

рН СРЕДЫ РЕГУЛИРУЕТ ВХОД КАЛЬЦИЯ В Т-КЛЕТКИ JURKAT

© А. Л. Черезова, Ю. А. Негуляев, В. В. Зенин, С. Б. Семенова¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

¹ электронный адрес: svsem@incras.ru

Вход кальция в клетки крови является ключевым событием в запуске множества транскрипционных программ, развитии иммунного ответа, пролиферации, росте и клеточной дифференцировке. В качестве основного проводника ионов кальция в клетках крови выступают каналы суперсемейства TRP, многие элементы регуляции которых до сих пор неясны. В настоящей работе на клетках линии Jurkat с помощью метода patch-clamp мы показали, что активность кальциевых каналов TRPV5 и TRPV6 (transient receptor potential vanilloid) суперсемейства TRP зависит от рН внешней среды. Результаты измерений уровня внутриклеточного Ca^{2+} с использованием флуоресцентного Ca^{2+} -чувствительного зонда Fluo-4 продемонстрировали, что вход Ca^{2+} в клетки Jurkat также регулируется внеклеточным рН. Полученные данные свидетельствуют о том, что изменения рН среды, влияя на активность кальциевых каналов TRPV5 и TRPV6, могут регулировать вход и уровень внутриклеточного Ca^{2+} в клетках Jurkat. Предполагается, что такой механизм реагирования на изменения кислотно-щелочного равновесия необходим клеткам иммунной системы для запуска защитных реакций, в том числе в местах развития различных воспалений.

Ключевые слова: каналы TRPV5 и TRPV6, вход Ca^{2+} , рН, патч-кламп, клетки Jurkat.

Регулирование кислотно-щелочного баланса и поддержание водородного показателя (рН) внутренней среды организма в пределах значений, близких к 7.4, является важной составляющей клеточного гомеостаза. Этот баланс может быть нарушен в результате развития различных патологических процессов в организме, включая метаболический ацидоз, ацидоз вследствие ишемии, неэластический рост, воспалительные процессы и пр. Для ограничения повреждения тканей организма, а также для поддержания кислотно-щелочного равновесия и выявления мест с измененным значением рН существуют различные механизмы физиологического контроля и инициации соответствующих ответных реакций организма.

Одним из таких эволюционно сложившихся механизмов является способность ряда ионных каналов реагировать на изменение рН среды в кислую или щелочную сторону. К таким рН-чувствительным ионным каналам относятся, например, каналы ASIC (acid-sensing ion channels) (Lingueglia et al., 1997; Waldmann et al., 1997; Chen et al., 1998), а также ванилоидные рецепторы TRPV (transient receptor potential vanilloid channels) суперсемейства TRP (Martenson et al., 1994; Kress et al., 1996; Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Jordt et al., 2000). Каналы ASIC активируются внеклеточными изменениями рН, и порог для активации у них сравнительно низкий (от 6.8) (Kress, Waldmann, 2006; Wemmie et al., 2006). Канал TRPV1, напротив, открывается и проводит токи только при сильном ацидозе, когда рН достигает значений ниже 6.0 (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Jordt et al., 2000). Кроме того, мягкий ацидоз (в диапазоне рН 7.0—6.0) может повышать чувствительность TRPV1 к таким

стимулам, как капсаицин и изменение температуры (Tominaga et al., 1998; McLatchie, Bevan, 2001; Ryu et al., 2003; Neelands et al., 2005).

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 (Peng et al., 1999; Hoenderop et al., 2000, 2001), а позднее были отнесены к подсемейству ванилоидных рецепторов (TRPV) и идентифицированы в клетках других млекопитающих, включая человека (Nijenhuis 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). Показано, что эти каналы могут обеспечивать строго дозированное поступление Ca^{2+} и участвовать в активной (ре)абсорбции Ca^{2+} в эпителиальных клетках почек, тонкого кишечника и плаценты (Hoenderop et al., 2001; Nijenhuis et al., 2003).

