и термодинамические характеристики были известны довольно давно (см. обзоры [26, 27]). Процесс поглощения Ca^{2+} через Ca^{2+} унипортер зависит от концентрации иона в среде и происходит по градиенту электрохимического потенциала, который может генерироваться как при окислении субстратов дыхания, так и активации АТФазной активности митохондрий. Поглощение Ca^{2+} митохондриями стимулируется в присутствии проникающих катионов (P_i , ацетата и др). Помимо этого Ca^{2+} унипортер способен транспортировать и другие двухвалентные катионы – Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , лантаноиды, но не Mg^{2+} [26]. Однако концентрация в клетке этих ионов настолько мала, что унипортер в норме вряд ли переносит другие катионы, помимо Ca^{2+} .

Еще в 1970-х гг. был обнаружен селективный неконкурентный ингибитор Ca^{2+} -унипортера – рутений красный, а позднее и его производное – Ru360. Кроме этого, поглощение Ca^{2+} подавляется лантаноидами, Mg^{2+} и другими двухвалентными металлами, а также АТФ [27–29].

Попытки выделить и очистить Ca^{2+} -унипортер предпринимали, начиная с 1970-х гг. В каче-

стве возможной структуры, ответственной за транспорт ионов Ca^{2+} в митохондрии, рассматривали молекулы от 2 до 75 кДа [30]. В частности, в нашей лаборатории из митохондрий сердца быка был выделен белок (мол. масса ~40 кДа), который формировал в мембране БЛМ Ca^{2+} -селективные рутений-чувствительные каналы [31, 32]. Лишь в 2011 г. идентификация гена, кодирующего порообразующую субъединицу Ca^{2+} -унипортера – MCU, позволила охарактеризовать структуру, ответственную за транспорт Ca^{2+} в митохондрии [6, 7]. Согласно современным представлениям, митохондриальный Ca^{2+} -унипортер млекопитающих представляет из себя комплекс белков, сформированный из мембранных порообразующих компонентов (MCU, MCUb) и связанных с MCU регуляторов – MiCU1,2, EMRE, MCUR1 и др. (рис. 2). Вместе с тем, по-видимому, лишь MCU и MiCU1 являются существенными компонентами для митохондриального транспорта Ca^{2+} , поскольку только они присутствуют во всех живых организмах, у которых был обнаружено поглощение Ca^{2+} митохондриями [33].

MCU. Ген MCU (*CCDC109a*) (*mitochondrial calcium uniporter*) является высоко-консервативным

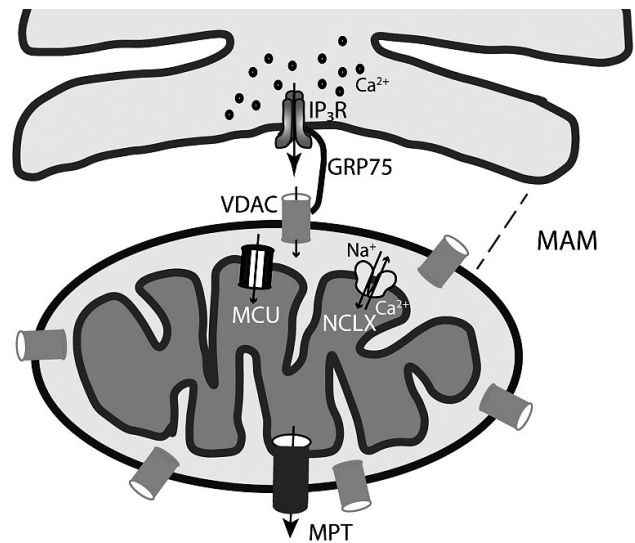


Рис. 1. МАМ-контакты между ЭР и митохондриями. Аккумулированный в ЭР Ca^{2+} при стимуляции IP_3 рецептора выходит из ретикулула в зону МАМ контакта, что приводит к образованию в этой области микродоменов с повышенной концентрацией Ca^{2+} (10-кратное увеличение). Из области микродоменов Ca^{2+} через VDAC внешней митохондриальной мембраны попадает в межмембранное пространство митохондрий и транспортируется в матрикс органелл по Ca^{2+} унипортеру. На рисунке показаны также $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник митохондрий (NCLX) и митохондриальная пора (MPT), индуцирующие выброс Ca^{2+} из органелл. VDAC митохондрий и IP_3 рецептор ретикулула физически соединены белком GRP75

и присутствует практически во всех эукариотических организмах за исключением некоторых простейших и грибов [33]. Он кодирует 40 кДа белок (активным является 35 кДа белок после отщепления в митохондриях сигнальной последовательности), который формирует пору Ca^{2+} -канала в митохондриях. Этот белок состоит из двух сверхспирализованных доменов (*cc-domains*) (*N*- и *C*-концы белка, экспонированные в матрикс митохондрий) и двух трансмембранных доменов, соединенных друг с другом короткой петлей (9 а.о.), несущей в себе высококонсервативный DIME мотив (аспарагиновая к-та²⁶⁰-изолейцин²⁶¹-метионин²⁶²-глутаминовая к-та²⁶³ в MCU человека) [6, 7]. Эта петля, экспонированная в межмембранное пространство митохондрий, ответственна как за кальций-транспортирующую функцию (глутаминовая к-та²⁵⁷, аспарагиновая к-та²⁶⁰ и глутаминовая к-та²⁶⁴), так и за связывание с унипортером ингибитора рутения красного (серин²⁵⁹) [6–8, 29]. Мутации по этим аминокислотным остаткам нарушают ион-транспортирующие свойства унипортера и снижают чувствительность белка к рутению красному. Важно отметить, что MCU не содержит в своем составе классический Ca^{2+} -связывающий домен, поэтому он не способен сам по себе регулировать свою активность [6, 7].

Поскольку MCU имеет всего лишь два трансмембранных домена, то для формирования

функционального канала в митохондриальной мембране происходит олигомеризация субъединиц. DIME мотив разных субъединиц формирует вход в пору канала и образует селективный фильтр для ионов Ca^{2+} . На основе методов молекулярной динамики предположили, что канал может быть сформирован четырьмя субъединицами MCU [8]. С помощью криоэлектронной микроскопии это предположение было подтверждено несколькими исследованиями на различных организмах [34–36]. Вместе с тем, еще в 2016 г. с помощью ЯМР и криоэлектронной микроскопии было показано, что MCU нематоды *Caenorhabditis elegans* представляет собой пентамер [37]. Следует отметить, что при установлении архитектуры канала MCU из *C. elegans* был использован не весь белок, а его часть без *N*-концевого домена (~160 а.о.), не обладающего канальной активностью. Тем не менее, можно предположить, что это все же внесло какие-то изменения в общую структуру порового канала. Таким образом, точная стехиометрия порового канала MCU все еще требует уточнения, и идентификация архитектуры у различных организмов поможет решить этот вопрос.

Анализ нуклеотидной последовательности гена *MCU* также позволил идентифицировать ген *CCDC109b*. Ген присутствует во всех позвоночных, но отсутствует в других организмах, где присутствует *MCU*. Этот ген кодирует 33 кДа бе-

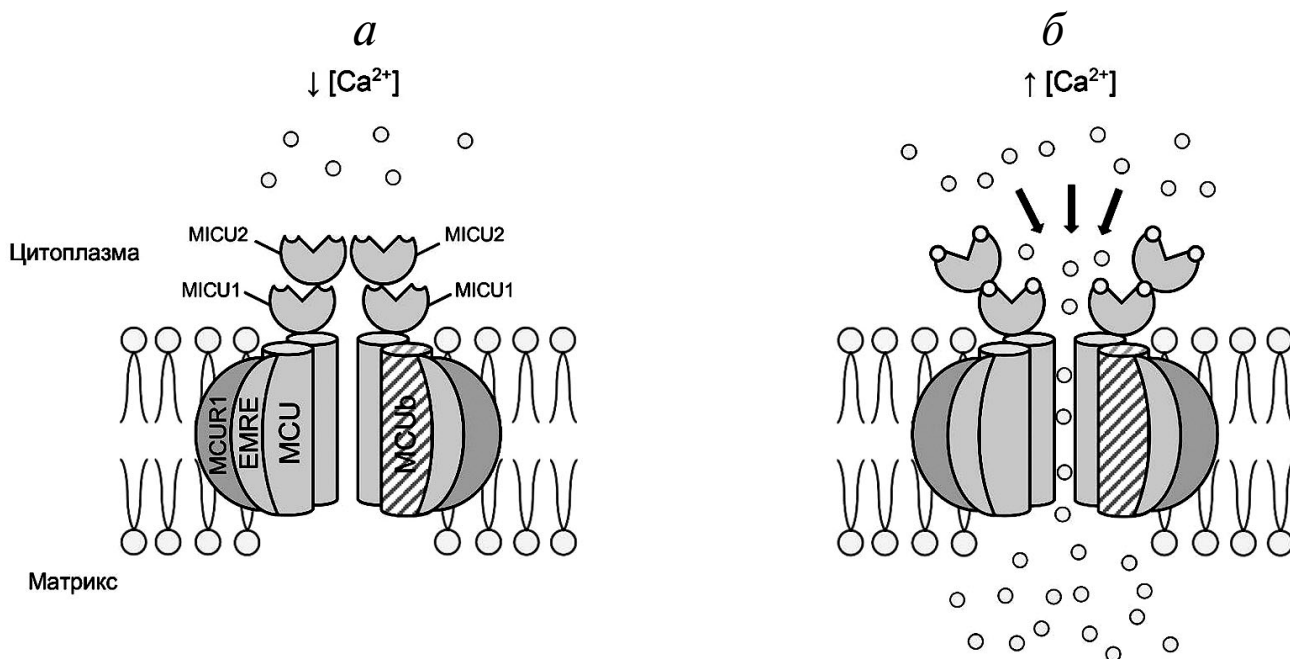


Рис. 2. Схематическое изображение Ca^{2+} унипортера. *а* — При низкой концентрации Ca^{2+} в цитоплазме белки MiCU в качестве воротного механизма Ca^{2+} унипортера препятствуют входу Ca^{2+} в митохондрию, тем самым, защищая митохондрию от перегрузки по этому иону; *б* — увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме приводит к связыванию иона с MiCU и их конформационным перестройкам, это приводит к открытию канала MCU для транспорта иона в митохондрию

лок MCU^b , который на 50% гомологичен MCU . Данный белок обладает похожей на MCU топологией и имеет два *cc*-домена и два трансмембранных домена, соединенными короткой петлей с DIME мотивом [8]. MCU^b достаточно легко взаимодействует с MCU в комплексе (происходит образование гетероолигомера). Вместе с тем, присутствие MCU^b (и его повышенная экспрессия) в мембранном поровом комплексе MCU нарушает ион-транспортирующие свойства комплекса [8, 11]. Таким образом, MCU^b принято рассматривать в качестве доминант-негативной формы MCU . Связано это с модификацией короткой петли с DIME мотивом, в котором одна из трех отрицательно-заряженных аминокислот (глутаминовая к-та) замещена на валин. Отношение MCU/MCU^b в мембране очень сильно варьирует в разных тканях. Так, в сердце и печени это отношение низко (3 : 1 и 4 : 1), в то время как в скелетных мышцах отношение экспрессии генов этих белков очень высоко (40 : 1). В то же время отношение в лейкоцитах близко к 1 : 5 [8, 29]. Вполне возможно, что соотношение этих субъединиц в разных тканях является одним из важных механизмов регулирования транспорта ионов Ca^{2+} в митохондриях.

