

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК**

**ТОМИЛИН
Виктор Николаевич**

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

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

**ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель –
кандидат биологических наук
С. Б. Семёнова**

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2014

Оглавление

1.	ВВЕДЕНИЕ	5
2.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
2.1.	Роль кальция в жизнеобеспечении и активации лимфоцитов	10
2.2.	Кальциевые каналы в лимфоцитах	13
2.3.	Каналы суперсемейства TRP	17
2.3.1.	Подсемейство TRPC	19
2.3.2.	Подсемейство TRPM	22
2.3.3.	Подсемейство TRPML	25
2.3.4.	Подсемейства TRPA и TRPP	31
2.3.5.	Подсемейство TRPV	33
2.4.	Роль TRPV6 в канцерогенезе	43
2.5.	TRP как каналы кальциевого входа	45
3.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	50
3.1.	Клетки	50
3.2.	Регистрация ионных токов	51
3.3.	Растворы	53
3.4.	Антитела	54
3.5.	Иммунофлуоресцентное окрашивание	55
3.6.	Анализ и обработка изображений	55
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	57
4.1.	Исследование кальциевых каналов в клетках крови	57
4.1.1.	Развитие интегральной активности моновалентных токов в клетках Jurkat	57
4.1.2.	Активность одиночных каналов в плазматической мембране клеток Jurkat	59
4.1.3.	Кальций-зависимая инактивация моновалентных токов	60
4.1.4.	Блокирование кальциевых каналов в клетках Jurkat рутениевым красным	61
4.1.5.	Экспрессия каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat	64
4.1.6.	Активность кальций проводящих каналов в плазматической мембране лимфоцитов человека	65

4.1.7.	Чувствительность кальциевых каналов к RuR в лимфоцитах периферической крови человека	67
4.1.8.	Экспрессия каналов TRPV5 и TRPV6 в нормальных лимфоцитах человека	68
4.1.9.	Структурные особенности каналов TRPV5 и TRPV6	69
4.2.	Регуляция активности каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat	71
4.2.1.	pH регулирует активность каналов TRPV5/V6	71
4.2.2.	Действие дайназора, на активность каналов TRPV5/V6	74
4.2.3.	Колокализация клатрина с каналами TRPV5 и TRPV6	75
4.2.4.	Колокализация белка EEA1 с каналами TRPV5 и TRPV6	77
5.	ОБСУЖДЕНИЕ	79
5.1.	Молекулярная идентификация кальциевых каналов в лимфоцитах человека	79
5.2.	Механизмы регуляции активности каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat	83
6.	ВЫВОДЫ	90
7.	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	91

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

TRP – transient receptor potential

RuR - рутениевый красный

IL-2 - интерлейкин-2

TCR- Т-клеточный рецептор

PIP₂ - фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат

IP₃ - инозитол-1,4,5-трифосфат

SOC - депо-управляемый Ca²⁺-канал

CRAC - Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel

APC - антиген презентирующая клетка

ДК - дендритная клетка

MHC - главный комплекс гистосовместимости

ИС - иммунологический синапс

cADPR - циклическая-АДФ-рибоза

RyR - рианодиновый рецептор

PTKs - тирозинкиназы

NF-κB - универсальный транскрипционный фактор κB

INF-γ - интерферон - γ

ALG-2 - гликозилтрансфераза

VDR - рецептор витамина D

1,25[OH]₂D₃ - дигидрокси витамин Д₃

PTH - паратиреоидный гормон

NCX1 – натрий кальциевый обменник 1

1. ВВЕДЕНИЕ

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 возбудимые 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, кальциевая и магниевая ре-абсорбция, осморегуляция, и т.д. [5–7]. 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 [8].

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 [9]. В последнее время накапливается все больше информации о роли каналов TRP в регуляции уровня внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$), 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 [10]. Уменьшение $[Ca^{2+}]_i$ приводит к ухудшению эффективности процесса активации Т-клеток и развитию различных форм иммунодефицита [11,12].

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 ИНЦ РАН (Санкт-Петербург, 2012), международная конференция IUPS2013 (Бирмингем, СК), IV конференция молодых ученых ИНЦ 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.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Роль кальция в жизнеобеспечении и активации лимфоцитов

Ключевым моментом в запуске иммунного ответа является взаимодействие между Т-клеткой и антиген-представляющей клеткой (АРС). Это событие обычно происходит во вторичных лимфоидных органах (лимфатических узлах или селезенке) между наивной Т-клеткой (ранее не активированной) и дендритной клеткой (ДК), которая несет на себе главный комплекс гистосовместимости с антигеном. Взаимодействие между Т-клеткой и АРС ведет к формированию структуры под названием иммунологический синапс (ИС), в создании которой участвуют множество мембранных белков обеих клеток. Специфичность этого взаимодействия зависит от степени сродства между антигеном, связанным с главным комплексом гистосовместимости (МНС), и Т-клеточным рецептором, узнающим антиген. В образовании ИС участвуют различные адгезионные и ко-активаторные белки, такие как LFA-1/ICAM-1 и CD28/CD80, CD86. Иммунологический синапс одновременно стабилен и пластичен, клетки сохраняют некоторую степень подвижности, а мембраны клеток постоянно перестраиваются [13].

Одним из первых признаков того, что процесс активации начался, является скачок внутриклеточной концентрации кальция, который происходит через несколько секунд после взаимодействия, задолго до образования иммунологического синапса. Это первичное повышение внутриклеточной концентрации кальция происходит вследствие взаимодействия лишь нескольких Т-клеточных рецепторов с МНС. Всего нескольких десятков МНС на поверхности антиген-представляющей клетки достаточно для запуска кальциевого ответа [2]. Также есть данные, что даже единичный МНС способен вызвать небольшой кальциевый ответ [15]. Но для более постоянного сигнала необходимо образование стабильного ИС.

При взаимодействии Т-клетки с антиген-презентирующей клеткой происходят значительные перестройки Т-клеточной мембраны, некоторые клетки даже перемещаются по поверхности антиген-представляющей клетки, пока не найдут оптимального места. Кальциевые исследования показали, что иммобилизация Т-клетки после взаимодействия с антиген-представляющей клеткой происходит после резкого повышения внутриклеточной концентрации кальция (Рис.1) [16]. Так, связывание кальция при помощи кальциевого хелатора ВАРТА предотвращает иммобилизацию, связанную с этим взаимодействием. Иммобилизация, по крайней мере частично, вызвана активацией кальций-зависимой протеазы, кальпаина. Кальпаин играет ключевую роль в клеточном распластывании и адгезии, процессах, которые происходят благодаря интегринам β_1 и β_2 . Активированный кальпаин переводит интегрины β_2 (LFA-1) из связанного с цитоскелетом состояния в свободное, что позволяет LFA-1 переместиться в зону контакта между Т-клеткой и антиген-презентирующей клеткой. Этот процесс необходим для образования прочного контакта и, следовательно, для нормальной активации Т-лимфоцита.

Как и во всех невозбудимых клетках, кальциевый ответ в лимфоцитах начинается с выброса кальция из внутриклеточных депо, через IP_3 – зависимые кальциевые каналы. Образование IP_3 происходит вследствие сигнального каскада, привлекающего некоторые тирозин киназы (Lck, Fyn и ZAP-70) к области взаимодействия Т-клеточного рецептора и МНС. Затем несколько субстратов, в том числе фосфолипаза $PLC-\gamma_1$, подвергаются фосфорилированию. В результате гидролиза PIP_2 образуется IP_3 . IP_3 связывается с рецептором IP_3R , расположенным в мембране ЭПР, что приводит к выбросу кальция в цитоплазму.

В лимфоцитах и клетках Jurkat было обнаружено три типа IP_3 -рецепторов, IP_3R1 , IP_3R2 , IP_3R3 . В тимоцитах и спленоцитах присутствуют лишь 2 типа - IP_3R2 и IP_3R3 [17]. Эти рецепторы по-разному реагируют на

концентрацию кальция и IP_3 , комбинации таких рецепторов могут создавать различные типы кальциевой сигнализации в клетках крови [18].

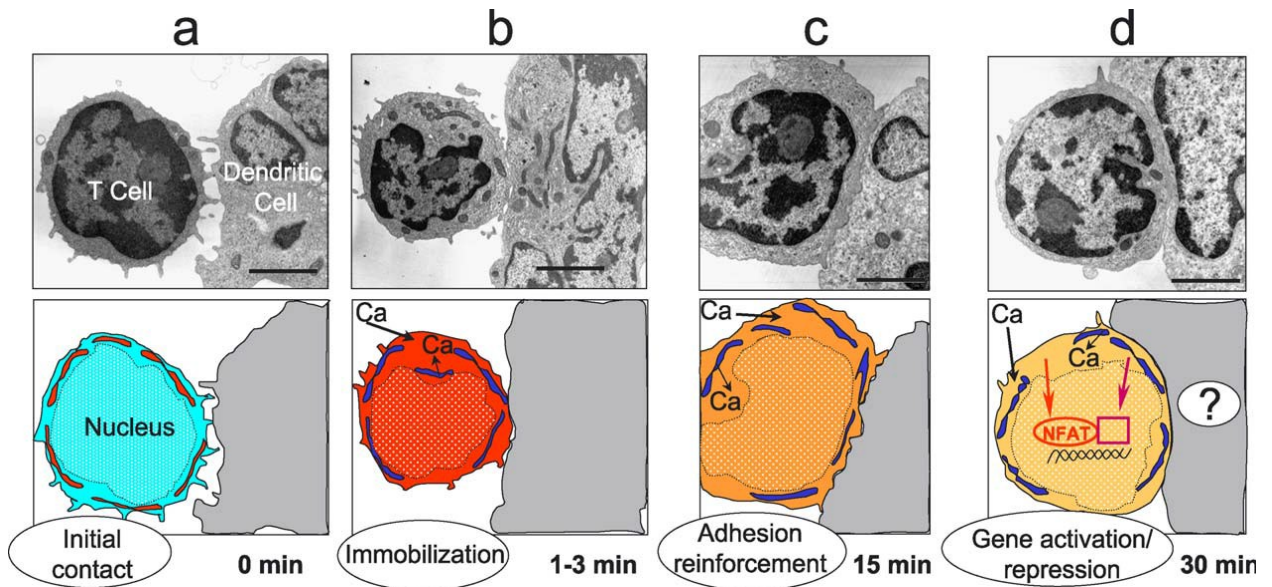


Рис. 1. Взаимодействие Т клетки с антиген-презентирующей клеткой. *а* Когда Т-клетка вступает в контакт с антиген-представляющей клеткой, уровень цитоплазматического кальция низкий, а кальциевые депо заполнены. *б* Через несколько минут появляется зона контакта и наблюдается резкий скачок в концентрации внутриклеточного кальция, что приводит к иммобилизации клетки. Кальциевые депо опустошаются. *с* Зона контакта увеличивается, и контакт становится более стабильным, цитоплазматический кальций стабилизируется на среднем уровне: кальциевые депо пусты, и, следовательно, продолжается кальциевый вход. *д* Повышенная концентрация цитоплазматического кальция в течение длительного времени приводит к перемещению в ядро транскрипционных факторов, таких как NFAT. Изменяется профиль экспрессии различных белков. Кальциевая концентрация отображена псевдоцветом (голубой – низкая; красный – высокая; оранжевый – средняя) [16]

Важная роль IP_3 в кальциевом ответе была показана в экспериментах с нокаутом по рецептору IP_3R , в таких клетках не происходило изменения концентрации кальция в ответ на активацию. Роль IP_3 в исходном опустошении кальциевых депо очевидна, однако менее понятно с помощью какого механизма кальциевые депо остаются пустыми в продолжение долгого времени, в то время как концентрация IP_3 изменяется лишь на короткое время. Одним из возможных объяснений этого феномена является то, что циклическая-АДФ-рибоза (сADPR) заменяет IP_3 в роли агента, поддерживающего депо опустошенными, за счет активации рианодинового

рецептора (RyR). На самом деле, в клетках Jurkat, было показано присутствие RyR 3-го типа, а также то, что cADPR может вызывать опустошение внутриклеточных депо [19]. Эти данные подтвердили, что одного IP_3 недостаточно для поддержания длительного кальциевого входа, для этого необходима cADPR.

Активация лимфоцитов не является процессом с одним возможным исходом. Так, $CD4^+$ Т-клетки, в процессе пролиферации и дифференцировки, могут трансформироваться в Т-хелперы 1-го типа (Th1). Th1 секретируют IL-2 и INF- γ , вызывая стимуляцию цитотоксических клеток и макрофагов. $CD4^+$ Т-клетки также могут пойти по пути развития в Th2, в результате чего, эти клетки будут секретировать IL-4 и активировать В-лимфоциты. $CD4^+$ Т-клетки, также, могут пойти по пути развития в регуляторные клетки, которые подавляют активность других Т-клеток. Все возможные пути превращения Т-клеток начинаются с одного и того же, - возрастания концентрации кальция.

Исследования роли кальция в различных путях развития лимфоцитов показали, что в Т-лимфоцитах изменение интенсивности и длительности возрастания уровня кальция приводило к различным последствиям [20]. Было показано, что NF- κ B и JNK активировались при непродолжительных и сильных повышениях концентрации кальция, тогда как небольшие и длительные повышения уровня кальция приводили к активации NFAT. Такая разница объясняется различной чувствительностью, вышеуказанных транскрипционных факторов, к концентрации кальция. Так, NF- κ B и JNK чувствительны лишь к высоким концентрациям кальция, тогда как NFAT активируется при малой концентрации кальция, но быстро инактивируется в отсутствие сигнала.

2.2. Кальциевые каналы в лимфоцитах

Величина и продолжительность кальциевого входа, являются важными факторами, влияющими на многие процессы в Т-клеточной активации.

Величина выброса кальция из внутриклеточных кальциевых депо Т-лимфоцитов незначительна, поэтому кальциевый вход в этих клетках в основном формируется за счет входа кальция через каналы плазматической мембраны. На плазматической мембране лимфоцитов экспрессируется несколько видов каналов, которые могут играть роль в кальциевом входе (Рис.2).

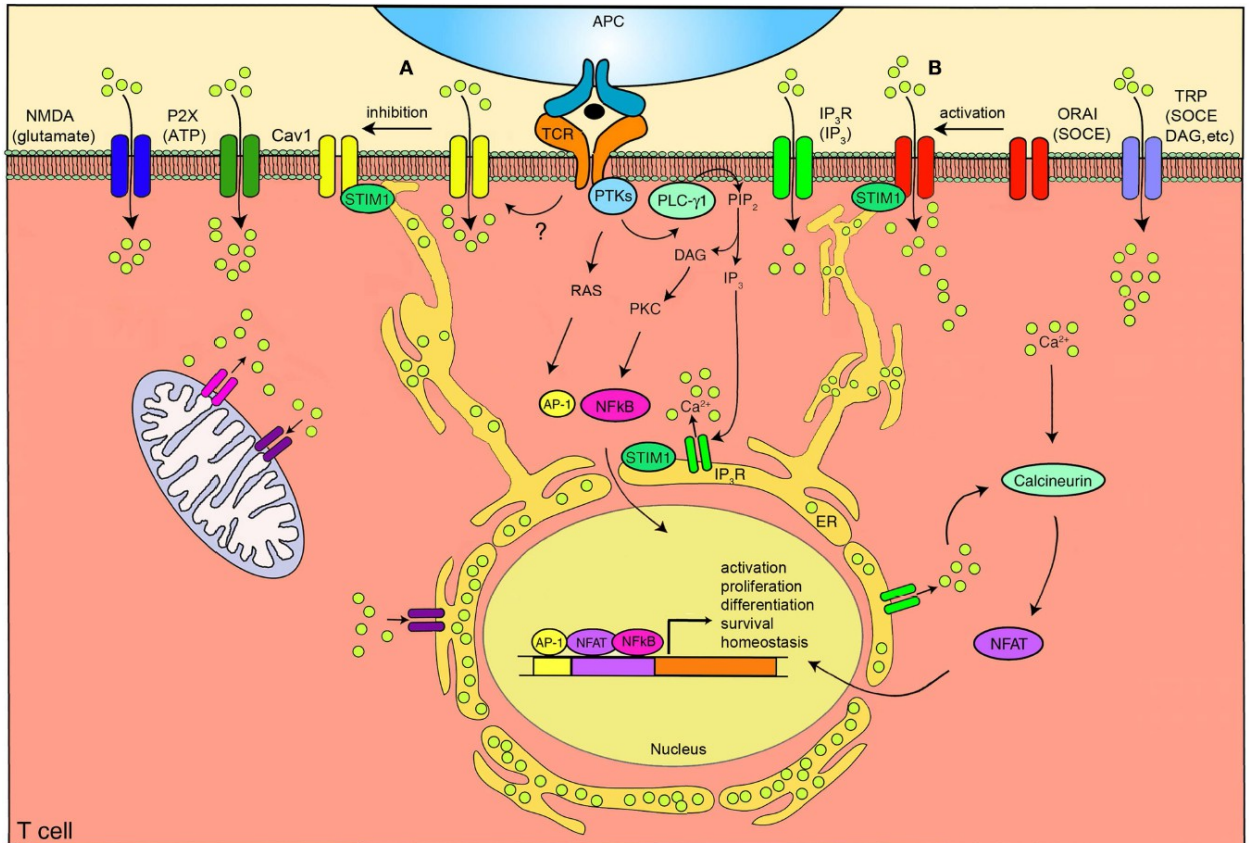


Рис. 2. Кальциевые каналы в Т-клетках. Связывание Т-клеточного рецептора (TCR) с главным комплексом гистосовместимости (МНС), несущим антиген, активирует тирозинкиназы (PTKs), которые активируют фосфолипазу PLC-γ1, которая, в свою очередь, гидролизует фосфатидил инозитол-4,5-бифосфат (PIP₂), образуя диацилглицерол (DAG) и инозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃). Повышение внутриклеточного уровня IP₃ приводит к выбросу кальция из внутриклеточных депо (ЭПР). Опустошение депо приводит к активации входа кальция через каналы Orai1 и депо-зависимые каналы суперсемейства TRP на плазматической мембране. Другие кальциевые каналы также участвуют в Т-клеточной активации. P2X-рецепторы реагируют на повышение концентрации АТР. Также могут функционировать потенциал-зависимые кальциевые каналы Ca_v1.

Принято считать, что основная часть кальциевого входа обеспечивается депо-зависимыми кальциевыми каналами. Кальциевые каналы,

обеспечивающие вход Ca^{2+} в ответ на опустошение депо, причисляются к обширному семейству депо-зависимых каналов (SOC), состоящему из множества кальциевых каналов с различными электрофизиологическими характеристиками. В Т-клетках существует несколько типов SOC каналов, основным из которых является канал CRAC (Ca^{2+} release activated Ca^{2+} channels) [21]. В течение долгого времени не была известна молекулярная природа этих каналов, но открытие белка ORAI1, при помощи геномного скрининга, разрешило эту проблему [22]. Белок ORAI1 и его два гомолога - ORAI2, ORAI3 являются мембранными белками. Структурный анализ и сайт-специфический мутагенез показали, что ORAI1 формирует пору канала CRAC, через которую и осуществляется вход кальция. Активация Т-клеточного рецептора приводит к образованию IP_3 . IP_3 индуцирует выброс кальция из эндоплазматического ретикулума, а опустошение депо приводит к открыванию каналов CRAC. Понижение уровня кальция в эндоплазматическом ретикулуме активирует белки STIM1 и STIM2, находящиеся в мембране ЭР, затем происходит перемещение ЭР к плазматической мембране, где белки STIM взаимодействуют с ORAI и открывают пору канала.

Роль каналов CRAC в Т-клетках была изучена у пациентах с мутациями в генах STIM и ORAI. Оказалось, что Т-клетки с каналами CRAC, непроводящими Ca^{2+} , плохо пролиферируют *in vitro*. В этих клетках осложнен и замедлен синтез различных цитокинов — $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-2 и IL-17. Т-клетки с мутацией в белках STIM и ORAI более резистентны к апоптозу и хуже мигрируют, но основным эффектом этих мутаций является неспособность Т-клеток адекватно выполнять свою роль в адаптивном иммунном ответе. В организмах с нокаутами по этим генам наблюдаются хронические инфекции, вызываемые широким спектром патогенов — вирусами, бактериями, грибами.

Каналы суперсемейства TRP, рецепторы P2X, потенциал-зависимые кальциевые каналы (Ca_v), также, участвуют в кальциевом входе в Т-клетках, но их роль, в отличие от CRAC каналов в жизнедеятельности лимфоцитов, остается слабо изученной.

Очень важным является тот факт, что некоторые каналы TRP также реагируют на опустошение внутриклеточных кальциевых депо. До открытия белков STIM и ORAI каналы TRP считались основными кандидатами на роль CRAC каналов. Так, было показано, что высокоселективный кальциевый канал TRPV6 активируется в ответ на опустошение кальциевых депо [23]. Несмотря на это, ингибитор CRAC, BTP2 не влиял на работу канала TRPV6. Каналы TRPC3 также рассматривались в качестве кандидатов на роль CRAC каналов, поскольку было обнаружено, что Т-клетки с мутантным TRPC3 хуже проводят кальций во время Т-клеточной активации. Кроме того, нокаут гена TRPC3 приводил к замедлению клеточной пролиферации после активации Т-клеток. Позднее было выявлено, что эти каналы активируются после опустошения депо, и их основным активатором является DAG [24].

Каналы TRPM2 не являются депо-зависимыми, но играют важную роль в кальциевом входе в Т-клетках. TRPM2 является неселективным кальциевым каналом, активируемым внутриклеточными вторичными мессенджерами АДФ-рибозой, NAD^+ и перекисью водорода [25]. Предполагается, что активация Т-клеток сопровождается повышением концентрации эндогенной АДФ-рибозы, что приводит к активации TRPM2 и входу кальция. Кроме того, каналы TRPM2 участвуют в эффекторных функциях клетки, поскольку было показано, что $CD4^+$ клетки, выделенные из мышей с нокаутом по TRPM2, хуже секретируют цитокины и пролиферировали. Воспалительные процессы у мышей с нокаутом по TRPM2 замедлялись. Несмотря на все вышесказанное, роль каналов TRP в кальциевой сигнализации Т-клеток все еще остается малоизученной. В настоящее время предполагается, что каналы TRP могут участвовать в кальциевом входе в некоторых типах Т-клеток, в

определенные моменты активации Т-клеток и при развитии различных патологий.

2.3. Каналы суперсемейства TRP

Каналы TRP (Transient Receptor Potential) представляют большое и разнообразное по функциям суперсемейство катионных каналов. Впервые канал TRP был обнаружен в мутантных мушках *Drosophila melanogaster* [26], фоторецепторы которых были неспособны поддерживать потенциал в ответ на продолжительное световое возбуждение. На данный момент обнаружено более 50 TRP каналов в различных видах живых организмов, что составляет порядка 20% всех известных генов, кодирующих ионные каналы. Первые каналы TRP в простейших, дрожжах и грибах отвечали за хемо-, термо- и механо-чувствительность. Многие из этих функций сохранились за каналами TRP в различных организмах, начиная от простейших до человека. Всего у млекопитающих обнаружено 28 каналов TRP. Согласно гомологии суперсемейство TRP подразделяют на 6 подсемейств: TRPC (канонические), TRPV (ванилоидные), TRPM (меластатиновые), TRPA (анкириновые), TRPML (муколипиновые), TRPP (полицистиновые) (Рис. 3). Каналы TRP участвуют во многих физиологических процессах, начиная от вкусовой передачи, болевой чувствительности, термочувствительности до поддержания осморегуляции и гомеостаза кальция и магния в организме.

Молекулярная архитектура каналов TRP похожа на архитектуру потенциал-зависимых калиевых каналов. Каждая субъединица состоит из шести трансмембранных доменов S1-S6, порообразующей петли между пятым и шестым трансмембранными доменами и цитоплазматических N- и С- концев [27]. Длина цитоплазматических концов, так же как и структурные домены в них входящие, могут сильно отличаться у разных подсемейств каналов TRP. Члены подсемейств TRPC и TRPM содержат на С-конце, так называемую, TRP кассету (25-аминокислотных остатков). У других подсемейств такой TRP домен отсутствует. Предполагается, что TRP домен,

скорее всего, необходим для связывания фосфатидилинозитол фосфатов [28]. Каналы подсемейств TRPC и TRPV обладают 3-4 анкириновыми повторами на N-конце, тогда как у канала TRPA1 их 14. Любопытно, что эти анкириновые повторы не были обнаружены в других подсемействах TRP.

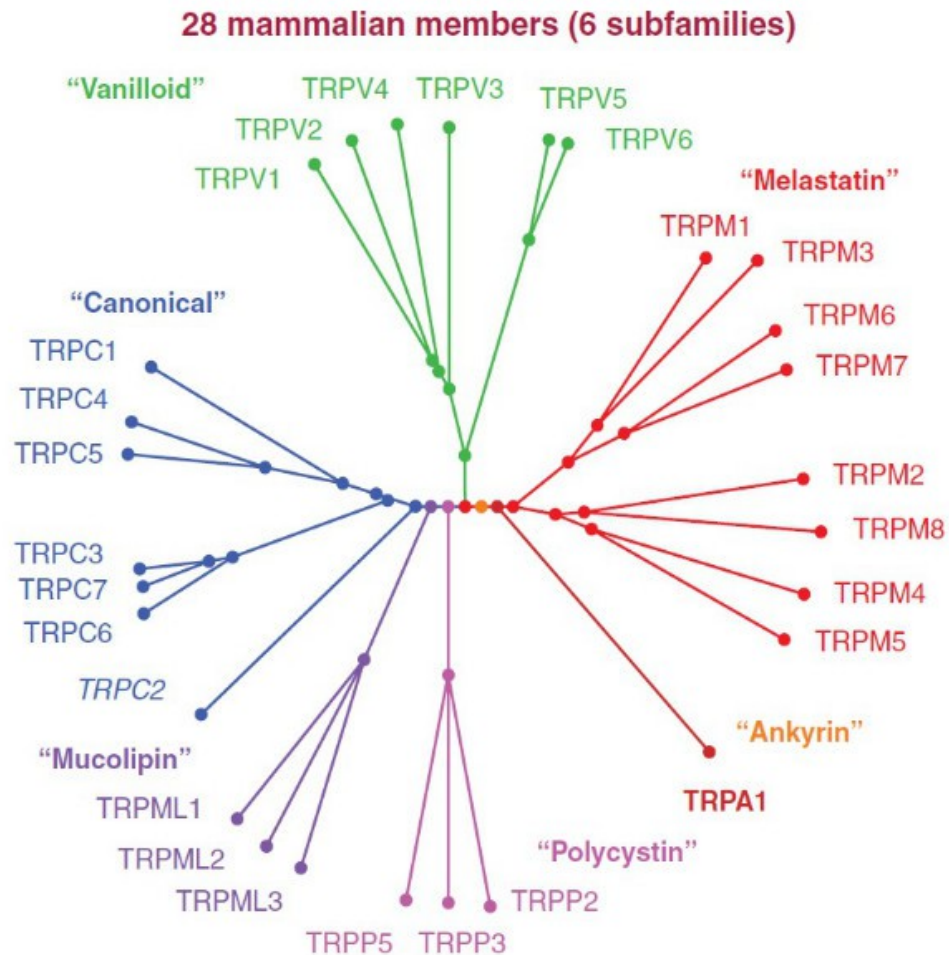


Рис. 3. Филогенетическое древо суперсемейства каналов TRP в млекопитающих. *TRPC* (канонические), *TRPV* (ванилоидные), *TRPM* (меластатиновые), *TRPA* (анкириновые), *TRPML* (муколипиновые), *TRPP* (полицистиновые).

Наши знания о пространственной структуре каналов TRP остаются ограниченными, только некоторые участки этих каналов были кристаллизованы. По имеющимся данным большинство каналов TRP имеют тетрамерную структуру, многие могут работать как гетеротетрамеры или гомотетрамеры. Все больше накапливающихся данных свидетельствует о

том, что субъединицы TRP белков, принадлежащих одному подсемейству, могут ассоциировать с образованием гетеротетрамерных функциональных каналов, обладающих различными характеристиками [29].

Основными направлениями в исследовании TRP каналов является изучение взаимодействия каналов с различными сигнальными белками и формирования сигнальных комплексов [30]. Особый интерес в последнее время уделяется исследованию различных механизмов доставки и экстракции каналов с плазматической мембраны, а также изучение общих аспектов локализации и трафика каналов внутри клетки.

2.3.1. Подсемейство TRPC

Каналы TRPC (канонические) являются неселективными кальциевыми каналами и экспрессируются почти во всех типах клеток млекопитающих [31]. Все члены подсемейства TRPC содержат инвариантную последовательность на С-концевом участке, так называемый TRP бокс (EWKFAR), и 3–4 анкириновых повтора на NH₂-конце (Рис. 4). Было показано, что субъединицы TRPC1 могут формировать тетрамеры с каналами TRPC4 и 5, и TRPC3/6/7 и характеристики таких каналов значительно отличаются от гомотетрамерных каналов, что осложняет исследование биофизических свойств этих каналов [32]. Все каналы подсемейства TRPC активируются стимуляцией рецепторов, сопряженных с активацией различных изоформы PLC (например, PLC_β, при активации G-белок сопряженных рецепторов (GPCRs), и PLC γ , при активации рецепторных тирозин киназ (RTKs)) [6].

