

КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ TRPV5 И TRPV6 В Т-КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

© И. О. Васильева, Ю. А. Негуляев, И. И. Марахова, С. Б. Семенова¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург:

¹ электронный адрес: svsem@mail.cytspb.rssi.ru

Клонирование специализированных кальциевых каналов TRPV5 и TRPV6 (transient receptor potential vanilloid channels) обеспечило молекулярную базу для изучения ранее не идентифицированных каналов кальциевого входа в электрически невозбудимые клетки. В настоящей работе с помощью метода RT-PCR получены результаты, подтверждающие транскрипцию генов *trpv5* и *trpv6* в клетках лимфобластной лейкемии Jurkat и Т-лимфоцитах периферической крови человека. Кроме того, методом иммуноблоттинга впервые показано присутствие каналообразующего белка TRPV5 в общих лизатах и в мембранных фракциях клеток Jurkat и нормальных Т-лимфоцитов человека. Использование иммунопреципитации позволило выявить белок TRPV6 в клетках Jurkat, однако в нормальных Т-лимфоцитах белок TRPV6 нами не обнаружен. Избирательный характер экспрессии и селективная Ca^{2+} -проницаемость каналов TRPV5 и TRPV6 указывают на важную роль этих каналов в Ca^{2+} -гомеостазе и, возможно, в злокачественной трансформации клеток крови.

Ключевые слова: кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6, RT-PCR, экспрессия каналообразующих белков, Т-клетки человека.

Цитоплазматический кальций используется в качестве ключевого сигнального мессенджера фактически во всех типах живых клеток. В клетках крови изменение концентрации внутриклеточного кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ассоциировано со множеством клеточных событий, включая активацию клеточных киназ и фосфатаз, регуляцию цитоскелетсвязывающих белков, транскрипционный контроль и модуляцию поверхностных рецепторов (Scharff, Foder, 1993; Revankar et al., 2006). В Т-лимфоцитах повышение внутриклеточного кальция при связывании Т-клеточного рецептора с чужеродным антигеном запускает транскрипционные программы, ведущие к секреции эффекторных цитокинов и координации иммунного ответа (Dolmetsch et al., 1997). Снижение уровня внутриклеточного кальция приводит к ослаблению активации Т-клеток и развитию различных форм иммунодефицита (Feske et al., 2006; Gwack et al., 2007).

Возрастание $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках крови, как и во всех эукариотических клетках, осуществляется двумя путями: высвобождением компартментализованного Ca^{2+} из внутриклеточных депо и(или) путем активации входа Ca^{2+} через плазматическую мембрану из наружной среды. Поскольку объем эндоплазматического ретикулума составляет всего около 1% от общего объема Т-лимфоцитов, считается, что только вход экстраклеточного Ca^{2+} через ионные каналы может обеспечить в течение многих часов и даже дней необходимый для активации лимфоцитов уровень внутриклеточного Ca^{2+} (Feske, 2007; Gwack et al., 2007).

Принято считать, что в клетках крови основное поступление Ca^{2+} осуществляется через каналы CRAC (calcium release activated calcium channels), активируемые при опустошении кальциевых депо (Hoth, Penner, 1992; Zwei-

fach, Lewis, 1993). Открытие суперсемейства белков TRP (transient receptor potential channels) существенно увеличило число белков-кандидатов на роль каналов кальциевого входа в электрически невозбудимые клетки. Первый ген, кодирующий белки TRP, был обнаружен в фоторецепторах *Drosophila* (Montell, Rubin, 1989). Было установлено, что мутантные по этому гену фоторецепторы не способны выдерживать деполяризационный рецепторный потенциал из-за дефектов в пути проведения Ca^{2+} (Hardie, Minke, 1995).

