

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАНАЛОВ TRPV5 И TRPV6 В НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

© В. Н. Томилин, И. О. Васильева, И. И. Марахова, Ю. А. Негуляев, С. Б. Семенова*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

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

Кальциевая сигнализация и Ca^{2+} -проводящие каналы участвуют в развитии иммунного ответа, пролиферации, росте и дифференцировке лимфоцитов. В настоящей работе в плазматической мембране Т-клеток линии Jurkat и нормальных лимфоцитов крови человека исследовали Ca^{2+} -каналы TRPV5 и TRPV6 (transient receptor potential vanilloid channels). Каналы спонтанно активировались при удалении Ca^{2+} и Mg^{2+} из растворов и инактивировались в присутствии эффективного блокатора каналов TRPV5 и TRPV6, рутениевого красного. Вольт-амперная характеристика каналов демонстрировала входящее выпрямление токов. Активность каналов в клетках Jurkat оказалась существенно выше, чем в нормальных лимфоцитах человека. ПЦР-анализ в режиме реального времени выявил более высокий уровень генов мРНК, кодирующих TRPV5 и TRPV6 в Т-клетках линии Jurkat по сравнению с нормальными лимфоцитами. В целом полученные данные показали, что экспрессируемые в лимфоцитах крови каналы TRPV5 и TRPV6 функционально активны и их активность связана с пролиферативным статусом клеток крови.

Ключевые слова: лимфоциты, каналы TRPV5 и TRPV6, патч-кламп, ПЦР в реальном времени, пролиферация.

Ионы кальция являются регуляторами практически всех жизненно важных клеточных процессов. К ним, в частности, относятся события, которые решают судьбу клетки — выживание, деление, подвижность, апоптоз и дифференцировку. При стимуляции внеклеточными сигналами, такими как гормоны, факторы роста и цитокины, в клетках возникают координируемые во времени и пространстве Ca^{2+} -осцилляции (Bootman et al., 2001). В стимулированных митогеном лимфоцитах осцилляции внутриклеточного Ca^{2+} способствуют активации Ca^{2+} -зависимых транскрипционных факторов и вхождению клеток в клеточный цикл, обеспечивая дальнейшую клональную пролиферацию и формирование иммунного ответа (Tomida et al., 2003). Известно, что колебания уровня внутриклеточного Ca^{2+} контролируются белками, расположенными в плазматической мембране клеток (Carafoli et al., 2001; Berridge et al., 2003; Santella et al., 2004) и в мембранах цитоплазматических органелл (Bianchi et al., 2004; Gerasimenko, Gerasimenko, 2004). Но многие данные указывают на исключительную роль именно входа внеклеточного Ca^{2+} в контроле за клеточным ростом и делением (Santella, 1998; Lipskaia, Lompre, 2004; Munaron et al., 2004). Вход ионов кальция из наружной среды внутрь клетки осуществляется через Ca^{2+} -проницаемые катионные каналы плазматической мембраны клеток, которые имеют разные уровни селективности, проводимости, разную кинетику и могут поддерживать продолжительный внутриклеточный Ca^{2+} -сигнал.

В клетках крови каналы для входа Ca^{2+} до сих пор недостаточно исследованы, и не существует единого мнения относительно их молекулярной природы и путей ак-

тивации. Принято считать, что одним из основных путей поступления Ca^{2+} в клетки крови является вход через ионные каналы CRAC (calcium release activated channels), структурными компонентами которых являются недавно открытые белки ORAI1, взаимодействующие с Ca^{2+} -сенсорами эндоплазматического ретикулума (белками STIM1) (см. обзор: Hogan et al., 2010). Наряду с этими данными появилось достаточное количество других, свидетельствующих об экспрессии в клетках крови иных Ca^{2+} -проводящих каналов, включая каналы большого суперсемейства TRP (см. обзор: Schwarz et al., 2007), однако их функции в клетках крови пока не исследованы.

Два представителя суперсемейства TRP — кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6 (первоначально известные как кальциевые транспортеры CaT2 и CaT1, или эпителиальные кальциевые каналы ECaC1 и ECaC2) — были впервые клонированы из эпителиальных клеток почки кролика и тонкого кишечника крысы (Hoenderop et al., 1999, 2000; Peng et al., 1999). Позднее TRPV5 и TRPV6 были отнесены к подсемейству каналов TRPV (transient receptor potential vanilloid channels) и идентифицированы в клетках других млекопитающих, включая человека (Nijenhuis et al., 2005). Сейчас известно, что белки TRPV5 и TRPV6 состоят примерно из 730 аминокислот, имеют 6 трансмембранных сегментов и длинные цитоплазматические N- и C-хвосты. Каналы имеют тетрамерную стехиометрию, кроме того, обнаружено, что они способны формировать гетеротетрамерные комплексы, включающие в себя субъединицы обоих каналов TRPV5 и TRPV6 (Hoenderop et al., 2003). Показано, что каналы TRPV5 и TRPV6 могут обеспечивать строго дозированное поступ-

ление кальция и участвовать в активной Ca^{2+} -(ре)абсорбции в эпителиальных клетках почек, тонком кишечнике и плаценте (Hoenderop et al., 2001, 2002).

В настоящее время установлена потенциальная связь каналов TRPV5 и TRPV6 с различными заболеваниями. Так, фенотипы TRPV5^{-/-} и TRPV6^{-/-} трансгенных мышей указывают на то, что эти каналы ответственны за многие заболевания, связанные с нарушением кальциевого обмена и образованием камней в почках (Nijenhuis et al., 2005). Кроме того доказано, что повышенная экспрессия белков TRPV6, которая в норме не наблюдается, выявляется при образовании злокачественной опухоли в предстательной железе; более того, уровень экспрессии TRPV6 увеличивается при переходе опухоли в метастазирующую стадию (Wissenbach et al., 2001).

