

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
РАБОТЫ

УДК 577.218+612.822

ЭКСПРЕССИЯ ФАРНЕЗИЛИРОВАННОГО EGFP В НЕЙРОНАХ  
ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ НЕОКОРТЕКСА ПРИВОДИТ  
К НАРУШЕНИЮ РАЗВИТИЯ ДЕНДРИТНЫХ ШИПИКОВ

© 2025 г. Г. Р. Смирнова<sup>1</sup>, О. С. Иджилова<sup>1</sup>, А. Абонакур<sup>1</sup>, А. Ю. Малышев<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

\*E-mail: malyshev@ihna.ru

Поступила в редакцию 15.11.2024 г.

После доработки 02.12.2024 г.

Принята к публикации 04.12.2024 г.

Генетически кодируемые флуоресцентные белки широко используются в биологических исследованиях вообще и в нейробиологии в частности. При использовании этих инструментов важно, чтобы экспрессия флуоресцентного белка не нарушила протекание естественных физиологических процессов в клетке. Добавление мотива фарнезилирования к флуоресцентным белкам приводит к их за jakiориванию в плазматической мембране, что часто используется для визуализации тонких деталей морфологии клетки, например дендритных шипиков. В нашей работе мы исследовали развитие шипиков в первично культивируемых нейронах неокортекса при трансфекции клеток фарнезилированным и немодифицированным EGFP методом электропорации в суспензии в день посадки. Было обнаружено, что нейроны, экспрессирующие фарнезилированный EGFP, демонстрируют выраженные нарушения в развитии шипиков, в частности эти клетки характеризовались более длинными шипиками с большим количеством филоподия-подобных структур, что характерно для различных патологических состояний. Поэтому при использовании фарнезилированных флуоресцентных белков в экспериментах необходимо учитывать их возможное негативное влияние на развитие различных мембранных структур клетки, в частности нейрональных шипиков.

**Ключевые слова:** EGFP, трансфекция, фарнезилирование, нейрон, шипик, культура нейронов

**DOI:** 10.31857/S1027813325010127, **EDN:** DKCJUD

ВВЕДЕНИЕ

Генетически кодируемые флуоресцентные белки в последние десятилетия стали незаменимым инструментом в нейробиологических исследованиях, позволяя прижизненно визуализировать различные процессы в клетках. Клонирование зеленого флуоресцентного белка (Green Fluorescent Protein, GFP) из медузы *Aequoria victoria* положило начало широкому применению этих инструментов, а также запустило поиск в геномах других беспозвоночных новых флуоресцентных белков с разными спектральными характеристиками [1], а также создание генно-инженерных модификаций уже имеющихся флуоресцентных белков с целью оптимизации параметров их экспрессии в клетках млекопитающих [2]. Так, был создан улучшенный GFP – enhanced GFP (EGFP), адаптированный для экспрессии в клетках млекопитающих и в 35 раз более яркий, чем природный GFP [3]. Причем если оригинальные флуоресцентные белки решают

задачи только морфологического мечения клеток, то созданные на их основе методами генной инженерии зонды позволяют проводить оптическое измерение множества физиологических параметров нейрона: измерение уровня ионов кальция в цитоплазме, уровня мембранныго потенциала и даже изменение концентрации тех или иных медиаторов или протонов в окружающем нейрон пространстве [4].

Присоединение к флуоресцентным белкам различных таргетирующих мотивов от белков, имеющих ту или иную специфическую локализацию в клетке, помогает визуализировать отдельные клеточные компартменты и органеллы, что значительно расширяет потенциал применения этих инструментов. В частности, широко применяются мотивы белков постсинаптической плотности PSD95 и proSAP1/Shank2 для таргетирования зондов в область постсинаптического уплотнения [5–7], мотив белка Kv2.1 – для локализации химерных конструкций в соматическом компартменте и проксимальных

частях дендритов [8]. Для таргетирования флуоресцентных белков в ядро применяют мотивы ядерной сигнализации NLS. [9, 10].