В настоящее время стремительно растущее суперсемейство TRP включает в себя 29 различных белков, все они формируют катионные каналы (Montell et al., 2002; Clapham, 2003). Разнообразие каналов TRP влечет за собой разнообразие физиологических функций, в которых они участвуют. К ним относятся обонятельная, болевая и температурная рецепция, $\text{Ca}^{2+}(\text{Mg}^{2+})$ -реабсорбция и пролиферация клеток (Montell et al., 2002; Clapham, 2003; Flockerzi, 2007). Классификация по сходству аминокислотных последовательностей подразделяет семейство белков TRP на 7 подсемейств: каналы TRPCs (TRP-canonical), каналы TRPVs (TRP-vanilloid receptor), каналы TRPMs (TRP-melastatin), каналы TRPMLs (TRP-mucolipins), каналы TRPPs (TRP-polycystins) и TRPA (TRP-ankyrin transmembrane protein). Седьмое подсемейство TRPN было пока найдено только в клетках насекомых (Montell et al., 2002; Clapham, 2003; Flockerzi, 2007).

Два члена семейства TRP — кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6 (первоначально известные как CaT2 и CaT1, или ECaC1 и ECaC2) — были впервые клонированы из эпителиальных клеток почки кролика и тонкого кишечника крысы (Hoenderop et al., 2000, 2001). Позднее TRPV5 и TRPV6 были отнесены к подсемейству ванило-

идных рецепторов TRPV и идентифицированы в клетках других млекопитающих, включая человека (Nijenhuis et al., 2005). Генетический анализ показал, что ген *trpv5* человека находится на хромосоме 7q35 в соседней позиции с геном *trpv6* на 7q33—q34 (Muller et al., 2000). Белки состоят из 730 аминокислот, имеют 6 трансмембранных сегментов (ТМ) и цитоплазматические N- и С-хвосты. Небольшая гидрофобная область между ТМ5 и ТМ6, как полагают, является порообразующей областью, а сам канал формируется из четырех субъединиц (Hoenderop et al., 2003). Каналы TRPV5 и TRPV6 имеют высокую степень гомологии (примерно 75 % идентичных аминокислотных остатков) и обладают сходными функциональными характеристиками (Hoenderop et al., 2001, 2003). Показано, что эти каналы могут обеспечивать строго дозированное поступление Ca^{2+} и участвовать в активной (ре)абсорбции Ca^{2+} в эпителиальных клетках почек, тонком кишечнике и плаценте (Hoenderop et al., 2000, 2001).

Ранее в клетках лейкемии человека K562 нами были обнаружены каналы с биофизическими свойствами, подобными свойствам кальциевых каналов TRPV6 и TRPV5 (Semenova et al., 2005; Семенова, Негуляев, 2006). Использование метода RT-PCR подтвердило транскрипцию гена *trpv6* в клетках K562 и позволило нам предположить, что белки TRPV6 и(или) TRPV5 могут эндогенно экспрессироваться и формировать кальциевые каналы в плазматической мембране других клеток крови. До сих пор в литературе не было данных об экспрессии белков TRPV6 и TRPV5 в клетках крови и роль этих белков в миелоидных и лимфоидных клетках неизвестна. Идентификация Ca^{2+} -каналов в нормальных и трансформированных клетках крови важна для решения как прикладных, так и фундаментальных вопросов кальциевой сигнализации.

В настоящей работе мы исследовали и сравнили экспрессию канала TRPV6 и его близкого гомолога — канала TRPV5 — в клетках лимфобластной лейкемии Jurkat, а также в нормальных Т-лимфоцитах, выделенных из периферической крови условно здоровых доноров.

Материал и методика

Клетки лимфобластной лейкемии Jurkat, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН), культивировали при 37 °С в среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, в присутствии 0.008 % гентамицина.

Выделение и культивирование лимфоцитов периферической крови человека. Лимфоциты выделяли по общепринятой схеме (Boyum, 1968) из свежей донорской крови. Лейкоцитарную фракцию отбирали после осаждения эритроцитов, добавляя в кровь 6%-ный раствор декстрана T500. Суспензию лейкоцитов (пробы по 8 мл) наслаивали на 3 мл гистобака и центрифугировали в течение 30 мин при 600 g. После центрифугирования интерфазу переносили в пробирки объемом сначала 50 мл, затем 10 мл и 3 раза промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) следующего состава (в mM): NaCl — 137, Na_2HPO_4 — 8, KCl — 2.7, KH_2PO_4 — 1.5. Для удаления макрофагов клеточную суспензию после отмывки разбавляли средой RPMI-1640 без антибиотиков и помещали в пластиковые матрицы, предварительно обработанные 10%-ной сывороткой человека группы крови 0(1), и оставляли на 40 мин при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 . Далее полученную суспензию лимфо-

цитов разливали во флаконы по 40—50 мл с концентрацией клеток 2 млн/мл. На следующие сутки суспензию переносили во флаконы по 10—15 мл с концентрацией 1.5—2.0 млн/мл. Лимфоциты использовали в этот или на следующий день.

