

УДК 612.82, 57.086.2

Когнитивная индексация нейронов: Cre-управляемое генетическое маркирование и изучение клеток, участвующих в обучении и памяти

О. И. Ивашкина^{1,2}, Н. С. Воробьева¹, А. М. Груздева¹, М. А. Рощина³, К. А. Торопова^{1,2},
К. В. Анохин^{1,2,4*}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», отдел нейронаук, 123182, Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Центр нейронаук и когнитивных наук, 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 27

³Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485, Россия, Москва, ул. Бутлерова, 5А

⁴Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, лаборатория нейробиологии памяти, 125315, Россия, Москва, ул. Моховая, 11, стр. 4

*E-mail: k.anokhin@gmail.com

Поступила в редакцию 27.11.2017

Принята к печати 26.03.2018

РЕФЕРАТ Описан и апробирован метод Cre-опосредуемого перманентного генетического маркирования нейронных сетей головного мозга, активных в ходе приобретения животным нового опыта. Метод основан на использовании двойных трансгенных мышей Fos-Cre-eGFP, у которых в результате управляемой тамоксифеном Cre-рекомбинации зеленый флуоресцентный белок экспрессируется только в тех клетках, в которых в результате получения животным нового опыта происходила экспрессия непосредственного раннего гена *c-fos*. Визуализация белка eGFP на срезах мозга мышей Fos-Cre-eGFP позволила выявить нейроны, подвергнувшиеся Cre-рекомбинации в момент обучения животных условному рефлексу замирания. С помощью двойного иммуногистохимического окрашивания охарактеризованы типы нейронов неокортекса и гиппокампа, в которых в ходе обследования животными новой обстановки происходила индуцированная опытом Cre-рекомбинация. При этом генетически маркированные нейроны относились к типу пирамидных возбуждающих нейронов, но не к различным типам тормозных нейронов. Показано, что сочетание генетического Cre-eGFP-маркирования с иммуногистохимическим мечением эндогенного белка *c-Fos* дает возможность выявлять и сравнивать две популяции нейронов мозга, активных во время двух различных эпизодов получения животным нового опыта. Описанный подход может найти широкое применение в визуализации и сравнительном анализе различных когнитивных клеточных сетей головного мозга.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА генетическое маркирование нейронов, мозг, нейронные сети, обучение, непосредственно ранние гены, Cre-рекомбинация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ eGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок; GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок; NeuN – нейрон-специфический ядерный белок; CaMKII – кальций-кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа 2; SOM – соматостатин; NPY – нейропептид Y; PV – парвальбумин; NPГ – непосредственно ранние гены; ПЦР – полимеразная цепная реакция; УРЗ – условно-рефлекторное замирание; ЭКР – электрокожное раздражение.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизмов формирования и работы нейронных сетей, обеспечивающих когнитивные функции головного мозга, является одним из главных направлений современной нейронауки. Решение этих задач требует создания новых экспериментальных

методов, позволяющих визуализировать нейронные субстраты когнитивных процессов в масштабе целого мозга с клеточным разрешением. Принципиальной при этом является необходимость сравнения клеточных популяций, отвечающих за различные когнитивные функции.

Классическим методом выявления нейронных популяций, вовлекаемых в различные типы когнитивной активности животных, служит детекция экспрессии непосредственно ранних генов (НРГ, *immediately early*) [1–3]. НРГ – семейство генов, быстро активирующихся в клетке через внутриклеточные сигнальные каскады в ответ на те или иные внешние воздействия. К этому семейству относятся гены, которые кодируют транскрипционные факторы, структурные синаптические белки, цитоплазматические ферменты и др. [4]. Экспрессия некоторых НРГ, например *c-fos*, *zif268* и *arc*, индуцируется новым для животного опытом и критически необходима для пластических перестроек и формирования долговременной памяти, хранящей следы индивидуального опыта [1, 3, 5, 6]. На этих свойствах НРГ основаны методы иммуногистохимического и *in situ* гибридизационного картирования мозга, позволяющие выявлять когнитивные нейронные сети, активные во время обучения [2, 7–9].

Однако выявление продуктов НРГ с помощью иммуногистохимии или *in situ* гибридизации трудоемко и ограничено узким временным окном после когнитивного воздействия. Перспективным способом решения части этих проблем является визуализация популяций когнитивно активных нейронов с помощью экспрессии генов флуоресцентных белков под контролем промоторов НРГ. Использование управляемых трансгенных систем дает возможность получать мышей, у которых флуоресцентный белок синтезируется только в тех нейронах, в которых в определенный момент времени происходила экспрессия НРГ, например, *c-fos* [10]. Такие технологии получают в последние годы все большее распространение. Однако они имеют существенное ограничение: мечение популяции когнитивно активных нервных клеток ограничено сроком жизни флуоресцентного белка.

Способом решения этой проблемы может стать перманентное генетическое маркирование популяции нервных клеток мозга, отвечающих за решение определенной когнитивной задачи. С этой целью может быть использована широко применяемая в нейробиологии система сайт-специфических рекомбиназ [11–13], в частности, система с модифицированной Cre-рекомбиназой бактериофага P1, которая соединена с мутантным лигандсвязывающим доменом рецептора эстрогена [14, 15]. В присутствии тамоксифена, синтетического антагониста эстрогена, Cre-рекомбиназа распознает гомотипические loxP-сайты и вырезает ДНК, фланкированную этими сайтами. Сайты loxP обычно ограничивают STOP-кодон, расположенный перед последовательностью репортерного гена, кодирующего флуоресцент-

ный белок (GFP, tdTomato и др.), β-галактозидазу или каналородопсин [13, 16]. В настоящее время созданы десятки трансгенных линий мышей, у которых Cre-рекомбиназа экспрессируется избирательно в разных тканях или разных типах клеток, например, в отдельных типах интернейронов [17], или на определенных стадиях развития нейрональных предшественников [13]. Таким образом, технология генетического маркирования нейронов с помощью Cre-рекомбиназы в настоящее время хорошо развита, однако применяется преимущественно для анатомического картирования нервной системы или для эмбриональных исследований.

Методической инновацией стала работа Guenther и соавт. [18], которые создали линии трансгенных мышей, экспрессирующих Cre-рекомбиназу под управлением промоторов НРГ – *c-fos* и *arc*. Скрещивание мышей линии Fos-Cre или Arc-Cre с мышами репортерной линии, несущей красный флуоресцентный белок tdTomato, дало возможность впервые получить перманентное генетическое маркирование нейронов, в которых активируются НРГ [18].

Нами получены двойные трансгенные мыши Fos-Cre-eGFP, которые были использованы в настоящей работе для исследования морфологического и молекулярного фенотипа нейронов различных структур головного мозга, подвергающихся Cre-рекомбинации при приобретении животными нового опыта. Мы также впервые апробировали возможность использования трансгенных мышей Fos-Cre-eGFP для маркирования и сравнения двух популяций нейронов, активных у одного и того же животного в двух разных ситуациях нового опыта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение двойных трансгенных мышей линии Fos-Cre-eGFP

Для получения мышей линии Fos-Cre-eGFP проводили скрещивание трансгенных мышей линий B6.129(Cg)-Fostm1.1(cre/ERT2)Luo/J (The Jackson Laboratory, стоковый номер: 021882), несущих Cre-рекомбиназу под промотором *c-fos*, с линией Tg(CAG-Bgeo/GFP)21Lbe/J (The Jackson Laboratory, стоковый номер 003920), несущей ген усиленного зеленого флуоресцентного белка eGFP под loxP-сайтами. Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках по пять животных со свободным доступом к воде и пище при световом цикле 12/12 ч. Все эксперименты проводили в соответствии с требованиями приказа № 267 МЗ РФ (19.06.2003 г.), а также с постановлением локального этического комитета по вопросам биомедицин-

ских исследований НИЦ «Курчатовский институт» (Протокол № 1 от 09.07.2015).

