

ОРИГИНАЛЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ИНДИКАТОРА КАЛЬЦИЯ GCaMP6m ДЛЯ ДВУХФОТОННОЙ КАЛЬЦИЕВОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ В МОЗГЕ НОВОРОЖДЕННЫХ МЫШЕЙ

Д. Ахметшина^{1,2}, В. Виллет¹, Т. Трессард¹, А. Мальваш¹, Р. Хазипов^{1,2}, Р. Коссар¹

¹Средиземноморский институт нейробиологии INSERM U901–INMED, Марсель, Франция

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Genetically encoded calcium indicator GCaMP6m for two-photon calcium imaging in newborn mouse cerebral cortex

D. Akhmetshina^{1,2}, V. Villette¹, T. Tressard¹, A. Malvache¹, R. Khazipov^{1,2}, R. Cossart¹

¹Mediterranean Institute of Neurobiology INSERM U901–INMED, Marseille, France

²Kazan (Volga Region) Federal University, Russia, Kazan

Кальций является универсальным внутриклеточным посредником во многих тканях и органах. В нервной системе генерация потенциалов действия запускает значительные кратковременные изменения свободной концентрации кальция в цитоплазме нейронов. Генетически кодируемые индикаторы кальция многократно усовершенствовались и теперь становятся все более пригодными для имиджинга активности популяций нейронов *in vivo*. Среди них GCaMP6m недавно был разработан как ультрачувствительный кальциевый сенсор в экспериментах *in vivo*. Однако остается неизвестным, можно ли использовать генетически кодируемые индикаторы кальция в исследованиях ранних паттернов активности коры развивающегося головного мозга. В настоящем исследовании описана методика ранней экспрессии кальциевого сенсора GCaMP6m в коре головного мозга мышей *in vivo*, которая может быть использована для характеристики популяционной активности нейронов в постнатальном периоде. Инъекция аденоассоциированного вируса (AAV) со встроеным геном GCaMP6m в область баррел кортекса (область представительства вибрисс) первичной соматосенсорной коры мозга новорожденных мышей проводилась на 0–2 день после рождения (P0–2). Через три дня после инъекции вируса в большинстве нейронов соматосенсорной коры в зоне диаметром около 1 мм была отмечена флуоресцентная маркировка цитоплазмы, дендритов и аксонов. Двухфотонный кальциевый имиджинг на возрасте P5–7 *in vivo* выявил спонтанные кальциевые транзиенты в нейронах соматосенсорной коры, которые также вызывались стимуляцией вибрисс, проецирующих в исследуемые участки коры головного мозга *in vivo*. Таким образом, трансфекция GCaMP6m в кору в первые дни после рождения позволяет добиться уровня экспрессии этого кальциевого индикатора, достаточного для исследования нейрональных популяций в области баррел кортекса первичной соматосенсорной коры мозга мышей *in vivo* на возрасте P5–7.

Ключевые слова: генетически кодируемый индикатор кальция, GCaMP6m, аденоассоциированный вирус, двухфотонный кальциевый имиджинг *in vivo*, соматосенсорная кора, баррел кортекс.

Calcium is a universal messenger regulating essential cellular signaling events in many tissues and organisms. In neurons, action potentials trigger large and rapid changes in cytoplasmic-free calcium concentration. Genetically encoded calcium indicators (GECIs) have been iteratively improved and are becoming useful for quantitative imaging of activity in defined neuronal populations *in vivo*. Among them, GCaMP6m has been recently introduced as an ultrasensitive calcium sensor for the experiments *in vivo*. Whether GECIs can be used in developmental studies to characterize early activity patterns in the immature cerebral cortex remains unknown, however. We used *in vivo* two-photon calcium imaging with GCaMP6m calcium indicator to characterize its developmental expression following adeno-associated virus (AAV) mediated viral induction of GCaMP6m expression in newborn mice (at postnatal days P0–2). Three days after virus injection, the vast majority of neurons showed fluorescent labeling in the neuronal cytoplasm, dendrites and axons. We found that the GCaMP6m calcium sensor is expressed in the cerebral cortex within 3–5 days following transfection at levels that enable monitoring spontaneous and sensory-evoked calcium transients in the intact mice barrel cortex *in vivo*. Thus, following GCaMP6m transfection at birth, it is possible to monitor neuronal populations in the barrel field of somatosensory cortex in P5–7 mice *in vivo*.