EMRE. Несмотря на то, что в модельных бислойных липидных мембранах для индукции Ca^{2+} проводимости достаточно встраивания одного MCU [38], во внутренней мембране митохондрий животных клеток присутствует важный трансмембранный регуляторный белок, без которого не будет происходить вход Ca^{2+} через MCU . **EMRE** (*essential MCU regulatory element*) — 10 кДа белок, обладающий одним трансмембранным сегментом, который присутствует лишь у многоклеточных животных, но не в других эукариотических таксонах — растениях, грибах, простейших [11]. Нокаут клеток по гену *Smdt1*, кодирующему **EMRE**, полностью устраняет возможность митохондрий клеток животных транспортировать ионы Ca^{2+} , даже при условии гиперэкспрессии гена *MCU* [11]. С другой стороны, увеличение уровня **EMRE** в митохондриях может приводить к неконтролируемому входу Ca^{2+} в органеллы, их перегрузке и неминуемой клеточной гибели. В то же время точная топология **EMRE** в мембране митохондрий не известна. Поэтому роль этого белка до конца не ясна. Предполагается, что высоко-консервативный полиаспаратный C-конец **EMRE** может служить сенсором Ca^{2+} с матричной стороны внутренней митохондриальной мембраны [39]. Между тем в других исследованиях предполагается иная топология, при которой в матрикс митохондрий обращен N-конец этого белка. Было предположено, что **EMRE** устанавливает взаи-

модействие между поровыми компонентами MCU комплекса и его регуляторными воротными субъединицами MiCU1 и MiCU2 [40].

Семейство *MiCU*. Исследования, посвященные кинетике поглощения ионов Ca^{2+} в митохондриях, позволили выявить одну из важнейших особенностей этого процесса — сигмоидальный характер зависимости скорости поглощения ионов Ca^{2+} от его концентрации в среде (цитоплазме). Эта положительная кооперативность с насыщением при высоких концентрациях Ca^{2+} позволила еще на начальных этапах этих исследований предположить наличие регуляторного аллостерического центра переносчика, находящегося на цитоплазматической стороне внутренней мембраны митохондрий, который при взаимодействии с Ca^{2+} «переключал» унипортер в активное ион-транспортирующее состояние [15, 26, 27, 29]. Как было сказано выше, сам MCU не имеет в своей структуре классический Ca^{2+} -связывающий домен (*EF-hand* домен) и поэтому, не способен к саморегуляции своей активности [6, 7]. Анализ митохондриальных белков по двум особенностям в структуре, а именно: локализация во внутренней митохондриальной мембране и наличие Ca^{2+} -связывающего домена, позволил идентифицировать регуляторный белок, которым оказался MiCU1 (*mitochondrial calcium uptake 1* (*CBARA1*, *EFHA3*)) (54 кДа) [5]. Именно белки семейства MiCU являются ключевыми регуляторами поглощения ионов кальция митохондриями, тем самым контролируя митохондриальный Ca^{2+} гомеостаз и метаболизм.

В настоящее время общепризнано, что MiCU1 является частью воротного механизма Ca^{2+} -унипортера, и в состоянии покоя (при низкой концентрации внутриклеточного Ca^{2+}) он препятствует доступу иона к каналу MCU (рис. 2). Это предотвращает массивный вход Ca^{2+} в органеллы, перегрузку митохондрий этим ионом, а также падение мембранного потенциала. Действительно, в митохондриях клеток с нокаутом по гену *MICU1* наблюдалась увеличенная концентрация митохондриального Ca^{2+} , повышенная чувствительность к открытию МРТ поры и пониженный уровень АТФ [41].

Как сказано выше, Ca^{2+} -унипортер способен транспортировать различные двухвалентные катионы через внутреннюю митохондриальную мембрану [26, 27]. Однако, сами по себе каналные субъединицы MCU (их DIME фильтр) не участвуют в селективном отборе тех или иных ионов. Недавно было показано, что за такую селективность (по крайней мере, для Mn^{2+}) отвечает MiCU1 , который предотвращает поглощение марганца митохондриями [42].

Как и в случае с соотношением MCU/MCUB, стехиометрия MCU/MiCU1 в различных тканях важна для транспорта Ca^{2+} в органеллах. Так, меньшее количество белка MiCU1 в сердце по сравнению с печенью объясняет более низкий порог активации транспорта Ca^{2+} и более низкую максимальную емкость поглощения Ca^{2+} митохондриями [43].

Помимо MiCU1 также были идентифицированы белки MiCU2 (EFHA1) (45 кДа) и MiCU3 (EFHA2) (55 кДа), которые являются паралогами MiCU1 и на 41, и 34% ему идентичны [9, 43]. В митохондриях MiCU2 образует гетеродимер с MiCU1 (посредством дисульфидных связей). Именно димер является активным воротным механизмом, выполняя две важные функции в качестве регулятора. При низкой концентрации Ca^{2+} в клетке (0,1 мкМ) воротный механизм защищает митохондрии от перегрузки ионом [41, 44] (рис. 2, а). При увеличении концентрации кальция в цитоплазме происходит связывание Ca^{2+} с EF-hand доменами MiCU1-MiCU2, вызывая конформационные изменения димера, который действует как молекулярный переключатель, снимающий ингибирование MCU и открывая канал для транспорта Ca^{2+} в митохондрии [41, 45] (рис. 2, б).

Как было сказано ранее, взаимодействие димера MiCU1-MiCU2 с MCU происходит посредством EMRE [40]. Однако недавно было показано, что MiCU1 (аргинин^{440/443}) может непосредственно взаимодействовать с DIME мотивом MCU, что, помимо регуляции входа Ca^{2+} в митохондрии, приводит к ингибированию взаимодействия MCU с рутением красным и Ru360 [46]. В отсутствие MiCU1 MiCU2 не способен образовывать комплекс с MCU, воротный механизм будет разрушен и произойдет перегрузка митохондрий по иону Ca^{2+} [9, 38].

Соотношение субъединиц MiCU1-MiCU2, а также их взаимодействие друг с другом и MCU определяет кинетику транспорта Ca^{2+} в митохондрии. Так, с конца 1980-х гг. было установлено, что преинкубация деэнергизованных митохондрий с низкими концентрациями Ca^{2+} (2–5 мкМ) приводила к более чем 10-кратному увеличению скорости поглощения добавленного иона митохондриями. При этом зависимость скорости входа Ca^{2+} от концентрации иона изменялась с сигмоидальной на гиперболическую [47, 48]. В основе этого явления, по-видимому, лежит Ca^{2+} -индуцированная диссоциация MiCU1 и MiCU2 от MCU, что приводит к значительному увеличению скорости поглощения Ca^{2+} даже при низких концентрациях иона. Оверэкспрессия гена *MICU1* также приводила к значительному ускорению входа Ca^{2+} в митохондрии, в то время как повышенная экспрессия гена *MiCU2*, наоборот, подавляла этот процесс [49].

Что касается MiCU3, то он является активатором транспорта Ca^{2+} , образуя димеры с MiCU1, но не MiCU2 [44, 50]. Показано, что экспрессия гена *MICU3* в клетках линии HeLa, где он обычно не экспрессируется, вызывает значительное увеличение скорости поглощения Ca^{2+} [9]. Таким образом, можно рассматривать MiCU3 в качестве регуляторного компонента, который определяет также кинетику транспорта Ca^{2+} в митохондриях и модулирует общую динамику концентрации кальция в клетке.

MCUR1 и SLC25A23. Еще одним активатором комплекса MCU является 40 кДа белок MCUR1 (MCU regulator 1) внутренней мембраны митохондрий, кодируемый геном *CCDC90A* (*Mcur1*) [10, 51]. Было показано, что MCUR1 необходим для поглощения митохондриями Ca^{2+} , поскольку его нокдаун подавлял вход Ca^{2+} в митохондрии, а оверэкспрессия усиливала поглощение иона. Нокдаун гена *Mcur1* в клетках млекопитающих придает им устойчивость к Ca^{2+} перегрузке митохондрий и открытию в них MPT поры [10]. В то же время показано, что эффект MCUR1 на Ca^{2+} транспорт может быть связан с поддержанием мембранного потенциала митохондрий, поскольку MCUR1 участвует в сборке комплекса IV дыхательной цепи митохондрий [52]. Несмотря на то, что прямое взаимодействие MCU с MCUR1 не установлено, было предположено, что MCUR1 может быть ответственен за взаимодействие MCU и EMRE. Так, в митохондриях мышей, нокаутированных по гену *Mcur1*, наблюдалось уменьшение количества собранных комплексов кальциевого унипортера и снижение скорости транспорта Ca^{2+} в митохондрии [53].

Одновременно с MCUR1 был идентифицирован еще один белок внутренней мембраны митохондрий, имеющий EF-hand домен. Им оказался белок SLC25A23, относящийся к семейству переносчиков, транспортирующих через мембраны Mg-ATP/ P_i (Mg-ATP/ P_i переносчик) [12]. Мутация EF-hand домена этого белка приводит к снижению скорости входа ионов Ca^{2+} в митохондрии. Но, как и в случае с MCUR1, связано ли это с непосредственным влиянием на комплекс унипортера или с влиянием белка на митохондриальную энергетику, до конца не определено.