Ранее мы обнаружили, что селективные Ca^{2+} -каналы TRPV5 и TRPV6 экспрессируются в клетках миелоидной (K562) и лимфоидной (Jurkat) лейкемии человека, а также в нормальных лимфоцитах человека (Semenova et al., 2009; Томилин и др., 2013; Vassilieva et al., 2013). Механизмы регуляции этих каналов до сих пор не изучены. В отличие от других членов подсемейства TRPV каналы нечувствительны к действию таких стимулов, как капсаицин, высокая температура, механический и осмотический стрессы и проч. Однако в последние годы появились разрозненные данные, свидетельствующие о чувствительности каналов TRPV5/6 к изменению величины внекле-

точного pH (Yeh et al., 2003, 2005; Lambers et al., 2007). Поэтому в настоящей работе была поставлена задача исследовать, влияет ли изменение pH внешней среды на активность Ca^{2+} -каналов TRPV5/6 и на вход Ca^{2+} в лимфоциты человека.

Материал и методика

Клетки линии Jurkat из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) культивировали при 37 °C в среде RPMI 1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 0.008 % гентамицина.

Регистрацию токов проводили методом локальной фиксации потенциала в режиме whole-cell. За 20 мин до опыта клетки пересевали на стекла, покрытые полилизинном. Стекла с клетками помещали в регистрирующую камеру объемом 0.1 мл, оснащенную системой смены растворов, расположенную на предметном столике инвертированного микроскопа AxioVert (Carl Zeiss, Германия). Трансмембранные токи регистрировали с помощью усилителя Axopatch 200B (Molecular Devices, США). Сигнал из усилителя записывали на диск компьютера через 12-разрядный аналого-цифровой преобразователь с частотой оцифровки 5 кГц. 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). Основной наружный раствор содержал (в мМ): 140 метансульфоната Na^+ , 5 KCl, 10 HEDTA, 10 HEPES/Tris и 10 D-глюкозы. Основной раствор в пипетке имел состав (в мМ): 140 аспартата K^+ , 5 NaCl, 10 Bapta, 10 HEPES/Tris и 10 D-глюкозы.

Измерения уровня внутриклеточной концентрации Ca^{2+} проводили с использованием проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, США). Клетки (1 млн/мл) нагружали флуоресцентным красителем Fluo-4 AM в концентрации 2 мкМ (Molecular Probes, США) в среде RPMI 10 мин при комнатной температуре. Далее клетки отмывали от излишков красителя и помещали в регистрирующую кювету. Концентрацию свободного кальция и необходимый объем для введения в регистрирующую кювету с клетками рассчитывали с помощью программы Maxchelator (<http://web.stanford.edu>). Флуоресцентный сигнал измеряли на канале FL1 (FITC 525/40) проточного цитометра. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения CytExpert software для CytoFlex (Beckman Coulter, США). Кинетический плот был построен с помощью программы FlowJo 7.5 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, США).

Результаты

Влияние изменений внеклеточного pH на регуляцию активности кальциевых каналов TRPV5 и TRPV6 (TRPV5/6) исследовали в режиме фиксации потенциала (метод патч-кламп) на целой клетке (конфигурация whole-cell) в растворах, не содержащих двухвалентных катионов (DVF — divalent free solution). В качестве основного носителя тока использовали 140 мМ Na^+ . При регистрации тока от целой клетки и поддерживаемых отрицательных потенциалах на мембране записывали

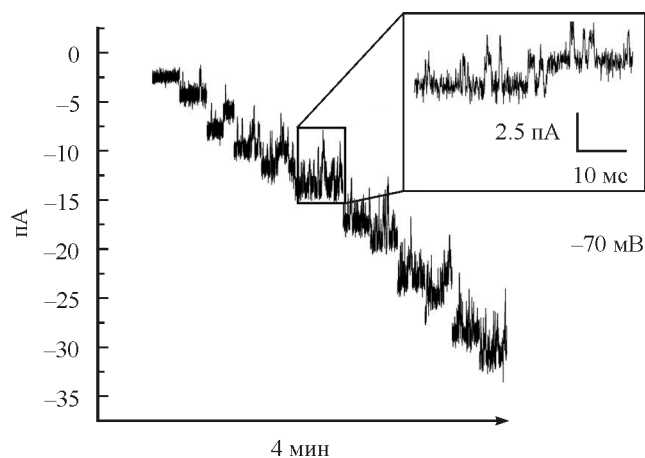


Рис. 1. Развитие интегральной активности кальциевых каналов TRPV5/6 во времени в клетках Jurkat.

