

На правах рукописи



ТОМИЛИН

Виктор Николаевич

**КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ TRPV5 И TRPV6 В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА:
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт цитологии Российской академии наук

Научный руководитель: **Семенова Светлана Борисовна**
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник Лаборатории ионных
механизмов клеточной сигнализации ФГБУН
«Институт цитологии РАН», г. Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: **Крутецкая Зоя Иринарховна**
доктор биологических наук
профессор Кафедры биофизики
ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский
государственный университет», г. Санкт-
Петербург

Алексей Валерьевич Карпушев
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник Лаборатории
клеточной биологии ФГБУ «ФМИЦ им. В.А.
Алмазова», г. Санкт-Петербург

Ведущая организация: ФГБУН «Институт физиологии им.
И.П.Павлова» РАН, г. Санкт-Петербург

Защита состоится «27» февраля 2015 года в 12 часов на заседании
диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу:
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4

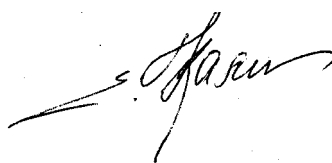
Сайт института: www.cytspb.rssi.ru

Адрес электронной почты института: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Факс института (812)297-03-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института цитологии РАН
Реферат разослан « ____ » января 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.В.Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Внутриклеточный Ca^{2+} регулирует многие физиологические и патологические процессы, происходящие в клетках крови, включая дегрануляцию, регуляцию белков цитоскелета, активацию клеточных киназ и фосфатаз, транскрипционный контроль и модуляцию поверхностных рецепторов [1,2]. Долгое время считалось, что одним из основных путей поступления Ca^{2+} в клетки крови является вход через ионные каналы, активируемые опустошением внутриклеточных кальциевых депо [3,4]. Однако клонирование каналов суперсемейства TRP (transient receptor potential channels) обеспечило молекулярную базу для изучения новых кандидатов кальциевого входа в электрически невозбудимые клетки.

На данный момент суперсемейство каналов TRP включает в себя более 33 членов, это составляет порядка 20% всех генов, кодирующих ионные каналы [5,6]. Суперсемейство разделено на несколько подсемейств по гомологии: TRPC (Canonical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastin), TRPA (Ankyrin), TRPML (Mucolipin), TRPP (Polycystin). Каналы TRP экспрессируются во многих возбудимых и невозбудимых тканях и вовлечены во множество физиологических процессов, таких как обоняние, осязание, вкусовая передача, болевая чувствительность, термочувствительность, абсорбция и реабсорбция кальция и магния, осморегуляция, и т.д. [7–9]. Большая часть каналов TRP представляет из себя неселективные катионные каналы, за исключением нескольких членов, из которых наиболее селективными по кальцию являются каналы TRPV5 и TRPV6 [10].

Открытие каналообразующих белков суперсемейства TRP существенно увеличило число кандидатов на участие в кальциевом входе, а изучение функциональных характеристик этих каналов значительно расширило знания о физиологических процессах, происходящих в клетке. Некоторые члены этого суперсемейства, как оказалось, могут играть важную роль в контроле клеточного роста, дифференцировке и клеточном апоптозе [11]. В последнее время накапливается все больше информации о роли каналов TRP в регуляции уровня внутриклеточного кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), как в возбудимых, так и в невозбудимых клетках.

Кальциевая сигнализация и Ca^{2+} -проводящие каналы участвуют в развитии иммунного ответа, пролиферации, росте и дифференцировке лимфоцитов. В Т-

лимфоцитах повышение уровня внутриклеточного кальция, при связывании Т-клеточного рецептора с главным комплексом гистосовместимости, несущим антиген, запускает транскрипционные и трансляционные процессы, ведущие к секреции эффекторных цитокинов и координации иммунного ответа [12]. Уменьшение $[Ca^{2+}]_i$ приводит к ухудшению эффективности процесса активации Т-клеток и развитию различных форм иммунодефицита [3,4].

Настоящая работа посвящена молекулярной и функциональной идентификации эндогенных Ca^{2+} -проводящих каналов в плазматической мембране клеток крови и исследованию их вклада в общую систему Ca^{2+} -сигнализации клеток. Актуальность выбранного направления определяется тем, что нарушения кальциевого обмена и сопряженных с ним функций лежат в основе многих клеточных патологий. Идентификация Ca^{2+} -каналов в нормальных и трансформированных клетках крови важна как для решения фундаментальных вопросов кальциевой сигнализации, так и в прикладных аспектах, при поиске потенциальных мишеней для использования в фармакологической и генной терапии.

Цели и задачи исследования

Цель работы: идентифицировать кальциевые каналы в клетках лимфобластной лейкемии линии Jurkat и лимфоцитах периферической крови человека. Определить механизмы регуляции идентифицированных кальциевых каналов.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. С помощью метода патч-кламп исследовать биофизические и фармакологические характеристики кальциевых каналов в клетках лимфобластной лейкемии линии Jurkat и лимфоцитах периферической крови человека.
2. По биофизическим параметрам идентифицировать тип кальциевых каналов.
3. Провести сравнительный анализ характеристик каналов в нормальных и злокачественно трансформированных лимфоцитах человека.
4. Исследовать экспрессию и локализацию идентифицированных кальциевых каналов в клетках Jurkat и нормальных лимфоцитах человека.
5. Установить механизмы регуляции активности идентифицированных кальциевых каналов при помощи электрофизиологических и иммунофлуоресцентных методов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В клетках лимфоидной лейкемии линии Jurkat и лимфоцитах периферической крови человека экспрессируются функционально активные кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6.
2. Экспрессия кальциевых каналов TRPV5/V6 в злокачественно трансформированных клетках существенно выше, чем в нормальных лимфоцитах человека.
3. Субъединицы TRPV5 и TRPV6 могут формировать гомо- и гетеротетрамерные каналы с новыми свойствами в лимфоцитах.
4. Внеклеточный pH влияет на активность каналов TRPV5/V6.
5. Регуляция активности каналов TRPV5/V6 в мембране лимфоцитов может осуществляться посредством клатрин/динамин - зависимого эндоцитоза.

Научная новизна работы

В работе впервые идентифицированы кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat и лимфоцитах периферической крови человека. С помощью метода иммунофлуоресценции была подтверждена экспрессия каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat и нормальных лимфоцитах человека. Впервые выявлен повышенный уровень поверхностной экспрессии каналов TRPV5 и TRPV6 в трансформированных клетках, по сравнению с нормальными лимфоцитами. Обнаружено, что внеклеточный pH влияет на активность кальциевых каналов TRPV5/V6. Впервые показана колокализация каналов TRPV5 и TRPV6 с клатрином, а также с маркером ранних эндосом, белком EEA1. Впервые получены результаты, указывающие на регулируемую роль везикулярного транспорта в активности кальциевых каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat.

Личный вклад автора

Все экспериментальные процедуры и обработка результатов выполнены автором лично. Все исследования проводились на оборудовании Института цитологии РАН. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Теоретическое и практическое значение работы

Полученные данные существенны для понимания роли кальциевых каналов в нормальных и патологических процессах, происходящих в клетках иммунной системы. Фундаментальное значение имеет анализ роли внеклеточного pH и эндо/экзоцитоза в регуляции активности кальциевых каналов TRPV5/V6 и, следовательно, в контроле уровня внутриклеточного кальция клеток крови. Новые знания о внутриклеточных механизмах, управляющих такими важными процессами, как транспорт каналов, могут быть полезны при создании фармакологических подходов при разработке новых терапевтических средств, для лечения патологий, связанных с нарушениями работы каналов. Эти данные могут быть использованы в курсах лекций по физиологии, биофизике и клеточной биологии.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ (2 статьи и 6 тезисов) в отечественных и зарубежных рецензируемых изданиях. Материалы работы доложены и обсуждены на конференциях и семинарах: международная конференция "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" (Пушино, 24-26 мая 2011), I Всероссийская конференция "Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет" (Санкт-Петербург, 11–13 октября 2011 г.), III конференция молодых ученых ИИЦ РАН (Санкт-Петербург, 2012), международная конференция IUPS2013 (Бирмингем, СК), IV конференция молодых ученых ИИЦ РАН (Санкт-Петербург, 2014), международная конференция Physiology 2014 (Лондон, СК).

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 187 ссылок. Диссертация изложена на 104 страницах с 35 рисунками.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты 08-04-00574, 12-04-00622), Правительства Санкт-Петербурга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры.

