

ПРИНЦИПЫ ФОРМИРОВАНИЯ КАЛЬЦИЕВОГО СИГНАЛА В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТ

© 2020 г. С. Б. Семенова*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: svsem@incras.ru

Поступила в редакцию 23.05.2020 г.

После доработки 05.06.2020 г.

Принята к публикации 08.06.2020 г.

Ионизированный кальций (Ca^{2+}) является универсальным сигнальным посредником, участвующим в передаче внеклеточного сигнала к внутриклеточным структурам и молекулам. С помощью Ca^{2+} обеспечивается регуляция множества клеточных процессов, включая транскрипцию генов, пролиферацию, дифференцировку, секрецию и апоптоз. Причина столь множественных ответов клетки кроется в сложной пространственно-временной организации подъема внутриклеточного Ca^{2+} (Ca^{2+} -сигнала), который, действуя на определенные эффекторы, инициирует конкретные сигнальные события в клетке. Когда нарушаются механизмы, ответственные за регулирование внутриклеточного Ca^{2+} , либо возникает чрезмерная стимуляция рецепторов, клетка погибает. В обзорной статье рассмотрены главные механизмы, лежащие в основе клеточного формирования Ca^{2+} -сигналов. Представлена краткая ретроспектива развития современных представлений о Ca^{2+} -сигнализации и ее роли в жизнедеятельности организма. Специальное внимание уделено основным внутриклеточным системам, обеспечивающим формирование, пространственно-временную регуляцию и кодирование Ca^{2+} -сигналов.

Ключевые слова: Ca^{2+} -сигнализация, Ca^{2+} -микродомены, рецепторы InsP_3R , RyR и NAADP , Ca^{2+} -каналы VOCs , TRP , CRAC

DOI: 10.31857/S0041377120090047

Ключевой принцип передачи Ca^{2+} -сигналов заключается в том, что изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) приводит к формированию клеточного ответа (Berridge et al., 2000). В нестимулированных клетках $[\text{Ca}^{2+}]_i$ поддерживается на уровне около 100 нМ. Стимуляция клеток гормонами, нейротрансмиттерами, факторами роста, антителами, механическими, электрическими, температурными и другими раздражителями существенно повышает уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Увеличение Ca^{2+} является стимулом для активации широкого спектра клеточных процессов, включая генерацию и передачу нервных импульсов, мышечное сокращение, секрецию, транскрипцию генов, пролиферацию клеток. Установлено, что $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в стимулированных клетках может достигать пиковых

уровней в 0.5–1 мкМ. Достигнутый уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ зависит от характера стимула, его концентрации, интенсивности, продолжительности, от присутствия Ca^{2+} -связывающих белков (Schwaller, 2010) и работы митохондрий (Wacquier et al., 2019). Суммарный подъем $[\text{Ca}^{2+}]_i > 1$ мкМ считается превышением физиологического диапазона и, как правило, связан с повреждением клеток.

Сверхпороговые повышения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ могут привести к губительным для клетки эффектам, особенно, если они сохраняются в течение продолжительного времени. В этот период может происходить запуск активации Ca^{2+} -зависимых протеаз, продукция активных форм кислорода, ремоделирование органелл и изменение проницаемости митохондрий (Oggenius et al., 2003). Ионы Ca^{2+} вовлечены в многочисленные патологии (Pargys, Bultynck, 2018), а также в процессы, лежащие в основе естественного старения клеток (Verkhatsky, 2019). Нарушение регуляции передачи Ca^{2+} -сигналов связывают с развитием таких заболеваний как рак (Roderick, Cook, 2008) и сердечная недостаточность (Goonasekera, Molkentin, 2012).

Таким образом, с одной стороны, Ca^{2+} является динамическим и универсальным сигналом (Clapham, 2007), с другой стороны, в зависимости от concentra-

Принятые сокращения: СР – саркоплазматический ретикулум; ЭР – эндоплазматический ретикулум; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – концентрация свободного Ca^{2+} в цитозоле; CRAC – каналы, активируемые опустошением Ca^{2+} -депо (Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} -channels); InsP_3R – рецептор инозитол 1,4,5-трифосфата; NAADP – адениндинуклеотидфосфат никотиновой кислоты; NCX – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник; PMCA – Ca^{2+} -АТФаза плазматической мембраны; RyR – рианодиновый рецептор; SERCA – Ca^{2+} -АТФаза внутриклеточных мембран; TRP – рецептор переходного потенциала (transient receptor potential); VOC – потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы.

ции (слишком большая или слишком маленькая), влияет на поведение и судьбу клетки (Giorgi et al., 2018).

Настоящий обзор посвящен анализу и обобщению устоявшихся научных данных, касающихся механизмов, участвующих в сложной системе формирования и контроля Ca^{2+} -сигналов в живых клетках.

ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ Ca^{2+} -СИГНАЛИЗАЦИИ

Важность ионов Ca^{2+} в проведении сигнала от поверхностных рецепторов внутрь клетки впервые была обнаружена Сиднеем Рингером с коллегами (Ringer, Buxton, 1887). В их работе довольно систематически была изучена роль Ca^{2+} в функционировании тканей и органов живых организмов. Проведенные исследования показали, что Ca^{2+} имеет решающее значение для сокращения сердца (Ringer, 1883) и скелетной мышцы лягушки (Ringer, Buxton, 1887), для оплодотворения яиц и развития головастика (Ringer, Sainsbury, 1894). Много позднее появилась серия открытий, подтвердивших необходимость свободного Ca^{2+} для сокращения скелетных мышц (Ebashi, Ebashi, 1964). Было обнаружено, что вызванное Ca^{2+} сокращение клеток связано с сократительным белком тропонином С. Кроме того, было показано, что свободный Ca^{2+} может быть быстро секвестрирован саркоплазматическим ретикуломом (СР). Эти исследования привели к пониманию того, что величина Ca^{2+} -сигнала внутри клеток может меняться. Значение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ может увеличиваться, приводя к активации конкретного эффектора, а затем уменьшаться, давая возможность системе реагировать на следующий стимул.

Позднее, когда появился метод патч-кламп и чувствительные к ионам Ca^{2+} флуоресцентные индикаторы, произошел настоящий прорыв в области исследования Ca^{2+} -сигнализации. Так, техника патч-кламп, изобретенная Нейером и Сакманом (Neher, Sakmann, 1976; Neher et al., 1978), увенчала почти 20-летний поиск методов детектирования ионных токов, протекающих по одиночным каналам. За короткое время метод распространился по всему миру и стал основным инструментом современной клеточной физиологии.

Примерно в то же время, когда появился метод патч-кламп, физиологические исследования были существенно усилены появлением флуоресцентных индикаторов ионов Ca^{2+} . Открытие Ca^{2+} -чувствительного люминесцентного белка экворина (aequorin) (Shimomura et al., 1962) сыграло важную роль в первых реальных записях цитозольного Ca^{2+} , выполненных на гигантских мышечных волокнах усоногих раков *Balanus nubilus* (Ridgway, Ashley, 1967). Однако высокая травматичность клеток, связанная с условиями введения белкового зонда, и

низкая интенсивность флуоресценции не позволили методу получить широкое распространение.

Эти проблемы были решены, когда был разработан первый флуоресцентный Ca^{2+} -зонд квин-2 (quin-2). Особенно важно, что этот новый зонд имел проницаемую для мембраны, ацетометилэфирную форму (Tsien, 1981). С этого времени появилась возможность легко загружать в клетку флуоресцентный краситель и избегать разрушения водорастворимого флуоресцентного компонента. Однако реальный прорыв пришелся на второе поколение флуоресцентных Ca^{2+} -индикаторов, таких как Fura-2 и Indo-1, которые имели гораздо лучшие характеристики, чем quin-2 и могли использоваться в более низких концентрациях (Grynkiewicz et al., 1985; Tsien, 1988).

И, наконец, в последние годы появился концептуально новый класс клеточных индикаторов Ca^{2+} , основанных на вариантах флуоресцентных белков с различными спектральными свойствами (Zhang et al., 2002). Эти зонды появились в результате принципиально нового подхода к изучению проблемы, суть которого состоит в том, что зонды могут быть экспрессированы в живых клетках, как *in vitro*, так и *in vivo*, и их экспрессия может контролироваться индуцируемыми промоторами. Эти новые флуоресцентные индикаторы могут быть также использованы для измерения Ca^{2+} во внутриклеточных оргanelлах (Pozzan et al., 2003; Tsien, 2003).