Активность каналов регистрировали методом patch-clamp в конфигурации whole-cell. Представлены короткие отрезки записей токов по 200—400 мс. Поддерживаемый потенциал -70 мВ.

спонтанные токи входящего направления. На рис. 1 представлено развитие интегральной активности токов с последовательным открыванием одиночных каналов и постепенным увеличением тока. Амплитуда тока через одиночный канал, посчитанная с помощью амплитудных гистограмм и описанная функцией Гаусса, имела значения $\sim 2.1 \pm 0.3$ пА (при -70 мВ), что соответствовало амплитуде токов через каналы TRPV5/6, зарегистрированные нами ранее в клетках Jurkat в конфигурации outside-out в аналогичных ионных условиях (Vassilieva et al., 2013).

Активность каналов развивали в 90 % случаев в течение первых нескольких минут после образования конфигурации whole-cell ($n = 30$). Количество открываний каналов увеличивалось по мере проникновения кальциевого хелатора ВАРТА из пипетки в цитоплазму клетки и последующего снижения внутриклеточной концентрации свободного кальция. Значения интегральных токов зависели от количества открытых каналов и варьировали в различных экспериментах от 15 до 50 пА. После стабильного развития активности каналов производили смену наружного раствора со значением pH 7.3 на растворы с таким же ионным составом, но со щелочным (8.2) или кислым (6.0) значением pH. Проточная система регистрирующей камеры позволяла в течение нескольких секунд добиться смены растворов с различными значениями pH. Как показано на рис. 2, а, б, замена раствора с pH 7.3 на раствор с pH 8.2 в регистрирующей камере приводила к существенному увеличению активности каналов TRPV5/6. Усредненное значение амплитуды унитарных токов, посчитанное из амплитудных гистограмм, практически не менялось после смены pH раствора, что свидетельствовало об увеличении числа открытых каналов, а не об изменении проводимости зарегистрированных каналов. В экспериментах со сменой нейтрального раствора на раствор с низким значением pH (6.0) наблюдали противоположную картину. Замена на раствор с кислым pH приводила к быстрому ингибированию работы каналов TRPV5/6 и подавлению интегральных токов в клетках Jurkat (рис. 3, а, б).

Известно, что каналы TRPV5/6 имеют конститутивную активность и могут играть важную роль в регуляции уровня внутриклеточного кальция. Согласно нашим

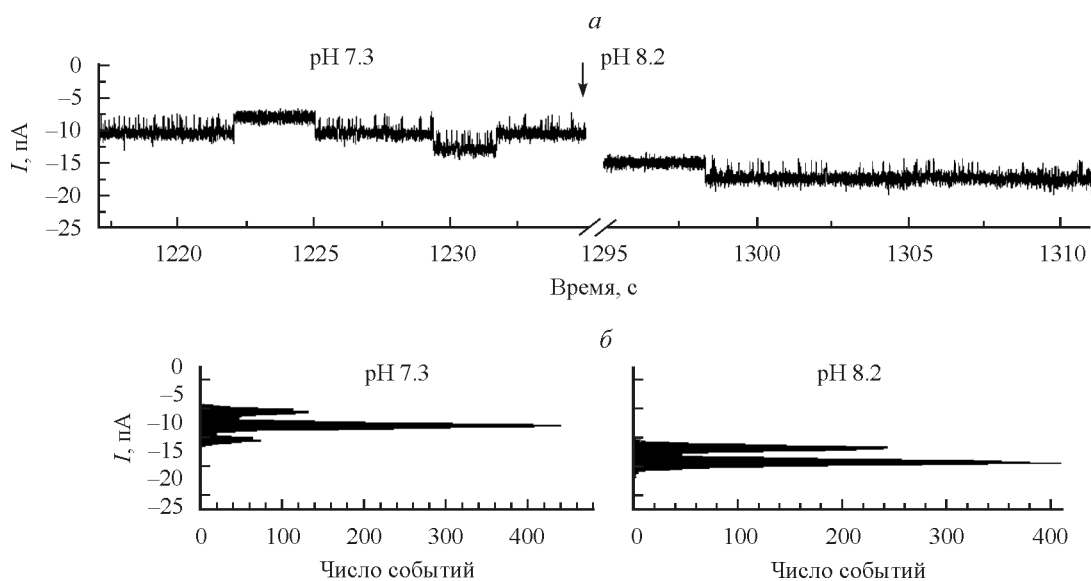


Рис. 2. Влияние щелочного значения pH на интегральную активность каналов TRPV5/6 в клетках Jurkat.

