

Ю.І. Дребот, О. І. Болдирєв, В.Є. Досенко, П.Г. Костюк

Експресія генів, що кодують ванілоїдні рецептори 1-го та 2-го типу, в культурі нейронів гіпокампа

В работе представлены результаты определения экспрессии матричной РНК (мРНК) ваниллоидных рецепторов 1-го и 2-го типа (TRPV1 и TRPV2) в одиночных культивируемых гиппокампальных нейронах. С помощью метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) одиночных нейронов было показано, что TRPV1- и TRPV2-рецепторы экспрессируются как в нейронах, так и в глиальных клетках. С использованием технологии ПЦР в реальном времени было установлено, что уровень экспрессии данных генов в различных нейронах одинаков. Также показано, что количество мРНК TRPV1 в ГАМКергических нейронах значительно выше, чем мРНК TRPV2, тогда как в глутаматергических нейронах экспрессия этих генов не отличалась. Полученные результаты об экспрессии TRPV1 и TRPV2 позволяют предполагать, что ваниллоидные рецепторы играют важную функциональную роль в нейронах головного мозга.

ВСТУП

Значення ванілоїдних рецепторів TRPV (від англ. transient receptor potential vanilloid) у функціонуванні центральних структур головного мозку активно вивчається останніми роками. Раніше було показано, що ванілоїдні рецептори експресуються в закінченнях сенсорних нейронів та є первинними ноцицепторами, а згодом доведено, що вони експресуються і в таких структурах головного мозку, як гіпокамп, гіпоталамус, кора, мозочок, таламус, середній і задній мозок, чорна субстанція тощо [18]. При цьому питання про фізіологічне значення цих рецепторів у центральній нервовій системі залишається відкритим. Ендогенними активаторами ванілоїдних рецепторів вважаються так звані ендованілоїди (N-арахідоноіл-дофамін, N-олеоїл-дофамін, анандамід, 2-арахідоноїлгліцерол тощо), що також мають здатність впливати на канабіоїдні рецептори. Крім того, TRPV активуються низкою неспецифічних стимулів (підвищення температури, осмотичного

тиску, зниження рН), вплив яких залежить від типу ванілоїдних рецепторів (TRPV 1–6).

Серед екзогенних агоністів TRPV1 найбільш відомим є капсаїцин – алкалоїд з червоного перцю, який не впливає на інші типи ванілоїдних рецепторів. З використанням капсаїцину та деяких інших лігандів TRPV1 було показано, що активація цих рецепторів у зоні CA1 гіпокампа призводить до посилення депресії популяційних спайків, яка спостерігається при парній стимуляції [1, 5]. Одним із імовірних механізмів такого впливу є активація пресинаптичних TRPV1-рецепторів у синаптичних терміналях гальмівних ГАМКергічних нейронів [1, 7]. Проте залишається питання малодослідженим про наявність (або відсутність) функціональних TRPV1 у ГАМКергічних нейронах. Також мало відомо про експресію TRPV2-ванілоїдних рецепторів 2-го типу, в глутаматергічних та ГАМКергічних нейронах головного мозку.

Виходячи з наведених даних та беручи до уваги відсутність таких про співвідношення кількості TRPV1 та TRPV2 в

© Ю.І. Дребот, О. І. Болдирєв, В.Є. Досенко, П.Г. Костюк

ГАМКергічних і глутаматергічних нейронах, метою нашої роботи було оцінити експресію мРНК різних типів ванілоїдних рецепторів у поодиноких нейронах гіпокампа, маркованими за мРНК транспортерів ГАМК або глутамату.

МЕТОДИКА

Культивування нейронів гіпокампа. Для приготування культури нейронів гіпокампа були використані новонароджені щури лінії Вістар. Тварин декапітували, гіпокамп виділяли та ферментативно обробляли 0,25%-м розчином трипсину ("Sigma", США) при 37°C упродовж 10 хв. Після цього гіпокамп піддавали механічній дисоціації із застосуванням пастерівських піпеток з різним діаметром. Використовували живильне середовище MEM ("Gibco", США) з додаванням 10%-ї сироватки коня ("Invitrogen", США), інсуліну ("Sigma", США) та гентаміцину ("Invitrogen", США). Клітини розміщували на попередньо покриті полі-L-лізином і ламініном ("Sigma", США) скельця діаметром 12–22 мм, які розміщували в чашках Петрі діаметром 35 мм. Нейрони культивували при 37°C у газовому середовищі (атмосферне повітря, збагачене CO₂ до 5 %) із застосуванням інкубатора ("Jouan", Франція). На 3–4-ту добу культивування в середовище додавали 10 мкл цитозин-А-D-арабіно-фуранозид ("Sigma", США) для пригнічення проліферації гліальних клітин. Заміну живильного середовища проводили через 20–24 год.

