

О.І. Болдирєв, Г.В. Соткіс, Є.М. Кулієва, І.А. Владимірова,
І.Б. Філіппов, Р. Скрима, Н. Преварська, Я.М. Шуба

Експресія холодового рецептора TRPM8 у гладеньких м'язах сім'явивідних протоків щура

Вперше за допомогою методів полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією та імунофлюоресцентного забарвлення в комбінації з конфокальною мікроскопією продемонстровано експресію мРНК та білка холод-ментолчутливого катіонного каналу – TRPM8 у гладеньком'язових клітинах (ГМК) епідидимальної та простатної ділянок сім'явивідних протоків щура. Показано кореляцію експресії мРНК TRPM8-каналу та мРНК андрогенного рецептора. При орхіектомії тварин спостерігається зростання експресії мРНК як TRPM8, так і андрогенного рецептора, що може відображати специфічні для сім'явивідних протоків компенсаторні ефекти, пов'язані зі зниженням вмісту циркулюючих андрогенів. TRPM8-білок ГМК в обох ділянках сім'явивідних протоків переважно локалізується поза межами плазматичної мембрани, однак у ГМК простатної ділянки спостерігається вища щільність його розподілу саме у ендоплазматичному ретикулумі та плазматичній мембрані, де він може утворювати функціональний, холод-ментолчутливий катіонний канал, здатний модулювати скоротливу активність ГМК, викликану деполяризацією або дією агоністів.
Ключові слова: гладенькі м'язи, сім'явивідні протоки, холодовий рецептор TRPM8, плазматична мембрана, ендоплазматичний ретикулум, полімеразна ланцюгова реакція, конфокальна мікроскопія.

ВСТУП

Вхід зовнішнього та вивільнення депонованого Ca^{2+} в клітинах відіграє ключову роль у перебігу таких важливих фізіологічних і патофізіологічних процесів, як секреція гормонів і нейромедіаторів, скорочення м'язів, експресія генів, проліферація, апоптоз тощо. Неселективні катіонні канали родини TRP (від англ. transient receptor potential) утворюють один із можливих шляхів надходження зовнішньоклітинних іонів кальцію, а в деяких випадках і їх вивільнення із внутрішньоклітинних депо в багатьох типах клітин [1, 2]. Всі представники TRP-родини за своєю структурою та мембранною топологією нагадують потенціалзалежні калієві канали, хоч і виявляють помітні відмінності білків у їх амінокислотних послідовностях. Це дає під-

стави класифікувати їх на сім підродин: TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP, TRPML та TRPN [15]. Характерною ознакою TRP-каналів є те, що вони відзначаються надзвичайною різноманітністю механізмів керування, навіть у межах кожної з підродин. Серед чинників, які здатні їх активувати, є хімічні, термічні та механічні, а також цитоплазматичні та ліпідні вторинні посередники, потенціал, стан наповнення внутрішньоклітинних кальцієвих депо, набухання клітин, мікрокривизна плазматичної мембрани, фізико-хімічний стан середовища тощо.

Серед TRP-каналів виділяють групу, представники якої реагують на зміни температури як у бік її підвищення, так і пониження відносно температури тіла. Такі канали називають термо-TRP. За своєю структурою вони відносяться до різних

© О.І. Болдирєв, Г.В. Соткіс, Є.М. Кулієва, І.А. Владимірова, І.Б. Філіппов, Р. Скрима, Н. Преварська, Я.М. Шуба

підродин, а об'єднує їх тільки термочутливість. При цьому термо-TRP, які активуються у відповідь на різні модальності гарячого (від теплого до пекучого) належать до ванілоїдної TRPV-підродини, на помірне охолодження – до меластатинової TRPM-підродини, а на сильний холод – до анкиринової TRPA-підродини [3]. Одним з найбільш цікавих представників цієї групи є холодовий рецептор TRPM8 [4, 5], який відповідає на помірні зниження температури в діапазоні, що не викликає больових відчуттів (тобто до 8°C). TRPM8 також активується хімічними сполуками, що відіграють роль хімічних аналогів холодкових подразнень (ментол, іцилін та їх похідні). Цей рецептор експресується у плазматичній мембрані сенсорних нейронів та функціонує в ній як катіонний канал, що при своїй активації пропускає вхідний натрій-кальцієвий струм. TRPM8 бере участь у перетворенні холодового стимулу в електрохімічний, котрий здатний до розповсюдження в інтегративні центри ЦНС [6, 7]. Цікаво, що крім сенсорних нейронів TRPM8 також наявний у сечостатевої системі осіб чоловічої статі, зокрема в простаті – органі, в якому не відбуваються суттєві коливання температури [8–11]. Більше того, рівень експресії TRPM8 значно підвищується при раку простати. Помітна експресія TRPM8 також спостерігається у розповсюджених пухлинах людини, включаючи рак молочної залози, товстої кишки, легенів і шкіри, в той час як у відповідних тканинах вона за фізіологічних умов практично відсутня [8, 12]. Нині стало очевидно, що експресія TRPM8 є більш широкою, ніж спочатку передбачалося. Зокрема її було виявлено в деяких типах гладеньких м'язів [13, 14] та епітеліальних клітин [15, 16]. Це говорить про те, що крім детекції температури TRPM8, імовірно, може виконувати у тканині й інші важливі функції як за фізіологічних умов, так і при канцерогенезі [5].