Key words: genetically encoded calcium indicator, GCaMP6m, adeno-associated virus, *in vivo* two-photon calcium imaging, somatosensory cortex, barrel cortex.

У новорожденных грызунов развитие коры больших полушарий мозга характеризуется особыми паттернами коллективной нейрональной активности, которые, как считается, участвуют в нейрональной дифференциации и формировании нейрональных сетей [1–5]. Гомологичные паттерны активности также обнаруживаются у человека в пренатальном периоде развития [6–12]. Считается, что активация кальциевых ионных каналов и транзиенты внутриклеточного кальция, ассоциированные с этими ранними паттернами активности, контролируют экспрессию

генов, миграцию, рост дендритов и аксонов, формирование синапсов и синаптическую пластичность [13, 14]. В свою очередь, визуализация внутриклеточных кальциевых транзиентов может также являться инструментом для исследования активности мозга. С этой целью широко применяются различные синтетические индикаторы кальция как *in vitro* [15], так и *in vivo* [7, 16]. Однако загрузка синтетических индикаторов является инвазивной, а также исключает хронические эксперименты *in vivo* [17]. Как альтернатива этому подходу, генетически кодируемые флуо-

ресцентные кальций-связывающие белки являются оптимальными как индикаторы внутриклеточной концентрации ионов кальция и имиджинга активности популяций нейронов *in vivo* [17]. Преимущества данных сенсоров в том, что их мишенями могут быть специфичные типы клеток [18] и они удобны для проведения хронических экспериментов *in vivo* [19]. В результате совершенствования различных типов флуоресцентных кальциевых сенсоров был создан GCaMP6m как ультрачувствительный кальциевый индикатор [20]. При этом остается открытым вопрос о том, насколько быстро этот белок экспрессируется после трансфекции кодирующего его гена и можно ли использовать этот кальциевый индикатор для исследования нейрональной активности у новорожденных животных. В настоящей работе нами описана методика трансфекции нейронов коры головного мозга новорожденных мышей с помощью вируса, в который встроен ген, кодирующий GCaMP6m, что обеспечивает удовлетворительную экспрессию GCaMP6m уже через 3–4 дня после трансфекции и позволяет исследовать кальциевые транзистенты в нейронах коры с использованием двухфотонной микроскопии *in vivo* уже на 5–7 день после рождения.

Материал и методы

Трансфекция нейронов геном GCaMP6m

Генетически кодируемый индикатор кальция GCaMP6m состоит из двух частей: усиленного зеленого флуоресцентного белка кольцевой формы (сrEGFP) и кальций-связывающего белка кальмодулина (CaM), которые соединены связующим звеном (сrEGFP-CaM linker) [20]. GCaMP6m имеет спектр возбуждения, равный 920 нм, и спектр эмиссии в 510 нм. Для трансфекции нейронов геном, кодирующим GCaMP6m, использовался аденоассоциированный вирусный вектор, в ген которого был встроен ген GCaMP6m — AAV2/1.Syn.GCaMP6M.WPRE.SV40 (Penn Vector Core). Введение GCaMP6m-вируса в кору головного мозга мышей (породы Swiss и линий GAD67-CRE, A114) производилось животным в возрасте P0–2 (P — день после рождения, P0 — день рождения).

Изначально, над областью представительства вибрисс (баррел кортекса) в коре левого полушария мозга в условиях холодовой анестезии кожа головы осторожно разрезалась, в черепе с помощью микродрели высверливалось трепанационное отверстие. Вирус вводился в концентрации 10^{12} вирусных ч/мл с помощью стеклянной пипетки в объеме 3 мкл (на одну инъекцию) на глубину 300–400 мкм под углом 20° к поверхности мозга. Инъекция длилась

5–10 мин под давлением 0,51–4,7 КПа (4–35 мм рт. ст.). Координаты центра баррел кортекса были следующими: латерально от брегмы на 1,8–2,1 мм и каудально от брегмы на 0,5–0,6 мм. Вирус вводили латеральнее на 0,3–0,4 мм от координат центра баррел кортекса: латерально от брегмы на 2,3 мм и каудально от брегмы на 0,9 мм (рис. 2А). После инъекции вируса на надраз в коже черепа прикладывали гемостатическую губку для того, чтобы остановить кровь и обеспечить заживление раны. Далее новорожденных мышей клали на подогретый столик (36–38°C) на 30 мин, а затем возвращали в клетку.