Ранее на уровне мРНК и белка мы впервые показали экспрессию TRPV5 и TRPV6 в Т-клетках линии Jurkat и экспрессию TRPV5 в нормальных лимфоцитах периферической крови человека. Достоверно выявить присутствие белка TRPV6 в нормальных лимфоцитах человека нам не удалось (Васильева и др., 2008). Задача настоящей работы заключалась в исследовании функциональной активности каналов TRPV5 и TRPV6 в плазматической мембране клеток Jurkat и нормальных лимфоцитов человека. Кроме того, было проведено количественное исследование и сравнение экспрессии TRPV5 и TRPV6 в трансформированных и нормальных лимфоцитах крови человека.

Материал и методика

Клетки линии Jurkat и K562, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) культивировали при 37 °С в среде RPMI 1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 0.008 % гентамицина. В день опыта клетки пересевали на покровные стекла (4×4 мм), покрытые полилизинном и помещенные в пластиковые чашки.

Выделение и культивирование лимфоцитов периферической крови человека. Лимфоциты выделяли из свежей донорской крови по общепринятой методике (Woyum, 1968). Лейкоцитарную фракцию отбирали после осаждения эритроцитов, добавляя в кровь 6%-ный раствор декстрана T500. Суспензию лейкоцитов (пробы по 8 мл) наслаивали на 3 мл Lymphosep (Sigma, США) и центрифугировали в течение 30 мин при 600 g. После центрифугирования интерфазу переносили в пробирки объемом сначала 50, затем 10 мл и 3 раза промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) следующего состава (в мМ): 137 NaCl, 8 Na₂HPO₄, 2.7 KCl и 1.5 KH₂PO₄. Для удаления макрофагов клеточную суспензию после отмывки разбавляли средой RPMI-1640 без антибиотиков и помещали в пластиковые матрацы, предварительно обработанные 10%-ной сывороткой человека группы крови 0 (1), и оставляли на 40 мин при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Далее полученную суспензию лимфоцитов (2 млн/мл) разливали во флаконы по 40—50 мл. На следующие сутки суспензию переносили во флаконы по 10—15 мл при концентрации клеток 1.5—2 млн/мл. Лимфоциты использовали на следующий день после выделения.

Регистрацию токов проводили методом локальной фиксации потенциала на изолированных мембранных фрагментах в конфигурации outside-out (когда на-

ружная поверхность мембраны обращена в регистрирующую камеру). Стеклообразные микроэлектроды были изготовлены на микрокузнице Р-97 (Sutter Instrument, США) и имели сопротивление 5—15 МОм. Трансмембранные ионные токи регистрировали высокоточным измерительным усилителем Axopatch 200B (Molecular/Devices, США). Сигнал из усилителя записывали на диск компьютера в реальном масштабе времени через 12-разрядный аналого-цифровой преобразователь с частотой оцифровки 5 кГц. Мембранный потенциал измеряли относительно потенциала наружного раствора. Активность каналов вычисляли по формуле $NP_o = I/i$, где I — средний ток, протекающий через фрагмент мембраны за определенный промежуток времени, i — амплитуда тока одиночного канала, N — число зарегистрированных каналов. Обработку данных и подготовку графиков проводили при помощи программы для обработки записей токов одиночного ионного канала pClamp 6 (Molecular/Devices, США) и графической программы Microcal Origin 6.0 (Microcal Software). Все опыты проводили при комнатной температуре (21—23 °С). Основной наружный раствор в экспериментальной камере содержал (в мМ): 140 метансульфоната Na⁺, 5 KCl, 10 N-2-гидроксиэтил-этилендиамин триуксусной кислоты (HEDTA), 10 HEPES/Tris и 10 D-глюкозы. Основной раствор в пипетке для регистрации в режиме outside-out имел состав (в мМ): 140 аспартата K⁺, 5 NaCl, 10 хелатора Ca²⁺ 1,2-бис(о-аминофеноксид) этан-N, N, N', N'-тетрауксусной кислоты (Bapta), 10 HEPES/Tris и 10 D-глюкозы. Величину pH всех растворов поддерживали на уровне 7.3. В работе использовали реактивы фирмы Sigma-Aldridge (США).

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) были проведены в соответствии с ранее опубликованным протоколом (Васильева и др., 2008). Общую РНК выделяли из клеток стандартным методом с применением гуанидин-изотиоцианата с последующей экстракцией фенол-хлороформом (Chomczynski, Sacchi, 1987). Праймеры для PCR были синтезированы согласно опубликованным последовательностям (Hoenderop et al., 2001).

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили для количественного анализа содержания мРНК генов TRPV5 и TRPV6 в клетках крови, на детектирующем амплификаторе Bio-Rad iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, США). Использовали специфичные праймеры и линейные разрушаемые пробы TaqMan, меченные флуорофором и гасителем флуоресценции. В качестве референсных генов (housekeeping genes) были выбраны гены, кодирующие гипоксантин фосфорибозилтрансферазу 1 (HPRT1) и α -субъединицу сукцинатдегидрогеназы (SDHA). Праймеры и TaqMan-пробы были синтезированы в компании Синтол (Россия). Для ПЦР-РВ использовали следующие праймеры и зонды к указанным генам (все последовательности написаны в ориентации 5'-3'): TRPV5 (TCACAGAGATCGACTCCTG, CCTTCACTGGGGTCT-GTTC, FAM-TCTGATAAACGAGAGGCTCGCCA-BHQ1); TRPV6 (ATGAGCGGGATGAGCTGTG, ATACTCCCGT-CCGCAGATC, FAM-CCCAGATTGTGGCCACCACGG-BHQ1); HPRT1 (GTCAGGCAGTATAATCCAAAG, GAA-TTCAAATCCAACAAAGTC, HEX-AAGCTTGCGACC-TTGACCATCTT-BHQ1); SDHA (CCACTCGCTATTGCACACC, CACTCCCCGTTCTCCATCA, JOE-ACGGTCTCT-CCGATATGATACCA-BHQ).