Генотипирование

У обеих родительских линий трансген находится в гетерозиготном состоянии, поэтому для выявления двойных трансгенных животных использовали генотипирование по каждому трансгену. В возрасте двух месяцев у мышей собирали образцы тканей и выделяли ДНК путем лизирования раствором протеиназы К (Sigma) в 1% SDS-буфере (Хеликон) с последующим осаждением 96% этанолом. Осадок ДНК растворяли в ТЕ-буфере. Полученную ДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами к Cre-рекомбиназе и eGFP в среде ScreenMix (ЗАО «Евроген»). Использовали следующие праймеры: для Cre – CACCAGTGTCTACCCCTGGA (общая прямая последовательность для дикого типа и трансгена), CGGCTACACAAAGCCAAACT (обратная последовательность дикого типа), CGCGCCTGAAGATATAGAAGA (обратная последовательность трансгена); для GFP – TGGACGGC-GACGTA AACGGC (первая последовательность трансгена), GGCGGTCACGAACTCCAGCA (вторая последовательность трансгена), CTAGGCCAC-AGAATTGAAAGATCT (прямая последовательность внутреннего позитивного контроля), GTAGGTGGA-AATTCTAGCATCATCC (обратная последовательность внутреннего позитивного контроля). Условия ПЦР указаны в *таблице*. Продукты ПЦР выявляли в 2.5% агарозном геле в ТАЕ-буфере с бромистым этидием.

Условия проведения полимеразной цепной реакции при генотипировании

Этап	Температура, °С	Время	Примечание
1	94	2 мин	
2	94	20 с	
3	65	15 с	Снижение температуры на 0.5°C за цикл
4	68	10 с	
5			Повторение этапов 2–4 в течение 10 циклов
6	94	15 с	
7	60	15 с	
8	72	10 с	
9			Повторение этапов 6–8 в течение 28 циклов
10	72	2 мин	
11	10		Остановка

Индукция Cre-рекомбинации тамоксифеном

Для индукции Cre-рекомбинации использовали однократную внутривенную инъекцию тамоксифена (Sigma) в дозе 150 мг/кг, растворенного в кукурузном масле (Sigma), согласно описанной ранее методике [18]. Для опыт-индуцируемой Cre-рекомбинации инъекцию тамоксифена проводили за 24 ч до получения животным нового опыта.

Обследование обстановки

При обследовании обстановки мышей помещали в экспериментальную камеру на 5 мин и давали свободно ее обследовать. Известно, что такое обследование приводит к формированию у животных долговременной памяти [19].

В работе использовали две обстановки. Обстановка А представляла собой освещенную диффузным белым светом камеру (средний уровень освещенности 87 лк) размером 20 × 30 × 20 см, снабженную с электродным полом; уровень шума в камере составлял 7 дБ. Перед помещением каждого животного камеру протирали 40% раствором этилового спирта. Обстановка В представляла собой камеру размером 20 × 15 × 20 см с электродным полом; камера была освещена только источником ближнего инфракрасного света, невидимого для мышей; уровень шума в камере составлял 25 дБ. Перед помещением каждого животного камеру протирали 3% раствором уксусной кислоты.

Нанесение немедленного электрокожного раздражения

Нанесение электрокожного раздражения (ЭКР) проводили через 3 дня после обследования обстановки А. Для этого мышей помещали в обстановку А или обстановку В и немедленно наносили ЭКР силой 1 мА и длительностью 2 с, после чего сразу же возвращали в домашнюю клетку.

Обучение в задаче условно-рефлекторного замирания (УРЗ)

Для обучения УРЗ мышей помещали в обстановку А и через 120 с подавали звуковой сигнал (90 дБ, 5 кГц) длительностью 30 с. Последние 2 с звука сочетали с подачей ЭКР силой 1 мА. Через 30 с после окончания ЭКР мышей возвращали в домашнюю клетку.

Экспериментальные группы

Для оценки фоновой и опыт-индуцированной экспрессии eGFP использовали две группы животных: мышей группы «Обучение» ($n = 4$) обучали в задаче УРЗ как описано выше; мыши из группы «Контроль» ($n = 4$) при этом оставались в домаш-

них клетках и не подвергались каким-либо воздействиям.

Для определения фенотипа клеток, проходящих опыт-зависимую Cre-рекомбинацию, брали животных, которые обследовали обстановку А в течение 5 мин ($n = 5$).

Для выявления двух популяций когнитивно активных нейронов в одном мозге использовали группы «А – А + ЭКР» ($n = 5$) и «А – В + ЭКР» ($n = 5$). Мыши группы «А – А + ЭКР» обследовали обстановку А и затем через 3 дня получали немедленное ЭКР в той же обстановке; мыши группы «А – В + ЭКР» обследовали обстановку В и через 3 дня получали немедленное ЭКР в обстановке В.

Взятие образцов мозга и изготовление плавающих срезов

Образцы мозга мышей забирали через 3 дня после предъявления животным нового опыта, сопровождавшегося Cre-рекомбинацией. В экспериментах по выявлению двух популяций активных нейронов образцы мозга мышей брали через 90 мин после второго когнитивного эпизода (нанесения ЭКР).

Мышей наркотизировали внутрибрюшинной инъекцией 15% хлоралгидрата в физиологическом растворе. После этого проводили интракардиальную перфузию растворами фосфатного буфера и 4% параформальдегида в фосфатном буфере и извлекали мозг. Полученные образцы мозга постфиксировали 4% раствором параформальдегида в фосфатном буфере: 2 ч при комнатной температуре и 14–18 ч при +4 °С. После этого образцы переносили в фосфатный буфер на 2 ч и изготавливали фронтальные срезы мозга толщиной 50 мкм с помощью вибратора Leica VT1200S (Leica). Срезы брали на расстоянии +2.46 и –1.34 мм от брегмы. Координаты срезов определяли с помощью стереотаксического атласа мозга мыши [20].

Выявление флуоресцентного белка eGFP и двойное иммуногистохимическое окрашивание

В экспериментах по определению фоновой и опыт-индуцированной экспрессии eGFP клетки, подвергшиеся Cre-рекомбинации, выявляли по собственной флуоресценции белка eGFP. Изготовленные срезы мозга заключали под покровные стекла с помощью водной среды Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich) и проводили оцифровку как описано ниже.

В экспериментах по определению фенотипа и доли клеток, проходящих опыт-зависимую Cre-рекомбинацию, а также выявлению двух популяций когнитивно активных нейронов, подвергшиеся Cre-рекомбинации клетки выявляли иммуногистохими-