Много работ было посвящено изучению взаимодействия белков депо-зависимого входа кальция, STIM1/ORAI1 и TRPC. Было показано, что белки STIM1/ORAI1 и TRPC1 образуют комплексы, участвующие в депо-зависимом входе кальция [33]. Предполагается, что белки ORAI1 взаимодействуют с каналами TRPC. Также было показано, что STIM1

связывается с TRPC1, TRPC4, и TRPC5. Вовлечение каналов TRPC в депо-зависимый вход может зависеть от липидных рафтов плазматической мембраны [34]. В общем, большинство исследователей сходится во мнении, что каналы TRPC, в определенных обстоятельствах, могут быть депо-зависимыми, но их электрофизиологические характеристики отличаются от каналов CRAC.

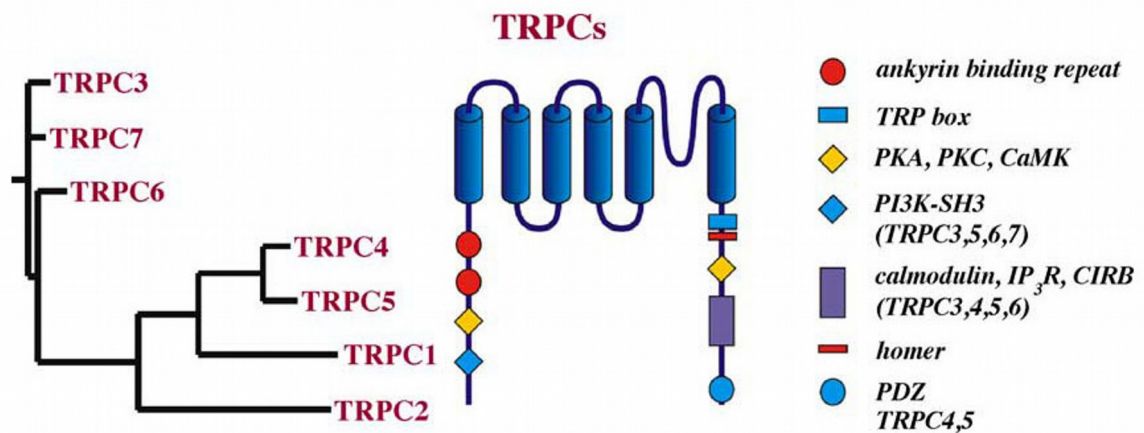


Рис. 4. Подсемейство TRPC. Предполагаемая мембранная топология, сайты связывания для регуляции каналов и белок-белковых взаимодействий.

Каналы подсемейства TRPC в млекопитающих разделяются на 4 подсемейства по функциональным свойствам и степени гомологии: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7, и TRPC4/5.

Каналы TRPC1 – TRPC3.

Про каналы TRPC1 известно, что они активируются нейрональным метаботропным глутаматным рецептором и тем самым участвуют в создании постсинаптического потенциала. Более того, TRPC1 служит «воротами» для входа кальция после воздействия агонистами, ростовыми факторами и PKC в различных типах клеток, в том числе и В-лимфоцитах [35]. У мышей с нокаутом гена TRPC1 обнаруживаются нарушения в секреции слюны, регулируемой нейротрансмиттерами. Нокаут TRPC1 у рыбы *Danio rerio*,

нарушает ангиогенез. Экспрессия канала TRPC3 наиболее высока в клетках гладких и сердечных мышц, а также в мозге [6]. Канал TRPC3 является и конститутивно активным и рецептор- управляемым каналом, дополнительно активирующимся DAG. Как и все каналы TRPC, TRPC3 может напрямую взаимодействовать с IP_3 и кальмодулином. Было показано, что участие активированного IP_3 канала TRPC3 необходимо для синаптогенеза и направленного роста аксонов, а также может участвовать в индуцирование роста артерий мозга [36]. Активация TRPC3 пуринергическим рецептором вызывает вход кальция и деполяризации в эндотелиальных клетках и клетках гладкой мускулатуры [37].

Каналы TRPC4 и TRPC5.

Экспрессия каналов TRPC4 была обнаружена в клетках эндотелия, клетках гладкой мускулатуры, кишечных клетках, во многих областях мозга, почках и надпочечниках [38]. У мышей с нокаутом по TRPC4 наблюдается сокращение в агонист-зависимом входе кальция и дефекты релаксации артериального эндотелия [39]. Так же как и TRPC4, TRPC5 экспрессируется во множестве тканей, включая мозг. Было показано, что TRPC5 может образовывать гетеромерные каналы с TRPC1. Предполагается, что эти гетеромультимерные каналы играют важную роль в развитии мозга [32]. В нейронах, TRPC5 был обнаружен в везикулярных телах, предназначенных для нейронального транспорта [40]. TRPC5 является потенциал-зависимым каналом, который может переключаться между состоянием выходящего выпрямления и двойного выходящего выпрямления (такие состояния называют фазами). Эти фазовые переходы могут изменяться под воздействием внешних факторов, таких как La^{3+} и белок EBP50 [41]. Каналы TRPC5 также участвуют в процессе регуляции длины нейронов гиппокампа и их росте. Показано, что TRPC5 оказывается необходим для формирования кратковременной памяти [41].

Каналы TRPC6 и TRPC7.

Каналы TRPC6 и TRPC7 являются близкими гомологами, но TRPC6 экспрессируется в основном в легких и мозге, а TRPC7 преимущественно обнаруживается в почках и гипофизе [31]. У мышей с нокаутом TRPC6 наблюдалось повышенное кровяное давление и повышенная сокращаемость гладких артериальных мышц [42]. Функциональная роль каналов TRPC7 остается неизвестной, предполагается, что TRPC7 проводит кальций во время миокардиального клеточного апоптоза при инфаркте [43].

2.3.2. Подсемейство TRPM

Подсемейство каналов TRPM (меластатиновые) разделяют на 4 группы на основании их гомологии: TRPM1/3, TRPM2/8, TRPM4/5, TRPM6/7 (Рис.5).

Каналы TRPM1 – TRPM3.

Канал TRPM1 является конститутивно активным, неселективным ионным каналом о клеточных функциях этого канала известно мало, в том числе и из-за большого числа сплайс вариантов этого канала. Пациенты, имеющие мутацию в канале TRPM1, страдают от куриной слепоты, что указывает на роль, которую этот канал играет в биполярных клетках сетчатки [44].

Белок TRPM2 представляет из себя комплекс канала и фермента, состоящий из неселективного катионного канала, связанного с АДФ-рибоза фосфатазным доменом (Рис. 5) [45]. Канал TRPM2 идентифицирован в основном в тканях мозга, но также обнаруживается и в других периферийных клетках. Было показано, что активация TRPM2 вызывает у клеток склонность к апоптозу и некрозу, а ингибирование TRPM2 оказывает нейропротекторное действие. Эти эффекты, скорее всего, обусловлены тем, что TRPM2 является катионным каналом, чувствительным к окислительно-восстановительному стрессу [46]. Через этот канал происходит вход кальция, индуцируемый

перекисью водорода в ходе клеточной смерти. Показано, что TRPM2 экспрессируется в промиелоцитарных клетках лейкемии HL-60, клетках гистiocитарной лимфомы U937, а также в клетках рака простаты и глиобластомах [47]. Была продемонстрирована роль, которую играет TRPM2 в индукции оксидативного стресса и кальциевом входе в клетках лейкемии. Подавление содержания белка TRPM2 при помощи малых интерферирующих РНК снижало концентрацию внутриклеточного кальция и уменьшало число апоптотических клеток [48].

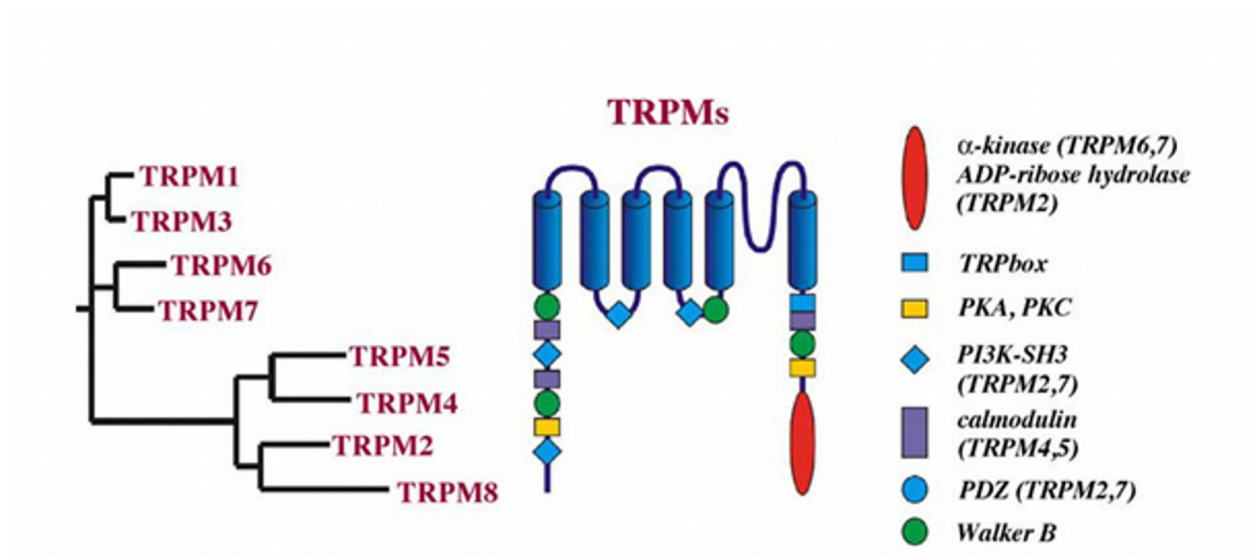


Рис. 5. Подсемейство TRPM. Предполагаемая мембранная топология, сайты связывания для регуляции каналов и белок-белковых взаимодействий.

Про каналы TRPM3 известно, что они проводят двухвалентные катионы и активируются снижением внеклеточной осмотичности. Экспрессия TRPM3 была показана в мозге и почках человека [49]. Активация, вызванная гипоосмотичностью может говорить о вовлеченности этого канала в почечный осмо-гомеостаз [49].

Каналы TRPM4 и TRPM5.

Каналы TRPM4/5 являются двумя близкими гомологами, которые экспрессируются практически повсеместно, но экспрессия TRPM4 наиболее высока в клетках сердца, поджелудочной железы и плаценты, а каналы TRPM5, в основном, экспрессируется в клетках кишечника, желудка, легких и мозга [50]. Эти каналы не проводят кальций, но могут участвовать в регуляции внутриклеточного кальция посредством других механизмов. Известно, что TRPM4 принимает участие в активации Т-лимфоцитов и тучных клеток, также как и в миграции дендритных и тучных клеток [51]. Было показано, что TRPM4 ускоряет пролиферацию клеток HeLa посредством воздействия на β -катениновый сигнальный путь [52], но влияет ли он на этот каскад при онкогенезе В и Т-лимфоцитов пока не известно. В некоторых клетках иммунной системы было отмечено, что уменьшение уровня TRPM4 приводит к экспрессии Е-кадхеринов, что может свидетельствовать об участии этих каналов в процессах миграции и инвазивности. Оверэкспрессия TRPM4 коррелирует с метастазированием в раке простаты [53].

Каналы TRPM6 – TRPM8.

Каналы TRPM6 и TRPM7 являются гомологичными каналами-киназами. TRPM6 экспрессируется в почках и кишечнике, он является высокоселективным магниевым каналом, и важным элементом магниевого гомеостаза в почках и кишечнике [54]. Канал TRPM7 экспрессируется в большом количестве тканей, включая ткани мозга, сердца, легких, в гемапоэтических клетках и клетках почек. Активность TRPM7 регулируется внутриклеточным уровнем Mg^{2+} и Mg-АТФ, канал участвует в гомеостазе магния и других важных физиологических процессах. Кроме этого канал TRPM7 участвует в регуляции клеточного цикла и индуцированной токсинами смерти нейронов [55]. Оверэкспрессия канала TRPM7 была

замечена в клетках рака молочных желез, и уровень экспрессии каналов коррелировал с прогрессией опухоли [56]. Известно, что канал TRPM7 экспрессируется в клетках базофильной лейкемии крысы RBL-2H3, и в клетках миелоидной лейкемии человека K562. Подавление экспрессии TRPM7 в клетках RBL-2H3 приводило к значительному снижению клеточной выживаемости и увеличению доли апоптотических клеток [57].

Каналы TRPM7, могут участвовать во внутриклеточном транспорте, поскольку были обнаружены в синаптических везикулах [58]. Также было отмечено, что после связывания канала TRPM7 с $PI(4,5)P_2$ на плазматической мембране, канал активировался и начинал пропускать различные ионы, включая кальций, из чего был сделан вывод о том, что канал является важным посредником в слиянии везикул.

TRPM8 был впервые идентифицирован в клетках рака простаты, но позже было показано, что каналы TRPM8 экспрессируются во множестве различных тканей. Например, высокий уровень экспрессии был обнаружен в ноцицептивных и термо-чувствительных нейронах [59]. Известно, что TRPM8 активируется при низких температурах ($8-28^{\circ}C$) и кроме того, такими веществами, как ицилин и ментол.

2.3.3. Подсемейство TRPML

Подсемейство каналов TRPML (Муколипиновые) представлено у млекопитающих тремя каналами (TRPML1-3). Первый член подсемейства муколипиновых (TRPML1) был идентифицирован как ген, продукт мутации которого, приводил к тяжелому заболеванию, связанному с накоплением лизосом, муколипидозу IV [99,100]. Все белки TRPML являются относительно небольшими (менее 600 аминокислотных остатков), и демонстрируют относительно низкую гомологию с другими членами суперсемейства TRP (Рис. 6).

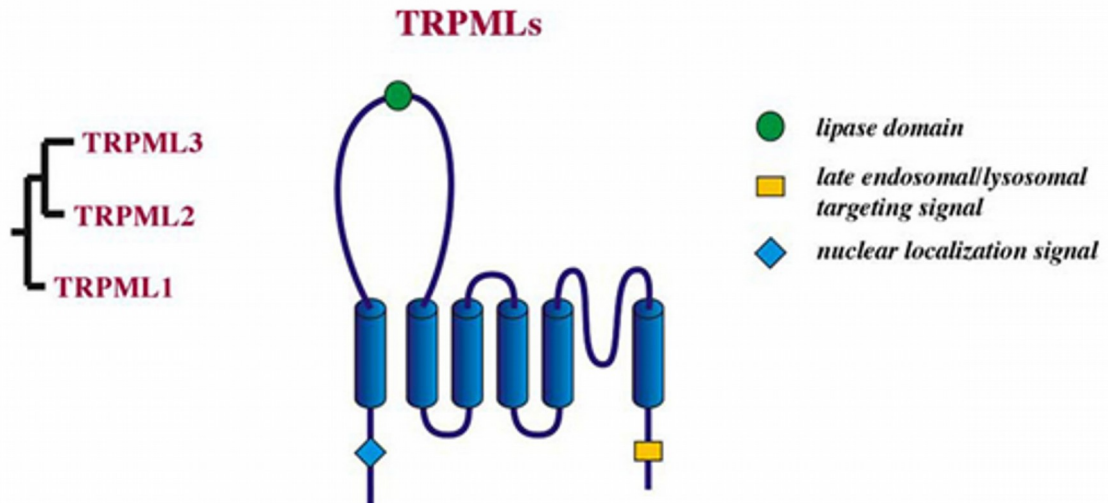


Рис. 6. Подсемейство TRPML. Предполагаемая мембранная топология, сайты связывания для регуляции каналов и белок-белковых взаимодействий.

TRPML1 эндо-лизосомальный канал.

TRPML1, также известный как муколипин-1, может считаться примером эндосомального TRP канала. TRPML1 содержит на С- и N-концах белка сигнальные участки доставки (двулейциновый мотив) в поздние эндосомы и лизосомы. Двулейцинный мотив на N-конце канала напрямую взаимодействует с клатриновыми адаптерами AP1 и AP3. Это взаимодействие обеспечивает перемещение белка TRPML1 из транс-Гольджи в эндосомальный путь. TRPML1 также может оказаться в поздних эндосомах и лизосомах после интернализации с плазматической мембраны, куда канал был ранее доставлен из транс-Гольджи. Эндоцитоз канала TRPML1, регулируется посредством двулейцинового мотива на С-конце канала, и зависит от клатрина и клатринового адаптера AP2 [60].

Методом патч-кламп, были получены записи токов через каналы TRPML1, на увеличенных лизосомах из клеток, обработанных вакуолином [61]. Эти данные, совместно с исследованиями на мутированном канале TRPML1, позволили выяснить, что каналы TRPML1 имеют свойство входящего выпрямления, пропускают ионы Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Fe^{2+} и Mn^{2+} , и

активируются кислыми значениями pH. Несмотря на тот факт, что этот канал не селективен к кальцию, считается, что основной его физиологической функцией является выброс кальция из эндосом.

Мутации в TRPML1 приводят к муколипидозу IV-типа [62,63]. Это заболевание характеризуется серьезными неврологическими и офтальмологическими аномалиями, связанными с лизосомной болезнью накопления. Первые симптомы заболевания проявляются в первый год жизни, и включают в себя умственную отсталость, задержки развития психомоторных функций, слабый тонус мышц и прогрессирующую потерю зрения. Пациенты с муколипидозом четвертого типа также испытывают проблемы с секрецией соляной кислоты в желудке, что приводит к понижению уровня абсорбции железа и, как следствие, к анемии. К 13-14-ти летнему возрасту большинство больных не могут ходить, плохо говорят и практически не видят. При помощи электронной микроскопии было показано, что фибробласты, полученные от больных муколипидозом, содержат крупные вакуолеподобные структуры, накапливающие мукополисахариды и липиды, которые формируют характерные мультиконцентрические ламеллы [63]. Эти огромные вакуоли были обнаружены не только в фибробластах, но и во всех тканях и органах пациентов, страдающих этим заболеванием, что свидетельствует о повсеместном нарушении функций лизосом. Отсутствие TRPML1 приводит к аномальным значениям pH в лизосомах, замедленному ретроградному транспорту из лизосом в транс-Гольджи, замедленному слиянию лизосом с плазматической мембраной, повышенному уровню Fe^{2+} в лизосомах и дефектам аутофагии [64,65]. Предполагается, что накопление всех этих факторов в итоге приводит к окислительному стрессу, что вызывает смерть нейронов и нейродегенерацию. Важно отметить, что измененный трафик липидов, накопление липофусцина, дефекты аутофагии и окислительный стресс часто встречаются во многих заболеваниях, связанных с лизосомами

[65]. Поэтому изучение механизмов, регулирующих активность каналов TRPML1 является приоритетным направлением большинства современных исследований в этой области (Рис 7).

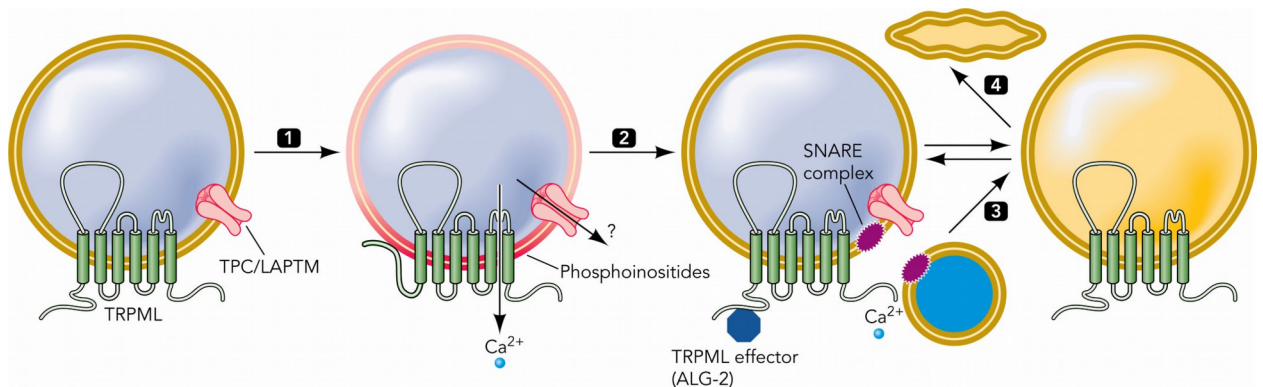


Рис. 7 Предполагаемая модель активации каналов TRPML. Каналы TRPML локализируются в эндосомальных мембранах. В покое каналы TRPML находятся на низком уровне. После стимуляции (1) фосфоинозитидами или pH каналы TRPML активируются и обеспечивают выход кальция из эндосом или лизосом. Утечка внутриэндосомного кальция приводит к рекрутированию эффекторных белков, таких как ALG-2 (2), которые, в свою очередь, взаимодействуют с белками, вовлеченными в эндосомальный трафик. Внутривезикулярный кальций также необходим для завершения эндосомального слияния, после связывания между комплексами SNARE (3). TRPML также могут регулировать перестройку органелл (4).

Было отмечено, что активность каналов TRPML1 модулируется фосфоинозитидами [61]. При помощи патч-кламп экспериментов на эндосомальных мембранах, было показано, что PI(3,5)P2 с высокой специфичностью стимулировал активность TRPML1. TRPML1 напрямую связывается с PI(3,5)P2 посредством нескольких положительных аминокислотных остатков на N-конце канала, что приводит к конформационным изменениям, активирующим канал. Белок ALG-2 (гликозилтрансфераза) также модулирует активность каналов TRPML1 [66]. ALG-2 связывается с N-концом канала, только в присутствии кальция. Мутации в связывающем домене ALG-2 значительно снижают накопление увеличенных лизосом, вызываемое гиперэкспрессией TRPML1, что свидетельствует о том, что ALG-2 может выступать в роли кальциевого сенсора, который регулирует процессы эндоцитарного пути, связанные с активностью TRPML1. Также было отмечено, что никотинамид динуклеотид

фосфат (NAADP) может активировать TRPML1 и способствовать выбросу кальция из лизосом [67]. NAADP – зависимый ответ блокировался антителами или миРНК против TRPML1.

Каналы TRPML3 и TRPML4.

Каналы TRPML2 и TRPML3 также принимают участие в различных функциях, связанных с эндосомальным трафиком. Иммунофлуоресцентные исследования позволили выявить, что как эндогенные, так и рекомбинантные каналы TRPML3 локализуются, в основном, в ранних и поздних эндосомах, а также в лизосомах и, в меньшей степени на плазматической мембране [68]. Патч-кламп эксперименты на клетках, оверэкспрессирующих каналы TRPML3, показали, что канал функционирует как кальций-проводящий канал, со свойством входящего выпрямления и ингибирования кислыми рН [69]. Ток через каналы TRPML3 был также измерен в эндолизосомных мембранах, и также как и для TRPML1, активность канала увеличивалась в присутствии PI(3,5)P₂. У мышей с фенотипом виритин-вадлер, характеризующихся потерей слуха и вестибулярной дисфункцией, была обнаружена мутация в гене TRPML3, приводящая к появлению канала с более высокой электрофизиологической активностью [70]. Эта единичная мутация в поро-образующем регионе канала TRPML3 предотвращает закрытие канала, что приводит к неконтролируемому входу кальция в клетки, следствием которого является апоптоз и клеточная смерть [70].

Оверэкспрессия TRPML3 приводит к серьезным изменениям в эндосомальном пути, таким как увеличение и кластеризация эндосом, задержкам в деградации эпидермального фактора роста и замедлению созревания аутофагосом [71]. Нокаут TRPML3 приводит к значительному накоплению кальция в лизосомах, сильным дефектам в закислении эндосом и увеличенному количеству слияний эндосом. Кроме того, отсутствие эндогенного TRPML3 влияет на целостность лизосом и аутофагию [72]. Исходя из этих данных, было сделано предположение, что регулируемый

кальциевый выброс из лизосом происходит посредством TRPML3, и функционирование этих каналов необходимо для поддержания кальциевого гомеостаза, эндосомального pH и мембранного трафика.

Также как канал TRPML3, TRPML2 частично локализуется в поздних эндосомах и лизосомах [73]. В клетках HeLa рекомбинантный TRPML2 распределяется у клеточной мембраны и в рециклирующих эндосомах. Характеристики и функции каналов TRPML2 намного хуже изучены, чем свойства каналов TRPML1 и TRPML3. Исследования в искусственно экспрессионных системах показали, что каналы TRPML2 являются неселективными катионными каналами, проводящими кальций [74]. TRPML2-опосредованный ток был зарегистрирован в эндолизосомных мембранах, что позволяет предположить, что этот канал участвует в эндосомальном пути. Мутация в канале TRPML2, блокирующая его активность, существенно снижает скорость рециклирования некоторых рецепторов на клеточной поверхности, что свидетельствует о том, что TRPML2 может регулировать транспорт определенных гликозил-фосфатидилинозитол заякоренных белков. Канал TRPML2 был также обнаружен в В-лимфоцитах, где его экспрессия регулируется тирозин киназой Брютонна, важнейшим белком в развитии В-лимфоцитов, что может свидетельствовать об участии TRPML2 в иммунном ответе [75].

Различные члены подсемейства каналов TRPML способны образовывать гетеромультимерные структуры, наличие таких гетеромультимерных каналов было показано при помощи метода FRET и ко-иммунопреципитации [74]. *In vitro* исследования показали, что гетеромультимерные каналы TRPML обладают отличными от гомомультимеров биофизическими свойствами. Также было показано, что гетеромультимеры рекомбинантных каналов TRPML способны модулировать некоторые клеточные процессы, такие как клеточная выживаемость и аутофагия. Формирование гетеромультимеров TRPML в клетке довольно ограничено, поскольку между TRPML1 и

TRPML2/3 наблюдается лишь частичная колокализация в поздних эндосомах и лизосомах [74]. Каналы TRPML также способны формировать гетероолигомеры с другими эндолизосомными трансмембранными белками. С помощью ко-иммунопреципитации было показано, что TRPML1 (но не TRPML3) взаимодействует с семейством лизосомно-ассоциированных трансмембранных белков, вовлеченных в транспорт различных молекул через лизосомные мембраны [76].

2.3.4. Подсемейства TRPA и TRPP

Канал TRPA1.

Канал TRPA1 является единственным членом подсемейства TRPA (анкирин), он характеризуется 14 анкириновыми повторами на N-конце канала (Рис. 8). TRPA1 экспрессируется в волосковых клетках и некоторых нейронах [77]. TRPA1 активируется сильным холодом и другими веществами, включая алил изотиоционат, аллицин и никотин [77]. TRPA1 играет важную роль в болевой передаче, вызванной холодом или химическими веществами.

Каналы TRPP2/3/5.

Подсемейство TRPP (полицистиновые) состоит из восьми членов, из которых лишь три демонстрируют канальную активность — TRPP2/3/5 (Рис. 8). Каналы TRPP имеют селективность по кальцию P_{Ca}/P_{Na} от 1 до 5 и не обладают специфичными анкириновыми доменами [78]. TRPP2 экспрессируется во многих тканях, но более всего в почечных клетках. TRPP2 важен для правильного расположения органов во время эмбриогенеза, дефекты в этом канале вызывают асимметрию в расположении органов модельных организмов [79]. Посредством спираль-спирального (coiled-coil) домена (Рис. 8) TRPP1 и TRPP2 образуют полицистиновый комплекс, который является необходимым сенсором давления в почках.

