

УДК 612.825:[577.95+575.322]

ТРАНСГЕН 6A-99 – МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАРКЕР РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ МЫШЕЙ

© 2007 г. А. А. Лазуткин, Б. И. Мейер *, К. В. Анохин

Институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАНН

125009 Москва, ул. Моховая, д. 11, стр. 4

**Max Planck Institute of Biophysical Chemistry*

Am Fassberg 11, D-37077 Göttingen, Germany

E-mail: lazalex@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.10.05 г.

Окончательный вариант получен 13.02.06 г.

Из десятков известных генов, работающих в развивающейся коре, до сих пор не найдено ни одного, экспрессия которого была бы ограничена строго одной функциональной областью коры. Мы обнаружили, что у трансгенной линии мышей 6A-99 экспрессия *LacZ*-репортерного гена происходит избирательно в соматосенсорной коре головного мозга. В первичной соматосенсорной коре экспрессия локализована в бочонковом поле, включая зону представительства вибрисс, передних и задних лап, челюстей и головы. Кроме того, *LacZ*-экспрессирующие клетки найдены во вторичной соматосенсорной коре, а также в ядрах гипоталамуса и шва среднего и продолговатого мозга. В коре трансгенная экспрессия впервые появляется на 3-и постнатальные сут и охватывает только область первичной соматосенсорной коры: зоны представительства мордочки, вибрисс и нижней челюсти. На 5-е сут после рождения выраженная экспрессия трансгена 6A-99 появляется во вторичной соматосенсорной коре и зоне представительства передних лап. Экспрессия в представительстве задних лап становилась заметной на 7-е сут. Экспрессия трансгена 6A-99 в соматосенсорной коре исчезала к 50-м сут – к возрасту окончательного функционального созревания коры. Полученные результаты свидетельствуют о том, что процессы регуляции транскрипции в развивающейся соматосенсорной коре мышей отличаются от таковых в других областях коры. Трансген 6A-99 может служить специфическим молекулярным маркером развивающейся соматосенсорной коры у мышей и быть использованным для исследования механизмов генетического и эпигенетического контроля функциональной регионализации неокортекса.

Ключевые слова: генная “ловушка”, соматосенсорная кора, регионализация неокортекса, постнатальный онтогенез, гетерохрония.

В современной нейробиологии остро стоит вопрос о механизмах развития различных структур головного мозга, в частности о генетической детерминации регионализации мозга и о роли внешних факторов в его развитии (Krubitser, Huffman, 2000; Pallas, 2001). Кора млекопитающих является классическим объектом для подобного рода исследований (см. обзоры: Rubenstein, Rakic, 1999; O’Leary, Nakagawa, 2002). Она обладает комплексной организацией и включает в себя около 50 регионов у человека (Brodmann, 1909) и около 20 функциональных областей – у мыши (Ragsdale, Grove, 2001), отличающихся друг от друга клеточным составом, cito-, хемо- и миелоархитектоникой, входящими и исходящими проекциями. Так как кора головного мозга является филогенетически неоднородной структурой, исследование онтогенетических механизмов становления ее функциональной и структурной гетерогенности является также средством изучения эволюции го-

ловного мозга (Krubitser, Kahn, 2003; Krubitser, Kaas, 2005).

В настоящий момент сложились две концепции, объясняющие процессы разделения коры на функциональные области. Согласно “модели протокарты” (Rakic, 1988), регионализация происходит в первую очередь под влиянием внутренних, генетически детерминированных факторов: вентрикулярная зона подразделяется на тангенциальные домены, формирующие “протокарту” будущей коры. В то же время сторонники “модели протокоры” (O’Leary, 1989) говорят о главенствующей роли внешних факторов в процессах неокортикальной регионализации: корковые предшественники “не запрограммированы” становятся нейронами строго той или иной области, а приобретают свою спецификацию вследствие взаимодействий дифференцирующихся нейронов с клеточным окружением и/или специфической афферентации.

Таким образом, в рамках проблемы клеточных механизмов регионализации коры возник вопрос о существовании генов, избирательно экспрессирующихся в различных областях развивающейся коры (Rubenstein, Rakic, 1999). Существование “протокарты” и ее “перенос” из вентрикулярной зоны в корковую пластинку, а затем и во все слои коры предполагает существование набора специфических молекул, границы распределения которых должны совпадать с будущими анатомическими границами структур. Однако поиски таких генов до сих пор не принесли заметных успехов. Многие из известных генов, активных в развитии, экспрессируются либо по типу градиента (например, *Emx1* и *Emx2*: Gulisano et al., 1996; Mallamaci et al., 1998; *Pax6*: Walther, Gruss, 1991; Stoykova, Gruss, 1994), либо в нескольких удаленных друг от друга функциональных областях (*Lhx2*: Porter et al., 1997; Nakagawa et al., 1999), либо их экспрессия охватывает значительную часть коры, включающую разные функциональные области (*COUP-TF1*, *Tbr1* и *Id2*: Rubenstein et al., 1999; Liu et al., 2000).

В нашей работе описывается экспрессия β -галактозидазного трансгенного маркера (*LacZ*) в мозгу у мышей линии 6A-99, полученных методом геной “ловушки” (gene trapping) (Salminen et al., 1998) в Институте биофизической химии им. М. Планка (Геттинген, Германия). *LacZ*-маркер в составе вектора IRES β galNeo(+rA) встраивался случайным образом в неактивную ДНК плюрипотентных стволовых клеток, с использованием которых в дальнейшем были получены линии трансгенных мышей. Конструкция вектора позволяла запускаться маркерной последовательности всякий раз, когда активировался меченный таким образом ген и/или промотор (Salminen et al., 1998). Таким образом, по экспрессии *LacZ* можно судить о работе маркированного участка генома.

Предварительные данные показали, что у этой линии мышей экспрессия *LacZ* имеет пространственно ограниченную локализацию в коре головного мозга. Учитывая это, мы поставили следующие задачи: выявить, какие области коры экспрессируют трансген 6A-99 и совпадают ли границы экспрессии трансгена с границами каких-либо функциональных областей коры, а также установить возрастную динамику этой экспрессии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали 44 мыши в возрасте 0 ($n = 3$), 1 ($n = 4$), 3 ($n = 5$), 5 ($n = 6$), 7 ($n = 6$), 14 ($n = 5$), 21 ($n = 6$), 30 ($n = 5$) и 50 ($n = 4$) постнатальных сут. Трансгенные животные первого поколения были получены с использованием мышей линии NMRI. Дальнейшее разведение и поддержание колонии трансгенных мышей осуществляли на основе линии мышей 129sv. Трансгенную линию поддержи-

вали в соответствии с правилами разведения инбредных линий животных.

Определение возраста животных. День рождения принимали за 1-е сут постнатального развития. Если наблюдали момент рождения, возраст животных принимали за нулевые постнатальные сутки.

Генотипирование. Перед экспериментами у животных определяли наличие трансгена. Для генотипирования использовали ДНК, выделенную из хвостов. *LacZ*-последовательность амплифицировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) и выявляли амплифицированные фрагменты ДНК методом горизонтального гелеэлектрофореза.