a — типичные записи токов в режиме whole-cell в растворе с pH 7.3 и после подачи раствора с pH 8.2. *б* — соответствующие амплитудные гистограммы, описанные функцией Гаусса. Видно, что повышение величины pH раствора увеличивает ток через каналы TRPV5/6. Общая активность каналов (NP_O), посчитанная для данного эксперимента, выросла с 4.2 (pH 7.2) до 6.8 (после смены на pH 8.2). Поддерживаемый потенциал -70 мВ.

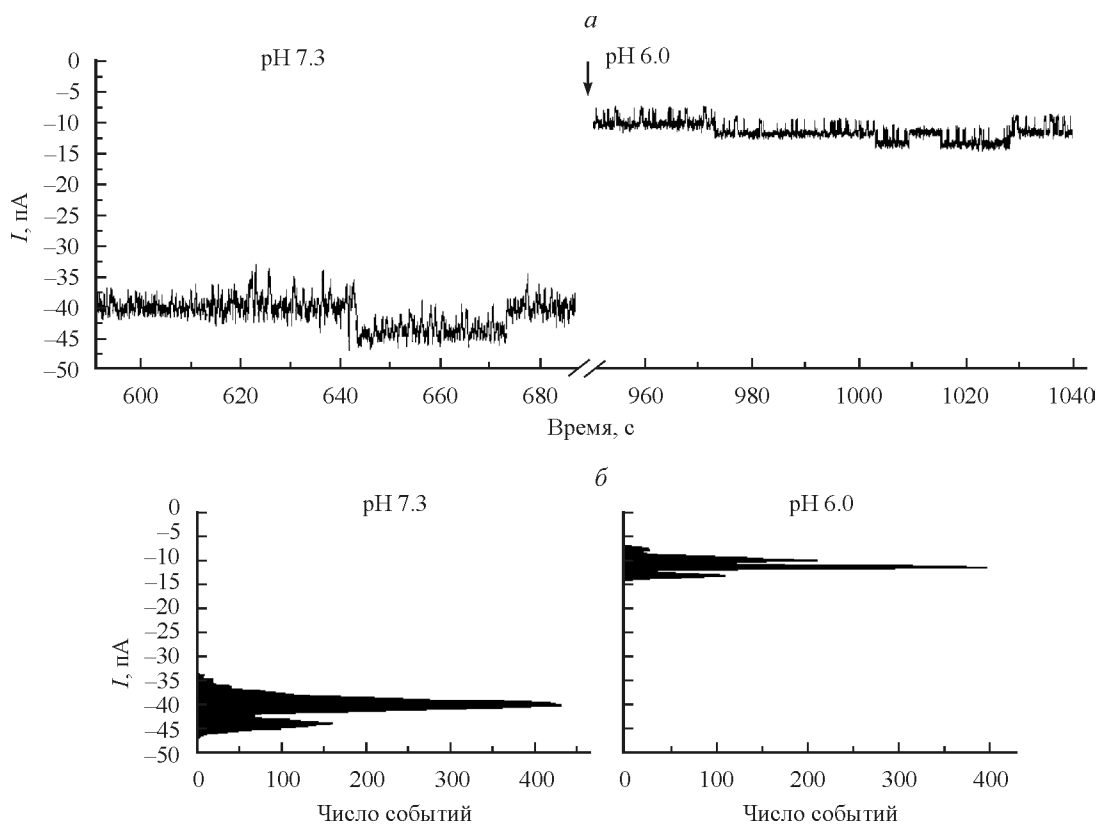


Рис. 3. Влияние кислого значения pH на интегральную активность каналов TRPV5/6 в клетках Jurkat.

a — типичные записи токов в режиме whole-cell до и после подачи раствора с pH 6.0. *б* — соответствующие амплитудные гистограммы, описанные функцией Гаусса. Видно, что понижение pH снижает ток через каналы TRPV5/6. Значение NP_O снизилось с 21.9 до 10.8 после подачи раствора с pH 6.0. Поддерживаемый потенциал -70 мВ.