Подготовка животных к прижизненной биовизуализации нейронов

Через три дня после инъекции вируса (мыши возрастом P5–7) под ингаляционной анестезией изофлураном (3–4% в чистом кислороде, 800 мл/мин) проводилось удаление кожи черепа, шейных и ушных мышц, очистка и сушка поверхности черепа (рис. 2Б). Далее в области левого полушария относительно брегмы ставилась отметка с координатами центра баррел кортекса: латерально от брегмы на 2,3–3,0 мм и каудально от брегмы на 0,5–1,0 мм. Затем всю область черепа, кроме левого полушария, покрывали цианакриламидным клеем и приклеивали кольцеобразную пластинку для фиксации головы. Место крепления пластинки к черепу укреплялось стоматологическим цементом, пластинка фиксировалась к стойке крепления (рис. 2Б). Последующие процедуры проводились без общего наркоза. На поверхность черепа, находящуюся внутри кольца фиксирующей пластинки, апплицировался раствор лидокаина с адреналином на 2 мин. Далее выполнялась трепанация черепа (отверстие диаметром 4 мм) по границе пластинки. При этом череп и обнаженная в дальнейшем поверхность мозга периодически орошалась натрий-фосфатным буфером. Затем осторожно удаляли высверленный фрагмент крыши черепа, не касаясь твердой мозговой оболочки. Далее поверхность мозга многократно омывалась натрий-фосфатным буфером вплоть до полной остановки кровотечения. После этого на обнаженную поверхность мозга накладывалось круглое покровное стекло диаметром 3 мм. Затем покровное стекло слегка прижималось с помощью иглы, укрепленной на микроманипуляторе и приклеивалось к краю крыши черепа с помощью цианакриламидного клея (рис. 2В, Г). Поверхность покровного стекла очищалась салфеткой и животное с фиксированной головой переносилось в микроскопическую установку.