чески при помощи окраски на белок eGFP. Срезы мозга подвергали процедуре пермеабиллизации в 1% растворе Triton-X100 (Sigma) в фосфатном буфере с 5% нормальной сывороткой осли (Sigma) и 5% нормальной сывороткой козла (Abcam) в течение 60 мин. После этого срезы трижды отмывали 0.2% раствором Triton-X100 в фосфатном буфере по 5 мин. Затем проводили инкубацию с первичными антителами в течение 18 ч при +4 °С. В разных реакциях использовали следующие первичные антитела для выявления различных маркеров: eGFP (Rabbit Anti-GFP Antibody, Life Technologies; разведение 1 : 250), eGFP (Chicken Anti-GFP Antibody, Aves Labs; разведение 1 : 500), c-Fos (Goat Anti-c-Fos Antibody, Santa Cruz Biotechnology; разведение 1 : 150), GFAP (Chicken Anti-GFAP Antibody, Abcam; разведение 1 : 500), NeuN (Mouse Anti-NeuN Antibody, EMD Millipore; разведение 1 : 500), CaMKII (Mouse Anti-CaMKII Antibody, EMD Millipore; разведение 1 : 200), SOM (Rabbit Anti-Somatostatin Antibody, Santa Cruz Biotechnology; разведение 1 : 1000), NPY (Rabbit Anti-Neuropeptide Y Antibody, Novus Biologicals; разведение 1 : 10000) и PV (Rabbit Anti-Parvalbumin Antibody, Abcam; разведение 1 : 10000). По окончании инкубации срезы отмывали 0.2% раствором Triton-X100 в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Далее инкубировали срезы с вторичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте. В разных реакциях были использованы следующие вторичные антитела: AlexaFluor® 488 Donkey Anti-Goat Antibody (Life Technologies; разведение 1 : 500), AlexaFluor® 488 Goat Anti-Chicken Antibody (Life Technologies; разведение 1 : 500), AlexaFluor® 568 Donkey Anti-Rabbit Antibody (Life Technologies; разведение 1 : 500), AlexaFluor® 568 Goat Anti-Chicken Antibody (Life Technologies; разведение 1 : 500) или AlexaFluor® 568 Donkey Anti-Mouse Antibody (Life Technologies; разведение 1 : 500). После инкубации с вторичными антителами срезы отмывали 3 раза по 5 мин в 0.2% растворе Triton-X100 в фосфатном буфере. После окончания окраски срезы заключали под покровные стекла с помощью водной среды Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich). Оцифровку срезов проводили на конфокальном микроскопе Olympus FV1000BW61WI (Olympus) при увеличении $\times 20$. С каждого среза мозга получали 10–13 оптических срезов с шагом 5 мкм по оси Z.

Подсчет eGFP-положительных клеток и анализ колокализаций

Обработку полученных изображений и дальнейший анализ проводили в программе Imaris 7.1.0 (Bitplane). Поскольку окраска на eGFP является цитоплазматиче-

ческой и выявляет не только тела, но и отростки клеток, автоматический подсчет eGFP-положительных нейронов затруднителен. В связи с этим, eGFP-положительные клетки отмечали вручную, а затем подсчитывали их количество автоматически. Окраски на NeuN и c-Fos являются ядерными, поэтому NeuN-положительные и c-Fos-положительные клетки выделяли и подсчитывали автоматически на основании размера и порогового уровня интенсивности окраски в красном канале. Для окрасок на eGFP, NeuN и c-Fos отмечали все положительные клетки, сомы которых полностью помещались в глубине среза по оси Z; клетки, сомы которых лежали на верхней и нижней границах срезов мозга по Z, не отмечали. Колокализацию eGFP с NeuN или c-Fos оценивали экспертно для каждой клетки в трех проекциях. Двойными положительными считали клетки, у которых NeuN- или c-Fos-положительное ядро было полностью окружено окрашенной на eGFP цитоплазмой. Двойные положительные клетки отмечали вручную и затем подсчитывали автоматически. Подсчет положительных клеток проводили по всей площади фронтальной ассоциативной коры на срезе мозга, а для совместной окраски с NeuN – также отдельно в слоях 1, 2/3, 5 и 6. Границы фронтальной ассоциативной коры определяли с помощью стереотаксического атласа мозга мыши [20]. Границы слоев определяли в соответствии с Алленовским атласом мозга мыши (Allen Mouse Brain Atlas, <http://mouse.brain-map.org/static/atlas>). От каждого животного анализировали по 3 среза фронтальной ассоциативной коры. Результаты подсчета положительных клеток усредняли для правого и левого полушария на одном срезе и трех срезов с одного мозга.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Prism 7 (GraphPad) с использованием двухвыборочного *t*-критерия, а также двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA или дисперсионного анализа ANOVA с повторными измерениями и *t*-теста Сидака. Критический уровень значимости принимали равным $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фоновая и опыт-индуцированная экспрессия зеленого флуоресцентного белка в мозге двойных трансгенных мышей Fos-Cre-eGFP

В результате скрещивания мышей линий B6.129(Cg)-Fostm1.1(cre/ERT2)Luo/J и Tg(CAG-Vgeo/GFP)21Lbe/J получено потомство, часть которого была двойными трансгенными животными, несущими одновременно ген Cre-рекомбиназы

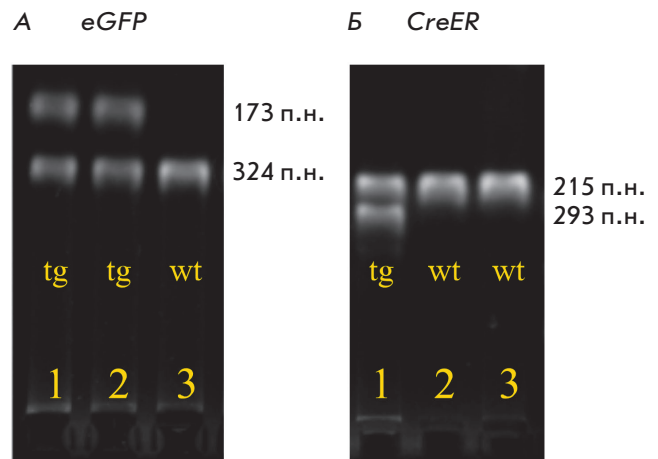


Рис. 1. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР для выявления двойных трансгенных мышей линии Fos-Cre-eGFP, несущих одновременно гены eGFP (A) и Cre-рекомбиназы (B). 173 п.н. – фрагмент, соответствующий трансгену по гену eGFP; 324 п.н. – внутренний позитивный контроль; 215 п.н. – фрагмент, соответствующий дикому типу по гену Cre-рекомбиназы; 293 п.н. – фрагмент, соответствующий трансгену по гену Cre-рекомбиназы; wt – животное дикого типа по данному гену, tg – трансгенное животное по данному гену; 1, 2, 3 – номер животного. Двойным трансгенным животным является только мышь № 1

под промотором *c-fos* и ген усиленного флуоресцентного белка eGFP под loxP-фланкированным стоп-сигналом (рис. 1). Для оценки базового уровня Cre-рекомбинации и опыт-зависимой индукции рекомбинации трансгенным мышам вводили тамоксифен и через 24 ч после инъекции обучали в задаче УРЗ (группа «Обучение») или оставляли в домашних клетках (группа «Контроль»). Через 3 дня на срезах мозга мышей выявляли eGFP (рис. 2). Нейроны, в которых выявлялся зеленый флуоресцентный белок – это нейроны, в которых происходила активация промотора гена *c-fos* и следующая за ней Cre-рекомбинация.