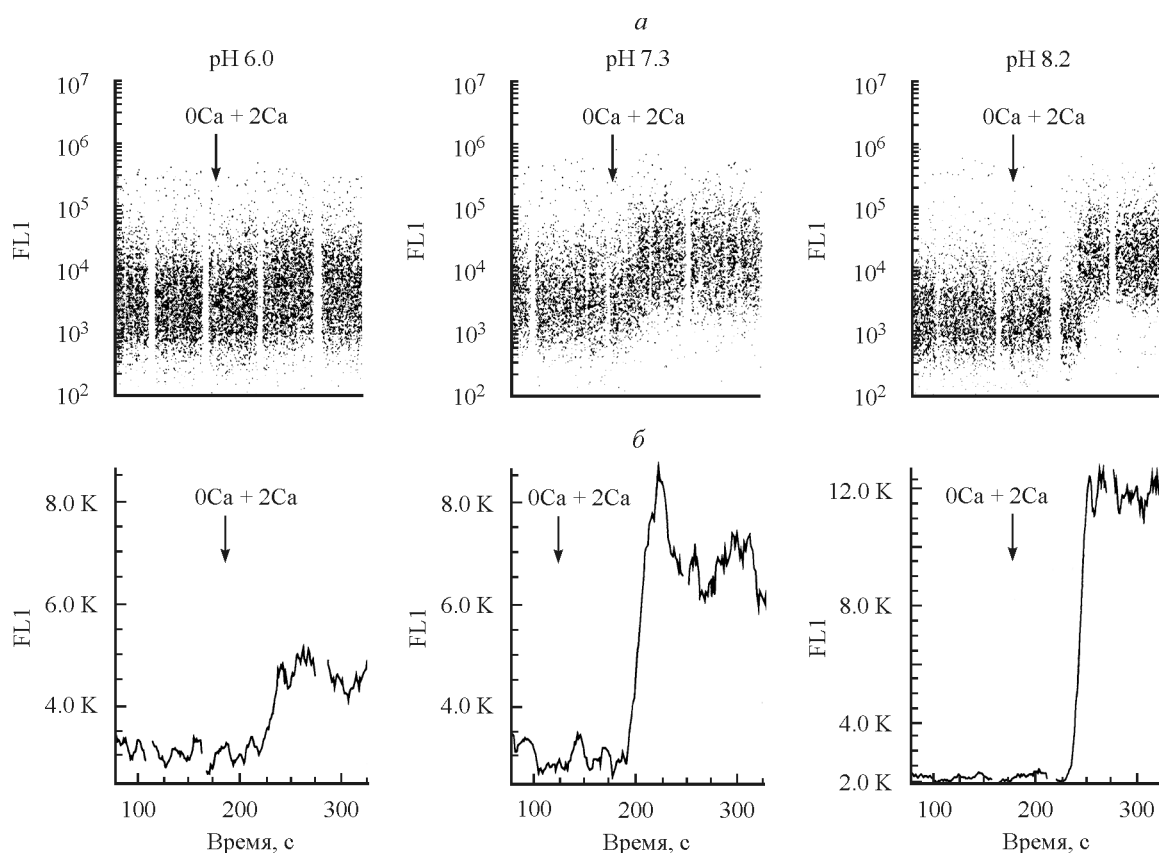


Рис. 4. Влияние внеклеточного pH на вход Ca^{2+} в клетки Jurkat.

a, б — гистограммы анализа данных проточной цитометрии образцов клеток, загруженных Fluo-4. По горизонтали — время, с; по вертикали — интенсивность флуоресценции Fluo-4; анализ на длине волны 525 нм (*a* — логарифмическая шкала; *б* — линейная шкала). Видно, что вход Ca^{2+} в клетки существенно выше в щелочных средах (pH 8.2) и существенно ниже в кислых (pH 6.0) по сравнению со входом Ca^{2+} при нейтральных значениях pH внеклеточной среды (pH 7.3).

