

В.К. Кухта, А.Д. Таганович, Э.И. Олецкий

Некоторые особенности действия ионов кальция в клетках в качестве сигнальной молекулы

Белорусский государственный медицинский университет

Рассматриваются особенности ионов кальция в качестве первичного вторичного и третичного посредников во внутриклеточной передаче сигналов к молекулам-мишеням. Отмечены авторегулирующие свойства ионов кальция в клетке и двойственная природа влияния кальция на внутриклеточные процессы.

Ключевые слова: кальций, клетки, внутриклеточный сигнал

Важнейшим признаком многоклеточных организмов являются системы межклеточной сигнализации. Внешние сигналы, действующие на такие организмы и получившие название первичных посредников, вызывают в клетках специфический ответ благодаря синтезу относительно небольшой группы соединений, названных вторичными посредниками. И если о многих внешних сигналах (звук, свет, гормоны и т.д.) известно давно, то сведения о вторичных посредниках появились относительно недавно благодаря выяснению роли циклической цАМФ в 50-х годах прошлого столетия. Однако, на самом деле, о такой роли ионов кальция (Ca^{2+}) стало известно намного раньше благодаря экспериментам Рингера, результаты которых были опубликованы в 1883 году [16]. В то время Ca^{2+} был известен как важный структурный элемент минерализованных тканей, но Рингеру удалось показать, что кальций выполняет еще одну функцию: он является сигналом, поддерживающим сокращение изолированного сердца. Открытие такой функции кальция оставалось по существу забытым в течение многих десятилетий, пока новые экспериментальные данные не заставили исследователей сконцентрировать свое внимание на роли Ca^{2+} в передаче сигналов.

Исследования показали, что Ca^{2+} обладает свойствами, которые делают его уникальным среди всех других носителей биологической информации. Среди таких свойств следует назвать способность Ca^{2+} выполнять функции как первичного, так и вторичного, и даже третичного посредника, способность Ca^{2+} сигналов к авторегуляции (Ca^{2+} управляет генерацией и регуляцией информации, которую сам же и несет) и, наконец, возможно наиболее важная особенность - Ca^{2+} заключается в том, что сигнал, передаваемый им, носит яркий амбивалентный характер. Ca^{2+} не только незаменимый регулятор нормальных функций клеток, но и важный посредник их смерти. В последние годы появился ряд обзоров, иллюстрирующих отдельные стороны роли кальция в передаче сигналов. [5,6,13].

1. Общие принципы передачи сигналов с участием Ca^{2+}

Концентрация ионизированного Ca^{2+} в цитоплазме покоящихся клеток по разным оценкам варьирует от 50 до 200 нМ, что на четыре порядка ниже концентрации Ca^{2+} в плазме крови и во внеклеточной жидкости. Такая низкая внутриклеточная концентрация позволяет избежать осаждения Ca^{2+} при взаимодействии его с фосфатами, поскольку фосфорнокислые соли кальция характеризуются низкой растворимостью. Хотя общая концентрация кальция в клетке значительно превышает «наномольные» концентрации, уровень свободного кальция снижается благодаря связыванию его с фосфолипидами мембран, с низкомолекулярными метаболитами, с неорганическими ионами, и формированию комплексов со специфическими белками.

Белки, образующие комплексы с кальцием, делятся на несколько классов. Один из них представлен мембранными белками, выполняющими роль транспортеров Ca^{2+} через плазматическую мембрану и мембраны клеточных органелл. Эти белки наиболее важны для поддержания гомеостаза кальция внутри клеток, поскольку они способны переносить кальций из цитозоля, где расположено большинство молекул-мишеней кальциевых сигнальных систем, во внеклеточные пространства или внутрь клеточных органелл и обратно.

Транспортеры кальция отличаются сродством к Ca^{2+} . Высоким сродством к кальцию обладают Ca^{2+} -АТФ-азы (насосы), которые расположены в мембранах клеток. К ним относятся Ca^{2+} насосы плазматической (внешней) мембраны клетки, Ca^{2+} насосы эндо- (сарко)плазматической мембраны и насосы мембран аппарата Гольджи. Низким сродством к Ca^{2+} обладают $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменники в плазматической мембране и во внутренней митохондриальной мембране.

Второй класс белков, участвующих в транспорте кальция, представлен каналобразующими белками, которые обеспечивают специфический транспорт Ca^{2+} через плазматическую мембрану и мембраны некоторых органелл. В зависимости от механизма раскрытия выделяют потенциалзависимые каналы, особенно активные в легковозбудимых клетках; лигандзависимые каналы, активируемые многими соединениями, в частности, нейромедиаторами; и каналы, которые обеспечивают поступление кальция, сопряженное с опустошением кальциевых депо. К последним относятся так называемые TRP каналы (transient receptor potential channel - англ.), механизм регуляции которых еще недостаточно изучен.