У мышей из группы «Обучение» выявлено большое количество eGFP-положительных нейронов во всех структурах, специфически связанных с обучением УРЗ [21], а именно: в обонятельных ядрах, гиппокампе, миндалине, вентральном таламусе, а также в различных областях неокортекса – фронтальной ассоциативной, прелимбической, инфраламбической, цингулярной, ретроспленальной, теменной ассоциативной, височной ассоциативной, энторинальной, соматосенсорной, слуховой, зрительной, моторной, инсулярной и орбитальной (рис. 2Б,Г,Е,З). При этом

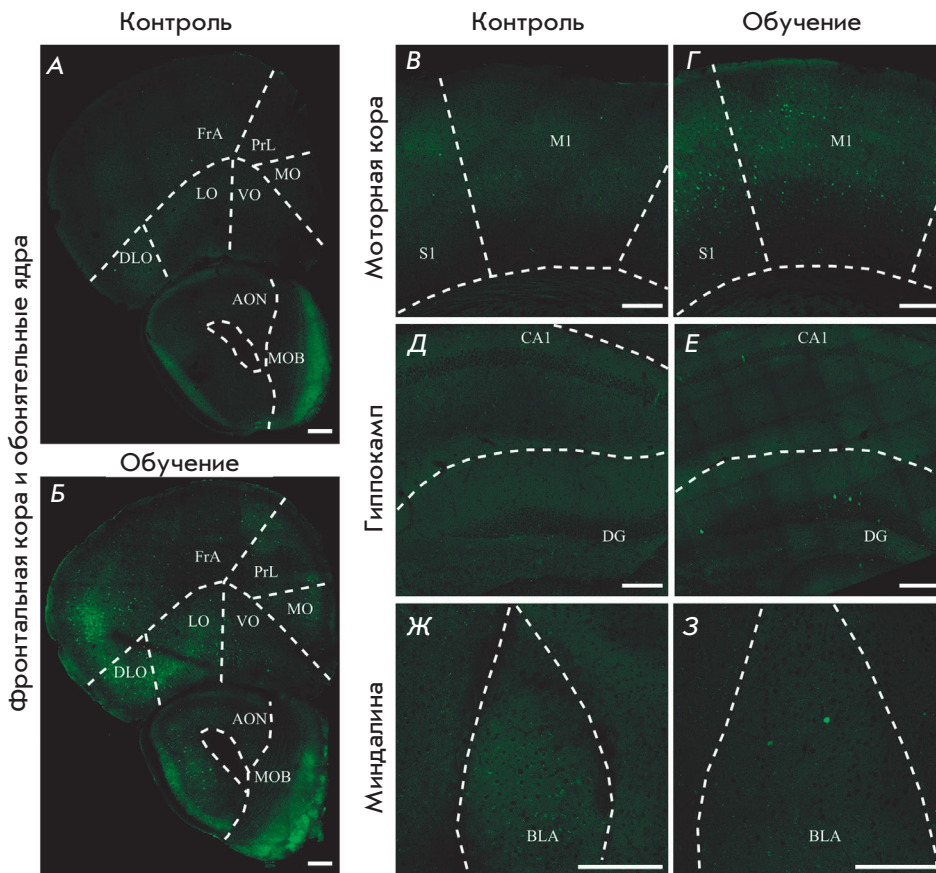


Рис. 2. Сопоставление базового уровня Cre-рекомбинации у мышей группы «Контроль», не получавших никаких поведенческих воздействий (А, В, Д, Ж), и опыт-индуцированной Cre-рекомбинации у мышей группы «Обучение», прошедших обучение УРЗ (Б, Г, Е, З). АОН – передняя обонятельная область; BLA – базолатеральное ядро миндалины; CA1 – зона CA1 гиппокампа; DG – зубчатая фасция гиппокампа; DLO – дорсолатеральная орбитальная кора; FrA – фронтальная ассоциативная кора; LO – латеральная орбитальная кора; M1 – первичная моторная кора; MO – медиальная орбитальная кора; MOB – основная обонятельная луковица; PrL – прелимбическая кора; S1 – первичная соматосенсорная кора; VO – вентральная орбитальная кора. Шкала – 100 мкм

у контрольных мышей eGFP-положительные клетки в перечисленных выше областях мозга почти не выявлялись (рис. 2А,В,Д,Ж). Единичные eGFP-положительные клетки у контрольных животных отмечены только в некоторых областях неокортекса: в фронтальной ассоциативной, дорсолатеральной орбитальной, моторной, соматосенсорной, пириформной и экторинальной. Эти результаты свидетельствуют о том, что метод генетического маркирования активных нейронов у мышей Fos-Cre-eGFP позволяет успешно визуализировать активацию широко распространенной популяции нейронов, захватывающей большое число разнообразных структур головного мозга.

Определение фенотипа клеток, проходящих опыт-зависимую Cre-рекомбинацию

В эксперименте по определению типа клеток, проходящих опыт-зависимую Cre-рекомбинацию, мышей после инъекции тамоксифена помещали в новую для них обстановку А и через 3 дня выявляли пары маркеров: eGFP и одного из специфических маркеров типов клеток.

В качестве маркера зрелых нейронов был выбран белок NeuN, который локализуется в ядрах практически всех типов нейронов в центральной нервной системе млекопитающих, за исключением клеток Пуркинье мозжечка, митральных клеток обонятельной луковицы и фоторецепторных клеток сетчатки [22]. В качестве клеточного маркера астроцитов был выбран белок GFAP [23]. Во всех исследованных структурах все eGFP-положительные клетки были также NeuN-положительными (рис. 3А,Б); при этом не выявлено ни одного случая колокализации eGFP с белком GFAP (рис. 3В).

Нейроны головного мозга можно разделить на возбуждающие (пирамидные) и тормозные (интернейроны). Маркером возбуждающих нейронов может служить CaMKII. Данный фермент принимает участие в организации возбуждающих синапсов и никогда не синтезируется в ГАМКэргических интернейронах [24]. Интернейроны очень вариабельны по своим морфологическим, электрофизиологическим и биохимическим свойствам, в связи с чем их подразделяют на несколько разных типов, например, на основании синтеза специфических биохимических

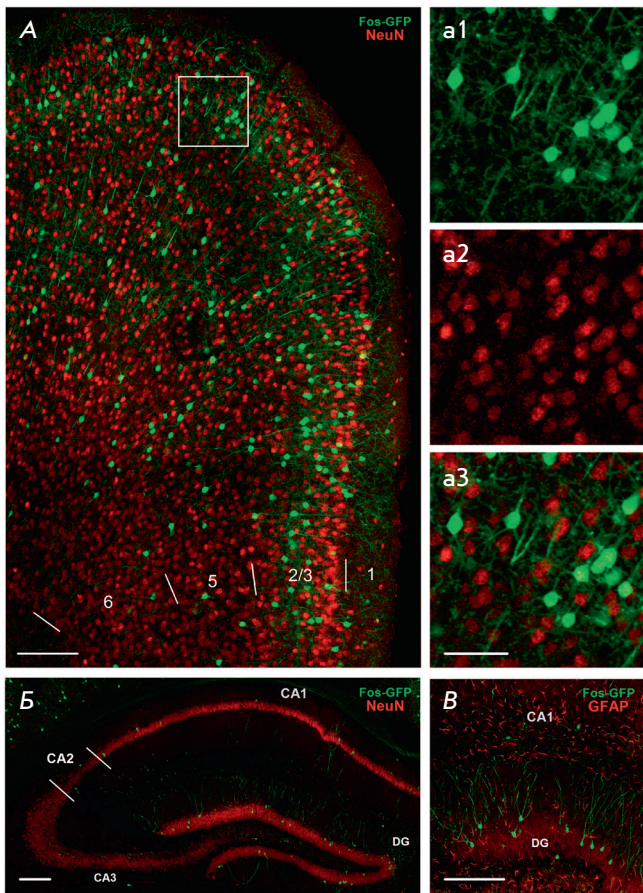


Рис. 3. Опыт-зависимая Cre-рекомбинация происходит только в нейронах. Зеленый канал – eGFP. Красный канал – маркер нейронов NeuN (A, B) или астроцитов GFAP (B). A – неокортекс (фронтальная ассоциативная кора); B, B' – дорсальный гиппокамп; шкала: 150 мкм. На микрофотографиях a1, a2, a3 показана область, выделенная рамкой на A, отдельно по каналам: a1 – цитоплазматическая окраска на eGFP, a2 – ядерная окраска на NeuN, a3 – их наложение; шкала: 70 мкм

маркеров: PV, SOM и NPY [25]. Чтобы определить, к какому типу нейронов относятся клетки, проходящие Cre-рекомбинацию, мы оценили колокализацию белка eGFP и маркера возбуждающих пирамидных нейронов CaMKII или одного из маркеров тормозных интернейронов (PV, SOM и NPY).