Клетки Jurkat. В работе использовались клетки лимфоидной лейкемии человека Jurkat Е6-1 (коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, СПб). Клетки Jurkat культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10%-ной эмбриональной сыворотки теленка, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина, при 5% CO₂ и 37°C. Для опытов клетки пересевали на покровные стекла (4 × 4 мм), предварительно покрытые Poly-DL-Lysine для лучшей адгезии клеток на поверхности стекла.

Лимфоциты периферической крови человека. Лимфоциты выделяли из свежей донорской крови по стандартной методике. Лейкоцитарную фракцию отбирали после осаждения эритроцитов, добавляя в кровь 6%-ный раствор декстрана Т500. Суспензию лейкоцитов (пробы по 8 мл) наслаивали на 3 мл Lymphosep (Sigma, США) и центрифугировали в течение 30 мин при 600g. После центрифугирования интерфазу переносили в пробирки объемом сначала 50, затем 10 мл и 3 раза промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Для удаления макрофагов, клеточную суспензию после отмывки разбавляли средой RPMI-1640 без антибиотиков и помещали в пластиковые матрицы, предварительно обработанные 10%-ной сывороткой крови человека группы крови 0 (1), и оставляли на 40 мин при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Далее полученную суспензию лимфоцитов (2 млн/мл) переносили 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. В полученной суспензии фракция Т-лимфоцитов составляла 85%, что было показано при помощи антител против CD3⁺. Лимфоциты использовали на следующий день после выделения.

Регистрация ионных токов. В работе использовался метод локальной фиксации потенциала (патч-кламп) в конфигурациях whole-cell и outside-out. Используемые в работе пипетки имели сопротивление 5-15 МОм. Покровные стекла с прикреплёнными клетками помещали в экспериментальную камеру объемом 0,15 мл, заполненную соответствующим эксперименту наружным раствором. Оптические наблюдения осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Zeiss Axiovert 40 CFL с дифференциальным контрастом по Номарскому (увеличение 400X), установленного на антивибрационном столике. Все эксперименты проводили при комнатной температуре.

На основании анализа записей токов при различных уровнях мембранного потенциала получали характеристики одиночных каналов, идентифицировали их по

проводимости и селективности, количественно оценивали уровень активности. Амплитуды токов, протекающих через одиночные каналы, рассчитывали по амплитудным гистограммам или оценивали непосредственно из записей токов. Уровень активности каналов оценивали по значению вероятности открытого состояния: $P_o = I/N_i$, где: N – число элементарных уровней проводимости, I – средний ток для заданного временного интервала, i – амплитуда тока, протекающего через одиночный канал. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение среднего (mean \pm SEM). Для оценки значимости различий использовали t-критерий Стьюдента (уровень значимости $p < 0,05$). Для обработки результатов использовали программные пакеты Clampfit 9.2 и SciDavis.

Растворы. Основной наружный раствор в экспериментальной камере содержал: 140 мМ метансульфоната Na, 5 мМ NaCl, 10 мМ HEEDTA, 10 мМ (HEPES) и 10 мМ D-глюкозы. Раствор в пипетке содержал 140 мМ аспартата K, 5 мМ NaCl, 10 мМ ВАРТА, 10 мМ HEPES и 10 мМ D-глюкозы. Метансульфонат натрия и аспартат калия использовали вместо хлорида натрия и калия, с целью минимизировать токи через анионные каналы. Внутренние растворы были лишены ионов магния и кальция, чтобы избежать инактивации каналов. В ряде экспериментов использовались наружные растворы с различными концентрациями RuR: 125 нМ-50 мкМ.

Антитела. Окрашивание клеток проводили с помощью специфических антител различных производителей. Для выявления каналов использовали антитела против TRPV5 (H-99, Santa Cruz Biotech, США) в разведении 1:100 и антитела против TRPV6 (H-90, Santa Cruz Biotech, США) в разведении 1:100. Для узнавания EEA1 использовали антитела (BD Transduction laboratories, США) в разведении 1:1000, для распознавания клатрина (anti-Clathrin heavy chain, BD Transduction laboratories, США) в разведении 1:1000. В качестве вторичных антител использовали конъюгаты GAR-FITC в разведении 1:200 (Jackson, США), GAM-Cy3 (Jackson, США) в разведении 1:200. Антитела разводили в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH=7,4), содержащем 1% БСА.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. В начале эксперимента суспензию клеток нанесли на покровные стёкла размером 10x10 мм, предварительно покрытые Poly-DL-Lysine. Фиксацию клеток производили в 3.7% параформальдегиде, 10 мин при температуре +4°C. Потом клетки промывали 5 раз по 3 мин раствором PBS и обрабатывали 10 мин при комнатной температуре раствором PBS, содержащем 0,25% Tween 20 (BioRad, США). Неспецифическое окрашивание блокировали инкубацией в

PBS, содержащим 10%-ную сыворотку, в течение 1 ч при комнатной температуре. С первичными антителами клетки инкубировали на протяжении ночи при +4°C. Далее вновь промывали 3 раза по 5 мин раствором PBS. Инкубацию с вторичными антителами проводили в течение 1 ч при +37°C, в темноте. Потом промывали, как описано выше. Ядра окрашивали DAPI (0,05 мкг/мл) при комнатной температуре в течение 10 мин. Клеточная мембрана окрашивалась при помощи конъюгата нетоксичной бета-субъединицы холерного токсина с FITC (FITC-CTB, Sigma-Aldrich, США) в течение 10 минут при комнатной температуре. После окрашивания покровные стёкла приклеивали к предметному стеклу с помощью клея Vectashield. Все изображения были получены на конфокальном микроскопе Leica TCS SL SP5 (Leica, Япония).

Анализ и обработка изображений. Полученные изображения обрабатывали с помощью программ Leica Confocal Software (Япония) и ImageJ 1.40g (National Institute of Health, США). Для оценки колокализации использовали плагин JACoP для программы ImageJ [13]. Степень колокализации определяли с помощью коэффициента Пирсона, который дает количественное значение степени перекрывания между флуоресцентными сигналами двух исследуемых изображений. Коррекцию фона производили одинаково для всех исследуемых изображений. Коэффициент колокализации Пирсона может иметь значение от 1 до -1. Степень колокализации характеризовали как: очень сильная при значениях (0,85 — 1), сильная (0,49 — 0,84), средняя (0,1 — 0,48), слабая (-0,26 — 0,09), и очень слабая (-1 - -0,27). Каждый эксперимент проводили не менее 3 раз. Данные обрабатывали с использованием пакета анализа программы SciDavis (США). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение среднего (mean \pm SEM). Для оценки значимости различий использовали t-критерий Стьюдента (уровень значимости $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Идентификация кальциевых каналов в клетках Jurkat.

1.1. Развитие интегральной активности моновалентных токов в клетках Jurkat

Известно, что кальций-селективные каналы обладают чрезвычайно низкой проводимостью в кальций-содержащих растворах, что значительно затрудняет исследование их свойств в электрофизиологических экспериментах. Также из литературных данных известно, что при исключении двухвалентных катионов из растворов, кальциевые каналы становятся проницаемыми для одновалентных катионов (Na^+ , K^+) и амплитуда тока через эти каналы возрастает в несколько раз [14]. Принимая во внимание эти факты, для исследования кальциевых каналов в клетках Jurkat мы использовали растворы, не содержащие ионы кальция и магния (DVF, divalent free solution), а в качестве основного носителя тока использовали 140 мМ натрия.

В таких условиях в патч-кламп экспериментах, при отведении тока от всей клетки (конфигурация whole-cell), были зарегистрированы спонтанные Na^+ -токи входящего направления при отрицательных потенциалах на мембране. Активность исследуемых каналов развивалась в течение нескольких минут после образования whole-cell конфигурации и наблюдалась в 90% экспериментов ($n=30$). Как правило, исследования Ca^{2+} -каналов базируются на измерениях интегральных токов от целой клетки, которые дают весьма приблизительную информацию о функциональных характеристиках одиночных каналов. Поэтому в данной работе было уделено особое внимание регистрации одиночных каналов. Биофизические характеристики канала (вольт-амперная характеристика, кинетические свойства, ионная проводимость и селективность, кальциевая инактивация и пр.), полученные на изолированных фрагментах мембраны, являются его молекулярным «паспортом», согласно которому можно с уверенностью говорить о молекулярной идентификации белков, образующих изучаемый канал.

1.2. Активность одиночных каналов в плазматической мембране клеток Jurkat.