Генетичні методи дослідження. Виділення РНК, зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція. Для з'ясування питання про те, які гени, що кодують різні ізоформи катіонних каналів з родини TRPV, експресуються в культурі нейронів гіпокампа, було застосовано метод зворотної транскрипції з наступною полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР). РНК виділяли з тканини гіпокампа овонароджених щурів

із використанням набору Trizol RNA-prep ("Isogen", Росія). Зворотну транскрипцію проводили із використанням набору First Strand cDNA Synthesis Kit ("Fermentas", Литва), застосовуючи 2–2,5 мкг загальної РНК та олігомерний (dT)₁₈ праймер. Отриману внаслідок ЗТ компліментарну ДНК (кДНК) піддавали генспецифічній ПЛР-ампліфікації. У дослідах були використанні праймери, комплементарні унікальним послідовностям нуклеотидів, які утворюються після відрізання інтронів під час сплайсингу матричної РНК (мРНК) (таблиця). Це дало змогу виключити можливість ампліфікації необхідного продукту протягом ПЛР з ядерної ДНК, а не з матриці, отриманої внаслідок ЗТ.

Зворотна транскрипція і ПЛР поодиноких клітин гіпокампа. Для аналізу експресії генів TRPV в поодиноких нейронах культури гіпокампа, які засмоктувалися в мікропіпетку, котра містила 4 мкл внутрішньоклітинного розчину (ммоль/л): KCl – 32, NaCl – 5, глюконат К – 108, MgATФ – 2, ГТФ – 0,3, HEPES – 10, EGTA(КОН) – 1,0, CaCl₂ – 0,3 і переносилися в спеціальний буфер для проведення зворотної транскрипції. Буфер містив у кінцевій концентрації такі компоненти (ммоль/л): тріс-НCl – 50 (рН 8,3), KCl – 50, MgCl₂ – 4, дитіотреїтол – 40, суміш чотирьох нуклеотидтрифосфатів – 1 ("Fermentas", Литва), інгібітор РНКаз RiboLock – 40 од. ("Fermentas", Литва), олігомерний (dT)₁₈ праймер – 0,2 мкг. До початку реакції ЗТ проби зберігалися при 4°C. Потім до всіх зразків додавали 40 од. зворотної транскриптази M-MuLV ("Fermentas", Литва) та інкубували проби протягом 2 год при 42°C. Отриману таким чином одноланцюгову кДНК з поодиноких клітин гіпокампа використовували для проведення двох серій ПЛР із застосуванням відповідних праймерів. Ампліфікаційна суміш для мультиплексної ПЛР містила 5 мкл 5-кратного буфера із сульфатом амонію, 2,5 ммоль/л сульфату

магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 5 пмоль/л кожного з праймерів та 0,5 од. рекомбінантної Taq-полімерази (“Fermentas”, Литва). Об’єм зразків доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Програма першої ампліфікації складалася з 25 циклів: денатурація – 94°C, 1 хв, приєднання праймерів – 64°C, 1 хв і елонгація – 74°C, 1 хв (GeneAmp PCR System 2700, “Applied Biosystems”, США). При проведенні другого циклу ПЛР в окремі пробірки додавали по 4 мкл продукту першого циклу мультиплексної ПЛР для ампліфікації специфічних фрагментів генів і використовували ті самі компоненти суміші, проте збільшували концентрацію праймерів до 30 пмоль/л. Друга ампліфікація складалася з 45–48 циклів. Ампліфікати розділяли в 1,5%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Візуалізацію та оцінку яскравості ампліфікатів після горизонтального електрофорезу (170 В протягом 30 хв) проводили за допомогою транслюмінатора та програмного забезпечення ViTran (“Біоком”, Росія)