Другие структуры, ответственные за возможный транспорт Ca^{2+} в митохондрии. Исследования механизмов поглощения ионов Ca^{2+} на изолированных митохондриях позволили еще в 1990-х гг. выделить два режима поглощения Ca^{2+} [54]. Оба зависят от присутствия мембранного потенциала, но проявляют различную чувствительность к рутению красному/Ru360. Первый режим активируется при относительно вы-

сокой концентрации цитоплазматического Ca^{2+} , он высокочувствителен к рутению красному и позволяет поглощать достаточно большое количество иона. Считается, что этот путь опосредован работой Ca^{2+} унипортера [54, 55]. Вторым режимом, названным RaM (*rapid uptake mode*), активируется при низких концентрациях кальция (50–100 нМ против 500 нМ для Ca^{2+} унипортера), ингибируется лишь высокими концентрациями рутения красного и способен с высокой скоростью транспортировать небольшое количество иона [54]. Предполагается, что этот режим может модулировать окислительное фосфорилирование физиологическими концентрациями Ca^{2+} , в то время как поглощение ионов Ca^{2+} , опосредуемое Ca^{2+} унипортером, приводит к внутриклеточному забуфериванию иона митохондриями. Молекулярная структура, ответственная за RaM, до сих пор не обнаружена. Более того, есть веские данные говорить о том, что это другой режим работы Ca^{2+} унипортера, поскольку при нокауте MCU режим RaM также не наблюдался [6, 7].

Предполагается, что помимо Ca^{2+} унипортера, транспортировать Ca^{2+} в митохондрии могут и другие белки. К ним можно отнести Letm1 (*leucine zipper-, EF-hand-containing transmembrane protein 1*) [3], рианодинорный рецептор (mRyR) [56] и разобщающий белок (UCP2 и 3) [57]. Стоит отметить, что роль этих белков в Ca^{2+} транспорте митохондрий до сих пор обсуждается. Так, Letm1 (70 кДа), который осуществляет электро-нейтральный обмен Ca^{2+} на 2H^+ , также осуществляет электро-нейтральный обмен K^+ на H^+ . При этом молекулярный механизм работы Letm1 до сих пор далек от понимания [58].

В 2000 г. во внутренней мембране митохондрий был обнаружен 600 кДа белок, транспортирующий Ca^{2+} , похожий на рианодинорный рецептор RyR1 [56]. Однако в настоящее время существование этого белка в митохондриях подвергается сомнению. Также, недавно были представлены достаточно убедительные доказательства против участия UCP2 и 3 в Ca^{2+} транспорте в митохондриях [59]. Все это позволяет говорить о том, что основным, если не единственным установленным механизмом транспорта Ca^{2+} в митохондрии является Ca^{2+} -унипортер.

СИСТЕМЫ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВЫБРОСА Ca^{2+} ИЗ МИТОХОНДРИЙ

Способность митохондрий не только поглощать, но и выбрасывать Ca^{2+} является важной функцией этих органелл. Именно баланс в работе митохондриальных систем входа и выхода

кальция обеспечивает поддержание внутриклеточного кальциевого гомеостаза и функционирование митохондрий в норме и при патологиях. Начиная с 1970-х гг., выброс Ca^{2+} из митохондрий рассматривали через призму двух систем – Na^+ -зависимого и Na^+ -независимого выхода (обмен Ca^{2+} на Na^+ и H^+ соответственно). Считается, что эти системы функционируют в зависимости от типа ткани: в возбудимых тканях (мозг, сердце) функционирует система $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена, а в невозбудимых (печень) – $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмена. Показано, что это системы медленного выброса кальция из митохондрий, скорость транспорта ионов через которые значительно уступает скорости поглощения кальция через кальциевый унипортер [60, 61]. Обмен ионов Ca^{2+} на Na^+ считается электрогенным со стехиометрией 3Na^+ на 1Ca^{2+} , в то время как обмен Ca^{2+} на протон является электро-нейтральным (стехиометрия 2H^+ на 1Ca^{2+}) [62, 63].

Переносчик, ответственный за $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмен (60 кДа), был идентифицирован в 2010 г. как антипортер внутренней мембраны митохондрий, способный выбрасывать ион Ca^{2+} в обмен на ионы Na^+ или Li^+ (NCLX – $\text{Na}^+/\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger) [4]. Он принадлежит к суперсемейству Ca^{2+} /катион⁺ антипортеров, которые обеспечивают обмен ионов Ca^{2+} на какой-либо одновалентный катион (Na^+ , Li^+ , K^+ или H^+) [64]. Способность обменивать ион Ca^{2+} не только на Na^+ , но и Li^+ является уникальной особенностью митохондриального переносчика [65], но не переносчиков плазматической мембраны NCX и NCKX). NCLX обнаружен лишь на внутриклеточных мембранах, особенно им богата внутренняя мембрана митохондрий. NCLX блокируется классическим ингибитором NCX плазматической мембраны клеток – CGP37157 и его ингибирование приводит к подавлению выброса Ca^{2+} из органелл [66]. Сродство антипортера к иону Na^+ ~7 мМ, что достаточно близко к внутриклеточной концентрации этого иона. Поэтому даже небольшое изменение концентрации Na^+ в клетке будет приводить к значительному увеличению скорости обменной активности и снижению концентрации Ca^{2+} внутри митохондрий [67]. Интересно, что при деполяризации митохондрий в клетке может происходить обращение переносчика и поглощение ионов Ca^{2+} в митохондрии [68].

Трехмерная структура NCLX до сих пор не определена. С другими белками суперсемейства у NCLX не очень высокая степень гомологии (~20%) [69]. Однако, учитывая сходство функций, трехмерная структура $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортера внутренней мембраны митохондрий должна быть похожа на структуру других транспорте-

ров этого семейства. Так, согласно кристаллической структуре NCX из археобактерии *Methanocaldococcus jannaschii*, белок обладает 10 трансмембранными доменами, где 12 ион-координирующих остатков на доменах TM2, 3, 7 и 8 формируют 4 сайта связывания (S_{ext} , S_{mid} , S_{int} и S_{Ca}) [70]. Показано, что 3 иона Na^+ способны занимать сайты S_{ext} , S_{int} и S_{Ca} , в то время как ион Ca^{2+} связывается в белке с сайтом S_{Ca} . Таким образом, сайты S_{int} и S_{ext} являются высокоселективными по Na^+ , в то время как сайт связывания S_{Ca} может взаимодействовать как с ионом Na^+ , так и с ионом Ca^{2+} [62, 71]. Следует отметить, что 11 из 12 ион-координирующих остатков идентичны в про- и эукариотических белках NCX [70]. Вместе с тем, как было сказано выше, NCLX обладает не очень большой степенью гомологии с остальными белками данного семейства, и 9 из 12 ион-координирующих остатков в нем отличаются от ион-координирующих остатков в NCX из *M. jannaschii* [4, 69].

В отличие от Na^+ -зависимого пути выброса ионов Ca^{2+} из митохондрий, не существует единого мнения о структуре, ответственной за Ca^{2+}/H^+ обмен. Роль этого обменника может выполнять Letm1 [58]. Таким образом, предположено, что этот белок в зависимости от условий может транспортировать Ca^{2+} как в митохондрии, так и из них. Исходно предполагалось, что стехиометрия обмена Ca^{2+} на H^+ 1 : 1 [3]. Вместе с тем, недавно на протеолипосомах, содержащих Letm1, было показано, что этот белок способен обменивать ионы Ca^{2+} и H^+ со стехиометрией 1 : 2 [63]. Это действительно позволяет рассматривать Letm1 как один из основных кандидатов на данный механизм Na^+ -независимого выброса ионов Ca^{2+} из митохондрий. Как было сказано выше, молекулярный механизм работы Letm1 далек от понимания. Поэтому необходимо проведение дополнительных экспериментов по определению его трехмерной структуры и точной идентификации механизма работы.

СИСТЕМЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ВЫБРОСА Ca^{2+} ИЗ МИТОХОНДРИЙ

МРТ пора. Одним из наиболее интригующих и до сих пор до конца не изученных Ca^{2+} -зависимых явлений в митохондриях является открытие во внутренней мембране органелл митохондриальной поры. Начиная с середины прошлого века было известно, что в присутствии ионов Ca^{2+} во внутренней мембране митохондрий различных тканей большинства эукариотических организмов может происходить неконтролируе-

мое увеличение проницаемости для гидрофильных соединений и ионов. Такое увеличение проницаемости внутренней митохондриальной мембраны сопровождается нарушением ионного гомеостаза по обе стороны мембраны, коллапсом мембранного потенциала, набуханием органелл, разрушением внешней митохондриальной мембраны и самих митохондрий. Позднее, это явление было названо митохондриальный переход проницаемости (*mitochondrial permeability transition* (MPT)) или митохондриальная пора (MPT пора) [72]. Показано, что размер поры может достигать 3 нм в диаметре (через пору способны проникать соединения до 1,5 кДа), а процесс ее закрытия—открытия регулируется рядом физиологических модуляторов. Так было показано, что регуляторами MPT поры являются: неорганический фосфат, окисляющие агенты (и окислительный стресс в целом), разобщители, снижение пула адениновых нуклеотидов и др. Ингибиторами поры являются адениновые нуклеотиды, SH-восстанавливающие агенты, восстановленные пиридиновые нуклеотиды и др. (см. обзоры [73, 74]).

Начиная с 1970-х гг. считали, что MPT пора имеет белковую природу [72]. Особенно это представление утвердилось с момента открытия высокоселективного ингибитора поры циклоспорина А. Циклоспорин А полностью ингибировал MPT в субмикромольных концентрациях, что стало ясно: речь в данном случае идет о его связывании с каким-то белком [75]. Между тем, точная структура поры до сих пор не определена. Сейчас можно говорить о том, что MPT пора — это комплекс белков внешней и внутренней мембраны митохондрий [74]. При этом, единственным, точно установленным компонентом, входящим в эту структуру, является циклофилин Д — мишень циклоспорина А [76]. Циклофилины — это семейство белков, проявляющих пептидил-пролил *цис-транс* изомеразную активность и катализирующих взаимопревращение *цис* и *транс* конформаций пептидных связей белков, расположенных рядом с остатками пролина [77]. Таким образом, циклофилин Д является, в первую очередь, регуляторным белком, который в присутствии ионов Ca^{2+} стимулирует перестройку в белках, ответственных за формирование канала MPT поры.