При переходе в режим outside-out из конфигурации whole-cell количество каналов значительно уменьшалось, но активность каналов не затухала на протяжении всего периода регистрации. В этом режиме также были зарегистрированы спонтанные Na^+ -токи входящего направления через одиночные каналы (Рис. 1).

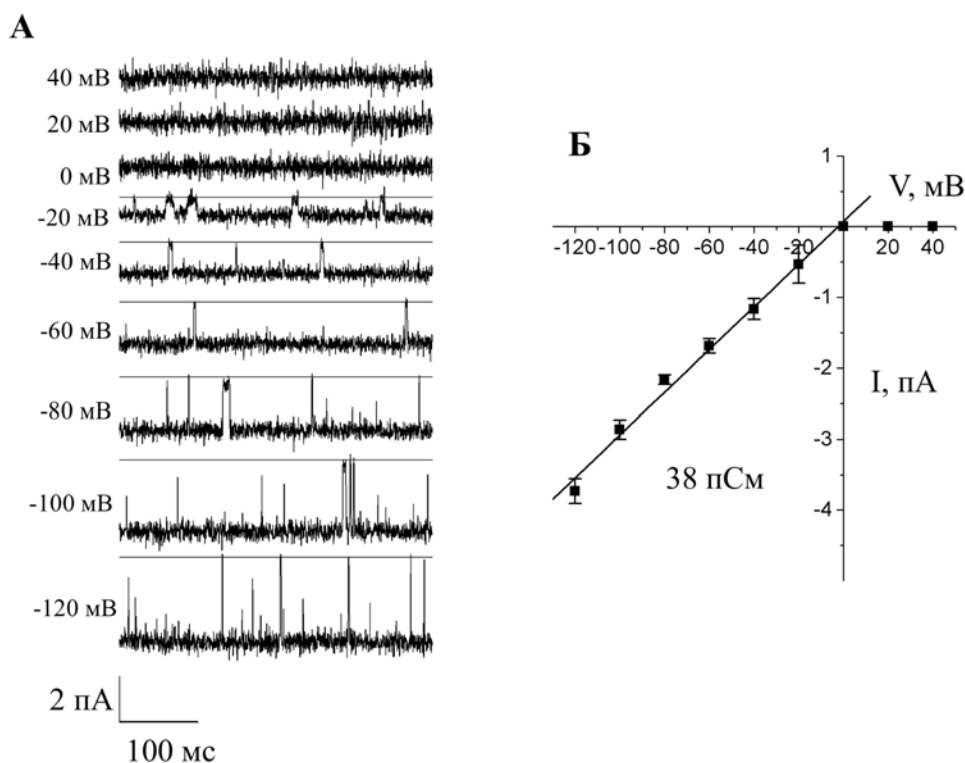


Рис. 1. Записи Na^+ -токов через одиночные каналы в растворах, не содержащих двухвалентных катионов. А. Записи моновалентных токов при различных потенциалах Б. вольт-амперная характеристика (ВАХ) токов, которая обладает свойством входящего выпрямления. Средняя проводимость каналов в клетках Jurkat равна ~ 38 пСм.

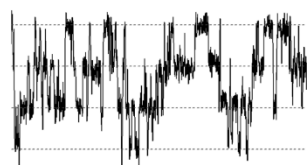
Каналы были зарегистрированы в 63% ($n=30$) экспериментов. На рис. 1А, Б представлены записи токов через одиночные каналы при разных потенциалах на мембране и вольт-амперная характеристика (ВАХ), построенная по усредненным значениям амплитуды токов через одиночные каналы. Проводимость одиночных каналов для клеток Jurkat была рассчитана из наклона ВАХ и составила, в диапазоне отрицательных потенциалов, около $38 \pm 0,3$ пСм ($n=11$). Эти значения были близки к значениям проводимости каналов TRPV5 и TRPV6, зарегистрированных нами ранее в клетках K562 ($30,0 \pm 3,1$ пСм) [15], а также соответствовали проводимости (40–70 пСм), рассчитанной для рекомбинантных TRPV5 и TRPV6 каналов в идентичных ионных условиях [16]. Унитарные токи через каналы, зарегистрированные нами в экспериментах на клетках Jurkat, имели свойство входящего выпрямления в конфигурации outside-out (Рис. 1). По этому параметру Ca^{2+} -каналы в лимфоцитах также демонстрируют сходство с каналами TRPV5/V6, которые характеризуются входящим выпрямлением в аналогичных ионных условиях [17–19] и отличаются от других каналов, зарегистрированных в Т-лимфоцитах и клетках RBL, для которых показана

линейная вольт-амперная характеристика в диапазоне потенциалов от -120 мВ до $+100$ мВ [20,21].

Мы обнаружили, что свойство входящего выпрямления токов сохранялось после отделения фрагмента мембраны в DVF раствор. По-видимому, это свойство обусловлено особенностями воротного механизма каналообразующей молекулы, а не потенциал-зависимой блокадой канала ионами магния или полиаминами, как это характерно, например, для калиевых каналов (Kir channel) [22].

Как известно из литературных данных, высокоселективные кальциевые каналы TRPV5/V6 характеризуются кальций-зависимой инактивацией. Чтобы проверить чувствительность исследуемых каналов к Ca^{2+} , мы использовали в ряде экспериментов кальций-содержащие растворы. Добавление кальция (30 мкМ - 1 мМ) в наружный раствор приводило к инактивации моновалентных токов через каналы в клетках Jurkat (Рис. 2).

Такие характеристики зарегистрированных каналов как: свойство входящего выпрямления, конститутивная активность, кальциевая инактивация и значения проводимости этих каналов, позволили нам сделать обоснованное предположение, о том что каналы образуются белками TRPV5/V6.



1 мМ кальция



2 пА
100 мс

Рис. 2. Инактивация моновалентных токов. Записи токов в конфигурации *outside-out* в клетках Jurkat до и после подачи раствора, содержащего 1 мМ кальция, при потенциале -70 мВ .

1.3. Блокирование кальциевых каналов в клетках Jurkat рутениевым красным.

Молекулярная идентификация большинства каналов суперсемейства TRP, в том числе TRPV6 и TRPV5, существенно осложняется отсутствием селективных блокаторов. Согласно литературным данным, неселективным блокатором каналов TRPV6 и TRPV5 является рутениевый красный (Ruthenium red, RuR). Несмотря на то, что каналы TRPV5 и TRPV6 имеют, в основном, сходные функциональные характеристики, они отличаются своей чувствительностью к рутениевому красному. В экспрессионных

системах было показано, что чувствительность каналов TRPV5 к RuR в 100 раз выше, чем чувствительность каналов TRPV6 [16]. Поэтому рутениевый красный был выбран для дальнейшей идентификации кальциевых каналов в клетках Jurkat (Рис 3, 4).

Было обнаружено, что часть каналов полностью ингибировалась при замене наружного раствора на раствор, содержащий RuR в концентрациях 250-500 нМ (Рис 3А). Рассчитанная концентрация ингибитора, необходимая для полумаксимального блокирования каналов, составила $IC_{50}=190 \pm 9,3$ нМ, ($n=7$) (Рис 3Б).