Більшість даних стосовно простатно-специфічного TRPM8 були отримані на епітеліальних клітинах лінії LNCaP раку простати людини та на первинних клітинах, одержаних із зразків тканини раку та доброякісної гіперплазії простати людини [9–11, 17]. На клітинах лінії LNCaP, зокрема, було показано, що TRPM8 може і не локалізуватись у плазматичній мембрані, як це відбувається у сенсорних нейронах, а знаходитися виключно у мембрані ендоплазматичного ретикулула, функціонуючи там як канал вивільнення кальцію [17]. Вважається, що переважна плазмолемальна або ендоплазматична локалізація TRPM8 зумовлена існуванням двох сплайс-варіантів цього каналу – повнорозмірного та вкороченого. Останній тип рецептора не тільки сам експресується в мембрані ендоплазматичного ретикулула, а й сприяє затримці в ньому розвитку повномірної форми [11, 17].

Незважаючи на значний прогрес у дослідженні як нейронального, так і простатоспецифічного TRPM8, його фізіологічна роль у тканинах, в яких не відбувається зміни температури, все ще залишається недослідженою. Практично невідомо, чи цей кальційпровідний канал експресується в інших органах чоловічої статеві системи, де б його фізіологічна роль була більш очевидною. Оскільки гладеньком'язові сім'явивідні протоки під час емісії (стадія еякуляції, яка передуює змішуванню сперматозоїдів із секретами допоміжних статевих залоз) транспортують сперматозоїди з епідидимуса, де вони знаходяться при дещо нижчій температурі, далі в еякуляторний тракт, то вірогідно, що TRPM8 може бути наявний у гладеньком'язових клітинах (ГМК) цих протоків, модулюючи їх скоротливу активність. Більше того, не виключена диференційована експресія та функціональна диференціація TRPM8 у різних ділянках сім'явивідних протоків. Температурні коливання у близькій до епідидимуса

епідидимальній ділянці та віддаленій від нього простатній можуть відрізнятись за діапазоном.

У цій роботі ми дослідили експресію TRPM8 на рівні мРНК за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції та локалізацію TRPM8-білка за допомогою імуноцитохімії в ГМК епідидимальної та простатної ділянок сім'явивідної протоки щура, а також провели кореляцію рівнів експресії мРНК TRPM8 та андрогенного рецептора контрольних щурів та щурів після орхіектомії.

МЕТОДИКА

Полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією. Епідидимальну та простатну ділянки сім'явивідної протоки статевозрілих самців щурів лінії Вістар масою 300–350 г розрізали вздовж осі та очищали від епітеліального шару. Отримані препарати негайно гомогенізували у лізуючому розчині (Trizol RNA-Prep, “Isogene”, Росія), а гомогенат використовували для виділення сумарної РНК. Зворотну транскрипцію здійснювали за допомогою набору RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва), використовуючи 0,3–0,6 мкг сумарної РНК і праймер оліго-dT. З отриманої одноланцюгової ДНК ампліфікували за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі фрагменти генів, що кодуєть канал TRPM8, андрогенний рецептор і гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназу (ГАФДГ, внутрішній контроль). Реакційна суміш для аналізу TRPM8 складалася з двократною полімеразноланцюговою суміші TaqMan PCR MasterMix (“Applied Biosystems”, США), 5 мкмоль/л розчину з кожного прямого та зворотного праймерів та флюоресцентного зонда, 2 мкл кДНК. Реакційна суміш для аналізу гена андрогенного рецептора складалася з двократною полімеразноланцюговою суміші SYBR-Green

PCR MasterMix (“Applied Biosystems”, США), 5 мкмоль/л розчину суміші прямого та зворотного праймерів, 2 мкл кДНК. Полімеразну ланцюгову реакцію здійснювали у термоциклері 7500 Fast Real-Time PCR System (“Applied Biosystems”, США) за програмою 94° С (5 с), 60° С (30 с) для TRPM8 та 94° С (10 с), 62° С (30 с), 72° С (30 с) для андрогенного рецептора протягом 45–50 циклів. Праймери, специфічні до кДНК TRPM8 щура (номер доступу Генбанку NM_134371), були розроблені, синтезовані та валідовані на замовлення фірмою “Applied Biosystems” і мали такі послідовності: TRPM8f – 5'-GGGTGGGAGCAACTGTCT-3', TRPM8r – 5'-CCAGGCTGAGCAATGAAATGC-3', TRPM8-зонд 5'-CCACCGCCAGCTCC-3'. Праймери, специфічні до кДНК андрогенного рецептора щура (номер доступу Генбанку NM_012502.1), були розроблені авторами роботи і мали такі послідовності: ARf 5'-TGAAAGCACTGCTACTCTTCAGC-3', ARr 5'-AGCTTGGTGAGCTGGTAGAAG-3'. Для визначення кількості ГАФДГ використовували праймери з набору TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents (VIC™ Probe), (“Applied biosystems”, США).

Візуалізацію ампліконів після горизонтального електрофорезу у 3%-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію здійснювали за допомогою транслюмінатора ViTran (“Біоком”, Росія). Кількісну оцінку експресії та обробку результатів проводили з використанням програмного забезпечення 7500 Fast System SDS Software 1.3.1 (“Applied biosystems”, США).