Антитела. Для специфического выявления белков использовали поликлональные козы антитела против С-концевого участка TRPV5 человека (Santa Cruz, США) в разведении 1 : 200 и поликлональные кроличьи антитела против С-концевого участка TRPV6 человека (Santa Cruz, США) в разведении 1 : 200. В качестве вторичных антител применяли антитела осла, выработанные против иммуноглобулинов козы, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz, США), в разведении 1 : 3000, и козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), в разведении 1 : 3000.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (RT-PCR). Общую РНК из клеток выделяли с помощью гуанидин-тиоцианатного метода (Chomczynski, Sacchi, 1987). Обратную транскрипцию проводили в объеме 20 мкл, содержащем 1—2 мкг РНК, 1 мкг случайных гексануклеотидных праймеров и 100 ед. MMLV-обратной транскриптазы (Силекс, Россия), согласно инструкции фирмы-изготовителя. Праймеры для PCR были синтезированы согласно опубликованным последовательностям (Hoenderop et al., 2001). TRPV-5 специфичные праймеры: прямой 5'-GGGGACCGCTGGTTC-CTGCGG-3', обратный 5'-TCAAAAATGGTAGACCTCC-TCTCC-3', размер ампликона 312 п. н.; TRPV6-специфичные праймеры: прямой 5'-GGGGACCGCTGGTTCCTGGG-3', обратный 5'-AGATCTGATATCCCAGCTCT-3', размер продукта 301 п. н. Праймеры обеспечивали специфичность амплификации кДНК, так как комплементарные им последовательности находятся в разных экзонах гена. PCR проводили в реакционном объеме 10 мкл, содержащем 2 мкл разведенной (1 : 6) кДНК, 0.5 мкМ каждого праймера, 0.2 мМ dNTP, 1.5 мМ $MgCl_2$, 1-кратный Hot-Taq-полимеразный буфер и 1 ед. Hot-Taq-полимеразы (Силекс, Россия). Режим амплификации: активация полимеразы 10 мин при 94 °С, затем 35 циклов (94 °С — 40 с, 60 °С — 40 с, 72 °С — 40 с). Продукты PCR (6 мкл) электрофоретически разделяли в 6%-ном ПААГ, окрашивали бромистым этидием и фотографируют при ультрафиолетовом облучении. Специфичность PCR была подтверждена секвенированием (Helix, Россия).

Получение тотальных клеточных лизатов и препаратов мембранных фракций. Клетки осаждали центрифугированием при 500 g в течение 10 мин, осадки промывали 3 раза холодным PBS и инкубировали на льду 20 мин в лизирующем буфере NP-40: 50 мМ Tris-HCl, pH 7.6, 0.5 % нонидета P-40 (NP-40), 150 мМ NaCl, 1 мМ Na_3VO_4 , 10 мМ NaF и коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США). Затем образцы мягко гомогенизировали, пропуская через охлажденную иглу 21 G. Полученную смесь центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин при 4 °С. Супернатант отбирали, измеряли концентрацию белка по методу Бредфорд и далее использовали для иммунопреципитации или добавляли буфер Лэммли для электрофоретических проб и прогревали в течение 5 мин при 95 °С. Препараты мембранных фракций получали путем мягкой гомогенизации клеток в лизирующем буфере (10 мМ Tris-HCl, pH 7.4, 0.25 М сахарозы, 1 мМ EDTA и коктейль ингибиторов протеаз; Sigma, США), центрифугирования 10 мин при 1500 g, 4 °С и

последующего ультрацентрифугирования в течение 1 ч при 200 000 g и 4 °C. Полученный осадок растворяли в буфере TBS (20 mM Tris-GCl, pH 7.4, и 150 mM NaCl), добавляли буфер Лэммли и прогревали в течение 5 мин при 95 °C.