Выделение ДНК (все реагенты фирмы “Sigma”, США). Образцы лизировали в растворе протеиназы К (0.5 мг/мл), приготовленном на буфере, содержащем 0.01M *tris*-HCl (pH 7.5), 0.01M ЭДТА (pH 8.0), 0.1M NaCl и 0.025%-ный додецилсульфат натрия в течение 18–20 ч при температуре 56°C. Лизированные образцы центрифугировали в течение 20–30 мин при 13000 об/мин и осаждали из супернатанта ДНК добавлением двойного объема 96%-ного этанола, 1/20 объема 3M NaCH₃COO (pH 5.5) и 1/10 объема 5M NaCl. Осадившиеся нити ДНК промывали 70%-ным этанолом, высушивали на воздухе и ресуспендировали в бидистиллированной воде при 37°C и постоянном встряхивании.

Амплификация и выявление *LacZ*-последовательности. Реакционную смесь, включающую в себя 5×10^{-12} M/мкл *LacZ*-специфичных праймеров GC105 (TTG GCG TAA GTG AAG CGA C, “IBA GmbH”, Германия) и GC106 (AGC GGC TGA TGT TGA ACT G, “IBA GmbH”, Германия), 3×10^{-9} M смесь дезоксирибонуклеотидов (“Силекс М”, Россия) и 0.5 ед/реакцию Taq ДНК-полимеразы (“Силекс М”, Россия), готовили на буфере для Taq/Tth ДНК-полимеразы (“Силекс М”, Россия). К 49 мкл реакционной смеси добавляли 1 мкл ресуспендированной ДНК и амплифицировали в ПЦР-амплификаторе (“Hybaid”, США) в следующем режиме: денатурация при 95°C – 2 мин, далее 30 циклов: 56°C – 30 с, 72°C – 1 мин, 95°C – 50 с; заключительные отжиг с праймерами (56°C – 30 с) и элонгация (72°C – 10 мин). Амплифицированные пробы подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле (“Sigma”, США) в ТАЕ-буфере, содержащем 0.5 мкг/мл бромистого этидия (“Carl Roth GmbH”, Германия), и анализировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Приготовление препаратов. Паттерны экспрессии трансгена 6A-99 и его возрастную динамику исследовали на тотальных препаратах коры у мышат в возрасте 0, 1, 3, 5, и 7 сут и на блоках головного мозга толщиной 2–3 мм у животных в возрасте 3, 14, 21, 30 и 50 постнатальных сут.

Животных умерщвляли транспозицией шейного позвонка, извлекали мозг и затем либо делали его тотальные препараты (кора и блоки), либо изготавливали тангенциальные серийные срезы. Блоки толщиной 2–3 мм нарезали из нефиксированного мозга скальпелем, смоченным физиологическим раствором. Для получения препаратов целой коры извлеченный мозг разрезали пополам в сагиттальном направлении и затем лезвием скальпеля отделяли кору от подкорковых структур. Для приготовления тангенциальных срезов коры полушария зажимали между двумя предметными стеклами и замораживали в парах жидкого азота. Тангенциальные срезы толщиной 40 мкм изготавливали на криостате-микротоме Microm HM505E (“Microm”, Германия) при температуре –15 ... –18°C. Срезы помещали на стекла, покрытые поли-*L*-лизинном (“Sigma”, США), и перед гистохимическими реакциями подсушивали.

Гистохимическое выявление β-галактозидазы. Места экспрессии трансгена 6А-99 определяли методом гистохимического выявления внутриклеточной β-галактозидазы с помощью X-gal (5-бromo-4-хлоро-3-индолил-β-*D*-галактопиранозид). Для определения границ экспрессии трансгена в коре использовали также двойное окрашивание тангенциальных срезов, комбинируя окрашивание X-gal с гистохимическим выявлением цитохромоксидазы или окрашиванием по Нисслю нейтральным красным (у 14-суточных мышат).

Окрашивание тотальных препаратов. Тотальные препараты собирали в 12-луночные культуральные планшеты (“Corning”, США), отмывали трижды фосфатным буфером (рН 7.4) и фиксировали при 4°C в растворе, содержащем 0.1%-ный формальдегид, 0.2%-ный глутаральдегид, 0.02%-ный Nonidet NP-40 (все препараты фирмы “Sigma”, США) в фосфатном буфере (рН 7.4), в течение 45–60 мин при постоянном покачивании. После фиксации препараты отмывали фосфатным буфером комнатной температуры два раза по 20 мин. После отмывки лунки с образцами заполняли красящим раствором (2 мл на лунку), содержащим X-gal (1 мг/мл, “Gibco BRL”, США), 5 мМ K₃[Fe(CN)₆] (“Sigma”, США), 5 мМ K₄[Fe(CN)₆] (“Sigma”, США) и 2 мМ MgCl₂ (“Sigma”, США) в фосфатном буфере, и инкубировали в темноте при 30°C в течение 20–24 ч. Окрашенные препараты отмывали два раза по 20 мин фосфатным буфером и осветляли в темноте в серии глицеринов (“Sigma”, США) возрастающей концентрации (15, 30, 50, 70, 80% в фосфатном буфере). В каждом из растворов препараты выдерживали от 1 до 2 сут до их полного погружения. Окрашенные образцы хранились в темноте при 4°C в 80%-ном глицерине.

Окрашивание срезов. Перед окрашиванием срезы, помещенные на стекла, фиксировали

5 мин при 4°C в растворе того же состава, что и для тотальных препаратов. После фиксации срезы отмывали фосфатным буфером три раза по 5 мин при комнатной температуре и инкубировали на покровных пластинах (Cover Plate, “Shandon”, Великобритания) в темноте в красящем растворе (100 мкл на стекло), содержащем 4 мг/мл X-gal, 10 мМ K₃[Fe(CN)₆], 10 мМ K₄[Fe(CN)₆] и 2 мМ MgCl₂ в фосфатном буфере, при 37°C в течение 18–20 ч. Окрашенные срезы отмывали три раза по 5 мин фосфатным буфером при комнатной температуре и использовали в дальнейшем либо для морфологического окрашивания, либо для выявления цитохромоксидазы.

Выявление цитохромоксидазы. В работе применяли методику Уонг-Райли (Wong-Riley, 1979) с разведением каталазы, предложенным Життоном и соавт. (Gitton et al., 1999b). Срезы отмывали фосфатным буфером три раза по 5 мин и инкубировали сначала в растворе 4%-ной *D*-сахарозы (“Sigma”, США) в фосфатном буфере (рН 7.4) в течение 90 мин при комнатной температуре, а затем в свежем растворе, содержащем 24 мкМ цитохром С (“Serva”, Германия), 1.4 мМ диаминобензидин тетрагидрохлорид (“Sigma”, США), 500 ед/мл каталазы (“Sigma”, США) и 4%-ную сахарозу в фосфатном буфере, в течение 60–90 мин в темноте при 37°C. Реакцию останавливали помещением срезов на 5 мин в раствор 4%-ной *D*-сахарозы в фосфатном буфере. Окрашенные срезы отмывали два раза по 5 мин фосфатным буфером и 5 мин дистиллированной водой при комнатной температуре, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации (70, 96, 100%-ный (абсолютный) этанол, 100%-ный этанол:о-ксилол (1:1), о-ксилол) и заключали под покровные стекла при помощи среды EUKITT (“O. Kindler GmbH & Co”, Германия).

Выявление морфологии по Нисслю осуществляли с помощью нейтрального красного (“Sigma”, США). Срезы, предварительно окрашенные X-gal, отмывали и помещали в 1%-ный раствор нейтрального красного на 20 мин при комнатной температуре, а после окрашивания дегидратировали в серии спиртов по 1 мин в каждом и заключали под покровные стекла.