В целом, появление метода патч-кламп и универсальных внутриклеточных индикаторов Ca^{2+} позволили проводить измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и трансмембранных потоков Ca^{2+} с большой точностью и высоким разрешением. Эти методы привели к новому пониманию сложных механизмов Ca^{2+} -сигнализации в клетках живых организмов.

ЛОКАЛЬНЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ СИГНАЛЫ

Известно, что свободный Ca^{2+} воспринимается клеткой, как сигнал, когда его концентрация в цитозоле (обычно очень низкая в покое — около 100 нМ) повышается. Как правило, стимуляция клеток приводит к резкому росту $[\text{Ca}^{2+}]_i$ вокруг мест расположения активированных Ca^{2+} -каналов. Области высокой концентрации Ca^{2+} вокруг таких каналов имеют различные сигнальные функции (Barak, Parekh, 2019). Их часто называют “сигнальные Ca^{2+} -микродомены”, иногда в литературе используют термины “горячие Ca^{2+} -точки”, “локальные Ca^{2+} -сигналы” или “ Ca^{2+} -вспышки”. Высокая способность цитоплазмы связывать ионы Ca^{2+} и очень низкая скорость диффузии Ca^{2+} (10–50 $\text{мкм}^2/\text{с}$) в пределах клетки (Allbritton, 1992), с одной стороны, и способность субклеточных структур поглощать и высвобождать Ca^{2+} , с другой стороны, а также кластеризация Ca^{2+} -каналов в дискретных мембранных доме-

нах, по-видимому, обеспечивают условия для генерации локальных Ca^{2+} -сигналов.

Локальные Ca^{2+} -сигналы, как установлено, возникают при открывании пространственно-ограниченной группы Ca^{2+} -каналов (Parker, Ivorra, 1990). Низко аффинный мутант экворина помог установить, что в синапсе гигантских аксонов кальмара во время разряда потенциала действия $[Ca^{2+}]_i$ на пике в горячих точках достигает значений порядка 200–300 мкМ (Linás et al., 1992). Кроме того, было установлено, что значения $[Ca^{2+}]_i$ вблизи каналов в синаптических терминалах биполярных клеток сетчатки достигают 100–200 мкМ (Heidelberger et al., 1994). Генерирование локальных горячих точек в устье Ca^{2+} -каналов критически контролирует ряд различных клеточных функций, среди них наиболее исследованной является секреция нейромедиаторов в синаптическую щель (Felmy et al., 2003).

Однако экзоцитоз не единственное физиологическое событие, которое зависит от амплитуды горячих Ca^{2+} -точек, возникающих вблизи Ca^{2+} -каналов. Модуляция самих Ca^{2+} -каналов также зависит от амплитуды локального Ca^{2+} -сигнала в устье самого канала (Findlay, 2004). Кроме того, локальные Ca^{2+} -сигналы могут активировать Ca^{2+} -чувствительные K^+ -каналы плазматической мембраны в клетках гладких мышц, приводя к их гиперполяризации и расслаблению – эффекту, противоположному тому, который вызывается глобальным повышением $[Ca^{2+}]_i$ и выражается в сокращении миофиламентов (Petkov et al., 2001).

По мере увеличения расстояния от активного канала $[Ca^{2+}]_i$ резко падает из-за рассеяния в результате диффузии и связывания со специфическими белками (Thul, Falcke, 2004). Поэтому некоторые Ca^{2+} -чувствительные эффекторы локализируются очень близко к Ca^{2+} -каналам, обеспечивая возможность для реализации быстрых и специфических клеточных ответов. Другие эффекторы, в зависимости от их чувствительности к Ca^{2+} , могут располагаться дальше (Berridge, 2006). Специфическая архитектура клетки обеспечивает условия для того, чтобы необходимый Ca^{2+} -сигнал попадал в определенное время в нужное место. Однако для индукции физиологического ответа клетке требуется слияние элементарных Ca^{2+} -событий в глобальный Ca^{2+} -сигнал.

ГЛОБАЛЬНЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ СИГНАЛЫ

Устойчивое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ является энергетически невыгодным для клетки, поскольку для этого необходим постоянный энергозависимый транспорт Ca^{2+} . Кроме того, продолжительное повышение Ca^{2+} может привести к негативным для клетки эффектам. Поэтому клетки часто используют энергетически более выгодные колебательные (осцилли-

рующие) Ca^{2+} -сигналы, с широким частотным спектром для передачи информации. Считается, что в системах, использующих сигнализацию с частотным кодированием точность воспроизведения выше, чем там, где сигнал передается в виде градиентных изменений амплитуды (Berridge, 1997). Кроме того, клетки имеют механизмы для декодирования и реагирования на кратковременное увеличение Ca^{2+} , предпочитаемая их устойчивым Ca^{2+} -сигналам (Hajnóczky et al., 1995).

Характер Ca^{2+} -колебаний может варьировать между клетками различных типов или даже между клетками в пределах одного типа в зависимости от стимула. Но в большинстве случаев Ca^{2+} -колебания представляют собой кратковременное увеличение $[Ca^{2+}]_i$, которое длится несколько секунд, достигая максимальных значений, а затем возвращается к исходной $[Ca^{2+}]_i$ в покое.

Алгоритм клеточного генерирования колебаний Ca^{2+} до сих пор не вполне ясен. Особенно это касается ситуаций, когда интервалы времени между последовательными увеличениями $[Ca^{2+}]_i$ составляют несколько десятков секунд или даже минут (Skupin et al., 2008). В стимулированных гормонами клетках Ca^{2+} -осцилляции чаще всего связывают с работой кластеров рецепторов инозитол 1,4,5-трифосфата ($InsP_3R$), активация которых критически зависит от уровня $[Ca^{2+}]_i$ (Prole, Taylor, 2019). Фактически, иницирование и распространение глобального Ca^{2+} -сигнала зависит от совокупного накопления Ca^{2+} -сигналов, поскольку рост $[Ca^{2+}]_i$ в клетке сенситизирует соседние рецепторы, увеличивая тем самым вероятность возникновения Ca^{2+} -сигналов и их последующее слияние в распространяющиеся Ca^{2+} -волны (Marchant et al., 1999).

Ранее было продемонстрировано, что частота колебаний $[Ca^{2+}]_i$ в клетке (Rooney et al., 1989) и последующие клеточные ответы (Dolmetsch et al., 1998) пропорциональны концентрации применяемого стимула. Соответственно, передача Ca^{2+} -сигналов может рассматриваться как информация, представленная в частотно-кодированном виде, когда последовательные импульсы цитозольного Ca^{2+} вызывают кумулятивный клеточный ответ (Roy, Cyert, 2019).

В основе огромной изменчивости характеристик Ca^{2+} -сигналов, необходимых для обеспечения конкретных функций в клетках разных типов лежит большое разнообразие белков, транспортирующих Ca^{2+} . Ни один из двух разных типов клеток не экспрессирует одинаковый набор проводников Ca^{2+} , в результате чего клетки разных типов имеют уникальную Ca^{2+} -сигнализацию, соответствующую их физиологии (Berridge et al., 2003). Например, сердечным миоцитам человека необходим быстрый подъем $[Ca^{2+}]_i$ в клетке, чтобы каждую секунду поддерживать сердечно-мышечное сокращение (Bers, 2002).

Эти быстрые Ca^{2+} -сигналы возникают в результате входа Ca^{2+} через потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны и выхода Ca^{2+} из СР через рианодиновые рецепторы (Fearnley et al., 2011). Напротив, в электрически невозбудимых клетках возникают достаточно медленные Ca^{2+} -колебания, которые зависят от выброса Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула (ЭР) в результате активации InsP_3R и входа Ca^{2+} через каналы TRP или CRAC, расположенные в плазматической мембране клеток. Такие медленные осцилляции Ca^{2+} необходимы для контроля экспрессии генов или обеспечения клеточного метаболизма (Dupont et al., 2011).