Нами не обнаружено колокализации eGFP ни с одним из маркеров интернейронов (рис. 4–6). При этом eGFP-положительные нейроны были также CaMKII-положительными, т.е. относились к возбуждающим пирамидным клеткам (рис. 7). CaMKII-положительные eGFP-положительные нейроны были выявлены в различных слоях неокортекса (рис. 7A), а также в пирамидном слое зоны CA1

и гранулярном слое зубчатой фасции гиппокампа (рис. 7B). При иммуногистохимическом выявлении белка eGFP окрашивались не только тела клеток, но и значительная часть отростков. Визуальный анализ анатомии таких eGFP-положительных клеток также подтвердил заключение о том, что опыт-зависимая Cre-рекомбинация происходила именно в пирамидных клетках (рис. 7B,Г).

Таким образом, по результатам молекулярного фенотипирования клеток было установлено, что опыт-зависимая Cre-рекомбинация у мышей Fos-Cre-eGFP происходит только в нейронах, но не в глиальных клетках. При этом нейроны, проходящие Cre-рекомбинацию, относятся к возбуждающим пирамидным клеткам.

Определение доли клеток, проходящих Cre-рекомбинацию после обследования животным новой обстановки

Для того чтобы определить, какая доля нейронов подвергается опыт-зависимой Cre-рекомбинации после получения животным нового опыта, а также проанализировать паттерны распределения таких клеток в мозге, оценивали количество eGFP-положительных нейронов в различных слоях фронтальной ассоциативной коры у мышей, обследовавших обстановку на фоне действия тамоксифена ($n = 5$). Для оценки доли eGFP-положительных клеток от всех нейронов данного слоя проводили совместное выявление eGFP и маркера зрелых нейронов NeuN [22].

eGFP-положительные клетки обнаружены во всех слоях фронтальной ассоциативной коры, однако их количество было наибольшим в слоях 2/3 и 5 ($F(1.298,5.191) = 41.47$, $p = 0.0009$; попарные сравнения слоев 2/3 и 5 с другими слоями: $p < 0.02$), тогда как в слое 1 выявлялись только единичные нейроны, прошедшие Cre-рекомбинацию (рис. 8A). При этом доля eGFP-положительных клеток от всех нейронов, помеченных NeuN, также была наибольшей в слоях 2/3 и 5 ($F(1.203,4.812) = 7.122$, $p = 0.0425$; попарные сравнения слоев 2/3 и 5 со слоем 6: $p < 0.02$), и для всей фронтальной ассоциативной коры составляла в среднем 11.0% (рис. 8B).

Использование Cre-рекомбинации для выявления двух популяций когнитивно активных нейронов в одном мозге

Активность Cre-рекомбиназы приводит к перманентному маркированию нейронов, активных во временном окне, ограниченном действием тамоксифена. Это открывает возможность повторно помещать такое животное с генетически маркированными нейронами в ситуацию приобретения нового или реактивации прошлого опыта, и затем выявлять в одном мозге две

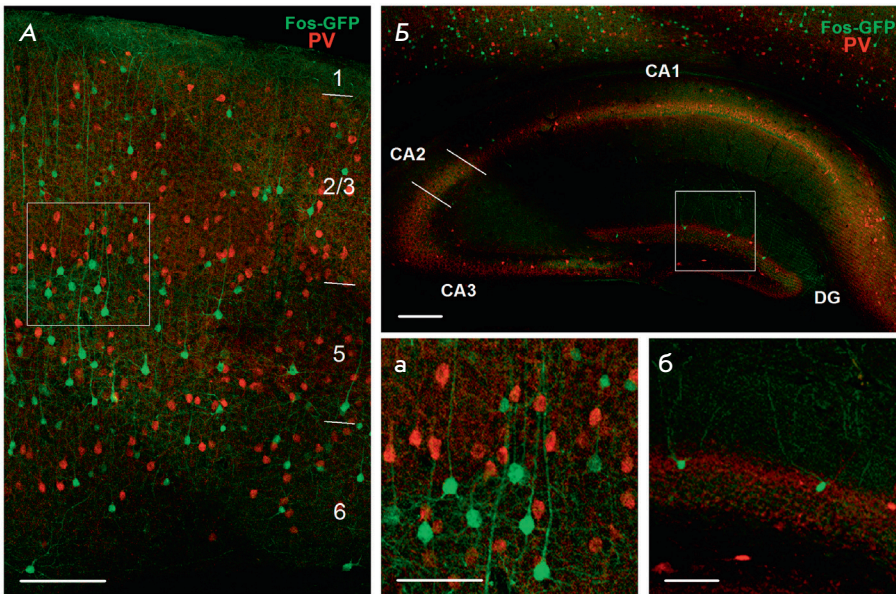


Рис. 4. Совместная окраска на eGFP (нейроны, прошедшие опыт-зависимую Cre-рекомбинацию, зеленый канал) и маркер интернейронов парвальбумин (PV, красный канал). А – неокортекс (фронтальная ассоциативная кора), цифрами отмечены слои неокортекса; Б – дорсальный гиппокамп; шкала: 150 мкм. На микрофотографиях а и б показаны выделенные рамками на А и Б области соответственно; шкала: 70 мкм. CA1 – зона CA1 гиппокампа; CA2 – зона CA2 гиппокампа; CA3 – зона CA3 гиппокампа; DG – зубчатая фасция гиппокампа

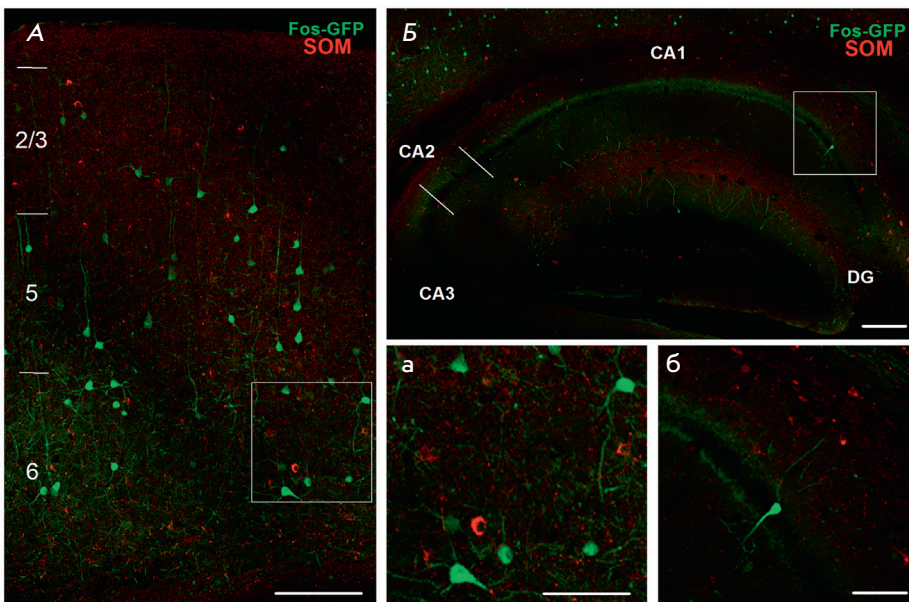


Рис. 5. Совместная окраска на eGFP (нейроны, прошедшие опыт-зависимую Cre-рекомбинацию, зеленый канал) и маркер интернейронов соматостатин (SOM, красный канал). А – неокортекс (фронтальная ассоциативная кора), цифрами отмечены слои неокортекса; Б – дорсальный гиппокамп; шкала: 150 мкм. На микрофотографиях а и б показаны выделенные рамками на А и Б области соответственно; шкала: 70 мкм. CA1 – зона CA1 гиппокампа; CA2 – зона CA2 гиппокампа; CA3 – зона CA3 гиппокампа; DG – зубчатая фасция гиппокампа

отдельные популяции нейронов, активные при двух разных когнитивных нагрузках. При этом нейроны, прошедшие Cre-рекомбинацию после первого когнитивного эпизода, можно выявить по наличию белка eGFP, а нейроны, активированные после второго эпизода, можно визуализировать иммуногистохимически по присутствию белка c-Fos.