Виділення ізольованих ГМК сім'явивідних протоків. Позбавлені слизової оболонки епідидимальну та простатну частини сім'явивідної протоки щура поміщували у холодний (4° С) розчин (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 5, глюкози – 10, HEPES – 10, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 1 (pH 7,4), подрібнювали ножицями на невеликі фрагменти (близько 1 мм³) та переносили у безкальцієвій

розчин (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 5, глюкози – 5, HEPES 10 (pH 7,4). Після цього кожну тканину окремо піддавали ферментативній обробці у безкальцієвому розчині 0,2%-ї колагенази (Type IV, «Sigma», США) протягом 1 год при 37° С. Після ферментативної обробки тканини декілька разів промивали у безкальцієвому розчині для вилучення ферменту та подрібнювали піпеткою Пастера (діаметр 1–2 мм) для одержання ізольованих клітин. Отримані суспензії клітин переносили в чашки Петрі для подальших експериментів.

Імунозабарвлення та конфокальна мікроскопія ГМК сім'явивідної протоки. В експериментах з імунозабарвлення використовували ГМК, ізольовані з епідидимальної та простатної частин сім'явивідної протоки. Клітини висаджували на покривні скельця та піддавали фіксації протягом 30 хв в 4%-му розчині формальдегіду, отримуючи слайди. Останні промивали тричі по 10 хв у розчині 0,1 М фосфатного буфера та витримували 30 хв в 1%-му блокуючому фосфатному буфері з додаванням 1%-го сироваткового альбуміну великої рогатої худоби для інгібування неспецифічного зв'язування антитіл. Для всіх препаратів використовували потрібне забарвлення: TRPM8-каналу, плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулума. Послідовність обробки відповідними маркерами була такою: спочатку слайди інкубували 15 хв при кімнатній температурі з маркером плазматичної мембрани – субодиницею В холерного токсину, міченою флуоресцеїн-ізотіоціанатом («Sigma-Aldrich», США), розчиненою в концентрації 1:2000 в 0,1 М фосфатного буфера, після чого їх тричі відмивали по 10 хв в чистому 0,1 М фосфатному буфері.

Прикладання наступних антитіл проводили після пермебілізації клітин упродовж 2 год у розчині 0,1 М фосфатного буфера з додаванням 0,3 % Triton X-100. Всі антитіла, які прикладалися до зразків, були

розчинені в 0,1 М PBS з додаванням 2%-го NaCl та 1%-го бичачого сироваткового альбуміну. Між етапами прикладання антитіл слайди відмивали три рази. Спочатку всі зразки обробляли протягом 24 год при 4°С первинним поліклональним кролячим антитілом до TRPM8-каналу («GeneTex Inc.», США) в розведенні 1:200, далі – їх двогодинна інкубація при кімнатній температурі за наявності вторинного антитіла – козячого антикролячого імуноглобуліну G, міченого флуоресцентним барвником Alexa Fluor 647 Goat («Invitrogen Corp.», США) в розведенні 1:500. Аналогічний протокол використовували також для обробки зразків первинним поліклональним кролячим антитілом до резидентного білка калнексину ендоплазматичного ретикулума («Abscam», Великобританія) в розведенні 1:20 та вторинним – козячим антимишачим міченим імуноглобуліном G, міченим Alexa Fluor 350 Goat («Invitrogen Corp.», США) в розведенні 1:500.

Імунозабарвлені слайди висушували при кімнатній температурі та покривали розчином проти вигорання. Конфокальні зображення отримували на скануючому лазерному конфокальному мікроскопі OLYMPUS FV1000 FLUOVIEW («Olympus Corp.», США), обладнаному ультрафіолетовими аргоновими 351/356, 457/488/515 та гелій/неоновими 543/633 лазерами. Слайди досліджували при 40-кратному збільшенні (водоімерсійний об'єктив UPLAPO 40x/0.85). Спектри збудження барвників Alexa Fluor 350, флуоресцеїн-ізотіоціанату та Alexa Fluor 647 мали довжину хвиль 346 нм, 495 нм та 650 нм відповідно, а спектри емісії – 442 нм, 521 нм та 666 нм відповідно.

РЕЗУЛЬТАТИ

Експресія мРНК TRPM8. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною траскрипцією на препаратах РНК, виділених із позбавлених слизової оболонки різних

частин сім'явивідної протоки щура, показала, що специфічна мРНК TRPM8 експресується приблизно на однаковому рівні як у простатній, так і у епідидимальній ділянках (рис. 1). Праймери підбиралися таким чином, щоб ампліфікувати інваріантну послідовність TRPM8, яка відповідає ділянці пори, наявну в усіх його можливих сплайс-варіантах, а тому результат полімеразної ланцюгової реакції відображає експресію всіх продуктів гена.

