

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-08

Физиологическая генетика

Оценка корректности взятия дорзальной и вентральной частей гиппокампа у лисиц для молекулярно-генетических исследований

Ю.В. Александрович¹, Ю.В. Маковка^{1,2}, Л.В. Мейстер¹, Ю.Э. Гербек¹

Аннотация: В статье представлен эффективный молекулярно-генетический инструмент для оценки чистоты раздельного сбора образцов дорзальной и вентральной частей гиппокампа и его оболочек у лисиц (*Vulpes vulpes*). Данный метод основан на определении экспрессии генов *NR2F2*, *HSD11B1* и *ALDH1A2* и необходим при исследовании механизмов гиппокамп-зависимого поведения, стресса и нейрогенеза в гиппокампе.

Ключевые слова: лисицы; дорзальный гиппокамп; вентральный гиппокамп; оболочки гиппокампа.

Благодарности: Исследование выполнено в рамках бюджетного проекта № 0259-2021-0016. Авторы выражают благодарность А.В. Владимировой, А.В. Харламовой, И.В. Пивоваровой, Т.И. Семёновой и всему персоналу ЦКП «Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных» за помощь в работе.

Для цитирования: Александрович Ю.В., Маковка Ю.В., Мейстер Л.В., Гербек Ю.Э. Оценка корректности взятия дорзальной и вентральной частей гиппокампа у лисиц для молекулярно-генетических исследований. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(2):71-74. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-08

Physiological genetics

Assessing the correctness of dorsal and ventral hippocampal sampling in foxes

Yu.V. Alexandrovich¹, Yu.V. Makovka^{1,2}, L.V. Meister^{1,2}, Yu.E. Herbeck¹

Abstract: The article presents an effective molecular genetic tool for assessing the purity of separate collection of samples of the dorsal and ventral parts of the hippocampus and its envelopes in foxes (*Vulpes vulpes*). This method is based on the determination of *NR2F2*, *HSD11B1*, and *ALDH1A2* gene expression and is essential in the study of mechanisms of hippocampal-dependent behavior, stress, and neurogenesis in the hippocampus.

Key words: foxes; dorsal hippocampus; ventral hippocampus; hippocampal meninges.

For citation: Alexandrovich Yu.V., Makovka Yu.V., Meister L.V., Herbeck Yu.E. Assessing the correctness of dorsal and ventral hippocampal sampling in foxes. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(2):71-74. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-08 (in Russian)

Введение

Изучение поведения и нейрофизиологии лисиц на современном этапе развития науки требует исследования молекулярно-генетических механизмов этих процессов. Одной из важных структур мозга, участвующих в создании ряда форм поведения мозга, служит гиппокамп, отличающийся


от большинства отделов в частности тем, что образование новых нейронов в нем происходит на протяжении всей жизни организма. Гиппокамп характеризуется значительной многофункциональностью: принимает участие в формировании эмоций и консолидации памяти, регуляции стресс-ответов, пространственной памяти, социальном рас-


¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 alexandrovich@bionet.nsc.ru

 Александрович Ю.В., Маковка Ю.В., Мейстер Л.В., Гербек Ю.Э., 2021

Праймеры, использованные для количественной ПЦР

Primers used for real-time PCR analysis

Ген / Gene	Праймеры / Primer set
<i>NR2F2</i>	fNR2F2-F3: 5'-AGCCAAGGAATGTGTCCAAG-3' fNR2F2-R3: 5'-CAATTCAGGAACCTAAGCGGGA-3'
<i>HSD11B1</i>	fHSD11B1-F2: 5'-GCAAGGGGATTGGAGAACAG-3' fHSD11B1-R2: 5'-GGTGCCAGGAATGTAGTGTG-3'
<i>ALDH1A2</i>	fALDH1A2-F5: 5'-GGGAGAGTGTTCCTGTCTA-3' fALDH1A2-R5: 5'-GCACCGCTTTGTCTATGTCT-3'
<i>CANX</i>	CANX-F1: 5'-GATGCCCTGCTAAGATTCC-3' CANX-R1: 5'-CTTCATCCCAATCCTCTGGC-3'