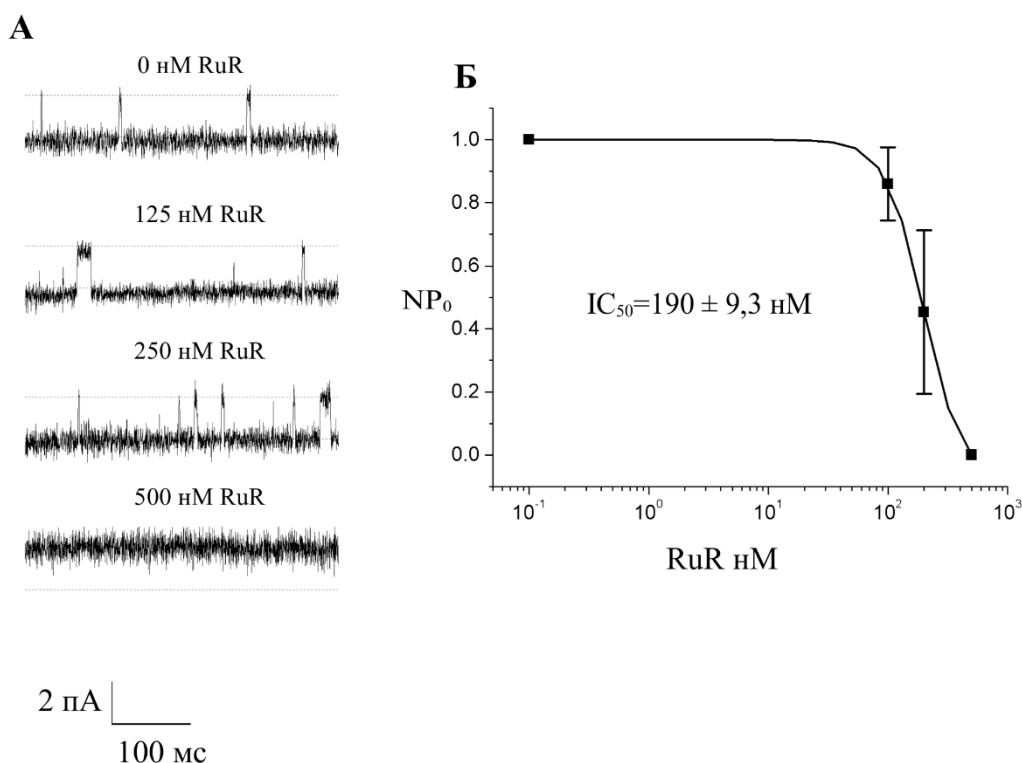


Рис. 3 Чувствительность кальциевых каналов к низким (нМ) концентрациям RuR в клетках Jurkat. А. Рутениевый красный (500 нМ) полностью заблокировал канал. **Б.** Зависимость NP_0 от концентрации RuR, рассчитанная по данным 7 экспериментов. Кривая представляет логарифмическую аппроксимацию полученных экспериментальных данных. Мембранный потенциал -70 мВ.

Кроме того, в результате проведенных исследований, были обнаружены каналы, которые полностью ингибировались при концентрации RuR 20-50 мкМ (Рис. 4А). Эффективная полумаксимальная концентрация RuR, необходимая для блокирования этого типа каналов, составила $IC_{50}=8,5 \pm 1,5$ мкМ, ($n=6$) (Рис 4Б). Таким образом, IC_{50} , рассчитанная для кальциевых каналов в клетках Jurkat, соответствовала значениям, полученным ранее для рекомбинантных каналов TRPV5 и TRPV6 ($IC_{50}=130$ нМ и $IC_{50}=10$ мкМ), соответственно [16].

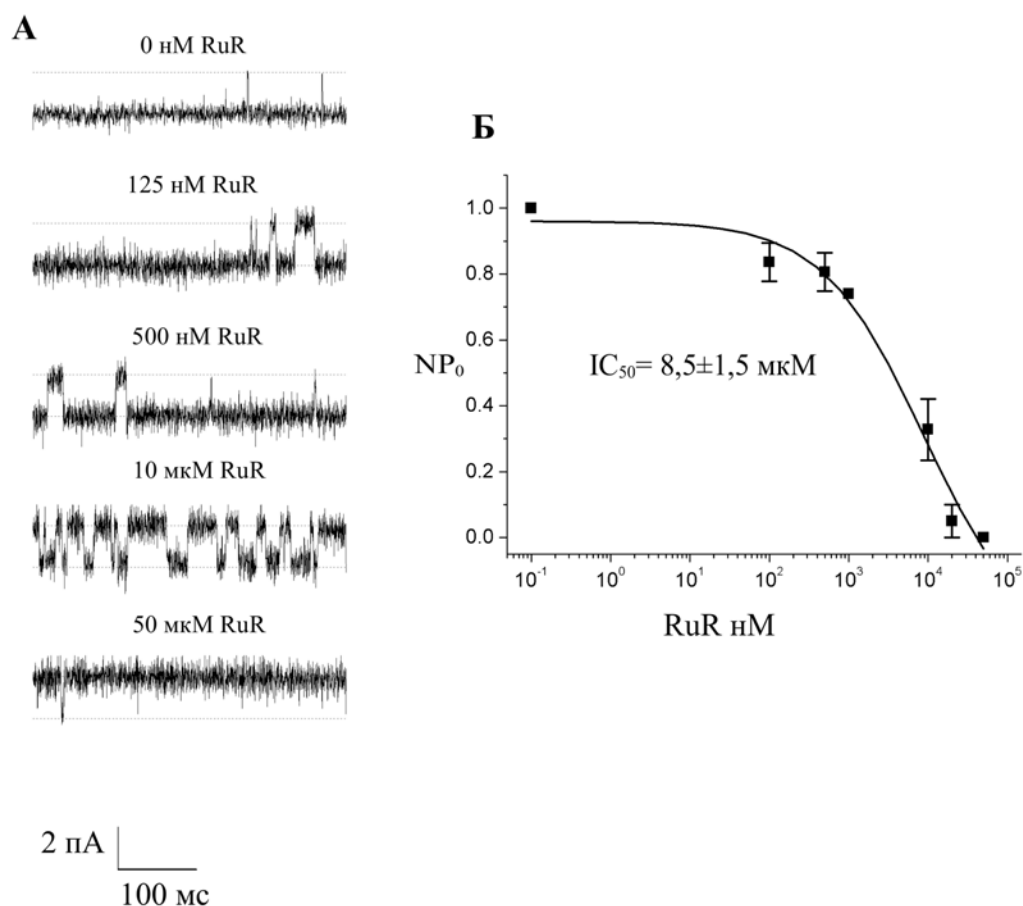


Рис. 4 Чувствительность кальциевых каналов к высоким (мкМ) концентрациям RuR в клетках Jurkat. **А.** Рутениевый красный (RuR) в концентрации 50 мкМ полностью заблокировал канал. **Б.** Зависимость NP_0 от концентрации RuR, рассчитанная по данным 6 экспериментов. Кривая представляет логарифмическую аппроксимацию полученных экспериментальных данных. Мембранный потенциал -70 мВ.

1.4. Экспрессия каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat.

В результате проведенных электрофизиологических исследований в клетках Jurkat человека были обнаружены каналы, биофизические и фармакологические свойства которых оказались сходными со свойствами каналов TRPV5/V6. Для подтверждения эндогенной экспрессии каналов TRPV5 и TRPV6 были проведены иммунофлуоресцентные исследования в клетках Jurkat (Рис. 5). Для этой цели использовали специфические антитела, выработанные против цитоплазматических С-концевых доменов каналов TRPV5 и TRPV6. В качестве контроля использовали блокирующий пептид фирмы производителя антител. Для лучшей локализации каналов TRPV5 и TRPV6 относительно плазматической мембраны, помимо антител к каналам TRPV5 и TRPV6, клетки Jurkat были окрашены красителем плазматической мембраны, CTX (β субъединица холерного токсина). Полученные, с помощью конфокальной

микроскопии, изображения показали, что большую часть клеток Jurkat занимает ядро, и всего лишь небольшая часть приходится на цитоплазму. Каналы TRPV5 и TRPV6 преимущественно локализируются в цитоплазме клеток Jurkat, и лишь небольшая часть каналов находится на плазматической мембране (Рис. 5).

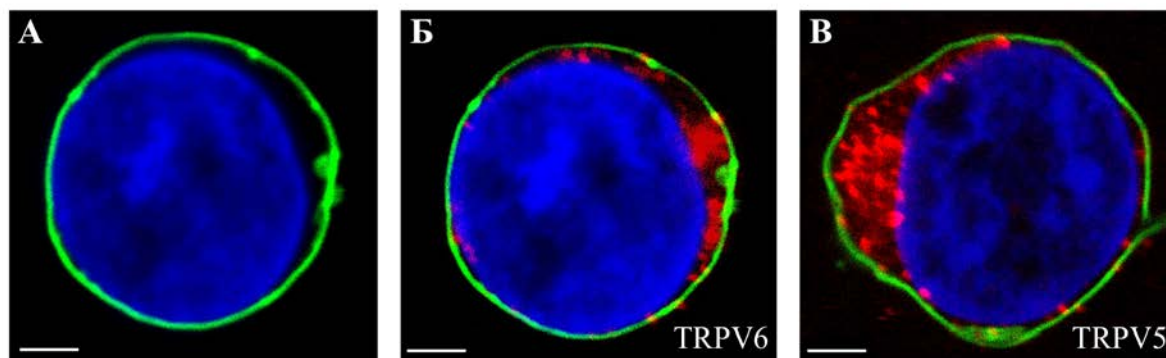


Рис. 5. Распределение каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat. Иммунофлуоресцентная окраска одиночных клеток Jurkat. А. Ядро (DAPI) - синий и плазматическая мембрана (CTX-FITC) - зеленый, Б. TRPV6 (Cy3) - красный В. TRPV5 (Cy3) – красный. Масштабная линейка 2,5 мкм.