Для епітеліальних клітин простати було показано, що експресія TRPM8 корелює із експресією андрогенного рецептора [9, 11]. Щоб перевірити, чи таке саме співвідношення спостерігається для сім'явивідної протоки, яка, як і простата, являє собою андрогензалежну тканину, порівнювали експресію мРНК TRPM8 та андрогенного

рецептора в контрольних щурів і впродовж 30 діб після орхієктомії. Неочікувано, орхієктомія призводила до значного (в 5–7 разів) підвищення експресії мРНК андрогенного рецептора в обох частинах сім'явивідних протоків порівняно з контролем (див. рис. 1,б). При цьому експресія TRPM8 також зростала (див. рис. 1,а), приблизно вдвічі, вказуючи на пряму кореляцію між рівнями мРНК TRPM8 та андрогенного рецептора. Несподіване підвищення експресії останнього після орхієктомії може бути наслідком компенсаторних ефектів, завдяки яким зниження вмісту андрогенів компенсується підвищенням експресії безпосередніх мішеней їх дії.

Експресія білка TRPM8. Для того, щоб перевірити, чи експресія мРНК TRPM8 відповідає експресії TRPM8-білка, а також

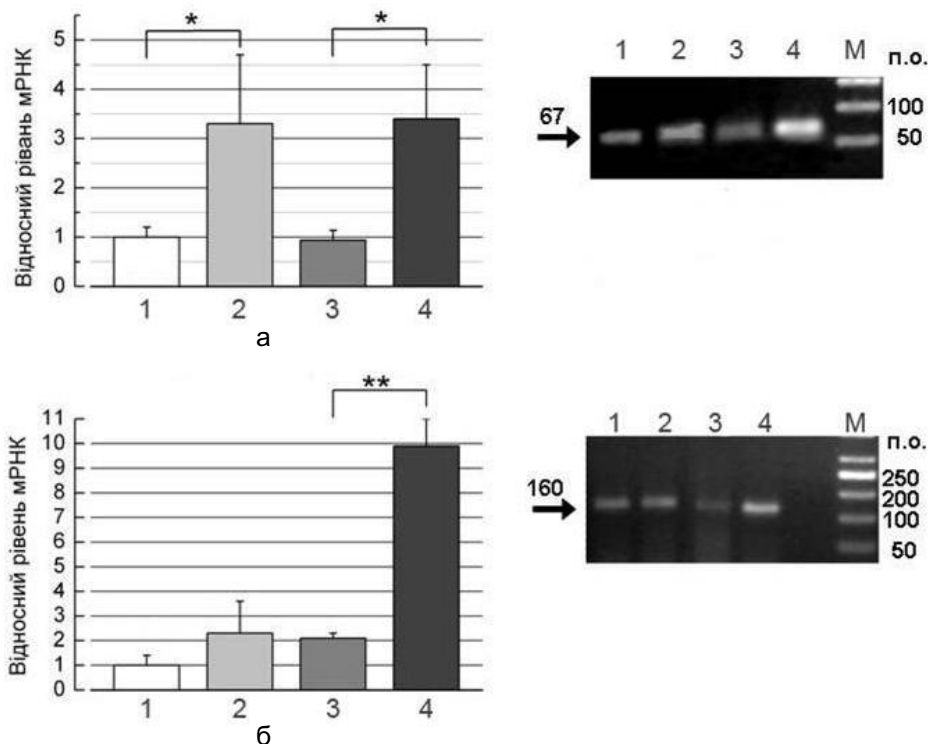


Рис. 1. Експресія мРНК холододового рецептора TRPM8 та андрогенного рецептора в гладеньких м'язах сім'явивідних протоків щура. Результати кількісних полімеразних ланцюгових реакцій (ПЛР), проведених на 5-ти гладеньком'язових препаратах простатної (1, 2) та епідидимальної (3, 4) ділянка сім'явивідних протоків контрольних щурів (1, 3) і щурів після орхієктомії з визначення експресії TRPM8 (а) та андрогенового рецептора (б). * $P < 0,05$, $P < 0,01$. Праворуч наведено зразки оригінальних гель-електрофорезів; стрілки вказують на розмір відповідних продуктів ПЛР у парах основ (п.о.); М – маркер молекулярної маси

визначити субклітинну локалізацію цього білка в ГМК сім'явивідної протоки, здійснювали потрійне забарвлення клітин флюоресцентно міченими антитілами: антитілом до TRPM8, антитілом до резидентного білка калнексину, який є маркером ендоплазматичного ретикулума [18] та нетоксичною В-субодиницею холерного токсину, яка за допомогою зв'язування із поверхневими гангліозидами мітить плазматичну мембрану [19]. При цьому анти-TRPM8 був кон'югований із барвником, що випромінює червоне світло ($\lambda = 647$ нм), антикалнексин – синє світло ($\lambda = 350$ нм), а В-субодиниця холерного токсину – зелене ($\lambda = 521$ нм). Візуалізацію флюоресцентних зображень проводили за допомогою скануючого лазерного конфокального мікроскопа.

Зразки отриманих конфокальних зображень ГМК простатної та епідидимальної ділянки сім'явивідних протоків щура наведені на рис. 2, а, в. Зняття конфокальних Z-перерізів показало, що в обох типах ГМК TRPM8-білок дифузно розподілений по всьому їх об'єму. Суперпозицію зображень Z-перерізів, отриманих у червоному–синьому, червоному–зеленому та синьому–зеленому світлі здійснювали для того, щоб оцінити наявність TRPM8 у мембрані ендоплазматичного ретикулума та плазматичній мембрані. Важливо також, наскільки місця локалізації ендоплазматичного ретикулума перекриваються з плазматичною мембраною (така ситуація можлива, коли відстань зближення ендоплазматичного ретикулума та плазматичної мембрани менша за роздільну здатність мікроскопа). Нами відмічено переважну наявність фіолетового кольору та практично повну відсутність жовтого. Такий розподіл кольорів накладених зображень був характерним для ГМК як простатної, так і епідидимальної ділянок. Оскільки фіолетовий колір виходить при змішуванні червоного та синього, то ці результати свідчать про переважну локалізацію TRPM8 білка в

мембрані ендоплазматичного ретикулума обох типів клітин. Незначна наявність жовтого кольору, який є результатом змішування червоного та зеленого, на накладених зображеннях ГМК вказує на те, що в цих клітинах TRPM8-білок частково локалізується також і в плазматичній мембрані.