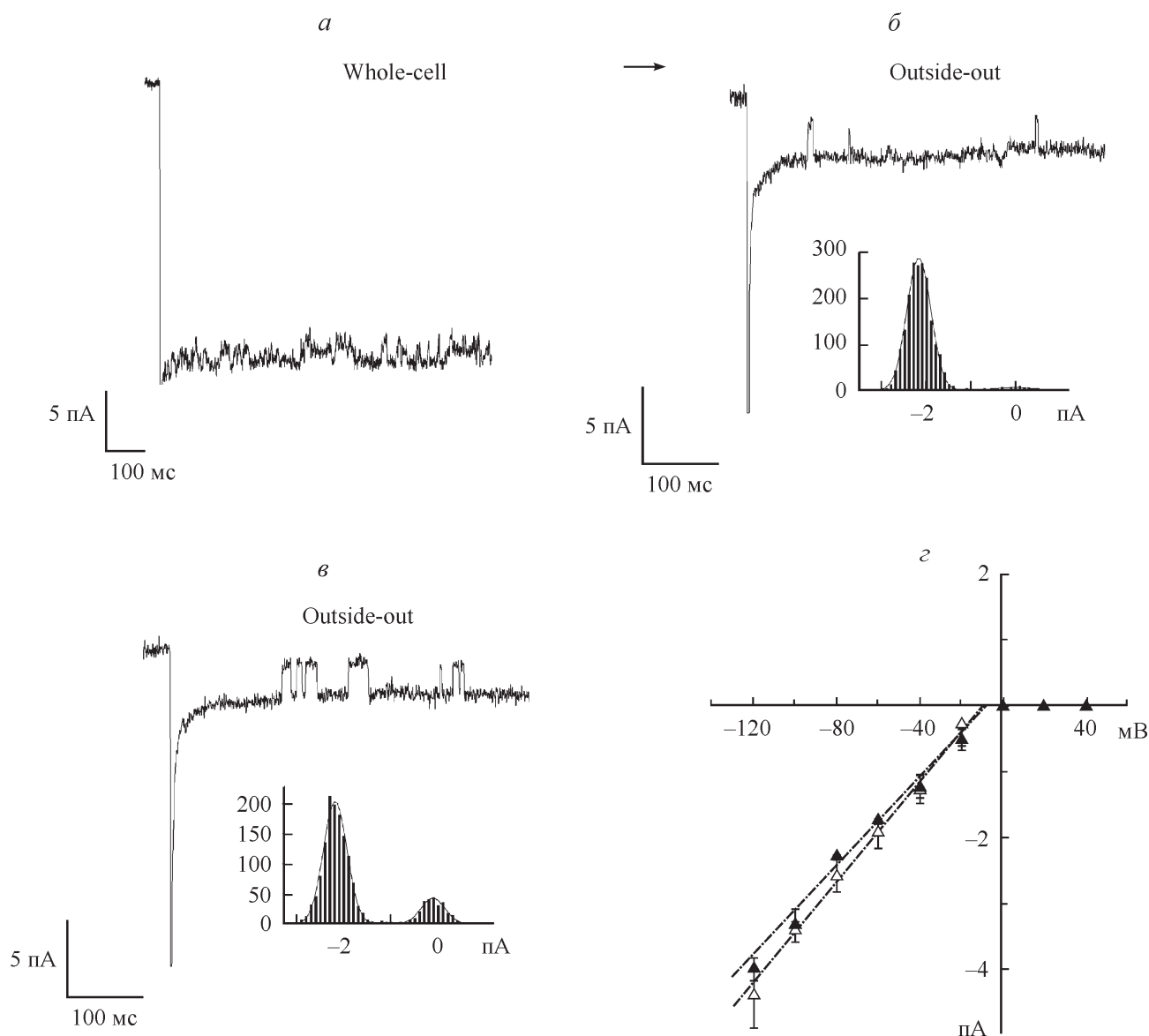


Рис. 1. Каналы, зарегистрированные в нормальных лимфоцитах и клетках Jurkat, имеют сходные характеристики с каналами TRPV5 и TRPV6.

a, б — регистрация токов от целой клетки (whole-cell) лимфоцита периферической крови и после отделения от лимфоцита мембранного фрагмента (outside-out) соответственно; *в* — токи, зарегистрированные в клетках Jurkat (конфигурация outside-out); *г* — обобщенная вольт-амперная характеристика токов, зарегистрированных в нормальных лимфоцитах (черные треугольники) и в клетках Jurkat (белые треугольники) (данные 5—19 экспериментов). Раствор в пипетке содержал 140 мМ К⁺-аспартата/10 мМ Ca²⁺-хелатора Варта, поддерживаемый потенциал на мембране — 70 мВ. Представлены средние значения и стандартная ошибка. Различия достоверны при $P < 0.05$.