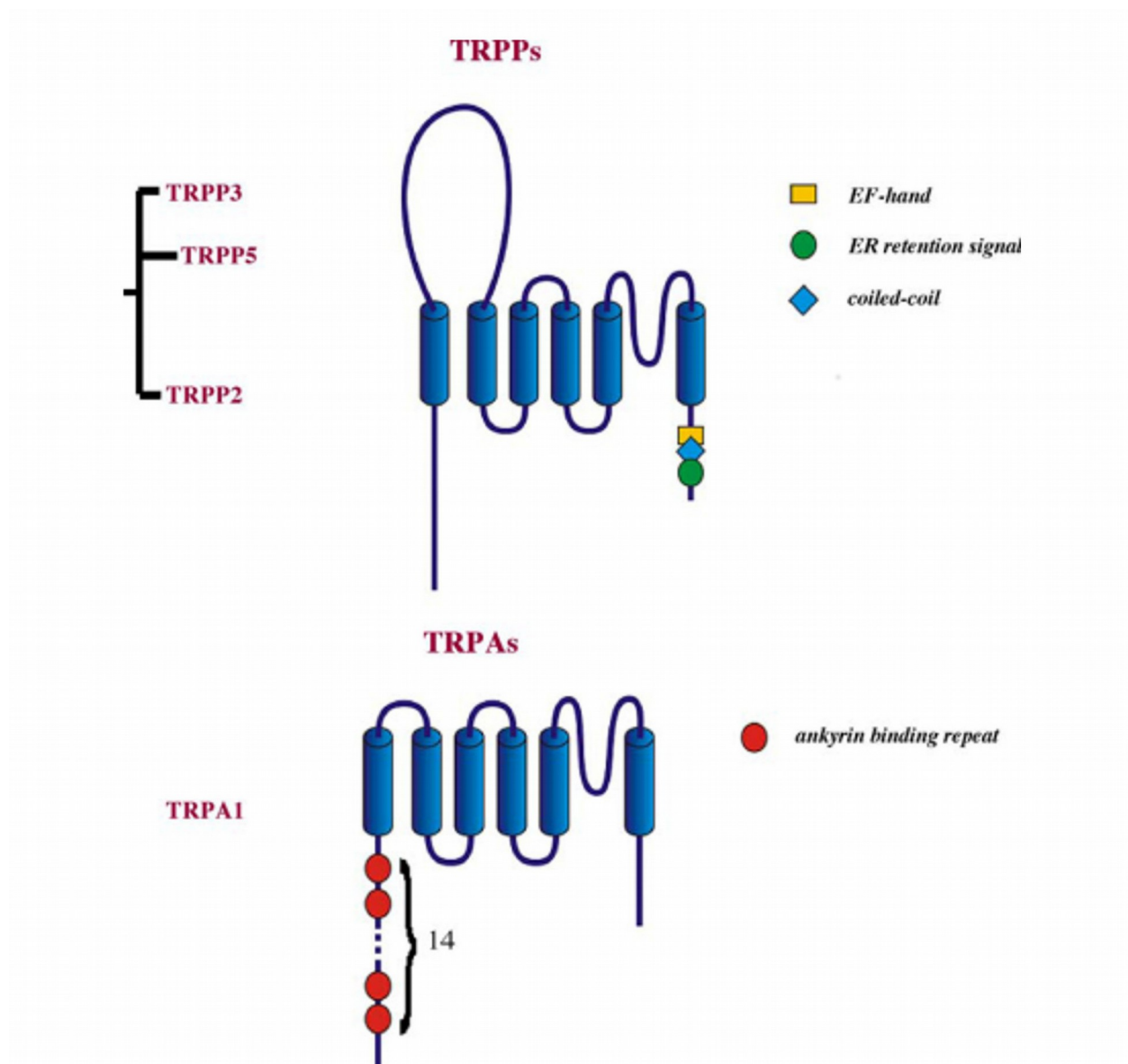


Рис. 8. Подсемейство TRPP и TRPA. Предполагаемая мембранная топология, сайты связывания для регуляции каналов и белок-белковых взаимодействий.

Функции TRPP3 и TRPP5 довольно слабо изучены. Известно, что TRPP3 экспрессируется достаточно широко, тогда как TRPP5, в основном, экспрессируется в семенниках. TRPP3 является кальций-проводящим неселективным каналом, активирующимся при защелачивании среды. Считается, что этот канал вовлечен во вкусовую рецепцию [80]. TRPP5 может играть роль в гомеостазе кальция.

2.3.5. Подсемейство TRPV

Каналы подсемейства TRPV (ванилоидные) получили свое название, продемонстрировав чувствительность к компоненту жгучего перца, капсаицину (ванилоиду). Часть членов этого подсемейства, каналы TRPV1-4 являются неселективными кальциевыми каналами, активируемые температурой и другими внешними стимулами. Другие каналы этого подсемейства, TRPV5/TRPV6 являются исключением, не только из подсемейства TRPV но и из всего суперсемейства TRP, поскольку имеют высокую селективность к кальцию [81]. Все представители подсемейства TRPV имеют от 3-6 анкириновых повторов на N-конце белка. На С-концевом участке каналы имеют сайты связывания с регуляторными белками, протеин киназой C, кальмодулином и пр. (Рис. 9). Так же как и подсемейство TRPC, подсемейство каналов TRPV можно разделить на несколько подсемейств по их структурным особенностям и функциям, так выделяют TRPV1/TRPV2, TRPV3, TRPV4 и каналы TRPV5/TRPV6.

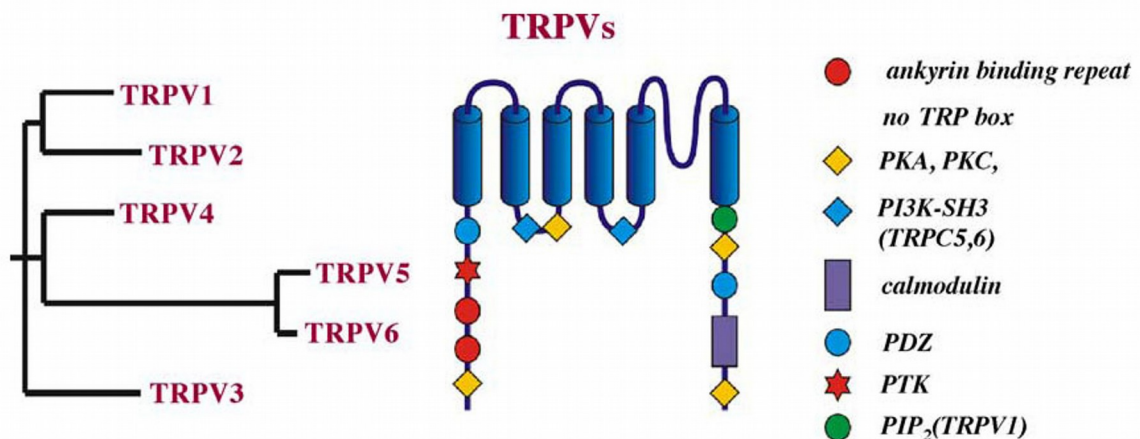


Рис. 9. Подсемейство TRPV. Предполагаемая мембранная топология, сайты связывания для регуляции каналов и белок-белковых взаимодействий.

Каналы TRPV1 и TRPV2.

Экспрессия TRPV1 была впервые обнаружена в нейронах спинного мозга, отвечающих за болевую передачу и нейронах узла тройничного нерва [82]. Позднее экспрессия TRPV1 была показана во многих других типах клеток [83]. Активация TRPV1 является потенциал-зависимой, и может быть вызвана капсаицином и высокой температурой ($>42^{\circ}\text{C}$). Исследования на мышцах с нокаутом по TRPV1 показали важную роль, которую этот канал играет в болевой и температурной чувствительности. Известно, что TRPV1 также участвует в выбросе вещества Р из поджелудочной железы [84].

Канал TRPV2 обладает 50% гомологией с TRPV1, и также экспрессируется в нейронах спинномозгового ганглия, некоторых отделах мозга и других клетках [82]. Так же как и TRPV1, TRPV2 активируется теплом, но при более высоких температурах ($>52^{\circ}\text{C}$). Факторы роста (IGF-1) могут активировать TRPV2, посредством встраивания в мембрану. TRPV2 также является механо-чувствительным каналом. В клетках гладкой мускулатуры сосудов он работает как сенсор механического воздействия. В последнее время появилось несколько работ, свидетельствующих о важной роли, которую каналы TRPV2 играют во врожденном иммунитете [85].

Каналы TRPV2 экспрессируются в CD34^{+} гемопоэтических стволовых клетках, где концентрация цитоплазматического кальция чрезвычайно важна для прогрессии клеточного цикла, роста и дифференцировки. Также была показана экспрессия этого канала в В-лимфоцитах. Предполагается, что кальциевый вход через этот канал контролирует сигнальный каскад, связанный с иммунологическим синапсом. Недавно была замечена связь между мутациями гена TRPV2 и трансформацией гемопоэтических клеток. Была обнаружена аберрантная экспрессия каналов TRPV2 в В- лимфоцитах лимфомы Мэнтла [86]. Оверэкспрессия TRPV2 была также обнаружена в клональных плазматических клетках костного мозга пациентов с злокачественным заболеванием костного мозга [87].

Каналы TRPV3 и TRPV4.

Экспрессия каналов TRPV3 была показана в тканях мозга, языке и семенниках [88]. Уровень экспрессии также высок в клетках кожи, кератиноцитах и клетках, окружающих волосяные фолликулы. TRPV3 активируется при температурах $>30-33^{\circ}\text{C}$. Мыши с нокаутом по TRPV3, демонстрировали значительное снижение чувствительность к тепловому стрессу, тогда как другие сенсорные функции оставались в порядке [89].

Каналы TRPV4 экспрессируются в костной ткани, хондроцитах, инсулин-производящих β -клетках, кератиноцитах, клетках гладкой мускулатуры, и в различных эпителиальных клетках [82]. TRPV4 активируется при довольно низкой температуре ($>24^{\circ}\text{C}$), поэтому является конститутивно активным при нормальной температуре тела. Другими известными активаторами канала являются механическое воздействие, анандамид и арахидоновая кислота [90]. Считается, что TRPV4 принимает участие в терморегуляции эпидермальных кератиноцитов. В нейронах TRPV4 работает как рецептор, активируемый механическим и осмотическим стрессом. Недавно обнаруженная экспрессия TRPV4 в остеобластах и остеокластах может свидетельствовать об участии этого канала в формировании костной ткани [91].

Каналы TRPV5 и TRPV6.

Каналы TRPV5 и TRPV6 были идентифицированы в результате поиска генов, ответственных за транслеточный транспорт Ca^{2+} в почках [92] и кишечнике [93]. До конца двадцатого века кальбидины считались основными молекулами транслеточного кальциевого транспорта, и лишь немного было известно о механизме входа кальция через апикальную мембрану. Используя мРНК, выделенную из клеток соединительных трубочек и клеток кортикальных собирательных трубочек, полученных из почки кролика, Бинделс и его группа [92] создали библиотеку кДНК и определили нужный

клон кДНК. Выделенная кДНК кодировала белок длиной 730 аминокислот, который был назван ECaC (Epithelial Ca^{2+} channel) или эпителиальный кальциевый канал [92]. В то же время, независимо, из двенадцатиперстного и слепого отделов кишечника крыс, находившихся на двухнедельной безкальциевой диете, другая группа ученых выделила мРНК, инъекция которой в ооциты приводила к повышенному входу кальция в этих клетках [93]. Из библиотеки кДНК, выделенной из тканей двенадцатиперстной кишки была клонирована кДНК, кодирующая белок состоящий из 727 аминокислот, который был назван CaT1 (Ca^{2+} transport protein subtype 1) или Ca^{2+} -переносящий белок подтип 1. Как оказалось, белки ECaC и CaT1 гомологичны на 74%. ECaC и CaT1 позже были переименованы в TRPV5 и TRPV6 соответственно. Только два известных и клонированных на тот момент белка имели некоторую степень гомологии к белкам TRPV5 и TRPV6, это были — капсаициновый рецептор VR1 (TRPV1), - канал, активирующийся в ответ на тепловое воздействие, и белок OSM-9, (*C. elegans*,) связанный с механочувствительностью и обонянием. Интересным является тот факт, что оба белка, TRPV5 и TRPV6 присутствуют в геноме млекопитающих, но только TRPV6, присутствует у птиц и рыб (Рис.10).

В работе группы Хогстранда было отмечено наличие лишь одного TRPV5/V6 - подобного гена в геноме рыбы фугу [94]. В геноме курицы также присутствует только TRPV6. Но оба гена TRPV5 и TRPV6 присутствуют в геноме мыши, шимпанзе и человека. В геноме человека и других млекопитающих гены TRPV5 и TRPV6 находятся в соседних позициях на одной хромосоме. Оба гена совпадают по длине экзонов в кодирующей последовательности [95]. Таким образом, вероятнее всего ген TRPV5 произошел за счет дупликации гена TRPV6. TRPV6 имеет более широкий профиль экспрессии, тогда как экспрессия TRPV5 ограничена почкой и лишь некоторыми другими тканями. По-видимому, необходимость в другом

принципе работы почки у млекопитающих и стала движущей силой, приведшей к появлению TRPV5.

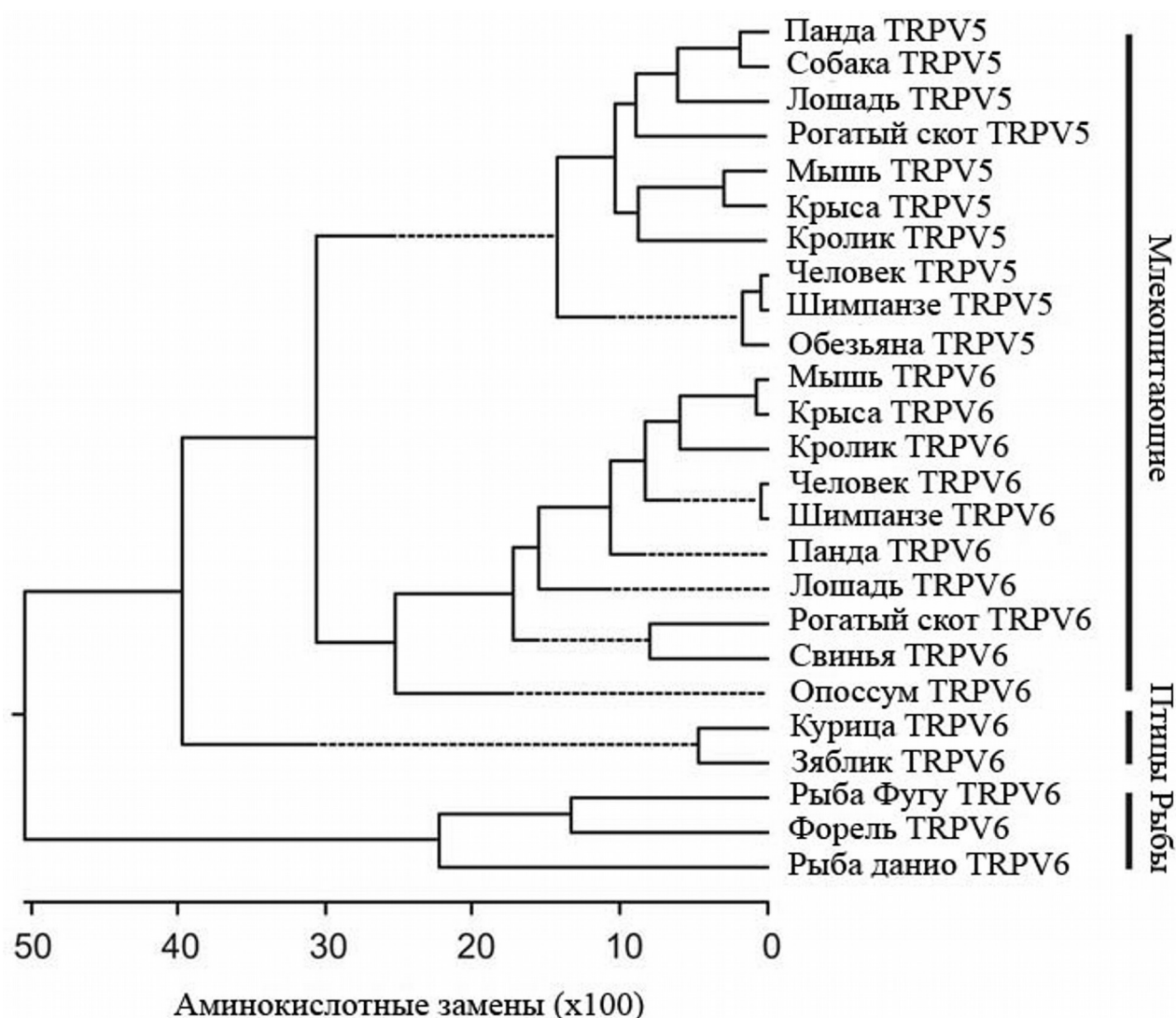


Рис. 10. Филогенетическое древо каналов TRPV5 и TRPV6. Древо было получено методом сопоставления белков TRPV5 и TRPV6 у различных видов.

TRPV5 и TRPV6 обладают набором схожих функциональных характеристик. Каналы TRPV5/TRPV6 конститутивно активны, и обеспечивают кальциевый вход вне зависимости от изменения мембранного потенциала, механических воздействий, внеклеточных лигандов и других стимулов. Эта особенность отличает их от других каналов подсемейства TRPV1-4, которые активируются в ответ на тепло, изменение осмотичности и различные лиганды. Фактически каналы TRPV5 и TRPV6 осуществляют транспорт кальция по градиенту концентрации. Кальциевый вход,

обеспечивающийся этими каналами, выходит на насыщение в субмиллимолярных пределах, что хорошо соответствует концентрации кальция в просвете кишечника и дистальных трубок [92,93,96,97].

Одной из общих характеристик для TRPV5 и TRPV6 является их высокая селективность к кальцию, с отношением проводимости Ca^{2+} к Na^{+} 100/1 и низкой проводимостью в кальций-содержащих растворах [98]. Поэтому активность одиночных каналов TRPV5/TRPV6 может быть зарегистрирована только в отсутствие двухвалентных катионов (Ca^{2+} и Mg^{2+}) в растворе. В этих условиях переносчиками заряда через каналы становятся Na^{+} или K^{+} [98]. По-видимому TRPV5 и TRPV6, функционируют как тетрамеры, и способны образовывать как гомо- так и гетеротетрамеры состоящие из субъединиц TRPV5 и TRPV6 (Рис. 11Б) [99]. На N-концевой части каналов TRPV5 и TRPV6 находятся пять анкириновых повторов. Считается, что третий анкириновый повтор является ключевым элементом для правильной сборки тетрамера (Рис. 11А) [100].

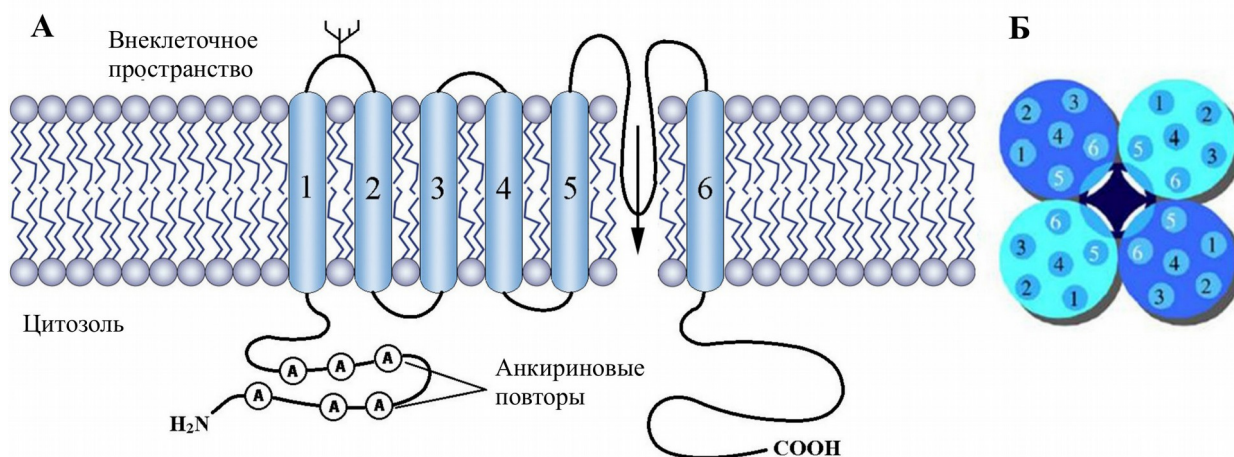


Рис. 11. Структура каналов TRPV5 и TRPV6. *А* структура каналообразующих белков TRPV5 и TRPV6. *Б* Полностью собранный гетеротетрамерный канал TRPV5/V6

Структура поры TRPV6 схожа со структурой поры K^{+} - канала (с единичным фильтром, предшествующим поро-образующей спирали) [101]. Кальциевый селективный фильтр канала сформирован четырьмя остатками 542 аспартатов субъединиц белков TRPV5/6, собравшихся в тетрамер

[102,103]. Блокирование каналов TRPV5/6 ионами магния также осуществляется за счет взаимодействия с 542 аспартатами белков TRPV5/6 [102,104]. Каналы TRPV5 и TRPV6 также обладают свойством кальций-зависимой инактивации, которая работает по принципу обратной связи [105]. Кальциевая инактивация TRPV6 происходит намного быстрее, чем TRPV5 [106]. Внутриклеточный линкер между вторым и третьим трансмембранными фрагментами каналов TRPV5 и TRPV6 считается ответственным за этот механизм инактивации [106]. Фаза медленной кальций-зависимой инактивации TRPV6 контролируется с помощью сайта связывания кальмодулина (CaM) на С-конце канала (Рис. 11А) [107,108]. Уровень взаимодействия между кальмодулином и TRPV6 динамически увеличивается с увеличением уровня внутриклеточного кальция [108]. Кальций-связывающий белок, кальбидин- D_{28K} , регулируемый витамином D, связывает кальций, входящий через TRPV5, и тем самым замедляет инактивацию канала [109]. В дополнение, PIP_2 увеличивает активность TRPV5 и TRPV6 и предотвращает кальций-зависимую инактивацию этих каналов [110,111]. Повышение внутриклеточной концентрации кальция активирует фосфолипазу C, что приводит к снижению уровня PIP_2 и тем самым способствует кальций-зависимой инактивации каналов [110]. АТФ стабилизирует TRPV6 и предотвращает его инактивацию, тогда как РКС βII напрямую противодействует этому эффекту [112].

TRPV5 и TRPV6 также регулируются сигналами извне. Активность обоих каналов увеличивается в ответ на защелачивание внешней среды [92,93,113]. Глутаматные остатки в поре и во внеклеточных доменах, близких к поре канала TRPV5, возможно, являются сенсорами изменения pH и регулируют активность канала за счет конформационных изменений поры [114,115]. В дополнение к этому pH внешнего раствора также регулирует динамику доставки внутриклеточных везикул с функциональными TRPV5 каналами на плазматическую мембрану [116].

Ген TRPV6 является одним из наиболее сильно подверженных влиянию кальцитриола ($1,25[\text{OH}]_2\text{D}_3$) — активной формы витамина D3. Уровень мРНК TRPV6 увеличивается уже по прошествии двух часов после добавления в среду к клеткам кишечного эпителия (Caco-2) раствора $1,25[\text{OH}]_2\text{D}_3$ (0,1 мкМ). А через 24 ч уровень мРНК увеличивается в 10 раз [117]. У мышей с нокаутом рецептора витамина D (VDR) уровень мРНК TRPV6 в двенадцатиперстной кишке уменьшался на 90%. Известным фактом является то, что паратиреоидный гормон (PTH) регулирует абсорбцию кальция в почках. PTH регулирует, как экспрессию, так и активность канала TRPV5. У мышей с пониженным уровнем PTH, было замечено снижение уровня TRPV5 (а также кальбинина $\text{D}_{28\text{k}}$ и NCX1), тогда как включение этого гормона в пищу приводило к восстановлению уровня TRPV5 и других кальций-транспортирующих белков [118]. Показано, что PTH способен резко увеличивать кальциевый ток в дистальных почечных трубочках [119]. Было выяснено, что активация TRPV5 паратиреоидным гормоном происходит посредством PKA и PKC [120,121]. PTH активирует cAMP-PKA сигнальный каскад и увеличивает вероятность открытого состояния TRPV5 за счет фосфорилирования треонина в 709 позиции белка TRPV5 [120].

Интересные данные были получены при изучении регуляции каналов TRPV5/V6 трансмембранным белком клото (англ. *Klotho*). Клото обладает β -глюкуронидазной активностью, поэтому изначально считалось, что клото модифицирует гликаны TRPV5 [122]. β -глюкуронидаза, также как и клото, активирует TRPV5 и TRPV6, но не влияет на другие члены суперсемейства TRP [123]. Как оказалось, клото отрезает сиаловые кислоты, расположенные в хвостовой части гликановых цепей TRPV5, и тем самым обнажает галактоз-N-ацетил-глюкозамин, который связывается с галектином-1 (галактозид-связывающий лектин) [124]. TRPV5, связанный с галектином-1, далее не подвергается эндоцитозу, механизм этого процесса остается не ясным.

Интересно, что полное удаление N-гликанов при помощи эндогликозидазы-F, также приводит к увеличению активности TRPV5 и TRPV6.

В ходе многочисленных исследований было показано, что биосинтез TRPV6 является самым быстрым и важным ответом организма на недостаток кальция, которые возникает при отсутствии кальция в пище, в период беременности и лактации. Бескальциевая диета резко увеличивает уровень TRPV6 в кишечнике и в меньшей мере увеличивает уровень TRPV5 и TRPV6 в клетках почек у мышей [125,126] и крыс [127]. Уровень TRPV5 и TRPV6 контролируется и половыми гормонами. Эстроген в фармакологических дозах увеличивал уровень мРНК TRPV6 в четыре раза у мышей дикого типа и в восемь раз у мышей с нокаутом по VDR [128].

Интересные данные были получены в экспериментах с физической нагрузкой крыс. Было обнаружено, что плавание крыс на выносливость стимулирует кальциевый транспорт в тонком кишечнике, и уменьшает кальциевый транспорт в проксимальном отделе толстого кишечника [129]. Увеличение абсорбции кальция сопровождалось повышением уровня мРНК рецептора VDR и кальций-транспортирующих белков TRPV5 и TRPV6 в трансклеточных путях [129]. А у обездвиженных крыс наблюдалась противоположная картина: уровни мРНК TRPV5, TRPV6 и $1,25[\text{OH}]_2\text{D}_3$ уменьшались, что приводило к уменьшению кальциевой абсорбции [130]. Эти данные свидетельствовали в пользу важной роли, которую играли каналы TRPV6 и TRPV5 в увеличении витамин D- зависимой кальциевой абсорбции, индуцированной физической нагрузкой.

Хорошо известно, что в процессе старения организма происходит уменьшение кальциевой абсорбции и увеличение количества выводимого с мочой кальция. Было обнаружено, что количество мРНК TRPV6 и TRPV5 в два раза меньше в кишечнике у взрослых (12-тимесячных) крыс, чем у молодых (2-х месячных) крыс [127]. У мышей наблюдалась аналогичная картина: с возрастом сокращалась абсорбция кальция и возрастало выделение

кальция с мочой, и это сопровождалось уменьшением уровня TRPV6 и TRPV5 в кишечнике и почках, соответственно [131]. Количество рецептора VDR также падает с возрастом [131]. У женщин, в возрасте от 50, существенно сокращается как уровень рецептора VDR, так и TRPV6 [132]. Таким образом, каналы TRPV6 и TRPV5 могут быть одной из причин негативного кальциевого баланса кальция, возникающего с возрастом.

Кроме кишечного и почечного эпителия экспрессия TRPV6 и TRPV5 была обнаружена в плаценте [97,133–136]. Количество мРНК TRPV6 оказалось в ~1000 раз выше, чем TRPV5 [95]. Оказалось, что TRPV6 экспрессируется в трофобластах и синцитиотрофобластах плаценты человека [137]. Участие TRPV6 в транспорте кальция от матери к плоду было показано при помощи модели с нокаутом по TRPV6 у мышей [138]. Белок и мРНК TRPV6 были обнаружены в внутриплацентарном и висцеральном слоях плаценты, где и происходит кальциевый транспорт от матери к плоду. В последние 4 дня беременности происходит 14-ти кратное увеличение количества транспортируемого кальция через плаценту, для того, чтобы обеспечить потребности эмбриона в кальции. У мышей с нокаутом по TRPV6 количество переносимого между матерью и плодом кальция снижалось на 40% по сравнению с мышами дикого типа. Как результат, плод с нокаутом по TRPV6 имел низкий уровень содержания кальция в крови и уменьшенный вес, в сравнении с мышами дикого типа [138]. Кроме того, уровень TRPV6 в плаценте, повышается во время беременности [139]. Таким образом, было продемонстрировано, что TRPV6 является важным элементом в транспорте кальция между матерью и плодом. Совокупность данных свидетельствует о том, что TRPV6 участвует не только в процессе передачи кальция от матери к плоду, но и в процессе становления и поддержания беременности [139,140].

2.4. Роль TRPV6 в канцерогенезе

Экспрессия каналов на уровне белка и мРНК каналов TRPV5/V6, а также с помощью записей одиночных каналов методом patch-clamp была показана в клетках миелоидной лейкемии человека K562 [141]. Профиль экспрессии и селективность каналов TRPV5/V6 по кальцию свидетельствуют о роли, которую эти каналы играют в кальциевом гомеостазе и пролиферации этих клеток. Шварцу и коллегам удалось показать увеличение скорости пролиферации клеток HEK-293, при экспрессии в них канала TRPV6. Авторы связывают это с увеличением внутриклеточного уровня кальция, которое является результатом экспрессии канала TRPV6.

Стоит отметить, что каналы TRPV5/V6 регулируются 1,25-дигидрокситамином D3, который уменьшает пролиферативную активность и индуцирует дифференцировку клеток K562 [142]. 1,25-дигидрокситамином D3 индуцирует дифференцировку клеток миелоидной лейкемии мышей M1 в макрофаго-подобные клетки. Такая же ситуация наблюдается и в клетках миело-моноцитарной клеточной линии U937, где 1,25-дигидрокситамином D3 контролирует дифференцировку в моноциты/макрофаги. Возможно, что каналы TRPV5/V6 регулируют дифференцировку клеток лейкемии посредством 1,25-дигидрокситамином D3-зависимого механизма [143].

В настоящее время достоверно показано, что уровень TRPV6 повышается при злокачественных изменениях предстательной железы, молочных желез, щитовидных желез, карциномах толстого кишечника и яичников [144]. При раке простаты уровень мРНК TRPV6 увеличивается с прогрессией заболевания, оцениваемой согласно показателю Глиссона [133,145,146]. В дополнение, экспрессия TRPV6 также коррелирует с патологической стадией и разрастанием опухоли за пределы простаты. В андроген-нечувствительных опухолях было обнаружено снижение уровня TRPV6 в сравнении с опухолями, не подвергавшимися лечению [146]. Таким

образом, TRPV6 может быть использован в качестве маркера прогрессии рака простаты.