Слід відмітити також той факт, що загальна площа забарвлення накладених зображень ГМК епідидимальної ділянки як фіолетовим (збіг червоного та синього), так і жовтим (збіг червоного та зеленого) кольором, була помітно нижчою порівняно з ГМК простатної ділянки (див. рис. 2). Це може свідчити про те, що в ГМК епідидимальної ділянки значна частина TRPM8-білка знаходиться поза межами як ендоплазматичного ретикулума, так і плазматичної мембрани. Можливо, білок локалізується в цитоплазмі, де він не має функціонального значення.

Зелена флюоресценція В-субодиниці холерного токсину, яка використовувалася як маркер плазматичної мембрани, в ГМК сім'явивідних протоків часто зосереджувалася на площині зображення клітини, а не тільки по його периметру. Це може бути наслідком зморщування клітин при їх фіксації, а також наявністю мембранних інвагінацій, вип'ячувань та перекручувань. Щоб підтвердити адекватність мічення плазматичної мембрани, ендоплазматичного ретикулума та TRPM8 використаними маркерами, було проведено контрольні експерименти з клітинами лінії НЕК-293, які, з одного боку, мають більш просту морфологію, а з іншого – не експресують TRPM8 [11]. Хоча клітини лінії НЕК-293 походять з людської тканини, антитіла до TRPM8 і калнексину здатні реагувати з відповідними білками щура та людини. Зображення, отримані на клітинах лінії НЕК-293 (рис. 3), показали, що В-субодиниця холерного токсину, як і очікувалося, переважно мітить їх по периметру, а синій і