Ответ на вопрос, какая структура формирует канал MPT поры во внутренней мембране митохондрий, до сих пор не известен (рис. 3, а). Долгое время превалировала гипотеза о том, что основным компонентом MPT поры, формирующим канал во внутренней митохондриальной мембране, является аденилат-транслокатор [73]. Это предположение было связано с тем, что

непроникающие ингибиторы аденилат-транслокатора – атрактилозид и карбоксиатрактилат стимулировали образование поры, а бонгрековая кислота ингибировала ее открытие. Более того, адениновые нуклеотиды, переносимые транслокатором в нормальных условиях, также подавляли открытие поры. Однако, в середине 2000-х гг. было показано, что аденилат-транслокактор не является столь существенным компонентом МРТ поры. В митохондриях, нокаутированных по генам *ANT1* и *ANT2*, также происходило открытие МРТ поры, чувствительной к циклоспирину А [78].

Поиск новых канальных компонентов МРТ поры привел сначала к фосфатному переносчику, а потом к АТФ-синтазе митохондрий [79, 80]. Все эти белки объединяет то, что они способны взаимодействовать с циклофилином Д. В последнее время в качестве канального компонента МРТ поры принято считать АТФ-синтазу. Было высказано несколько предположений, как она может «работать» в качестве МРТ поры – начиная от формирования поры различными белками, входящими в мембранный F₀ комплекс АТФ-синтазы и заканчивая тем, что пора может образовываться на стыке димера АТФ-синтазы [80, 81]. Так, нокаун гена, кодирующего *c* субъединицу АТФ-синтазы, приводил к ингибированию

открытия МРТ поры в митохондриях [81]. При встраивании в липосомы димеров АТФ-синтазы также была обнаружена Ca²⁺-зависимая канальная проводимость, похожая на таковую для МРТ поры [80]. Подобная канальная активность наблюдалась и в митохондриях дрожжей, причем она сильно ослаблялась в мутантах, у которых отсутствовали *e*- и *g*-субъединицы АТФ-синтазы, необходимые для формирования димеров [82]. С другой стороны, с помощью молекулярной динамики и нокаутов генов различных субъединиц было продемонстрировано, что данные структуры вряд ли могут формировать МРТ пору. Так, показано, что внутреннее пространство *c* кольца АТФ-синтазы настолько гидрофобно, что вряд ли может быть ответственно за формирование поры [83]. При нокауте генов, кодирующих эту субъединицу, в митохондриях, также можно индуцировать образование МРТ поры [84]. Нарушение синтеза белков, ответственных за формирование димеров также не препятствует формированию в митохондриях поры [85]. Кроме того, димеризация АТФ-синтазы усиливается ингибитором АТФ-азы – белком IF1, который ингибирует открытие МРТ поры и защищает клетку от ишемических повреждений [86]. Вместе с тем, необходимо отметить, что удаление различных субъединиц АТФ-синтазы

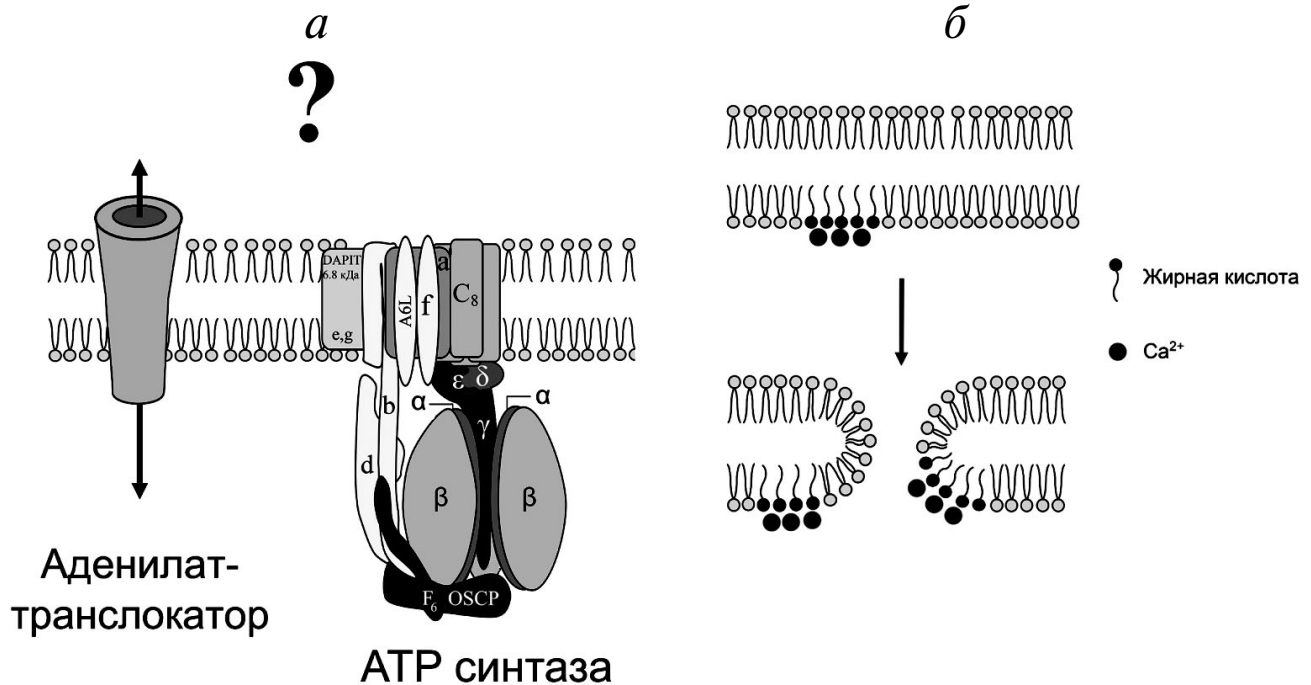


Рис. 3. Митохондриальные поры. *a* – Аденилаттранслокатор и АТФ-синтаза митохондрий как возможные канал-образующие компоненты МРТ поры внутренней мембраны митохондрий; *b* – образование липидной поры, индуцированной пальмитиновой кислотой и Ca²⁺. Взаимодействие Ca²⁺ с жирной кислотой приводит к формированию твердокристаллических мембранных доменов с последующим образованием липидной поры по механизму ламелярного (хемотропного) фазового перехода

влечет за собой и снижение уровня энергетического метаболизма, подавление дыхательной активности и генерации мембранного потенциала [84, 85]. Безусловно, это может являться дополнительным фактором, облегчающим формирование поры в митохондриях даже при отсутствии тех или иных субъединиц.

Таким образом, в настоящее время можно говорить о том, что структура поры до сих пор не установлена. Проведенное в 2015 г. исследование с применением технологии Crispr/Cas9 показало, что из 14-ти белков, которые могут участвовать в формировании МРТ поры, неотъемлемым компонентом является циклофилин Д (также рассматривается SPG7) [76]. Потеря циклофилина Д приводит к значительному увеличению пороговой концентрации Ca^{2+} для открытия поры, однако не к устранению самого открытия. Можно предположить, что в зависимости от тех или иных условий канальным компонентом внутренней мембраны митохондрий может быть любой из белков, взаимодействующих с циклофилином Д.

Несмотря на то, что структура МРТ поры так и не определена, ее роль в физиологии и патологии хорошо установлена. Так, еще в начале 1990-х гг. показано, что ингибитор МРТ поры циклоспорин А способен значительно увеличивать поглощение Ca^{2+} и снижать его выброс изолированными кардиомиоцитами без влияния на клеточную морфологию и жизнеспособность. Установлено, что этот эффект был опосредован митохондриями [87]. Подобные результаты были получены на клетках, нокаутированных по гену *Ppif*, кодирующему циклофилин Д [88]. Bernardi и Patronilli предположили в 1996 г., что именно открытие МРТ поры ответственно за выброс ионов Ca^{2+} из органелл, т.е. МРТ пора может быть неспецифической системой выброса ионов Ca^{2+} из органелл [13]. Гипотеза «МРТ пора как система выброса Ca^{2+} » основана на возможном кратковременном открытии МРТ поры. Многочисленными исследованиями показано, что МРТ пора может существовать в двух состояниях – высоко- и низко-проводимом. Режим открывания МРТ поры: («постоянный» или «кратковременный») зависит от концентрации индуцирующих ее агентов, прежде всего, Ca^{2+} [89]. В поддержку данного предположения получены результаты о Ca^{2+} -индуцированных осцилляциях (« Ca^{2+} волны») в изолированных митохондриях и культуре клеток, которые были ингибированы циклоспорином А [90, 91]. Необходимо отметить, что описанные осцилляции индуцировались также ионами Sr^{2+} , что предполагает участие в этих процессах поры иного типа [92].

Митохондриальная липидная Ca^{2+} -зависимая пора, индуцированная жирными кислотами. Изучение структуры МРТ поры и поиск ее модуляторов позволили показать, что можно подобрать условия, когда циклоспорин А не блокирует набухание органелл. В настоящее время известен ряд соединений, способных индуцировать открытие Ca^{2+} -зависимой поры по механизму, нечувствительному к циклоспорину. К ним относятся экзогенные амфипатические пептиды (например, сигнальные белки), некоторые прооксиданты, гормоны (тироксин), и др. [93]. К таким соединениям также относятся и свободные жирные кислоты.

Способность насыщенных жирных кислот в умеренных концентрациях в присутствии ионов Ca^{2+} индуцировать открытие циклоспорин А-нечувствительной митохондриальной поры была продемонстрирована в начале 2000 гг. [94]. Проведенные нами исследования позволили сделать вывод о новом типе митохондриальной поры – липидной поре. Показано, что насыщенная пальмитиновая кислота связывает Ca^{2+} с высоким сродством и в присутствии этого иона способна пермеабилезировать как природные мембраны (митохондрии разных тканей и плазматическая мембрана эритроцитов), так и искусственные мембраны (БЛМ и липосомы) [95–99]. Последнее исключило возможное участие белков в образовании порового компонента. О том, что пора, индуцируемая пальмитиновой кислотой и Ca^{2+} не является МРТ порой говорит и совершенно другой тип регуляции и, в первую очередь, нечувствительность к циклоспорину А и возможность замены Ca^{2+} на Sr^{2+} [94, 99]. Показано, что в основе механизма образования пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры лежит способность анионов насыщенных жирных кислот образовывать прочные комплексы с Ca^{2+} в липидном бислое с последующей их сегрегацией в твердо-кристаллические мембранные домены и появлением гидрофильных липидных пор [96, 99] (рис. 3, б). Следует отметить важную особенность этой поры (как и любой липидной поры): она способна самопроизвольно «залечиваться», если ее размер не превышает критического значения (для жидкокристаллического бислоя – это 9 нм) [100]. Именно поэтому в экспериментах на митохондриях мы со временем наблюдали восстановление мембранного митохондриального потенциала после индукции поры.