Даже незначительных изменений в передаче Ca^{2+} -сигналов достаточно, чтобы вызвать драматические или патологические эффекты в клетке. Так, при чрезмерном усилении Ca^{2+} -сигнализации в миоцитах нарушается транскрипция генов, приводящая к патологической гипертрофии сердца (Higazi et al., 2009). Превышение физиологических потребностей в Ca^{2+} также становится патологическим фактором для нейронов при развитии эксайтотоксичности мозга в результате гиперактивации NMDA-рецепторов (Arundine, Tymianski, 2003). Кроме того, Ca^{2+} также может играть ключевую роль в развитии рака, хотя его реальная роль пока недостаточна изучена. Существует точка зрения, что больные клетки могут ремоделировать Ca^{2+} -сигналы для достижения неконтролируемого клеточного роста. Это может быть достигнуто, например, с помощью активации Ca^{2+} -входа, стимулирующего транскрипцию генов, связанных с клеточным циклом (Lipskaia et al., 2009). Или, напротив, клетки могут уменьшать Ca^{2+} -сигналы, предотвращая Ca^{2+} -зависимый апоптоз (Bergner, Huber, 2008).

КАЛЬЦИЕВЫЕ ТРАНСПОРТЕРЫ

Известно, что на плазматической мембране всех клеток эукариот существует крутой (10^4) градиент концентрации Ca^{2+} . Как сообщалось выше, значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ поддерживается примерно на уровне 100 нМ, в то время, как концентрация Ca^{2+} во внеклеточной среде обычно больше 1 мМ. Такой градиент поддерживается согласованным действием транспортных Ca^{2+} -АТФаз плазматической мембраны (PMCA), Ca^{2+} -АТФаз внутриклеточных мембран (SERCA), ионных $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменников ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX) и K^+ -зависимых $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменников (K^+ -dependent $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchangers, NCKX).

PMCA млекопитающих, которые присутствуют практически во всех клетках, кодируются 4 генами. Еще существует примерно 30 сплайс-вариантов РНК первичных транскриптов гена (Strehler, Treiman, 2004). NCX, которые преимущественно экспрессируются в возбудимых тканях, кодируются

тремя разными генами. Для них также известны несколько сплайс-вариантов (Philipson et al., 2002). Энергия для переноса Ca^{2+} против его электрохимического градиента имеет различное происхождение. В случае PMCA — это гидролиз АТФ, причем на один откаченный ион Ca^{2+} приходится одна потребленная молекула АТФ. В случае NCX — это электрохимический градиент ионов Na^+ с выкачиванием одного иона Ca^{2+} за счет трех ионов Na^+ (и четырех Na^+ в случае NCKX) (Philipson et al., 2002; Strehler, Treiman, 2004).

Семейство АТФаз SERCA включает продукты трех генов: *SERCA1 (ATP2A1)*, *SERCA2 (ATP2A2)* и *SERCA3 (ATP2A3)*. Каждый из них подвергается альтернативному сплайсингу, что приводит к появлению новых мРНК и белковых изоформ (Gélébart et al., 2003). В мышечных клетках SERCA (в отличие от PMCA) гидролизует одну молекулу АТФ, чтобы транспортировать два иона Ca^{2+} против градиента их электрохимического потенциала из цитоплазмы в просвет (эндо)саркоплазматического ретикула (ЭР/СР) (Inesi, Tadini-Buoninsegni, 2014). SERCA и равновесная утечка Ca^{2+} регулируют уровень Ca^{2+} во внутриклеточных Ca^{2+} -депо (ЭР/СР), митохондриях, везикулярных органеллах, аппарате Гольджи, эндосомах (лизосомах) и секреторных везикулах.

КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Активный перенос ионов Ca^{2+} с помощью SERCA способствует накоплению Ca^{2+} в люмене ЭР/СР и внутриклеточных органелл, а Ca^{2+} -каналы внутриклеточных хранилищ возвращают Ca^{2+} обратно в цитоплазму. К каналам, освобождающим Ca^{2+} из ЭР/СР и внутриклеточных везикул, относятся следующие белки: инозитол 1,4,5-трифосфатные рецепторы (InsP_3R), рианодиновые рецепторы (RyR), рецепторы NAADP и некоторые члены суперсемейства TRP (рис. 1).

Рецептор InsP_3R . При стимуляции поверхностных рецепторов клетки и активации фосфолипазы C ($\text{PLC}\beta$ или $\text{PLC}\gamma$) происходит гидролиз фосфатидинозитол-4,5-дифосфата (PIP_2) на два вторичных медиатора: 1,4,5-инозитолтрифосфат (InsP_3) и диацилглицерин (DAG). На мембране эндоплазматического ретикула InsP_3 связывается с достаточно массивным рецепторным комплексом InsP_3R (молекулярная масса ~1200 кДа), который состоит из четырех субъединиц. Как только медиатор InsP_3 занимает все четыре мономера, происходит конформационное изменение InsP_3R , которое сенсibiliзирует сайт связывания с Ca^{2+} . При связывании Ca^{2+} с этим сайтом канал открывается и Ca^{2+} высвобождается в цитоплазму. Активация InsP_3R имеет колоколообразную зависимость от $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Относительно низкие значе-

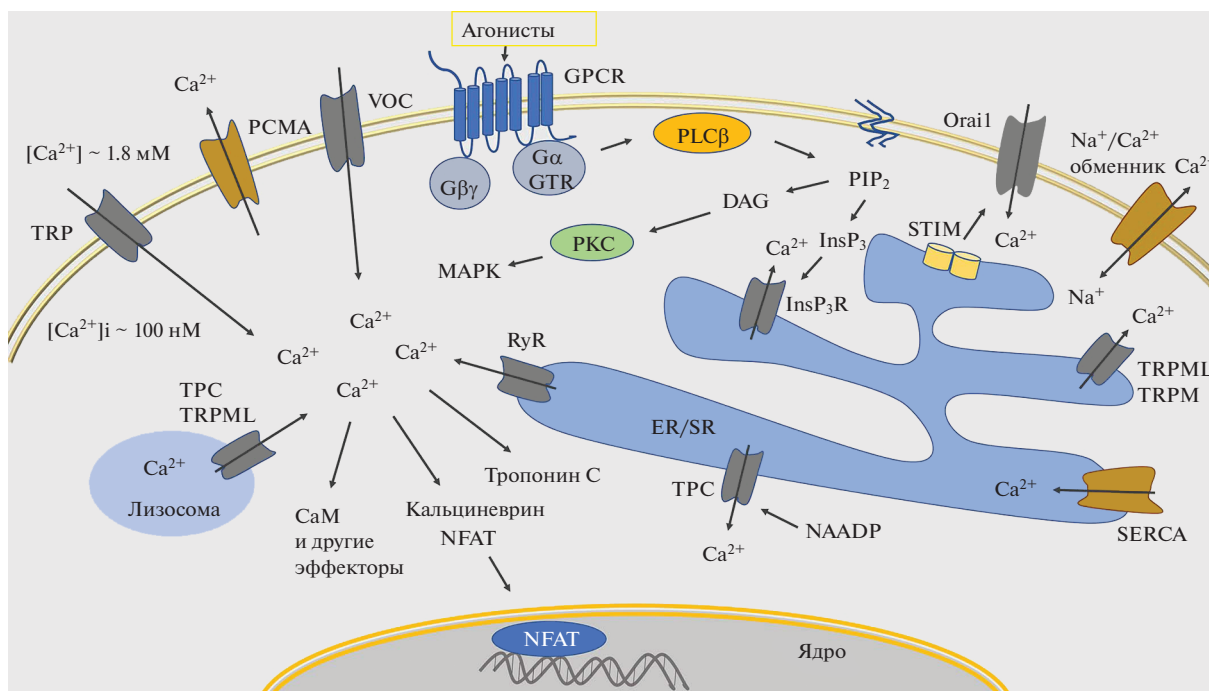


Рис. 1. Механизмы формирования Ca^{2+} -сигнала в живых клетках. Внешние стимулы активируют вход Ca^{2+} через потенциал-активируемые Ca^{2+} -каналы VOC (voltage-operated Ca^{2+} channels), рецептор-активируемые каналы ROC (receptor-operated Ca^{2+} channels), каналы переходного рецепторного потенциала TRP (transient receptor potential) и каналы, активируемые опустошением Ca^{2+} -депо CRAC (Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} channels). Связывание гормонов с G-белок-сопряженными рецепторами (GPCR) приводит к генерации инозитол-1,4,5-трифосфата (InsP_3), который, связываясь с рецептором InsP_3R , высвобождает Ca^{2+} из Ca^{2+} -депо эндоплазматической сети (ЭР). Опустошение Ca^{2+} -депо активирует каналы CRAC (Orai1 и STIM) и запускает вход Ca^{2+} в клетку. Вход Ca^{2+} через каналы VOC стимулирует выброс Ca^{2+} через риадиноновые рецепторы (RyR) саркоплазматического ретикула (СР). Кроме того, Ca^{2+} выходит из ЭР через двухпоровые каналы (TPC) и через некоторые каналы суперсемейства TRP (TRPML, TRPP, TRPM). Действуя на различные эффекторы (тропонин, кальциеврин, кальмодулин и др.) Ca^{2+} осуществляет регуляцию многочисленных клеточных функций. Уровень внутриклеточного Ca^{2+} поддерживается согласованной работой Ca^{2+} -АТФаз (PMCA и SERCA) и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменников (по: Bootman, 2012 с изменениями).