Кількісна оцінка експресії генів TRPV в поодиноких нейронах гіпокампа із застосуванням методу ПЛР у реальному часі. В окремі серії дослідів продукт першого циклу ПЛР (кількість циклів зменшували до 15) використовували для кількісної оцінки експресії відповідних генів за

допомогою установки 7500 Fast Real-time PCR System (“Applied Biosystems”, США). Суміш для ампліфікації складалася з 10 мкл флуорисцентного барвника SYBR Green PCR Master Mix (“Applied Biosystems”, США) та 50 пмоль/л відповідних праймерів. Об’єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Програма ампліфікації починалася після попередньої активації AmpliTaq ДНК-полімерази протягом 10 хв при 94°C і складалася з 40 циклів: денатурація – 94°C, 15 с, приєднання праймерів та елонгація – 60°C, 1 хв. Для контролю за специфічністю флуоресценції продукту ампліфікації проводили дисоціацію: послідовне підвищення температури від 60 до 94°C із реєстрацією зменшення інтенсивності флуоресценції комплексів дволанцюгових ДНК з використанням барвника SYBR Green. Для побудови стандартної кривої використовували ДНК ампліфікатів генів TRPV, вилучену з агаровою гелю та очищену за допомогою набору DNA Extraction Kit (“Fermentas”, Литва). Концентрацію ДНК визначали із використанням спектрофотометра NanoDrop ND1000 (“NanoDrop Technologies Inc”, США) та перераховували в кількість молекул в 1 мкл. Після цього готували послідовні розведення очищеної ДНК фрагментів генів TRPV (від 130800 до 130 молекул для TRPV1 і від 180200 до 180 молекул для TRPV2) і застосовували їх для

Послідовність нуклеотидів у праймерах, температура гібридизації та розмір продуктів ампліфікації

Ген	Послідовність нуклеотидів для ампліфікації	Температура гібридизації, °C	Розмір ампліфікату, п. о.
Ванілоїдні рецептори			
TRPV1	5'-GCGAGTTCAAAGACCCAGAG-3' 5'-GGCATTGACAAACTGCTTCA-3'	56	140
TRPV2	5'-TGCATACACAGAAGGCTCCA-3' 5'-CCGGAATCCTTGTCATCTG-3'	56	114
Везикулярні транспортери γ-аміномасляної кислоти (VGAT)	5'-CGTCTGCGTTTCTGTCTGTC-3' 5'-GAACTGCGTGTTCCTTTCC-3'	61	197
глутамату (VGLUT)	5'-ACCCATCGGAGGCCAGATCG-3' 5'-GCCACTCCTCCCGCGTCTTGTGC-3'	61	341

ампліфікації за вищевказаними програмами (15 циклів звичайної ПЛР і 40 циклів ПЛР у реальному часі) паралельно з пробами окремих клітин гіпокампа.

Отримані цифрові результати обробляли статистично з використанням програми Excel 2000 та Origin 7.0. Вірогідність відмінностей середніх значень ($P < 0,05$) визначали за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведених експериментів показали, що як у тканині гіпокампа, так і в поодиноких культивованих нейронах цієї ділянки мозку визначається експресія мРНК TRPV1 та TRPV2 (рис. 1), причому її рівень в різних нейронах досить суттєво відрізняється.

Кількісна оцінка експресії генів дає змогу констатувати, що кількість молекул мРНК TRPV1 (діапазон від 70 до 192 молекул на 1 клітину, в середньому – 124) значно перевищує кількість мРНК TRPV2 (від 1 до 75 молекул на 1 клітину, в середньому – 66).

За літературними даними TRPV1 ек-

пресуються як в нейронах, так і в гліальних клітинах. При цьому ванілоїдні рецептори локалізуються в різних компартментах клітини:

1. TRPV1 плазматичної мембрани – основна та найбільш вивчена форма. Всі ефекти активації ванілоїдних рецепторів пов’язані саме з цією локалізацією [8].