Способность пальмитат/ Ca^{2+} -зависимой поры к самопроизвольному закрытию легла в основу нашего предположения, что данная пора может являться системой выброса ионов Ca^{2+} из органелл. Показано, что в присутствии пальмитиновой кислоты происходит выброс иона Ca^{2+}

из митохондрий, что сопровождается как деполяризацией органелл, так и защелачиванием среды инкубации (т.е. наблюдался своего рода неспецифический $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ обмен). Добавление рутения красного в этих условиях приводило к остановке выброса Ca^{2+} и практически полному восстановлению мембранного потенциала [14, 101]. Это свидетельствует о том, что в данном случае деполяризация митохондрий была связана, прежде всего, с рециркуляцией Ca^{2+} через внутреннюю мембрану, а не с постоянным открытием поры.

Возможность участия липидной поры в рециркуляции ионов $\text{Ca}^{2+}(\text{Sr}^{2+})$ через митохондриальную мембрану была продемонстрирована нами и в отсутствие экзогенной жирной кислоты. Известно, что ионы Ca^{2+} и Sr^{2+} являются активаторами митохондриальной Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 ($\beta 3$ изоформа), которая способна гидролизовать фосфолипиды как по *sn-2*, так и по *sn-1* положению (в *sn-1* положении фосфолипидов находятся преимущественно насыщенные жирные кислоты) [102]. Нами было продемонстрировано, что в гипотонических условиях $\text{Ca}^{2+}(\text{Sr}^{2+})$ запускают циклические циклоспорин-нечувствительные колебания как ионных потоков через внутреннюю мембрану митохондрий, так и колебания объема митохондриального матрикса. Эти колебания подавлялись ингибиторами Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 — ААСОС F_3 , аристолоховой кислотой и трифторперазином, но не ингибиторами Ca^{2+} -независимой фосфолипазы A_2 . Добавление в этих условиях экзогенной пальмитиновой кислоты приводило к восстановлению колебаний ионных потоков через внутреннюю митохондриальную мембрану [14]. Таким образом, полученные результаты послужили доказательством того, что липидная пора, индуцированная насыщенными жирными кислотами и Ca^{2+} , может являться системой выброса двухвалентного иона из митохондрий.

ЗНАЧЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ТРАНСПОРТА ИОНОВ Ca^{2+} ДЛЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КЛЕТКИ

Исследования, посвященные роли Ca^{2+} транспорта в жизнедеятельности клетки, проводят во многих лабораториях мира. Между тем, можно выделить три основных функции, которые выполняют Ca^{2+} -транспортирующие системы митохондрий в клетке — это обеспечение внутриклеточного Ca^{2+} гомеостаза, регуляция энергетического метаболизма митохондрий и запуск процессов клеточной гибели.

Регуляция внутриклеточной концентрации Ca^{2+} является важным механизмом во внутриклеточной сигнализации. Она достигается взаимодействием нескольких органелл, которые поглощают и выбрасывают кальций, что и обеспечивает согласованную и быструю передачу кальциевого сигнала. Митохондрии играют важную роль в этом процессе, являясь основной буферной системой для ионов кальция, своего рода «файберволом» от избыточного увеличения этих ионов в цитоплазме. Они обладают способностью быстро поглощать высокие концентрации кальция из цитоплазмы в митохондриальный матрикс, где этот ион формирует комплексы с неорганическим и другими фосфатами. Многочисленными исследованиями, проведенными на разных типах клеток, показано, что митохондрии способны изменять внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} как локально, так и во всей цитоплазме [29]. Показано, что при выбросе Ca^{2+} из ретикулума при стимуляции IP_3 рецепторов пиковая внутриклеточная концентрация Ca^{2+} ниже в тех клетках, в которых была повышена экспрессия *MCU* [6]. При этом наличие активного митохондриального кальциевого унипортера не является обязательным условием выживания млекопитающих, поскольку нокаут гена канального белка *MCU* в печени или сердце мышей не приводил к каким-либо существенным дефектам этих органов [103]. В то же время животные, нокаутированные по гену *Slc8b1 (NCLX)*, были нежизнеспособны и погибли в течение первых дней после нокаута, что было связано с увеличенным содержанием Ca^{2+} в митохондриях и индукцией МРТ поры [104].

Способность митохондрий участвовать в Ca^{2+} -сигнализации в большой степени зависит от типа клеток. Так, во взрослых кардиомиоцитах Ca^{2+} из цитоплазмы убирается, в основном, с помощью Ca^{2+} АТФазы саркоплазматического ретикулума *SERCA* и обменника *NCX* плазматической мембраны, которые выбрасывают Ca^{2+} из цитоплазмы в 20–60 раз быстрее, чем Ca^{2+} -унипортер митохондрий [105]. В то же время в других немuscle клетках именно поглощение Ca^{2+} митохондриями может играть основную роль в регуляции концентрации иона в цитоплазме. Например, в клетках поджелудочной железы митохондрии способны предотвращать избыточное увеличение концентрации Ca^{2+} в апикальной части цитоплазмы, вызванное инозитол (1,3,5) трифосфатом и, тем самым, регулировать секрецию инсулина [106]. Показано также, что митохондрии являются активным участником кальциевых волн в нервных клетках и молодых кардиомиоцитах, изменяя концентрацию иона локально на ограниченном пространстве цитоплазмы [107, 108].

Аккумуляция кальция митохондриями является важным процессом в регуляции митохондриальной и клеточной энергетики. В митохондриях ионы Ca^{2+} активируют три матриксных фермента – пируватдегидрогеназу, цитратдегидрогеназу и α -кетоглутарат дегидрогеназу, и некоторые комплексы дыхательной цепи [109]. Активация этих систем приводит к увеличению продукции АТФ в митохондриях. Это подтверждается наблюдением, что нокаут мышей по гену *MCU* приводил к переключению энергетического метаболизма нейронов головного мозга на гликолиз и подавлению активности I комплекса дыхательной цепи.

Как было сказано выше, избыточное накопление Ca^{2+} в митохондриях приводит к открытию в органеллах двух типов пор – МРТ поры и липидной, индуцированной жирными кислотами. Неконтролируемая и длительная пермеабилзация митохондриальной мембраны будет приводить к коллапсу мембранного потенциала, разрушению митохондрий, появлению в цитоплазме проапоптотических белков и гибели клетки. Участие циклоспорин А-чувствительной МРТ поры было продемонстрировано в развитии многих патологий, таких как инфаркт, мышечные дистрофии, нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз и боковой амиотрофический склероз), инсульт и др. Показано, что фармакологическая или генетическая модуляция циклофилина D придавала не только устойчивость митохондрий к открытию МРТ поры, но и толерантность к вышеперечисленным патологиям: снижались размеры инфаркта и инсульта, увеличивалась обучаемость животных и т.д. [74].

Подобно негативному влиянию МРТ поры на клетки и органы животных, липидная пора также может участвовать в развитии патологических процессов. Она способствует не только выбросу проапоптотических белков из митохондрий [98, 99], но также участвует в развитии глутамат-индуцированной дегенерации нервных клеток, которая наблюдается при гипоксических повреждениях мозга. В этих условиях длительное поступление Ca^{2+} в клетку через активируемые глутаматом NMDA рецепторы приводит к развитию отсроченной кальциевой дисрегуля-

ции и митохондриальной деполяризации с последующей клеточной гибелью. Данные процессы не всегда подавляются циклоспорином А и могут быть индуцированы при замене Ca^{2+} на Sr^{2+} [110, 111]. Эти свойства позволили нам предположить участие в данном механизме липидной поры, индуцированной жирными кислотами. Показано, что ААСОСF₃, ингибитор Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы А₂, препятствуя появлению жирных кислот в мембране митохондрий и, соответственно, формированию липидной поры, подавлял как циклоспорин А-нечувствительный выброс $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ из изолированных митохондрий мозга, так и развитие глутамат-индуцированной отсроченной Ca^{2+} дисрегуляции и митохондриальной деполяризации нейронов мозжечка [99, 112].

За долгую историю изучения митохондриального транспорта ионов Ca^{2+} достигнут значительный прогресс в понимании механизмов этого процесса и расшифровки молекулярных структур, ответственных за него. Очевидно, что системы, транспортирующие Ca^{2+} через внутреннюю митохондриальную мембрану, важны не только для физиологии клетки (регуляция Ca^{2+} гомеостаза или клеточной энергетики), но и в развитии патологических процессов и клеточной гибели. Следует отметить, что перед исследователями в данной области стоит еще достаточно много задач, к которым можно отнести определение архитектуры Ca^{2+} транспортирующих систем митохондрий и МРТ поры, а также выявление механизмов регуляции и управления этими системами при различных заболеваниях.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 18-315-20011 (главы 1, 5), 19-015-00117 (глава 4)), РФФИ (грант 18-75-00011 (главы 2, 3)), и Министерства образования и науки РФ (госзадание 6.5170.2017/8.9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящий обзор не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deluca, H.F., and Engstrom, G.W. (1961) Calcium uptake by rat kidney mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1744–1750, doi: 10.1073/pnas.47.11.1744.
2. Vasington, F.D., and Murphy, J.V. (1962) Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **237**, 2670–2677.
3. Jiang, D., Zhao, L., and Clapham, D.E. (2009) Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter, *Science*, **326**, 144–147, doi: 10.1126/science.1175145.
4. Palty, R., Silverman, W.F., Hershinkel, M., Caporale, T., Sensi, S.L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-