После оптимизации условий ПЦР, включающей в себя подбор температуры отжига и подбор концентраций праймеров и проб, эффективность амплификации была близка к 100%. ПЦР проводили в реакционном объеме 20 мкл, содержащем 2 мкл разведенной кДНК, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, Hot-Taq-буфер, 2 ед. Hot-Taq-полимеразы. Условия амплификации: 95 °С 10 мин, 48 циклов, 63 °С 60 с, 95 °С 20 с. Флуоресценцию детектировали в каждом цикле в конце стадии отжига (элонгации) (63 °С). Для анализа данных использовали величину порогового цикла реакции (cycle threshold, Ct). Линию порога выставляли по логарифмической шкале таким образом, чтобы ее уровень примерно соответствовал середине участка линейного накопления логарифма сигнала (середина фазы экспоненциального роста). Расчет базовой линии проводили автоматически.

Результаты

Известно, что Ca²⁺-селективные каналы обладают чрезвычайно низкой проводимостью в физиологических растворах, что значительно затрудняет исследование их функций и параметров. При отсутствии двухвалентных ионов эти каналы становятся проницаемыми для одновалентных катионов (Na⁺, K⁺) и амплитуда тока через эти каналы возрастает в несколько раз (Hoth, Penner, 1993; Premack et al., 1994). Исходя из этого в экспериментах патч-кламп для изучения свойств каналов TRPV5 и TRPV6 мы использовали растворы, не содержащие ионов кальция и магния.

При использовании 140 мМ Na⁺ в качестве основного носителя тока и поддерживаемом потенциале на мембране -70 мВ активность каналов развивалась сразу, в начале

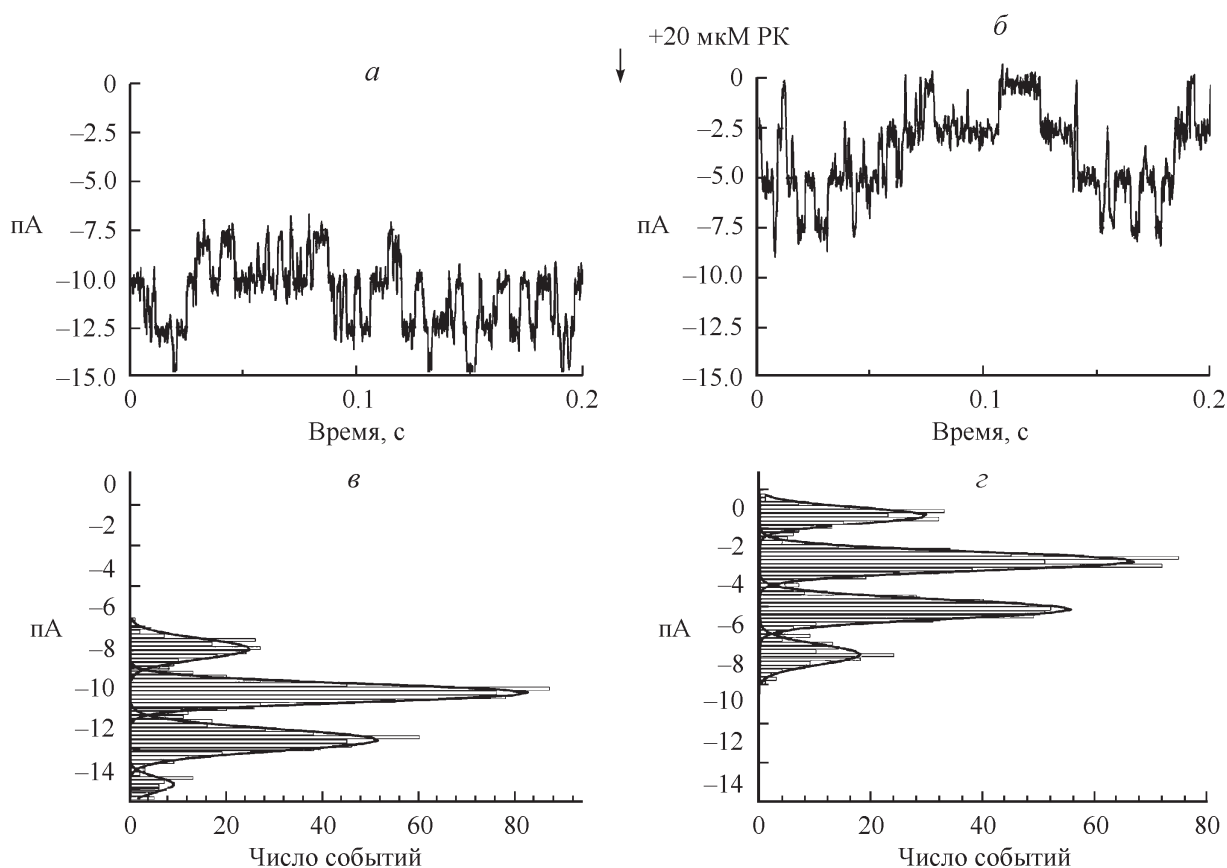


Рис. 2. Подавление активности каналов в клетках Jurkat ингибитором каналов TRPV5 и TRPV6 рутениевым красным (РК). Представлены записи токов через одиночные каналы (конфигурация outside-out) в клетках Jurkat до (а) и после добавления (б) в раствор РК. Видно, что добавление 20 мкМ РК к наружной стороне мембранного фрагмента существенно подавляет активность каналов. в, г — соответствующие амплитудные гистограммы, описанные функцией Гаусса. Расстояние между пиками гистограмм соответствует амплитуде одиночного открывания канала (пА). Раствор в пипетке содержал 140 мМ K^+ -аспартата/10 мМ Ca^{2+} -хелатора Варта. Поддерживаемый потенциал на мембране — 70 мВ.