Иммунопреципитация. Для иммунопреципитации к 500 мкг общего клеточного белка в 1 мл лизирующего буфера NP-40 добавляли 20 мкл 50%-ной суспензии протеин-A/G агарозы (Santa Cruz, США) и инкубировали 1 ч при 4 °C при постоянном перемешивании для удаления неспецифических белков. После центрифугирования (1 мин при 1000 g) к супернатанту добавляли 2 мкг анти-TRPV6-антител и инкубировали ночь при 4 °C с перемешиванием; в контрольных экспериментах этот этап пропускали. Затем добавляли 20 мкл протеин-A/G агарозы и после инкубации в течение 1 ч в тех же условиях осадки иммунокомплексов промывали 3 раза в 1 мл буфера NP-40. К осадкам добавляли равный объем (20 мкл) 2-кратного буфера Лэммли и прогревали в течение 5 мин при 95 °C. Перед электрофорезом пробы центрифугировали и использовали супернатант.

Электрофорез и иммуноблотинг. Белки разделяли методом диск-электрофореза в 7.5%-ном ПААГ в присутствии SDS, а затем проводили их электроперенос на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond ECL, Amersham Bioscience, Великобритания). Для визуализации белковых полос использовали Rонсеау (Sigma, США). Мембрану блокировали 5%-ным раствором обезжиренного сухого молока в TTBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl и 0.1 % Trion X-100) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем инкубировали в течение ночи при 4 °C с анти-TRPV5- или анти-TRPV6-антителами, разведенными в буфере TTBS с 2%-ным молоком. После отмытки в TTBS (3 раза по 5 мин) мембрану инкубировали 1 ч с соответствующими вторичными антителами. Визуализацию бловот проводили путем усиленной хемолуминесценции (ECL plus Western blotting detection system, Amersham Bioscience, Великобритания). Хемолуминесцентное свечение регистрировали при экспонировании мембраны на пленку для рентгеновских снимков.

Результаты и обсуждение

Для того чтобы идентифицировать возможные молекулярные корреляты кальциевых каналов в клетках крови, мы исследовали транскрипцию генов *trpv5* и *trpv6* в клетках лимфобластной лейкемии Jurkat и в Т-лимфоцитах периферической крови человека. Тестирование генов проводили на уровне мРНК методом RT-PCR с конечной электрофоретической детекцией полученного амплификата (312 п. н. для гена *trpv5* и 301 п. н. для гена *trpv6*). На рис. 1 представлены результаты RT-PCR-анализа, которые показали транскрипцию генов *trpv5* и *trpv6* в клетках Jurkat, а также в нормальных Т-лимфоцитах человека. Важно отметить, что мРНК гена *trpv5* выявлялась в Т-лимфоцитах периферической крови всех исследованных доноров ($n = 6$), а мРНК гена *trpv6* была обнаружена в Т-лимфоцитах лишь некоторых доноров (3 из 6).

Далее мы исследовали экспрессию белков TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat и Т-лимфоцитах человека. Следует отметить, что в работах на лимфоцитах экспрессия белков TRP была показана главным образом только на уровне мРНК методом Northern-блот или RT-PCR. Так, были обнаружены мРНК генов *trpc1* и *trpc3* в Т- и В-клетках

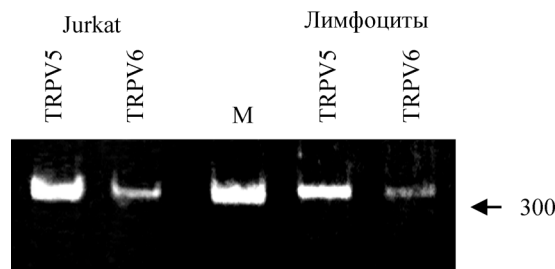


Рис. 1. Экспрессия мРНК генов *trpv5* и *trpv6* в клетках Jurkat и Т-лимфоцитах периферической крови человека.