ния $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (250–500 нМ) способствуют высвобождению ионов Ca^{2+} , тогда как более высокие значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (~1 мкМ) ингибируют высвобождение ионов Ca^{2+} (Prole, Taylor, 2019). Двойное регулирование InsP_3R с помощью InsP_3 и ионов Ca^{2+} необходимо для многочисленных функций клеточной сигнализации. Например, зависимость активности InsP_3R от $[\text{Ca}^{2+}]_i$ имеет решающее значение для генерации сложных осциллирующих Ca^{2+} -сигналов, наблюдаемых во многих клетках.

Несмотря на то, что для активации InsP_3R требуется связывание с InsP_3 , на самом деле они открываются и закрываются при связывании Ca^{2+} с дискретными сайтами активации и ингибирования рецептора. При низкой клеточной стимуляции и, следовательно, низких уровнях InsP_3 возникают локальные Ca^{2+} -сигналы. Однако при более значительной стимуляции клетки ионы Ca^{2+} могут диффундировать к соседнему, оккупированному InsP_3 , кластеру InsP_3R и запускать следующий Ca^{2+} -сигнал, захватывая новые кластеры InsP_3R и распро-

страняя далее Ca^{2+} -волны. Кальциевые волны, отражающие эту схему распространения Ca^{2+} -сигналов (Thul et al., 2008), были визуализированы в цитозоле ряда клеток, включая невозбудимые клетки (Bootman et al., 1997; Callamaras et al., 1998), миоциты сердца (Kockskämper et al., 2001), а также нанотоннели, соединяющие цитоплазму соседних клеток (Smith et al., 2011). Кроме того, Ca^{2+} -волны могут проникать в нуклеоплазму путем диффузии через ядерные поры (Bootman et al., 2009) и модулировать в ядре транскрипцию генов (Hagenston et al., 2019).

Рецепторы RyRs. RyR представляет собой массивный, проницаемый для Ca^{2+} тетрамерный канал, который расположен в мембране ЭР или СР. Белки RyR кодируются тремя независимыми генами и экспрессируются в трех различных изоформах (Sorrentino, 1995). Первичным природным агонистом RyR является ион Ca^{2+} . А свое название RyR получили из-за высокой аффинности к растительному алкалоиду риадину. Низкий уровень Ca^{2+} в цитоплазме открывает канал, позволяя Ca^{2+} вытекать из ЭР/СР. Более высокий Ca^{2+} вблизи устья канала инактивирует

каналы, предотвращая перегрузку клеток свободным Ca^{2+} . При низких концентрациях рианоцина (100 нМ) связывание с рецептором запирает канал RyR в долгоживущем субпроводящем состоянии, тогда как более высокие концентрации (>10 мкМ) препятствуют открыванию канала. RyR также активируются миллимолярными концентрациями кофеина. Механизм этой модуляции заключается в повышении чувствительности рецепторов к Ca^{2+} в присутствии кофеина таким образом, что даже базальные концентрации Ca^{2+} становятся активирующими.

Структурно и функционально RyR похожи на InsP_3R , хотя имеют примерно в два раза большие мол. массу и проводимость, чем InsP_3R . RyR обнаруживаются, главным образом, в возбудимых типах клеток, таких как мышцы и нейроны. В клетках сердечной мышцы потенциал действия вызывает кратковременную деполяризацию сарколеммы, что приводит к активации потенциал-управляемых Ca^{2+} -каналов L-типа и входу Ca^{2+} в клетку извне в специфическую мембранно-ограниченную область — диадическую щель (dyadic cleft) (Eisner et al., 2017). В этой области саркоlemma T-трубочек и мембрана CP находятся в пределах 10–15 нм друг от друга, что способствует быстрой диффузии монов Ca^{2+} через каналы L-типа к RyR (Fearnley et al., 2011). Активация RyRs приводит к запуску Ca^{2+} -индуцированного высвобождения Ca^{2+} и быстрому росту $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в диадической щели. Далее Ca^{2+} -сигнал диффундирует в цитоплазму, где взаимодействует с тропонином C, участвующем в ассоциации актина с миозином и сердечно-мышечном сокращении. При некоторых сердечных заболеваниях саркоlemma и мембрана CP разобщаются, теряется связь между потенциал-зависимыми Ca^{2+} -каналами и RyRs , что приводит к серьезному нарушению сокращения миоцитов (Louch et al., 2004; Heinzel et al., 2011). Важнейшую функцию сопряжения потенциала действия с мышечным сокращением RyR выполняет также и в других типах мышечных клеток (Suntulli, Marks, 2015).

Рецепторы NAADP. Этот рецептор адениндинуклеотидфосфат никотиновой кислоты может мобилизовать Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ, активируя семейство белков, известных как двухпорные каналы (two-pore channels, TPC) (Galione, 2019). TPC появились недавно как новый класс неселективных катионных каналов в (эндо)лизосомной системе. В геноме человека существует два гена, кодирующие каналы TPC1 и TPC2 (Grimm et al., 2017). Субъединицы TPC состоят из 12 трансмембранных доменов (TMD) с предполагаемыми петлями пор между доменами TMD5/6 и TMD11/12.

Двухпорные каналы активируются NAADP в наномолярных концентрациях, тогда как NAADP в микромолярных концентрациях фактически ингибируют работу канала (Galione et al., 2009). Откры-

тие TPC регулируется, по-видимому, как величиной люминального pH, так и величиной свободного Ca^{2+} в (эндо)лизосомах. Важным отличительным свойством NAADP-чувствительных Ca^{2+} -хранилищ является их нечувствительность к ингибитору Ca^{2+} -АТФазы тапсигаргину (Galione, 2019).

Показано, что TPC участвуют в регуляции нейронального возбуждения, сокращении гладкомышечных клеток, оплодотворении и высвобождении инсулина из бета-клеток поджелудочной железы. Недавнее исследование продемонстрировало, что активность TPC необходима для высвобождения вируса Эбола из эндосомы (лизосомы) в цитозоль клетки-хозяина. Было обнаружено, что нокдаун TPC1 или TPC2 предотвращал инфицирование Эболой *in vitro*, что делает TPC потенциальными мишенями для лечения этой инфекции (Sakurai et al., 2015).

Каналы TRP в мембранах внутриклеточных оргanelл. Изначально TRP считали каналами, обеспечивающими вход Ca^{2+} исключительно через плазматическую мембрану клеток. Позднее было обнаружено, что некоторые члены суперсемейства могут формировать каналы выхода Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ (см. обзоры: Gees et al., 2010; Семенова, 2017). Классическим представителем (эндо)лизосомных каналов является подсемейство муколипидных рецепторов, в состав которого входят каналы TRPML1, TRPML2 и TRPML3. Название подсемейства получило от первого члена подсемейства муколипидного канала тип 1 (TRPML1), который был клонирован при поиске генетических детерминант заболевания муколипидоза IV типа.

Молекулярная структура каналов TRPML, как и всех TRP, имеет сходства с потенциал-управляемыми калиевыми каналами. Канал образуется в результате объединения четырех молекул TRP в гомо- или гетеротетрамеры. Пороформирующий участок находится между 5 и 6 трансмембранными доменами. Аминокислотные последовательности самой поры у членов подсемейства TRPML1–TRPML3 почти идентичны, поэтому разница биофизических характеристик и механизмов регуляции определяется структурными особенностями, находящимися вне поры канала.

Доказано, что каналы TRPML распределены, главным образом, по эндосомным путям, где они участвуют в сортировке различных липидов и белков. Несмотря на то, что каналы TRPML1 не обладают селективностью к иону Ca^{2+} , считается, что основная их функция заключается в обеспечении выхода Ca^{2+} из эндосом (лизосом) в цитоплазму клеток. Например, выходящий через каналы TRPML1 люминальный Ca^{2+} является основным ресурсом Ca^{2+} , необходимого для формирования лизосом из (эндо)лизосомных гибридов (Luzio et al., 2007).