Потенциальная роль TRPV6 в прогрессии рака молочной железы была показана в нескольких работах группы Хедигера [147,148]. У семи из двенадцати пациентов с раком молочной железы, был обнаружен повышенный (2-15 раз) уровень мРНК TRPV6, в сравнении с нормальными тканями [147]. Интересно, что антагонист рецептора эстрогена тамоксифен, не только частично блокировал экспрессию TRPV6 в клеточной линии T47D рака молочной железы, но и ингибировал TRPV6-опосредованный кальциевый вход в ооцитах *Xenopus* [147]. В клетках MCF-7 (трансформированных клетках молочной железы) активность TRPV6 блокировалась антагонистом эстрогена, тамоксифеном в присутствии агониста рецептора эстрогена. Эффект тамоксифена на TRPV6 также оставался в клетках с нокаутом по эстрогеновому рецептору – MDA-MB-231 [148]. Таким образом, тамоксифен-зависимое ингибирование TRPV6 может быть частью терапевтического эффекта, который оказывает тамоксифен, как в эстроген-чувствительных, так и в эстроген-нечувствительных злокачественных заболеваниях молочной железы.

Повышенная экспрессия TRPV6 была также замечена на ранних стадиях рака толстого кишечника у человека. Блокирование экспрессии TRPV6 при помощи siRNA останавливало рост раковых клеток и индуцировало апоптоз [149]. Из этих данных можно сделать вывод, что повышенная экспрессия TRPV6, скорее всего, участвует в прогрессии рака толстого кишечника, и TRPV6 может стать потенциальной мишенью для терапии этих заболеваний.

Капсаицин, который входит в состав перца чили и является активатором TRPV1, индуцирует апоптоз в некоторых злокачественно трансформированных клетках. Интересен тот факт, что клетки рака желудка были более чувствительны к капсаицину из-за высокого уровня экспрессии в них TRPV6 [150]. Оверэкспрессия TRPV6 в нормальных клетках приводила к

индуцированию апоптотической реакции в ответ на капсаицин, а нокдаун TRPV6 в раковых клетках приводил к потере чувствительности к капсаицину в этих клетках [150]. На базе этих данных возможно создание методик по селективному индуцированию апоптоза в раковых клетках с высоким уровнем экспрессии TRPV6. Несмотря на все эти исследования, использование TRPV6, как маркера и терапевтической мишени для раковых клеток, остается слабо изученной.

2.5. TRP как каналы кальциевого входа

Концентрация кальция важна в жизненном цикле клетки, начиная от оплодотворения и формирования эмбриона, до клеточной дифференцировки, пролиферации и вплоть до клеточной смерти. Внутриклеточная концентрация кальция играет важную роль в выбросе нейротрансмиттеров, мышечных сокращениях и транскрипции генов. Известно, что основная часть каналов TRP напрямую регулируется кальцием, который создает систему прямой и обратной связи с этими каналами. Посредством каналов TRP клетки способны очень гибко контролировать внутриклеточную концентрацию кальция.

TRP каналы могут участвовать в изменении концентрации внутриклеточного кальция либо непосредственно обеспечивая вход кальция, либо посредством изменения мембранного потенциала, обеспечивая условия для входа кальция через другие каналы. Внутриклеточная концентрация кальция также может меняться благодаря выбросу кальция из внутриклеточных кальциевых депо [151]. Каналы TRP связаны с потенциал-зависимыми калиевыми каналами, которые активируются после деполяризации мембраны, которую могут обеспечивать каналы TRP. Изменяя мембранный потенциал и локальный кальциевый градиент, каналы TRP обеспечивают движущую силу для входа кальция в клетки и выброса кальция из внутриклеточных органелл.

Несмотря на тот факт, что все каналы TRP проводят кальций, селективность этих каналов может сильно различаться. Например, селективность каналов к кальцию по сравнению с натрием (P_{Ca}/P_{Na}) для каналов TRPM1 <1 , тогда как для TRPV5/V6 >100 . Это отличие говорит о разном строении поры каналов, а также о различной регуляции пор всевозможными модуляторами [152]. В строении селективных фильтров каналов TRP не наблюдается высокой гомологии. Для каналов TRPV5 и TRPV6 было показано, что кальциевая селективность зависит от аспартата в 524 позиции для TRPV5 и аспартата в 541 позиции для TRPV6 [153]. Каналы TRPV5 и TRPV6 формируют как гомо-, так и гетеротетрамеры, и селективный кальциевый фильтр поры канала сформирован кольцом четырех аспартатов, по аспартату от каждой субъединицы собранного канала [99]. При помощи сайт-направленного мутагенеза было показано, что мутации в аспартате 546 у канала TRPV1 и соответствующая мутация 682 аспартата в TRPV4 снижают кальциевую селективность этих каналов. Дополнительные мутации в 672 и 680 позиции белка TRPV4 полностью ликвидировали кальциевую селективность канала [154]. Исследование поры канала TRPM4, который не пропускает кальций, показали, что замена аминокислот в позициях 981 и 986 на аминокислоты селективного фильтра TRPV6 привела к образованию канала со свойствами TRPM4 и кальциевой селективностью TRPV6 [155].

Несмотря на то, что структура поры считается достаточно стабильной, появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что как диаметр поры, так и селективность к кальцию зависит от способа активации, к примеру агонистами. Такая динамическая структура поры была впервые обнаружена в каналах P2X-рецептора [156]. Активация TRPV1 приводит к увеличению селективности поры канала к ионам кальция. Различные агонисты TRPV1 специфично изменяют селективные характеристики поры. Таким образом, характеристики канала TRPV1 динамически изменяются по

ходу активации [157]. Аналогичная ситуация наблюдается и для канала TRPA1. В неактивированном состоянии канал является неселективным катионным каналом с диаметром поры $\sim 11 \text{ \AA}$, что соответствует размерам пор неселективных каналов TRPM6, TRPV1 и TRPP2, но намного больше, чем у селективных кальциевых каналов TRPV5 и TRPV6 ($\sim 7,5 \text{ \AA}$ и $\sim 5,4 \text{ \AA}$ соответственно). После активации электрофильными веществами (алил изотиоцианатом или горчичным маслом), у канала TRPA1 происходит сужение поры на $\sim 3 \text{ \AA}$. Это изменение структуры поры сопровождается увеличением кальциевой селективности и количественным увеличением ионов кальция, проходящих через канал TRPA1. После стимуляции горчичным маслом проводимость каналов $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ возрастала с $\sim 5,7$ до $7,9$ и процентная составляющая кальциевого тока через канал возрастала с 17% до $23,3\%$ [152]. Для каналов TRPV5 было показано pH-зависимое расширение поры [158]. Такое динамичное поведение пор каналов TRP добавляет новый механизм регуляции агонист-зависимого кальциевого входа. Свойства изменения геометрии поры, количественной составляющей кальциевого тока, по-видимому, проявляется во всех ионных каналах суперсемейства TRP.

Активация любого канала суперсемейства TRP вызывает деполяризацию мембраны. Действие деполяризующего потенциала, опосредованного каналами TRP, зачастую недооценивается. Как было отмечено ранее, лишь небольшая часть тока через каналы TRP - это кальциевые ионы. TRPV1 является классическим примером TRP активируемого кальциевого входа. Кальциевый ток через этот канал составляет лишь 5% от общего числа проходящих ионов [159]. Доля кальциевого тока в каналах TRPM8 составляет $\sim 3\%$. Из всего суперсемейства лишь каналы TRPV5/V6 и в меньшей мере TRPV1 и TRPM3 характеризуются высоким уровнем кальция, проходящего через эти каналы. Для TRPM3 эта доля составляет 24% от всего тока через канал и увеличивается до 51% при концентрации внешнего кальция равной 10 mM . Из этого предполагается, что помимо пропускания кальциевого тока,

каналы суперсемейства TRP могут существенно влиять на вход кальция посредством других механизмов, таких как деполяризация мембраны.

Работа каналов TRP влияет на потенциал-зависимые кальциевые каналы, возбудимых клеток (Рис. 12). Активация каналов TRP приводит к деполяризации мембраны и, как следствие, к открыванию потенциал-зависимых кальциевых каналов. Если деполяризация продолжается достаточно долго, то происходит инактивация этих каналов. Эксперименты показали, что деполяризующее действие каналов TRP может быть важнее прямого входа кальция, проводимого этими каналами. Все каналы TRPC экспрессируются в нейронах и принимают участие в генерации их электрической активности [160]. TRPC каналы участвуют в развитии мозга, синаптогенезе и многих других функциях, связанных с генерацией электрического потенциала. Также известно несколько примеров непрямого участия каналов TRP в создании ритмоводящих входящих токов в клетках сердца. Входящий ток через каналы TRPC4 создает деполяризацию мембраны, за которой следует сокращение мышечных клеток [161].

В потенциал-независимых клетках каналы TRP способны воздействовать на кальциевых вход за счет деполяризации или гиперполяризации, при помощи кальций- зависимой активации различных каналов, например, таких как калиевые каналы. Например, каналы TRPM4 и TRPM5, не проводящие кальций, оба активируются при повышении внутриклеточной концентрации кальция, они вызывают деполяризацию мембраны с последующим ингибированием кальциевого входа через кальций проводящие каналы (STIM/ORAI) [162]. Взаимодействие антигена с тучными клетками вызывает гиперполяризацию мембраны посредством ингибирования каналов TRPM4. Гиперполяризация приводит к увеличению кальциевого тока через каналы STIM/ORAI и повышению уровня выброса гистаминов и интерлекинов и, соответственно, повышенному аллергическому ответу [82]. Такое взаимодействие между деполяризующими TRPM4/5 и кальций-

активируемыми калиевыми каналами создает механизм тонкой регуляции кальциевого входа во многих невозбудимых клетках.

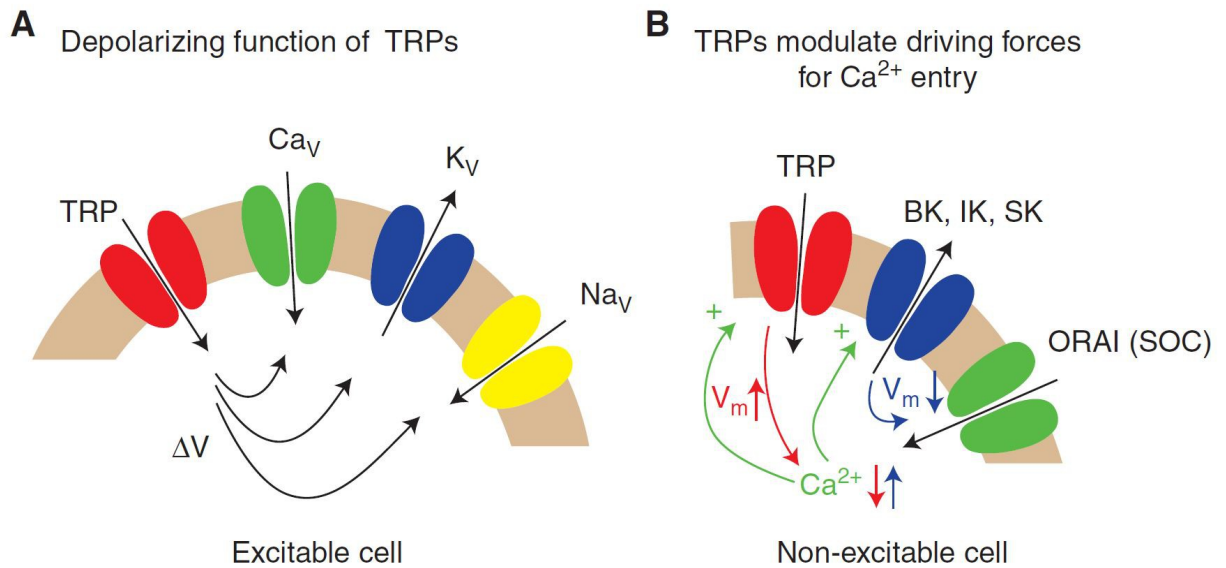


Рис. 12. Кальциевый вход через каналы TRP деполяризует возбудимые клетки.
А Деполяризация возбудимых клеток после открывания TRP каналов регулирует потенциал-зависимые кальциевые, калиевые, и натриевые каналы. *В* Деполяризация мембраны каналами TRP приводит к уменьшению кальциевого тока через канал ORAI, тогда как гиперполяризация мембраны различными калиевыми каналами увеличивает вход кальция. Вошедший кальций в свою очередь регулирует активность калиевых каналов и с помощью систем обратной связи - каналы TRP.

TRP каналы также сами являются чувствительными к изменениям внутриклеточной концентрации кальция. Большинство каналов TRP регулируется кальцием, в том числе и посредством сигнальных комплексов, таких как кальций-кальмодулиновый комплекс. Каналы TRP могут как активироваться, так и инактивироваться кальцием. Каналы TRPC1/4/5/6, TRPV4, TRPM2/4/5, - активируются кальцием. Инактивация каналов TRP наблюдается при повышении концентрации кальция выше допустимых пределов. Инактивация может осуществляться при помощи кальций-зависимых киназ, кальций-зависимых фосфатаз и кальций-зависимых фосфолипаз, которые регулируют уровень PI(4,5)P₂ [163]. Кальций-зависимая активация и инактивация позволяет TRP каналам создавать тонко регулируемые системы в различных клетках.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Клетки

Jurkat

В работе были использованы клетки лимфоидной лейкемии человека Jurkat E6-1 (коллекция клеточных культур Института Цитологии РАН, СПб). Клетки Jurkat культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки телят, 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 T500. Суспензию лейкоцитов (пробы по 8мл) 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 и промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Для удаления макрофагов, клеточную суспензию после отмывки разбавляли средой RPMI-1640 без антибиотиков и помещали в пластиковые матрацы, предварительно обработанные 10% 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.

3.2. Регистрация ионных токов

В работе использовался метод локальной фиксации потенциала (патч-кламп) (Рис. 13) в нескольких конфигурациях (конфигурации whole-cell, outside-out) (Рис. 14).

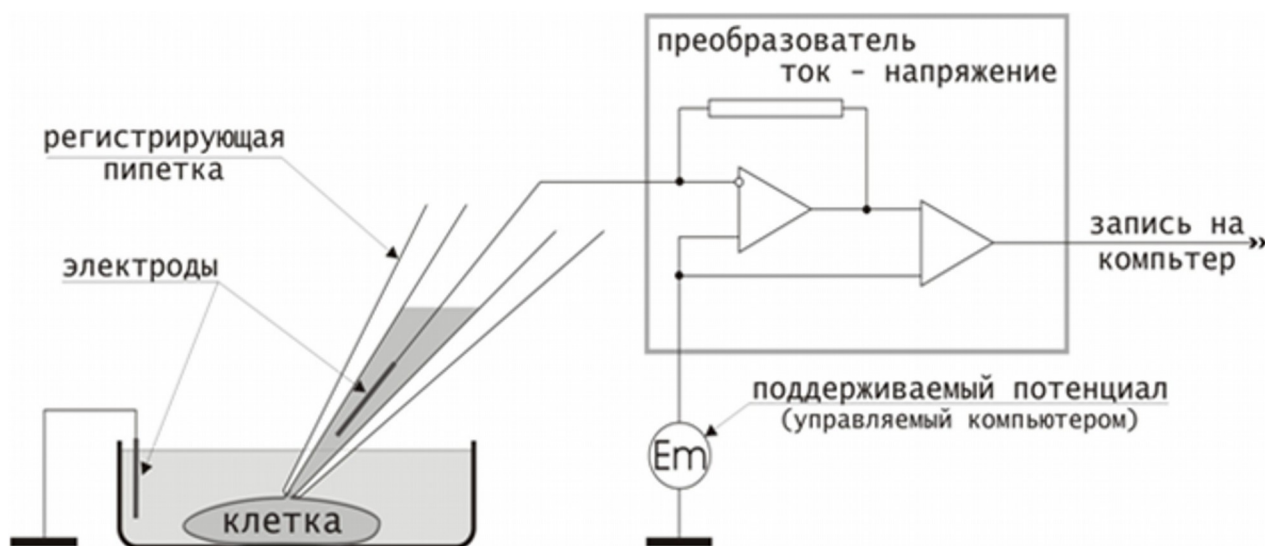


Рис. 13. Упрощенная схема патч-кламп метода.

Пипетки изготавливали из боросиликатных стеклянных капилляров (BF-150-110-10, Sutter Instruments) на автоматической кузнице Flaming/Brown P-97. Используемые в работе пипетки имели сопротивление 5-15 МОм. Покровные стекла с прикрепленными клетками помещали в экспериментальную камеру объемом 0,15 мл (Рис. 15), изготовленную из органического стекла и заполненную наружным раствором (см. гл. Растворы). Оптические наблюдения осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Zeiss Axiovert 40 CFL с дифференциальным контрастом по Номарскому (увеличение 400х), установленного на антивибрационном столике (Рис. 16). Все эксперименты проводили при комнатной температуре.

В работе использовали усилитель НЕКА ЕРС-8, который позволяет менять коэффициент передачи от 0.005 до 1000 мВ/пА, что достигается благодаря использованию трех различных резисторов с сопротивлениями 5

МОм, 500 МОм и 50 ГОм в цепи обратной связи. Что давало возможность регистрировать токи в широком диапазоне вплоть до токов амплитудой до 0.1 пА. С выхода усилителя сигналы записывали в реальном масштабе времени через 12-ти разрядный аналого-цифровой преобразователь (L-card, Москва) на диск компьютера для последующей обработки. Для фильтрации сигнала использовали 7-х полюсный фильтр Бесселя с полосой пропускания 0.1-1 кГц.

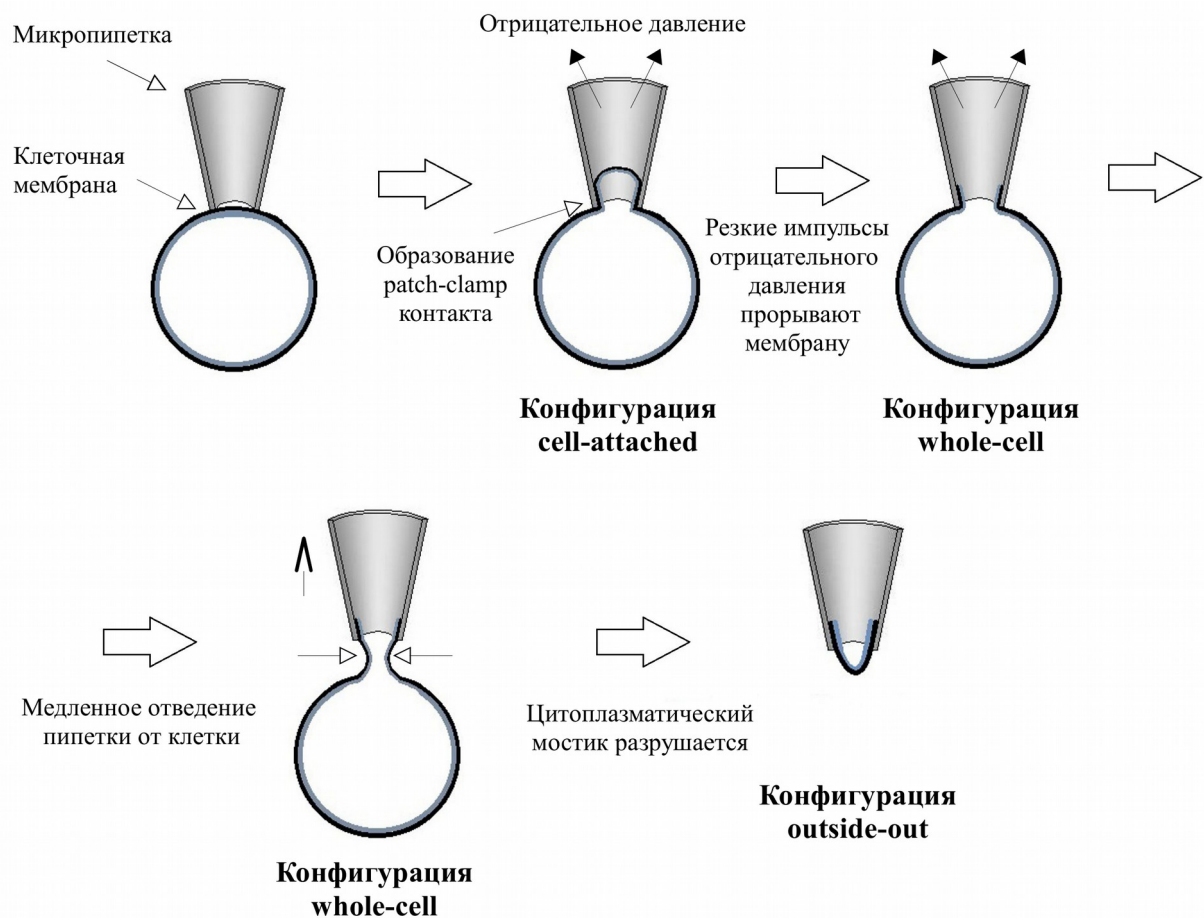


Рис. 14. Упрощенная схема патч-кламп конфигураций. Схема эксперимента от образования патч-кламп контакта до перехода в конфигурацию outside-out.

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 из амплитудных гистограмм или оценивали непосредственно из записей токов. Уровень активности каналов оценивали по

значению вероятности открытого состояния: $P_o = I/Ni$, 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.



Рис. 15. Камеры для проведения патч-кламп измерений.

3.3. Растворы

Основной наружный раствор в экспериментальной камере содержал: 140 mM метансульфоната Na, 5 mM NaCl, 10 mM HEPES, 10 mM (HEPES) и 10 mM D-глюкозы. Раствор в пипетке содержал 140 mM аспартата K, 5 mM NaCl, 10 mM BAPTA, 10 mM HEPES и 10 mM 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, с целью избежать инактивации каналов.

В ряде экспериментов использовались наружные растворы с различными концентрациями RuR: 125нМ - 50мкМ.



Рис. 16. Установка для патч–кламп экспериментов. Установка смонтирована на виброизолирующих основаниях и помещена в камеру Фарадея для защиты от паразитных электрических и магнитных полей. Для подведения пипетки к клетке используются механический и гидроманипуляторы. Контроль осуществляется с помощью инвертированного микроскопа Zeiss Axiovert 40 CFL.

3.4. Антитела

Окрашивание клеток проводилось с помощью специфических антител различных производителей. Для выявления каналов использовали антитела против TRPV5 (Н-99, Santa Cruz Biotech, США) в разведении 1:100 и антитела против TRPV6 (Н-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.

3.5. Иммунофлуоресцентное окрашивание.

В начале эксперимента суспензия клеток была нанесена на покровные стёкла размером 10/10 мм, предварительно покрытые Poly-DL-Lysine. Фиксация клеток производилась 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. Неспецифическое окрашивание блокировали инкубацией в PBS, содержащем 10% сыворотку, в течение 1 часа при комнатной температуре. С первичными антителами клетки инкубировали ночь при +4°C. Далее промывали 3 раза по 5 мин раствором PBS, содержащим 0.1% Tween-20 (BioRad, США). Инкубацию с вторичными антителами проводили в течение 1 часа при +37°C, в темноте. Потом промывали, как описано выше. Ядра окрашивали DAPI (0.05 мкг/мл) при комнатной температуре в течение 10 минут. 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 окраски покровные стёкла приклеивались к предметному стеклу, с помощью клея Vectashield. Все изображения были получены на конфокальном микроскопе Leica TCS SL SP5 (Leica, Япония).

3.6. 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 [164]. Степень колокализации определялась с помощью коэффициента

Пирсона, который дает количественное значение степени перекрывания между флуоресцентными сигналами двух исследуемых изображений. Коррекция фона производилась одинаково для всех исследуемых изображений. Коэффициент колокализации Пирсона может иметь значение от 1 до -1. Степень колокализации характеризовалась 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 $p < 0,05$).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Исследование кальциевых каналов в клетках крови.

4.1.1. 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 [165]. Исходя из этих соображений, чтобы исследовать биофизические и функциональные свойства низкопроводящих кальциевых каналов в клетках крови, мы применили широко распространенный метод использования Na^+ , как основного носителя тока, в растворах, не содержащих двухвалентных катионов (DVF, divalent free solution). 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. На рисунке 17 представлено пошаговое развитие активности, с последовательным открыванием одиночных каналов и постепенным увеличением тока. Активность исследуемых каналов развивалась в течение нескольких минут после образования whole-cell конфигурации, в 90% случаев ($n=30$). На рисунке 17 показаны открывания одиночных каналов, число которых увеличивалось по мере проникания кальциевого хелатора (BAPTA) в цитоплазму клеток. Такое развитие активности кальциевых каналов могло свидетельствовать о том, что по мере уменьшения концентрации кальция в клетке, вызванной проникновением хелатора, клетка реагирует на недостаток кальция, запуская

процессы, связанные с активацией все большего количества кальциевых каналов для компенсации дефицита кальция. Также, активность каналов может увеличиваться в результате связывания хелатором свободного Ca^{2+} , как потенциального участника кальций-зависимой инактивации каналов.

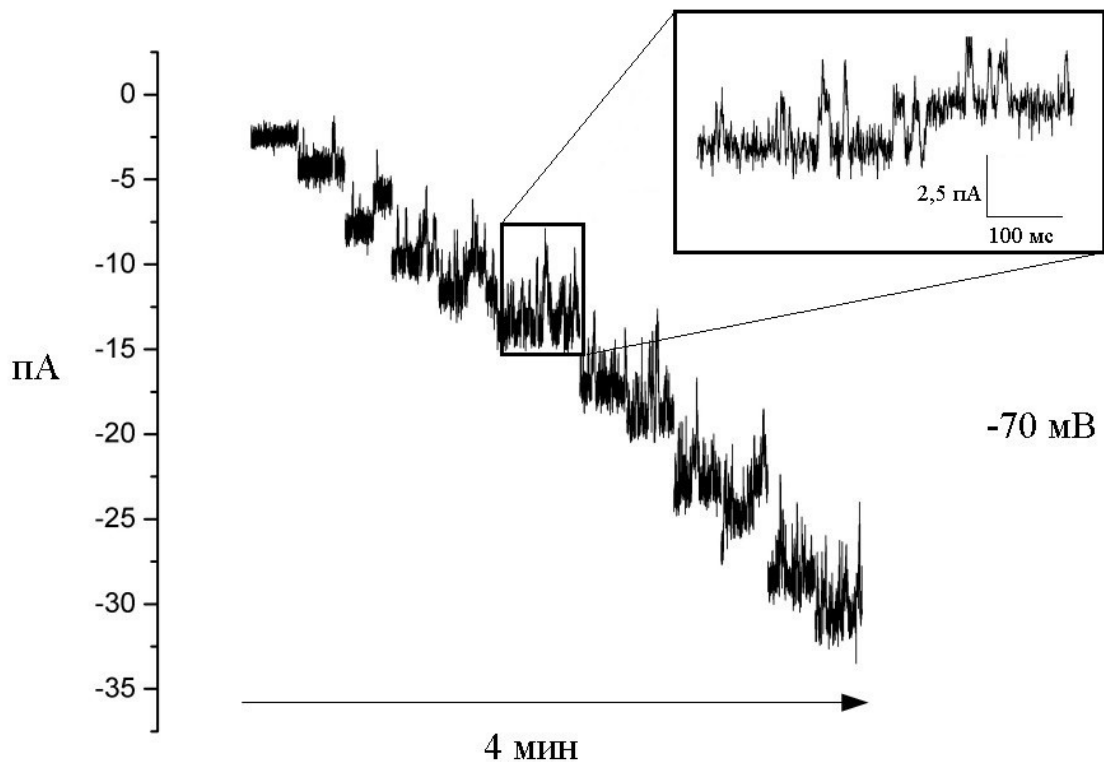


Рис. 17. Развитие активности кальциевых каналов в течении первых минут после образования конфигурации whole-cell в клетках Jurkat. Представлены короткие репрезентативные отрезки записей по 200-400 мс. Поддерживаемый потенциал -70мВ, растворы без двухвалентных катионов.

Как правило, электрофизиологические эксперименты по исследованию Ca^{2+} -каналов базируются на измерениях интегральных токов от целой клетки, которые дают весьма приблизительную информацию о функциональных характеристиках одиночных каналов. Поэтому в настоящем исследовании было уделено особое внимание регистрации одиночных каналов на изолированных фрагментах плазматической мембраны.

4.1.2. Активность одиночных каналов в плазматической мембране клеток Jurkat.

В режиме локальной фиксации потенциала (режим outside-out), в клетках Jurkat, были зарегистрированы спонтанные Na^+ токи входящего направления через одиночные каналы (Рис. 18).