регистрации токов от целой клетки (whole-cell) и постепенно увеличивалась по мере проникновения кальциевого хелатора Варта из регистрирующей пипетки внутрь клетки (рис. 1, а). После отделения фрагмента мембраны от клетки и образования outside-out конфигурации число каналов существенно уменьшалось, но активность каналов сохранялась на протяжении всего эксперимента (рис. 1, а—в). Усредненные значения амплитуд унитарных токов, рассчитанные по амплитудным гистограммам, для клеток Jurkat и покоящихся лимфоцитов были близки: -2.3 ± 0.1 пА ($n = 11$) и -2.0 ± 0.1 пА ($n = 8$) соответственно. Значения вероятности открытого состояния каналов (P_o), полученные из анализа записей токов одиночных каналов, значительно уменьшались при деполяризации мембраны, и при мембранном потенциале выше -20 мВ активность каналов практически отсутствовала ($n = 15$). Вольт-амперная характеристика (ВАХ), построенная по усредненным данным ($n = 5-19$), отражала входящее выпрямление унитарных токов (рис. 1, з). Потенциал реверсии токов, полученный путем экстраполяции, имел значение около 0 мВ.

Значения проводимости каналов, рассчитанные по наклону ВАХ при отрицательных потенциалах, составляли в клетках Jurkat и покоящихся лимфоцитах 38.0 ± 0.3 и 36 ± 0.2 пСм соответственно и были близки к значениям проводимости каналов TRPV5 и TRPV6, зарегистрированным нами ранее в клетках K562 (Semenova et al., 2009). Активность одиночных каналов была зарегистри-

рована в 63 % экспериментов (в 19 из 30), проведенных на изолированных фрагментах клеток Jurkat, и в 28 % экспериментов (в 9 из 32), проведенных на покоящихся лимфоцитах. Следует отметить, что число активных каналов, обнаруженных в клетках Jurkat, было значительно больше, чем в нормальных лимфоцитах человека. Общая активность каналов (NP_o) в изолированных фрагментах мембраны клеток Jurkat оказалась выше (2.18 ± 0.27 ; $n = 19$), чем в лимфоцитах крови человека (1.15 ± 0.13 ; $n = 9$).

Согласно литературным данным, каналы TRPV6 и TRPV5 имеют сходные биофизические характеристики, однако их можно дифференцировать по чувствительности к известному ингибитору этих каналов рутениевому красному (РК). Мы исследовали влияние РК в различных концентрациях на активность каналов в клетках Jurkat. Трансмембранные токи регистрировали при постоянном значении разности потенциалов на мембране (-70 мВ). После активации каналов в режиме outside-out в регистрирующую камеру подавали растворы с содержанием РК от 0.1 до 50 мкМ. На рис. 2, а—г представлены типичные записи токов через одиночные каналы, из которых видно, что активность каналов постепенно подавляется при добавлении РК. Следует отметить, что в клетках Jurkat регистрируемые каналы обладали разной чувствительностью к ингибитору РК. Всего было проведено 18 независимых экспериментов на изолированных (outside-out) фрагментах клеток Jurkat с использованием РК. Из них в

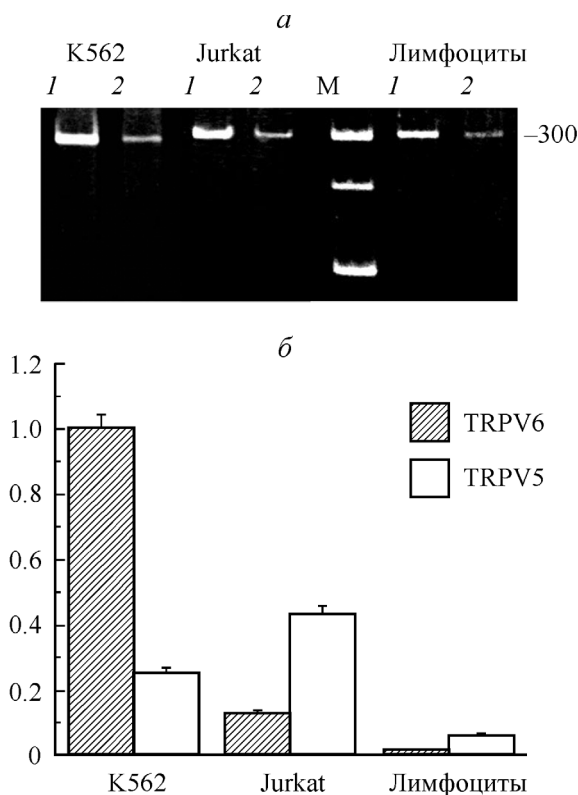


Рис. 3. Экспрессия мРНК генов *TRPV5* и *TRPV6* в клетках K562, Jurkat и лимфоцитах периферической крови человека.

a — методом ОТ-ПЦР с использованием ген-специфичных праймеров показана амплификация *TRPV5* и *TRPV6* в разных клетках крови; дорожки: 1 — *TRPV5* (312), 2 — *TRPV6* (301 п. н.), М — маркерная ДНК (300 п. н.). *б* — уровни экспрессии мРНК генов *TRPV5* и *TRPV6* в разных клетках крови, отн. ед., по данным ПЦР в реальном времени. Представлены средние значения и их стандартная ошибка (Standard Error Means, SEM). Различия достоверны при $P < 0.05$.

7 экспериментах полное ингибирование каналов происходило при действии 500 нМ РК, рассчитанная концентрация полумаксимального ингибирования тока ($IC_{50} = 190 \pm 9.3$ нМ) соответствовала величине IC_{50} , полученной для каналов TRPV5. В 6 экспериментах полное подавление активности каналов происходило при действии 50 мкМ РК, и концентрация полумаксимального ингибирования ($IC_{50} = 8.5 \pm 1.5$ мкМ) соответствовала величине IC_{50} , рассчитанной для каналов TRPV6. В остальных 5 экспериментах каналы инактивировались при эстраклеточном добавлении 200 нМ, 10 и 20 мкМ РК.