В настоящее время представлены доказательства того, что и другие каналы суперсемейства TRP также функционируют во внутриклеточных органеллах. Например, меластатиновые рецепторы TRPM2 идентифицированы в поздних эндоцитозных компартментах, как каналы, высвобождающие Ca^{2+} из эндосом в ответ на действие цитозольной ADP-рибозы (Lange et al., 2009). В терминалях симпатических нейронов в комплексе с транспортными белками, такими, как снапин, синаптотогмин и синапсин были обнаружены другие меластатиновые рецепторы-каналы TRPM7 (Krapivinsky et al., 2006). Проведенные исследования выявили корреляцию между экспрессией TRPM7 в нейронах и высвобождением нейромедиатора в синаптическую щель (Krapivinsky et al., 2006).

КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

Фаза высвобождения ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо довольно короткая и, как правило, полностью инактивируется в течение нескольких десятков секунд, что обусловлено кальций- и лиганд-зависимой инактивацией Ca^{2+} -каналов внутриклеточных мембран, а также работой SERCA, PMCA и Na/Ca^{2+} -обменника. Однако для многих ключевых клеточных процессов требуется устойчивое увеличение $[Ca^{2+}]_i$, что достигается путем входа ионов Ca^{2+} в клетку через Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны.

Создание удобной классификации каналов является пока еще не решенной проблемой. Мембранные белки трудно классифицировать по их структуре. Поэтому часто каналы подразделяют по типу их активации. Активация каналов может зависеть от изменения мембранного потенциала (в случае VOC – voltage-operated Ca^{2+} channels) (Catterall, 2000), от связывания с лигандом (в случае ROC – receptor-operated Ca^{2+} channels) (Meldolesi, Pozzan, 1987) и от опустошения внутриклеточных Ca^{2+} -депо (в случае CRAC – Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} channels). Кроме того, группа каналов, относящаяся к суперсемейству TRP, может быть активирована множеством факторов, включая механическое растяжение, изменение осмолярности или температуры, вторичные мессенджеры, G-белки и т.д. (см. обзор: Montell et al., 2002).

Потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы. Одними из наиболее исследованных являются каналы VOC, которые впервые были обнаружены в мембране клеток, обладающих электрической возбудимостью (сердечная мышца, гладкомышечные клетки, нейроны, эндокринные клетки). Каналы VOC условно делятся на три основных семейства: Ca_v1 , Ca_v2 и Ca_v3 . Каждое семейство включает несколько типов Ca^{2+} -каналов, отличающихся друг от друга уровнями активации и инактивации, временем нахождения в открытом состоянии, величиной проводимости и фармакологическими свойствами (Catterall et al.,

2005). Если в клетке сохраняется потенциал покоя, то VOC находятся в неактивном состоянии, но при деполяризации мембраны каналы активируются, обеспечивая быстрый вход ионов Ca^{2+} в клетку.

В структуру VOC входит большая α_1 -субъединица, формирующая собственно проводящую часть канала, а также вспомогательные субъединицы – $\alpha_2\delta$, β и иногда γ . Субъединицы $\alpha_2\delta$ и β имеют регуляторные функции и могут влиять на свойства α_1 -субъединицы. В настоящее время выделяют несколько типов кальциевых каналов (L, T, N, P, Q, R), обладающих разными свойствами и имеющих разную тканевую локализацию. Субъединица α_1 является ключевым определителем подтипа кальциевого канала (Weber et al., 2010).

Так, семейство каналов Ca_v1 ($Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v1.4$ и изоформа $Ca_v1.1$) включает в себя Ca^{2+} -каналы L-типа (long-lasting – долгоживущие) (Beck-Hansen et al., 1998). Семейство каналов Ca_v2 , состоящее из трех подсемейств ($Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ и $Ca_v2.3$) объединяет каналы P- Q- N- и R-типа (Richards et al., 2007). В семейство каналов Ca_v3 ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ и $Ca_v3.3$) входят кальциевые каналы T-типа (transient – кратковременные) (Cribbs et al., 1998).

Представительство тех или иных типов кальциевых каналов в различных клетках определяется, по всей видимости, соответствующими функциями. Так, Ca^{2+} -каналы L-типа участвуют в электромеханическом сопряжении в скелетных, гладких и сердечных мышцах. Члены семейства Ca_v2 локализируются в зернистых нейронах мозжечка, пирамидных клетках гиппокампа, клетках эндокринной системы и пр. Основной их функцией является освобождение нейротрансмиттера (Hillman, 1991). Ca^{2+} -каналы T-типа участвуют в генерации коротких пачек импульсов в клетках сердца, нейронах, и различных секреторных клетках (см. обзор: Мельников, 2007).

Депо-управляемые Ca^{2+} -каналы. Концепция депо-управляемых Ca^{2+} -каналов была предложена в 1986 году Патни с соавторами (Putney, 1986). Согласно этой концепции, вход Ca^{2+} в невозбудимые клетки регулируется степенью опустошения внутриклеточных Ca^{2+} -депо. В клетках, в основном гемопоэтического ряда, был зарегистрирован исключительно селективный для Ca^{2+} ток, характеризующийся входящим выпрямлением, который получил название I_{CRAC} (calcium release activated Ca^{2+} current) (Hoth, Penner, 1992). Сейчас очевидно, что депо-управляемый вход в различных типах клеток реализуется при участии не только каналов CRAC, а также семейства Ca^{2+} -проницаемых каналов SOCE (store-operated calcium entry), с различными биофизическими и фармакологическими свойствами (Soboloff, Romanin, 2019).

Депо-управляемые Ca^{2+} -каналы включают в себя комплекс белков Orai и STIM (stromal interaction molecule). Каналы Orai локализируются в плазматиче-

ской мембране и представляют собой порообразующую структуру канала CRAC. Они формируются путем сборки из четырех субъединиц (Hogan et al., 2010). Селективный фильтр Orai состоит из четверки глутаматных остатков, которые образуют высокоаффинный сайт связывания с Ca^{2+} , формируя каналы с высокой Ca^{2+} -селективностью (Prakriya et al., 2006). Анализ выстилающих пору остатков в трансмембранных доменах указывает на то, что поры канала Orai очень узкие (Zhou et al., 2010), что потенциально объясняет его низкую проводимость и является лимитирующим фактором роста $[Ca^{2+}]_i$ при открывании канала. Цитоплазматический С-конец Orai имеет специфический спиральный домен (CC), который содержит сайт связывания с белком STIM.

Белки STIM1 и STIM2 были идентифицированы как сенсоры концентрации Ca^{2+} в люмене хранилищ ЭР. Нокдаун, с помощью siRNA, более чем 2300 генов человека в клеточных линиях HeLa и Jurkat помог установить, что STIM1 и STIM2 участвуют в работе SOCE (Liou et al., 2005). N-конец белков STIM, содержащий Ca^{2+} -связывающий домен EF-hand, располагается в просвете ЭР. Когда концентрация Ca^{2+} в люмене ЭР падает ниже порогового уровня, Ca^{2+} диссоциирует от STIM, что приводит к конформационным изменениям сенсора, в результате которого С-концевой домен STIM разворачивается и взаимодействует с каналом Orai в областях, где мембрана ЭР наиболее близко подходит к плазматической мембране (в пределах 15 нм) (Zhou et al., 2017). Далее происходит активация депо-управляемых Ca^{2+} -каналов, которая сопровождается входом ионов Ca^{2+} в клетку (Kawasaki et al., 2009).

Каналы суперсемейства TRP. Каналы, относящиеся к этому суперсемейству, делятся на несколько подсемейств: канонические (TRPC), ванилоидные (TRPV), меластатиновые (TRPM), анкириновые (TRPA), полицистиновые (TRPP) и муколипиновые (TRPML) (см. обзор: Nilius, Owsianik, 2011). Все члены суперсемейства состоят из шести трансмембранных доменов (S1–S6) с обращенными в цитоплазму N- и С –концами и порообразующей петлей между доменами S5 и S6. Длина цитозольных концов, на которых находятся регуляторные сайты, сильно варьирует между членами суперсемейства TRP (см. обзор: Owsianik et al., 2006).