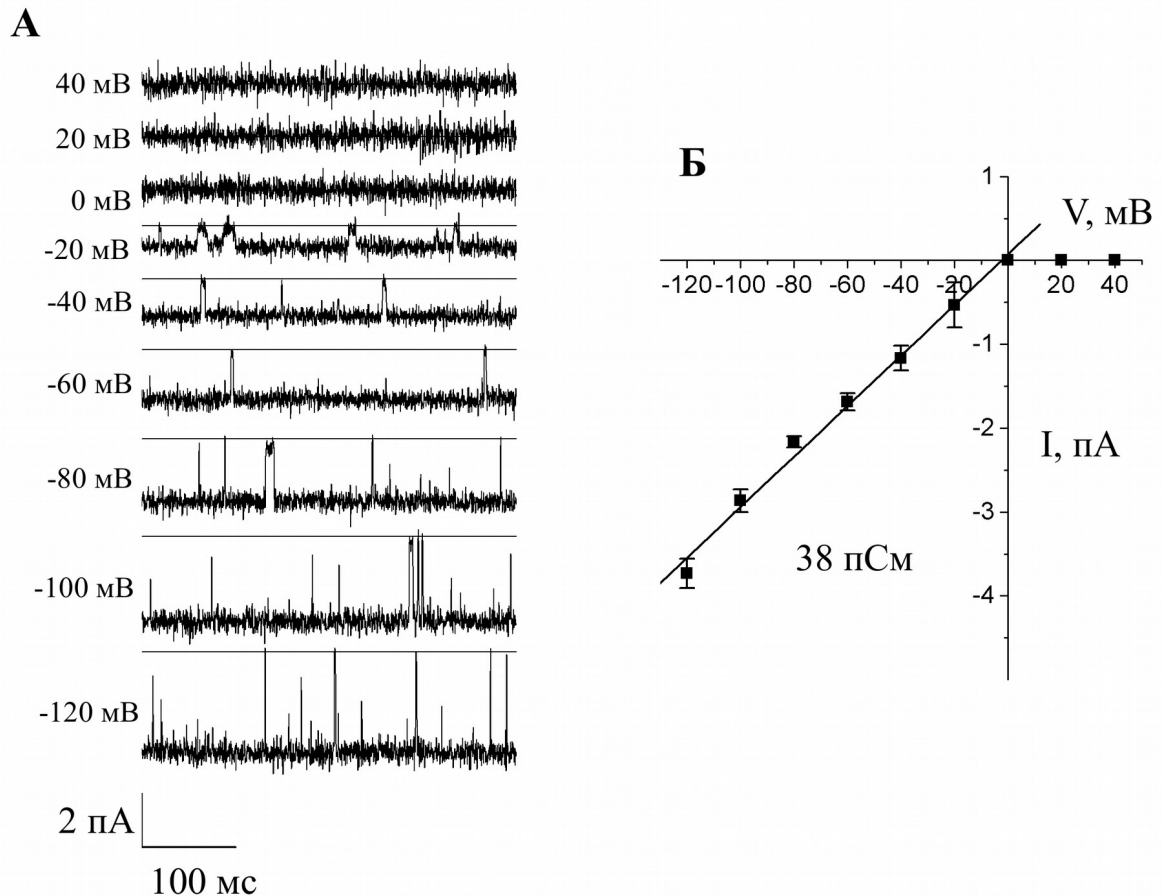


Рис. 18. Записи Na^+ -токов через одиночные каналы, в растворах, не содержащих двухвалентных катионов. **А.** Записи моновалентных токов при различных потенциалах **Б.** вольт-амперная характеристика (ВАХ) токов, которая обладает свойством входящего выпрямления. Средняя проводимость каналов в клетках Jurkat равна ~ 38 пСм.

Каналы были зарегистрированы в 63% ($n=30$) экспериментов, усредненное значение амплитуды токов через одиночные каналы было рассчитано по амплитудным гистограммам. На рис. 18А представлены типичные записи токов через одиночные каналы, полученные при разных поддерживаемых потенциалах на мембране. На рис. 18Б представлена вольт-

амперная характеристика (ВАХ) каналов, построенная по усредненным значениям амплитуды токов через одиночные каналы. ВАХ демонстрирует входящее выпрямление токов (в процессе регистрации не было выявлено токов при положительных потенциалах на мембране). Проводимость одиночных каналов для клеток Jurkat, была рассчитана из наклона ВАХ и составила, в диапазоне отрицательных потенциалов, около $38 \pm 0,3$ пСм ($n=11$). Проведенный сравнительный анализ выявил сходство биофизических характеристик зарегистрированных в клетках Jurkat каналов с эпителиальными кальциевыми каналами TRPV5 и TRPV6, относящимися к суперсемейству каналов TRP [98]. Как известно из литературных данных, высокоселективные кальциевые каналы TRPV5/V6 обладают низкой проводимостью в физиологических растворах, но проводят моновалентные катионы при исключении из раствора катионов магния и кальция. В этих условиях они имеют выраженное свойство входящего выпрямления, проводимость ~ 40 -70 пСм [98] и кальций зависимую инактивацию.

4.1.3. Кальций-зависимая инактивация моновалентных токов.

Как было описано выше, каналы TRPV5/V6 обладают свойством кальций-зависимой инактивации, которая работает по принципу обратной связи. Чтобы проверить эти свойства каналов, мы использовали кальций-содержащие растворы. (Рис. 19).

На клетках Jurkat, после регистрации активности каналов, в растворах не содержащих ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , в регистрирующую камеру подавался раствор содержащий различные концентрации кальция (30мкМ — 1 мМ). Как показано на рисунке 19, после добавления кальция в наружный раствор в концентрации 1 мМ происходила инактивация токов через канал. Следует отметить, что добавление меньших концентраций кальция также приводило к инактивации работы каналов.

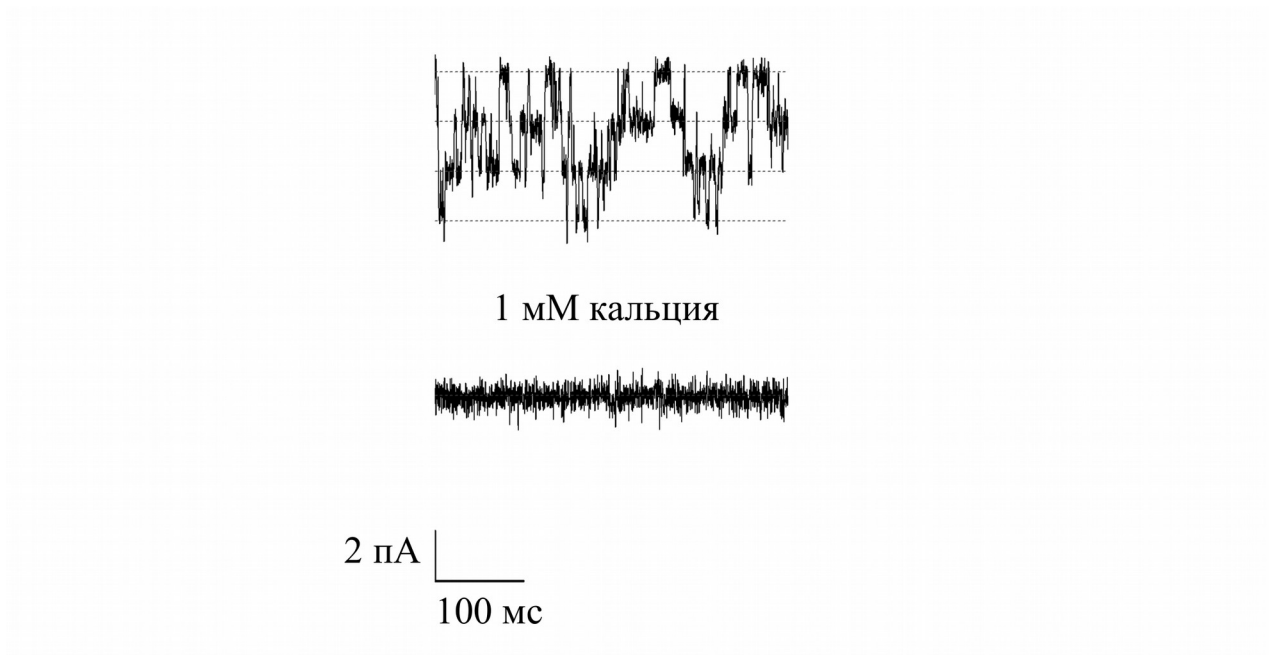


Рис. 19. Инактивация моновалентных токов. Записи токов в конфигурации *outside-out*, в клетках *Jurkat* до и после подачи раствора, содержащего 1мМ кальция, при потенциале -70мВ.

4.1.4. Блокирование кальциевых каналов в клетках *Jurkat* рутениевым красным.

Идентификация большинства каналов суперсемейства TRP, в том числе и TRPV6 и TRPV5 существенно осложняется отсутствием селективных блокаторов. Согласно литературным данным, неселективным блокатором каналов TRPV6 и TRPV5 является рутениевый красный (Ruthenium red, RuR). При этом показано, что TRPV6 и TRPV5 отличаются по чувствительности к RuR на 2 порядка. Полумаксимальная концентрация блокирования TRPV5 оказалась равной $IC_{50}=130\text{нМ}$, тогда как для TRPV6 $IC_{50}=10\text{мкМ}$ [166]. Для дальнейшей идентификации кальциевых каналов TRPV6 и TRPV5 в клетках *Jurkat*, исследовали влияние рутениевого красного на активность каналов. На рисунке 20 приведены записи токов до и после добавления в наружный раствор рутениевого красного в различных концентрациях. Регистрация токов была проведена в режиме *outside-out* при потенциале -70 мВ. Было обнаружено, что часть каналов полностью ингибировалась при замене наружного раствора на раствор, содержащий 250-500 нМ RuR (Рис. 20А).

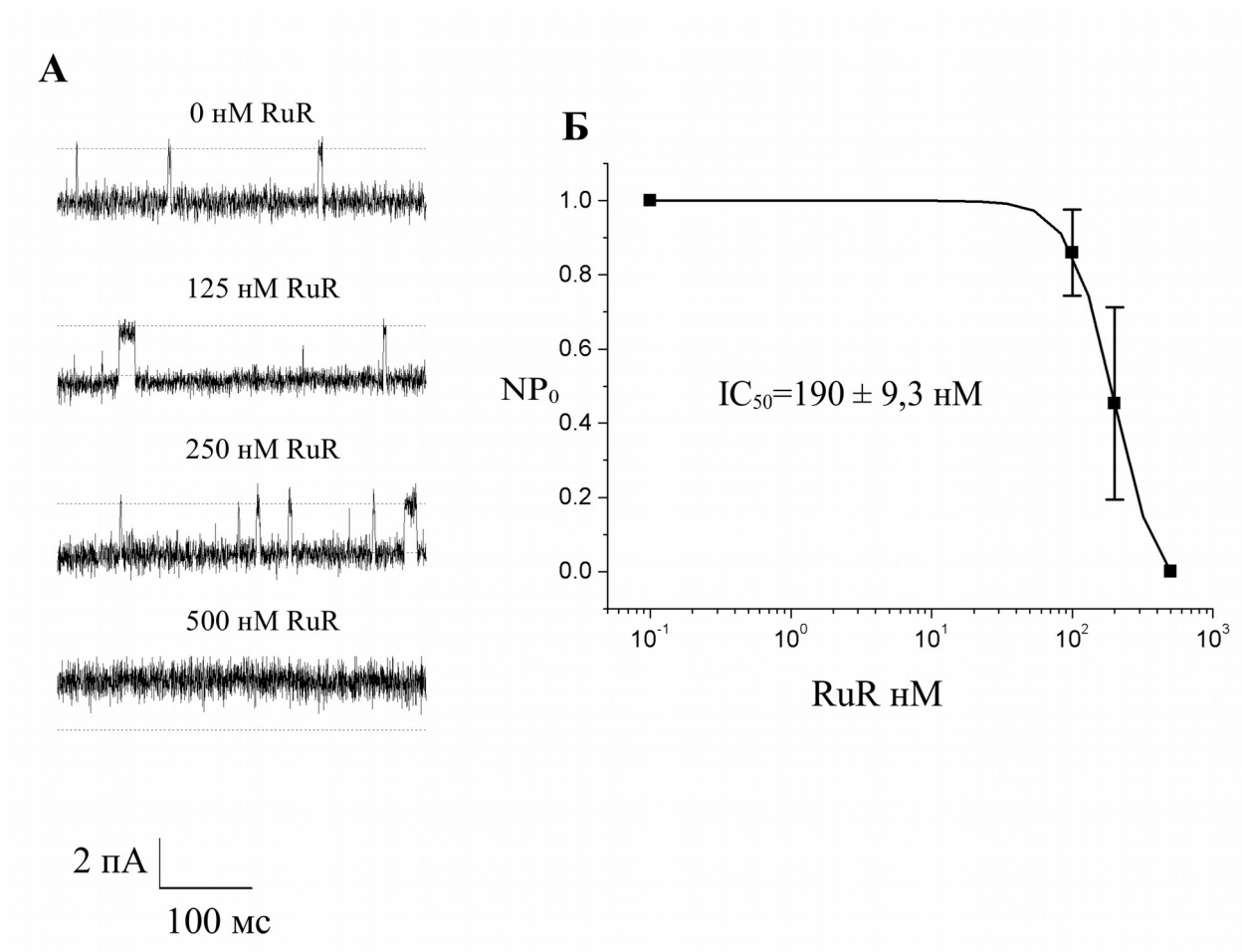


Рис. 20. Чувствительность кальциевых каналов к низким (нМ) концентрациям RuR в клетках Jurkat. А. 500нМ концентрация RuR полностью заблокировала канал. **Б.** Зависимость NP_0 от концентрации RuR, рассчитанная по данным 7 экспериментов.

Рассчитанная по концентрационной кривой, концентрация ингибитора, необходимая для полумаксимального блокирования каналов, составила для этих каналов $IC_{50}=190 \pm 9,3 \text{ нМ}$, ($n=7$). Кривая представляет логарифмическую аппроксимацию, полученных экспериментальных данных (Рис. 20Б).

Кроме того в результате проведенных исследований были обнаружены каналы, которые полностью ингибировались при концентрации RuR 20-50 мкМ (Рис. 21А). Концентрация RuR необходимая для полумаксимального блокирования этого типа каналов составила $IC_{50}=8,5 \pm 1,5 \text{ мкМ}$, ($n=6$) (Рис. 21Б). Результаты outside-out экспериментов указывают на прямое блокирование каналов рутениевым красным с наружной стороны мембраны.

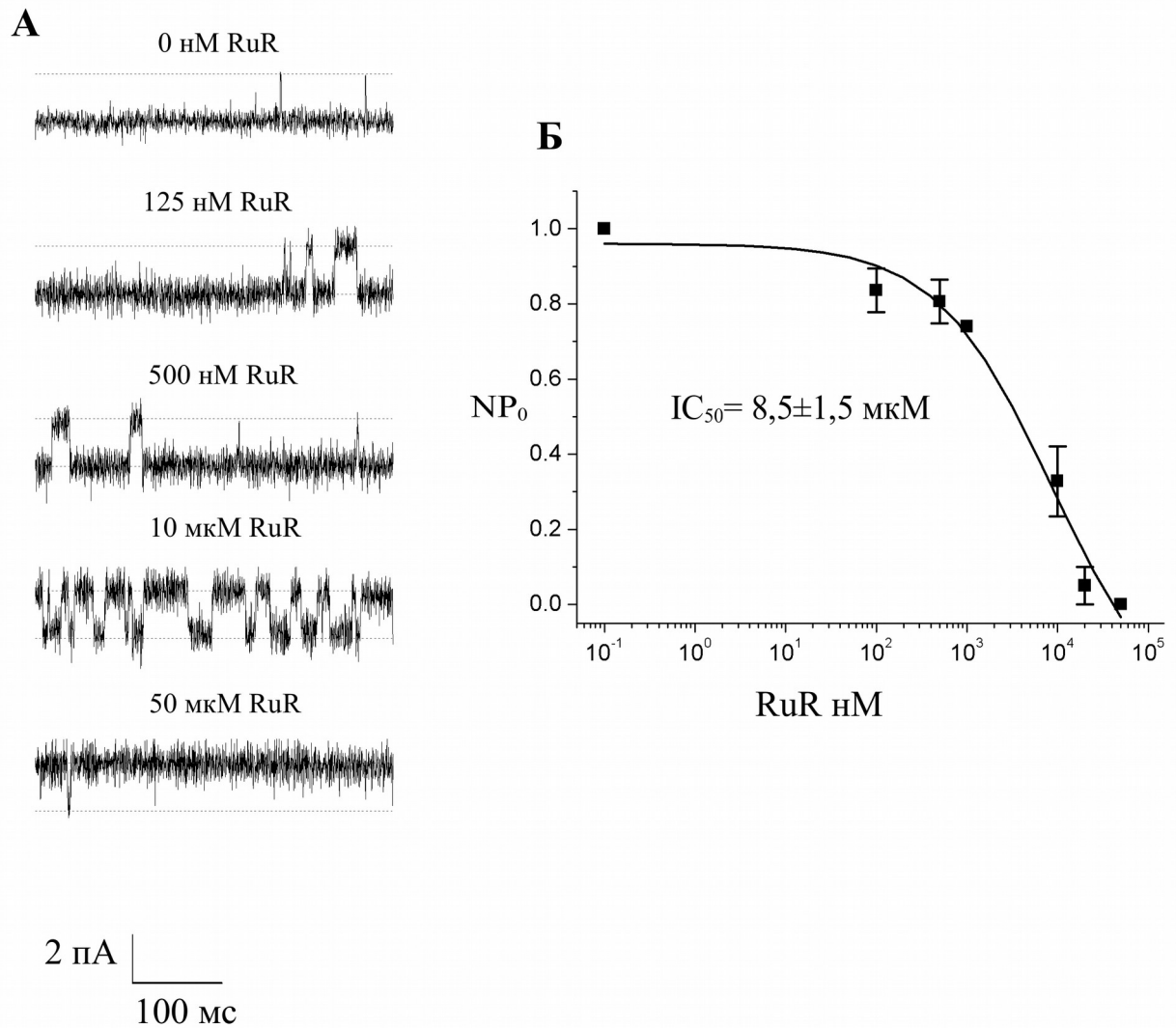


Рис. 21. Чувствительность кальциевых каналов к высоким (мкМ) концентрациям RuR в клетках Jurkat. А. 50 мкМ концентрация RuR полностью заблокировала канал. **Б.** Зависимость NP_0 от концентрации RuR, рассчитанная по данным 6 экспериментов.

Блокирование каналов, скорее всего, было обусловлено нейтрализацией отрицательно заряженных стенок канала катионами рутениевого красного. Кроме того, IC_{50} , рассчитанная в этих экспериментах, соответствовала значениям полученным ранее для рекомбинантных каналов TRPV5 и TRPV6 ($IC_{50}=130 \text{ нМ}$ и $IC_{50}=10 \text{ мкМ}$), соответственно [166].

4.1.5. 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. Для этой цели использовали специфические антитела, выработанные против цитоплазматических С-концевых доменов каналов TRPV5 и TRPV6. Для получения более убедительных результатов были использованы антитела различных коммерческих компаний. В качестве контроля использовался блокирующий пептид фирмы производителя антител.

На рисунках 22-23 представлены результаты иммунофлуоресцентного окрашивания клеток Jurkat и лимфоцитов человека, полученные на конфокальном микроскопе.

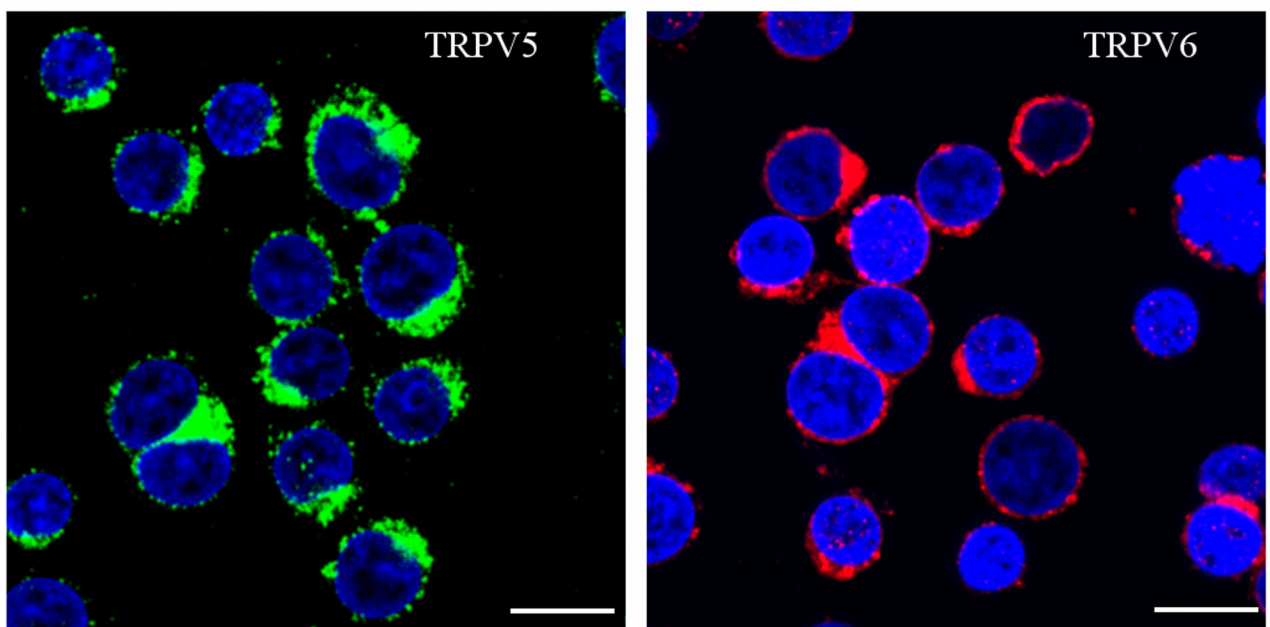


Рис. 22. Экспрессия каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток Jurkat, антителами. Зеленый — TRPV5, красный — TRPV6, синий - DAPI. Масштабная линейка 10 мкм.

Специфическое флуоресцентное свечение в области периферии клеток доказывает эндогенную экспрессию белков TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat.

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). Из рисунка 23, при большем масштабировании, видно, что большую часть клеток Jurkat занимает ядро, и всего лишь небольшая часть приходится на цитоплазму. Каналы TRPV5 и TRPV6 преимущественно локализуются в цитоплазме клеток Jurkat, и лишь небольшая часть каналов, находится на плазматической мембране.

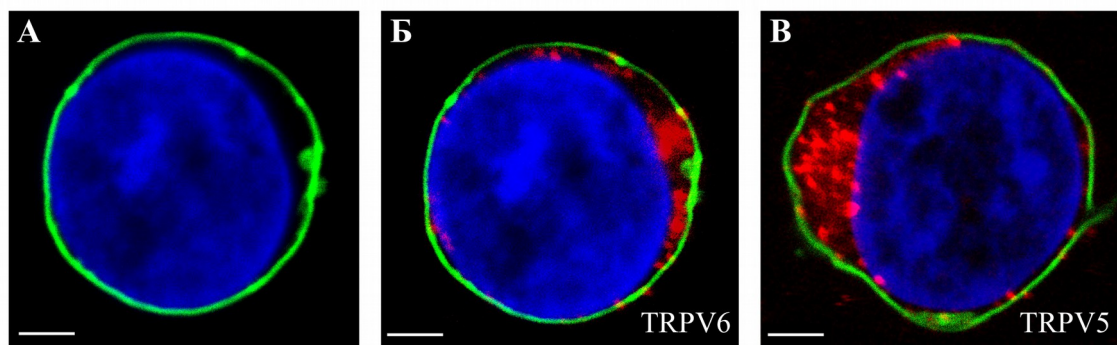


Рис. 23. Распределение каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat. Иммунофлуоресцентная окраска одиночных клеток Jurkat. **А.** Ядро (DAPI) - синий и плазматическая мембрана (CTX-FITC) - зеленый, **Б.** TRPV6 (Cy3) - красный **В.** TRPV5 (Cy3) - красный, Масштабная линейка 2,5 мкм.

4.1.6. 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 полученным ранее результатам, гиперэкспрессия некоторых каналов TRP наблюдается только в злокачественно трансформированных клетках, тогда как в нормальных клетках эти каналы отсутствуют. В связи с этим, особый интерес представляли 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 двухвалентные ионы, были зарегистрированы катионные каналы с проводимостью $36 \pm 0,2$ пСм ($n=10$). Но вероятность регистрации этих каналов в нормальных лимфоцитах была достаточно невелика (25%, $n=36$). На рис. 24А приведены примеры записей токов через одиночные каналы, записанные при разных поддерживаемых потенциалах на мембране.

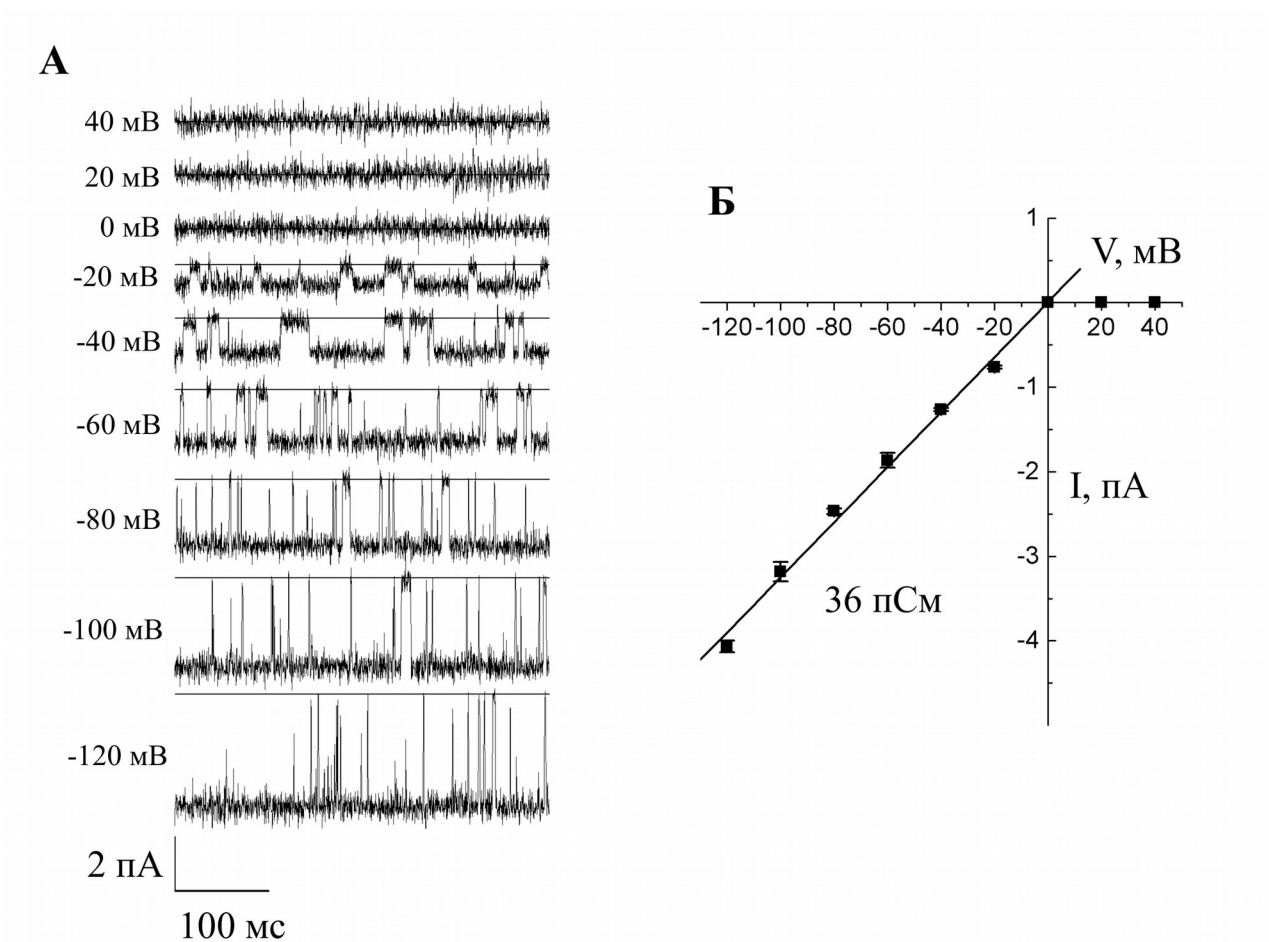


Рис. 24. Записи токов через кальциевые каналы в лимфоцитах периферической крови человека. **А.** ток через зарегистрированные каналы при различных потенциалах. **Б.** вольт-амперная характеристика.

На рисунке 24Б приведена вольт-амперная характеристика, 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. Различия наблюдались только в количестве зарегистрированных каналов. 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 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 ; $n=9$). Эти статистические данные свидетельствуют о том, что в плотность (поверхностная экспрессия) кальциевых каналов в клетках Jurkat выше, чем в нормальных лимфоцитах человека.

4.1.7. Чувствительность кальциевых каналов к RuR в лимфоцитах периферической крови человека.