Сбор данных. Окрашенные образцы качественно анализировали с помощью светового микроскопа Olympus SZX12, Япония (тотальные препараты головного мозга) или Olympus BX50 (срезы). Изображения снимали цифровой камерой Nikon DXM1200, Япония.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Места экспрессии трансгена 6А-99. Было найдено шесть областей в неокортексе, гипоталамусе, среднем и продолговатом мозгу, обладаю-

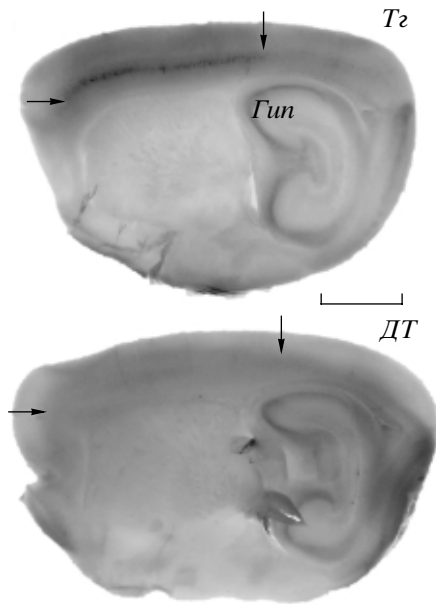


Рис. 1. Избирательная экспрессия трансгена 6A-99 в соматосенсорной коре мышей в возрасте 30 сут после рождения, сагитальные блоки. (—>) – границы экспрессии; *Gup* – гиппокамп; *T2* – трансгенные мыши; *ДТ* – мыши дикого типа. Масштаб: 2.5 мм.

щих экспрессией трансгена 6A-99. В гипоталамусе экспрессия трансгена наблюдалась в клетках паравентрикулярных и дорсомедиальных ядер. В продолговатом и среднем мозгу экспрессия *LacZ* была обнаружена в дорсальных ядрах шва (B7) и в ядрах каудальной группы ядер шва: nuclei raphe pallidus (B1) и obscurus (B2).

Особое внимание было уделено определению границ экспрессии трансгена 6A-99 в неокортексе. Эту оценку производили у 30-суточных животных. К этому возрасту в коре полностью завершен процесс стратификации, границы функциональных областей коры уже сформированы. На рис. 1 показано, что β -галактозидазная активность в коре характерна только для трансгенных мышей и не наблюдается у животных дикого типа. В неокортексе 30-суточных мышей экспрессия трансгена 6A-99 обладала четкими rostrocaudальными и lateromedialными границами. Предварительное сопоставление границ трансгенной экспрессии во фронтальных блоках с соответствующими уровнями в атласе (Franklin, Paxinos, 1997) показало, что трансген 6A-99 экспрессируется в первичной и вторичной соматосенсорной коре. В первичной соматосенсорной коре трансгенная экспрессия наблюдается только в гранулярных зонах: в бочонковом поле, зоне

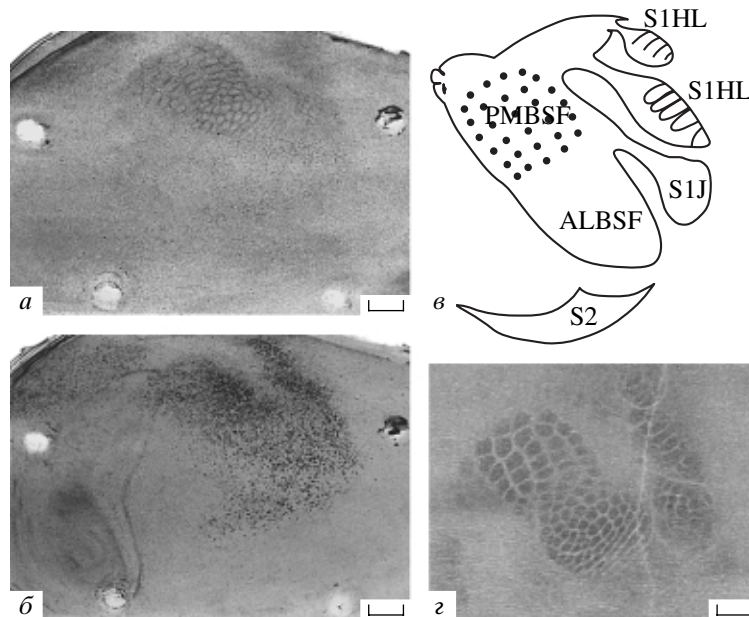


Рис. 2. Экспрессия трансгена 6A-99 в проекционных полях первичной соматосенсорной коры мышей (тангенциальные срезы толщиной 40 мкм). *a*, *б* – реконструкции мозга 14-суточных мышей, полученные наложением последовательных срезов, контрастированных нейтральным красным друг на друга: *a* – на уровне слоя IV (3 микрофотографии), *б* – на уровне слоя V коры (11 микрофотографий); *в* – схема проекционных полей соматосенсорной коры; *г* – проекционные поля первичной соматосенсорной коры мышей в возрасте 7 сут, выявленные с помощью окрашивания на цитохромоксидазу.

S1, S2 – первичная и вторичная соматосенсорная кора соответственно; представительства: задних (HL) и передних (FL) лап, нижней челюсти (J); PMBSF, ALBSF – заднемедиальное (представительство вибрисс) и переднелатеральное бо-
чонковые подполя. Масштаб: 500 мкм.

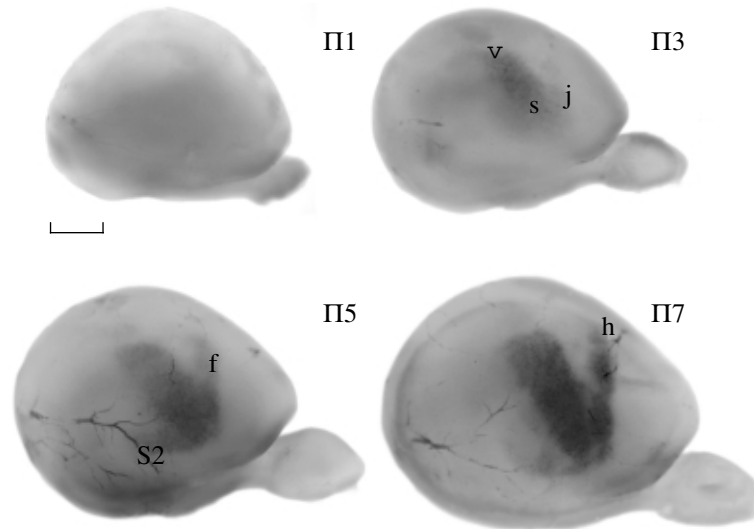


Рис. 3. Возрастная динамика экспрессии трансгена 6A-99 в соматосенсорной коре мышей в возрасте 1, 3, 5, 7 сут (П1, 3, 5, 7) после рождения (препараты коры головного мозга, окрашенные X-gal *in toto*). Показана последовательность появления экспрессии трансгена в представительствах вибрисс (v), мордочки (s), нижней челюсти (j), во вторичной соматосенсорной коре (S2), в представительстве передних (f) и задних лап (h). Масштаб: 1 мм.

представительств челюстей, передних и задних лап. В агранулярной зоне первичной соматосенсорной коры экспрессия трансгена 6A-99 обнаружена не была.