Накопленные данные указывают на то, что каналы TRP играют заметную роль в регуляции Ca^{2+} , как в возбудимых, так и невозбудимых клетках. Большинство каналов TRP пропускают ионы Ca^{2+} непосредственно через плазматическую мембрану, а другие члены суперсемейства создают движущую силу, облегчая вход ионов Ca^{2+} снаружи внутрь клетки через Ca^{2+} -проводящие каналы. Например, в эндотелиальных клетках (Bollimuntha et al., 2005), тромбоцитах (Adebijiyi et al., 2011) и клетках гладких мышц (Lussier et al., 2008) вход Ca^{2+} может обеспечиваться

каналами TRPC1. Каналы TRPC1 тесно взаимодействуют с Ca^{2+} -каналом Orai1 и Ca^{2+} -сенсором STIM (Cheng et al., 2011). Истощение Ca^{2+} -депо и образование комплексов STIM1/Orai приводит к встраиванию TRPC в плазматическую мембрану и продлению активности каналов SOCE в клетках (Desai et al., 2015).

Каналы суперсемейства TRP демонстрируют разную степень проницаемости для Ca^{2+} – от умеренно проницаемых до полностью непроницаемых. Но два члена этого подсемейства (каналы TRPV5 и TRPV6) признаны самыми высокоселективными кальциевыми каналами ($P_{Ca}/P_{Na} > 100$) среди всего суперсемейства TRP (Owsianik et al., 2006). Высокая Ca^{2+} -селективность каналов, строгое входящее выпрямление и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая инактивация (Owsianik et al., 2006; Derler et al., 2012) была причиной, по которой TRPV6 ранее относили к белкам, формирующим пору CRAC (Yue et al., 2001). Позднее проведенный анализ показал, что TRPV6 имеют более высокую проводимость, чем CRAC, они не активируются истощением Ca^{2+} -депо и потенциал-зависимым образом блокируются ионами Mg^{2+} , что не характерно для каналов CRAC (Voets et al., 2001). Последующее открытие белков Orai и STIM окончательно сформировало мнение, что именно они, а не каналы TRPV6/5 обеспечивают депо-управляемый вход Ca^{2+} .

Каналы TRPV5 и TRPV6 имеют схожие функциональные характеристики, они конститутивно активны и обеспечивают вход Ca^{2+} в клетку при потенциале покоя, не требуя активации внеклеточными лигандами. Каналы могут обеспечивать строго дозированное поступление Ca^{2+} и участвовать в активной (ре)абсорбции ионов Ca^{2+} в эпителиальных клетках почек, тонкого кишечника и плаценты (Nijenhuis et al., 2003). Показано, что TRPV6 является важным элементом в транспорте кальция между матерью и плодом, и его функционирование необходимо для поддержания нормального протекания беременности (Choi et al., 2009). Кроме того, каналы TRPV5 и TRPV6, по-видимому, участвуют в обеспечении Ca^{2+} -зависимых функций в лимфоцитах человека (Vassilieva et al., 2013).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активация входа Ca^{2+} в клетку в результате открывания Ca^{2+} -каналов приводит к локальному всплеску $[Ca^{2+}]_i$. Из этих локальных точек Ca^{2+} -сигналы могут диффузно рассеиваться, быть секвестированы или могут объединяться в глобальные Ca^{2+} сигналы. По существу, глобальные Ca^{2+} -сигналы возникают в результате скоординированного действия кластера Ca^{2+} -каналов, обеспечивающих вход и (или) выброс Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ. Глобальные Ca^{2+} -сигналы далее распространяются между скоплениями клеток для координации взаи-

модействия тканей и органов. Система Ca^{2+} -сигналов организована таким образом, что позволяет клеткам использовать Ca^{2+} в качестве средства одно-временного управления различными процессами. Особенно важно, что Ca^{2+} -сигнализация тесно интегрируется с другими путями передачи внутриклеточного сигнала. Поэтому сигнализация в клетке может кардинально меняться в зависимости от изменений Ca^{2+} -сигналов или Ca^{2+} -гомеостаза.

Формирования Ca^{2+} -сигналов обеспечивается слаженной работой внутренних систем регулирования Ca^{2+} с участием Ca^{2+} -каналов, Ca^{2+} -насосов и обменников. Эти системы тончайшим образом модулируют амплитуду и временно-пространственное распределение Ca^{2+} -сигналов, которые в свою очередь влияют на множество Ca^{2+} -чувствительных процессов внутри клетки. Нарушение этих механизмов и сбой в регуляции Ca^{2+} -сигналов может приводить к их ремоделированию и вызывать патологические процессы, которые ведут к нарушениям функций и гибели клеток. Понимание того, как изменение Ca^{2+} -сигнала влияет на развитие определенного заболевания и, напротив, как патологии ремоделируют Ca^{2+} -сигнал, необходимо для совершенствования современных терапевтических стратегий.

Настоящий обзор включает лишь некоторые ключевые аспекты клеточной Ca^{2+} -сигнализации. В него не вошли данные из литературы, касающиеся огромной роли митохондрий и кальций-связывающих белков в формировании и проведении Ca^{2+} -сигнала. К сожалению, несмотря на то, что многие вопросы, связанные с Ca^{2+} -сигнализацией до сих пор не раскрыты, в последнее время наблюдалось неоправданное снижение интереса к этой области исследования. Стоит надеяться, что современные, стремительно развивающиеся технологии в области молекулярной биологии и флуоресцентной микроскопии дадут новый импульс изучению процессов, связанных с формированием Ca^{2+} -сигнала и его влиянием на важнейшие функции клетки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 18-04-00231а).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность редактору журнала И.А. Гамалей за ценные замечания и советы, которые были учтены в этой статье. Автор также благодарит Е.А. Морачевскую за участие в обсуждении обзора.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с использованием животных и человека авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мельников К.Н.* 2007. Кальциевые каналы возбудимых мембран. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. Т. 5. С. 28. (*Melnikov K.N.* 2007. Calcium channels of excitable membranes. Reviews of clinical pharmacology and drug therapy. V. 5. P. 28.)
- Семенова С.Б.* 2017. Каналы TRP в эндосомных транспортных путях. Цитология. Т. 52. С. 87. (*Semenova S.B.* 2017. TRP channels in the endosomal pathway. Tsitologiya. V. 52. P. 87.)
- Adebisi A., Narayanan D., Jaggar J.H.* 2011. Caveolin-1 assembles type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and canonical transient receptor potential 3 channels into a functional signaling complex in arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* V. 286. P. 4341.
- Allbritton N.L., Meyer T., Stryer L.* 1992. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science.* V. 258. P. 1812.
- Arundine M., Tymianski M.* 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium.* V. 34. P. 325.
- Barak P., Parekh A.B.* 2019. Signaling through Ca^{2+} microdomains from store-operated CRAC channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035097>
- Bech-Hansen N.T., Naylor M.J., Maybaum T.A., Pearce W.G., Koop B., Fishman G.A., Mets M., Musarella M.A., Boycott K.M.* 1998. Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha 1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat. Genet.* V. 19. P. 264.
- Bergner A., Huber R.M.* 2008. Regulation of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -store in cancer. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry.* V. 8. P. 705.
- Berridge M.J.* 1997. The AM and FM of calcium signalling. *Nature.* V. 386. P. 759.
- Berridge M.J.* 2006. Calcium microdomains: Organization and function. *Cell Calcium.* V. 40. P. 405.
- Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L.* 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 4. P. 517.
- Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D.* 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 1. P. 11.
- Bers D.M.* 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* V. 415. P. 198.
- Bollimuntha S., Cornatzer E., Singh B.B.* 2005. Plasma membrane localization and function of TRPC1 is dependent on its interaction with beta-tubulin in retinal epithelium cells. *Vis. Neurosci.* V. 22. P. 163.