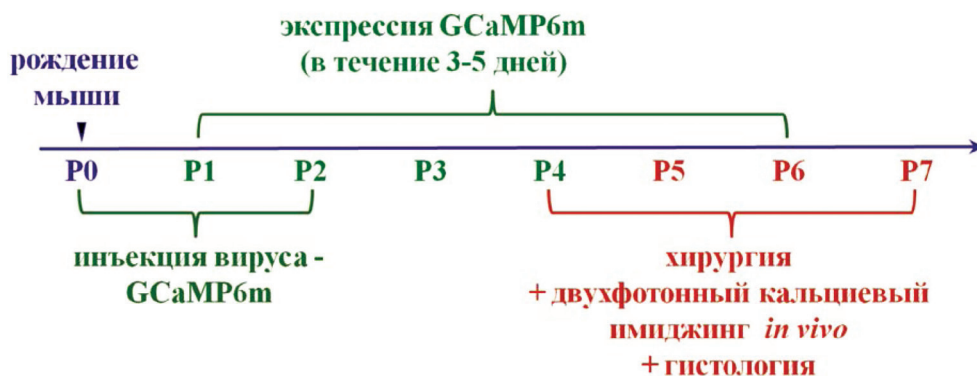


Рис. 1.
Дизайн эксперимента.
P — постнатальные дни

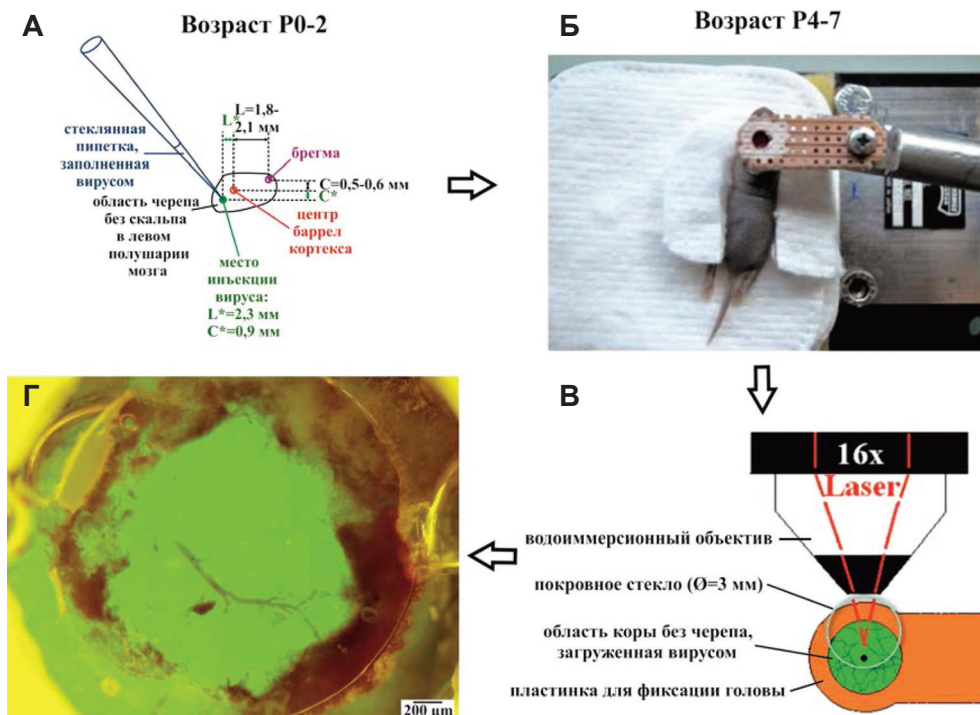


Рис. 2. Схема методики инъекции вируса GCaMP6m и подготовка новорожденной мыши к прижизненной визуализации нейронов головного мозга: А — инъекция адено-ассоциированного вируса GCaMP6m в область баррел кортекса первичной соматосенсорной коры мозга новорожденной мыши возрастом P0-2; Б — животное возрастом P5 после операции, подготовленное для дальнейшего наложения покровного стекла на область коры, трансфицированной вирусом GCaMP6m; В — подготовки к имиджингу; Г — область соматосенсорной коры, «загруженная» вирусом GCaMP6m, под покровным стеклом диаметром 3 мм

Двухфотонный кальциевый имиджинг *in vivo*

В течение всего эксперимента под животное подкладывалась термостатируемая пластинка (36–38°C). Визуализацию проводили с использованием двухфотонного лазерного микроскопа на базе TriM Scope II, LaVision Biotech. Для возбуждения GCaMP6m использовался лазер на основе кристалла Ti:sapphire (Chameleon Ultra II, Coherent) на длине волны 920 нм (с мощностью порядка <20 мВт). Флуоресценция GCaMP6m измерялась после филь-

рования сигнала (510/25 нм). Получаемые изображения кальциевых транзиев записывались с помощью видеокамеры GaSP PMT (H7422-40, Hamamatsu) с использованием иммерсионного объектива $\times 16$ (NIKON, NA 0.8) (рис. 4). Для записи видеоданных использовался программный пакет Inspector software (LaVision Biotech, США), с помощью которого производилась запись флуоресцентной активности окна размером 635×635 мкм с частотой 9,62 Гц.