Полученные в настоящей работе электрофизиологические данные выявили более высокую активность каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat, чем в нормальных лимфоцитах человека. По нашему предположению, это могло быть результатом повышенной экспрессии этих белков в постоянно пролиферирующей линии Jurkat по сравнению с покоящимися лимфоцитами. Ранее нами была проведена оценка экспрессии генов *TRPV5* и *TRPV6* на уровне мРНК в клетках K562 (Semenova et al., 2009), клетках Jurkat и нормальных лимфоцитах человека (Васильева и др., 2008). ОТ-ПЦР-анализ с конечной электрофоретической детекцией продуктов реакции показал амплификацию фрагментов ожидаемых расчетных размеров (рис. 3, *a*), что свидетельствовало о наличии транскриптов генов *TRPV5* и *TRPV6* в исследуемых клетках крови. В настоящей работе мы оценивали уровни экспрессии

TRPV5 и *TRPV6* в разных клетках крови с использованием количественного ПЦР-анализа в реальном времени (ПЦР-РВ).

Анализ значений пороговых циклов (C_t) для референсных генов *HPRT* и *SDHA*, полученный в образцах покоящихся лимфоцитов, клеток Jurkat и клеток линии K562 с использованием программы BestKeeper 1.0 (Pfaffl et al., 2004), показал, что экспрессия гена *SDHA* является более стабильной ($C_t = 23.83 \pm 0.63$) по сравнению с *HPRT* ($C_t = 25.91 \pm 1.02$). Исходя из этих данных нормирование содержания мРНК исследуемых генов проводили относительно содержания мРНК гена *SDHA*. В образцах клеток K562 средние значения C_t составили: для гена *TRPV5* 31.77 ± 0.15 ($n = 3$), для гена *TRPV6* 29.68 ± 0.11 ($n = 3$), для гена *SDHA* 23.16 ± 0.12 ($n = 6$). Значения C_t в образцах клеток Jurkat составили: для гена *TRPV5* 32.22 ± 0.18 ($n = 3$), для гена *TRPV6* 33.96 ± 0.16 ($n = 3$), для гена *SDHA* 24.49 ± 0.15 ($n = 6$). Значения C_t в образцах лимфоцитов периферической крови составили: для гена *TRPV5* 34.11 ± 0.74 ($n = 6$), для гена *TRPV6* 35.62 ± 0.48 ($n = 6$), для гена *SDHA* 23.67 ± 0.81 ($n = 12$). При обработке результатов ПЦР-РВ вычисляли значение $2^{-\Delta\Delta C_t}$, которое показало относительный уровень экспрессии генов *TRPV5* и *TRPV6* в разных клетках крови. $\Delta\Delta C_t$ рассчитывали как $\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{исследуемого гена}} - C_{tSDHA})_{\text{исследуемого образца}} - (C_{tTRPV6} - C_{tSDHA})_{\text{клеток K562}}$. На гистограммах рис. 3, *б* представлены усредненные данные, из которых следует, что в клетках Jurkat и клетках K562 относительный уровень экспрессии гена *TRPV5* выше, чем в нормальных лимфоцитах человека. Также гистограммы демонстрируют, что уровень гена *TRPV6* в клетках K562 и клетках Jurkat значительно выше, чем в нормальных лимфоцитах человека, где он едва детектируется.

Обсуждение

Наши результаты представляют первую функциональную идентификацию кальциевых каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках линии Jurkat и нормальных лимфоцитах, выделенных из периферической крови человека. Ранее нами была показана экспрессия каналов TRPV5 и TRPV6 на уровне мРНК и белка в клетках K562 (Semenova et al., 2009), клетках Jurkat и нормальных лимфоцитах крови человека (Васильева и др., 2008). В настоящей работе методом патч-кламп в плазматической мембране клеток Jurkat и нормальных лимфоцитов крови человека были зарегистрированы каналы, обладающие биофизическими свойствами, подобными свойствам каналов TRPV5 и TRPV6. Рассчитанные проводимости каналов имели близкие значения в клетках Jurkat и покоящихся лимфоцитах. Их величины соответствовали проводимости каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках K562 (Semenova et al., 2005, 2009) и проводимости рекомбинантных каналов TRPV5 и TRPV6 в идентичных ионных условиях (Nilius et al., 2000; Yue et al., 2001).

Известно, что кальцевые каналы TRPV5 и TRPV6 проявляют свойство селективности для Ca^{2+} даже в сравнении с другими двухвалентными катионами, такими, как например Ba^{2+} и Sr^{2+} , но в отсутствие двухвалентных катионов каналы TRPV5 и TRPV6 демонстрируют потенциалзависимую кинетику, а также свойство входящего выпрямления токов (Hoenderop et al., 2001; Voets et al., 2001, 2003; Yue et al., 2001). Зарегистрированные нами в клетках Jurkat и лимфоцитах крови человека унитарные

токи также имели входящее выпрямление и по этому параметру были похожи на рекомбинантные каналы TRPV5 и TRPV6. Мы обнаружили, что входящее выпрямление сохраняется после изоляции фрагмента мембраны в раствор, не содержащий двухвалентных катионов. Это, по-видимому, обусловлено особенностями воротного механизма каналообразующей молекулы, а не потенциалзависимой блокадой канала ионами магния или полиаминами, как это характерно, например, для калиевых каналов (Kir channels) входящего выпрямления (Ficker et al., 1994; Lopatin et al., 1994; Matsuda, 2001).