Далее были проведены серии экспериментов, в которых исследовалась чувствительность зарегистрированных каналов к рутениевому красному в лимфоцитах периферической крови человека. В результате, в плазматической мембране нормальных лимфоцитов были обнаружены каналы, которые полностью ингибировались при концентрации RuR 250-500 нМ (Рис. 25А). И не было зарегистрировано каналов, которые блокировались при более высоких концентрациях RuR (в диапазоне 20-50 мкМ). Максимальная концентрация RuR, при которой блокировались каналы в лимфоцитах человека, составила 10 мкМ (Рис. 25Б). Эти данные могут свидетельствовать о низкой экспрессии каналов TRPV6 в нормальных лимфоцитах человека, по сравнению с трансформированными клетками линии Jurkat.

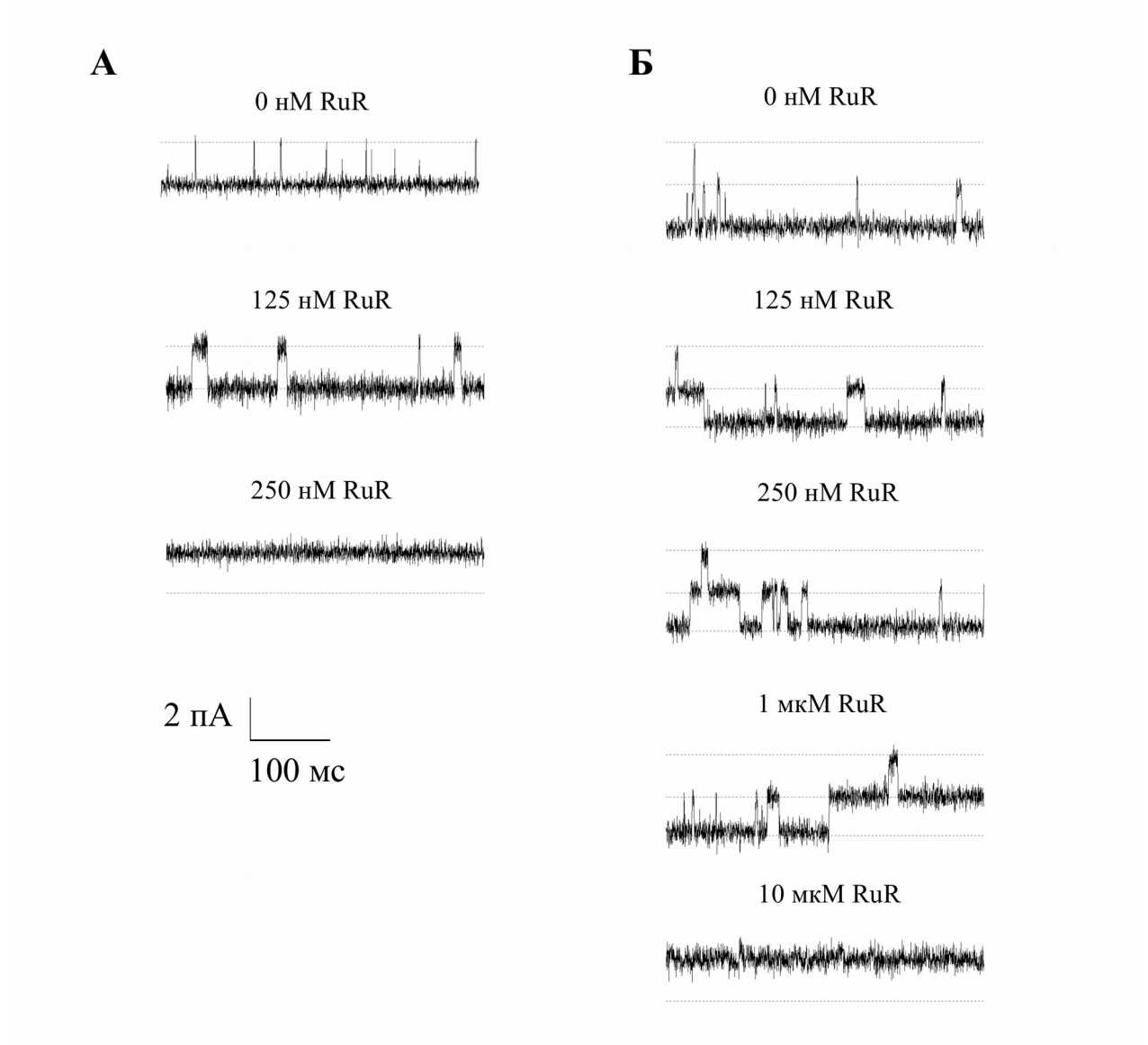


Рис. 25. Блокирование каналов TRPV5 и TRPV6 в лимфоцитах рутениевым красным. Записи моновалентных токов в лимфоцитах человека в режиме *outside-out* при потенциале -70 мВ. **А.** Блокирование каналов 250 нМ RuR. **Б.** Блокирование каналов 10 мкМ RuR.

4.1.8. Экспрессия каналов TRPV5 и TRPV6 в нормальных лимфоцитах человека.

В результате проведенных электрофизиологических исследований в лимфоцитах периферической крови человека были обнаружены каналы, биофизические и фармакологические свойства которых, оказались сходными со свойствами каналов TRPV5/V6. Для подтверждения экспрессии каналов TRPV5 и TRPV6, были проведены иммунофлуоресцентные исследования на

нормальных лимфоцитах человека. Для этой цели использовали специфические антитела, выработанные против цитоплазматических С-концевых доменов каналов TRPV5 или TRPV6. В качестве контроля использовался блокирующий пептид фирмы производителя антител.

На рисунке 26 представлены результаты иммунофлуоресцентного окрашивания лимфоцитов человека, полученные на конфокальном микроскопе. Специфическое флуоресцентное свечение в области периферии клеток доказывает эндогенную экспрессию белков TRPV5 и TRPV6 в нормальных лимфоцитах человека. Полученные результаты, в совокупности с литературными данными, позволяют с уверенностью утверждать, что в клетках Jurkat и лимфоцитах человека экспрессируются функционально активные каналы TRPV5/V6.

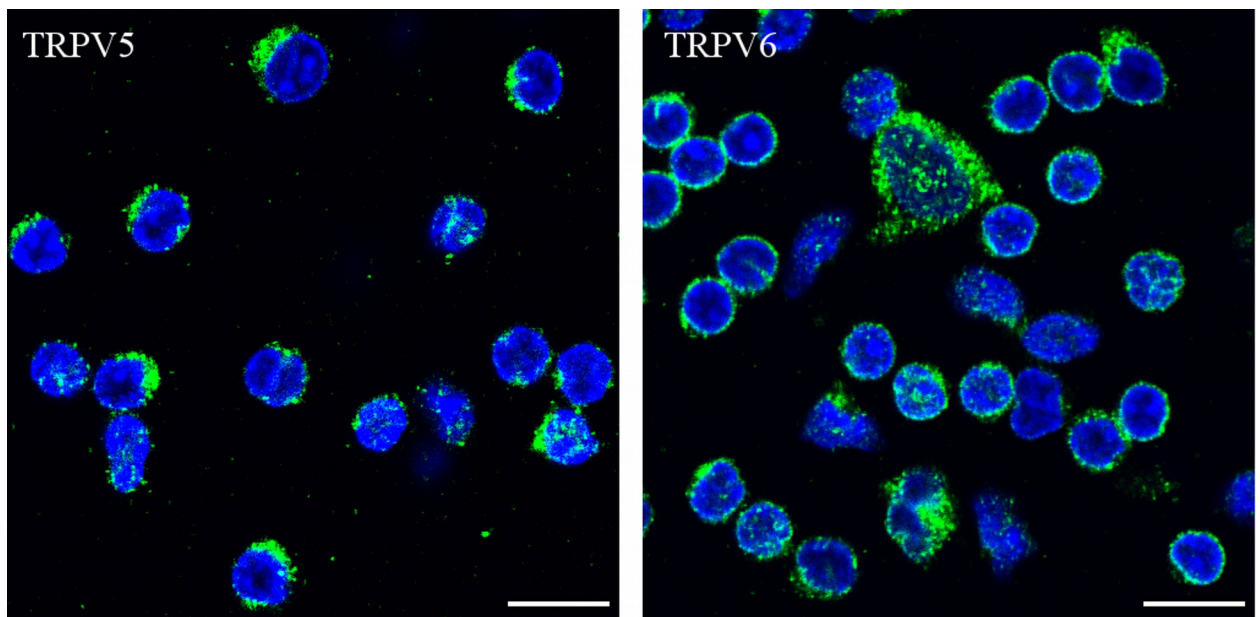


Рис. 26. Экспрессия каналов TRPV5 и TRPV6 в лимфоцитах человека. Иммунофлуоресцентное окрашивание лимфоцитов человека антителами. Зеленый — TRPV5, TRPV6, синий - DAPI. Масштабная линейка 10 мкм.

4.1.9. Структурные особенности каналов TRPV5 и TRPV6.

Следует отметить, что в результате проведенных электрофизиологических исследований 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 [99]. Более того, увеличение количества субъединиц TRPV6 в таких гетеротетрамёрных комплексах, по отношению к TRPV5 приводило к уменьшению их чувствительности к RuR.

Чтобы исследовать присутствие гетеротетрамеров в клетках Jurkat, было проведено двойное окрашивание антителами против TRPV5 и TRPV6. На рисунке 27 показано совмещение изображений, полученных при различных длинах волн флуоресценции, соответствующих сигналам TRPV6 и TRPV5. Коэффициент перекрывания, рассчитанный по формуле Пирсона, показал высокий уровень колокализации каналов TRPV5/V6 (коэффициент Пирсона: $P=0,85\pm0,5$).

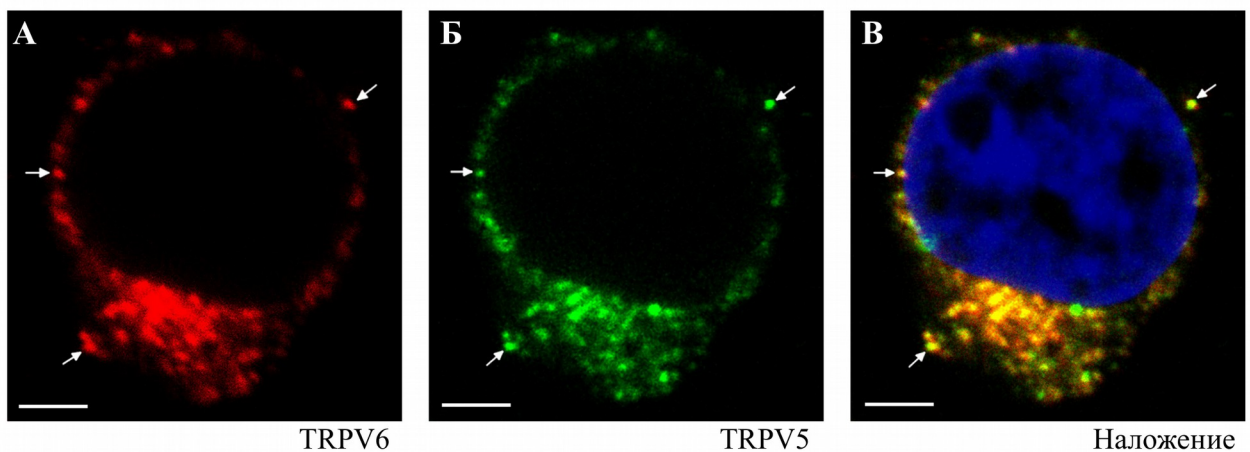


Рис. 27. Колокализация каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat. А. TRPV6 (Cy3), Б. TRPV5 (FITC). В. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: красная флуоресценция — TRPV6, зеленая - TRPV5, синяя - DAPI. Масштабная линейка 2,5 мкм.

Эти данные подтверждают возможность формирования гибридных гетеротетрамеров 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.

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

4.2.1. pH регулирует активность каналов TRPV5/V6.

Мы показали экспрессию и функциональную активность каналов TRPV5 и TRPV6 в лимфоцитах человека, однако о механизмах регуляции этих каналов, как и других каналов TRP, в клетках крови, известно крайне мало. Как уже указывалось выше, 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 [113].

Мы исследовали действие различных значений внеклеточного pH на активность каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat. Эксперименты проводились в режиме outside-out, при поддерживаемых потенциалах на мембране -50 -70 мВ и исходном значении внеклеточного pH=7,3. После развития активности каналов производилась смена раствора в регистрирующей камере с pH=7,3 на раствор с щелочными или кислыми значениями pH. Как показано на рисунке 28 смена раствора с pH=7,3 на щелочной (pH=8,2) 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. 28). Следует отметить, что воздействие кислого pH на каналы было необратимым, т.е. возвращение к исходному значению pH=7,3 не приводила к восстановлению активности каналов (n=5).

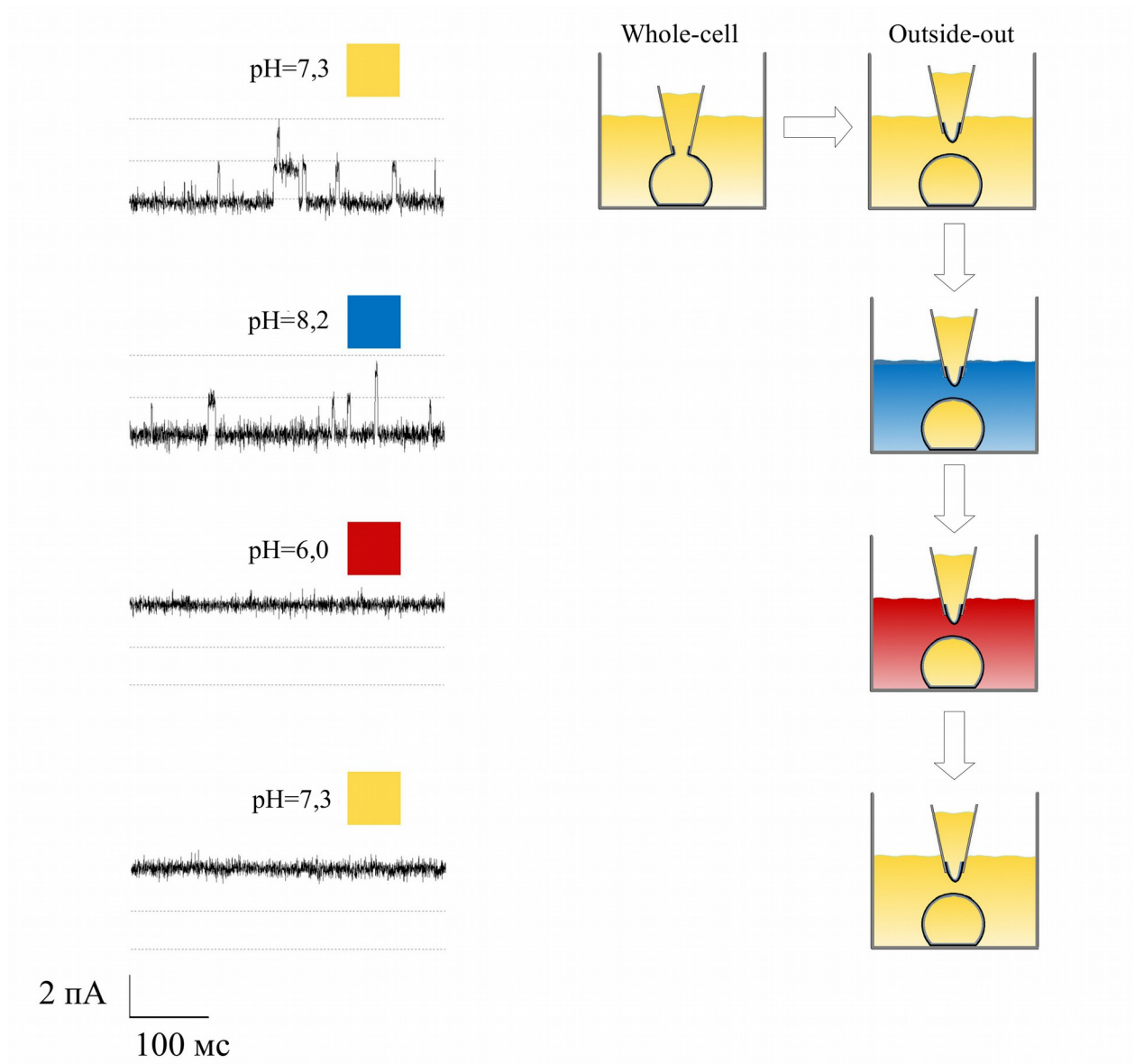


Рис. 28. Влияние различных значений pH раствора на активность каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat. Регистрация токов в режиме *outside-out*, при смене наружного раствора на раствор с различными значениями pH. Потенциал -70 мВ.

Согласно некоторым литературным данным, внеклеточный pH может напрямую воздействовать и менять проводящие свойства поры некоторых ионных каналов, в том числе, некоторых каналов суперсемейства TRP [158,167,168]. Но наши данные не подтверждают этот факт. Во-первых, действие кислого pH в экспериментах с TRPV5/V6 каналами было необратимо, и во-вторых, щелочной pH не увеличивал активность каналов.

В последние годы появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что внеклеточный pH может влиять на внутриклеточный транспорт и

регулировать встраивание каналов в мембрану, таким образом контролируя их количество и, следовательно, активность на плазматической мембране клеток [116].

Чтобы проверить эту гипотезу, была проведена серия экспериментов, в которых клетки изначально (до изоляции фрагмента мембраны) помещали в растворы с кислым или щелочным pH (Рис. 29).

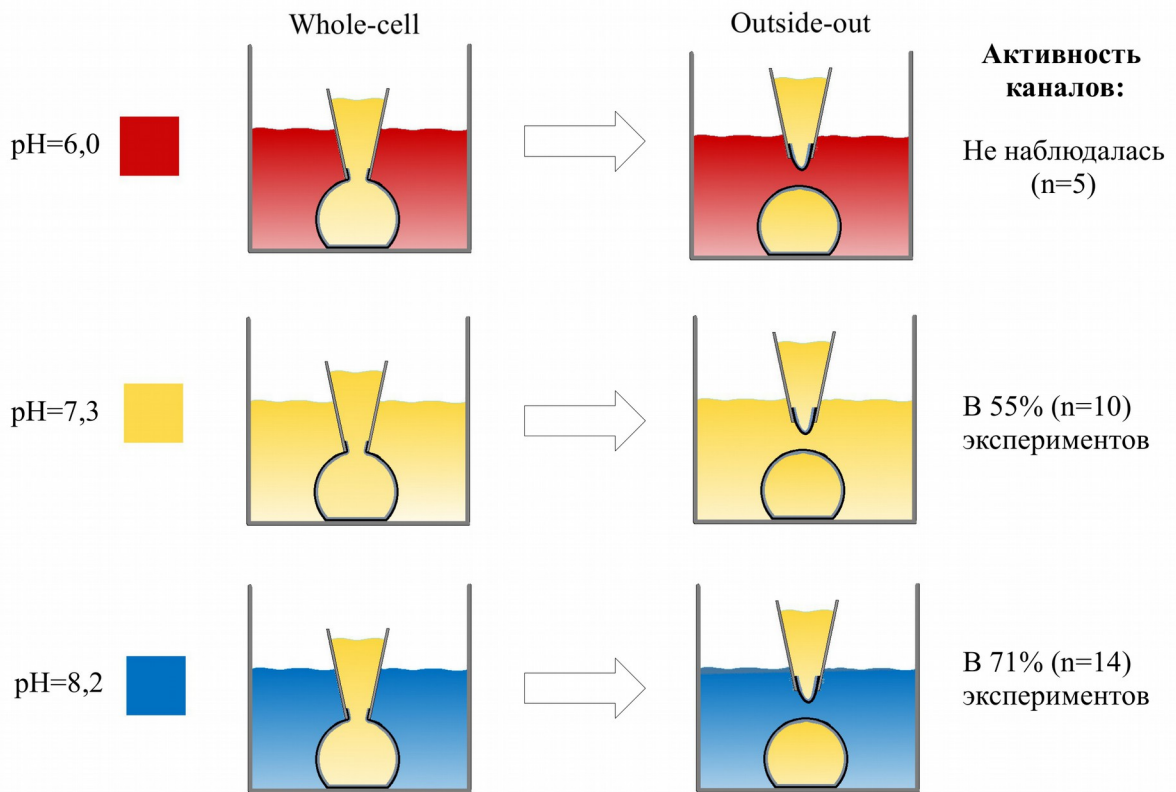


Рис. 29. Изменение активности каналов TRPV5/V6, во фрагментах мембраны, изолированных в растворах с различными значениями pH.

В таких условиях производилась изоляция фрагмента мембраны (конфигурация outside-out) и далее считалось количество зарегистрированных каналов при потенциале -70 мВ. Из пяти экспериментов, проведенных в растворе с pH=6,0 ни в одном из них 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% изолированных патчей ($n=9$) в растворах с $pH=7,3$. Таким образом, когда клетка была интактной, и все структуры в ней были целы, то щелочной pH увеличивал активность каналов. Из полученных результатов следует вывод о том, что действие pH 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.

4.2.2. 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, в том числе включая многих членов суперсемейства каналов TRP [169]. Чтобы проверить участвует ли эндо/экзоцитоз в регуляции активности каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat мы использовали известный мембрано-проникающий ингибитор динамина (участника клатрин-зависимого эндоцитоза), дайнасор. После развития активности каналов в конфигурации outside – out в окружающий раствор добавляли 100 мкМ дайнасора (Рис. 30).

На рисунке 30, представлены типичные записи токов, зарегистрированные до и после подачи дайносора в омывающий раствор. Постепенное затухание активности каналов TRPV5 и TRPV6 ($n=6$) после действия дайнасора свидетельствовало о том, что динамин-зависимый эндоцитоз может участвовать в процессе регуляции активности каналов TRPV5/V6 в плазматической мембране клеток Jurkat.

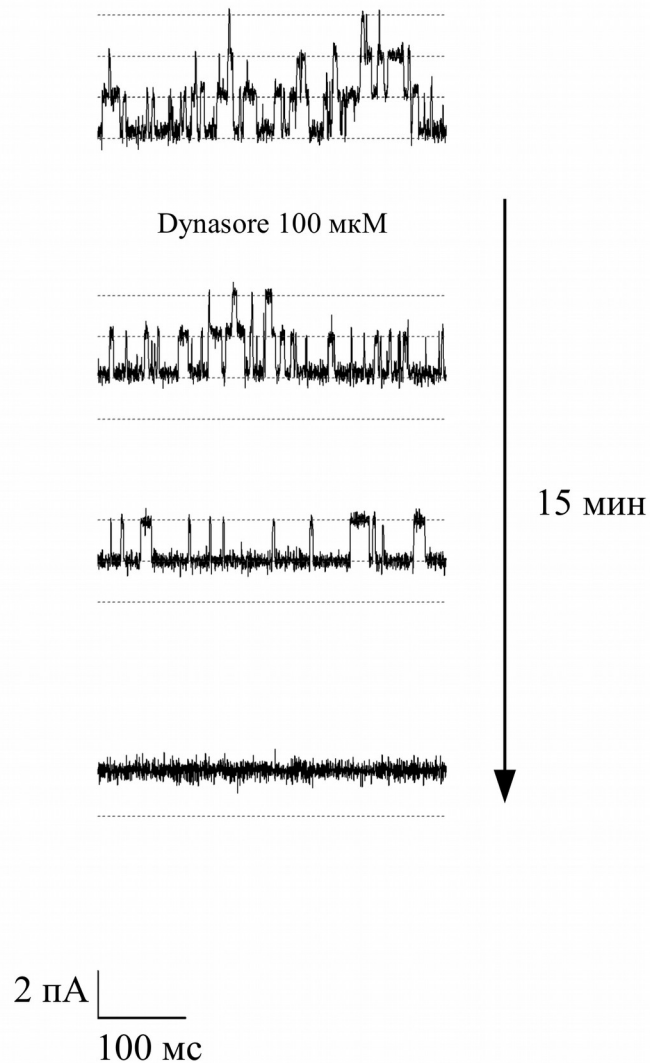


Рис. 30. Действие дайнасора на активность каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat. Добавление 100мкМ дайнсора во внешний раствор, приводило к подавлению активности каналов TRPV5/V6. Регистрация токов в режиме outside-out, при V_h -70мВ.

4.2.3. 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. 31-32).

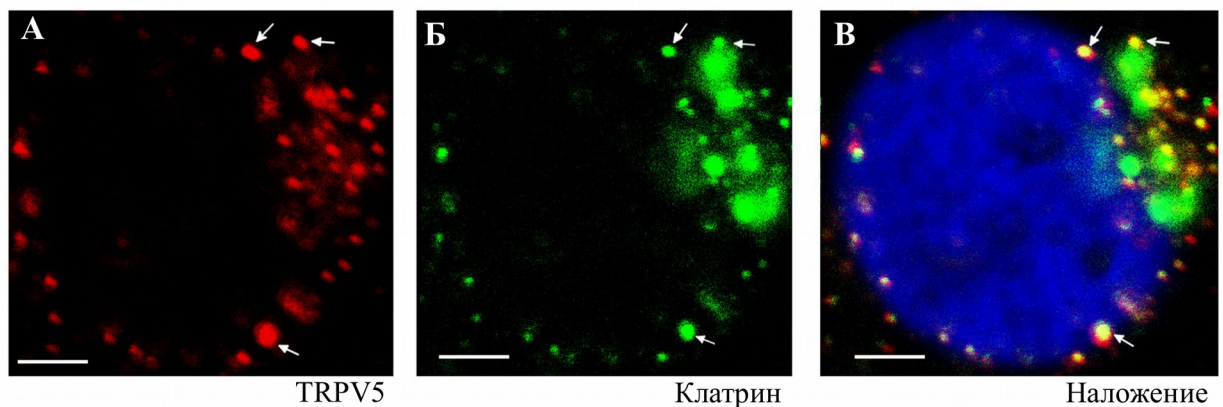


Рис. 31. Колокализация каналов TRPV5 и клатрина в клетках Jurkat. *А. TRPV5 (Cy3) Б. клатрин (FITC) В. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: красная флуоресценция — TRPV5, зеленая - клатрин, синяя - DAPI. Масштабная линейка 2,5 мкм.*

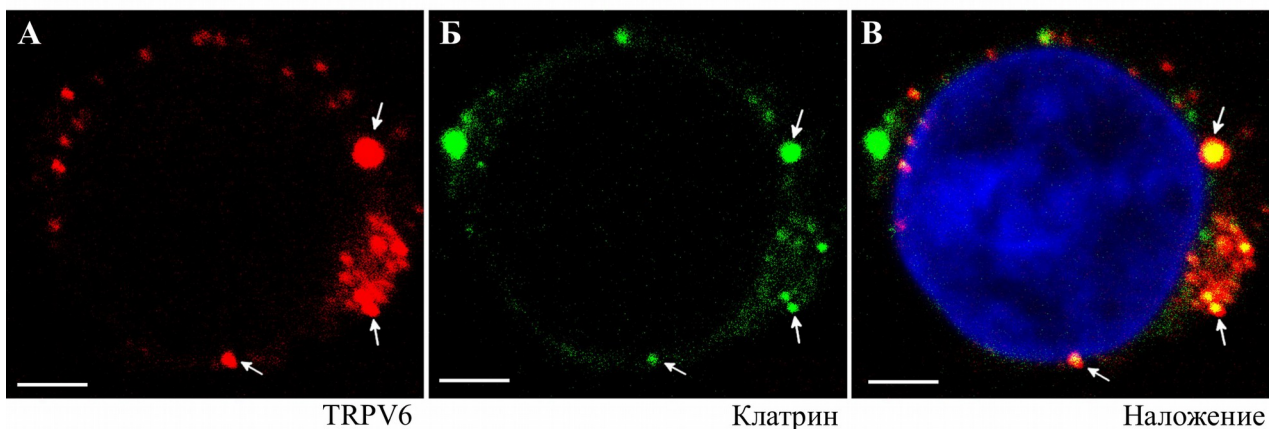


Рис. 32. Колокализация каналов TRPV6 и клатрина в клетках Jurkat. *А. TRPV6 (Cy3) Б. клатрин (FITC) В. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: красная флуоресценция — TRPV6, зеленая клатрин, синяя - DAPI. Масштабная линейка 2,5 мкм.*

При изучении совмещенных изображений, полученных на конфокальном микроскопе с разных каналов, было выявлено, что каналы TRPV5 (Рис. 31) и каналы TRPV6 (Рис. 32) колокализуются с клатрином в клетках Jurkat. При анализе совместной локализации белков клатрина и TRPV5, а также клатрина и TRPV6 выяснилось, что степень колокализации этих белков при оценке доли совпадений была довольно высока (коэффициент Пирсона для TRPV5: $r=0,6\pm0,1$; для TRPV6: $r=0,6\pm0,1$).

4.2.4. Колокализация белка EEA1 с каналами TRPV5 и TRPV6.

Каналы TRP плазматической мембраны постоянно подвергаются эндоцитозу или входят в рециклирующие пути [170]. Молекулярная идентификация внутриклеточных компартментов, в которых находятся каналы TRP до конца не закончена. Чтобы выяснить с каким типом эндосом связываются каналы TRPV5 и TRPV6 на возможном пути рециклирования к плазматической мембране были использованы специфические антитела против маркера ранних эндосом, белка EEA1 (Early Endosomal Autoantigen1) (Рис 33-34).