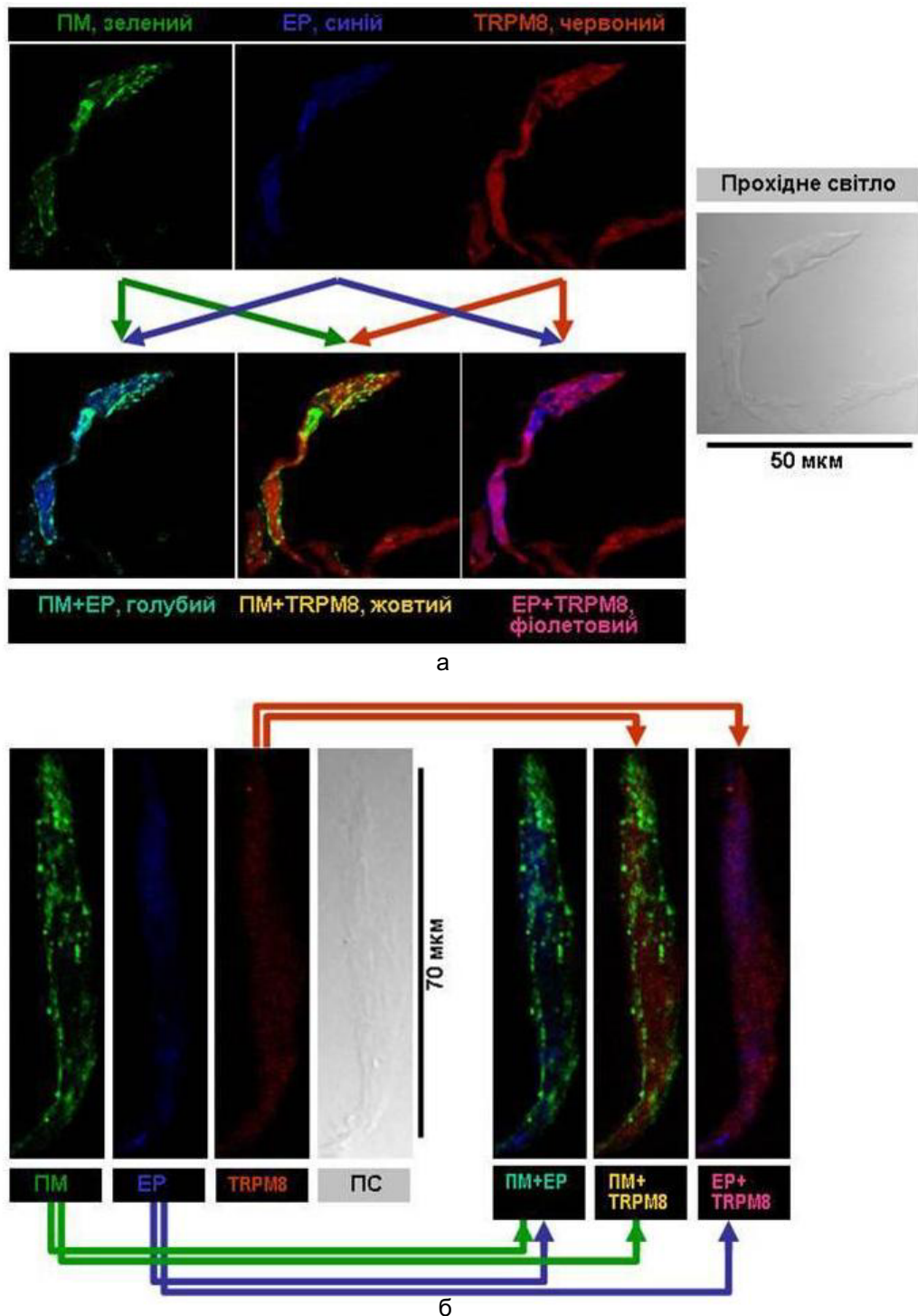


Рис. 2. Субклітинна локалізація TRPM8-білка в гладеньком'язових клітинах сім'явидних протоків щура. Приклади конфокальних зображень X-Y перерізів ГМК простатної (а) та епідидимальної ділянок, одержані в зеленому, синьому та червоному світлі, що відображують розподіл плазматичної мембрани (ПМ), мембрани ендоплазматичного ретикулума (ЕР) та TRPM8 відповідно, а також накладені зображення (показані кольоровими стрілками), що відображують колокалізацію цих структур; наведено також зображення клітин у звичайному прохідному світлі (ПС)

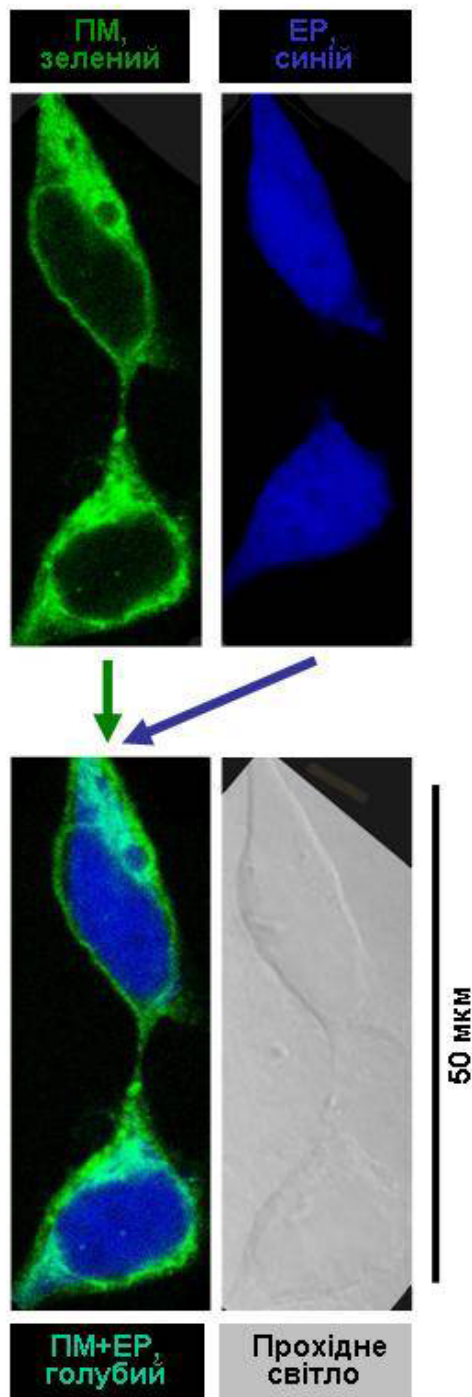


Рис. 3. Контрольний експеримент з мічення плазматичної мембрани (ПМ) і мембрани ендоплазматичного ретикулу (ЕР) у клітинах HEK-293. Приведений приклад конфокальних зображень Х-У перерізів HEK-293 клітини, одержаних у зеленому та синьому світлі, що відображують розподіл плазматичної мембрани та мембрани ЕР, відповідно, а також накладені зображення (показані кольоровими стрілками), що відображують колокалізацію цих структур; TRPM8-білок у клітинах HEK-293 виявлений не був; приведені також зображення клітини у звичайному прохідному світлі

зелений кольори практично не збігаються в периферичних ділянках, тобто ендоплазматичний ретикулум і плазматична мембрана є просторово розділеними. Крім того, мічення за допомогою анти-TRPM8 не виявило наявності TRPM8 в клітинах лінії НЕК-293, що вказує на специфічність використаних анти-TRPM8-антитіл.

ОБГОВОРЕННЯ

Наші результати вперше демонструють експресію TRPM8 на рівні мРНК і білка у ГМК сім'явивідних протоків щура. Як показує імунофлюоресцентне забарвлення, білок TRPM8 переважно локалізується у ендоплазматичному ретикулумі, а не в плазматичній мембрані, як це спостерігається у сенсорних нейронах. Якщо при цьому він може функціонувати як катіонний, кальцій-провідний канал ендоплазматичного ретикулума, то його активація у відповідь на зниження температури або спряжені із поверхневими рецепторами сигнальні шляхи може модулювати скоротливу активність ГМК.