познавании и принятии решений (Amaral, Lavenex, 2007). Однако важной характеристикой гиппокампа является его морфофункциональная неоднородность: в частности, вдоль дорзовентральной оси функциональное значение гиппокампа меняется (Cembrowski et al., 2016). Считается, что дорзальная (верхняя) часть в большей степени связана с формированием пространственной памяти, а вентральная (нижняя) – с регуляцией ответа на стресс. Вероятно, эти функциональные различия во многом вызваны положением гиппокампа и его частей в мозге. Так, дорзальная часть имеет больше проекций в кору головного мозга, где формируются когнитивные реакции, а вентральная – в структуры лимбической системы, такие как миндалина и гипоталамус, играющие существенную роль в регуляции ответа на стресс и эмоциональном окрашивании поведенческих реакций. Кроме того, к гиппокампу прилегают сосудистая оболочка и центральный сосуд, выполняющие определенные функции. Например, кровь переносит в клетки оболочки витамин А, из которого синтезируется ретиноевая кислота, необходимая для инициации нейрогенеза (Mishra et al., 2018).

Молекулярно-генетические исследования частей гиппокампа необходимо проводить отдельно и контролировать чистоту взятия образцов. Например, при диссекции зубчатой извилины у мышей разработана система проверки корректности взятия образцов с помощью анализа экспрессии специфических генов (Nagihara et al., 2009). В известных нам исследованиях очистку от оболочек и корректность взятия дорзальной и вентральной частей проверяли лишь визуально (Stoney et al., 2016), что могло привести к ряду недочетов.

В статье предложен точный метод определения корректности и чистоты взятия образцов гиппокампа лисиц, основанный на сравнении экспрессии генов *NR2F2* и *HSD11B1* в вентральном и дорзальном гиппокампе и оценке экспрессии гена *ALDH1A2*, характерного для сосудистых оболочек гиппокампа.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Исследование проведено на трех группах серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*): domesticируемых, агрессивных и неселекционируемых. Лисиц содержали на экспериментальной ферме в ЦКП «Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных» ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Селекцию ведут более 50 лет на эмоционально-положительную (у domesticируемых) или агрессивно-оборонительную (у агрессивных) реакции по отношению к человеку (Трут и др., 2004). Интактных 7-8-месячных самцов умерщвляли путем введения 5.0% раствора тиопентала натрия. Для исследования взяты оболочки гиппокампа, а также фрагменты его дорзальной и вентральной частей. Все образцы хранили при температуре –70 °С. Эксперименты проводили в соответствии с международными европейскими биоэтическими стандартами (Директива 2010/63/EU).

Выделение РНК и обратная транскрипция

РНК выделяли с помощью TRI Reagent (Molecular Research Center, США) согласно инструкции производителя. Концентрацию РНК, а также ее чистоту определяли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer N50 (Implen, Германия) по соотношениям A260/A280 и A260/A230. Далее удаляли геномную ДНК из образцов РНК с использованием DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific, Литва). кДНК синтезировали в объеме 20 мкл с использованием 0.2 мкг РНК с помощью набора для полимеразной цепной реакции в реальном времени, совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва).

ПЦР в реальном времени

Последовательности праймеров к исследуемым генам подобраны с помощью инструмента Primer-BLAST (Ye et al., 2012) (таблица). ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе Roche LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Германия) с помощью 2.5-кратной реакционной смеси в присутствии красителя SYBR Green I, кат. № M-427 (ООО «Синтол», Россия) на 96-луночных плашках. Для каждого образца ПЦР выполнена в двух технических повторах в объеме 20 мкл, содержащих 4 мкл образцов кДНК (разведенных в 20 раз), 0.3 мкл праймеров (10 пкмоль/мкл), 7.4 мкл ddH₂O и 8 мкл 2.5-кратной реакционной смеси. Амплификация проведена по следующей схеме: преинкубация при температуре 95 °С в течение 300 с; 40 циклов трехэтапной амплификации, денатурация при 95 °С, 15 с, ренатурация при 60 °С, 30 с, и элонгация при 72 °С, 30 с; плавление продукта для проверки специфичности ПЦР: при температуре 95 °С в течение 10 с, при 65 °С 60 с, непрерывная детекция флуоресценции при температуре, достигающей 97 °С. Результаты обработаны с