Чтобы детально определить, в каких зонах представительств в первичной соматосенсорной коре наблюдается экспрессия трансгена 6A-99, мы выявляли β-галактозидазную активность на тангенциальных срезах коры 14-суточных мышей с последующей реконструкцией соматотопических проекций путем наложения соседних срезов друг на друга. С этой целью изготавливали серийные тангенциальные срезы на уровнях слоев коры IV и V. Срезы совмещали друг с другом по отверстиям, предварительно сделанным в замороженном мозгу. Были получены две реконструкции из набора срезов: на уровне слоя IV, выявляющие проекционные поля соматосенсорной коры, и на уровне слоя V. Как видно на изображениях (рис. 2, а, б), основное скопление клеток, экспрессирующих трансген 6A-99, находилось на уровне пирамидного слоя коры. Полученные реконструкции совпадали с границами бочонковых полей, выявляемых с помощью цитохромоксидазы, и подтвердили приуроченность экспрессии трансгена 6A-99 к зонам представительств передних, задних лап, вибрисс, верхних и нижних челюстей и мордочки (рис. 2, в, г). Экспрессия *LacZ* тем не менее отсутствовала в представительстве туловища; таким образом, в первичной соматосенсорной коре экспрессия трансгена 6A-99 совпадала только с представительствами, имеющими бочонковую организацию.

Возрастная динамика экспрессии трансгена 6A-99 в коре. В препаратах мозга мышат ново-

рожденных (0 сут) и в возрасте 1 сут, окрашенных *in toto*, экспрессия 6A-99 выявлена не была (рис. 3). Впервые заметную экспрессию трансгена в коре головного мозга фиксировали на 3-и сут после рождения. В этом возрасте область, экспрессирующая трансген, повторяла очертания первичной соматосенсорной коры и состояла из двух сходящихся полос, верхняя из которых соответствовала зонам представительств нижней челюсти и передних лап. В этой части соматосенсорной коры экспрессия обладала низкой интенсивностью, особенно в представительстве передних лап. Нижняя широкая полоса представляла собой будущие заднемедиальное и передне-латеральное бочонковые подполя, являющиеся представителями вибрисс и передней части мордочки соответственно. Экспрессия в этой части соматосенсорной коры была интенсивней, чем в представительстве челюстей (рис. 3). Наибольшая плотность экспрессии 6A-99 наблюдалась в дорсальной части заднемедиального бочонкового подполя и затухала по градиенту в назальном и темпорально-вентральном направлениях. У животных в возрасте 3-х постнатальных сут отсутствовала экспрессия трансгена во вторичной соматосенсорной коре. Это было видно как на препаратах целой коры, так и на фронтальных блоках головного мозга, где трансген экспрессировался только в слое V коры. Экспрессия при этом носила менее интенсивный характер, чем в последующих возрастах.

На 5-е сут после рождения границы неокортикальной экспрессии трансгена 6A-99 приобретали более четкие очертания, особенно в назальной части, где экспрессия становилась наиболее ин-

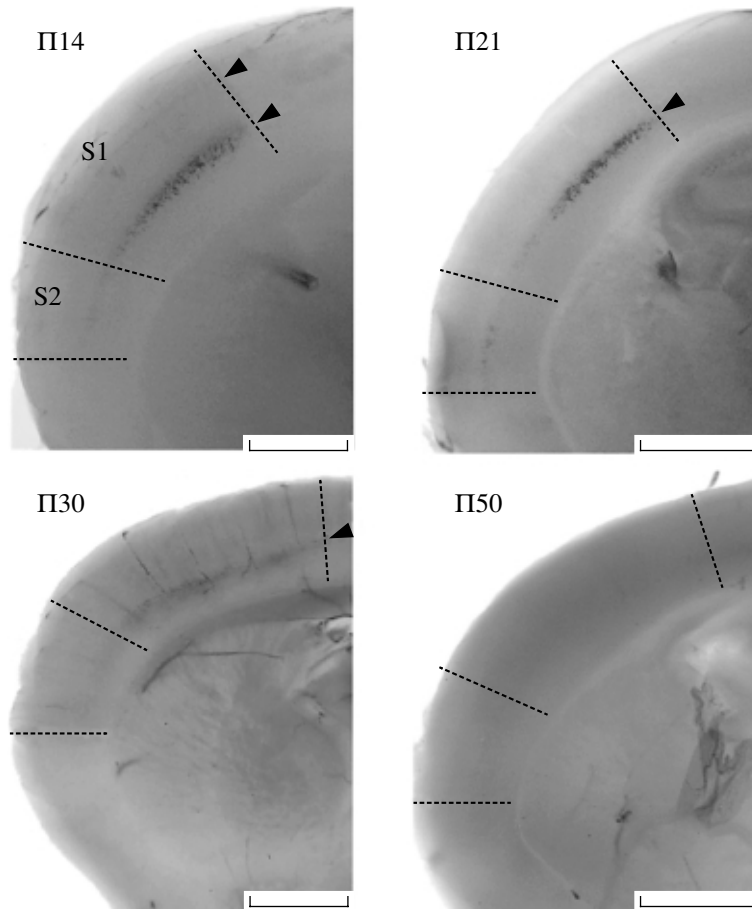


Рис. 4. Возрастная динамика экспрессии трансгена 6A-99 в соматосенсорной коре мышей в возрасте 14, 21, 30, 50 сут (П14, 21, 30, 50) после рождения (фронтальные блоки головного мозга толщиной 2–3 мм, окрашенные X-gal *in toto*). (-----) – границы первичной (S1) и вторичной (S2) соматосенсорной коры, (▶) – слои коры, экспрессирующие *LacZ*. Масштаб: 1 мм.

тенсивной. В области заднемедиального бочонкового подполя экспрессия *LacZ* была менее интенсивной, такой же как на 3-и сут. Задняя граница этого подполя не была окончательно оформлена. В зоне представительства нижней челюсти трансген интенсивно экспрессировался, однако граница между этой частью первичной соматосенсорной коры и переднелатеральным бочонковым подполем не была выражена. На 5-е сут появлялась экспрессия в зоне представительства задних лап, а в представительстве передних лап наблюдалась слабая трансгенная экспрессия, более сильная, однако, чем в соседнем представительстве задних лап и чем на 3-и сут после рождения. Так же выраженная, с четкими границами экспрессия трансгена появлялась во вторичной соматосенсорной коре (рис. 3).

На 7-е постнатальные сут экспрессия 6A-99 в коре была наиболее выраженной. Интенсивно прокрашивались зоны представительства нижней челюсти, передних и задних лап. Тем не менее экспрессия в представительстве задних лап была

слабее, чем в таковом передних. Менее интенсивная окраска в темпоральной части заднемедиального бочонкового подполя сохранялась, однако задняя граница представительства вибрисс становилась более четкой, просматривались полосы, соответствующие рядам бочонков. Представительство нижней челюсти отграничивалось от переднелатерального подполя, представительства передних и задних лап принимали характерный обособленный характер (рис. 3).

Тотальные препараты коры мышей старше 7 сут получить невозможно из-за недостаточной тканевой проницаемости X-gal. В связи с этим оценку границ экспрессии трансгена 6A-99 у животных старших возрастов производили на реконструкциях серийных тангенциальных срезов. Границы экспрессии *LacZ* у животных в возрасте 14 постнатальных сут были аналогичными тому, что наблюдалось у 7-суточных мышат, однако, в отличие от них, одинаково интенсивная экспрессия трансгена 6A-99 была отмечена во всех представительствах (рис. 2, б). Трансген 6A-99 пре-

кращал экспрессироваться в коре к 50-м сут после рождения (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Региональная экспрессия трансгена 6A-99 в коре. Наши результаты показали, что трансген 6A-99 обладает выраженной, пространственно ограниченной экспрессией в коре головного мозга. Границы его экспрессии четко совпадают с морфологическими границами бочонковых полей первичной соматосенсорной коры и со вторичной соматосенсорной корой.