2. TRPV1 плазматичних везикул – транспортна форма синтезованих *de novo* ванілоїдних рецепторів, а також рецептори внутрішньоклітинного депо, за рахунок яких здійснюється регуляція кількості рецепторів на цитоплазматичній мембрані [4, 8].

3. TRPV1 ендоплазматичного ретикулума – беруть участь у регуляції внутрішньоклітинного іонного балансу (активація спричинює вихід іонів кальцію із внутрішньоклітинного депо в цитоплазму) [12].

Існування TRPV1 у мозку було підтверджено багатьма експериментами з використанням мРНК TRPV1 [11, 13–16, 20, 21]. В одному з найбільш детальних досліджень було застосовано RTX-маркування (резиноферотоксин) для виявлення експресії гена TRPV1 в мозку нормальних і нокаутованих за цим геном мишей [14].

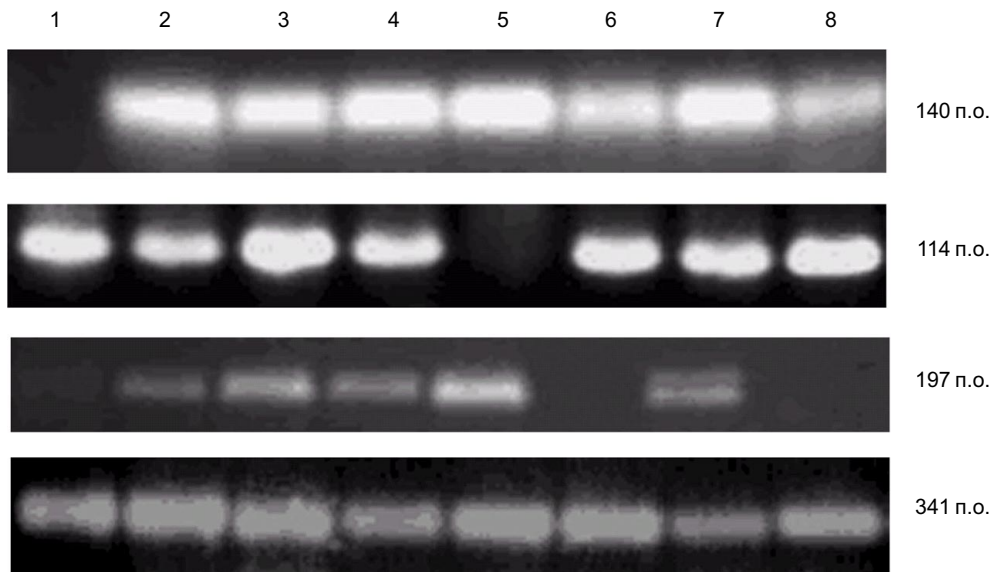


Рис. 1. Електрофорезний гель продуктів полімеразної ланцюгової реакції фрагментів генів ванілоїдних рецепторів TRPV1 (а), TRPV2 (б) і везикулярних транспортерів VGAT (в) та VGLUT (г) з поодиноких нейронів культури нейронів гіпокампа новонароджених щурів

Це дослідження показало широке розповсюдження TRPV1 в мозку, включаючи ділянки кори головного мозку, мозочка та різноманітних підкіркових структур. Згодом було підтверджено, що кількість мРНК TRPV1 у задньокорінцевих гангліях приблизно в 28 разів перевищує такий в інших ділянках головного та спинного мозку [15]. Іншим дослідникам не вдалося виявити експресію TRPV1 в центральній нервовій системі [3, 19], що може бути пояснено застосуванням методів із недостатньою чутливістю. За нашими результатами TRPV1, TRPV2 досить активно експресується як у тканині гіпокампа новонароджених шурів, так і в культивованих нейронах цієї ділянки мозку.

Імунохімічними методами доведено, що TRPV1 розташовані переважно в сомі

нейронів і дендритах [11, 13, 14, 21]. Також продемонстровано, що TRPV1 і TRPV2 колокалізовані в деяких структурах мозку [13], виявляються в цитоплазматичному ретикулумі та плазматичній мембрані нейронів [13]. При цьому їх колокалізація не є характерною для нейронів задньокорінцевих гангліїв [13]. Результати наших експериментів показали, що практично усі нейрони експресували одночасно гени TRPV1 і TRPV2 (рис. 2).