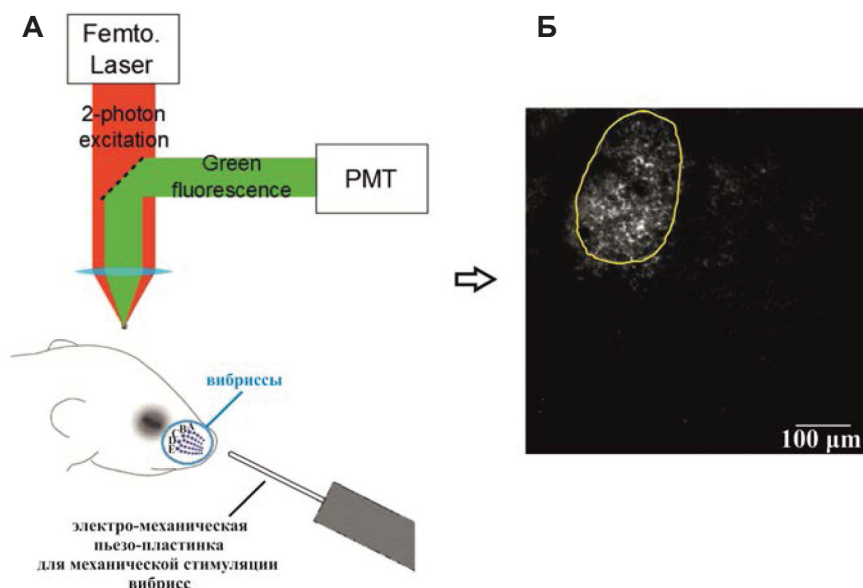


Рис. 4. Схема методики визуализации внутриклеточного кальция с помощью GCaMP6m *in vivo*: А — схема методики имиджинга *in vivo* в мозге новорожденной мыши возрастом P4-7 с использованием двухфотонного лазерного микроскопа; Б — пример кальциевого транзientа, вызванного в области баррел кортекса первичной соматосенсорной коры мозга механической стимуляцией одной вибриссы с помощью электро-механической пьезо-пластинки

Гистологический анализ

После декапитации мозг мышей извлекался и фиксировался в параформальдегиде (4%) в течение суток, затем отмывался в натрий-фосфатном буфере в течение 30 мин. Корональные срезы толщиной 100 мкм выполнялись с помощью виброслайсера. Микрофотографии GFP-флюоресценции получали с использованием микроскопа Zeiss AxioImager Z2, оснащенного камерой (Zeiss AxioCam MR3), и лампы HBO с фильтром 470/40 нм (рис. 3).

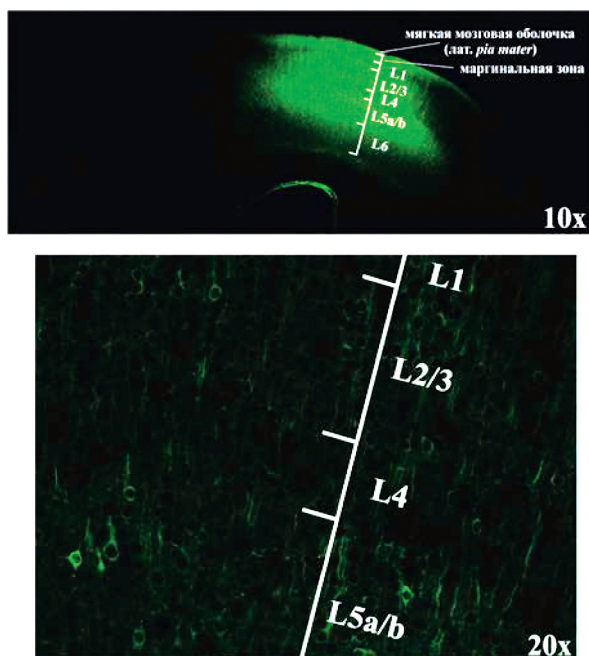
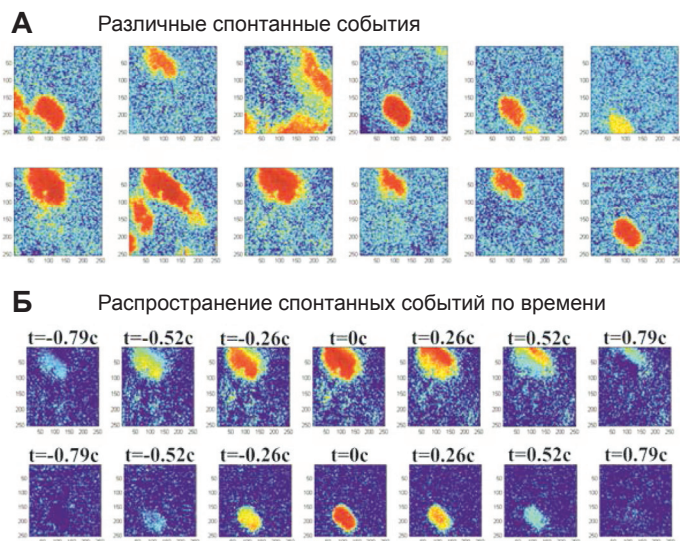