- Barmatz, V., Herrmann, S., Khananshvil, D., and Sekler, I. (2010) NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 436–441, doi: 10.1073/pnas.0908099107.
5. Perocchi, F., Gohil, V.M., Girgis, H.S., Bao, X.R., McCombs, J.E., Palmer A.E., and Mootha, V.K. (2010) MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake, *Nature*, **467**, 291–296, doi: 10.1038/nature09358.
 6. De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabo, I., and Rizzuto, R. (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter, *Nature*, **476**, 336–340, doi: 10.1038/nature10230.
 7. Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., Kotliansky, V., and Mootha, V.K. (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter, *Nature*, **476**, 341–345, doi: 10.1038/nature10234.
 8. Raffaello, A., De Stefani, D., Sabbadin, D., Teardo, E., Merli, G., Picard, A., Checchetto, V., Moro, S., Szabo, I., and Rizzuto, R. (2013) The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit, *EMBO J.*, **32**, 2362–2376, doi: 10.1038/emboj.2013.157.
 9. Plovanich, M., Bogorad, R.L., Sancak, Y., Kamer, K.J., Strittmatter, L., Li, A.A., Girgis, H.S., Kuchimanchi, S., De Groot, J., Speciner, L., Taneja, N., Oshea, J., Kotliansky, V., and Mootha, V.K. (2013) MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling, *PLoS One* **8**, e55785, doi: 10.1371/journal.pone.0055785.
 10. Mallilankaraman, K., Cardenas, C., Doonan, P.J., Chandramoorthy, H.C., Irrinki, K.M., Golenar, T., Csordas, G., Madireddi, P., Yang, J., Muller, M., Miller, R., Kolesar, J.E., Molgo, J., Kaufman, B., Hajnoczky, G., Foskett, J.K., and Madesh, M. (2012) MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 1336–1343, doi: 10.1038/ncb2622.
 11. Sancak, Y., Markhard, A.L., Kitami, T., Kovacs-Bogdan, E., Kame, K.J., Udeshi, N.D., Carr, S.A., Chaudhuri, D., Clapham, D.E., Li, A.A., Calvo, S.E., Goldberger, O., and Mootha, V.K. (2013) EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex, *Science*, **342**, 1379–1382, doi: 10.1126/science.1242993.
 12. Hoffman, N.E., Chandramoorthy, H.C., Shanmughapriya, S., Zhang, X.Q., Vallem, S., Doonan, P.J., Malliankaraman, K., Guo, S., Rajan, S., Elrod, J.W., Koch, W.J., Cheung, J.Y., and Madesh, M. (2014) SLC25A23 augments mitochondrial Ca²⁺ uptake, interacts with MCU, and induces oxidative stress-mediated cell death, *Mol. Biol. Cell*, **25**, 936–947, doi: 10.1091/mbc.E13-08-0502.
 13. Bernardi, P., and Petronilli, V. (1996) The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **28**, 131–138, doi: 10.1007/BF02110643.
 14. Mironova, G.D., Saris, N.-E.L., Belosludtseva, N.V., Agafonov, A.V., Elantsev, A.B., and Belosludtsev, K.N. (2015) Involvement of palmitate/Ca²⁺(Sr²⁺)-induced pores in the cycling of ions across the mitochondrial membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **1848**, 488–495, doi: 10.1016/j.bbamem.2014.10.027.
 15. Bragadin, M., Pozzan, T., and Azzone, G. (1979) Kinetics of Ca²⁺ carrier in rat liver mitochondria, *Biochemistry*, **18**, 5972–5978, doi: 10.1021/bi00593a033.
 16. Pozzan, T., Bragadin, M., and Azzone, G.F. (1977) Disequilibrium between steady-state Ca²⁺ accumulation ratio and membrane potential in mitochondria. Pathway and role of Ca²⁺ efflux, *Biochemistry*, **16**, 5618–5625, doi: 10.1021/bi00644a036.
 17. Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. (1993) Microdomains with high Ca²⁺ close to IP(3)-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria, *Science*, **262**, 744–747, doi: 10.1126/science.8235595.
 18. Raturi, A., and Simmen, T. (2013) Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM), *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 213–24, doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.04.013.
 19. Giorgi, C., Missiroli, S., Patergnani, S., Duszynski, J., Wieckowski, M.R., and Pinton, P. (2015) Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications, *Antioxid. Redox. Signal.*, **22**, 995–1019, doi: 10.1089/ars.2014.6223.
 20. Poston, C.N., Krishnan, S.C., and Bazemore-Walker, C.R. (2013) In depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM), *J. Proteomics*, **79**, 219–230, doi: 10.1016/j.jprot.2012.12.018.
 21. Szabadkai, G., Bianchi, K., Varnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M.R., Cavagna, D., Nagy, A.I., Balla, T., and Rizzuto, R. (2006) Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels, *J. Cell Biol.*, **175**, 901–911, doi: 10.1083/jcb.200608073.
 22. De Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria, *Nature*, **456**, 605–610, doi: 10.1038/nature07534.
 23. Hirabayashi, Y., Kwon, S.K., Paek, H., Pernice, W.M., Paul, M.A., Lee, J., Erfani, P., Raczowski, A., Petrey, D.S., Pon, L.A., and Polleux, F. (2017) ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca²⁺ dynamics in mammalian neurons, *Science*, **358**, 623–630, doi: 10.1126/science.aan6009.
 24. Chernorudskiy, A.L., and Zito, E. (2017) Regulation of calcium homeostasis by ER redox: a close-up of the ER/mitochondria connection, *J. Mol. Biol.*, **429**, 620–632, doi: 10.1016/j.jmb.2017.01.017.
 25. Giacomello, M., Drago, I., Bortolozzi, M., Scorsetto, M., Gianelle, A., Pizzo, P., and Pozzan, T. (2010) Ca²⁺ hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca²⁺ mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca²⁺ channels, *Mol. Cell*, **38**, 280–290, doi: 10.1016/j.molcel.2010.04.003.
 26. Gunter, T., and Pfeiffer, D. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium, *Am. J. Physiol.*, **258**, 755–786, doi: 10.1152/ajpcell.1990.258.5.C755.
 27. Deryabina, Y.I., Isakova, E.P., and Zvyagilskaya, R.A. (2004) Mitochondrial calcium transport systems: properties, regulation, and taxonomic features, *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 91–102.
 28. Rossi, C.S., Vasington, F.D., and Carafoli, E. (1973) The effect of ruthenium red on the uptake and release of Ca²⁺ by mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 846–852.
 29. De Stefani, D., Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2016) Enjoy the trip: calcium in mitochondria back and forth, *Annu. Rev. Biochem.*, **85**, 161–192, doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034216.
 30. Saris, N.E., and Karafoli, E. (2005) A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 187–194.
 31. Mironova, G.D., Sirota, T.V., Pronevich, L.A., Trofimenko, N.V., Mironov, G.P., Grigorjev, P.A., and Kondrashova, M.N. (1982) Isolation and properties of Ca²⁺-transporting glycoprotein and peptide from beef heart mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **14**, 213–225.
 32. Saris, N.E., Sirota, T.V., Virtanen, I., Niva, K., Penttila, T., Dolgachova, L.P., and Mironova, G.D. (1993) Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by antibodies against a 40-kDa glycoprotein T, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **25**, 307–312, doi: 10.1007/BF00762591.