предположениям, pH внешней среды через воздействие на каналы TRPV5/6 может регулировать вход Ca^{2+} и поддерживать определенный уровень внутриклеточного Ca^{2+} в лимфоцитах человека. Для проверки этой гипотезы мы провели измерения уровня цитоплазматического Ca^{2+} с помощью Ca^{2+} -чувствительного флуоресцентного зонда Fluo-4. Аликвоту клеток (500 мкл), загруженных Fluo-4 (как описано в разделе «Материал и методика»), помещали в регистрирующую кювету и анализировали на проточном цитометре. В процессе эксперимента из наружной среды убирали Ca^{2+} (с помощью кальций-связывающего хелатора EGTA), что сразу приводило к снижению уровня внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в клетках Jurkat. Последующее добавление 2 мМ Ca^{2+} во внешнюю среду вызывало подъем внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Этот подъем указывал на вход Ca^{2+} в клетку через плазматическую мембрану и восстановление внутриклеточной концентрации Ca^{2+} до исходного уровня. Для исследования влияния величины pH на вход Ca^{2+} в лимфоциты в кювету с клетками, находящимися в растворе без Ca^{2+} , добавляли растворы, содержащие Ca^{2+} (2 мМ), которые имели кислый, щелочной или нормальный pH. В качестве положительного контроля протекания реакции использовали кальциевый ионофор иономицин в финальной концентрации 10 мкМ (данные не представлены).

Как показали результаты, изменение pH наружного раствора в значительной степени влияло на вход и уровень Ca^{2+} в клетках Jurkat (рис. 4, *a, б*). При добавлении в

камеру кальциевого раствора, pH 8.2, уровень внутриклеточного Ca^{2+} существенно возрастал в результате активации входа кальция в клетки. Его значение превышало вход Ca^{2+} , наблюдаемый после подачи кальций-содержащих растворов, имеющих pH 7.3 ($n = 3$). Подача в регистрирующую камеру с клетками раствора Ca^{2+} с низким pH (6.0) приводила к уменьшению или блокированию входа Ca^{2+} в клетки Jurkat ($n = 3$).

Обсуждение

Таким образом, в настоящей работе впервые на лимфоцитах человека показано, что активность каналов TRPV5/6 и вход Ca^{2+} в клетки находятся под контролем внеклеточного pH. Полученные данные согласуются с результатами исследований других авторов, которые обнаружили, что изменения внеклеточного pH могут регулировать работу каналов TRPV5, экспрессированных в клетках HEK293T (Yeh et al., 2003, 2005; Lambers et al., 2007). Эти авторы показали, что изменение pH наружных растворов может приводить к конформационным изменениям поры канала TRPV5 и влиять на ее проводящие свойства. При этом снижение pH раствора ингибировало, а повышение pH стимулировало активность каналов TRPV5 (Yeh et al., 2003, 2005).

Кроме того, существуют экспериментальные данные других авторов, которые обнаружили, что pH наружной

среды влияет на процессы, связанные с внутриклеточным транспортом каналов. Так, при слабом защелачивании растворов увеличивались скорость доставки и встраивание в плазматическую мембрану каналов TRPV5, экспрессированных в клетках НЕК293Т (Lambers et al., 2007). Закисление наружной среды, напротив, приводило к перемещению каналов TRPV5 из плазматической мембраны в подмембранные компартменты клеток НЕК293Т (Lambers et al., 2007). Несмотря на то что механизмы действия pH на каналы TRPV5 в разных работах принципиально различаются, авторы тем не менее сходятся в том, что изменения pH приводят к изменению активности кальциевых каналов.