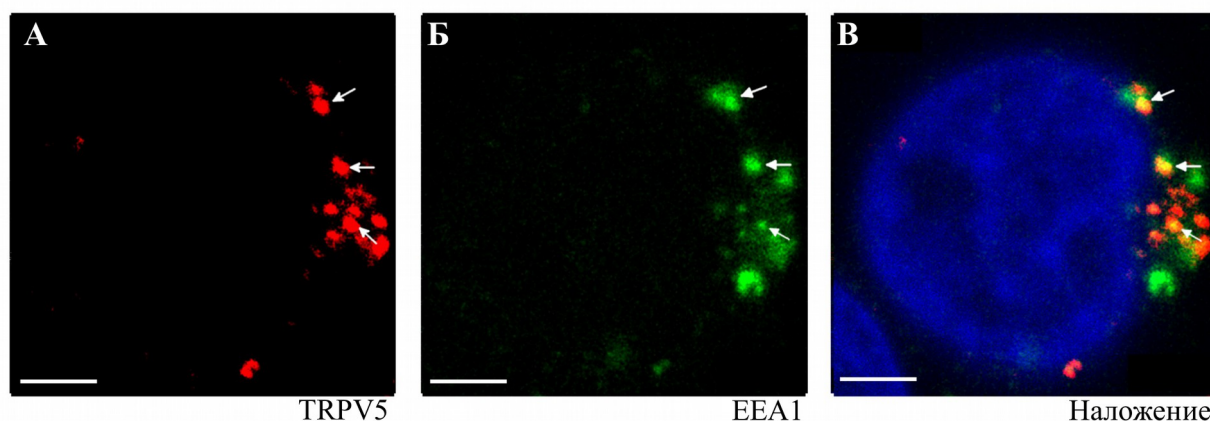


Рис. 33. Колокализация каналов TRPV5 и маркера ранних эндосом - EEA1 в клетках Jurkat. А. TRPV5 (Cy3) Б. EEA1 (FITC) В. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: красная флуоресценция — TRPV5, зеленая - EEA1, синяя - DAPI. Масштабная линейка 2,5 мкм.

При анализе изображений клеток, окрашенных антителами к EEA1, отчетливо видны везикулярные образование соответствующие ранним

эндосомам. При совмещении имиджей, полученных с разных каналов флуоресценции видно, что каналы TRPV5 и TRPV6 колокализуются с EEA1. (коэффициент Пирсона для TRPV5: $r=0,25$; TRPV6: $r=0,27$).

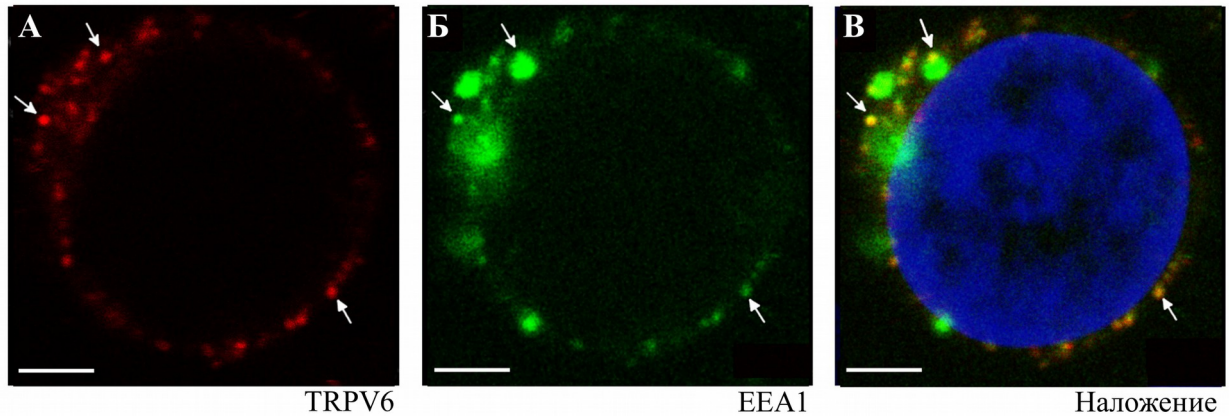


Рис. 34. Колокализация каналов TRPV6 и маркера ранних эндосом - EEA1 в клетках Jurkat. А. TRPV6 (Cy3) Б. EEA1 (FITC) В. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: красная флуоресценция — TRPV6, зеленая EEA1, синяя - DAPI. Масштабная линейка 2,5 мкм.

Таким образом, было показано, что каналы TRPV5/V6, по крайней мере частично, находятся в ранних эндосомах, и могут участвовать в процессах связанных с везикулярным транспортом.

5. ОБСУЖДЕНИЕ

5.1. Молекулярная идентификация кальциевых каналов в лимфоцитах человека.

Наши результаты представляют первую функциональную идентификацию кальциевых каналов TRPV5 и TRPV6 в Т-клетках человека линии Jurkat и нормальных лимфоцитах, выделенных из периферической крови условно здоровых доноров. С помощью метода patch-clamp в клетках Jurkat и нормальных лимфоцитах человека, в режиме отведения токов от целой клетки (конфигурация whole-cell) были зарегистрированы входящие токи, при отрицательных потенциалах, в отсутствие двухвалентных катионов в растворе. После изоляции фрагмента мембраны от целой клетки и переходе в режим outside-out количество каналов значительно уменьшалось, но активность каналов не затухала на протяжении всего периода регистрации, при сохранении отрицательных потенциалов на мембране. Проводимость каналов оказалась равной 38.0 ± 3.1 пСм в клетках Jurkat и 36 ± 0.2 пСм в покоящихся лимфоцитах. Эти значения были близки значениям проводимости каналов TRPV5 и TRPV6, зарегистрированных нами ранее в клетках K562 (30.0 ± 3.1 пСм) [141], а также соответствовали проводимости (40 - 70 пСм) рассчитанной для рекомбинантных TRPV5 и TRPV6 каналов в идентичных ионных условиях [166].

Унитарные токи через каналы, зарегистрированные нами в экспериментах на лимфоцитах, имели свойство входящего выпрямления в вариантах отведения от фрагмента мембраны. По этому параметру эндогенные катионные каналы в клетках крови также демонстрируют сходство с каналами TRPV5 и TRPV6, которые характеризуются входящим выпрямлением в аналогичных ионных условиях [98,104,171], 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 [172,173]. В наших опытах было обнаружено, что свойство входящего выпрямления токов сохранялось после отделения фрагмента мембраны в раствор, не содержащий двухвалентных катионов. 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 входящего выпрямления (Kir channels) [174].

Известно, что каналы TRPV5 и TRPV6 имеют между собой сходные функциональные характеристики, но отличаются своей чувствительностью к рутениевому красному. В искусственно экспрессионных системах было показано, что чувствительность каналов TRPV5 к RuR в 100 раз выше, чем чувствительность каналов TRPV6 [171]. Обнаруженные в клетках Jurkat и покоящихся лимфоцитах каналы, инактивировались рутениевым красным в широком диапазоне концентраций (от 500 нМ до 50 мкМ). В ряде экспериментов рутениевый красный блокировал каналы с концентрацией полумаксимального ингибирования (IC_{50}) равной 190 нМ. Эта величина очень близка значению IC_{50} , полученному для рекомбинантных каналов TRPV5 (130 нМ). В других экспериментах проведенных на клетках Jurkat, зарегистрированные каналы инактивировались с $IC_{50} = 8,5 \mu\text{M}$, что соответствовало значению, полученному на рекомбинантных TRPV6 ($IC_{50} = 9 \mu\text{M}$), и являлось дополнительным доказательством в пользу правильной идентификации каналов TRPV5/V6. В ряде экспериментов, были зарегистрированы каналы, которые блокировались при концентрации RuR слишком высокой для блокирования каналов TRPV5 и слишком низкой для блокирования TRPV6. Согласно литературным данным, полученным в искусственно экспрессионных системах, субъединицы белков TRPV5 и TRPV6 способны образовывать гомо- и гетеротетрамерные структуры, формируя каналы с новыми свойствами. В зависимости от уровня экспрессии белков TRPV5 и TRPV6 изменяется соотношение субъединиц состав каналов

в клетке и такие каналы приобретают особые характеристики в зависимости от субъединичного состава. Так, в клетках с более высокой экспрессией канала TRPV6 будут преобладать каналы с меньшей чувствительностью к RuR. И наоборот, чем ниже будет экспрессия каналов TRPV6 в клетке по сравнению с каналами TRPV5, тем большую чувствительность к ингибитору RuR будут демонстрировать каналы [166].

Присутствие каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках крови было подтверждено в настоящем исследовании при помощи метода иммунофлуоресценции. С помощью специфичных антител, выработанных против TRPV5 и TRPV6 и флуоресцентных антител была выявлена локализация каналов TRPV5 и TRPV6 в цитоплазме и плазматической мембране клеток Jurkat и нормальных лимфоцитах человека. Возможность формирования гетеротетрамеров TRPV5/V6 было подтверждено посредством двойного окрашивания специфическими антителами против TRPV5 и TRPV6 и дальнейшего анализа, полученных наложением, изображений. Проведенный анализ показал высокий процент совпадения (колокализацию) сигналов этих антител. В целом, в проведенном исследовании, впервые, были идентифицированы высокоселективные кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat и лимфоцитах периферической крови человека. Согласно полученным данным, эти каналы могут находиться в клетках крови не только в виде гомотетрамерных структур, сформированных исключительно из TRPV5 или TRPV6, но и образовывать гетеротетрамерные структуры.

Очень важным фактом является то, что проведенный сотрудниками нашей лаборатории 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 генов TRPV6 в трансформированных клетках Jurkat по сравнению с покоящимися лимфоцитами [175]. Низкий (почти следовой)

уровень экспрессии каналов TRPV6 объясняет отсутствие регистрации низко чувствительных к RuR каналов в нормальных лимфоцитах человека.

В последние годы накапливаются данные, что некоторые каналы TRP участвуют, как в поддержании нормального Ca^{2+} -гомеостаза, так и в развитии и прогрессии опухолей. Экспрессия и активность различных типов каналов этого суперсемейства могут соответствовать различным стадиям заболевания и, более того, участвовать в определенных стадиях развития рака. Каналы суперсемейства TRP участвуют во множестве процессов, начиная от контроля клеточной пролиферации до регуляции инвазивности и метастазирования. Поэтому исследования механизмов работы каналов TRP в различных злокачественно перерожденных клетках являются очень перспективной областью исследования.

Строгая корреляция между увеличением экспрессии мРНК каналов TRPV6 и стадией малигнизации клеток, впервые, была показана в исследованиях на клетках предстательной железы [137]. В настоящее время повышенная экспрессия каналов TRPV6 обнаружена в карциномах предстательной железы, щитовидной железы, кишечника и яичников [145]. Также появляются работы, указывающие на то, что вход Ca^{2+} через каналы TRPV6 может модулировать пролиферацию трансформированных клеток и менять их резистентность к апоптозу [143,176].

В нашем исследовании каналы TRPV5 и TRPV6 были зарегистрированы в 63% опытов полученных на клетках Jurkat и только в 28% опытов полученных на покоящихся лимфоцитах. Более того, активность каналов, представленная как NP_o , оказалась существенно ниже в нормальных лимфоцитах по сравнению с трансформированными клетками. Полученные результаты указывают на повышенную плотность каналов TRPV5/V6 в постоянно пролиферирующей линии Т-лимфоцитов по сравнению с нормальными лимфоцитами. В целом эти данные свидетельствуют о потенциальной роли TRPV5/V6 в пролиферации или злокачественной

трансформации лимфоцитов. Тот факт, что каналы TRPV5/V6 могут дифференцированно экспрессироваться в нормальных и злокачественно трансформированных клетках позволяет предположить, что каналы TRPV5/V6 могут рассматриваться в качестве потенциальных маркерных белков при злокачественной трансформации клеток крови.

5.2. Механизмы регуляции активности каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat.

Дальнейшим этапом настоящего исследования было изучение механизмов регуляции идентифицированных кальциевых каналов в лимфоцитах. Большинство каналов TRP работают как сенсоры изменений во внеклеточной среде, таких как изменения температуры, осмолярности, механического воздействия или химических веществ [113]. Некоторые каналы TRP реагируют на внутриклеточное изменение pH или на концентрации сигнальных молекул. Как показано в обзоре литературы (раздел 2.3), каналы TRPV5/6, расположенные на апикальной мембране почечного или кишечного эпителия являются первичной мишенью для регуляции кальциевого гомеостаза гормонами. Кроме того, есть данные указывающие на чувствительность эпителиальных каналов TRPV5/6 к изменению pH [158,168]. Это хорошо согласуется с результатами исследований, указывающих на то, что изменения в работе эпителиальных кальциевых каналов могут приводить к ряду заболеваний, связанных с нарушением кислотно-щелочного баланса. Принимая во внимание совокупность существующих данных, в настоящей работе мы исследовали влияние экстраклеточного pH на активность каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat.

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что закисление среды приводит к быстрой инактивации моновалентных токов через каналы TRPV5/V6, в режиме отведения тока от фрагмента мембраны.

Однако, защелачивание среды, в большинстве экспериментов, не вызывало какого-либо эффекта. Существует несколько работ посвященных исследованиям воздействия рН на каналы TRPV5 в искусственно экспрессионных системах. В ряде работ было показано, что рН может напрямую воздействовать на геометрию поры канала [158,167,168]. Разумеется, прямое протонирование поры канала и, как следствие, инактивация канала были бы вполне допустимы, если бы последующее возвращение к нормальной среде восстанавливало активность каналов. Однако, наши электрофизиологические данные говорят о том, что, по-видимому, существуют и другие механизмы регуляции каналов. Во-первых, ингибирование активности каналов кислым рН было необратимым. Во-вторых, защелачивание среды при регистрации токов на изолированных фрагментах мембраны не приводило к изменению активности каналов TRPV5/V6.

Поэтому далее мы изменили условия проведения эксперимента по изучению влияния рН на каналы TRPV5/V6. В этих экспериментах клетки исходно (до отделения фрагмента мембраны) помещались в растворы с различными значениями рН. В этих же растворах происходила изоляция участка мембраны (outside-out) и регистрация токов. При проведении экспериментов в таких условиях, было обнаружено, что количество зарегистрированных каналов было значительно выше в растворе с щелочным рН, чем в растворах с рН=7, 3. Когда же отделение фрагмента производилось в кислых растворах, активности каналов зарегистрировано не было. Полученные данные привели нас к выводу, что клетки крови реагируют на такой стимул как изменение рН внеклеточного раствора, в том числе через регуляцию активности кальциевых каналов. И этот механизм регуляции работает по определенной программе, по-видимому, не связанной с прямыми изменениями геометрии поры каналы. Тот факт, что увеличение плотности каналов при защелачивании отмечается только, когда клетка сохраняет свою

целостность, может говорить о том что, механизм регулирующий плотность каналов на мембране не полностью функционален в мембранных фрагментах.

Согласно многочисленным литературным данным, внеклеточный pH регулирует многие процессы внутриклеточного везикулярного транспорта, такие как эндо/экзоцитоз, а также лизосомальный трафик [177,178]. Некоторые исследования свидетельствуют о том, что контроль численности белков на мембране осуществляется посредством pH-зависимого эндоцитоза и экзоцитоза. В клетке существуют механизмы рециклирования везикул с определенными белками, которые могут встраиваться или удаляться из плазматической мембраны в зависимости от различных клеточных сигналов [116]. Исходно предполагалось, что основная часть каналов TRP функционирует на клеточной мембране. Но многочисленные исследования показали, что как минимум часть молекул всегда локализуется во внутриклеточных везикулах [179]. Во многих случаях не ясно, является ли такое распределение физиологически необходимым. Каналы TRP, обнаруживающиеся во внутриклеточных структурах, могут представлять новосинтезированные белки в процессе доставки на мембрану, или интернализованные каналы на своем пути к деградации. Также выяснилось, что некоторые каналы накапливаются в больших и стабильных рециклирующих компартментах, близких к плазматической мембране, и активируются после транспортировки к плазматической мембране (Рис. 35) [116]. Каналы TRPV5/V6 конститутивно активны при физиологических потенциалах, таким образом, общая активность каналов напрямую зависит от их численности на плазматической мембране. Наши исследования показали, что блокатор белка динамина, участника клатрин-зависимого эндоцитоза, дайнасор блокирует активность каналов TRPV5/V6. 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 предотвращают работу каналов.

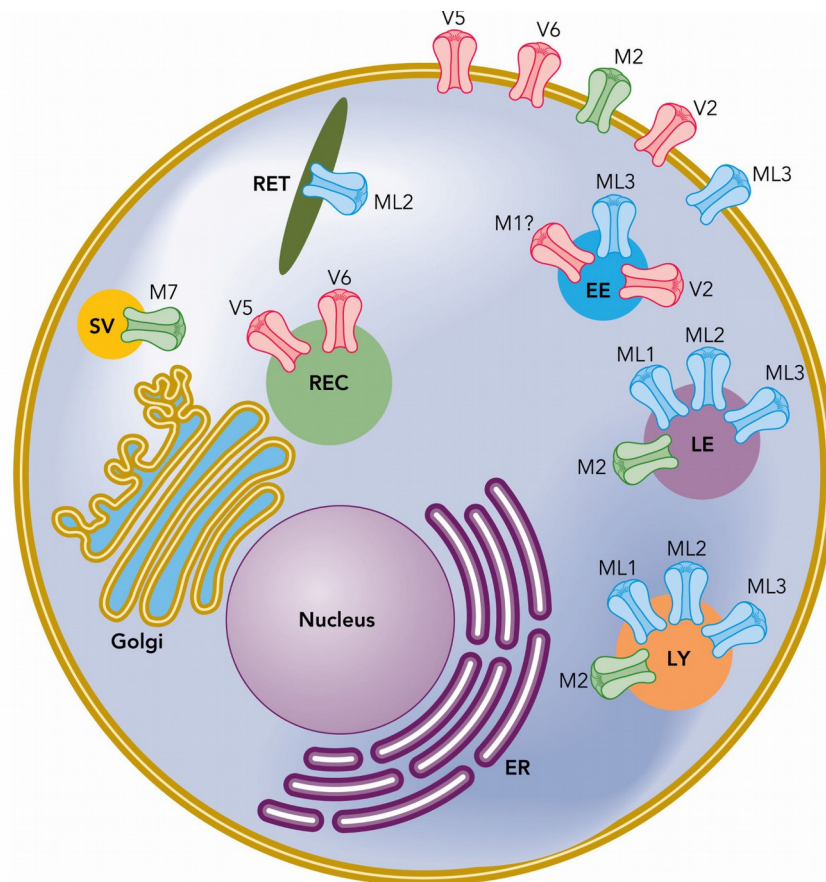


Рис. 35. TRP каналы в эндосомальных путях. Каналы суперсемейства TRP распределены в различных органеллах эндосомального пути. TRPML1 экспрессируется в поздних эндосомах и лизосомах. TRPML2 обнаружен в поздних эндосомах, лизосомах, и в рециклирующих эндосомальных трубочках. TRPML3 находится в мембранах не только поздних эндосом и лизосом, но и в ранних эндосомах, а также и в плазматической мембране. Каналы TRPV5 и TRPV6 были обнаружены в плазматической мембране и рециклирующих эндосомальных компартментах, но на данный момент не известно вовлечены ли они в эндосомальный трафик. TRPV2 экспрессируются в плазматической мембране и ранних эндосомах.

В работе были проведены иммунофлуоресцентные окрашивания клеток Jurkat, которые подтвердили высокую степень колокализации каналов TRPV5/V6 с клатрином. Это позволило предположить, что клатрин/динамин зависимый эндоцитоз вовлечен в систему контроля численности каналов TRPV5/V6 на мембране, в том числе, при изменении внеклеточного pH. Кроме того, оказалось, что каналы TRPV5/V6 в клетках крови

взаимодействуют с ранними эндосомами. Вполне вероятно, что это взаимодействие происходит на пути рециклирования каналов к плазматической мембране. Каналы TRPV5 и TRPV6 были обнаружены в рециклирующих эндосомах, но их роль в этих везикулах остается не ясной. Оба канала конститутивно активны при физиологических условиях, высоко селективны по кальцию и играют важную роль в ре-абсорбции кальция в эпителиальных клетках кишечника и почек. Последние данные показали прямое взаимодействие между TRPV5/V6 и Rab11, малой ГТФазой, которая регулирует трафик множества молекул из рециклирующихся эндосом на мембрану [180]. TRPV5 колокализуется с Rab11 в везикулярных структурах, и экспрессия мутантного Rab11, дефектного по ГТФазному домену, уменьшала уровень белков TRPV5/V6 на плазматической мембране. На данный момент остается не ясным функционируют ли эти каналы в рециклирующих эндосомах. Скорее всего, накопление этих каналов в эндосомах является способом, с помощью которого клетка регулирует количество этих каналов на мембране и, следовательно, их общую активность.

Анализируя совокупность полученных нами результатов и литературных данных, можно сделать вывод о том, что рН- зависимые изменения наружной среды приводят к изменению плотности и, соответственно активности, кальциевых каналов плазматической мембраны 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 на лимфоциты и иммунный ответ в целом. Исследования локальных изменений в местах инфекции и воспаления изучаются уже давно. Известно, что одной из характеристик места воспаления является локальное понижение рН, которое связано с локальным увеличением производства молочной кислоты нейтрофилами и кислыми продуктами метаболизма бактерий [181].

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 [182]. Средний pH многих опухолей примерно на 0,5 меньше, чем в нормальных тканях [183,184]. Из этого было сделано предположение о том, что это закисление может влиять на функцию иммунных клеток.

Исследования действия внеклеточного pH становятся все более распространенным в иммунологических исследованиях. В рамках этих исследований изучали действие нейтрального и кислого pH на подвижность лимфоцитов после стимуляции IL-2. Было показано, что подвижность лимфоцитов возрастает при pH=6,7 по сравнению с pH=7,1. Также было выдвинуто предположение, что слабое закисление среды является активирующим фактором для лимфоцитов, но сильное закисление токсично, и препятствует процессу активации [185]. Было показано снижение цитотоксической активности человеческих лимфокин-активируемых киллеров и снижение активности натуральных киллеров в мышцах при кислых значениях pH [186,187].

На сегодняшний день большинство исследований, посвященных изучению роли pH в различных клеточных процессах, не фокусируется на важных участниках этих процессов, а именно на ионных каналах. Однако ионные каналы являются участниками любого регуляторного процесса, они позволяют клетке реагировать на все стимулы внешней среды и адаптироваться под изменения внешних условий. Реакция клеток на изменение внеклеточного pH, также происходит при участии ионных каналов плазматической мембраны. Наши данные указывают на то, что каналы TRPV5/V6 реагируют на изменения внеклеточного pH, а следовательно могут

участвовать в рН-зависимых функциях лимфоцитов, в том числе и иммунных реакциях.

6. 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.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scharff O. Calcium signals in blood cells // Ugeskr. Laeger. 1993. Vol. 155, № 49. P. 3995–3999.
2. Revankar C.M., Advani S.H., Naik N.R. Altered Ca^{2+} homeostasis in polymorphonuclear leukocytes from chronic myeloid leukaemia patients. // Mol. Cancer. 2006. Vol. 5. P. 65.
3. Hoth M., Penner R. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. // J. Physiol. 1993. Vol. 465. P. 359–386.
4. Premack B.A., McDonald T. V, Gardner P. Activation of Ca^{2+} current in Jurkat T cells following the depletion of Ca^{2+} stores by microsomal Ca^{2+} -ATPase inhibitors. // J. Immunol. 1994. Vol. 152, № 11. P. 5226–5240.
5. Montell C., Birnbaumer L., Flockerzi V. The TRP channels, a remarkably functional family // Cell. 2002. Vol. 108. P. 595–598.
6. Clapham D.E. TRP channels as cellular sensors. // Nature. 2003. Vol. 426, № 6966. P. 517–524.
7. Flockerzi V. An introduction on TRP channels // Handb. Exp. Pharmacol. 2007. Vol. 179. P. 1–19.
8. Dimke H., Hoenderop J.G.J., Bindels R.J.M. Molecular basis of epithelial Ca^{2+} and Mg^{2+} transport: insights from the TRP channel family. // J. Physiol. 2011. Vol. 589, № Pt 7. P. 1535–1542.
9. Pedersen S.F., Owsianik G., Nilius B. TRP channels: an overview. // Cell Calcium. 2005. Vol. 38, № 3-4. P. 233–252.
10. Dolmetsch R.E. et al. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration // Nature. 1997. Vol. 386, № 6627. P. 855–858.
11. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. // Nat. Rev. Immunol. 2007. Vol. 7, № 9. P. 690–702.
12. Gwack Y. et al. Signalling to transcription: Store-operated Ca^{2+} entry and NFAT activation in lymphocytes // Cell Calcium. 2007. Vol. 42, № 2. P. 145–156.
13. Donnadieu E., Revy P., Trautmann A. Imaging T-cell antigen recognition and comparing immunological and neuronal synapses // Immunology. Blackwell Science Ltd, 2001. Vol. 103, № 4. P. 417–425.
14. Delon J. et al. Antigen-dependent and -independent Ca^{2+} Responses Triggered in T Cells by Dendritic Cells Compared with B Cells // J. Exp. Med. . 1998. Vol. 188 , № 8 . P. 1473–1484.

15. Irvine D.J. et al. Direct observation of ligand recognition by T cells // *Nature*. 2002. Vol. 419, № 6909. P. 845–849.
16. Donnadieu E., Bismuth G., Trautmann A. Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium // *Curr. Biol. Elsevier*, 1994. Vol. 4, № 7. P. 584–595.
17. Harnick D.J. et al. The Human Type 1 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor from T Lymphocytes: structure localization and tyrosine phosphorylation // *J. Biol. Chem.* . 1995. Vol. 270 , № 6 . P. 2833–2840.
18. Yamazawa M.A., Hirose T., Kurosaki K., Iino T., Masamitsu T.M. Encoding of Ca^{2+} signals by differential expression of IP3 receptor subtypes // *EMBO J.* 1999. Vol. 18, № 5. P. 1303–1308.
19. Guse A.H. et al. Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. // *Nature*. 1999. Vol. 398, № 6722. P. 70–73.
20. Dolmetsch R.E. et al. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration // *Nature*. 1997. Vol. 386, № 6627. P. 855–858.
21. Prakriya M., Lewis R.S. CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity // *Cell Calcium*. 2003. Vol. 33, № 5-6. P. 311–321.
22. Feske S. et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. // *Nature*. 2006. Vol. 441, № 7090. P. 179–185.
23. Cui J. et al. CaT1 Contributes to the Stores-operated Calcium Current in Jurkat T-lymphocytes // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 49. P. 47175–47183.
24. Hofmann T. et al. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol // *Nature*. 1999. Vol. 397, № 6716. P. 259–263.
25. Massullo P. et al. TRPM channels, calcium and redox sensors during innate immune responses. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2006. Vol. 17, № 6. P. 654–666.
26. Montell C., Rubin G.M. Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction // *Neuron. Elsevier*, 1989. Vol. 2, № 4. P. 1313–1323.
27. Gaudet R. TRP channels entering the structural era // *J. Physiol.* . 2008. Vol. 586 , № 15 . P. 3565–3575.
28. Rohacs T. Regulation of TRP channels by PIP2 // *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* Springer-Verlag, 2007. Vol. 453, № 6. P. 753–762.
29. Smith G.D. et al. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein // *Nature. Macmillian Magazines Ltd.*, 2002. Vol. 418, № 6894. P. 186–190.