1.5. Структурные особенности каналов TRPV5 и TRPV6.

Отдельно следует отметить, что в работе были получены данные, согласно которым каналы инактивировались при концентрациях RuR более высоких, чем это было необходимо для ингибирования TRPV5, и в то же время недостаточно высоких 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 гетеротетрамёрный канал. Возможность формирования таких комплексов между TRPV5 и TRPV6 была показана в искусственно экспрессионных системах [23]. Более того, увеличение количества субъединиц TRPV6 в таких гетеротетрамёрных комплексах по отношению к TRPV5 приводило к уменьшению их чувствительности к RuR [23].

Чтобы исследовать присутствие гетеротетрамёров в клетках Jurkat, было проведено двойное окрашивание антителами против TRPV5 и TRPV6. На рис. 6 показано совмещение изображений, полученных при различных длинах волн флуоресценции, соответствующих сигналам TRPV6 и TRPV5. Коэффициент перекрытия, рассчитанный по формуле Пирсона, показал высокий уровень колокализации каналов TRPV5/V6 (коэффициент Пирсона: $P=0.85\pm 0,5$). Эти данные подтверждают возможность формирования гибридных гетеротетрамёров из субъединиц TRPV6 и TRPV5 в клетках

Jurkat. Можно предположить, что соотношение субъединиц TRPV5/TRPV6 в таком канале может обеспечивать механизм для тонкой регуляции транспорта кальция и кальций-зависимых функций, таких как пролиферация и дифференцировка в клетках крови.

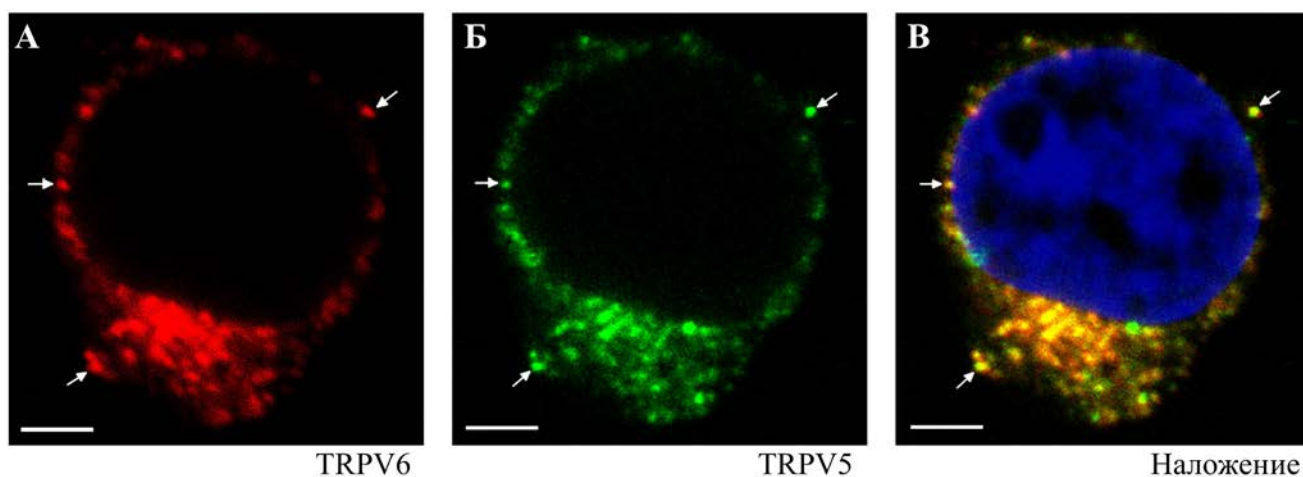


Рис. 6. Колокализация каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat. *А.* anti-TRPV6 H-90 и Cy3, *Б.* anti-TRPV5 H-99 и FITC. *В.* Наложение двух сигналов и DAPI. Масштабная линейка 2,5 мкм.

1.6. Активность кальций-проводящих каналов в плазматической мембране лимфоцитов человека.

Клетки Jurkat представляют иммортализованную линию Т-лимфоцитов и были исходно получены из крови больного лейкемией в 1976 г. Согласно существующим литературным данным, оверэкспрессия некоторых каналов TRP наблюдается только в злокачественно трансформированных клетках, тогда как в нормальных клетках эти каналы отсутствуют [26]. В связи с этим особый интерес представляют исследования экспрессии и свойств каналов в нормальных клетках и их сравнение с каналами в лейкозных клетках. Поэтому далее были проведены исследования кальциевых каналов в нормальных лимфоцитах, полученных из периферической крови условно здоровых доноров (как описано в «Материалах и методах»). В режиме регистрации одиночных токов на фрагменте изолированной мембраны (outside-out конфигурация), в растворах, не содержащих двухвалентных ионов, были зарегистрированы катионные каналы с проводимостью $36 \pm 0,2$ пСм ($n=10$) (Рис. 7).

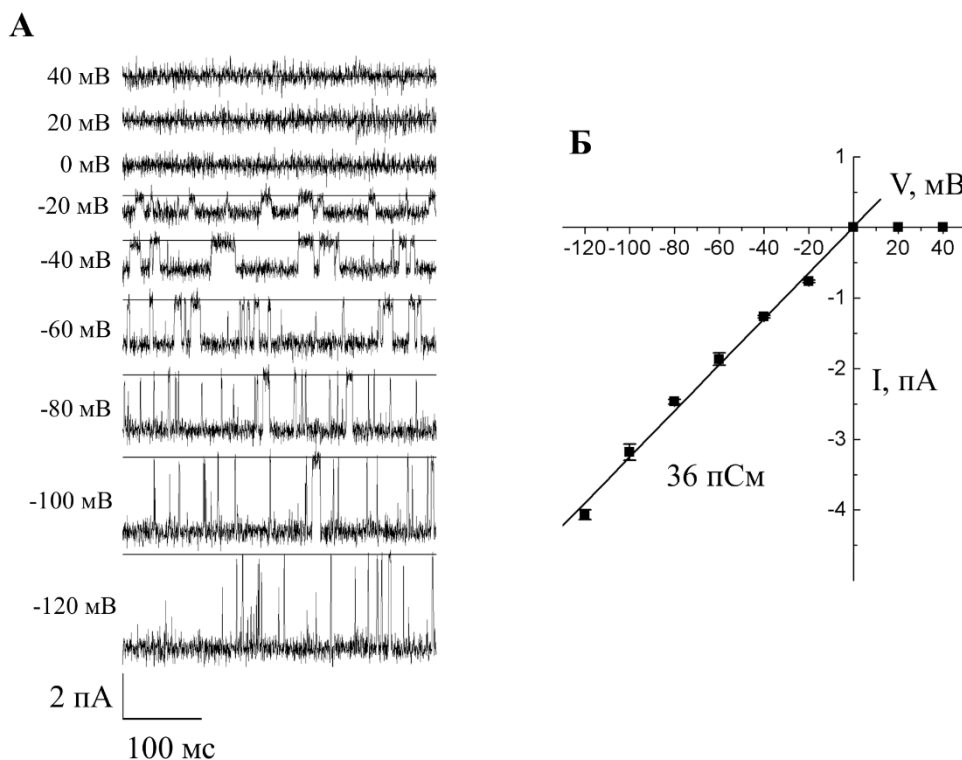


Рис. 7. Записи токов через кальциевые каналы в лимфоцитах периферической крови человека. **А.** ток через зарегистрированные каналы при различных потенциалах. **Б.** вольт-амперная характеристика.

Но вероятность регистрации этих каналов в нормальных лимфоцитах была достаточно невелика (25%, $n=36$). На рис. 7А приведены примеры записей токов через одиночные каналы, записанные при разных поддерживаемых потенциалах на мембране. На рис. 7Б приведена ВАХ, построенная по усредненным значениям амплитуды токов, полученным из амплитудных гистограмм. ВАХ демонстрирует входящее выпрямление моновалентных токов, характерное для селективных кальциевых каналов, в том числе каналов TRPV5 и TRPV6.