Методом RT-PCR с использованием ген-специфических праймеров показана амплификация TRPV5 и TRPV6 — 312 и 301 п. н. соответственно. М — маркерная ДНК, стрелкой обозначена позиция ДНК размером 300 п. н.

(Philipp et al., 2003; Vazquez et al., 2003). Напротив, мРНК генов *trpc4*, *trpc5* и *trpc7* не детектировались в Т-клетках (Philipp et al., 2003). В литературе отсутствует информация об экспрессии в лимфоцитах белков TRPV1—TRPV4. О транскрипции генов *trpv5* и *trpv6* в клетках Jurkat сообщение есть (Cui et al., 2002).

Для специфического выявления белков TRPV5 и TRPV6 проводили иммуноблотинг на образцах общих клеточных лизатов и фракций клеточных мембран, используя поликлональные антитела против TRPV5 и против TRPV6. На рис. 2, а приведены результаты, показывающие эндогенную экспрессию белков TRPV5 в клетках линии Jurkat и нормальных Т-лимфоцитах человека. Иммунореактивные полосы соответствуют гликозилированным (90 кДа) и негликозилированным (75 кДа) формам белка TRPV5, что согласуется с литературными данными (Hoenderop et al., 2003).

Низкий уровень экспрессии не позволил нам выявить белок TRPV6 в иммуноблотах, поэтому для детекции белка TRPV6 мы использовали иммунопреципитацию. Иммунореактивная полоса с мол. массой 90 кДа, показанная на рис. 2, б, свидетельствует об экспрессии белка TRPV6 в клетках Jurkat. В Т-лимфоцитах периферической крови человека белок TRPV6 вообще не детектировался. Таким образом, нами впервые показана экспрессия белков TRPV5 в клетках Jurkat и в нормальных Т-лимфоцитах человека и белка TRPV6 в клетках Jurkat.

Присутствие экстраклеточного сайта N-гликозилирования между сегментами TM1 и TM2 белков TRPV5 и TRPV6 было обнаружено в ряде работ (Hoenderop et al., 2001, 2003). Показано, что гликозилирование может играть существенную роль в фолдинге каналообразующих белков. Например, для калиевых каналов Shaker гликозилирование являлось необходимым условием объединения и стабильности мультимерного комплекса канала (Khanna et al., 2001). Сходство общей топологии калиевых каналов и каналов семейства TRP дает основание считать, что гликозилирование, возможно, определяет стабильное состояние тетрамерных комплексов TRPV5 и TRPV6 в клетках крови.

Основными известными функциями каналов TRPV5 и TRPV6 являются обеспечение дозозависимого входа Ca^{2+} и (ре)абсорбция Ca^{2+} в эпителиальных клетках кишечника и почек (Hoenderop et al., 2001, 2002). Согласно общепринятому мнению, в клетки крови Ca^{2+} поступает в основном через каналы CRAC (Hoth, Penner, 1992; Zweifach, Lewis, 1993). Однако каналы CRAC до сих пор не клонированы и пока еще не идентифицированы. Так, в течение

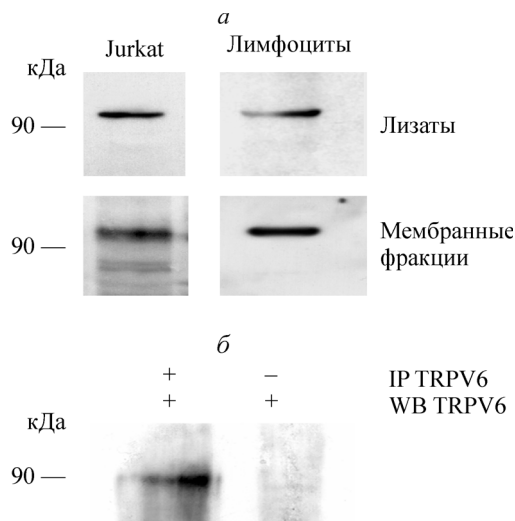


Рис. 2. Экспрессия белков TRPV5 (а) и TRPV6 (б) в клетках Jurkat и Т-лимфоцитах периферической крови человека.