Ранее во фронтальной ассоциативной коре выявлен высокий уровень перекрытия популяций нейронов, помеченных при обследовании мышами новой обстановки (первый когнитивный эпизод) и после-

дующем нанесении немедленного ЭКР в этой же обстановке через 25 мин после ее обследования (второй когнитивный эпизод) [26]. В связи с этим в нашем эксперименте для визуализации двух популяций нейронов, вовлеченных в различные когнитивные эпизоды, мышам давали обследовать новую обстановку на фоне действия тамоксифена и через 3 дня наносили немедленное ЭКР. Двойное иммуногистохимическое окрашивание образцов мозга позволило выявить нейроны активные при обследовании обстановки (по белку eGFP) или при нанесении немедленного ЭКР

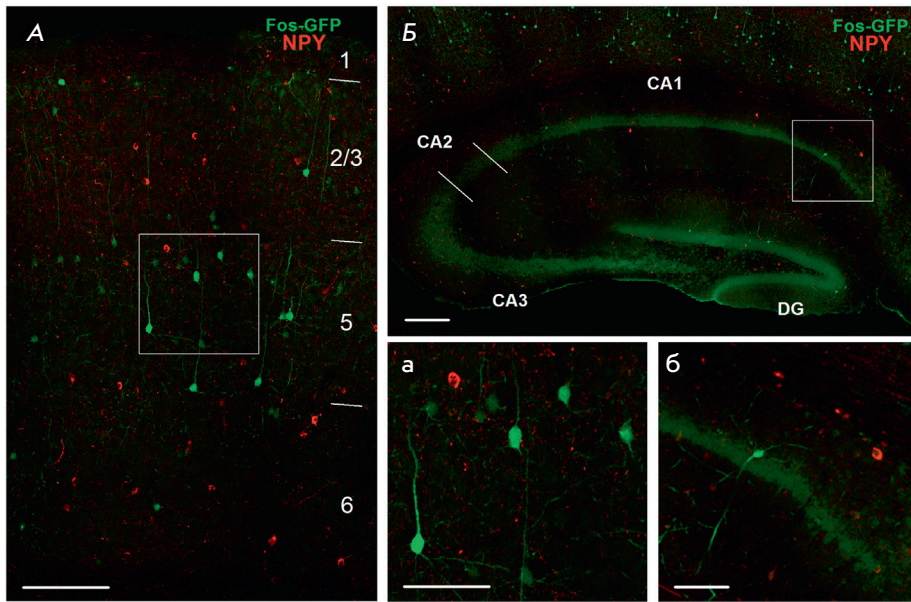


Рис. 6. Совместная окраска на eGFP (нейроны, прошедшие опыт-зависимую Cre-рекомбинацию, зеленый канал) и маркер интернейронов нейропептид Y (NPY, красный канал). А – неокортекс (фронтальная ассоциативная кора), цифрами отмечены слои неокортекса; Б – дорсальный гиппокамп; шкала: 150 мкм. На микрофотографиях а и б показаны выделенные рамками на А и Б области соответственно; шкала: 70 мкм. CA1 – зона CA1 гиппокампа; CA2 – зона CA2 гиппокампа; CA3 – зона CA3 гиппокампа; DG – зубчатая фасция гиппокампа

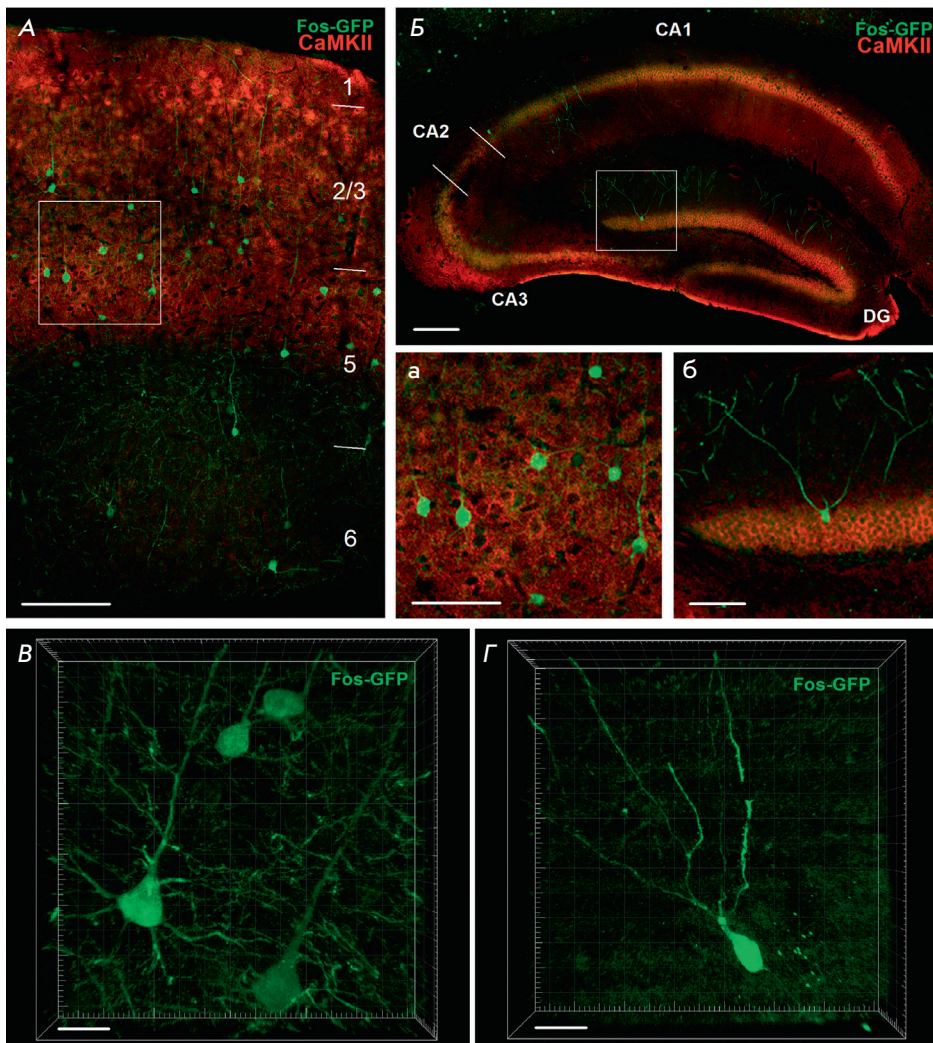


Рис. 7. Колокализация eGFP-положительных нейронов, прошедших опыт-зависимую Cre-рекомбинацию (зеленый канал), с маркером пирамидных нейронов CaMKII (красный канал). А – неокортекс (фронтальная ассоциативная кора), цифрами отмечены слои неокортекса; Б – дорсальный гиппокамп, отмечены зоны CA1, CA2, CA3 и зубчатая фасция (DG); шкала: 150 мкм. На микрофотографиях а и б показаны выделенные рамками на А и Б области соответственно; шкала: 70 мкм. В и Г – микрофотографии отдельных нейронов, прошедших опыт-зависимую Cre-рекомбинацию в неокортексе и гиппокампе соответственно. Видны дендритные деревья клеток и отходящие от сомы аксоны; шкала: 20 мкм

(по белку *c-Fos*), а также нейроны, которые были активны в обоих когнитивных эпизодах (*eGFP* и *c-Fos*) в различных областях мозга мышей (рис. 9).