30. Redondo P.C. et al. Intracellular Ca²⁺ store depletion induces the formation of macromolecular complexes involving hTRPC1, hTRPC6, the type II IP₃ receptor and SERCA3 in human platelets. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. Vol. 1783, № 6. P. 1163–1176.
31. Montell C. The TRP Superfamily of Cation Channels // *Sci. Signal*. 2005. Vol. 2005, № 272. P. re3–re3.
32. Strübing C. et al. Formation of Novel TRPC Channels by Complex Subunit Interactions in Embryonic Brain // *J. Biol. Chem.* . 2003. Vol. 278 , № 40 . P. 39014–39019.
33. Ambudkar I.S. et al. TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. // *Cell Calcium*. 2007. Vol. 42, № 2. P. 213–223.
34. Pani B. et al. Lipid Rafts Determine Clustering of STIM1 in Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions and Regulation of Store-operated Ca²⁺ Entry (SOCE) // *J. Biol. Chem.* . 2008. Vol. 283 , № 25 . P. 17333–17340.
35. Mori Y. Transient Receptor Potential 1 Regulates Capacitative Ca²⁺ Entry and Ca²⁺ Release from Endoplasmic Reticulum in B Lymphocytes // *J. Exp. Med.* 2002. Vol. 195, № 6. P. 673–681.
36. Xi Q. et al. IP₃ Constricts Cerebral Arteries via IP₃ Receptor–Mediated TRPC3 Channel Activation and Independently of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release // *Circ. Res.* . 2008. Vol. 102 , № 9 . P. 1118–1126.
37. Kwan H.-Y., Huang Y., Yao X. TRP channels in endothelial function and dysfunction. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. Vol. 1772, № 8. P. 907–914.
38. Zechel S., Werner S., von Bohlen und Halbach O. Distribution of TRPC4 in developing and adult murine brain // *Cell Tissue Res. Springer-Verlag*, 2007. Vol. 328, № 3. P. 651–656.
39. Freichel M. et al. Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice // *Nat Cell Biol. Nature Publishing Group*, 2001. Vol. 3, № 2. P. 121–127.
40. Greka A. et al. TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology // *Nat Neurosci*. 2003. Vol. 6, № 8. P. 837–845.
41. Obukhov A.G., Nowycky M.C. TRPC5 channels undergo changes in gating properties during the activation-deactivation cycle // *J. Cell. Physiol. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company*, 2008. Vol. 216, № 1. P. 162–171.
42. Dietrich A. et al. Increased Vascular Smooth Muscle Contractility in TRPC6^{-/-} Mice // *Mol. Cell. Biol.* . 2005. Vol. 25 , № 16 . P. 6980–6989.
43. Satoh S. et al. Transient receptor potential (TRP) protein 7 acts as a G protein-activated Ca²⁺ channel mediating angiotensin II-induced myocardial apoptosis //

- Mol. Cell. Biochem. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 2007. Vol. 294, № 1-2. P. 205–215.
44. Van Genderen M.M. et al. Mutations in TRPM1 Are a Common Cause of Complete Congenital Stationary Night Blindness // *Am. J. Hum. Genet.* Elsevier, 2009. Vol. 85, № 5. P. 730–736.
 45. Perraud A.-L., Schmitz C., Scharenberg A.M. TRPM2 Ca²⁺ permeable cation channels: from gene to biological function // *Cell Calcium*. 2003. Vol. 33, № 5-6. P. 519–531.
 46. McNulty S., Fonfria E. The role of TRPM channels in cell death // *Pflügers Arch.* Springer-Verlag, 2005. Vol. 451, № 1. P. 235–242.
 47. Nazıroğlu M. et al. 2.45-Gz wireless devices induce oxidative stress and proliferation through cytosolic Ca²⁺ influx in human leukemia cancer cells // *Int. J. Radiat. Biol. Informa Clin Med*, 2012. Vol. 88, № 6. P. 449–456.
 48. Zhang W. et al. A Novel TRPM2 Isoform Inhibits Calcium Influx and Susceptibility to Cell Death // *J. Biol. Chem.* . 2003. Vol. 278 , № 18 . P. 16222–16229.
 49. Grimm C. et al. Molecular and Functional Characterization of the Melastatin-related Cation Channel TRPM3 // *J. Biol. Chem.* . 2003. Vol. 278 , № 24 . P. 21493–21501.
 50. Colsoul B. et al. Loss of high-frequency glucose-induced Ca²⁺ oscillations in pancreatic islets correlates with impaired glucose tolerance in *Trpm5*^{–/–} mice // *Proc. Natl. Acad. Sci.* . 2010. Vol. 107 , № 11 . P. 5208–5213.
 51. Launay P. et al. TRPM4 Regulates Calcium Oscillations After T Cell Activation // *Sci.* . 2004. Vol. 306 , № 5700 . P. 1374–1377.
 52. Armisen R. et al. TRPM4 enhances cell proliferation through up-regulation of the β -catenin signaling pathway // *J. Cell. Physiol.* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2011. Vol. 226, № 1. P. 103–109.
 53. Barbet G. et al. The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells // *Nat Immunol.* Nature Publishing Group, 2008. Vol. 9, № 10. P. 1148–1156.
 54. Voets T. et al. TRPM6 Forms the Mg²⁺ Influx Channel Involved in Intestinal and Renal Mg²⁺ Absorption // *J. Biol. Chem.* . 2004. Vol. 279 , № 1 . P. 19–25.
 55. Aarts M.M., Tymianski M. TRPM7 and Ischemic CNS Injury // *Neurosci.* . 2005. Vol. 11 , № 2 . P. 116–123.
 56. Dhennin-Duthille G.M., Haren I., Sevestre N., Ouadid-Ahidouch H., Halima A.G. Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2009. Vol. 297, № 3. P. C493–C502.

57. Ng N.M., Jiang S.P., Lv Z.Q. Retrovirus-Mediated siRNA targeting TRPM7 gene induces apoptosis in RBL-2H3 cells // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2012. Vol. 16, № 9. P. 1172–1178.
58. Krapivinsky G. et al. The TRPM7 Ion Channel Functions in Cholinergic Synaptic Vesicles and Affects Transmitter Release // *Neuron*. Elsevier, 2006. Vol. 52, № 3. P. 485–496.
59. McKemy D.D., Neuhauser W.M., Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation // *Nature*. Macmillan Magazines Ltd., 2002. Vol. 416, № 6876. P. 52–58.
60. Vergarajauregui S., Puertollano R. Two Di-Leucine Motifs Regulate Trafficking of Mucolipin-1 to Lysosomes // *Traffic*. Blackwell Publishing Ltd, 2006. Vol. 7, № 3. P. 337–353.
61. Dong X.-P. et al. The type IV mucopolipidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel // *Nature*. Macmillan Publishers Limited. All rights reserved, 2008. Vol. 455, № 7215. P. 992–996.
62. Sun M. et al. Mucopolipidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel // *Hum. Mol. Genet.* . 2000. Vol. 9 , № 17 . P. 2471–2478.
63. Slaugenhaupt S.A. et al. Mapping of the Mucopolipidosis Type IV Gene to Chromosome 19p and Definition of Founder Haplotypes // *Am. J. Hum. Genet.* Elsevier, 1999. Vol. 65, № 3. P. 773–778.
64. Soyombo A.A. et al. TRP-ML1 Regulates Lysosomal pH and Acidic Lysosomal Lipid Hydrolytic Activity // *J. Biol. Chem.* . 2006. Vol. 281 , № 11 . P. 7294–7301.
65. Vergarajauregui S. et al. Autophagic dysfunction in mucopolipidosis type IV patients // *Hum. Mol. Genet.* . 2008. Vol. 17 , № 17 . P. 2723–2737.
66. Vergarajauregui S., Martina J.A., Puertollano R. Identification of the Penta-EF-hand Protein ALG-2 as a Ca²⁺-dependent Interactor of Mucolipin-1 // *J. Biol. Chem.* . 2009. Vol. 284 , № 52 . P. 36357–36366.
67. Zhang F. et al. TRP-ML1 functions as a lysosomal NAADP-sensitive Ca²⁺ release channel in coronary arterial myocytes // *J. Cell. Mol. Med.* Blackwell Publishing Ltd, 2009. Vol. 13, № 9b. P. 3174–3185.
68. Tjon-Kon-Sang K.Q., So S., Kiselyov I., Soyombo K., Muallem A.A., Shmuel H.J.L. A novel mode of TRPML3 regulation by extracytosolic pH absent in the varitint-waddler phenotype // *EMBO J.* 2008. Vol. 27, № 8. P. 1197–1205.
69. Nagata K. et al. The varitint-waddler (Va) deafness mutation in TRPML3 generates constitutive, inward rectifying currents and causes cell degeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci.* . 2008. Vol. 105 , № 1 . P. 353–358.

70. Xu H. et al. Activating mutation in a mucolipin transient receptor potential channel leads to melanocyte loss in varintint-waddler mice // *Proc. Natl. Acad. Sci.* . 2007. Vol. 104 , № 46 . P. 18321–18326.
71. Kim H.J. et al. The Ca²⁺ Channel TRPML3 Regulates Membrane Trafficking and Autophagy // *Traffic*. Blackwell Publishing Ltd, 2009. Vol. 10, № 8. P. 1157–1167.
72. Zeevi D.A. et al. A potentially dynamic lysosomal role for the endogenous TRPML proteins // *J. Pathol.* John Wiley & Sons, Ltd., 2009. Vol. 219, № 2. P. 153–162.
73. Karacsonyi C., Miguel A.S., Puertollano R. Mucolipin-2 Localizes to the Arf6-Associated Pathway and Regulates Recycling of GPI-APs // *Traffic*. Blackwell Publishing Ltd, 2007. Vol. 8, № 10. P. 1404–1414.
74. Lev S. et al. Constitutive Activity of the Human TRPML2 Channel Induces Cell Degeneration // *J. Biol. Chem.* . 2010. Vol. 285 , № 4 . P. 2771–2782.
75. Song Y. et al. TRPML cation channels regulate the specialized lysosomal compartment of vertebrate B-lymphocytes. // *Eur. J. Cell Biol.* 2006. Vol. 85, № 12. P. 1253–1264.
76. Vergarajauregui S., Martina J.A., Puertollano R. LAPTMs regulate lysosomal function and interact with mucolipin 1: new clues for understanding mucolipidosis type IV // *J. Cell Sci.* . 2011. Vol. 124 , № 3 . P. 459–468.
77. Story G.M. et al. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures // *Cell*. Elsevier, 2003. Vol. 112, № 6. P. 819–829.
78. Delmas P. Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. // *Cell*. Elsevier, 2004. Vol. 118, № 2. P. 145–148.
79. Bisgrove B.W. et al. Polaris and Polycystin-2 in dorsal forerunner cells and Kupffer's vesicle are required for specification of the zebrafish left-right axis. // *Dev. Biol.* 2005. Vol. 287, № 2. P. 274–288.
80. Shimizu T. et al. Regulation of the murine TRPP3 channel by voltage, pH, and changes in cell volume // *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* Springer-Verlag, 2009. Vol. 457, № 4. P. 795–807.
81. Vriens J., Appendino G., Nilius B. Pharmacology of Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels // *Mol. Pharmacol.* . 2009. Vol. 75 , № 6 . P. 1262–1279.
82. Vennekens R., Owsianik G., Nilius B. Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. // *Curr. Pharm. Des.* 2008. Vol. 14, № 1. P. 18–31.
83. Hayes P. et al. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1 // *Pain*. Elsevier/North-Holland., 2000. Vol. 88, № 2. P. 205–215.

84. McVey A.A., Douglas C. Thomas, Jean E. Prpic, Veronica Vigna, Steven R. Liddle, Rodger A. J.D.P. Capsaicin vanilloid receptor-1 mediates substance P release in experimental pancreatitis // *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 2001. Vol. 281, № 5. P. G1322–G1328.
85. Link T.M. et al. TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis // *Nat Immunol.* Nature Publishing Group, 2010. Vol. 11, № 3. P. 232–239.
86. Boyd R.S. et al. Protein Profiling of Plasma Membranes Defines Aberrant Signaling Pathways in Mantle Cell Lymphoma // *Mol. Cell. Proteomics* . 2009. Vol. 8 , № 7 . P. 1501–1515.
87. Fabris S. et al. Molecular and transcriptional characterization of the novel 17p11.2-p12 amplicon in multiple myeloma // *Genes, Chromosom. Cancer.* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2007. Vol. 46, № 12. P. 1109–1118.
88. Chung M.-K., Güler A.D., Caterina M.J. Biphasic Currents Evoked by Chemical or Thermal Activation of the Heat-gated Ion Channel, TRPV3 // *J. Biol. Chem.* . 2005. Vol. 280 , № 16 . P. 15928–15941.
89. Moqrich A. et al. Impaired Thermosensation in Mice Lacking TRPV3, a Heat and Camphor Sensor in the Skin // *Sci.* . 2005. Vol. 307 , № 5714 . P. 1468–1472.
90. Prenen N., Droogmans J., Voets G., Thomas B.V. TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2004. Vol. 286, № 2. P. C195–C205.
91. Masuyama R. et al. TRPV4-Mediated Calcium Influx Regulates Terminal Differentiation of Osteoclasts // *Cell Metab.* Elsevier, 2008. Vol. 8, № 3. P. 257–265.
92. Hoenderop J.G.J. et al. Molecular Identification of the Apical Ca²⁺ Channel in 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃-responsive Epithelia // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 13. P. 8375–8378.
93. Peng J.-B. et al. Molecular Cloning and Characterization of a Channel-like Transporter Mediating Intestinal Calcium Absorption // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 32. P. 22739–22746.
94. Qiu A., Hogstrand C. Functional characterisation and genomic analysis of an epithelial calcium channel (ECaC) from pufferfish, *Fugu rubripes* // *Gene*. 2004. Vol. 342, № 1. P. 113–123.
95. Peng J.B., Brown E.M., Hediger M.A. Structural conservation of the genes encoding CaT1, CaT2, and related cation channels. // *Genomics*. 2001. Vol. 76, № 1-3. P. 99–109.

96. Peng J.-B. et al. A Rat Kidney-specific Calcium Transporter in the Distal Nephron. // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, № 36. P. 28186–28194.
97. Peng J.B. et al. Human calcium transport protein CaT1. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. Vol. 278, № 2. P. 326–332.
98. Yue L. et al. CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. // Nature. 2001. Vol. 410, № 6829. P. 705–709.
99. Hoenderop J.G.J. et al. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. // EMBO J. 2003. Vol. 22, № 4. P. 776–785.
100. Erler I. et al. Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279, № 33. P. 34456–34463.
101. Voets T. et al. Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel. // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279, № 15. P. 15223–15230.
102. Nilius B. et al. The single pore residue Asp542 determines Ca²⁺ permeation and Mg²⁺ block of the epithelial Ca²⁺ channel. // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 2. P. 1020–1025.
103. Dodier Y., Dionne F. Topology of the selectivity filter of a TRPV channel: rapid accessibility of contiguous residues from the external medium // Am. J. 2007. Vol. 7. P. 1962–1970.
104. Voets T. Mg²⁺-dependent Gating and Strong Inward Rectification of the Cation Channel TRPV6 // J. Gen. Physiol. 2003. Vol. 121, № 3. P. 245–260.
105. Bödding M., Wissenbach U., Flockerzi V. The recombinant human TRPV6 channel functions as Ca²⁺ sensor in human embryonic kidney and rat basophilic leukemia cells. // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, № 39. P. 36656–36664.
106. Nilius B. et al. Fast and slow inactivation kinetics of the Ca²⁺ channels ECaC1 and ECaC2 (TRPV5 and TRPV6). Role of the intracellular loop located between transmembrane segments 2 and 3. // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, № 34. P. 30852–30858.
107. Niemeyer B. a et al. Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2001. Vol. 98, № 6. P. 3600–3605.
108. Derler I. et al. Dynamic but not constitutive association of calmodulin with rat TRPV6 channels enables fine tuning of Ca²⁺-dependent inactivation. // J. Physiol. 2006. Vol. 577, № Pt 1. P. 31–44.
109. Lambers T.T. et al. Calbindin-D28K dynamically controls TRPV5-mediated Ca²⁺ transport. // EMBO J. 2006. Vol. 25, № 13. P. 2978–2988.

110. Thyagarajan B., Lukacs V., Rohacs T. Hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates calcium-induced inactivation of TRPV6 channels. // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283, № 22. P. 14980–14987.
111. Rohacs T., Nilius B. Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides. // *Pflugers Arch.* 2007. Vol. 455, № 1. P. 157–168.
112. Al-Ansary D. et al. ATP modulates Ca^{2+} uptake by TRPV6 and is counteracted by isoform-specific phosphorylation. // *FASEB J.* 2010. Vol. 24, № 2. P. 425–435.
113. Bonny O. et al. Mechanism of urinary calcium regulation by urinary magnesium and pH. // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008. Vol. 19, № 8. P. 1530–1537.
114. Yeh B.-I., Yoon J., Huang C.-L. On the role of pore helix in regulation of TRPV5 by extracellular protons. // *J. Membr. Biol.* 2006. Vol. 212, № 3. P. 191–198.
115. Cha S.-K. et al. Regulation of TRPV5 single-channel activity by intracellular pH. // *J. Membr. Biol.* 2007. Vol. 220, № 1-3. P. 79–85.
116. Lambers T.T. et al. Extracellular pH dynamically controls cell surface delivery of functional TRPV5 channels. // *Mol. Cell. Biol.* 2007. Vol. 27, № 4. P. 1486–1494.
117. Wood R., Tchack L., Taparia S. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 increases the expression of the CaT1 epithelial calcium channel in the Caco-2 human intestinal cell line // *BMC Physiol.* 2001. Vol. 1. P. 11.
118. Van Abel M. et al. Coordinated control of renal Ca^{2+} transport proteins by parathyroid hormone. // *Kidney Int.* 2005. Vol. 68, № 4. P. 1708–1721.
119. Bacskai B., Friedman P. Activation of latent Ca^{2+} channels in renal epithelial cells by parathyroid hormone // *Nature.* 1990. Vol. 347, № 6291. P. 388–391.
120. De Groot T. et al. Parathyroid hormone activates TRPV5 via PKA-dependent phosphorylation. // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009. Vol. 20, № 8. P. 1693–1704.
121. Cha S.-K.S., Wu T., Huang C.-L.C. Protein kinase C inhibits caveolae-mediated endocytosis of TRPV5. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2008. Vol. 294, № 5. P. F1212–F1221.
122. Chang Q. et al. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. // *Science.* 2005. Vol. 310, № 5747. P. 490–493.
123. Lu P. et al. The beta-glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6. // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008. Vol. 23, № 11. P. 3397–3402.
124. Cha S.-K. et al. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105, № 28. P. 9805–9810.

125. Song Y. et al. Calcium transporter 1 and epithelial calcium channel messenger ribonucleic acid are differentially regulated by 1,25 dihydroxyvitamin D3 in the intestine and kidney of mice. // *Endocrinology*. 2003. Vol. 144, № 9. P. 3885–3894.
126. Van Cromphaut S.J. et al. Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. Vol. 98, № 23. P. 13324–13329.
127. Brown A.J., Krits I., Armbrecht H.J. Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2005. Vol. 437, № 1. P. 51–58.
128. Cromphaut S.J.V.A.N. et al. Intestinal calcium transporter genes are upregulated by estrogens and the reproductive cycle through vitamin D receptor-independent mechanisms. // *J. Bone Miner. Res.* 2003. Vol. 18, № 10. P. 1725–1736.
129. Teerapornpuntakit J. et al. Endurance swimming stimulates transepithelial calcium transport and alters the expression of genes related to calcium absorption in the intestine of rats. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009. Vol. 296, № 4. P. E775–E786.
130. Sato T. et al. Immobilization decreases duodenal calcium absorption through a 1,25-dihydroxyvitamin D-dependent pathway. // *J. Bone Miner. Metab.* 2006. Vol. 24, № 4. P. 291–299.
131. Van Abel M. et al. Age-dependent alterations in Ca²⁺ homeostasis: role of TRPV5 and TRPV6. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006. Vol. 291, № 6. P. F1177–F1183.
132. Walters J.J.R.F. et al. Calcium channel TRPV6 expression in human duodenum: different relationships to the vitamin D system and aging in men and women. // *J. Bone Miner. Res.* 2006. Vol. 21, № 11. P. 1770–1777.
133. Müller D. et al. Molecular Cloning, Tissue Distribution, and Chromosomal Mapping of the Human Epithelial Ca²⁺ Channel (ECAC1) // *Genomics*. 2000. Vol. 67, № 1. P. 48–53.
134. Bernucci L. et al. Diverse calcium channel types are present in the human placental syncytiotrophoblast basal membrane. // *Placenta*. 2006. Vol. 27, № 11-12. P. 1082–1095.
135. Moreau R. et al. Expression of Calcium Channels along the Differentiation of Cultured Trophoblast Cells from Human Term Placenta // *Biol. Reprod.* 2002. Vol. 67, № 5. P. 1473–1479.
136. Moreau R. et al. Calcium uptake and calcium transporter expression by trophoblast cells from human term placenta. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. Vol. 1564, № 2. P. 325–332.

137. Wissenbach U. et al. Expression of CaT-like, a Novel Calcium-selective Channel, Correlates with the Malignancy of Prostate Cancer. // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 22. P. 19461–19468.
138. Suzuki Y. et al. Calcium Channel TRPV6 Is Involved in Murine Maternal–Fetal Calcium Transport // J. Bone Miner. Res. 2008. Vol. 23, № 8. P. 1249–1256.
139. Choi Y. et al. Dynamic expression of calcium-regulatory molecules, TRPV6 and S100G, in the uterine endometrium during pregnancy in pigs. // Biol. Reprod. 2009. Vol. 81, № 6. P. 1122–1130.
140. Lee B.-M. et al. Uterine and placental expression of TRPV6 gene is regulated via progesterone receptor- or estrogen receptor-mediated pathways during pregnancy in rodents. // Reprod. Biol. Endocrinol. 2009. Vol. 7. P. 49.
141. Semenova S.B. et al. Endogenous expression of TRPV5 and TRPV6 calcium channels in human leukemia K562 cells. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2009. Vol. 296, № 5. P. C1098–C1104.
142. OWEN T.A. et al. Pleiotropic Effects of Vitamin D on Osteoblast Gene Expression Are Related to the Proliferative and Differentiated State of the Bone Cell Phenotype: Dependency upon Basal Levels of Gene Expression, Duration of Exposure, and Bone Matrix Competency in Normals // Endocrinology. The Endocrine Society, 1991. Vol. 128, № 3. P. 1496–1504.
143. Lehen'kyi V. et al. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. // Oncogene. 2007. Vol. 26, № 52. P. 7380–7385.
144. Zhuang L. et al. Calcium-Selective Ion Channel, CaT1, Is Apically Localized in Gastrointestinal Tract Epithelia and Is Aberrantly Expressed in Human Malignancies // Lab. Investig. 2002. Vol. 82, № 12. P. 1755–1764.
145. Peng J.B. et al. CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. Vol. 282, № 3. P. 729–734.
146. Fixemer T. et al. Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. // Oncogene. 2003. Vol. 22, № 49. P. 7858–7861.
147. Bolanz K. a, Hediger M. a, Landowski C.P. The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. // Mol. Cancer Ther. 2008. Vol. 7, № 2. P. 271–279.
148. Bolanz K. a et al. Tamoxifen inhibits TRPV6 activity via estrogen receptor-independent pathways in TRPV6-expressing MCF-7 breast cancer cells. // Mol. Cancer Res. 2009. Vol. 7, № 12. P. 2000–2010.
149. Peleg S. et al. Suppression of aberrant transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6 expression in hyperproliferative colonic crypts by dietary

- calcium. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2010. Vol. 299, № 3. P. G593–G601.
150. Chow J. et al. TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells--Mechanisms behind a possible new “hot” cancer treatment. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. Vol. 1773, № 4. P. 565–576.
 151. Bootman M.D. et al. Calcium signalling--an overview. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2001. Vol. 12, № 1. P. 3–10.
 152. Karashima Y. et al. Agonist-Induced Changes in Ca²⁺ Permeation through the Nociceptor Cation Channel TRPA1 // *Biophys. J. Elsevier*, 2010. Vol. 98, № 5. P. 773–783.
 153. Nilius, Guy B.D. Ion Channels and Their Functional Role in Vascular Endothelium // *Physiol. Rev.* 2001. Vol. 81, № 4. P. 1415–1459.
 154. Voets T. et al. Molecular Determinants of Permeation through the Cation Channel TRPV4 // *J. Biol. Chem.* . 2002. Vol. 277 , № 37 . P. 33704–33710.
 155. Nilius B. et al. The Selectivity Filter of the Cation Channel TRPM4 // *J. Biol. Chem.* . 2005. Vol. 280 , № 24 . P. 22899–22906.
 156. Egan T.M., Khakh B.S. Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses // *J. Neurosci.* . 2004. Vol. 24 , № 13 . P. 3413–3420.
 157. Chung M.-K., Guler A.D., Caterina M.J. TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation // *Nat Neurosci.* Nature Publishing Group, 2008. Vol. 11, № 5. P. 555–564.
 158. Yeh B.-I. et al. Conformational changes of pore helix coupled to gating of TRPV5 by protons. // *EMBO J.* 2005. Vol. 24, № 18. P. 3224–3234.
 159. Zeilhofer H.U., Kress M., Swandulla D. Fractional Ca²⁺ currents through capsaicin- and proton-activated ion channels in rat dorsal root ganglion neurones. // *J. Physiol.* . 1997. Vol. 503 , № Pt 1 . P. 67–78.
 160. Boisseau S. et al. Heterogeneous distribution of TRPC proteins in the embryonic cortex // *Histochem. Cell Biol.* Springer-Verlag, 2009. Vol. 131, № 3. P. 355–363.
 161. Tsvilovskyy V. V et al. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in Mice Impairs Smooth Muscle Contraction and Intestinal Motility In Vivo // *Gastroenterology.* Elsevier, 2009. Vol. 137, № 4. P. 1415–1424.
 162. Nilius B., Vennekens R. From cardiac cation channels to the molecular dissection of the transient receptor potential channel TRPM4 // *Pflügers Arch.* Springer-Verlag, 2006. Vol. 453, № 3. P. 313–321.

163. Nilius, Prenen F., Janssens J., Owsianik A., Vennekens G., Voets R., Thomas B.M. The Ca^{2+} -activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate // *EMBO J.* 2006. Vol. 25, № 3. P. 467–478.
164. Bolte S., Cordelières F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy // *J. Microsc.* 2006. Vol. 224, № 3. P. 213–232.
165. Kerschbaum H.H. Single-Channel Recording of a Store-Operated Ca^{2+} Channel in Jurkat T Lymphocytes // *Science* (80-.). 1999. Vol. 283, № 5403. P. 836–839.
166. Hoenderop J.G. et al. Function and expression of the epithelial Ca^{2+} channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. // *J. Physiol.* 2001. Vol. 537, № Pt 3. P. 747–761.
167. Nilius B. et al. Modulation of the epithelial calcium channel, ECaC, by intracellular Ca^{2+} . // *Cell Calcium.* 2001. Vol. 29, № 6. P. 417–428.
168. Yeh B.-I. et al. Mechanism and molecular determinant for regulation of rabbit transient receptor potential type 5 (TRPV5) channel by extracellular pH. // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 51. P. 51044–51052.
169. Van de Graaf S.F.J. et al. TRPV5 is internalized via clathrin-dependent endocytosis to enter a Ca^{2+} -controlled recycling pathway. // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283, № 7. P. 4077–4086.
170. Maxfield F.R., McGraw T.E. Endocytic recycling // *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nature Publishing Group, 2004. Vol. 5, № 2. P. 121–132.
171. Hoenderop J.G. et al. Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001. Vol. 12, № 7. P. 1342–1349.
172. Braun F.-J. et al. Stable Activation of Single Ca^{2+} Release-activated Ca^{2+} Channels in Divalent Cation-free Solutions // *J. Biol. Chem.* . 2001. Vol. 276 , № 2 . P. 1063–1070.
173. Prakriya M., Lewis R.S. Separation and characterization of currents through store-operated CRAC channels and Mg^{2+} -inhibited cation (MIC) channels. // *J. Gen. Physiol.* 2002. Vol. 119, № 5. P. 487–507.
174. Matsuda H. Magnesium Gating of the Inwardly Rectifying K^{+} Channel // *Annu. Rev. Physiol.* Annual Reviews, 1991. Vol. 53, № 1. P. 289–298.
175. Vassilieva I.O. et al. Expression of transient receptor potential vanilloid channels TRPV5 and TRPV6 in human blood lymphocytes and Jurkat leukemia T cells. // *J. Membr. Biol.* 2013. Vol. 246, № 2. P. 131–140.
176. Schwarz E.C. et al. TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. // *Cell Calcium.* 2006. Vol. 39, № 2. P. 163–173.

177. Glunde K. et al. Extracellular Acidification Alters Lysosomal Trafficking in Human Breast Cancer Cells // *Neoplasia*. Neoplasia Press Inc., 2003. Vol. 5, № 6. P. 533–545.
178. Keyes S.R., Rudnick G. Coupling of transmembrane proton gradients to platelet serotonin transport. // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257, № 3. P. 1172–1176.
179. Gees M., Colasoul B., Nilius B. The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling // *Cold Spring Harb.* 2010.
180. Graaf S. van de. Direct interaction with Rab11a targets the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 to the plasma membrane // ... *Cell. Biol.* 2006. Vol. 26, № 1. P. 303–312.
181. Grinstein S., Swallow C.J., Rotstein O.D. Regulation of cytoplasmic pH in phagocytic cell function and dysfunction // *Clin. Biochem.* 1991. Vol. 24, № 3. P. 241–247.
182. Kraus M., Wolf B. Implications of acidic tumor microenvironment for neoplastic growth and cancer treatment: a computer analysis. // *Tumour Biol.* 1996. Vol. 17, № 3. P. 133–154.
183. Bidani A. et al. Evidence for pH sensitivity of tumor necrosis factor-?? release by alveolar macrophages // *Lung.* 1998. Vol. 176, № 2. P. 111–121.
184. Vaupel P.W., Frinak S., Bicher H.I. Heterogeneous Oxygen Partial Pressure and pH Distribution in C3H Mouse Mammary Adenocarcinoma // *Cancer Res.* . 1981. Vol. 41 , № 5 . P. 2008–2013.
185. Ratner S. Lymphocytes Stimulated With Recombinant Human Interleukin-2: Relationship Between Motility Into Protein Matrix and In Vivo Localization in Normal and Neoplastic Tissues of Mice // *J. Natl. Cancer Inst.* . 1990. Vol. 82 , № 7 . P. 612–616.
186. Severin T. et al. pH-Dependent LAK Cell Cytotoxicity // *Tumor Biol.* 1994. Vol. 15, № 5. P. 304–310.
187. Loeffler D.A., Heppner G.H., Juneau P.L. Natural killer-cell activity under conditions reflective of tumor micro-environment // *Int. J. Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 1991. Vol. 48, № 6. P. 895–899.