а — иммуноблоттинг белков клеточных лизатов и мембранных фракций с использованием антител против TRPV5; б — клеточные лизаты Jurkat иммунопреципитировали (IP) антителами против TRPV6 (+), в контрольных преципитациях антитела не использовали (–); полученные комплексы преципитировали протеин-А/G агарозой; иммуноблоттинг (WB) проводили с использованием антител против TRPV6.

последних нескольких лет в качестве наиболее вероятно кандидата на роль канала CRAC выдвигался белок TRPC3. Основанием для таких предположений служили опыты с клетками Jurkat, дефектными по каналам CRAC (Fanger et al., 1995), в которых, как впоследствии оказалось, была мутация гена белка TRPC3 (Philipp et al., 2003). Суперэкспрессия белка TRPC3 приводила к увеличению токов CRAC (Philipp et al., 2003). Однако в отличие от известных неселективных катионных каналов TRPC3 каналы, трансфицированные в клетки Jurkat, имели характеристики высокоселективных кальциевых каналов, что ставит под сомнение гипотезу о тождестве каналов TRPC3 и CRAC (Hofmann et al., 1999; Vazquez et al., 2001). В настоящее время открыт новый белок Orail, который тоже заявлен как возможный кандидат эндогенных каналов CRAC в лимфоцитах (Feske et al., 2006).

Известно, что белки TRPV5 и TRPV6 являются высокоселективными Ca^{2+} -каналами. Их селективность для Ca^{2+} по отношению к моновалентным ионам (Hoenderop et al., 2003; Nijenhuis et al., 2005) можно сравнить с потенциалзависимыми Ca^{2+} -каналами (Almers, McCleskey, 1984) или каналами CRAC (Hoth, 1995). Высокая Ca^{2+} -селективность TRPV5 и TRPV6 являлась предпосылкой для гипотезы, согласно которой TRPV6 реагируют на опустошение внутриклеточных кальциевых депо и могут входить в состав поры каналов CRAC (Yue et al., 2001), однако эта точка зрения не является общепринятой (Voets et al., 2001). В настоящем исследовании нами показана эндогенная экспрессия высокоселективных кальциевых каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках лимфобластной лейкемии Jurkat и каналов TRPV5 в нормальных Т-лимфоцитах человека. Мы предполагаем, что эти каналы функционально активны и участвуют в кальциевой сигнализации клеток крови. Вопрос о взаимодействии их с каналами CRAC остается за рамками настоящего исследования.

В последнее время появляется все больше работ, в которых ионные каналы рассматриваются как возможные участники процессов, связанных как с пролиферацией,

так и с программируемой смертью клеток. Так, было обнаружено, что экспрессия потенциалуправляемых Na^{+} - и K^{+} -каналов меняется в метастазирующих клетках простаты (Foster et al., 1999). В клетках линий LNCaP и PC3 препарат TH-1177 блокировал вход Ca^{2+} и подавлял пролиферацию (Haverstick et al., 2000). Строгая корреляция между повышенной экспрессией мРНК канала TRPV6 и стадиями злокачественного перерождения клеток была показана на предстательной железе человека (Wissenbach et al., 2001). В ряде работ (Schwarz et al., 2006; Lehen'kyi et al., 2007) показано, что вход Ca^{2+} через каналы TRPV6 может модулировать пролиферацию трансформированных клеток и менять их резистентность к апоптотической гибели.

Важно отметить, что мы не подтвердили экспрессию мРНК гена *trpv6* и белка TRPV6 в нормальных Т-лимфоцитах всех исследованных доноров. Если избирательный характер экспрессии белков TRPV6 каким-либо образом связан с изменением пролиферации, а возможно, со злокачественной трансформацией клеток крови, то полученные нами данные очень перспективны для поиска потенциальных мишеней при фармакологической и генной терапии. Однако для подтверждения этих предположений требуются дальнейшие исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 07-04-00679 и 08-04-00659).