Нами проведена оценка количества нейронов, активированных при обследовании обстановки и последующем нанесении немедленного ЭКР, а так-

же степени перекрытия этих популяций нейронов, во фронтальной ассоциативной коре мышей группы «А – А + ЭКР» и контрольных мышей из группы «А – В + ЭКР» (рис. 10). Обследование новой обстановки и нанесение немедленного ЭКР активировали сходные по объему популяции нейронов фронтальной ассоциативной коры, однако большее число нейронов активировалось в том случае, если ЭКР наносили в ранее обследованной обстановке А, чем в новой обстановке В (фактор «группа»: $F(1,8) = 12.33, p = 0.0080$; фактор «когнитивный эпизод»: $F(1,8) = 11.37, p = 0.0098$; взаимодействие факторов: $F(1,8) = 3.947, p = 0.0404$; сравнение количества *c-Fos*-положительных клеток у групп «А – А + ЭКР» и «А – В + ЭКР»: $p = 0.0212$) – см. рис. 10А. Кроме того, нанесение ЭКР в знакомой обстановке активировало больше нейронов, чем ее изначальное обследование (сравнение количества *c-Fos*-положительных и *eGFP*-положительных клеток у группы «А – А + ЭКР»: $p = 0.01924$). При этом доля нейронов, активных во время обследования новой обстановки и затем повторно активировавшихся при нанесении ЭКР, была значимо выше у группы «А – А + ЭКР» (48.8%), чем у группы «А – В + ЭКР» (4.2%) – $p < 0.0001$. Аналогичный результат получен и для доли нейронов, активных в обоих когнитивных эпизодах, от всех нейронов, активируемых при нанесении ЭКР (рис. 10Б).

Результаты этого эксперимента указывают на возможность использования метода Cre-управляемого

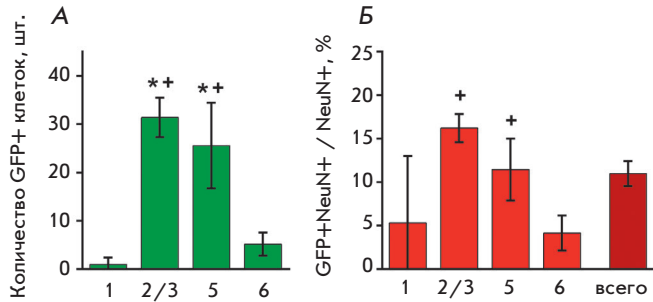


Рис. 8. Анализ паттернов распределения нейронов, прошедших опыт-зависимую Cre-рекомбинацию после обследования животным новой обстановки, по слоям фронтальной ассоциативной коры. А – количество *eGFP*-положительных клеток; Б – доля *eGFP*-положительных клеток от всех нейронов, выявленных по окраске на NeuN. Цифрами обозначены слои неокортекса, столбец «всего» – среднее значение по всей фронтальной ассоциативной коре. * – $p < 0.02$, + – $p < 0.02$ при сравнении со слоями 1 и 6 соответственно, *t*-тест Сидака. Данные представлены как среднее \pm 95% доверительный интервал

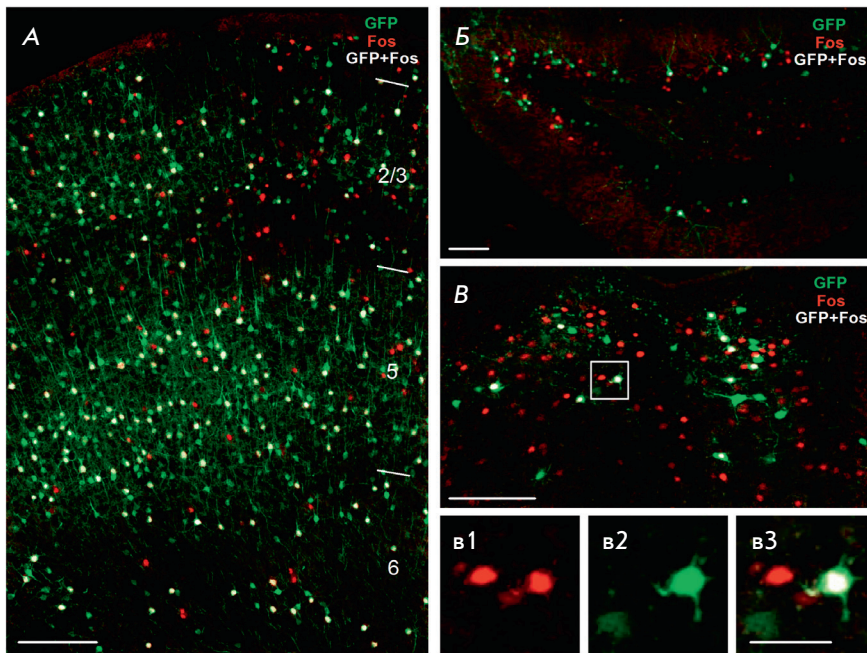


Рис. 9. Иммуногистохимическое выявление нейронов, активных во время двух когнитивных эпизодов. Нейроны, активные во время первого эпизода, обследования новой обстановки, помечены *eGFP* (зеленый канал); клетки, активные во время второго эпизода, нанесения ЭКР, помечены эндогенным белком *c-Fos* (красный канал). Белым псевдоцветом окрашены клетки, положительные как по *eGFP*, так и по *c-Fos* – т.е. активные в обоих когнитивных эпизодах. А – фронтальная ассоциативная кора, цифрами отмечены слои неокортекса; Б – зубчатая фасция гиппокампа; В – паравентрикулярное ядро таламуса; шкала: 100 мкм. На микрофотографиях в1, в2, в3 показана область, выделенная рамкой на В, отдельно по каналам: в1 – цитоплазматическая окраска на *eGFP*; в2 – ядерная окраска на *c-Fos*; в3 – их наложение; шкала: 70 мкм