Лигандзависимые каналы обнаружены также в некоторых органеллах (эндо- или саркоплазматическом ретикулуме, мембранах комплекса Гольджи). Важнейшим лигандом, который регулирует такие внутренние каналы, является инозитол 1,4,5 трифосфат (Ин-Ф3) [2]. Он образуется в ответ на взаимодействие внеклеточных сигналов (первичных посредников) с рецепторами плазматической мембраны. В последнее время стали известны другие лиганды для внутриклеточных Ca^{2+} каналов: циклическая АДФ-рибоза (цАДФр) и НКАДФ-динуклеотид, подобный НАДФ+, но содержащий никотиновую кислоту вместо никотинамида. К сожалению, до настоящего

времени не раскрыты механизмы их образования.

Еще один класс белков, способных специфически связывать Ca^{2+} , - это растворимые белки цитозоля и белки немембранных структур, типа миофибрилл или цитоскелета. Часть таких белков выполняют функцию буфера Ca^{2+} , снижая концентрацию свободного иона в цитозоле. Однако большая часть таких белков выполняет дополнительные функции в передаче сигналов. Связывание с Ca^{2+} позволяет им взаимодействовать с другими белками, передавая тем самым сигнальную информацию, принесенную Ca^{2+} . Такие белки получили название сенсоров Ca^{2+} . К ним относятся аннексины, гельсолин, белки, содержащие специфические домены C-2 и EF-рука.

Аннексин и гельсолин, передают информацию для одного белка-мишени. Наиболее распространено в клетках семейство белков (известно свыше 600 членов семейства [11]), содержащее домен EF-рука. Они оказывают модулирующее действие на большое количество молекул-мишеней. Наиболее важным среди таких белков считается кальмомодулин. Домен EF-рука в кальмомодулине формируется несколькими участками надвторичной структуры - « α -спираль - β -поворот - α -спираль», примыкающими к неспирализованному участку, состоящему из 12 аминокислот. Такой домен впервые был описан свыше 40 лет назад в белке-парвальбумине [12]. Многие белки с доменом EF-рука, подобно кальмомодулину, являются регуляторными субъединицами ферментов, которые временно связываются с белками-мишенями. В ряде случаев кальмомодулин может связываться с белками, которые уже имеют свои собственные кальмомодулин подобные субъединицы. Примером может служить активируемая Ca^{2+} протеинфосфатаза - кальциневрин, который таким образом становится молекулой мишенью под двойным влиянием Ca^{2+} . Другим примером двойного регулирования кальцием может служить протеаза калпаин. В ее состав входит кальмомодулин как кальцийсвязывающий домен каталитической субъединицы и еще одна отдельная субъединица с доменом EF-рука, которая также взаимодействует с каталитической субъединицей.

Наконец, многие белки или ферменты содержат специфические участки связывания кальция, которые позволяют кальцию непосредственно регулировать их активность без посредников. Такие белки, примером которых может служить протеинкиназа C, также можно рассматривать как сенсоры кальция в клетках.

2. Кальций может выполнять функции первичного, вторичного и третичного посредников

Процессы передачи сигнала обычно включают взаимодействие химических или физических факторов (первичные посредники) с рецепторами плазматической мембраны клеток - мишеней, которые затем инициируют внутри клетки цепь последующих событий с участием растворимых сигнальных молекул (вторичные посредники). Это самый распространенный способ обмена информацией между клетками. Клетки могут общаться друг с другом путем прямых межклеточных взаимодействий, некоторые первичные

посредники проникают в клетку через плазматическую мембрану и взаимодействуют с рецепторами в цитоплазме и/или ядре, при этом вторичные посредники не образуются.

Изучение роли кальция в механизмах передачи сигналов показало, что его действие не всегда укладывается в каноническую схему передачи сигнала с участием вторичных посредников. Ca^{2+} может вести себя как обычный вторичный посредник, концентрация которого растет в ответ на взаимодействие многих первичных сигналов с рецепторами плазматической мембраны. Но повышение уровня кальция может происходить в результате действия других классических вторичных посредников (Ин-Ф3 или диацилглицерола), которые после своего образования способствуют выходу Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Придерживаясь общих принципов названий, Ca^{2+} в этом случае должен быть определен как третичный посредник. Наконец, Ca^{2+} может проникнуть в клетки из внеклеточного пространства, иницируя внутриклеточную цепь передачи сигнала. Такое действие не уникально для Ca^{2+} . Другие вторичные посредники, (например, NO), также могут иметь двойное происхождение (из межклеточного пространства и образование внутри клеток). Однако наиболее значимая отличительная особенность Ca^{2+} как сигнальной молекулы открыта относительно недавно и заключается в том, что кальций обладает способностью узнавать специфические 7 ТМС рецепторы плазматической мембраны, связанные с G-белками. После такого взаимодействия опосредованная G-белком цепь событий приводит к высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

Открытие действия Ca^{2+} как классического первичного посредника стало неожиданностью [4]. Как правило, концентрация первичного посредника низкая и должна изменяться во внеклеточном окружении, тогда как концентрация Ca^{2+} высока и ее постоянство строго контролируется. Поэтому возможность роли внеклеточного Ca^{2+} в качестве первичного посредника вообще не рассматривалась, хотя было известно, что уровень секреции гормонов, регулирующих уровень кальция в крови, изменяется в ответ на изменение концентрации внеклеточного Ca^{2+} .