Ранее было показано, что каналы TRPV5 и TRPV6 имеют разную чувствительность к рутениевому красному (РК) (Hoenderop et al., 2001). Каналы TRPV5 примерно в 100 раз оказались чувствительнее к РК, чем каналы TRPV6 (Hoenderop et al., 2001). В наших экспериментах на клетках Jurkat и покоящихся лимфоцитах активность каналов подавлялась РК в широком диапазоне концентраций (от 500 нМ до 50 мкМ). Так, концентрация полумаксимального действия (IC_{50}) РК в ряде экспериментов оказалась равной 190 нМ и была близка к значению IC_{50} , полученному для рекомбинантных каналов TRPV5 (130 нМ) (Hoenderop et al., 2001). В других экспериментах оказалось, что для подавления активности каналов требовались более высокие концентрации РК. Значение IC_{50} (8.5 мкМ) в этих экспериментах было достаточно близко значению IC_{50} (9 мкМ), полученному для рекомбинантных каналов TRPV6 (Hoenderop et al., 2001). В соответствии с этими данными был сделан вывод о том, что в плазматической мембране клеток Jurkat присутствуют оба типа каналов — TRPV5 и TRPV6.

Следует отметить, что в некоторых случаях каналы инaktivировались РК при концентрациях более высоких, чем это было необходимо для ингибирования TRPV5, и в то же время недостаточных для ингибирования TRPV6. Эти данные указывают на присутствие каналов с особыми свойствами поры, которые могли быть сформированы в результате объединения субъединиц разных белков TRPV5 и TRPV6 в один гетеромультимерный канал. Возможность формирования таких комплексов между TRPV5 и TRPV6 была показана в искусственных экспрессионных системах (Hoenderop et al., 2003). Более того, увеличение субъединиц TRPV6 в таких гетеротетрамерных комплексах по отношению к TRPV5 приводило к уменьшению чувствительности каналов к РК (Hoenderop et al., 2003). Вполне вероятно, что соотношение субъединиц TRPV5/TRPV6, формирующих гетеротетрамерные каналы, может обеспечивать механизм для тонкой регуляции транспорта Ca^{2+} и кальцийзависимых функций, таких как пролиферация и дифференцировка, в клетках крови.

В последние годы накапливаются данные о том, что некоторые каналы TRP участвуют как в поддержании нормального гомеостаза Ca^{2+} , так и в развитии и прогрессии опухолей. Строгая корреляция между увеличением экспрессии мРНК каналов TRPV6 и стадией малигнизации клеток впервые была показана в исследованиях на клетках предстательной железы (Wissenbach et al., 2001). В настоящее время повышенная экспрессия каналов TRPV6 обнаружена в карциномах предстательной и щитовидной желез, кишечника и яичников (Peng et al., 2001). Также появляются работы, указывающие на то, что вход Ca^{2+} через каналы TRPV6 может модулировать пролиферацию трансформированных клеток и менять их резистентность к апоптозу (Schwarz et al., 2006; Lehen'kyi et al., 2007).

В нашей работе активность каналов TRPV5/TRPV6 была зарегистрирована в 63 % опытов, проведенных на клетках Jurkat, и в 28 % опытов на нормальных лимфоцитах. Более того, активность каналов, представленная как NP_0 , оказалась существенно ниже в нормальных лимфоцитах по сравнению с трансформированными клетками. Результаты показали более высокую плотность каналов TRPV5 и TRPV6 в трансформированных клетках, чем в нормальных лимфоцитах, что свидетельствует о повышенном уровне экспрессии этих каналов в трансформированных клетках. Проведенный анализ ПЦР-РВ подтвердил экспрессию обоих генов TRPV5 и TRPV6 в исследуемых клеточных линиях и выявил значительное увеличение экспрессии этих генов в трансформированных клетках K562 и клетках Jurkat по сравнению с покоящимися лимфоцитами.

Таким образом, полученные результаты показали, что идентифицированные в лимфоцитах человека кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6 функционально активны и их активность коррелирует с пролиферативным статусом клеток крови. Согласно этим данным, можно предположить, что каналы TRPV5 и (или) TRPV6 могут потенциально участвовать в регуляции пролиферации, а возможно, и злокачественной трансформации клеток крови.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-01030-а) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Васильева И. О., Негуляев Ю. А., Марахова И. И., Семенова С. Б. 2008. Кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6 в Т-клетках человека. Цитология. 50 (11): 953—957.
- Berridge M. J., Bootman M. D., Roderick H. L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 : 517—529.
- Bianchi K., Rimessi A., Prandini A., Szabadkai G., Rizzuto R. 2004. Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship. Biochim. biophys. acta. 1742 : 119—131.
- Bootman M. D., Collins T. J., Peppiatt C. M., Prothero L. S., MacKenzie L., De Smet P. et al. 2001. Calcium signalling -an overview. Semin. Cell Develop. Biol. 12 : 3—10.
- Boyum A. 1968. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. J. Clin. Lab. Invest. 21 : 9—29.
- Carafoli E., Santella L., Branca D., Brini M. 2001. Generation, control and processing of cellular calcium signals. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 36 : 107—260.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162 : 156—159.
- Ficker E., Taglialatela M., Wible B. A., Henley C. M., Brown A. M. 1994. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K^+ channels. Science. 266 : 1068—1072.
- Gerasimenko O., Gerasimenko J. 2004. New aspects of nuclear calcium signalling. J. Cell Sci. 17 : 3087—3094.
- Hoenderop J. G., Hartog A., Stuver M., Doucet A., Willems P. H., Bindels R. J. 2000. Localization of the epithelial Ca^{2+} channel in rabbit kidney and intestine. J. Amer. Soc. Nephrol. 11 : 1171—1178.
- Hoenderop J. G. J., Nilius B., Bindels R. J. M. 2002. Molecular mechanism of active Ca^{2+} reabsorption in the distal nephron. Annu. Rev. Physiol. 64 : 529—549.
- Hoenderop J. G., van der Kemp A. W., Hartog A., van de Graaf S. F., van Os C. H., Willems P. H., Bindels R. J. 1999. Molecular identification of the apical Ca^{2+} channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D3-responsive epithelia. J. Biol. Chem. 274 : 8375—8378.