Сравнительный анализ показал идентичность электрофизиологических характеристик кальциевых каналов в клетках Jurkat и нормальных лимфоцитах человека. Однако, различия наблюдались в частоте встречаемости каналов с этими свойствами. Так, в клетках Jurkat каналы TRPV5 и TRPV6 были зарегистрированы в 63% экспериментов, тогда как в лимфоцитах человека каналы проявились лишь в 25% экспериментов. Следует отметить, что общая активность каналов, обнаруженных в изолированных фрагментах мембраны клеток Jurkat, была значительно выше, чем в нормальных лимфоцитах человека. Общая активность каналов в клетках Jurkat, выраженная в NP_0 , оказалась равной $2,18 \pm 0,27$ ($n=19$), а NP_0 в лимфоцитах крови

человека оказалась равной $1,15 \pm 0,13$ ($n=9$). Эти статистические данные свидетельствуют, что плотность (поверхностная экспрессия) исследуемых кальциевых каналов в клетках Jurkat выше, чем в нормальных лимфоцитах человека.

Присутствие каналов TRPV5 и TRPV6 в лимфоцитах периферической крови было подтверждено в настоящем исследовании при помощи метода иммунофлуоресценции. С помощью специфичных антител, выработанных против TRPV5 и TRPV6, была выявлена локализация каналов TRPV5 и TRPV6 в цитоплазме и плазматической мембране лимфоцитов периферической крови человека.

Следует особенно отметить, что проведенный в лаборатории в которой выполнялась данная работа количественный ПЦР анализ, во-первых, подтвердил экспрессию мРНК обоих генов *TRPV5* и *TRPV6* в исследуемых клеточных линиях. Во-вторых, этот метод показал значительно более высокий уровень экспрессии мРНК гена *TRPV6* в трансформированных клетках Jurkat по сравнению с покоящимися лимфоцитами [24]. Строгая корреляция между увеличением экспрессии мРНК каналов TRPV6 и стадией малигнизации клеток впервые была показана в исследованиях на клетках предстательной железы [25]. В настоящее время повышенная экспрессия каналов TRPV6 обнаружена в карциномах предстательной железы, щитовидной железы, кишечника и яичников [26]. Поэтому полученные в настоящем исследовании данные могут указывать на потенциальную роль каналов TRPV5/V6 в пролиферации или злокачественной трансформации лимфоцитов.

2. Регуляция активности каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat.

2.1. pH регулирует активность каналов TRPV5/V6.

Мы показали экспрессию и функциональную активность каналов TRPV5 и TRPV6 в нормальных и трансформированных лимфоцитах человека, однако о механизмах регуляции этих каналов, как и других каналов TRP в клетках крови известно крайне мало. Известно, что каналы TRPV5 и TRPV6 не чувствительны к действию стимулов, которые участвуют в регуляции других каналов этого подсемейства TRPV (капсаицину, высокой температуре, механическому и осмотическому воздействию и пр.) Однако в последние годы появились разрозненные данные, свидетельствующие о чувствительности этих каналов к изменению внеклеточного pH [27]. Мы исследовали действие различных значений внеклеточного pH на активность каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat (Рис. 8). Эксперименты проводили в режиме outside-out, при

поддерживаемых потенциалах на мембране -50 или -70 мВ и исходном значении внеклеточного $\text{pH}=7,3$. Оказалось, что замена раствора с $\text{pH}=7,3$ на щелочной ($\text{pH}=8,2$) раствор не повлияла на работу каналов TRPV5/V6 ($n=10$). Однако подача раствора с кислым pH к изолированному фрагменту мембраны приводила к ингибированию работы каналов TRPV5/V6 (Рис. 8). Следует отметить, что воздействие кислого pH на каналы было необратимым, т.е. возвращение к исходному значению $\text{pH}=7,3$ не приводило к восстановлению активности каналов ($n=5$).

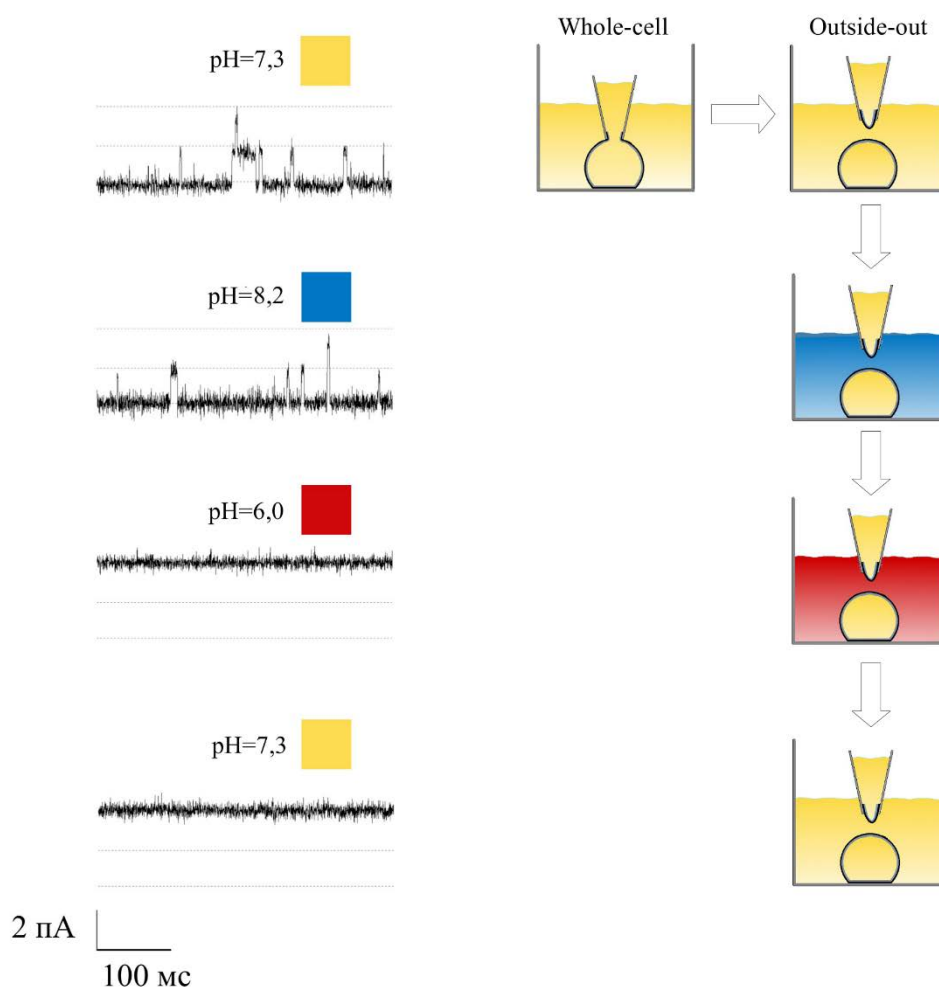


Рис. 8 Влияние различных pH раствора на активность каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat. Регистрация токов в режиме *outside-out*, при смене наружного раствора на раствор с различными значениями pH . Потенциал -70 мВ.

Согласно некоторым литературным данным, внеклеточный pH может напрямую воздействовать и менять проводящие свойства поры некоторых ионных каналов, в том числе некоторых каналов суперсемейства TRP [28–30]. Что касается каналов TRPV5/V6 в лимфоцитах, то наши данные не подтверждают этот факт. Во-первых, действие кислого pH на каналы TRPV5/V6 было необратимо, и, во-вторых, щелочной pH не

увеличивал активность каналов. В последние годы появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что внеклеточный рН может влиять на внутриклеточный транспорт и регулировать встраивание каналов в мембрану, таким образом контролируя их количество и, следовательно, активность на плазматической мембране клеток [31].

Чтобы проверить эту гипотезу, провели серию экспериментов, в которых клетки изначально (до изоляции фрагмента мембраны) помещали в растворы с кислым или щелочным рН. В таких условиях производили изоляцию фрагмента мембраны (конфигурация outside-out) и далее считали долю экспериментов, в которых были зарегистрированы каналы. Из пяти экспериментов, проведенных в растворе с рН=6,0, ни в одном не была зарегистрирована активность каналов. Напротив, если смена нормального раствора на щелочной раствор происходила когда клетка была целой (до изоляции фрагмента мембраны), то активность каналов TRPV5/V6 существенно увеличивалась. Активность каналов была зарегистрирована в 71% патчей (n=14), исходно изолированных в щелочной среде, и в 55% патчей (n=9), изолированных в растворах с рН=7,3. Таким образом, когда клетка была интактной, и все структуры в ней были целы, щелочной рН увеличивал активность каналов.

Из полученных результатов следует вывод о том, что действие рН на каналы TRPV5/V6 в клетках Jurkat, по-видимому, не связано с прямым действием на пору канала, а возможно сюда вовлечены процессы внутриклеточного транспорта каналов.