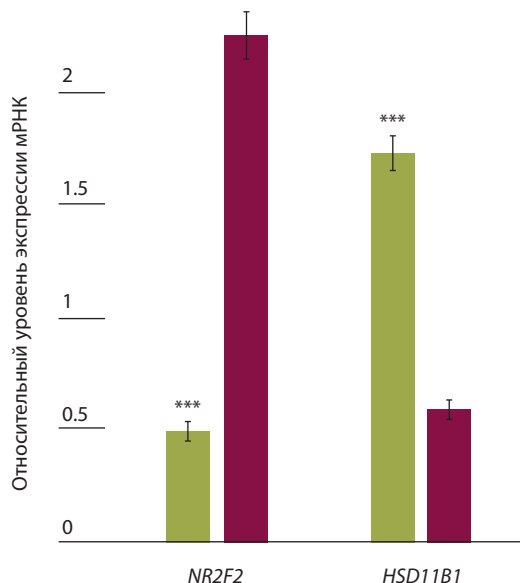


Рис. 1. Различия в экспрессии генов *NR2F2* и *HSD11B1* между дорзальной и вентральной частями гиппокампа: зеленым отмечен дорзальный гиппокамп, бордовым – вентральный (n = 18 в каждой группе) *** $p < 0.001$

Fig. 1. Differences in *NR2F2* and *HSD11B1* expression between the dorsal and ventral parts of the hippocampus: green indicates dorsal, dark red for ventral (n = 18 in each group). The y-axis represents relative mRNA expression levels *** $p < 0.001$

помощью метода $\Delta\Delta Ct$ (Livak, Schmittgen, 2001). В качестве референсного использовали ген *CANX* (*Calnexin*) ввиду высокого уровня и стабильности экспрессии.

Статистическая обработка данных

Для попарного сравнения результатов ОТ-ПЦР использовали непараметрический тест Манна – Уитни. Для анализа применяли программу GenEx 6.0 (MultiD Analyses AB, Швеция). Во всех случаях величину $p < 0.05$ считали статистически значимой. Данные представлены в виде среднего \pm стандартной ошибки среднего.

Результаты и обсуждение

Гены-маркеры дорзовентральной оси

Для определения корректности отнесения образцов к дорзальной или вентральной частям гиппокампа и чистоты этого разделения исследована экспрессия генов *HSD11B1* (кодирует кортизонредуктазу) и *NR2F2* (кодирует транскрипционный фактор COUP 2) у лисиц. Эти гены, согласно данным параллельного секвенирования транскриптомов, по-разному экспрессируются в дорзальном и вентральном гиппокампе у мышей (Cembrowski et al., 2016) и крыс (Lee et al., 2017).

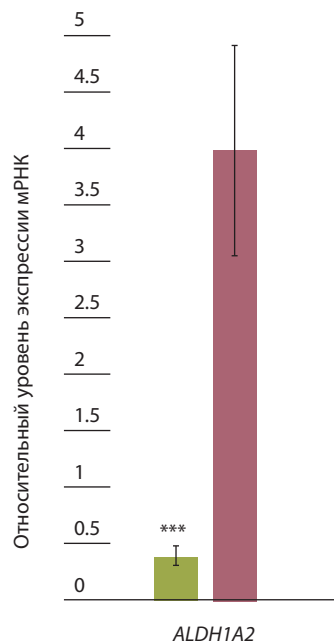


Рис. 2. Различия в экспрессии гена *ALDH1A2* между дорзальным гиппокампом и оболочками: зеленым отмечен дорзальный гиппокамп, светло-красным – оболочки гиппокампа (n = 8 в каждой группе) *** $p < 0.001$

Fig. 2. Differences in *ALDH1A2* expression between the dorsal hippocampus and meninges: green indicates dorsal, light red for ventral (n = 8 in each group). The y-axis represents relative mRNA expression levels *** $p < 0.001$

В представленной работе показано, что у лисиц, как и грызунов, экспрессия *HSD11B1* преобладает в дорзальном гиппокампе, а экспрессия *NR2F2* – в вентральном (рис. 1). При этом уровень экспрессии у *HSD11B1* в дорзальном гиппокампе в среднем выше, чем в вентральном почти в три раза ($p < 0.001$), а экспрессия *NR2F2* в вентральном гиппокампе – более чем в четыре раза по сравнению с дорзальным ($p < 0.001$). Ввиду стабильной разницы (*HSD11B1* всегда выше в дорзальном, *NR2F2* всегда выше в вентральном гиппокампе) эти два гена можно использовать в качестве маркеров частей гиппокампа по дорзовентральной оси.