Известно, что кислотно-щелочной гомеостаз необходим для поддержания нормальных клеточных ответов и физиологической целостности клеток живого организма. Многие клеточные ответы, включая активность цитозольных и мембранно-связанных ферментов, активность транспорта ионов, синтез белка и ДНК, уровень цАМФ и внутриклеточного кальция, меняются при изменении внеклеточного pH (см. обзор: Madshus, 1988). Что касается иммунной системы, то изменения pH в местах инфекций и воспалений известны на протяжении долгого времени (Rotstein et al., 1987, 1988; Grinstein et al., 1991). Так, характерной чертой воспалительного очага является локальный ацидоз (Grinstein et al., 1991). Внутриклеточные значения pH могут упасть до 4.7 в гематомах, до 5.4 в местах воспалений и до 5.7 в миокарде (при сердечной ишемии) (Steen et al., 1992; Kress, Waldmann, 2006; Wemmie et al., 2006). Ацидоз наблюдается также внутри и вокруг злокачественных опухолей (Vaupel et al., 1989; Newell et al., 1993). Кроме того, кислое микроокружение может играть важную роль в ингибировании иммунной функции при тяжелых заболеваниях, таких как муковисцидоз и неопластический рост, а также при различных видах инвазии (Kraus, Wolf, 1996; Helmlinger et al., 1997).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что внеклеточный pH может регулировать активность кальциевых каналов TRPV5/6 и вход Ca^{2+} в лимфоциты человека. Высокий pH наружной среды увеличивает активность кальциевых каналов TRPV5/6 и повышает вход Ca^{2+} в клетки Jurkat. Низкий pH редуцирует входящие токи через каналы TRPV5/6 и снижает вход Ca^{2+} в клетки. В результате полученных данных можно сделать вывод о том, что изменения внеклеточного pH, влияя на вход кальция в лимфоциты, могут запускать цепь сигнальных событий, связанных с кальциевым ответом. Мы предполагаем, что такая регуляция может быть необходима клеткам иммунной системы для получения и передачи сигнала об изменении тканевого микроокружения и для последующего формирования соответствующего иммунного ответа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-00938) и программы президента РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта Санкт-Петербурга в сфере научной и научно-технической деятельности.

Список литературы

Томилини В. Н., Васильева И. О., Марахова И. И., Негуляев Ю. А., Семенова С. Б. 2013. Функциональные характеристики каналов TRPV5 и TRPV6 в нормальных и трансформированных лимфоцитах человека. Цитология. 55 (5) : 300—306.

(Tomilin V. N., Vassilieva I. O., Marakhova I. I., Negulyaev Y. A., Semenova S. B. 2013. The functional characteristics of TRPV5 and TRPV6 channels in normal and transformed human blood lymphocytes. Tsytologiya. 55 (5) : 300—306.)

Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J. D., Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature. 389 : 816—824.

Chen C. C., England S., Akopian A. N., Wood J. N. 1998. A sensory neuron-specific, proton gated ion channel. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 95 : 10 240—10 245.

Grinstein S., Swallow C. J., Rotstein O. D. 1991. Regulation of cytoplasmic pH in phagocytic cell function and dysfunction. Clin. Biochem. 24 : 241—247.

Helmlinger G., Yuan F., Dellian M., Jain R. K. 1997. Interstitial pH and pO_2 gradients in solid tumors *in vivo*: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. Nat. Med. 3 : 177—182.

Hoenderop J. G., Hartog A., Stuijver 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., Vennekens R., Müller D., Prenen J., Droogmans G., Bindels R. J., Nilius B. 2001. Function and expression of the epithelial Ca^{2+} -channel family: comparison of mammalian ECaCl1 and 2. J. Physiol. 537 : 747—761.

Jordt S. E., Tominaga M., Julius D. 2000. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 97 : 8134—8135.

Kraus M., Wolf B. 1996. Implications of acidic tumor microenvironment for neoplastic growth and cancer treatment: a computer analysis. Tumor Biol. 17 : 133—154.

Kress M., Fetzer S., Reeh P. W., Vyklicky L. 1996. Low pH facilitates capsaicin responses in isolated sensory neurons of the rat. Neurosci. Lett. 211 : 5—8.

Kress M., Waldmann R. 2006. Acid sensing ionic channels. Curr. Top. Membr. 57 : 241—276.

Lambers T. T., Oancea E., de Groot T., Topala C. N., Hoenderop J. G., Bindels R. J. 2007. Extracellular pH dynamically controls cell surface delivery of functional TRPV5 channels. Mol. Cell. Biol. 27 : 1486—1494.

Lingueglia E., de Weille J. R., Bassilana F., Heurteaux C., Sakai H., Waldmann R., Lazdunski M. 1997. A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. J. Biol. Chem. 272 : 29 778—29 783.

Madshus I. H. 1988. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. Biochem. J. 250 : 1—8.

Martenson M. E., Ingram S. L., Baumann T. K. 1994. Potentiation of rabbit trigeminal responses to capsaicin in a low pH environment. Brain Res. 651 : 143—147.