2.2. Действие дайнасора на активность каналов TRPV5/V6.

Исследования последних лет показали, что транспортные процессы, связанные с доставкой и утилизацией канальных белков, регулируют количество каналов в плазматической мембране и влияют на общую функциональную активность каналов в клетке. Активируемый везикулярный транспорт и последующее включение в плазматическую мембрану были показаны для многих катионных каналов [31]. Чтобы проверить, участвует ли эндо/экзоцитоз в регуляции активности каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat, мы использовали известный мембранно-проникающий ингибитор динамина (участника клатрин-зависимого эндоцитоза), дайнасор.

Результаты проведенных экспериментов показали, что введение в наружный раствор дайнасора (100 мкМ) приводило к постепенному затуханию активности каналов TRPV5 и TRPV6 (n=6) и свидетельствовало в пользу гипотезы об участии динамин-зависимого эндоцитоза в процессе регуляции активности каналов TRPV5/V6 в

плазматической мембране клеток Jurkat. Динамин является АТФазой, ответственной за процесс отщепления везикул с грузом от мембраны. Поэтому мы предполагаем, что при добавлении дайнасора образуются клатриновые инвагинации с каналами, которые не отщепляются от мембраны, но каким-то образом предотвращают работу каналов.

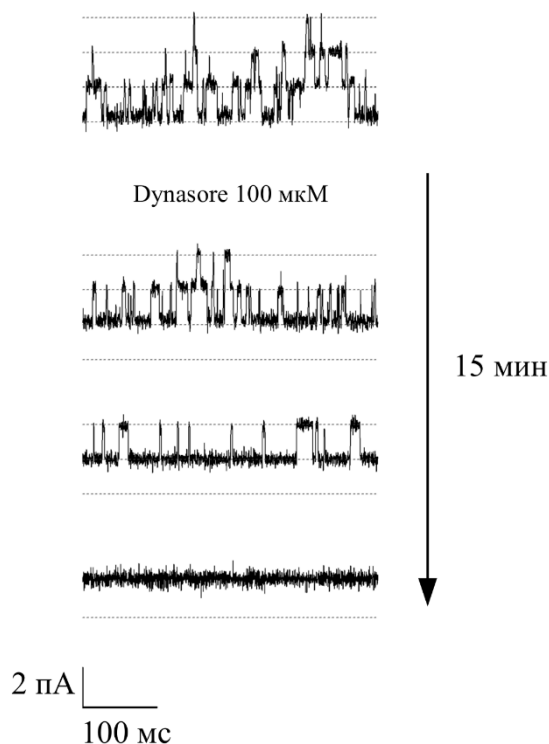


Рис. 9 Действие дайнасора на активность каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat. Добавление 100мкМ дайнсора во внешний раствор приводило к подавлению активности каналов TRPV5/V6. Регистрация токов в режиме *outside-out* при потенциале -70 мВ.

2.3. Колокализация клатрина с каналами TRPV5 и TRPV6.

В последнее время накапливается все больше данных, что каналы TRPV5 и TRPV6, как и многие члены суперсемейства TRP, постоянно участвуют в рециклировании, и их стационарное состояние на мембране определяется балансом эндоцитоза и экзоцитоза. Кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6 не имеют специфических рецепторов, они конститутивно активны, поэтому регулируемый экспорт и импорт этих каналов в плазматическую мембрану может оказаться основным механизмом регуляции их активности. Данные, полученные в электрофизиологических экспериментах, позволили сделать предположение, что регуляция количества и, соответственно, активности каналов TRPV5/V6 на плазматической мембране клеток Jurkat осуществляется посредством клатрин/динамин-зависимого эндоцитоза. Чтобы проверить эту гипотезу, была поставлена задача показать потенциальное взаимодействие белка клатрина с каналами TRPV5/V6. Используя специфические антитела к клатрину и белкам TRPV5 и TRPV6, были проведены двойные окрашивания на клетках Jurkat (Рис. 10, 11).

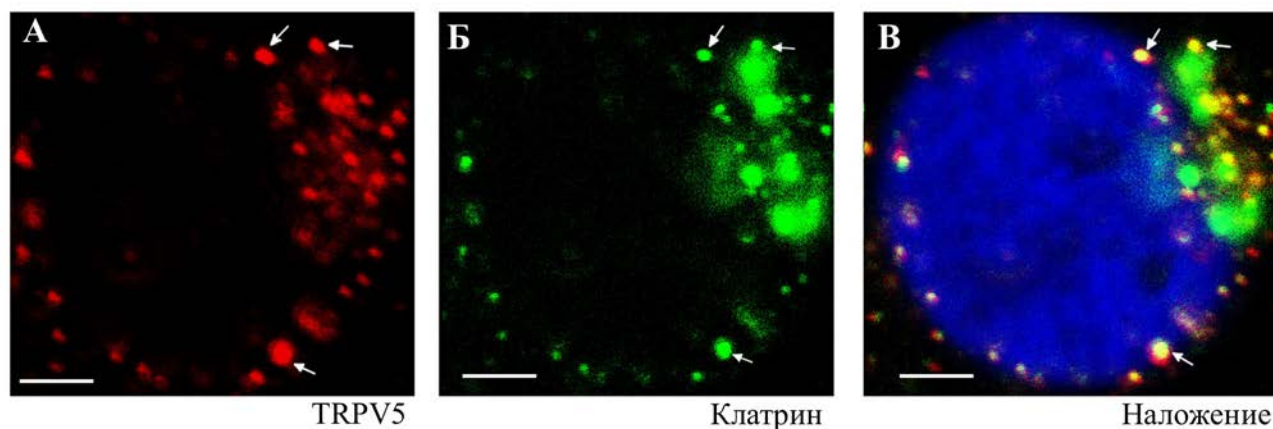


Рис. 10 Колокализация каналов TRPV5 и клатрина в клетках Jurkat. *А. TRPV5 (Cy3) Б. клатрин (FITC) В. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: красная флуоресценция — TRPV5, зеленая - клатрин, синяя - DAPI. Масштабная линейка 2,5 мкм.*

При изучении совмещенных изображений, полученных на конфокальном микроскопе, было выявлено, что каналы TRPV5 (Рис. 10) и каналы TRPV6 (Рис. 11) колокализуются с клатрином в клетках Jurkat. Степень колокализации этих белков при оценке доли совпадений была довольно высока (коэффициент Пирсона для TRPV5: $r=0,6 \pm 0,1$; для TRPV6: $r=0,6 \pm 0,1$).

Кроме того, в работе были проведены аналогичные иммунофлуоресцентные окрашивания клеток Jurkat для изучения колокализации каналов TRPV5/V6 и белка маркера ранних эндосом EEA1. Анализ совмещённых изображений показал частичную колокализацию белка EEA1 и каналов TRPV5/V6 (коэффициент Пирсона для TRPV5: $r=0,25 \pm 0,03$; TRPV6: $r=0,27 \pm 0,03$), что свидетельствует о том, что по крайней мере часть каналов TRPV5/V6 может находиться в ранних эндосомах.

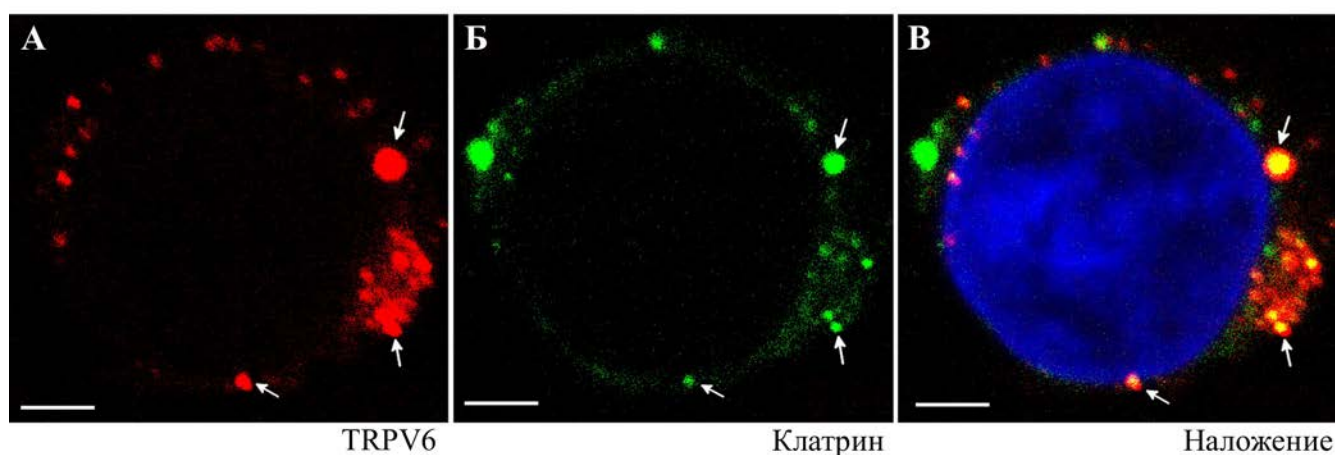


Рис. 11 Колокализация каналов TRPV6 и клатрина в клетках Jurkat. *А. TRPV6 (Cy3) Б. клатрин (FITC) В. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: красная флуоресценция — TRPV6, зеленая - клатрин, синяя - DAPI. Масштабная линейка 2,5 мкм.*