- Bootman M.D.* 2012. Calcium signaling. Cold Spring Harb. Persp. Biol. V. 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011171>
- Bootman M.D., Fearnley C., Smyrniak I., MacDonald F., Roderick H.L.* 2009. An update on nuclear calcium signalling. J. Cell Sci. V. 122. P. 2337.
- Bootman M., Niggli E., Berridge M., Lipp P.* 1997. Imaging the hierarchical Ca²⁺ signaling system in HeLa cells. J. Physiol. V. 499. P. 307.
- Callamaras N., Marchant J.S., Sun X.P., Parker I.* 1998. Activation and co-ordination of InsP₃-mediated elementary Ca²⁺ events during global Ca²⁺ signals in *Xenopus* oocytes. J. Physiol. V. 509. P. 8191.
- Catterall W.A.* 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. V. 6. P. 521.
- Catterall W.A., Perez-Reyes E., Snutch T.P., Striessnig J.* 2005. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. Pharmacol. Rev. V. 57. P. 411.
- Cheng K.T., Ong H.L., Liu X., Ambudkar I.S.* 2011. Contribution of TRPC1 and Orai1 to Ca²⁺ entry activated by store depletion. Adv. Exp. Med. Biol. V. 704. P. 435.
- Choi Y., Seo H., Kim M., Ka H.* 2009. Dynamic expression of calcium-regulatory molecules, TRPV6 and S100G, in the uterine endometrium during pregnancy in pigs. Biol. Reprod. V. 81. P. 1122.
- Clapham D.E.* 2007. Calcium signaling. Cell. V. 131. P. 1047.
- Cribbs L.L., Lee J.H., Yang J., Satin J., Zhang Y., Daud A., Barclay J., Williamson M.P., Fox M., Rees M., Perez-Reyes E.* 1998. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. Circ. Res. V. 83. P. 103.
- Derler I., Madl J., Schutz G., Romanin C.* 2012. Structure, regulation and biophysics of I-CRAC, STIM/Orai1. Calcium Signal. V. 740. P. 383.
- Desai P.N., Zhang X., Wu S., Janoshazi A., Bolimuntha S., Putney J.W., Trebak M.* 2015. Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the Orai1 message. Sci. Signal. V. 8. P. ra74. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa8323>
- Dolmetsch R.E., Xu K., Lewis R.S.* 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. Nature. V. 392. P. 933.
- Dupont G., Combettes L., Bird G.S., Putney J.W.* 2011. Calcium oscillations. Cold Spring Harbor Persp. Biol. V. 13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004226>
- Ebashi S., Ebashi F.* 1964. A new protein component participating in the super precipitation of myosin B. J. Biochem. V. 55. P. 604.
- Eisner D.A., Caldwell J.L., Kistamas K., Trafford A.W.* 2017. Calcium and excitation-contraction coupling in the heart. Circ. Res. V. 121. P. 181.
- Fearnley C.J., Roderick H.L., Bootman M.D.* 2011. Calcium signaling in cardiac myocytes. Cold Spring Harbor Persp. Biol. V. 3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004242>
- Felmy F., Neher E., Schneggenburger R.* 2003. The timing of phasic transmitter release is Ca²⁺-dependent and lacks a direct influence of presynaptic membrane potential. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 100. P. 15200.
- Findlay I.* 2004. Physiological modulation of inactivation in L-type Ca²⁺ channels: one switch. J. Physiol. V. 554. P. 275.
- Galione A.* 2019. NAADP receptors. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035071>
- Galione A., Evans A.M., Ma J., Parrington J., Arredouani A., Cheng X., Zhu M.X.* 2009. The acid test: the discovery of two-pore channels (TPCs) as NAADP-gated endolysosomal Ca²⁺ release channels. Pflugers Arch. V. 458. P. 869.
- Gees M., Colsoul B., Nilius B.* 2010. The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. V. 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003962>
- Gélébart P., Martin V., Enouf J., Papp B.* 2003. Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. V. 303. P. 676.
- Giorgi C., Danese A., Missiroli S., Patergnani S., Pinton P.* 2018. Calcium dynamics as a machine for decoding signals. Trends Cell Biol. V. 28. P. 258.
- Goonasekera S.A., Molkentin J.D.* 2012. Unraveling the secrets of a double life: Contractile versus signaling Ca²⁺ in a cardiac myocyte. J. Mol. Cell Cardiol. V. 52. P. 317.
- Grimm C., Chen C., Wahl-Schott C., Biel M.* 2017. Two-pore channels: catalyzers of endolysosomal transport and function. Front. Pharmacol. V. 7. P. 45.
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y.* 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. V. 260. P. 3440.
- Hagenston A.M., Bading H., Bas-Orth C.* 2019. Functional consequences of calcium-dependent synapse-to-nucleus communication: Focus on transcription-dependent metabolic plasticity. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. V. 12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035287>
- Hajnóczky G., Robb-Gaspers L.D., Seitz M.B., Thomas A.P.* 1995. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. Cell. V. 82. P. 415.
- Heidelberger R., Heinemann C., Neher E., Matthews G.* 1994. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. Nature. V. 371. P. 513.
- Heinzel FR, MacQuaide N, Biesmans L, Sipido K.* 2011. Dyssynchrony of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum as subcellular mechanism of cardiac contractile dysfunction. J. Mol. Cell Cardiol. V. 50. P. 390.
- Higazi D.R., Fearnley C.J., Drawnel F.M.* 2009. Endothelin-1-stimulated InsP₃-induced Ca²⁺ release is a nexus for hypertrophic signaling in cardiac myocytes. Mol. Cell. V. 33. P. 472.
- Hillman D., Chen S., Aung T.T., Cherksey B., Sugimori M., Llinás R.R.* 1991. Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 88. P. 7076.
- Hogan P.G., Lewis R.S., Rao A.* 2010. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. Annu. Rev. Immunol. V. 28. P. 491.
- Hoth M., Penner R.* 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. Nature. V. 355. P. 353.
- Inesi G., Tadini-Buoninsegni F.* 2014. Ca²⁺/H⁺ Exchange, luminal Ca²⁺ release and Ca²⁺/ATP coupling ratios in the

- sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Cell Commun. Signal.* V. 8. P. 5.
- Kawasaki T., Lange I., Feske S.* 2009. A minimal regulatory domain in the C terminus of STIM1 binds to and activates ORAI1 CRAC channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 385. P. 49.
- Kockskämper J., Sheehan K.A., Bare D.J., Lipsius S.L., Mignery G.A., Blatter L.A.* 2001. Activation and propagation of Ca²⁺ release during excitation–contraction coupling in atrial myocytes. *Biophys. J.* V. 81. P. 2590.
- Krapivinsky G., Mochida S., Krapivinsky L., Cibulsky S.M., Clapham D.E.* 2006. The TRPM7 ion channel functions in cholinergic synaptic vesicles and affects transmitter release. *Neuron.* P. 52. P. 485.
- Lange I., Yamamoto S., Partida-Sanchez S., Mori Y., Fleig A., Penner R.* 2009. TRPM2 functions as a lysosomal Ca²⁺-release channel in beta cells. *Sci. Signal.* V. 2. P. ra23. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000278>
- Liou J., Kim M.L., Won Do Heo W.D., Jones J.T., Myers J.W., Ferrell J.E., Jr., and Meyer T.* 2005. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr. Biol.* V. 15. P. 1235.
- Lipskaia L., Hulot J.S., Lompre A.M.* 2009. Role of sarco/endoplasmic reticulum calcium content and calcium ATPase activity in the control of cell growth and proliferation. *Pflügers Archiv.* V. 457. P. 673.
- Llinás R., Sugimori M., Silver R.B.* 1992. Presynaptic calcium concentration microdomains and transmitter release. *J. Physiol. Paris.* V. 86. P. 135.
- Louch W.E., Bito V., Heinzel F.R., Macianskiene R., Vanhaecke J., Flameng W., Mubagwa K., Sipido K.R.* 2004. Reduced synchrony of Ca²⁺ release with loss of T-tubules – a comparison to Ca²⁺ release in human failing cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* V. 62. P. 63.
- Lussier M.P., Lepage P.K., Bousquet S.M., Boulay G.* 2008. RNF24: A new TRPC interacting protein, causes the intracellular retention of TRPC. *Cell Calcium.* V. 5. P. 432.
- Luzio J.P., Pryor P.R., Bright N.A.* 2007. Lysosomes: Fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 8. P. 622.
- Marchant J., Callamaras N., Parker I.* 1999. Initiation of IP₃-mediated Ca²⁺ waves in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* V. 18. P. 5285.
- Meldolesi J., Pozzan T.* 1987. Pathways of Ca²⁺ influx at the plasma membrane: Voltage-, receptor-, and second messenger-operated channels. *Exp. Cell Res.* V. 171. P. 271.
- Montell C., Birnbaumer L., Flockerzi V.* 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell.* V. 108. P. 595.
- Neher E., Sakmann B.* 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* V. 260. P. 799.
- Neher E., Sakmann B., Steinbach J.H.* 1978. The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Arch.* V. 375. P. 219.
- Nijenhuis T., Hoenderop J.G., van der Kemp A.W., Bindels R.J.* 2003. Localization and regulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* V. 14. P. 2731.
- Nilius B., Owsianik G.* 2011. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* V. 12. P. 218.
- Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P.* 2003. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 4. P. 552.
- Owsianik G., D'hoedt D., Voets T., Nilius B.* 2006. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* V. 156. P. 61.
- Parker I., Ivorra I.* 1990. Localized all-or-none calcium liberation by inositol trisphosphate. *Science.* V. 250. P. 977.
- Parys J.B., Bultynck G.* 2018. Calcium signaling in health, disease and therapy. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* V. 1865. P. 1657.
- Petkov G.V., Bonev A.D., Heppner T.J., Brenner R., Aldrich R.W., Nelson M.T.* 2001. Beta1-subunit of the Ca²⁺-activated K⁺ channel regulates contractile activity of mouse urinary bladder smooth muscle. *J. Physiol.* V. 537. P. 443.
- Philipson K.D., Nicoll D.A., Ottolia M., Quednau B.D., Reuter H., John S., Qiu Z.* 2002. The Na⁺/Ca²⁺ exchange molecule: An overview. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* V. 976. P. 1.
- Prakriya M., Feske S., Gwack Y., Srikanth S., Rao A., Hogan P.G.* 2006. Orail is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature.* V. 443. P. 230.
- Prole D.L., Taylor C.W.* 2019. Structure and function of IP₃ receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035063>
- Pozzan T., Mongillo M., Rudolf R.* 2003. The Theodore Bucher lecture. Investigating signal transduction with genetically encoded fluorescent probes. *Eur. J. Biochem.* V. 270. P. 2343.
- Putney J.W.* 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* V. 7. P. 1.
- Richards M.W., Leroy J., Pratt W.S., Dolphin A.C.* 2007. The HOOK-domain between the SH3 and the GK domains of Cav beta subunits contains key determinants controlling calcium channel inactivation. *Channels (Austin).* V. 1. P. 92.
- Ridgway E.B., Ashley C.C.* 1967. Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 29. P. 229.
- Ringer S.* 1883. A Third contribution regarding the influence of the inorganic constituents of the blood on the ventricular contraction. *J. Physiol.* V. 4. P. 222.
- Ringer S., Buxton D.W.* 1887. Upon the similarity and dissimilarity of the behavior of cardiac and skeletal muscle when brought into relation with solutions containing sodium, calcium and potassium salts. *J. Physiol.* V. 8. P. 288.
- Ringer S., Sainsbury H.* 1894. The action of potassium, sodium and calcium salts on *Tubifex rivulorum*. *J. Physiol. (Lond.).* V. 16. P. 1.
- Roderick H.L., Cook S.J.* 2008. Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodeling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat. Rev. Cancer.* V. 8. P. 361.
- Rooney T.A., Sass E.J., Thomas A.P.* 1989. Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes. *J. Biol. Chem.* V. 264. P. 17131.
- Roy J., Cyert M.S.* 2019. Identifying new substrates and functions for an old enzyme: Calcineurin. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035436>
- Sakurai Y., Kolokoltsov A.A., Chen C.C., Tidwell M.W., William E. Bauta W.E., Klugbauer N., Grimm C., Christian Wahl-Schott C., Biel M., Davey R.A.* 2015. Ebola virus. Two-pore chan-

- nels control Ebola virus host cell entry and are drug targets for disease treatment. *Science*. V. 347. P. 995.
- Schwaller B. 2010. Cytosolic Ca²⁺ buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. V. 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004051>
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell Comp. Physiol*. V. 59. P. 223.
- Skupin A., Kettenmann H., Winkler U., Wartenberg M., Sauer H., Tovey S.C., Taylor C.W., Falcke M. 2008. How does intracellular Ca²⁺ oscillate: By chance or by the clock? *Biophys J*. V. 94. P. 24041.
- Smith I.F., Shuai J., Parker I. 2011. Active generation and propagation of Ca²⁺ signals within tunneling membrane nanotubes. *Biophys. J*. V. 100. P. L37.
- Soboloff J., Romanin C. 2019. STIM1 structure-function and downstream signaling pathways. *Cell Calcium*. V. 80. P. 101.
- Sorrentino V. 1995. The ryanodine receptor family of intracellular calcium release channels. *Adv. Pharmacol*. V. 33. P. 67.
- Strehler E.E., Treiman M. 2004. Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr. Mol. Med*. V. 4. P. 323.
- Suntulli G., Marks A.R. 2015. Essential roles of intracellular calcium release channels in muscle, brain, metabolism, and aging. *Curr. Mol. Pharmacol*. V. 8. P. 206.
- Thul R., Falcke M. 2004. Release currents of IP₃ receptor channel clusters and concentration profiles. *Biophys. J*. V. 86. P. 2660.
- Thul R., Smith G.D., Coombes S. 2008. A bidomain threshold model of propagating calcium waves. *J. Math. Biol*. V. 56. P. 435.
- Tsien R.Y. 1981. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*. V. 290. P. 527.
- Tsien R.Y. 1988. Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium. *Trends Neurosci*. V. 11. P. 419.
- Tsien R.Y. 2003. Imagining imaging's future. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Suppl*. SS16.
- Vassilieva I.O., Tomilin V.N., Marakhova I.I., Shatrova A.N., Negulyaev Y.A., Semenova S.B. 2013. Expression of transient receptor potential vanilloid channels TRPV5 and TRPV6 in human blood lymphocytes and Jurkat leukemia T Cells. *J. Membr. Biol*. V. 246. P. 131.
- Verkhatsky A. 2019. Astroglial calcium signaling in aging and Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035188>
- Voets T., Prenen J., Fleig A., Vennekens R., Watanabe H., Hoenderop J.G.J., Bindel R.J.M., Droogmans G., Penner R., Nilius, B. 2001. CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J. Biol. Chem*. V. 276. P. 47767.
- Wacquier B., Combettes L., Dupont G. 2019. Cytoplasmic and mitochondrial calcium signaling: A two-way relationship. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035139>
- Weber A.M., Wong F.K., Tufford A.R., Schlichter L.C., Matveev V., Stanley E.F. 2010. N-type Ca²⁺ channels carry the largest current: implications for nanodomains and transmitter release. *Neurosci*. V. 13. P. 1348.
- Yue L., Peng J.B., Hediger M.A., Clapham D.E. 2001. CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature*. V. 410. P. 705.
- Zhang J., Campbell R.E., Ting A.Y., Tsien R.Y. 2002. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. V. 3. P. 906.
- Zhou Y., Ramachandran S., Oh-Hora M., Rao A., Hogan P.G. 2010. Pore architecture of the ORAI1 store-operated calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 107. P. 4896.
- Zhou Y., Cai X., Nwokonko R.M., Loktionova N.A., Wang Y., Gill D.L. 2017. The STIM-Orai coupling interface and gating of the Orai1 channel cell calcium. *J. Biol. Chem*. V. 292. P. 8.

The Principles of Organization of Calcium Signal in Eukaryotic Cells

S. B. Semenova*

Institute of Cytology, Russia Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

**e-mail: svsem@incras.ru*

Ionized calcium (Ca²⁺) is a universal signaling element that transmits an extracellular stimulus from the surface of cells to intracellular structures and molecules. Ca²⁺ regulates many cellular processes, including gene transcription, proliferation, differentiation, secretion and apoptosis. The key to this pleiotropic activity is the complex spatiotemporal organization of the rise of intracellular Ca²⁺ (Ca²⁺ signal), which, acting on certain effectors, initiates specific signaling events in the cell. Violation of the mechanisms responsible for the regulation of cellular Ca²⁺ or exceeding stimulation of receptors leads to cell death. The review article addresses the main mechanisms underlying the cellular organization of Ca²⁺ signals. A brief retrospective of the development of modern concept of Ca²⁺ signaling and its role in the vital functions of the organism is presented. Special attention is given to the basic intracellular systems that provide the organization, spatio-temporal regulation and encoding of Ca²⁺ signals.

Keywords: Ca²⁺ signaling, Ca²⁺ microdomains, InsP3R, RyR, and NAADP receptors, Ca²⁺ channels of VOCs, TRP, CRAC