Ca^{2+} рецептор плазматической мембраны был выделен и клонирован, вначале из клеток паращитовидной железы [3], а затем и из других клеток, участвующих в гомеостазе кальция (С-клетки щитовидной железы и клетки канальцев почек). Структура молекулы рецептора была подобна строению других рецепторов, ассоциированных с G-белками. Внеклеточная часть содержит несколько областей, богатых дикарбоновыми аминокислотами, к которым присоединяется Ca^{2+} . Взаимодействие внеклеточного кальция с таким рецептором в паращитовидной железе снижает секрецию паратиринина [4] и активирует секрецию кальцитонина С-клетками щитовидной железы [15]. Это стало доказательством того, что Ca^{2+} , может выполнять функции первичного сигнала, передавая сигналы клеткам, которые участвуют в секреции кальцитотропных гормонов, что придает Ca^{2+} роль своеобразного «кальцитотропного» гормона подобно витамину Д, кальцитонину и

паратирину [4] .

3. Ca^{2+} обладает авторегулирующими свойствами

Авторегулирующие свойства Ca^{2+} как сигнальной молекулы обнаружены относительно недавно при исследовании транскрипции генов, кодирующих переносчики кальция плазматической мембраны (насосы PMCA и NCX) и внутриклеточных мембран (рецептор Ин-Ф3). В мозжечковых нейронах [8-10,13] синтезируются четыре основных изоформы насоса PMCA, три основных изоформы NCX, и рецептор Ин-Ф3 типа 1. Если эти клетки выделить из новорожденных крыс и культивировать *in vitro*, они созревают через несколько суток. Однако без деполяризации их плазматических мембран путем незначительного увеличения поступления Ca^{2+} через потенциалзависимый канал, они неизбежно подвергаются апоптозу. Незначительное увеличение уровня Ca^{2+} в цитозоле культивируемых нейронов полностью изменяет спектр экспрессии изоформ переносчиков Ca^{2+} . Конечный результат такого изменения синтеза переносчиков Ca^{2+} - трех-, четырехкратное увеличение уровня цитозольного Ca^{2+} , который тем или иным способом способствует долговременному выживанию мозжечковых гранулярных нейронов в культуре.

Важным подтверждением авторегулирующей функции кальция является открытие кальцийсвязывающих белков, регулирующих экспрессию генов. Одним из таких белков является DREAM (downstream regulatory element (DRE) antagonist modulator-англ.) – белок содержит домен EF-рука и выполняет функцию сайленсера транскрипции гена [7]. Без Ca^{2+} белок DREAM связан со специфическим участком ДНК (DRE) в промоторе генов и подавляет их транскрипцию. При увеличении концентрации Ca^{2+} он связывается с DREAM и способствует его удалению с DRE-участка ДНК, тем самым, увеличивая транскрипцию гена. Относительно недавно показано, что DREAM контролирует транскрипцию генов, кодирующих NCX 3. В результате при нарушении связывания Ca^{2+} с DREAM, культивируемые нейроны теряют способность эффективно экспортировать кальций. Тогда увеличивается уровень Ca^{2+} в цитозоле клеток и повышается вероятность их гибели.

Случаи саморегуляции Ca^{2+} на посттранскрипционном уровне известны уже давно и более многочисленны. Примером может служить регуляция PMCA кальмомодулином. Такая регуляция обратима, но насос также может необратимо активироваться калпаином - эндогенной протеазой, активность которой, в свою очередь, регулируется Ca^{2+} .