Такой характер экспрессии в неокортексе является необычным. К настоящему времени известны только небольшой набор генов, избирательно активных в функционально специализированных областях коры головного мозга. Так, например, у новорожденных мышшей места экспрессии кадхеринов *Cdh6*, *Cdh8* и *Cdh11* коррелируют с появляющимися региональными границами моторной, соматосенсорной, слуховой и зрительной коры (Suzuki et al., 1997), экспрессия *ephryne-A5* более интенсивна в первичной соматосенсорной коре, чем в соседних областях (Maskarehtschian et al., 1999). Тем не менее экспрессия этих генов в коре либо не имеет столь же отчетливых границ, как описываемый нами трансген 6A-99, либо эти гены экспрессируются более чем в одной функциональной области. Достаточно специфично в коре экспрессируются LAMP (limbic system-associated membrane protein) – классический маркер лимбической коры (Eagleson, Levitt, 1999), – а также *Otx2*, избирательно работающий в зрительной коре (Nothias et al., 1998).

Однако единственным молекулярным маркером, очерчивающим строго определенный функциональный регион коры, до сих пор являлся трансген H-2Z1, полученный случайной вставкой *LacZ* в геном мыши (Cohen-Tannoudji et al., 1994; Gitton et al., 1999a, b). Его экспрессия приурочена к первичной соматосенсорной коре, зонам представительства передних и задних лап, нижней челюсти, передне- и заднемедиальным бочонковым подполям, а также ко вторичной соматосенсорной коре. При этом экспрессия этого трансгена ограничена только слоем IV соматосенсорной области неокортекса (Cohen-Tannoudji et al., 1994).

В целом области экспрессии трансгена H-2Z1 в коре полностью совпадают с обнаруженными нами неокортикальными границами экспрессии трансгена 6A-99. Тем не менее трансгены 6A-99 и H-2Z1, очевидно, отражают работу разных генов или промоторов, избирательно работающих в соматосенсорной коре. Об этом свидетельствует экспрессия их в разных слоях коры: трансген H-2Z1 является маркером слоя IV, трансген 6A-99 – слоев II–V; а также отличающаяся возрастная ди-

намика. Таким образом, наша работа описывает второй пример специфического молекулярного маркирования функциональной области коры.

Факт наличия двух избирательно работающих трансгенов в соматосенсорной коре наводит на мысль о существовании различий между функциональными областями коры не только по citoархитектоническим характеристикам, организации входящих и исходящих связей, свойствам хемо- и миелоархитектоники (см. обзор: O'Leary, 1989), но и по молекулярно-генетическим особенностям регуляции их развития. В связи с этим помимо описанной выше экспрессии молекулярных маркеров следует отметить еще один факт. Недавно было обнаружено, что антитела против С-терминального домена синапсина Ia/b (anti-SynI-C) специфично связываются с клетками и проксимальными дендритами полости бочонков и таким образом избирательно окрашивают бочонковые поля первичной соматосенсорной коры (Nowicka et al., 2003). Авторы предполагают, что anti-SynI-C распознают поверхностные полисахаридные эпитопы, специфичные для перинеурональных сетей первичной соматосенсорной коры. Если это так, то должны существовать гены и ферменты, избирательно работающие в первичной соматосенсорной коре, необходимые для развития такого специфического клеточного аппарата. Таким образом, наши результаты и данные других авторов свидетельствуют о том, что процессы регуляции экспрессии генов в развивающейся соматосенсорной коре мышшей отличаются от таковых в других корковых областях.

Данные о паттернах экспрессии гена *Otx2* и трансгена H-2Z1 помимо молекулярной спецификации функциональных областей неокортекса в развитии наводят на мысль и о “маркированности” афферентных входов в кору. Гомеобоксный ген *Otx2* помимо экспрессии в зрительной коре экспрессируется также и в сетчатке и латеральном коленчатом теле (Nothias et al., 1998). Трансген H-2Z1 помимо слоя IV соматосенсорной коры экспрессируется в ядрах таламуса, посылающих проекции в S1 (Gitton et al., 1999a). Исходя из этого можно было бы предполагать наличие экспрессии трансгена 6A-99 не только в коре, но и в таламических ядрах. Тем не менее в таламусе экспрессия *LacZ* нами обнаружена не была, но была найдена в дорсальных ядрах шва (B7), т. е. в ядрах, посылающих свои проекции в неокортекс, в частности в S1 (см. обзор: Rubenstein, 1998), а также в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса, получающих обильную серотониновую афферентацию от ядер шва (Petrov et al., 1992; Larsen et al., 1996). Поэтому не исключено, что экспрессия трансгена 6A-99 в соматосенсорной коре может быть связана с синаптическими эффектами серотонина, необходимыми для нормального развития бочонков (см. обзор: Erzurumlu, Kind, 2001).

Возрастная динамика экспрессии трансгена 6A-99. Выраженная экспрессия 6A-99 в соматосенсорной коре появляется на 3-и сут после рождения. В этом возрасте соматосенсорная кора имеет дифференцированные слои I, V и VI; а слой IV, в котором в будущем будут располагаться бочонки и по которому соматосенсорная кора цитоархитектонически заметно отличается от остальных регионов, еще не выделился из корковой пластинки (Rice, Van Der Loos, 1977), специфические афференты из таламуса активно ветвятся в слоях коры V, VI (Auladell et al., 2000). Тем не менее, пять рядов бочонков, соответствующих рядам вибрисс, а следовательно, и границы соматосенсорной коры, становятся различимы на тангенциальных срезах, импрегнированных серебром (Waite, 1977), окрашенных на 11/тенасцин (Steindler et al., 1989) или серотонин (Gittton et al., 1999a), начиная со 2-х постнатальных сут. Таким образом, появление экспрессии трансгена 6A-99 в коре отстает от появления границ соматосенсорной коры. Это может означать, что активация его транскрипции осуществляется не факторами, ответственными за становление границ данной области коры, а скорее, сигналами, действующими внутри уже сформированных границ соматосенсорной коры.

Внедрение таламических волокон в корковую пластинку и кластеризация их на отдельные бочонки начинается примерно на 4–5-е сут (Wise, Jones, 1978). В этом же возрасте выделяются слои III и IV коры, отростки клеток которых обеспечивают связи первичных и вторичных проекционных зон (Дуринян, Рубин, 1971), а бочонки впервые становятся различимы как цитоархитектонические единицы (Rice, Van Der Loos, 1977). Именно в эти сроки мы наблюдали заметное усиление экспрессии трансгена 6A-99 в первичной и

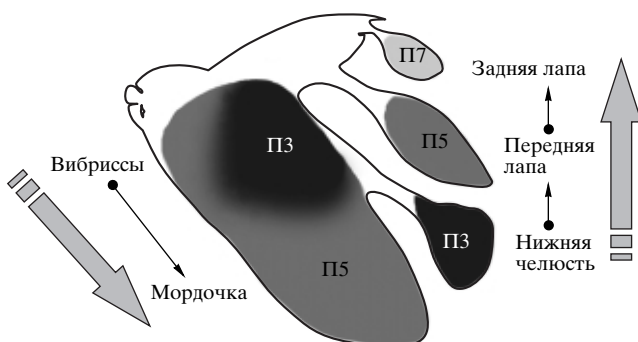


Рис. 5. Динамика появления экспрессии трансгена 6A-99 в первичной соматосенсорной коре мышей в возрасте 3, 5, 7 сут (ПЗ, 5, 7) после рождения (схема). Интенсивность окраски отражает сроки появления экспрессии, (●→) – направление распространения экспрессии.