Визначення експресії генів, що кодують везикулярні транспортери глутамату та γ -аміномасляної кислоти дало змогу оцінити відсоткове співвідношення між експресією мРНК TRPV1 та TRPV2 в ГАМКергічних та глутаматергічних нейронах. Так, було встановлено, що кількість мРНК TRPV1 в

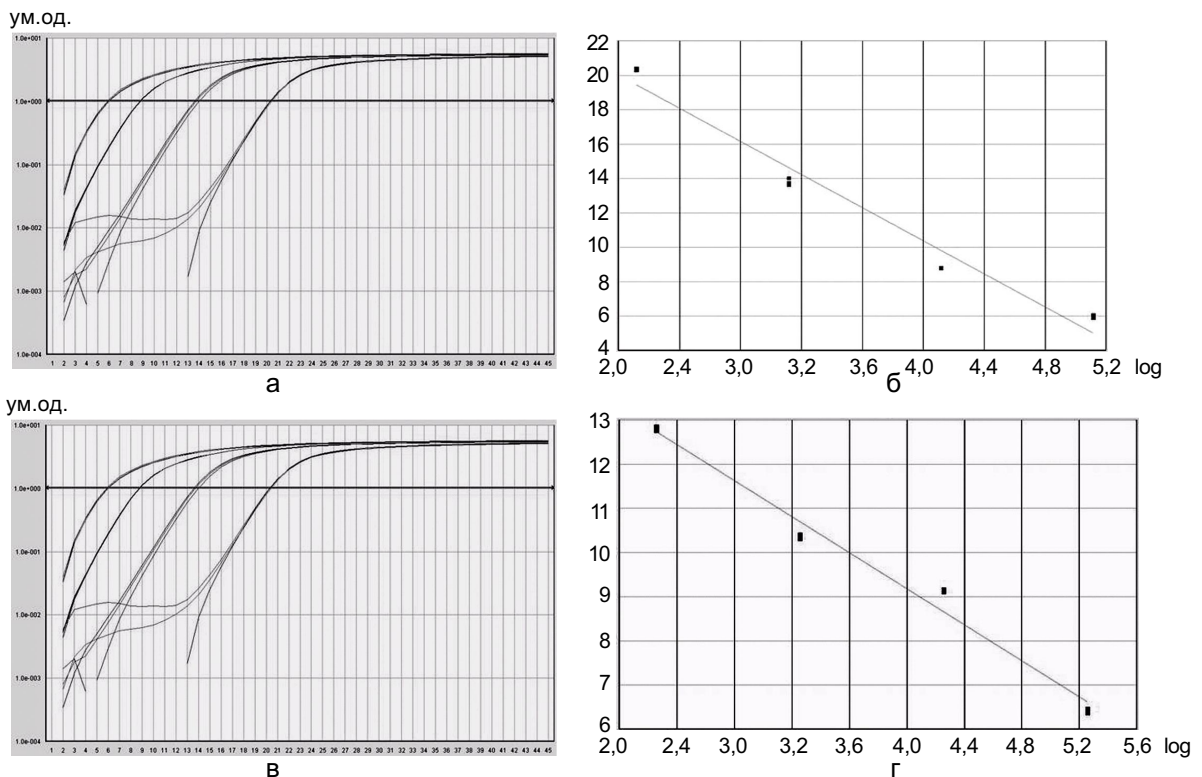


Рис. 2. Результати кількісного аналізу експресії генів ванілоїдних рецепторів TRPV1 і TRPV2 у поодиноких нейронах гіпокампа: а – залежність інтенсивності флуоресценції від циклу ампліфікації при різних концентраціях ампліфікату TRPV1, б – стандартна крива, що описує відношення логарифму концентрації очищеної ДНК фрагмента гена TRPV1 до порогового циклу, в – залежність інтенсивності флуоресценції від циклу ампліфікації субодиниці TRPV2, г – стандартна крива, що описує відношення логарифму концентрації очищеної ДНК фрагмента гена TRPV2 до порогового циклу

ГАМКергічних нейронах була значно вищою, ніж мРНК TRPV2 (96 та 88 % ГАМКергічних нейронів відповідно), тоді як в глутаматергічних нейронах експресія цих генів не відрізнялася (рис. 3).