33. Bick, A.G., Calvo, S.E., and Mootha, V.K. (2012) Evolutionary diversity of the mitochondrial calcium uniporter, *Science*, **336**, 886, doi: 10.1126/science.1214977.
34. Baradaran, R., Wang, C., Siliciano, A.F., and Long, S.B. (2018) Cryo-EM structures of fungal and metazoan mitochondrial calcium uniporters, *Nature*, **559**, 580–584, doi: 10.1038/s41586-018-0331-8.
35. Yoo, J., Wu, M., Yin, Y., Herzik, M.A., Lander, G.C., and Lee, S.Y. (2018) Cryo-EM structure of a mitochondrial calcium uniporter, *Science*, **361**, 506–511, doi: 10.1126/science.aar4056.
36. Fan, C., Fan, M., Orlando, B.J., Fastman, N.M., Zhang, J., Xu, Y., Chambers, M.G., Xu, X., Perry, K., Liao, M., and Feng, L. (2018) X-ray and cryo-EM structures of the mitochondrial calcium uniporter, *Nature*, **559**, 575–579, doi: 10.1038/s41586-018-0330-9.
37. Oxenoid, K., Dong, Y., Cao, C., Cui, T., Sancak, Y., Markhard, A.L., Grabarek, Z., Kong, L., Liu, Z., Ouyang, B., Cong, Y., Mootha, V.K., and Chou, J.J. (2016) Architecture of the mitochondrial calcium uniporter, *Nature*, **533**, 269–273, doi: 10.1038/nature17656.
38. Patron, M., Checchetto, V., Raffaello, A., Teardo, E., Vecellio Reane, D., Mantoan, M., Granatiero, V., Szabo, I., De Stefani, D., and Rizzuto, R. (2014) MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity, *Mol. Cell*, **53**, 726–773, doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.013.
39. Yamamoto, T., Yamagoshi, R., Harada, K., Kawano, M., Minami, N., Ido, Y., Kuwahara, K., Fujita, A., Ozono, M., Watanabe, A., Yamada, A., Terada, H., and Shinohara, Y. (2016) Analysis of the structure and function of EMRE in a yeast expression system, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 831–839, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.019.
40. Vais, H., Mallilankaraman, K., Mak, D., Hoff, H., Payne, R., Tanis, J.E., and Foskett, J.K. (2016) EMRE is a matrix Ca²⁺ sensor that governs gatekeeping of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter, *Cell Rep.*, **14**, 403–410, doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.054.
41. Csordas, G., Golenar, T., Seifert, E.L., Kamer, K.J., Sancak, Y., Perocchi, F., Moffat, C., Weaver, D., de la Fuente Perez, S., Bogorad, R., Koteliensky, V., Adjianto, J., Mootha, V.K., and Hajnoczky, G. (2013) MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter, *Cell Metab.*, **17**, 976–987, doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.020.
42. Kamer, K.J., Sancak, Y., Fomina, Y., Meisel, J.D., Chaudhuri, D., Grabarek, Z., and Mootha, V.K. (2018) MICU1 imparts the mitochondrial uniporter with the ability to discriminate between Ca²⁺ and Mn²⁺, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 7960–7969, doi: 10.1073/pnas.1807811115.
43. Paillard, M., Csordas, G., Szanda, G., Golenar, T., Debattisti, V., Bartok, A., Wang, N., Moffat, C., Seifert, E.L., Spat, A., and Hajnoczky, G. (2017) Tissue-specific mitochondrial decoding of cytoplasmic Ca²⁺ signals is controlled by the stoichiometry of MICU1/2 and MCU, *Cell Rep.*, **18**, 2291–2300, doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.032.
44. Kamer, K.J., Grabarek, Z., and Mootha, V.K. (2017) High-affinity cooperative Ca²⁺ binding by MICU1-MICU2 serves as an on-off switch for the uniporter, *EMBO Rep.*, **18**, 1397–1411, doi: 10.15252/embr.201643748.
45. Payne, R., Hoff, H., Roskowski, A., and Foskett, J.K. (2017) MICU2 restricts spatial crosstalk between InsP3R and MCU channels by regulating threshold and gain of MICU1-mediated inhibition and activation of MCU, *Cell Rep.*, **21**, 3141–3154, doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.064.
46. Paillard, M., Csordas, G., Huang, K.T., Varnai, P., Joseph, S.K., and Hajnoczky, G. (2018) MICU1 interacts with the D-ring of the MCU pore to control its Ca²⁺ flux and sensitivity to Ru360, *Mol. Cell*, **72**, 778–785, doi: 10.1016/j.molcel.2018.09.008.
47. Kroner, H. (1986) Ca²⁺ ions, an allosteric activator of calcium uptake in rat liver mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **251**, 525–535, doi: 10.1016/0003-9861(86)90360-7.
48. Kasparinsky, F.O., and Vinogradov, A.D. (1996) Slow Ca²⁺-induced inactive/active transition of the energy-dependent Ca²⁺ transporting system of rat liver mitochondria: clue for Ca²⁺ influx cooperativity, *FEBS Lett.*, **389**, 293–296, doi: 10.1016/0014-5793(96)00606-0.
49. Basso, E., Rigotto, G., Zucchetti, A.E., and Pozzan, T. (2018) Slow activation of fast mitochondrial Ca²⁺ uptake by cytosolic Ca²⁺, *J. Biol. Chem.*, **293**, 17081–17094, doi: 10.1074/jbc.RA118.002332.
50. Patron, M., Granatiero, V., Espino, J., Rizzuto, R., and De Stefani, D. (2019) MICU3 is a tissue-specific enhancer of mitochondrial calcium uptake, *Cell Death Differ.*, **26**, 179–195, doi: 10.1038/s41418-018-0113-8.
51. Ren, T., Wang, J., Zhang, H., Yuan, P., Zhu, J., Wu, Y., Huang, Q., Guo, X., Zhang, J., Ji, L., Li, J., Zhang, H., Yang, H., and Xing, J. (2018) MCUR1-mediated mitochondrial calcium signaling facilitates cell survival of hepatocellular carcinoma via reactive oxygen species-dependent P53 degradation, *Antioxid. Redox Signal.*, **28**, 1120–1136, doi: 10.1089/ars.2017.6990.
52. Paupe, V., Prudent, J., Dassa, E.P., Rendon, O.Z., and Shoubridge, E.A. (2015) CCDC90A (MCUR1) is a cytochrome c oxidase assembly factor and not a regulator of the mitochondrial calcium uniporter, *Cell. Metab.*, **21**, 109–116, doi: 10.1016/j.cmet.2014.12.004.
53. Tomar, D., Dong, Z., Shanmughapriya, S., Koch, D.A., Thomas, T., Hoffman N.E., Timbalia, S.A., Goldman, S.J., Breves, S.L., Corbally, D.P., Nemani, N., Fairweather, J.P., Cutri, A.R., Zhang, X., Song, J., Jana, F., Huang, J., Barrero, C., Rabinowitz, J.E., Luongo, T.S., Schumacher, S.M., Rockman, M.E., Dietrich, A., Merali, S., Caplan, J., Stathopoulos, P., Ahima, R.S., Cheung, J.Y., Houser, S.R., Koch, W.J., Patel, V., Gohil, V.M., Elrod, J.W., Rajan, S., and Madesh, M. (2016) MCUR1 is a scaffold factor for the MCU complex function and promotes mitochondrial bioenergetics, *Cell. Rep.*, **15**, 1673–1685, doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.050.
54. Sparagna, G.C., Gunter, K.K., Sheu, S.S., and Gunter, T.E. (1995) Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode, *J. Biol. Chem.*, **270**, 27510–27515, doi: 10.1074/jbc.270.46.27510.
55. Wei, A.C., Liu, T., Winslow, R.L., and O'Rourke, B. (2012) Dynamics of matrix-free Ca²⁺ in cardiac mitochondria: two components of Ca²⁺ uptake and role of phosphate buffering, *J. Gen. Physiol.*, **139**, 465–478, doi: 10.1085/jgp.201210784.
56. Beutner, G., Sharma, V.K., Giovannucci, D.R., Yule, D.I., and Sheu, S.S. (2001) Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **276**, 21482–21488, doi: 10.1074/jbc.M101486200.
57. Waldeck-Weiermair, M., Jean-Quartier, C., Rost, R., Khan, M.J., Vishnu, N., Bondarenko, A.I., Imamura, H., Malli, R., and Graier, W.F. (2011) Leucine zipper EF-hand-containing transmembrane protein 1 (Letm1) and uncoupling proteins 2 and 3 (UCP2/3) contribute to two distinct mitochondrial Ca²⁺ uptake pathways, *J. Biol. Chem.*, **286**, 28444–28455, doi: 10.1074/jbc.M111.244517.
58. Lin, Q.T., and Stathopoulos, P.B. (2019) Molecular mechanisms of leucine zipper EF-hand containing transmembrane protein-1 function in health and disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 286, doi: 10.3390/ijms20020286.
59. Brookes, P.S., Parker, N., Buckingham, J.A., Vidal-Puig, A., Halestrap, A.P., Gunter, T.E., Nicholls, D.G., Bernardi, P.,

- Lemasters, J.J., and Brand, M.D. (2008) UCPs-unlikely calcium porters, *Nat. Cell Biol.*, **10**, 1235–1237, doi: 10.1038/ncb1108-1235.
60. Wingrove, D.E., and Gunter, T.E. (1986) Kinetics of mitochondrial calcium transport. I. Characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism of liver mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **261**, 15159–15165.
61. Wingrove, D.E., and Gunter, T.E. (1986) Kinetics of mitochondrial calcium transport. II. A kinetic description of the sodium-dependent calcium efflux mechanism of liver mitochondria and inhibition by ruthenium red and by tetraphenylphosphonium, *J. Biol. Chem.*, **261**, 15166–15171.
62. Marinelli, F., Almagor, L., Hiller, R., Giladi, M., Khananshvil, D., and Faraldo Gomez, J.D. (2014) Sodium recognition by the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the outward-facing conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 5354–5362, doi: 10.1073/pnas.1415751111.
63. Tsai, M.F., Jiang, D., Zhao, L., Clapham, D., and Miller, C. (2014) Functional reconstitution of the mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter Letm1, *J. Gen. Physiol.*, **143**, 67–73, doi: 10.1085/jgp.201311096.
64. Khananshvil, D. (2013) The SLC8 gene family of sodium-calcium exchangers (NCX): structure, function, and regulation in health and disease, *Mol. Aspects Med.*, **34**, 220–235, doi: 10.1016/j.mam.2012.07.003.
65. Palty, R., Ohana, E., Hershfinkel, M., Volokita, M., Elgazar, V., Beharier, O., Silverman, W.F., Argaman, M., and Sekler, I. (2004) Lithium–calcium exchange is mediated by a distinct potassium-independent sodium–calcium exchanger, *J. Biol. Chem.*, **279**, 25234–25240, doi: 10.1074/jbc.M401229200.
66. Zhang, Y.L., and Lipton, P. (1999) Cytosolic Ca²⁺ changes during in vitro ischemia in rat hippocampal slices: major roles for glutamate and Na⁺-dependent Ca²⁺ release from mitochondria, *J. Neurosci.*, **19**, 3307–3315, doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-09-03307.1999.
67. Kim, B., and Matsuoka, S. (2008) Cytoplasmic Na⁺-dependent modulation of mitochondrial Ca²⁺ via electrogenic mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange, *J. Physiol. (Lond.)*, **586**, 1683–1697, doi: 10.1113/jphysiol.2007.148726.
68. Samanta, K., Mirams, G.R., and Parekh, A.B. (2018) Sequential forward and reverse transport of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger generates Ca²⁺ oscillations within mitochondria, *Nat. Commun.*, **9**, 156, doi: 10.1038/s41467-017-02638-2.
69. Palty, R., and Sekler, I. (2012) The mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger, *Cell Calcium*, **52**, 9–15, doi: 10.1016/j.ceca.2012.02.010.
70. Liao, J., Li, H., Zeng, W., Sauer, D.B., Belmares, R., and Jiang, Y. (2012) Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger, *Science*, **335**, 686–690, doi: 10.1126/science.1215759.
71. Liao, J., Marinelli, F., Lee, C., Huang, Y., Faraldo-Gomez, J.D., and Jiang, Y. (2016) Mechanism of extracellular ion exchange and binding-site occlusion in a sodium/calcium exchanger, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 590–599, doi: 10.1038/nsmb.3230.
72. Hunter, D., and Haworth, R. (1979) The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms, *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 453–459, doi: 10.1016/0003-9861(79)90371-0.
73. Zoratti, M., and Szabo, I. (1995) Mitochondrial permeability transition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 139–76, doi: 10.1016/0304-4157(95)00003-A.
74. Briston, T., Selwood, D.L., Szabadkai, G., and Duchon, M.R. (2019) Mitochondrial permeability transition: a molecular lesion with multiple drug targets, *Trends Pharmacol. Sci.*, **40**, 50–70, doi: 10.1016/j.tips.2018.11.004.
75. Crompton, M., Ellinger, H., and Costi A. (1988) Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress, *Biochem. J.*, **255**, 357–360.
76. Shanmughapriya, S., Rajan, S., Hoffman, N.E., Higgins, A.M., Tomar, D., Nemani, N., Hines, K.J., Smith, D.J., Eguchi, A., Vallem, S., Shaikh, F., Cheung, M., Leonard, N.J., Stolakis, R.S., Wolfers, M.P., Ibeti, J., Chuprun, J.K., Jog, N.R., Houser, S.R., Koch, W.J., Elrod, J.W., and Madesh, M. (2015) SPG7 is an essential and conserved component of the mitochondrial permeability transition pore, *Mol. Cell*, **60**, 47–62, doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.009.
77. Galat, A. (1993) Peptidyleproline *cis-trans*-isomerases: immunophilins, *Eur. J. Biochem.*, **216**, 689–707, doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18189.x.
78. Kokoszka, J., Waymire, K., Levy, S., Sligh, J., Gai, J., Jones, D., MacGregor, G., and Wallace, D. (2004) The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore, *Nature*, **427**, 461–465, doi: 10.1038/nature02229.
79. Leung, A.W., Varanyuwatana, P., and Halestrap, A.P. (2008) The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition, *J. Biol. Chem.*, **283**, 26312–26323, doi: 10.1074/jbc.M805235200.
80. Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G.D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabo, I., Lippe, G., and Bernardi, P. (2013) Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5887–5892, doi: 10.1073/pnas.1217823110.
81. Bonora, M., Bononi, A., De Marchi, E., Giorgi, C., Lebedzinska, M., Marchi, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Suski, J.M., Wojtala, A., Wieckowski, M.R., Kroemer, G., Galluzzi, L., and Pinton, P. (2013) Role of the c-subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition, *Cell Cycle*, **12**, 674–683, doi: 10.4161/cc.23599.
82. Carraro, M., Giorgio, V., Pileikytė, J., Sartori, G., Forte, M., Lippe, G., Zoratti, M., Szabo, I., and Bernardi, P. (2014) Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition, *J. Biol. Chem.*, **289**, 15980–15985, doi: 10.1074/jbc.C114.559633.
83. Zhou, W., Marinelli, F., Nief, C., and Faraldo-Gomez, J.D. (2017) Atomistic simulations indicate the c-subunit ring of the F1Fo ATP synthase is not the mitochondrial permeability transition pore, *Elife*, **6**, e23781, doi: 10.7554/eLife.23781.
84. He, J., Ford, H.C., Carroll, J., Ding, S., Fearnley, I.M., and Walker, J.E. (2017) Persistence of the mitochondrial permeability transition in the absence of subunit c of human ATP synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 3409–3414, doi: 10.1073/pnas.1702357114.
85. He, J., Carroll, J., Ding, S., Fearnley, I.M., and Walker, J.E. (2017) Permeability transition in human mitochondria persists in the absence of peripheral stalk subunits of ATP synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 9086–9091, doi: 10.1073/pnas.1711201114.
86. Campanella, M., Casswell, E., Chong, S., Farah, Z., Wieckowski, M.R., Abramov, A.Y., Tinker, A., and Duchon, M.R. (2008) Regulation of mitochondrial structure and function by the F₁F₀-ATPase inhibitor protein, IF1, *Cell Metab.*, **8**, 13–25, doi: 10.1016/j.cmet.2008.06.001.
87. Altschuld, R.A., Hohl, C.M., Castillo, L.C., Garleb, A.A., Starling, R.C., and Brierley, G.P. (1992) Cyclosporin inhibits mitochondrial calcium efflux in isolated adult rat ventricular cardiomyocytes, *Am. J. Physiol.*, **262**, 1699–1704, doi: 10.1152/ajpheart.1992.262.6.H1699.