появление ее во вторичной соматосенсорной коре. Границы трансгенной экспрессии становились яркими и четкими к 7-м сут после рождения, т.е. к возрасту, когда бочонковые поля становятся полностью сформированными (Rice, Van Der Loos, 1977). В последующем продолжается стратификация коры, интенсивно идет синаптогенез и установление интер- и интракорткальных связей (Максимова, 1990). Экспрессия 6A-99 также обнаруживается в эти сроки. Трансген перестает экспрессироваться в соматосенсорной коре к 50-м сут после рождения, к возрасту, когда мыши достигают половозрелости и завершается созревание коры головного мозга. Таким образом, экспрессия 6A-99 наблюдалась в очерченных временных рамках, захватывавших период наиболее интенсивного развития соматосенсорной коры, с момента первого появления ее границ до окончательного созревания ее связей и цитоархитектоники. Эти данные позволяют говорить о трансгене 6A-99 как о молекулярном маркере именно развивающейся соматосенсорной коры. Пользуясь этим обстоятельством, мы решили проследить динамику становления проекционных полей соматосенсорной коры, применяя 6A-99 в качестве индикатора процессов созревания в этой области.

Экспрессия трансгена 6A-99 и гетерохронная динамика развития отделов соматосенсорной коры. Наши данные показывают, что экспрессия трансгена 6A-99 в первичной соматосенсорной коре появляется раньше, чем во вторичной. Это согласуется с данными о более раннем созревании в онтогенезе эволюционно более старых первичных проекционных областей по сравнению с более молодыми вторичными и третичными областями у человека (Поляков, 1938–1948; Кононова, 1962) и мыши (del Rio et al., 1994). Наблюдаемая филогенетическая гетерохрония может являться следствием гетерохронного вовлечения генов, контролирующих созревание первичных и вторичных областей, о чем, в частности, свидетельствует разное по срокам появление экспрессии трансгена 6A-99 в первичной и вторичной соматосенсорной коре. Тем не менее описанная гетерохрония не является, по-видимому, общим правилом для регионспецифичной регуляции экспрессии, поскольку второй специфический маркер соматосенсорной коры, трансген H-2Z1, в отличие от трансгена 6A-99, начинает экспрессироваться во вторичной соматосенсорной коре одновременно с первичной – на 2-е сут после рождения (Gittton et al., 1999a).

Рассмотрим теперь развитие экспрессии 6A-99 в разных отделах первичной соматосенсорной коры. У мышей эта область представлена в виде двух сходящихся полос: широкая соответствует зонам проекций вибрисс и мордочки; вторая, более узкая, – представителям нижней челюсти,

передних и задних лап (рис. 2, б; 3). Этот процесс, по-видимому, подчиняется разным принципам (рис. 5).

Для зон представительств вибрисс и мордочки описан градиентный принцип развития. В работе Життона и соавт. (Gitton et al., 1999a) было показано, что между 3-ми и 7-ми постнатальными сут развитие бочонков и вращение таламических афферентов в соматосенсорную кору происходит по каудоростральному градиенту. Вначале таламические волокна, выявляемые с помощью иммуногистохимии на серотонин, появляются в заднемедиальном (представительство вибрисс), а потом в переднелатеральном (представительство мордочки) бочонковом подполе. Динамика экспрессии трансгена 6А-99 в этой части первичной соматосенсорной коры полностью соответствовала этому градиенту и появлялась сначала в зоне представительства вибрисс, а затем в зоне представительства мордочки (рис. 3, 5). По данным Життона и соавт. (Gitton et al., 1999a), Н-2Z1 начал экспрессироваться в представительстве мордочки (в вентральной его части) раньше (на 2-е сут), чем в представительстве вибрисс (на 3-и сут). Тем не менее в дальнейшем его экспрессия распространялась в дорсальном (противоположном по сравнению с экспрессией 6А-99) и ростральном направлениях. Таким образом, в зоне проекции вибрисс и мордочки экспрессия трансгенов 6А-99 и Н-2Z1 в целом (за исключением первых постнатальных дней экспрессии Н-2Z1) следовала каудоростральному градиентному принципу.

Однако ряд данных указывает на то, что эволюционно более древний градиентный тип развития может нарушаться или полностью заменяться системным принципом, отражающим последовательность функционального включения разных систем у новорожденного, связанную с экологией данного вида (Анохин, 1949). Это, в частности, наблюдается в случае более ранней экспрессии трансгена Н-2Z1 в представительстве мордочки по сравнению с представительством вибрисс (Gitton et al., 1999a), что нарушает в первые несколько суток после рождения каудоростральный градиент. Однако еще более наглядным примером этого является последовательность созревания представительств лап и челюстей, которая происходит в противоположном описанному ранее направлении. Анализ экспрессии трансгенов 6А-99 и Н-2Z1 (Gitton et al., 1999a) показывает, что она появлялась в зоне представительства нижней челюсти раньше, чем в представительстве лап (на 3-и сут). Появление экспрессии в представительстве передних лап опережало ее возникновение в проекционной зоне задних конечностей (трансген Н-2Z1 начинал экспрессироваться на 5-е сут, а экспрессия трансгена 6А-99, хоть и появлялась на 3-и сут, но сравнимой с таковой в представительстве нижней челюсти становилась только к 5-м сут).

В представительстве задних лап экспрессия трансгена Н-2Z1 появлялась только к 6–7-м сут после рождения, а трансгена 6А-99, слабо различимая, – на 5-е сут и выраженная – к 7-м постнатальным сут (рис. 3, 5).

Эта последовательность созревания проекционных зон передних и задних конечностей подтверждается данными других авторов. Показано, что развитие кортикоспинальных связей происходит в том же направлении: сначала эфференты достигают нижних сегментов шейного отдела спинного мозга (3–5-е сут у крыс), а затем нижних сегментов поясничного и крестцового отдела (9–12-е сут) (Donatelle, 1977; Jones et al., 1981). В той же последовательности идет и их миелинизация (Jones et al., 1981). Ретроградным мечением кортикоспинальных волокон быстрым голубым было показано, что волокна от первичной соматосенсорной коры достигают у крыс нижних шейных сегментов на 4-е сут, а поясничных отделов – лишь на 7-е сут (Schreyer, Jones, 1988).

Электрофизиологические исследования также подтверждают описанную последовательность развития проекционных областей соматосенсорной коры. Потенциалы, вызванные стимуляцией вибрисс у новорожденных крысят, наблюдаются в соматосенсорной коре спустя 12 ч после рождения, тогда как раздражение передних и задних конечностей вызывает появление потенциалов только спустя 24 и 36 ч соответственно (McCasldish et al., 1993), и эта динамика соответствует выявленной ранее для связывания лектинов с радиальной глией внутри границ бочонков (McCasldish et al., 1989). Детальный анализ становления движений лап у плода кролика в ответ на их кожную стимуляцию (изолированные и одновременные флексии и экстензии, реципрокные и альтернирующие движения) в работах Стакалич (цит. по: Волохов, 1968) показал, что динамика становления движений задних лап сходна с таковой передних, однако с заметным опозданием в сроках.