McLachie L. M., Bevan S. 2001. The effects of pH on the interaction between capsaicin and the vanilloid receptor in rat dorsal root ganglia neurons. Br. J. Pharmacol. 132 : 899—908.

Neelands T. R., Jarvis M. F., Han P., Faltynek C. R., Surovy C. S. 2005. Acidification of rat TRPV1 alters the kinetics of capsaicin responses. Mol. Pain. 1 : 28. Doi: 10.1186/1744-8069-1-28

Newell K., Franchi A., Pouyssegur J., Tannock I. 1993. Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90 : 1127—1131.

Nijenhuis T., Hoenderop J. G. J., Nilius B., Bindels R. J. M. 2003. (Patho)physiological implications of the novel epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6. Pflugers Arch. 446 : 401—409.

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.

Rotstein O. D., Fiegel V. D., Simmons R. L., Knighton D. R. 1988. The deleterious effect of reduced pH and hypoxia on neutrophil migration *in vitro*. J. Surg. Res. 45 : 298—303.

Rotstein O. D., Nasmith P. E., Grinstein S. 1987. The bacteroides by-product succinic acid inhibits neutrophil respiratory burst by reducing intracellular pH. Infect. Immun. 55 : 864—870.

Ryu S., Liu B., Qin F. 2003. Low pH potentiates both capsaicin binding and channel gating of VR1 receptors. *J. Gen. Physiol.* 122 : 45—61.

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. Cell Physiol.* 296 : 1098—1104.

Steen K. H., Reeh P. W., Anton F., Handwerker H. O. 1992. Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, *in vitro*. *J. Neurosci.* 12 : 86—95.

Tominaga M., Caterina M. J., Malmberg A. B., Rosen T. A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B. E., Basbaum A. I., Julius D. 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron.* 21 : 1—20.

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.* 246 : 131—140.

Vaupel P., Okunieff P., Neuringer L. J. 1989. Blood flow, tissue oxygenation, pH distribution, and energy metabolism of murine mammary adenocarcinomas during growth. *Adv. Exp. Med. Biol.* 248 : 835—845.

Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., Heurteaux C., Lazdunski M. 1997. A proton-gated channel involved in acid sensing. *Nature.* 386 : 173—177.

Wemmie J. A., Price M. P., Welsh M. J. 2006. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends. Neurosci.* 29 : 578—586.

Yeh B. I., Kim Y. K., Jabbar W., Huang C. L. 2005. Conformational changes of pore helix coupled to gating of TRPV5 by protons. *EMBO J.* 24 : 3224—3234.

Yeh B. I., Sun T. J., Lee J. Z., Chen H. H., Huang C. L. 2003. Mechanism and molecular determinant for regulation of rabbit transient receptor potential type 5 (TRPV5) channel by extracellular pH. *J. Biol. Chem.* 278 : 51 044—51 052.

Поступила 5 VI 2017

EXTRACELLULAR pH REGULATES THE CALCIUM INFLUX IN JURKAT-CELLS

A. L. Cherezova, Yu. A. Negulyaev, V. V. Zenin, S. B. Semenova¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

¹ e-mail: svsem@incras.ru

The calcium influx in blood cells is a key event in the launch of a multitude of transcriptional programs, including the development of an immune response, proliferation, growth and cell differentiation. The main conductors of calcium ions in blood cells are the superfamily TRP channels, elements of regulation of which are still not clear. In the present work on Jurkat cells, using the patch-clamp method, we showed that the activity of calcium channels TRPV5 and TRPV6 (transient receptor potential vanilloid) superfamily TRP, depends on the environment pH. Measurement of the level of intracellular Ca²⁺ with a fluorescent Ca²⁺-sensitive Fluo-4 probe revealed that the Ca²⁺ influx in human lymphocytes is also controlled by the external pH. Thus, changes in extracellular pH, affecting the activity of calcium channels TRPV5 and TRPV6, can regulate the entry and level of intracellular Ca²⁺ in Jurkat cells. It is supposed, that such a mechanism of response to changes of acid-base balance is necessary for immune system to trigger the protective reactions, including the places of development of various inflammations.

Key words: TRPV5 and TRPV6 channels, Ca²⁺ influx, pH, patch-clamp, Jurkat cells.