Список литературы

- Семенова С. Б., Негуляев Ю. А. 2006. Эндогенные катион-транспортирующие каналы в клетках миелоидной лейкемии человека. Биол. мембр. 23(4) : 321–329.
- Almers W., McCleskey E. W. 1984. Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle: calcium selectivity in a single-file pore. J. Physiol. 353 : 585–608.
- Boyum A. 1968. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. J. Clin. Lab. Invest. 21 : 9–29.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162 : 156–159.
- Chapham D. E. 2003. TRP channels as cellular sensors. Nature. 426 : 517–524.
- Cui J., Bian J. C., Kagan A., McDonald T. V. 2002. CaT1 contributes to the stores-operated calcium current in Jurkat T-lymphocytes. J. Biol. Chem. 277 : 47 175–47 183.
- Dolmetsch R. E., Lewis R. S., Goodnow C. C., Healy J. I. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. Nature. 386 : 855–858.
- Fanger C. M., Hoth M., Crabtree G. R., Lewis R. S. 1995. Characterization of T cell mutants with defects in capacitative calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels. J. Cell Biol. 131 : 655–667.
- Feske S. 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. Nat. Rev. Immunol. 7 : 690–702.
- Feske S., Gwack Y., Prakria M., Srikanth S., Puppel S. H., Tanasa B., Hogan P. G., Lewis R. S., Daly N., Rao A. 2006. A mutation in Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. Nature. 441 : 179–185.
- Frockerzi V. 2007. An introduction on TRP channels. Handb. Exp. Pharmacol. 179 : 1–19. Review.
- Foster C. S., Cornfold P., Forsyth L., Djamgoz M. B., Ke Y. 1999. The cellular and molecular basis of prostate cancer. BJU Int. 83 : 171–194.
- Gwack Y., Feske S., Srikanth S., Hogan P. G., Rao A. 2007. Signalling to transcription: store-operated Ca^{2+} entry and NFAT