Рис. 3. Кора головного мозга новорожденной мыши возрастом P5. L1 – L6 – слои коры головного мозга, экспрессия GFP. Флуоресцентная микроскопия

Результаты и обсуждение

Для исследования экспрессии GCaMP6m после трансфекции, которая производилась у мышей на 1–2 день после рождения, на первом этапе нами был произведен флуоресцентный микроскопический анализ срезов головного мозга на предмет экспрессии GFP, который является одним из компонентов молекулы GCaMP6m. Нами было обнаружено, что GFP удовлетворительно экспрессируется в тканях животных возрастом P5–7. На рис. 3 представлен пример микрофотографии среза коры головного 5-дневной мыши, на котором хорошо видна экспрессия GFP во всех слоях коры (область баррел кортекса первичной соматосенсорной коры) в зоне диаметром около 1 мм. На клеточном уровне было хорошо выражена флуоресцентная маркировка цитоплазмы, дендритов и аксонов нейронов (см. рис. 3).

На следующем этапе нами была проведена регистрация кальций-зависимой флюоресценции GCaMP6m в коре головного мозга 5–7-дневных мышат *in vivo* ($n = 5$). Для этого использовалась высокоскоростная двухфотонная микроскопия, как схематически изображено на рис. 4. Нами регистрировалось два типа активности: спонтанная активность и активность, вызываемая механической стимуляцией вибрисс, которые проецировали в исследуемые участки соматосенсорной коры. На рис. 5 приведены примеры спонтанных всплесков внутриклеточного кальция. Характерной особенностью кальциевых событий являлось то, что большинство из них были ограничены зонами около 100–300 микрон в диаметре, что вполне соответствует «доменам», которые были ранее описаны в коре новорожденных мышат с использованием химических кальциевых индикаторов [21]. Типичная длительность кальциевых транзиентов составляла около 1–2 с, что сопоставимо с длительностью эпизодов спонтанной активности, описанных с использованием электрофизиологических методов (так называемые спиндл-берсты и ранние гамма-осцилляции) [22–24]. Пример динамики одного из таких событий приведен на рисунке 5. Характерной особенностью спонтанных кальциевых транзиентов являлось также то, что кальциевые домены были пространственно сегрегированы (рис. 5).



В 6 различных спонтанных событий

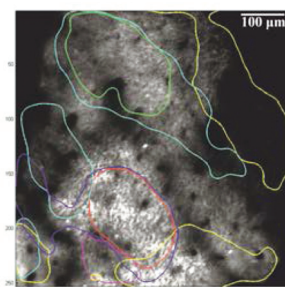


Рис. 5. Кальциевый имиджинг спонтанных событий *in vivo* в области баррел кортекса первичной соматосенсорной коры мозга новорожденной мыши возрастом P7:

А – примеры спонтанных кальциевых транзиентов;
Б – динамика двух типичных кальциевых транзиентов (t – время, $t = 0$ соответствует пику кальциевой флуоресценции);
В – кальциевые домены, которые активировались во время 6 последовательных кальциевых транзиентов (калибровочная шкала 100 мкм)

Механическая стимуляция вибрисс, проецирующих в исследуемые участки соматосенсорной коры, выявила кальциевые транзисты в участках коры около 100–300 мкм в диаметре, что вполне соответствует размеру кортикальных колонок ($n = 1$ мышь возраста P5). На рисунке 6А приведены примеры усредненных ответов, вызываемых стимуляцией 3 соседних вибрисс (D2, D3, C3) у 5-дневного животного, а на рисунке 6Б обозначены соответствующие зоны активации. В соответствии с полученными ранее электрофизиологическими данными о ранней сегрегации сенсорно-вызываемой активности [25, 26], анализ кальциевых транзистов также выявил значительную пространственную сегрегацию событий, вызываемых стимуляцией соседних вибрисс. При этом зоны активации в ряду частично перекрывались (рис. 6Б), что также находится в соответствии с анализом электрической активности [25].