Анализируя совокупность полученных нами результатов, можно сделать вывод о том, что в клетках Jurkat и лимфоцитах периферической крови человека экспрессируются кальциевые каналы TRPV5/V6. Изменение pH наружной среды приводит к изменению плотности и, соответственно общей активности кальциевых каналов TRPV5/V6 в плазматической мембране клеток Jurkat. И, по-видимому, эти важные события контролируются при помощи клатрин-зависимого эндоцитоза. Полученные нами данные приобретают особенный смысл при рассмотрении роли кислотно/щелочного микроокружения в иммунном ответе и жизнедеятельности лимфоцитов. Известно, что одной из характеристик места воспаления является локальное понижение pH, которое связано с локальным увеличением производства молочной кислоты нейтрофилами и выделением кислых продуктов метаболизма бактерий [32]. Межклеточная жидкость в различных опухолях и абсцессах также показывает кислые значения pH на уровне 6,0. Существуют предположения, согласно которым, локальное закисление среды может участвовать в ингибировании иммунных функций при некоторых заболеваниях, включая муковисцидоз, и во время опухолевого роста и инвазивности [33]. Наши данные указывают на то, что каналы TRPV5/V6 реагируют на изменения внеклеточного pH, а следовательно, могут участвовать в pH-зависимых функциях лимфоцитов, в том числе и иммунных реакциях.

ВЫВОДЫ

1. В лимфоцитах периферической крови человека и клетках лимфобластной лейкемии линии Jurkat экспрессируются функционально активные кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6.
2. В нормальных лимфоцитах и клетках Jurkat биофизические свойства каналов TRPV5/V6 практически идентичны. Плотность функционально активных каналов выше в мембране клеток Jurkat по сравнению с нормальными лимфоцитами.
3. В клетках Jurkat каналы TRPV5 и TRPV6 могут функционировать как гомо- и гетеротетрамерные структуры.
4. Изменение внеклеточного pH влияет на активность исследуемых каналов.
5. Каналы TRPV5 и TRPV6 колокализуются с клатрином и маркером ранних эндосом EEA1. Регуляция активности TRPV5 и TRPV6 связана с процессами клатрин-зависимого эндоцитоза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Томилин 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. т. 55, №5: 300–306
2. Vassilieva I.O., **Tomilin V.N.**, Marakhova I.I., Shatrova A.N., Negulyaev Y.N., Semenova S.B. 2013. Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid Channels TRPV5 and TRPV6 in Human Blood Lymphocytes and Jurkat Leukemia T Cells. *Journal of Membrane Biology* 246(2):131-40.
3. Tomilin V.N., Semenova S.B. and Negulyaev Y.A. 2014. Regulation of TRPV5/V6 channel activity in Jurkat T-Cells (стендовый доклад). PCB089, abstract book p253P. *Physiology 2014*, London, UK.
4. **Томилин В.Н.**, Семенова С.Б. 2014. “Исследование внутриклеточного транспорта каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat.” Цитология. т. 56, №5: 382.
5. **Tomilin V.N.**, Negulyaev Y.A., Semenova S.B. 2013, “Role of TRPV6 calcium channels in proliferation of human T lymphocytes” (стендовый доклад). PCD203, abstract book p979P. IUPS 2013, Birmingham, UK.
6. **Томилин В.Н.**, Семенова С.Б., 2012 “Исследование кальций-проводящих каналов в Т-клетках человека линии Jurkat.” Цитология. т. 54, №4. 358-359.
7. Семенова С.Б., Васильева И.О., **Томилин В.Н.**, Негуляев Ю.А. 2011 “Сравнительный анализ экспрессии каналов TRPV5 и TRPV6 в нормальных и трансформированных лимфоцитах человека.” Цитология т. 53, №9. 715-716.
8. Васильева И.О., **Томилин В.Н.**, Негуляев Ю.А., Семенова С.Б. 2011. “Идентификация кальций-проводящих каналов в плазматической мембране клеток крови” Сборник статей международной конференция “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация” 24-26 мая 2011г., г. Пущино, т.1, Стр. 337-342.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scharff O. 1993. *Ugeskr. Laeger.* 155 (49): 3995–3999.
2. Revankar C.M., Advani S.H., Naik N.R. 2006. *Mol. Cancer.* 5: 65.
3. Feske S. 2007. *Nat. Rev. Immunol.* 7 (9): 690–702.
4. Gwack Y. et al. 2007. *Cell Calcium.* 42 (2): 145–156.
5. Hoth M., Penner R. 1993. *J. Physiol.* 465: 359–386.
6. Premack B.A., McDonald T. V, Gardner P. 1994. *J. Immunol.* 152 (11): 5226–5240.
7. Montell C., Rubin G.M. 1989. *Neuron.* 2 (4): 1313–1323.
8. Clapham D.E. 2003. *Nature.* 426 (6966): 517–524.
9. Flockerzi V. 2007. *Handb. Exp. Pharmacol.* 179: 1–19.
10. Dimke H., Hoenderop J.G.J., Bindels R.J.M. 2011. *J. Physiol.* 589 (7): 1535–1542.
11. Pedersen S.F., Owsianik G., Nilius B. 2005. *Cell Calcium.* Vol. 38, № 3-4. P. 233–252.
12. Dolmetsch R.E. et al. 1997. *Nature.* Vol. 386, № 6627. P. 855–858.
13. Bolte S., Cordelieres F.P. J. 2006. *Microsc.* Vol. 224, № 3. P. 213–232.
14. Kerschbaum H.H. 1999. *Science* 283 (5403): 836–839.
15. Semenova S.B. et al. 2009. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* Vol. 296, № 5. P. C1098–C1104.
16. Hoenderop J.G. et al. 2001. *J. Physiol.* 537 (3): 747–761.
17. Hoenderop J.G. et al. 2001. *J. Am. Soc. Nephrol.* Vol. 12, № 7. P. 1342–1349.
18. Voets T. 2003. *J. Gen. Physiol.* Vol. 121, № 3. P. 245–260.
19. Yue L. et al. 2001. *Nature.* 410 (6829): 705–709.
20. Braun F.-J. et al. 2001. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, № 2. P. 1063–1070.
21. Prakriya M., Lewis R.S. 2002. *J. Gen. Physiol.* Vol. 119, № 5. P. 487–507.
22. Matsuda H. 1991. *Annu. Rev. Physiol. Annual Reviews,* Vol. 53, № 1. P. 289–298.
23. Hoenderop J.G.J. et al. 2003. *EMBO J.* Vol. 22, № 4. P. 776–785.
24. Vassilieva I.O. et al. 2013. *J. Membr. Biol.* Vol. 246, № 2. P. 131–140.
25. Wissenbach U. et al. 2001. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, № 22. P. 19461–19468.
26. Peng J.B. et al. 2001. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 282, № 3. P. 729–734.
27. Bonny O. et al. 2008. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19 (8): 1530–1537.
28. Nilius B. et al. 2001. *Cell Calcium.* 29 (6): 417–428.
29. Yeh B.-I. et al. 2005. *EMBO J.* 24 (18): 3224–3234.
30. Yeh B.-I. et al. 2003. *J. Biol. Chem.* 278 (51): 51044–51052.
31. Lambers T.T. et al. 2007. *Mol. Cell. Biol.* 27 (4): 1486–1494.
32. Grinstein S., Swallow C.J., Rotstein O.D. 1991. *Clin. Biochem.* Vol. 24, № 3. P. 241–247.
33. Kraus M., Wolf B. 1996. *Tumour Biol.* Vol. 17, № 3. P. 133–154.