- activation in lymphocytes. *Cell Calcium*. 42 : 145—156. Review.
- Hardie M. C., Minke D. 1995. Phosphoinositide-mediated phototransduction in *Drosophila* photoreceptors: the role of Ca²⁺ and trp. *Cell Calcium*. 18 : 256—274.
- Haverstick D. M., Heady T. N., Macdonald T. L., Gray L. S. 2000. Inhibition of human prostate cancer proliferation *in vitro* and in mouse model by a compound synthesized to block Ca²⁺ entry. *Cancer Res*. 60 : 1002—1008.
- Hoenderop J. G., Hartog A., Stuiver M., Doucet A., Willem P. H., Bindels R. J. 2000. Localization of the epithelial Ca²⁺ channel in rabbit kidney and intestine. *J. Amer. Soc. Nephrol*. 11 : 1171—1178.
- Hoenderop J. G., Vennekens R., Muller D., Prenen J., Droogmans G., Bindels R. J., Nilius B. 2001. Function and expression of the epithelial Ca²⁺ channel family: comparison of mammalian ECaCl and 2. *J. Physiol*. 537 : 747—761.
- Hoenderop J. G., Voets T., Hoefs S., Weidema F., Prenen J., Nilius B., Bindels R. J. 2003. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J*. 22 : 776—785.
- Hofmann T., Obukhov A. G., Schaefer M., Harteneck C., Gudermand T., Schultz G. 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*. 397 : 259—263.
- Hogan P. G., Rao A. 2007. Dissecting ICRAC, a store-operated calcium current. *Trends Biochem. Sci*. 32 : 235—245.
- Hoth M. 1995. Calcium and Barium permeation through calcium release-activated calcium (CRAC) channels. *Pflugers Arch*. 430 : 315—322.
- Hoth M., Penner R. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. 355 : 353—356.
- Khanna R., Myers M. P., Laine M., Papazian D. M. 2001. Glycosylation increases potassium channel stability and surface expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem*. 276 : 34 028—34 034.
- Lehen'kyi V., Flourakis M., Skryma R., Prevarskaya N. 2007. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene*. 26 : 7380—7385.
- Montell C., Birnbaumer L., Flockerzi V. 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*. 108 : 595—598.
- Montell C., Rubin G. M. 1989. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 2 : 1313—1323.
- Muller D., Hoenderop J. G., Merx G. F., van Os C. H., Bindels R. J. 2000. Gene structure and chromosomal mapping of human epithelial calcium channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 275 : 47—52.
- Nijenhuis T., Hoenderop J. G., Bindels R. 2005. TRPV5 and TRPV6 in Ca²⁺ (re)absorption: regulating Ca²⁺ entry at the gate. *Pflugers Arch*. 451 : 181—192.
- Philipp S., Strauss B., Hirnet D., Wissenbash U., Mery L., Flockerzi V., Hoth M. 2003. TRPC3 mediates T-cell receptor-dependent calcium entry in human T-lymphocytes. *J. Biol. Chem*. 278 : 26 629—26 638.
- Revankar C. M., Advani S. H., Naik N. R. 2006. Altered Ca²⁺ homeostasis in polymorphonuclear leukocytes from chronic myeloid leukaemia patients. *Mol. Cancer*. 275 : 55—65.
- Scharff O., Foder B. 1993. Regulation of cytosolic calcium in blood cells. *Physiol. Rev*. 73 : 547—582.
- Schwarz E. C., Wissenbash U., Niemeyer B. A., Strauss B., Philipp S. E., Flockerzi V., Hoth M. 2006. TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. *Cell Calcium*. 39 : 163—173.
- Semenova S. B., Fomina A. F., Vassilieva I. O., Negulyaev Y. A. 2005. Properties of Mg²⁺-dependent cation channels in human leukemia K562 cells. *J. Cell. Physiol*. 205 : 372—378.
- Vazquez G., Lievreumont J. P., St J. Bird G., Putney J. W. 2001. Human Trp3 forms both inositol trisphosphate receptor-dependent and receptor-independent store-operated cation channels in DT40 avian B lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 98 : 11 777—11 782.
- Vazquez G., Wedel B. J., Trebak M., St John Bird G., Putney J. W., Jr. 2003. Expression level of the canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channel determines its mechanism of activation. *J. Biol. Chem*. 278 : 21 649—21 654.
- Voets T., Prenen J., Fleig A., Vennekens R., Watanabe H., Hoenderop J. G., Bindels R. J., Droogmans G., Penner R., Nilius B. 2001. CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J. Biol. Chem*. 276 : 47 767—47 770.
- Wissenbach U., Niemeyer B. A., Fixemer T., Schneidewind A., Trost C., Cavalie A., Reus K., Meese E., Bonkhoff H., Flockerzi V. 2001. Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J. Biol. Chem*. 276 : 19 461—19 468.
- Yue I., Peng J. B., Hediger M. A., Clapham D. E. 2001. CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature*. 410 : 705—709.
- Zweifach A., Lewis R. S. 1993. Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 90 : 6295—6299.

Поступила 4 VI 2008

TRPV5 AND TRPV6 CALCIUM CHANNELS IN HUMAN T CELLS

I. O. Vassilieva, Yu. A. Negulyaev, I. I. Marakhova, S. B. Semenova¹Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; ¹ e-mail: svsem@mail.cytspb.rssi.ru

The recent cloning of the special calcium channels TRPV5 and TRPV6 (transient receptor potential vanilloid channels) provided the molecular base for the studying of new candidate of calcium influx in non-excitabile cells. Using RT-PCR technique we obtained endogenous expression of the mRNAs *trpv5* and *trpv6* in lymphoblast leukemia Jurkat cells and in human blood primary T lymphocytes. Additionally, Western blot analysis showed TRPV5 proteins in both the whole lysate and in the crude membrane preparations from Jurkat cells and normal T lymphocytes. The using of the immunoprecipitation revealed TRPV6 proteins in Jurkat cells, whereas in normal T lymphocytes TRPV6 was not detected. The expression pattern and the selective Ca²⁺ permeation properties of TRPV5 and TRPV6 channels indicate an important role of these channels in the Ca²⁺ homeostasis and probably in malignant transformation of blood cells.

Key words: TRPV5, TRPV6 calcium channels, RT-PCR, expression of channel proteins, human T cells.