Результаты настоящего исследования указывают на то, что кальциевый сенсор GCaMP6m экспрессируется в коре головного мозга в течение 3–5 дней после введения вирусного вектора на 1–2 день после рождения, и что с его использованием возможна регистрация кальциевых транзистов, возникающих в соматосенсорной коре новорожденных мышей возрастом P5–7 как во время спонтанной активности, так и во время ответов, вызываемых стимуляцией одиночных вибрисс. Обнаруженные в настоящем исследовании домены активации во время спонтанной и сенсорно-вызванной активности вполне согласуются с полученными ранее электрофизиологическими и имиджинговыми данными [25, 27–29], что в дальнейшем позволит использовать данную методику для более детального анализа пространственно-временных характеристик ранних паттернов активности в коре головного мозга.

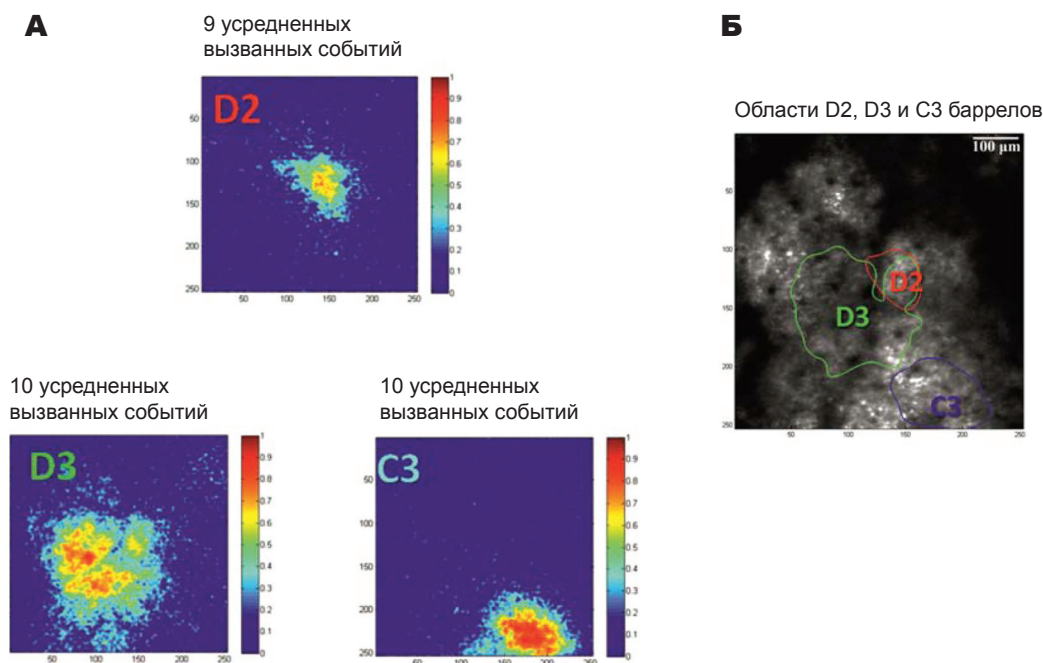


Рис. 6. Имиджинг кальциевых транзистов, вызываемых стимуляцией соседних вибрисс в области баррел кортекса первичной соматосенсорной коры новорожденной мыши возрастом P5: А – усредненные ответы на стимуляцию вибрисс D2, D3 и C3; Б – сопоставление областей, активируемых стимуляцией вибрисс D2, D3 и C3

Благодарности

Работа поддержана грантом FP7-ERC «GABA Networks» № 242842 (Р. Коссар), грантом Правительства РФ ведущим ученым №11.G34.31.0075 (Р. Хазилов) и программой конкурентного развития Казанского федерального университета. Авторы

благодарят Vivek Jayaraman, Ph.D., Rex A. Kerr, Ph.D., Douglas S. Kim, Ph.D., Loren L. Looger, Ph.D., Karel Svoboda, Ph.D., GENIE Project, Janelia Farm Research Campus, Howard Hughes Medical Institute GENIE Program и Janelia за предоставление гена GCaMP6m.