На початковому етапі знаходиться вивчення проблеми про регуляцію експресії генів TRPV. Mezey та співавт. [11] отримали дані про те, що введення капсаїцину неонатальним щурам зменшує експресію мРНК TRPV1 в мозку. Залишається відкритим питання про участь ендованілоїдів та інших нейромедіаторів у регуляції кількості та активності ванілоїдних рецепторів у нейронах центральної та периферичної нервової системи. Лише в 2007 р. Sikand і Premkumar вдалося встановити, що активація протеїнкінази С збільшує чутливість TRPV1 глутаматергічних нейронів до капсаїцину [17]. Фізіологічне значення TRPV у структурах мозку також потребує більш детального вивчення. Виходячи з того, що TRPV1 залучені в процеси ноцицепції на рівні задньокорінцевих гангліїв і сенсорних нервових закінчень, можна при-

пустити аналогічне значення цих рецепторів і в інших мозкових структурах, зокрема у гіпокампі. Проте, на нашу думку, роль ванілоїдних рецепторів у гіпокампі не може обмежуватися лише їх участю в ноцицепції.

I.I. Drebot , O.I. Boldyryev , V. E. Dosenko, P.G. Kostyuk

EXPRESSION OF TRPV1 AND TRPV2 RECEPTORS MRNA IN THE CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS

Expression of mRNA of 1 and 2 type (TRPV1 and TRPV2) vanilloid receptors in the cultured hippocampal neurons was determined. With the use of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of single neurons (single-cell RT-PCR), was shown the TRPV1 and TRPV2 receptors expression in both neurons and glia cell. With use of real - time (real-time PCR) we determined that the level of these genes expression in different neurons is identical. It was also shown that the level of mTRPV1 in GABAergic neurons was considerably higher, than the level of mTRPV2, while expression of genes in the glutamatergic neurons did not differ. Findings about expression of TRPV1 and TRPV2 allow to suppose that vanilloid receptors can play an important functional role in the hippocampal neurons.