Результати полімеразної ланцюгової реакції вказують на пряму залежність рівнів експресії андрогенного рецептора та TRPM8 у ГМК сім'явивідних протоків. Необхідність функціонального андрогенного рецептора для забезпечення експресії та функції TRPM8 було раніше встановлено для епітеліальних клітинах раку простати [9, 11]. Більше того, було показано, що у нативній простаті людини ген *trpm8*, найімовірніше, являє собою первинний андрогенкерований ген [11]. У наших дослідженнях несподіваним виявилось те, що експресія мРНК як андрогенного рецептора, так і TRPM8 у сім'явивідних протоків зростала при орхіектомії, оскільки для більшості тканин передбачається зворотна залежність, а саме, що експресія андрогенного рецептора безпосередньо регулюється вмістом самих циркулюючих андрогенів [20]. Не виключено, що це є специфічною

для сім'явивідних протоків компенсаційною відповіддю, спрямованою на утримання функціональності його андрогензалежних механізмів за умов різкого зменшення вмісту циркулюючих андрогенів. У літературі є свідчення про те, що в деяких випадках андрогенова депривація може призводити до збільшення експресії андрогенного рецептора і в інших тканинах. Зокрема, 1,6-разове підвищення експресії мРНК андрогенного рецептора на 3-тю та 5-ту добу після орхіектомії було відзначено у вентральній простаті щурів [21]. При цьому на 7-му добу експресія мРНК андрогенного рецептора відповідала нормі, однак поки невідомо, що відбувається у більш тривалому періоді після орхіектомії.

Той факт, що білок TRPM8 у ГМК сім'явивідних протоків переважно локалізується в ендоплазматичному ретикулумі, вказує на те, що він може брати участь як у вивільненні Ca^{2+} з депо у відповідь на холодний стимул, так і у температурозалежній модуляції ступеня наповнення кальцієвих депо, а через них у регуляції скорочення. Так, у епітеліальних клітинах раку простати людини активація TRPM8-каналі локалізованих в ендоплазматичному ретикулумі ментолом призводила не тільки до спустошення кальцієвих депо ендоплазматичного ретикулума, а і до активації входу кальцію через депокеровані кальцієві канали [11, 17].

Відомо, що епідидимальна і простатна частини сім'явивідних протоків характеризуються відмінними механізмами агоністіндукованої активації скорочення [22]. Наші результати показують, що, незважаючи на приблизно однаковий загальний рівень експресії специфічної мРНК TRPM8 у обох ділянках, у ГМК простатні ділянки спостерігається вища локалізація TRPM8-білка саме у ендоплазматичному ретикулумі та плазматичній мембрані, тобто структурах, де його наявність може мати більше функціональне значення. Тому не виключено, що активація TRPM8 буде

модулювати скорочення ГМК епідидимальної та простатної частин сім'явивідної протоки, викликане деполяризацією мембрани ГМК або безпосередньою дією на канал.

В цих дослідженнях використовувався конфокальний мікроскоп Olympus Fluoview™ FV1000, що був безкоштовно наданий Центром колективного користування «Прилади та обладнання клітинної біофізики та фізіології» при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця, НАНУ.

Висловлюємо вдячність к.б.н. Тетяні Андріївні Півневій та к.м.н. Олегу Михайловичу Цупікову за допомогу у налагодженні методів імунофлюорисценції та отримання конфокальних зображень, а також д.м.н. Віктору Євгеновичу Досенку за допомогу в налагодженні метода ПЛР у реальному часі.

**А.И. Болдырев, А.В. Соткис, Е.М. Кулиева,
И.А. Владимирова, И.Б. Филиппов,
Р. Скрыма, Н. Преvarская, Я.М. Шуба**

ЭКСПРЕССИЯ ХОЛОДОВОГО РЕЦЕПТОРА TRPM8 В ГЛАДКИХ МЫШЦАХ СЕМЯВЫВОДНЫХ ПРОТОКОВ КРЫСЫ

Впервые при помощи методов полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и иммунофлуоресцентного окрашивания в комбинации с конфокальной микроскопией продемонстрирована экспрессия мРНК и белка холод-ментолчувствительного катионного канала – TRPM8 в гладкомышечных клетках (ГМК) эпидидимального и простатного отделов семявыводящих протоков крысы. Показано коррекцию экспрессии мРНК TRPM8-канала и мРНК андрогенного рецептора. При орхиэктомии животного наблюдается возрастание экспрессии мРНК как TRPM8, так и андрогенного рецептора, что может отражать специфические для семявыводных протоков компенсаторные эффекты, связанные со снижением содержания циркулирующих андрогенов. TRPM8-белок ГМК обоих отделов семявыводящих протоков преимущественно локализован за пределами плазматической мембраны. Однако в ГМК простатного отдела наблюдается более высокая плотность распределения TRPM8-белка именно в эндоплазматическом ретикулуме и плазматической мембране, где он может образовывать функциональный канал, способный модулировать сократительную активность гладких мышц.

Ключевые слова: гладкие мышцы, семявыводящие протоки, холодовой рецептор TRPM8, плазматическая мембрана,

эндоплазматический ретикулум, полимеразная цепная реакция, конфокальная микроскопия.