ЛИТЕРАТУРА:

- Garaschuk O., Linn J., Eilers J. et al. Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat. Neurosci.* 2000; 3: 452–9.
- Khazipov R., Sirota A., Leinekugel X. et al. Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature* 2004; 432: 758–61.
- Minlebaev M., Colonnese M., Tsintsadze T. et al. Early gamma oscillations synchronize developing thalamus and cortex. *Science* 2011; 334: 226–9.
- Khazipov R., Minlebaev M., Valeeva G. Early gamma oscillations. *Neuroscience* 2013; 250: 240–52.
- Gerasimova E.V., Zakharov A.V., Lebedeva J.A. et al. Sensory evoked responses in somatosensory cortex of neonatal rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013; 268–72.
- Dreyfus-Brisac C., Larroche J.C. Discontinuous electroencephalograms in the premature newborn and at term. *Electro-anatomo-clinical correlations (in French)*. *Rev. Electroencephalogr. Neurophysiol. Clin.* 1971; 1: 95–9.

- Stosiek C., Garaschuk O., Holthoff K. et al. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Neuroscience* 2003; 100(12): 7319–24.
- Kerr J.N., Greenberg D., Helmchen F. Imaging input and output of neocortical networks *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 14063–8.
- Hromádka T., Deweese M.R., Zador A.M. Sparse representation of sounds in the unanesthetized auditory cortex. *PLoS Biol.* 2008; 6(1): e16.
- Milh M., Kaminska A., Huon C. et al. Rapid Cortical Oscillations and Early Motor Activity in Premature Human Neonate. *Cerebral Cortex* 2007; 17: 1582–94.
- Colonnese M.T., Kaminska A., Minlebaev M. et al. A conserved switch in sensory processing prepares developing neocortex for vision. *Neuron* 2010; 67: 480–98.
- Colonnese M., Khazipov R. Spontaneous activity in developing sensory circuits: Implications for resting state fMRI. *Neuroimage* 2012; 62(4): 2212–21.

13. Gomez T.M., Spitzer N.C. In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* 1999; 397(6717): 350-5.
14. Allene C., Cattani A., Ackman J.B. et al. Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *J. Neurosci.* 2008; 28: 12851-63.
15. Yuste R., Peinado A., Katz L.C. Neuronal domains in developing neocortex. *Science* 1992; 257: 665-9.
16. Fetcho J.R., Cox K.J., O'Malley D.M. Monitoring activity in neuronal populations with single-cell resolution in a behaving vertebrate. *Histochem. J.* 1998; 30: 153-67.
17. Tian L., Hires S.A., Mao T. et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature* 2009; 461(7262): 875-81.
18. Palmer A.E., Tsien R.Y. Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat. Protocols* 2006; 1: 1057-65.
19. Mank M., Santos A.F., Drenth S. et al. A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging. *Nat. Methods* 2008; 5(9): 805-11.
20. Chen T.-W., Wardill T.J., Sun Y. et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 2013; 499: 295-300.
21. Golshani P., Goncalves J.T., Khoshkhoo S. et al. Internally mediated developmental desynchronization of neocortical network activity. *J. Neurosci.* 2009a; 29: 10890-9.
22. Khazipov R., Sirota A., Leinekugel X. et al. Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature* 2004a; 432: 758-61.
23. Minlebaev M., Ben-Ari Y., Khazipov R. Network mechanisms of spindle-burst oscillations in the neonatal rat barrel cortex in vivo. *J. Neurophys.* 2007; 97: 692-700.
24. Yang J.W., Hanganu-Opatz I.L., Sun J.J. et al. Three patterns of oscillatory activity differentially synchronize developing neocortical networks in vivo. *J. Neurosci.* 2009a; 29: 9011-25.
25. Mitrukina O., Suchkov D., Khazipov R. et al. Imprecise Whisker map in the neonatal rat barrel cortex. *Cereb. Cortex*. 2014 Aug 6; pii: bhu169.
26. Yang J.W., An S., Sun J.J. et al. Thalamic network oscillations synchronize ontogenetic columns in the newborn rat barrel cortex. *Cereb. Cortex* 2013; 23: 1299-316.
27. Khazipov R., Sirota A., Leinekugel X. et al. Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature* 2004b; 432: 758-61.
28. Golshani P., Goncalves J.T., Khoshkhoo S. et al. Internally mediated developmental desynchronization of neocortical network activity. *J. Neurosci.* 2009b; 29: 10890-9.
29. Yang J.W., Hanganu-Opatz I.L., Sun J.J. et al. Three patterns of oscillatory activity differentially synchronize developing neocortical networks in vivo. *J. Neurosci.* 2009b; 29: 9011-25.

Поступила: 29.08.2014