Описанные диссоциации в созревании разных проекционных зон первичной соматосенсорной коры согласуются с данными о гетерохронном становлении ранних функциональных систем у млекопитающих и, по-видимому, обусловлены последовательностью их функционального включения у новорожденного (Анохин, 1968). У новорожденных млекопитающих одними из самых первых поведенческих систем являются функциональные системы сосания и поиска матери (Волохов, 1968; Шулейкина, 1971). Раннее созревание проекционных зон мордочки, вибрисс и челюстей в соматосенсорной коре по сравнению с другими представительствами, скорее всего, связано с включением тактильных рецепторов этих частей тела в обеспечение этих первых поведенческих актов. Раннее развитие тактильной чувствительности

мордочки наблюдается уже у новорожденных крольчат: через несколько часов после рождения они способны прыгать в сторону раздражителя и осуществлять сосательные движения в ответ на стимуляцию мордочки кисточкой (Волохов, 1968). Сходные поисковые и сосательные движения в ответ на тактильную и тепловую стимуляцию мордочки наблюдаются также у котят, щенят и крысят (Слоним, 1961; Шулейкина, 1971).

Гетерохронии в развитии представительств передних и задних лап в соматосенсорной коре также находят свое отражение на поведенческом уровне. Тактильная и проприоцептивная чувствительность передних лап у крыс развивается раньше, чем задних (4–7-е и 9–13-е сут соответственно) (Donatelle, 1977). Та же последовательность наблюдается при гетерохронном становлении локомоции у незрелорождающихся млекопитающих (Волохов, 1968).

Таким образом, гетерохронность активации трансгенов 6A-99 и H-2Z1 в разных функциональных участках соматосенсорной коры, по-видимому, может отражать неоднородное включение этих зон коры в созревание различных функциональных систем в раннем постнатальном периоде. Следующим важным вопросом является, обусловлены ли эти гетерохронии внутрикорковыми клеточными сигналами или они возникают под влиянием взаимодействий с периферией. Трансген 6A-99, являясь молекулярным маркером развивающейся соматосенсорной коры, может служить удобным инструментом для дальнейшего исследования молекулярных механизмов генетического и эпигенетического контроля этих процессов.

В нашей работе показано, что: 1) трансген 6A-99 обладает избирательной экспрессией в коре головного мозга: границы его экспрессии четко совпадают с морфологическими границами боковых полей первичной соматосенсорной коры и со вторичной соматосенсорной корой.

2) Экспрессия трансгена 6A-99 наблюдалась только в период наиболее интенсивного постнатального развития соматосенсорной коры: с момента первого появления ее границ (3-и сут) до окончательного созревания ее связей и цитоархитектоники (до 50-х сут).

3) Экспрессия трансгена 6A-99 в первичной соматосенсорной коре появлялась раньше, чем во вторичной, что согласуется с данными о более раннем созревании в процессе развития эволюционно более старых первичных проекционных областей по сравнению с более молодыми вторичными.

4) Появление экспрессии трансгена 6A-99 в разных функциональных участках соматосенсорной коры происходит гетерохронно и может отражать неоднородное включение этих зон коры в

созревание различных функциональных систем в раннем постнатальном периоде.

5) Полученные данные позволяют говорить о трансгене 6A-99 как о молекулярном маркере развивающейся соматосенсорной коры и дают возможность использовать его в качестве инструмента для дальнейшего исследования молекулярных механизмов генетического и эпигенетического контроля функциональной регионализации коры головного мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Анохин П.К. Физиологический градиент, рефлекс и функциональная система как факторы эмбрионального развития безусловных реакций // Журн. общ. биологии. 1949. Т. X. № 5. С. 361–385.

Анохин П.К. Биология и нейрофизиология условного рефлекса. М.: Медицина, 1968. 547 с.

Волохов А.А. Очерки по физиологии нервной системы. Л.: Медицина, 1968. 311 с.

Дурина Р.А., Рабин А.Г. Проблема двойственного представительства проекционных систем мозга // Успехи физиол. наук. 1971. Т. 2. № 2. С. 3–25.

Кононова Е.П. Лобная область большого мозга. Л.: Медгиз, 1962. 176 с.

Максимова Е.В. Онтогенез больших полушарий. М.: Наука, 1990. 183 с.

Поляков Г.И. Онтогенез изокортекса у человека // Труды Института мозга. М.: Ин-т мозга, 1938–1948. Вып. 1–6.

Слоним А.Д. Основы общей экологической физиологии млекопитающих. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1961. 498 с.

Шулейкина К.В. Системная организация пищевого поведения. М.: Наука, 1971. 280 с.

Auladell C., Perez-Sust P., Super H. et al. The early development of thalamocortical and corticothalamic projections in the mouse // Anat. Embryol. (Berlin). 2000. V. 201. P. 169–179.

Brodmann K. Vergleichende lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf grund des Zeilenbaues. Leipzig: Barth, 1909. 324 S.

Cohen-Tannoudji M., Babinet C., Wassef M. Early determination of a mouse somatosensory cortex marker // Nature. 1994. V. 368. P. 460–463.

del Rio J.A., de Lecea L., Ferrer I., Soriano E. The development of parvalbumin-immunoreactivity in the neocortex of the mouse // Brain Res. Devel. Brain Res. 1994. V. 81. P. 247–259.

Donatelle J.M. Growth of the corticospinal tract and the development of placing reactions in the postnatal rat // J. Comp. Neur. 1977. V. 175. P. 207–232.

Eagleson K.L., Levitt P. Complex signaling responsible for molecular regionalization of the cerebral cortex // Cereb. Cortex. 1999. V. 9. P. 562–568.