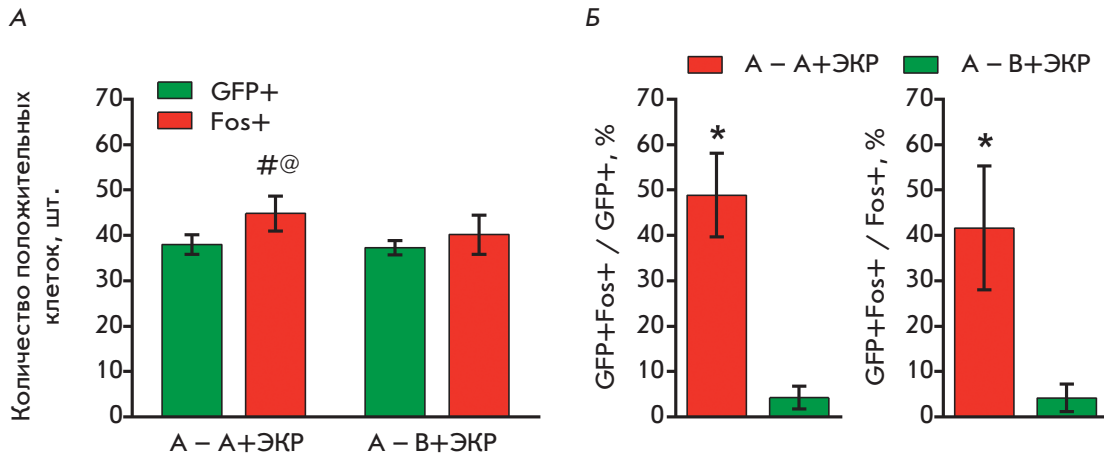


Рис. 10. Количественный анализ перекрытия популяций нейронов фронтальной ассоциативной коры, активных во время двух когнитивных эпизодов. А – популяции нейронов, активных при обследовании обстановки А (клетки, положительные по eGFP) и нанесении немедленного ЭКР (клетки, положительные по c-Fos); Б – доля нейронов, активных в обоих когнитивных эпизодах, от всех нейронов, вовлекшихся в обследование новой обстановки (GFP+Fos+ / GFP+), или от всех нейронов, вовлекшихся в нанесение немедленного ЭКР (GFP+Fos+ / Fos+). # – $p = 0.0192$ при сравнении количества c-Fos-положительных и eGFP-положительных клеток у группы «А – А + ЭКР», @ – $p = 0.0212$ при сравнении количества c-Fos-положительных клеток у групп «А – А + ЭКР» и «А – В + ЭКР», t -тест Сидака; * – $p < 0.0001$ при сравнении с группой «А – В + ЭКР», двухвыборочный t -критерий. Данные представлены как среднее \pm 95% доверительный интервал

генетического маркирования нейронов для выявления и последующего анализа популяций нейронов, активных в одном мозге во время двух разных когнитивных эпизодов.

Ранее для мечения двух популяций когнитивно активных нейронов была применена трансгенная технология, основанная на использовании системы tTA-tetO. В статье Reijmers и соавт. систему tTA-tetO использовали для анализа перекрытий популяций нейронов, активных во время формирования и реактивации памяти [27]. При этом для сопоставления этих популяций использовали два разных генетических маркера транскрипционной активации клеток – *c-fos* и *zif268*. Однако известно, что эти два гена имеют различный базовый уровень экспрессии, различные клеточные функции, разную специфичность по отношению к типам клеток мозга и активируются в ответ на различающиеся типы когнитивной активности животных [28]. Поэтому соотнесение вовлечения популяций нейронов в два эпизода когнитивной активности по этим двум различающимся маркерам представляет большие теоретические сложности и вызывает серьезные возражения. Кроме того, система tTA-tetO имеет и ряд методических ограничений: трансгенным мышам tTA-tetO в течение всей жизни необходимо вводить доксициклин, а генетическое маркирование нейронов возможно только в пе-

риод отмены препарата. При этом временное окно активации системы после отмены доксициклина может занимать несколько дней, что приводит к большому числу неспецифически маркированных нейронов [27, 29]. Таким образом, трансгенная система с Cre-рекомбиназой представляется более адекватной для применения в экспериментах по выявлению в одном мозге двух нейрональных сетей, активных в разных когнитивных эпизодах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе получены двойные трансгенные мыши Fos-Cre-eGFP, у которых в результате опыт-зависимой Cre-рекомбинации происходит генетическое маркирование нейронов, активных в период действия тамоксифена. У данных мышей наблюдали низкий фоновый уровень Cre-рекомбинации в спокойном состоянии и значительное увеличение количества eGFP-экспрессирующих генетически маркированных нейронов после эпизода приобретения нового опыта. Опыт-индуцированная Cre-рекомбинация у этих мышей проходит в большом числе структур головного мозга, принадлежащих к разным функциональным группам. При этом Cre-рекомбинация проходит в пирамидных возбуждающих нейронах, но не в тормозных интернейронах. Также показано, что метод Cre-опосредованного генетического мар-

кирования нейронных сетей может быть успешно применен для выявления в одной нервной системе активности двух разных популяций нейронов, связанных с разными когнитивными эпизодами, а также для анализа степени перекрытия этих популяций нейронов. ●

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00685). Работа проведена с использованием оборудования Ресурсного центра нейрокогнитивных исследований Курчатковского комплекса НБИКС-технологий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анохин К.В. // Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 1997. Т. 47. № 2. С. 262–286.
2. Kaczmarek L. // Handbook of Chem. Neuroanatomy. Amsterdam: Elsevier, 2002. V. 19. P. 189–215.
3. Korb E., Finkbeiner S. // Trends Neurosci. 2011. V. 34. № 11. P. 591–598.
4. Pérez-Cadahía B., Drobic B., Davie J.R. // Biochem. Cell Biol. 2011. V. 89. № 1. P. 61–73.
5. Anokhin K.V., Rose S.P. // Eur. J. Neurosci. 1991. V. 3. № 2. P. 162–167.
6. Alberini C.M. // Physiol. Rev. 2009. V. 89. P. 121–145.
7. Abramova A.B., Anokhin K.V. // Neurosci. Behav. Physiol. 1998. V. 28. № 6. P. 616–619.
8. Zvorykina S.V., Anokhin K.V. // Neurosci. Behav. Physiol. 2004. V. 34. № 8. P. 869–872.
9. Kuptsov P.A., Pleskacheva M.G., Voronkov D.N., Lipp Kh.P., Anokhin K.V. // Neurosci. Behav. Physiol. 2006. V. 36. № 4. P. 341–350.
10. Barth A.L., Gerkin R.C., Dean K.L. // J. Neurosci. 2004. V. 24. № 29. P. 6466–6475.
11. Branda C.S., Dymecki S.M. // Dev. Cell. 2004. V. 6. P. 7–28.
12. Nagy A. // Genesis. 2000. V. 26. P. 99–109.
13. Wu S., Ying G., Wu Q., Capecchi M.R. // Nat. Genet. 2007. V. 39. P. 922–930.
14. Metzger D., Clifford J., Chiba H., Chambon P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 6991–6995.
15. Feil R., Wagner J., Metzger D., Chambon P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. V. 237. P. 752–757.
16. Imayoshi I., Sakamoto M., Kageyama R. // Front. Neurosci. 2011. V. 5. № 64. P. 1–11.
17. Taniguchi H., He M., Wu P., Kim S., Paik R., Sugino K., Kvitsani D., Fu Y., Lu J., Lin Y., et al. // Neuron. 2011. V. 71. P. 998–1013.
18. Guenther C.J., Miyamichi K., Yang H.H., Heller H.C., Luo L. // Neuron. 2013. V. 78. № 5. P. 773–784.
19. Воробьева Н.С., Ивашкина О.И., Торопова К.А., Анохин К.В. // Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2016. Т. 66. № 3. С. 352–360.
20. Franklin K.B.J., Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 3rd ed. N.Y.: Acad. Press, 2007. 346 p.
21. Tovote P., Fadok J.P., Lüthi A. // Nat. Rev. Neurosci. 2015. V. 16. P. 317–331.
22. Mullen R.J., Buck C.R., Smith A.M. // Development. 1992. V. 116. № 1. P. 201–211.
23. Funchs E., Weber K. // Annu. Rev. Biochem. 1994. V. 63. P. 345–382.
24. Liu X.B., Murray K.D. // Epilepsia. 2012. V. 53. P. 45–52.
25. Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y., Gupta A., Silberberg G., Wu C. // Nat. Rev. Neurosci. 2004. V. 5. № 10. P. 793–807.
26. Nakayama D., Baraki Z., Onoue K., Ikegaya Y., Matsuki N., Nomura H. // Curr. Biol. 2015. V. 25. № 1. P. 117–123.
27. Reijmers L.G., Perkins B.L., Matsuo N., Mayford M. // Science. 2007. V. 317. P. 1230–1233.
28. Lee J.L., Everitt B.J., Thomas K.L. // Science. 2004. V. 304. № 5672. P. 839–843.
29. Glazewski S., Bejar R., Mayford M., Fox K. // Neuropharmacology. 2001. V. 41. P. 771–778.