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

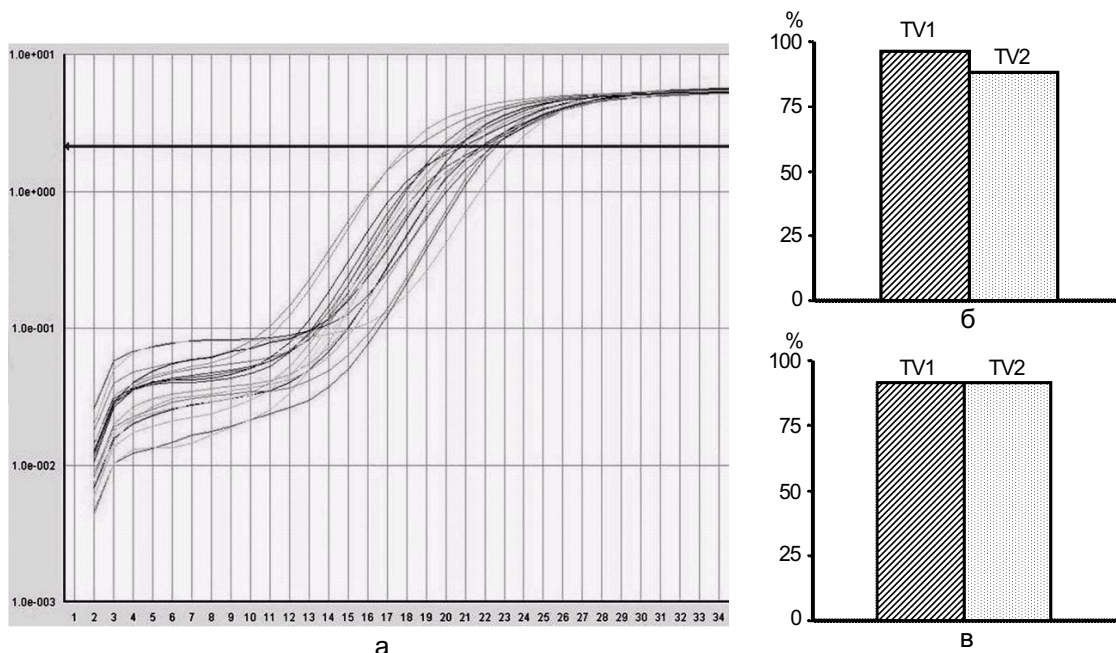


Рис. 3. Результати кількісного аналізу експресії гена везикулярних транспортерів VGAT і VGLUT у поодиноких нейронах гіпокампа. Залежність інтенсивності флуоресценції від циклу ампліфікації (а), відсоткове співвідношення експресії мРНК ванілоїдних рецепторів TRPV1 і TRPV2 в ГАМКергічних (б) і глутаматергічних нейронах (в)

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Al-Hayani A., Wease K.N., Ross R.A. et al. The endogenous cannabinoid anandamide activates vanilloid receptors in the rat hippocampal slice // *Neuropharmacology*. – 2001. – **41**. – P.1000–1005.
2. Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway // *Nature*. – 1997. – **389**. – P.816–824.
3. Caterina M.J., Leffler A., Malmberg A.B. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor // *Science*. – 2000. – **288**. – P. 306–313.
4. Jung J., Lee S.Y., Hwang S.W. et al. Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1 // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, № 46. – P. 44448–44454.
5. Huang S.M., Bisogno T., Trevisani M. et al. An endogenous capsaicinlike substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – **99**. – P.8400–8405.
6. Kim S.R., Lee D.Y., Chung E.S. et al. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons in vivo and in vitro // *J. Neurosci.* – 2005. – **25**. – P.662–671.
7. Kofalvi A., Oliveira C.R., Cunha A. Lack of evidence for functional TRPV(1) vanilloid receptors in rat hippocampal nerve terminals // *Neurosci. Lett.* – 2006. – **403**. – P. 151–156.
8. Nagy I., Santha P., Jancso G., Urban L. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology // *Eur. J. Pharmacol.* – 2004. – 500. – P. 351–69.
9. Millan M.J. Descending control of pain // *Prog. Neurobiol.* – 2002. – **66**. – P.355–474.
10. Millan M.J. The induction of pain: an integrative review // *Ibid.* – 1999. – **57**. – P.1–164
11. Mezey E., Toth Z.E., Cortright D.N. et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – **97**. – P.3655–3660.
12. Liu L., Simon S.A. The influence of removing extracellular Ca^{2+} in the desensitization responses to capsaicin, zingerone and olvanil in rat trigeminal ganglion neurons // *Brain. Res.* – 1998. – **809**, № 2. – P. 246–52
13. Liapi A., Wood J.N. Extensive co-localization and heteromultimer formation of the vanilloid receptor-like protein TRPV2 and the capsaicin receptor TRPV1 in the adult rat cerebral cortex // *Eur. J. Neurosci.* – 2005. – **22**. – P. 825–834.
14. Roberts J.C., Davis J.B., Benham C.D. [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution // *Brain. Res.* – 2004. – **995**. – P. 176–183.
15. Sanchez J.F., Krause J.E., Cortright D.N. The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat // *Neuroscience*. – 2001. – 107. – P. 373–381.
16. Sasamura T., Sasaki M., Tohda C., Kuraishi Y. Existence of capsaicinsensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus // *Neuroreport*. – 1998. – **9**. – P. 2045–2048.
17. Sikand P., Premkumar L.S. Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse // *J. Physiol.* – 2007. – **581**, Pt 2. – P.631–647.
18. Steenland H.W., Ko S.W., Wu L.J., Zhuo M. Hot receptors in the brain // *Mol. Pain*. – 2006. – **8**. – P. 2–34.
19. Szallasi A., Nilsson S., Farkas-Szallasi T. et al. Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment // *Brain Res.* – 1995. – **703**. – P. 175–183.
20. Szabo T., Biro T., Gonzalez A.F. et al. Pharmacological characterization of vanilloid receptor located in the brain // *Brain. Res. Mol. Brain Res.* – 2002. – **98**. – P. 51–57.
21. Toth A., Boczan J., Kedei N. et al. Expression and distribution of vanilloid receptor1 (TRPV1) in the adult rat brain // *Ibid.* – 2005. – **135**. – P. 162–168.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 04.09.2007*