- Erzurumlu R.S., Kind P.C.* Neural activity: sculptor of 'barrels' in the neocortex // *Trends Neurosci.* 2001. V. 24. P. 589–595.
- Franklin K.B.J., Paxinos G.* The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press, 1997. 120 p.
- Gitton Y., Cohen-Tannoudji M., Wassef M.* Role of thalamic axons in the expression of H-2Z1, a mouse somatosensory cortex specific marker // *Cereb. Cortex.* 1999a. V. 9. P. 611–620.
- Gitton Y., Cohen-Tannoudji M., Wassef M.* Specification of somatosensory area identity in cortical explants // *J. Neurosci.* 1999b. V. 19. P. 4889–4898.
- Gulisano M., Broccoli V., Pardini C. et al.* *Emx1* and *Emx2* show different patterns of expression during proliferation and differentiation of the developing cerebral cortex in the mouse // *Eur. J. Neurosci.* 1996. V. 8. P. 1037–1050.
- Jones E.G., Schreyer D.J., Wise S.P.* Growth and maturation of the rat corticospinal tract // *Prog. Brain Res.* 1981. V. 57. P. 361–379.
- Krubitzer L., Huffman K.J.* Arealization of the neocortex in mammals: genetic and epigenetic contributions to the phenotype // *Brain Behav. Evol.* 2000. V. 55. P. 322–335.
- Krubitzer L., Kaas J.* The evolution of the neocortex in mammals: how is phenotypic diversity generated // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2005. V. 15. P. 444–453.
- Krubitzer L., Kahn D.M.* Nature versus nurture revisited: an old idea with a new twist // *Prog. Neurobiol.* 2003. V. 70. P. 33–52.
- Larsen P.J., Hay-Schmidt A., Vrang N., Mikkelsen J.D.* Origin of projections from the midbrain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: a combined retrograde and anterograde tracing study // *Neuroscience.* 1996. V. 70. P. 963–988.
- Liu Q., Dwyer N.D., O'Leary D.D.M.* Differential expression of *COUP-TFI*, *CHL1* and two novel genes in developing neocortex identified by differential display PCR // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. P. 7682–7690.
- Mackarehtschian K., Lau C.K., Caras I. et al.* Regional differences in the developing cerebral cortex revealed by ephrin-A5 expression // *Cereb. Cortex.* 1999. V. 9. P. 601–610.
- Mallamaci A., Iannone R., Briata P. et al.* *EMX2* protein in the developing mouse brain and olfactory area // *Mech. Devel.* 1998. V. 77. P. 165–172.
- McCandlish C., Waters R.S., Cooper N.G.* Early development of the representation of the body surface in S1 cortex barrel field in neonatal rats as demonstrated with peanut agglutinin binding: evidence for differential development within the rattunculus // *Exp. Brain Res.* 1989. V. 77. P. 425–431.
- McCandlish C.A., Li C.X., Waters R.S.* Early development of S1 cortical barrel field representation in neonatal rats follows a lateral-to-medial gradient: an electrophysiology study // *Ibid.* 1993. V. 92. P. 369–374.
- Nakagawa Y., Johnson J.E., O'Leary D.D.M.* Graded and areal expression patterns of regulatory genes and cadherins in embryonic neocortex independent of thalamocortical input // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. P. 10 877–10 885.
- Nothias F., Fishell G., Ruiz i Altaba A.* Cooperation of intrinsic and extrinsic signals in the elaboration of regional identity in the posterior cerebral cortex // *Curr. Biol.* 1998. V. 8. P. 459–462.
- Nowicka D., Liguz-Leczmar M., Skangiel-Kramska J.* A surface antigen delineating a subset of neurons in primary somatosensory cortex of the mouse // *Acta Neurobiol. Exp.* 2003. V. 63. P. 185–195.
- O'Leary D.D.* Do cortical areas emerge from a protocortex // *Trends Neurosci.* 1989. V. 12. P. 400–406.
- O'Leary D.D., Nakagawa Y.* Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002. V. 12. P. 14–25.
- Pallas S.L.* Intrinsic and extrinsic factors that shape neocortical specification // *Trends Neurosci.* 2001. V. 24. P. 417–423.
- Petrov T., Krukoff T.L., Jhamandas J.H.* The hypothalamic paraventricular and lateral parabrachial nuclei receive collaterals from raphe nucleus neurons: a combined double retrograde and immunocytochemical study // *J. Comp. Neurol.* 1992. V. 318. P. 18–26.
- Porter F.D., Drago J., Xu Y. et al.* *Lhx2*, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development // *Development.* 1997. V. 124. P. 2935–2944.
- Ragsdale C.W., Grove E.A.* Patterning the mammalian cerebral cortex // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2001. V. 11. P. 50–58.
- Rakic P.* Specification of cerebral cortical areas // *Science.* 1988. V. 241. P. 170–176.
- Rice F.L., Van der Loos H.* Development of the barrels and barrel field in the somatosensory cortex of the mouse // *J. Comp. Neurol.* 1977. V. 171. P. 545–560.
- Rubenstein J.L.R.* Development of serotonergic neurons and their projections // *Biol. Psychiatry.* 1998. V. 44. P. 145–150.
- Rubenstein J.L., Rakic P.* Genetic control of cortical development // *Cereb. Cortex.* 1999. V. 9. P. 521–523.
- Rubenstein J.L.R., Anderson S., Shi L. et al.* Genetic control of cortical regionalization and connectivity // *Ibid.* 1999. V. 9. P. 524–532.
- Salminen M., Meyer B.I., Gruss P.* Efficient polyA Trap Approach allows the capture of genes specifically active in differentiated embryonic stem cells and in mouse embryos // *Devel. Dynamics.* 1998. V. 212. P. 326–333.
- Schreyer D.J., Jones E.G.* Topographic sequence of outgrowth of corticospinal axons in the rat: a study using retrograde axonal labeling with Fast blue // *Devel. Brain Res.* 1988. V. 38. P. 89–101.
- Steindler D.A., Cooper N.G., Faissner A. et al.* Boundaries defined by adhesion molecules during development of the cerebral cortex: the J1/tenascin glycoprotein in the mouse somatosensory cortical barrel field // *Devel. Biol.* 1989. V. 131. P. 243–260.
- Stoykova A., Gruss P.* Roles of Pax genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns // *J. Neurosci.* 1994. V. 14. P. 1395–1412.
- Suzuki S.C., Inoue T., Kimura Y. et al.* Neuronal circuits are subdivided by differential expression of type-II classic cadherins in postnatal mouse brains // *Mol. Cell Neurosci.* 1997. V. 9. P. 433–447.

Waite P.M. Normal nerve fibers in the barrel region of developing and adult mouse cortex // *J. Comp. Neurol.* 1977. V. 173. P. 165–174.

Walther C., Gruss P. *Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS // *Development.* 1991. V. 113. P. 1435–1449.

Wise S.P., Jones E.G. Developmental studies of thalamocortical and commissural connections in the rat somatic sensory cortex // *J. Comp. Neurol.* 1978. V. 178. P. 187–208.

Wong-Riley M. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry // *Brain Res.* 1979. V. 171. P. 11–28.

Transgene 6A-99 Is a Molecular Marker of Developing Somatosensory Cortex in Mice

A. A. Lazutkin*, B. I. Meyer**, and K. V. Anokhin*

* *Anokhin Institute of Normal Physiology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Mokhovaya 11/4, Moscow. 125009 Russia*

** *Max Planck Institute of Biophysical Chemistry, Am Fassberg 11, F-37077 Gottingen, Germany
E-mail: lazalex@yandex.ru*

Abstract—Among dozens of known genes, active in the developing cortex, none possessed expression strictly limited by one functional area of the cortex. We found that in 6A-99 transgenic mice, *Lac-Z*-reported gene was expressed selectively in the somatosensory cortex. In the primary somatosensory cortex, expression was localized in the barrel field, including the zone of representation of vibrissae, fore and hind limbs, jaws, and head. In addition, *LacZ*-expressing cells were found in the secondary somatosensory cortex, as well as in the nuclei of hypothalamus and dorsal and caudal raphe nuclei. In the cortex, expression of transgene 6A-99 began on day 3 of postnatal development (P3) and embraced only the area of primary somatosensory cortex: zones of representation of the snout, vibrissae, and lower jaw. On P5, pronounced expression 6A-99 was detected in the secondary somatosensory cortex and zone of representation of fore paws. Expression in the zone of representation of hind paws was observed on P7. Expression of 6A-99 in the somatosensory cortex disappeared by P50, the age of final functional maturation of the cerebral cortex. Our results suggest that the regulation of transcription in the developing mouse somatosensory cortex differs from those in other cortical areas. Transgene 6A-99 may serve as a specific molecular marker of the developing somatosensory cortex in mice and can be used for studying the mechanisms underlying genetic and epigenetic control of the neocortex functional regionalization.

Key words: gene trap, somatosensory cortex, regionalization of neocortex, postnatal development, heterochrony.