88. Elrod, J.W., Wong, R., Mishra, S., Vagnozzi, R.J., Sakthivel, B., Goonasekera, S.A., Karch, J., Gabel, S., Farber, J., Force, T., Brown, J.H., Murphy, E., and Molkenkin, J.D. (2010) Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca^{2+} exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice, *J. Clin. Invest.*, **120**, 3680–3687, doi: 10.1172/JCI43171.
89. Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P., and Di Lisa, F. (1999) Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence, *Biophys. J.*, **76**, 725–734, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77239-5.
90. Ichas, F., Jouaville, L.S., Sidash, S.S., Mazat, J.-P., and Holmuhamedov, E.L. (1994) Mitochondrial calcium spiking: a transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signaling, *FEBS Lett.*, **348**, 211–215, doi: 10.1016/0014-5793(94)00615-6.
91. Evtodienko, Yu.V., Teplova, V., Khawaja, J., and Saris, N.-E.L. (1994) The Ca^{2+} -induced permeability transition pore is involved in Ca^{2+} -induced mitochondrial oscillations. A study on permeabilised Ehrlich ascites tumour cells, *Cell Calcium*, **15**, 143–152, doi: 10.1016/0143-4160(94)90053-1.
92. Холмухамедов Э.Л., Теплова В.В., Чухлова Э.А. (1991) Возбудимость внутренней мембраны митохондрий. II. Обратимый Sr^{2+} -индуцированный выход Sr^{2+} из митохондрий, *Биологические мембраны*, **8**, 612–2620.
93. Zoratti, M., Szabo, I., and De Marchi, U. (2005) Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim. Biophys. Acta*, **1706**, 40–252, doi: 10.1016/j.bbabi.2004.10.006.
94. Sultan, A., and Sokolove, P. (2001) Palmitic acid opens a novel cyclosporin A-insensitive pore in the inner mitochondrial membrane, *Arch. Biochem. Biophys.*, **386**, 31–21, doi: 10.1006/abbi.2000.2194.
95. Mironova, G.D., Gateau-Roesch, O., Lévrat, C., Gritsenko, E., Pavlov, E., Lazareva, A.V., Limarenko, E., Rey, P., Louisot, P., and Saris, N.-E.L. (2001) Palmitic and stearic acids bind Ca^{2+} with high affinity and form non-specific channels in black-lipid membranes. Possible relation to Ca^{2+} -activated mitochondrial pores, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 319–331, doi: 10.1023/A:1010659323937.
96. Agafonov, A., Gritsenko, E., Belosludtsev, K., Kovalev, A., Gateau-Roesch, O., Saris, N.-E.L., and Mironova, G.D. (2003) A permeability transition in liposomes induced by the formation of Ca^{2+} /palmitic acid complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1609**, 153–160, doi: 10.1016/S0005-2736(02)00666-1.
97. Belosludtsev, K. N., Trudovishnikov, A.S., Belosludtseva, N.V., Agafonov, A.V., and Mironova, G.D. (2010) Palmitic acid induces the opening of a Ca^{2+} -dependent pore in the plasma membrane of red blood cells: the possible role of the pore in erythrocyte lysis, *J. Membr. Biol.*, **237**, 13–19, doi: 10.1007/s00232-010-9302-1.
98. Belosludtsev, K., Saris, N.-E., Andersson, L., Belosludtseva, N., Agafonov, A., Sharma, A. Moshkov, D.A., and Mironova, G.D. (2006) On the mechanism of palmitic acid-induced apoptosis: role of pore induced by palmitic acid and Ca^{2+} in mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **38**, 113–120, doi: 10.1007/s10863-006-9010-9.
99. Белослудцев К.Н., Миронова Г.Д. (2012) Митохондриальная липидная пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированная пора и ее возможная роль в деградации нервных клеток, *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, **3**, 20–232.
100. Антонов В.Ф., Шевченко Е.В. (1995) Липидные поры и стабильность клеточных мембран, *Вестн. РАМН*, **10**, 48–255.
101. Mironova, G.D., Belosludtsev, K.N., Belosludtseva, N.V., Gritsenko, E.N., Khodorov, B.I., and Saris, N.-E. (2007) Mitochondrial Ca^{2+} cycle mediated by the palmitate-activated cyclosporine A-insensitive pore, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **39**, 167–174, doi: 10.1007/s10863-007-9079-9.
102. Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T., and Yamamoto, K. (2011) Recent progress in phospholipase A_2 research: from cells to animals to humans, *Prog. Lipid. Res.*, **50**, 152–192, doi: 10.1016/j.plipres.2010.12.001.
103. Holmstrom, K.M., Pan, X., Liu, J.C., Menazza, S., Liu, J., Nguyen, T.T., Pan, H., Parks, R.J., Anderson, S., Noguchi, A., Springer, D., Murphy, E., and Finkel, T. (2015) Assessment of cardiac function in mice lacking the mitochondrial calcium uniporter, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **85**, 178–182, doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.05.022.
104. Luongo, T.S., Lambert, J.P., Gross, P., Nwokedi, M., Lombardi, A.A., Shanmughapriya, S., Carpenter, A.C., Kolmetzky, D., Gao, E., van Berlo, J.H., Tsai, E.J., Molkenkin, J.D., Chen, X., Madesh, M., Houser, S.R., and Elrod, J.W. (2017) The mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger is essential for Ca^{2+} homeostasis and viability, *Nature*, **545**, 93–97, doi: 10.1038/nature22082.
105. Bers, D.M. (2002) Cardiac excitation–contraction coupling, *Nature*, **415**, 198–205, doi: 10.1038/415198a.
106. Tinel, H., Cancela, J.M., Mogami, H., Gerasimenko, J.V., Gerasimenko, O.V., Tepikin, A.V., and Petersen, O.H. (1999) Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule prevent spreading of inositol triphosphate-evoked local cytosolic Ca^{2+} signals, *EMBO J.*, **18**, 4999–5008, doi: 10.1093/emboj/18.18.4999.
107. Billups, B., and Forsythe, I.D. (2002) Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses, *J. Neurosci.*, **22**, 5840–5847, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2002-02.2002.
108. Drago, I., De Stefani, D., Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2012) Mitochondrial Ca^{2+} uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca^{2+} peaks in cardiomyocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 12986–12991, doi: 10.1073/pnas.1210718109.
109. Denton, R.M. (2009) Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1309–1316, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.01.005.
110. Khodorov, B. (2004) Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **86**, 279–351, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.00.
111. Bolshakov, A.P., Mikhailova, M.M., Szabadkai, G., Pinelis, V.G., Brustovetsky, N., Rizzuto, R., and Khodorov, B.I. (2008) Measurements of mitochondrial pH in cultured cortical neurons clarify contribution of mitochondrial pore to the mechanism of glutamate-induced delayed Ca^{2+} deregulation, *Cell Calcium*, **43**, 602–614, doi: 10.1016/j.ceca.2007.10.005.
112. Mironova, G.D., Belosludtsev, K.N., Surin, A.M., Trudovishnikov, A.S., Belosludtseva, N.V., Pinelis, V.G., Krasilnikova, I.A., and Khodorov, B.I. (2012) Mitochondrial lipid pore in the mechanism of glutamate-induced calcium deregulation of brain neurons, *Biologicheskoe Membrany*, **6**, 45–55, doi: 10.1134/S1990747811060080.

**MITOCHONDRIAL Ca²⁺ TRANSPORT: MECHANISMS,
MOLECULAR STRUCTURES, AND A SIGNIFICANCE
FOR CELLS****K. N. Belosludtsev^{1,2*}, M. V. Dubinin¹, N. V. Belosludtseva²,
and G. D. Mironova²**¹ *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy
of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia;
E-mail: bekonik@gmail.com*² *Mari State University, 424000 Yoshkar-Ola, Russia*

Received February 19, 2019

Revised March 18, 2019

Accepted March 19, 2019

Mitochondria are one of the most important cell organelles involved in the regulation of intracellular calcium homeostasis. In the past decade, a number of molecular structures that are responsible for the mitochondrial calcium transport and the formation of mitochondrial pores have been identified, including mitochondrial Ca²⁺ uniporter, Na⁺/Ca²⁺ exchanger, and Ca²⁺/H⁺ antiporter. This review considers data on their structure, regulation, and physiological role. The pathophysiological mechanism of Ca²⁺ transport provided by the cyclosporin A-sensitive mitochondrial permeability transition pore is discussed. An alternative mechanism for the formation of mitochondrial pore, namely the lipid pore induced by fatty acids, as well as its role in Ca²⁺ transport, is described in detail.

Keywords: mitochondria, Ca²⁺ transport, MCU, NCLX, MPT pore, mitochondrial lipid pore