ALDH1A2 как маркер оболочек гиппокампа

Для того чтобы корректно определить чистоту разделения гиппокампа и его оболочек, исследована экспрессия гена *ALDH1A2* (кодирует ретинальдегиддегидрогеназу 2). Согласно данным, полученным на мышах, белок *ALDH1A2* обнаружен в оболочках гиппокампа, но не в самом гиппокампе (Goodman et al., 2012). Однако у человека и белок, и мРНК *ALDH1A2* в гиппокампе хорошо детектируются (Fragoso et al., 2012).

В нашей работе продемонстрировано, что в дорзальном гиппокампе у лисиц экспрессия гена *ALDH1A2* значительно снижена в сравнении с оболочками (рис. 2) – более чем в 10 раз ($p < 0.001$). Экспоненциальная кривая *ALDH1A2* в гиппо-

кампе приближается к уровню неспецифического сигнала – около 34 циклов.

Заключение

Разработана надежная система определения чистоты и корректности взятия образцов гиппокампа лисиц на основе оценки количества мРНК *NR2F2*, *HSD11B1* и *ALDH1A2* с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени. Можно предполагать, что использование данных генов для тех же целей подходит и при работе с грызунами.

Список литературы / References

- Трут Л.Н., Плюснина И.З., Оськина И.Н. Эксперимент по domestикации лисиц и дискуссионные вопросы эволюции собак. *Генетика*. 2004;40(6):794-807. DOI 10.1023/B:RUGE.0000033312.92773.c1. [Trut L.N., Plyusnina I.Z., Oskina I.N. An experiment on fox domestication and debatable issues of evolution of the dog. *Rus. J. Genet.* 2004;40(6):644-655. DOI 10.1023/B:RUGE.0000033312.92773.c1. (in Russian)]
- Amaral D., Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, 2007;37-114. DOI 10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001.
- Cembrowski M.S., Wang L., Sugino K., Shields B.C., Spruston N. Hip- poseq: a comprehensive RNA-seq database of gene expression in hippocampal principal neurons. *Elife*. 2016;5:e14997. DOI 10.7554/ eLife.14997.
- Fragoso Y.D., Shearer K.D., Sementilli A., de Carvalho L.V., McCaffery P.J. High expression of retinoic acid receptors and synthetic enzymes in the human hippocampus. *Brain Struct. Funct.* 2012;217:473-483. DOI 10.1007/s00429-011-0359-0.
- Goodman T., Crandall J.E., Nanesco S.E., Quadro L., Shearer K., Ross A., McCaffery P. Patterning of retinoic acid signaling and cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus*. 2012;22:2171-2183. DOI 10.1002/hipo.22037.
- Hagihara H., Toyama K., Yamasaki N., Miyakawa T. Dissection of hippocampal dentate gyrus from adult mouse. *J. Vis. Exp.* 2009;(33):1543. DOI 10.3791/1543.
- Lee A.R., Kim J.H., Cho E., Kim M., Park M. Dorsal and ventral hippocampus differentiate in functional pathways and differentially associate with neurological disease-related genes during postnatal development. *Front. Mol. Neurosci.* 2017;10:331. DOI 10.3389/fnmol.2017.00331.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*. 2001;25:402-408. DOI 10.1006/meth.2001.1262.
- Mishra S., Kelly K.K., Rumian N.L., Siegenthaler J.A. Retinoic Acid Is Required for Neural Stem and Progenitor Cell Proliferation in the Adult Hippocampus. *Stem Cell Reports*. 2018;10:1705-1720. DOI 10.1016/j.stemcr.2018.04.024.
- Stoney P.N., Fragoso Y.D., Saeed R.B., Ashton A., Goodman T., Simons C., Gomaa M.S., Sementilli A., Sementilli L., Ross A.W., Morgan P.J., McCaffery P.J. Expression of the retinoic acid catabolic enzyme CYP26B1 in the human brain to maintain signaling homeostasis. *Brain Struct. Funct.* 2016;221:3315-3326. DOI 10.1007/s00429-015-1102-z.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134. DOI 10.1186/1471-2105-13-134.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 22.03.2021. После доработки 08.04.2021. Принята к публикации 09.04.2021.