**O.I. Boldyryev, H.V. Sotkis, E. M. Kulieva,
I. A. Vadimirova, I.B. Philippov, R Skryma,
N. Prevarskaya, Ia.M. Shuba**

EXPRESSION OF THE COLD RECEPTOR TRPM8 IN THE SMOOTH MUSCLES OF THE RAT

By means of real-time RT-PCR and immunofluorescent staining combined with confocal microscopy we show for the first time the expression of mRNA and protein of the cold/menthol-sensitive cationic channel, TRPM8, in the smooth muscle cells (SMC) from the epididimal and prostatic portions of the rat vas deferens. Expression of TRPM8 mRNA correlated with the expression of mRNA for androgen receptor (AR): orchidectomy of the animals resulted in the enhancement of the expression of both mRNAs, which likely reflects specific for the vas deferens compensatory response to the decreasing levels of circulating androgens. TRPM8 protein in the SMC from both parts of the vas deferens primarily localized outside the plasma membrane (PM), however, in the SMC from prostatic portion we observed higher TRPM8 protein targeting specifically to the endoplasmic reticulum and PM, where it can form functional cold/menthol-sensitive cationic channel capable of modulating contractile activity of the smooth muscle.

Key words: smooth muscle, vas deferens, cold receptor TRPM8, plasma membrane, endoplasmic reticulum, RT-PCR, confocal microscopy.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

International Center of Molecular Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Universite des Sciences et Technologies de Lille, France

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ramsey I.S., Delling M., Clapham D. E. An introduction to TRP channels // *Annu. Rev. Physiol.* – 2006. – **68**. – P. 619–647.
2. Venkatachalam K., Montell C. TRP channels // *Annu. Rev. Biochem.* – 2007. – **76**. – P. 387–417.
3. Dhaka A., Viswanath V., Patapoutian A. Trp ion channels and temperature sensation // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2006. – **29**. – P. 135–161.
4. Kraft R., Нандрогенного рецепторateneck C. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview // *Pflug. Arch.* – 2005. – **451**(1). P. 204–211.
5. Voets T., Owsianik G., Nilius B. TRPM8 // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2007. – (179). – P. 329–344.
6. McKemy D.D., Neuhausser W.M., Julius D. Identifi-

- cation of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation // *Nature*. – 2002. – **416**(6876). – P. 52–58.
7. Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C. et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol // *Cell*. – 2002. – **108**(5). – P. 705–715.
 8. Tsavaler L., Shapero M.H., Morkowski S., Laus R. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins // *Cancer Res*. – 2001. – **61**(9). – P. 3760–3769.
 9. Zhang L., Barritt G.J. Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells // *Ibid.* – 2004. – **4**(22). – P. 8365–8373.
 10. Zhang L., Barritt G.J. TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? // *Endocrinol. Relat. Cancer*. – 2006. – **13**(1). – P. 27–38.
 11. Bidaux G., Flourakis M., Thebault S. et al. Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function // *J. Clin. Invest.* – 2007. – **117**(6). – P. 1647–1657.
 12. Fonfria E., Murdock P.R., Cusdin F.S. et al. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family // *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* – 2006. – **26**(3). – P. 159–178.
 13. Mustafa S., Oriowo M. Cooling-induced contraction of the rat gastric fundus: mediation via transient receptor potential (TRP) cation channel TRPM8 receptor and Rho-kinase activation // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2005. – **32**(10). – P. 832–838.
 14. Yang X.R., Lin M.J., McIntosh L.S., Sham J.S. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle // *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2006. – **290**(6). – P. 1267–1276.
 15. Sabnis A.S., Shadid M., Yost G.S., Reilly C.A. Human lung epithelial cells express a functional cold-sensing TRPM8 variant // *Amer. J. Physiol.* – 2006. – **290**(6) – P. 1267–1276.
 16. Everaets W., Gevaert T., Nilius B., De Ridder D. On the origin of bladder sensing: Tr(i)ps in urology // *NeuroUrol. Urodyn.* – 2008. – **27**(4). – P. 264–273.
 17. Thebault S., Lemonnier L., Bidaux G. et al. Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatin family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**(47). – P. 39423–3935.
 18. Bergeron J.J., Brenner M.B., Thomas D.Y., Williams D.B. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum // *Trends Biochem. Sci.* – 1994. – **19**(3). P. 124–128.
 19. McCann J.A., Mertz J.A., Czworkowski J., Picking W.D. Conformational changes in cholera toxin B subunit-ganglioside GM1 complexes are elicited by environmental pH and evoke changes in membrane structure // *Biochemistry*. – 1997. – **36**(30). – P. 9169–9178.
 20. Goyal H.O., Bartol F.F., Wiley A.A., Khalil M.K., Williams C.S., Vig M.M. Regulation of androgen and estrogen receptors in male excurrent ducts of the goat: an immunohistochemical study // *Anat. Res.* – 1998. – **250**(2). – P. 164–171.
 21. Kumar V.L., Majumder P.K., Kumar V. Androgen deprivation causes up-regulation of androgen receptor transcript in the rat prostate // *Mol. Cell. Biochem.* – 1997. – **171**(1–2). – P. 133–138.
 22. Amobi N.I., Smith I.C. Different actions in the rat prostatic and epididymal vas deferens of cyclopiazonic acid or ryanodine on noradrenaline-induced contractions // *Gen. Pharmacol.* – 1999. – **32**(2). – P. 271–278.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
Міжнарод. Центр молекуляр. фізіології НАН України, Київ;
Лільськ. ун-т наук і технологій, Франція
E-mail: yshuba@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до
редакція 18.03.2009*