4. Двойственная природа кальциевых сигналов

Ни одна клетка не может функционировать должным образом без участия Ca^{2+} сигнальной системы. Однако, для поддержания жизнедеятельности клеток чрезвычайно важно строго контролировать уровень кальция внутри клеток. Увеличение уровня свободного Ca^{2+} выше оптимальной концентрации 100-200 нм в цитозоле может быть безвредным и даже необходимым, но только в течение короткого времени. Быстрые колебания уровня Ca^{2+} - удобное средство, к которому обращаются клетки при

необходимости модулировать функции, требующие высоких концентраций свободного Ca^{2+} . Существует ряд механизмов, позволяющих клетке справиться с перегрузкой кальцием при условии непродолжительного повышения его уровня. Среди таких механизмов важная роль принадлежит митохондриям, которые могут захватывать довольно большие количества Ca^{2+} и депонировать его в форме нерастворимой фосфорнокислой соли (гидроксиапатита). Однако для переноса кальция митохондрия затрачивает энергию градиента электрохимического потенциала, которая обычно используется на синтез АТФ. Непрерывный захват Ca^{2+} митохондриями привел бы к прекращению синтеза АТФ, необходимого, в том числе, для удаления Ca^{2+} из цитоплазмы при помощи кальциевых насосов. Развитие подобного порочного круга было бы губительным для клетки, способствуя некрозу клеток, что является крайне нежелательным отрицательным феноменом. Однако кальций участник и программируемой смерти клеток – апоптоза. Апоптоз опосредуется семейством протеаз, каспаз, которые хотя и не зависят непосредственно от Ca^{2+} , но могут активироваться ферментами, регулируемые при участии кальция. С другой стороны, как это показано недавно [1], активированные каспазы могут способствовать расщеплению РМСА, что приводит к внутриклеточной перегрузке кальцием, а это в свою очередь включает названные выше ферменты, разрушающие клетки.

Заключение

Изучение роли ионов кальция как посредника сигнальных систем привлекает пристальное внимание исследователей. Первые эксперименты Рингера породили лавину исследований в этой области. Выявлены основные механизмы, регулирующие уровень кальция в крови и в клетке. В настоящем обзоре затронуты только некоторые особенности функции кальциевых сигнальных систем. Нарушения строения участников этих систем – причина многих заболеваний. Широкое применение в клинической практике ингибиторов кальциевых сигналов – результат исследования роли кальция в регуляции процессов жизнеобеспечения. С другой стороны, более глубокое проникновение в детали механизмов кальциевых регуляторных систем потребует более внимательного отношения к назначению таких препаратов.

Литература

1. Bano, D. Cleavage of the plasma membrane $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in excitotoxicity / D. Bano [et al.] // Cell. 2005, 120: 275–285.
2. Berridge, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signaling / M. J. Berridge // Nature 1993, 361: 315–325.
3. Brown, E. M. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid / E. M. Brown [et al.] // Nature 1993, 366:575–580.
4. Brown, E. M. G-protein-coupled, extracellular Ca^{2+} -sensing receptor: a versatile regulator of diverse cellular functions / E. M. Brown [et al.] // Vitamins and hormones 1999,55:1–71.
5. Calcium Signalling and Disease Edited by Ernesto Carafoli (2007) Springer, 591

p.

6. Carafoli, E. Calcium-mediated cellular signals: a story of failures Trends Biochem / E. Carafoli // Sci. 2004, 29, 371–379.
7. Carrion, A. M. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor / A. M. Carrion [et al.] // Nature, 1999,398:80–4.
8. Geanzzani, A. Calcineurin controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression in neurons / A. Geanzzani, E. Carafoli, D. Guerini // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 5797–5801.
9. Guerini, D. The expression of plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms in cerebellar granule neurons is modulated by Ca²⁺ / D. Guerini [et al.] // J. Biol. Chem. 1999, 274, 1667–1676.
10. Guerini, D. Calcineurin controls the expression of isoform 4CII of the plasma membrane Ca²⁺ pump in neurons / D. Guerini [et al.] // J. Biol. Chem 2000, 275:3706–3712.
11. Kawasaki, H. Classification and evolution of EF-hand proteins / H. Kawasaki, S. Nakayama, R. H. Kretsinger // BioMetals 1998, 11:277–295.
12. Kretsinger, R. H. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description / R. H. Kretsinger, C. E. Nockolds // J Biol Chem. 1973; 248:3313–26.
13. Li, L. Calcineurin Controls the Transcription of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Isoforms in Developing Cerebellar Neurons / L. Li, D. Guerini, E. Carafoli // J. Biol. Chem. 2000, 275, 20903–20910.
14. Mellstro, B. Ca²⁺-Operated Transcriptional Networks: Molecular Mechanisms and In Vivo Models / B. Mellstro [et al.] // Physiol Rev 2008, 88: 421–449.
15. McGehee, D. S. Mechanism of extracellular Ca²⁺ receptor-stimulated hormone release from sheep thyroid parafollicular cells / D. S. McGehee [et al.] // J. Physiol. 1997, 502, 31–44.
16. Nemeth, E. Rapid mobilization of cellular Ca²⁺ in bovine parathyroid cells by external divalent cations / E. Nemeth, A. Scarpa // J Biol Chem 1987, 202: 5188–5196.
17. Ringer, S. A further contribution regarding the influence of different constituents of the blood on the contraction of the heart / S. Ringer // J. Physiol.1883,4,29–43.