- Hoenderop J. G., Vennekens R., Muller D., Prenen J., Droogmans G., Bindels R. J. M., Nilius B. 2001. Function and expression of the epithelial Ca²⁺ channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J. Physiol.* 537 : 747—761.
- Hoenderop J. G. J., Voets T., Hoefs S., Weidema F., Prenen J., Nilius B., Bindels R. J. M. 2003. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J.* 22 : 776—785.
- Hogan P. G., Lewis R. S., Rao A. 2010. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu. Rev. Immunol.* 28 : 491—533.
- Hoth M., Penner R. 1993. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J. Physiol.* 465 : 359—386.
- Lehen'kyi V., Flourakis M., Skryma R., Prevarskaya N. 2007. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca²⁺/NFAT-dependent pathways. *Oncogene.* 26 : 7380—7385.
- Lipskaia L., Lompre A. M. 2004. Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biol. Cell.* 96 : 55—68.
- Lopatin A. N., Makhina E. N., Nichols C. G. 1994. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature.* 372 : 366—369.
- Matsuda H. 2001. Magnesium gating of the inwardly rectifying K⁺ channel. *Annu. Rev. Physiol.* 53 : 289—298.
- 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.
- Munaron L., Antoniotti S., Pla A. F., Lovisolo D. 2004. Blocking Ca²⁺ entry: a way to control cell proliferation. *Curr. Med. Chem.* 11 : 1533—1543.
- 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.
- Nilius B., Vennekens R., Prenen J., Hoenderop J. G., Bindels R. J., Droogmans G. 2000. Whole-cell and single channel monovalent cation currents through the novel rabbit epithelial Ca²⁺ channel EcaC. *J. Physiol.* 527 : 239—248.
- Peng J. B., Chen X. Z., Berger U. V., Vassilev P. M., Tsukaguchi H., Brown E. M., Hediger M. A. 1999. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J. Biol. Chem.* 274 : 22 739—22 746.
- Peng J. B., Zhuang L., Berger U. V., Adam R. M., Williams B. J., Brown E. M., Hediger M. A., Freeman M. R. 2001. CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282 : 729—734.
- Pfaffl M. W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper — Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Letts.* 26 : 509—515.
- Premack B. A., McDonald T. V., Gardner P. 1994. Activation of Ca²⁺ current in Jurkat T cells following the depletion of Ca²⁺ stores by microsomal Ca²⁺-ATPase inhibitors. *J. Immunol.* 152 : 5226—5240.
- Santella L. 1998. The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244 : 317—324.
- Santella L., Lim D., Moccia F. 2004. Calcium and fertilization: the beginning of life. *Trends Biochem. Sci.* 29 : 400—408.
- Schwarz E. C., Wissenbach 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.
- Schwarz E. C., Wolfs M. J., Tonner S., Wenning A. S., Quintana A., Griesemer D., Hoth M. 2007. TRP Channels in lymphocytes. *Handb. Exp. Pharmacol.* 179 : 445—456. Review.
- 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.
- Semenova S. B., Vassilieva I. O., Fomina A. F., Runov A. L., Negulyaev Y. A. 2009. Endogenous expression of TRPV5 and TRPV6 calcium channels in human leukemia K562 cells. *Amer. J. Physiol.* 296 : 1098—1104.
- Tomida T., Hirose K., Takizawa A., Shibasaki F., Iino M. 2003. 2 NFAT functions as a working memory of Ca²⁺ signals in decoding Ca²⁺ oscillation. *EMBO J.* 22 (15): 3825—3832.
- Voets T., Janssens A., Prenen J., Droogmans G., Nilius B. 2003. Mg²⁺-dependent gating and strong inward rectification of the cation channel TRPV6. *J. Gen. Physiol.* 121 : 245—260.
- 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 L., 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.

Поступила 6 II 2013

THE FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF TRPV5 AND TRPV6 CHANNELS IN NORMAL AND TRANSFORMED HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES

V. N. Tomilin, I. O. Vassilieva, I. I. Marakhova, Yu. A. Negulyaev, S. B. Semenova¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; ¹ e-mail: svsem@mail.cytspb.ru

Calcium signaling and Ca²⁺-conducting channels are involved in the development of immune response, cell proliferation, growth and differentiation of lymphocytes. In this paper the calcium channels TRPV5 and TRPV6 (transient receptor potential vanilloid channels) were studied in the plasma membrane of T cell line Jurkat and normal human blood lymphocytes. The channels were activated by removing Ca²⁺ and Mg²⁺ from surrounding solution, characterized by inward rectification, and were inactivated by the effective blocker of TRPV5 and TRPV6, ruthenium red. Channel activity was significantly higher in Jurkat cells, than in normal human lymphocytes. Quantitative PCR analysis revealed higher levels of mRNA genes encoding channels TRPV5 and TRPV6 in the proliferation cells compared with resting lymphocytes. In general these data showed that TRPV5/TRPV6 in human lymphocytes are functionally active, and their activity is associated with proliferative status of blood cells.

Key words: channels TRPV5 and TRPV6, patch-clamp technique, real-time RT-PCR analysis, proliferation, lymphocytes.