Для лучшей визуализации плазматической мембраны клеток используют мотивы, таргетирующие флуоресцентные белки в подмембранные пространство. В частности, фарнезилирующий мотив белков семейства Ras, присоединенный к флуоресцентным белкам, помогает более четко визуализировать границы клетки. Фарнезилирующий мотив белка H-Ras (F мотив) состоит из 20 аминокислот, последние 4 аминокислоты образуют так называемую CAAХ последовательность, где С – цистеин, А – любая алифатическая кислота, а Х – серин, метионин или аланин [11]. Фермент фарнезилтрансфераза узнает CAAХ последовательность и необратимо присоединяет к цистеину 15-углеродную предильную группу, имеющую сродство к мембране клетки. Кроме сайта пренилирования, F мотив имеет 2 сайта пальмитирования: к цистеину через тиоэфирную связь обратимо присоединяется 16-углеродный остаток пальмитиновой кислоты. Таргетирующее свойство мотивов также используют для создания сенсоров: например, фарнезилирующий мотив из белка K-Ras4b использовали для создания фарнезил-электростатического переключателя, регулируемого активностью протеинкиназы A [12]. Желтый флуоресцентный белок, чувствительный к иону хлора, с N-концевым 10-аминокислотным содержащим сайты пальмитирования мотивом белка нейромодулина (GAP-43) способен встраиваться в мембрану и детектировать внутриклеточную концентрацию хлора как в соме, так и в дендритах нейронов [13].

С помощью флуоресцентных белков и определенных таргетирующих мотивов можно изучать даже микродомены мембран: например, гликосфинголипид-холестериновые домены (т.н. липидные рафты) – участки мембраны, обогащенные сфингомиелином, стеринами и белками. В статье Роджерса 2002 г. был использован фьюжен флуоресцентного белка EGFP и 10-аминокислотного мотива белка Src тирозинкиназы p56<sup>lck</sup> (Lck). В мотиве аминокислот Gly<sup>2</sup> N-миристилируется (присоединяется остаток миристиновой кислоты – C14), а Cys<sup>3</sup> и Cys<sup>5</sup> – пальмитируются, тем самым обеспечивая гидрофобность EGFP, что увеличивает его встраивание в липидные рафты [14].

При использовании любых генетически кодируемых зондов в физиологических экспериментах важно, чтобы экспрессия применяемых конструкций не приводила к нарушению тех или иных физиологических процессов в клетке. Особенно пристальное внимание следует уделять этому тогда, когда используются мотивы, направляющие зонд в определенную часть клетки, где возможна конкуренция с другими белковыми молекулами, входящими в состав исследуемой структуры. В нашей

работе мы показали, что использование такого распространенного мотива для встраивания флуоресцентного зонда в мембрану клетки как мотива фарнезилирования может приводить к нарушению формирования тонких деталей морфологии дендритных шипиков нейрона, по крайней мере при экспрессии генетической конструкции, содержащей F мотив, на протяжении всего времени индивидуального развития нейрона и формирования его шипиков.

## МЕТОДЫ

**Создание генетических конструкций.** Плазмида pAAV\_CAG\_EGFP\_F с фарнезилирующим мотивом была создана на основе плазмида pAAV\_CAG\_ChR2\_EGFP. Плазмиду pAAV\_CAG\_ChR2\_EGFP обрабатывали эндонуклеазами рестрикции EcoRI и NheI-HF, в результате реакции вырезался участок ChR2\_EGFP, и по этим же рестриктным сайтам вставлялась последовательность EGFP\_F. F (фарнезилирующий) мотив взят из последовательности белка с-Ha-Ras. Между каждым флуоресцентным белком и F мотивом вставлен линкер agcggccctgcggagc. Последовательность EGFP\_F амплифицировалась с плазмида pAAV\_СамКII\_oChIEF\_EGFP с помощью праймеров EGFP\_NheI\_for и EGFP\_F\_EcoRI\_rev (нуклеотидные последовательности приведены в табл. 1). Контрольная плазмида содержит только последовательность флуоресцентного белка.

**Животные.** Все манипуляции и процедуры с участием животных производились в соответствии с протоколами, одобренными этической комиссией ИВНД и НФ РАН. В работе использовались мыши линии ICR неонатального возраста (0–1 день жизни) для посадки первичной культуры нейронов и мыши линии C57Black/6 в возрасте 2–3 месяцев для инъекции вируса.

**Инъекция вируса.** Инъекция вируса производилась под изофлурановой анестезией по стандартной методике [15]. Дексаметазон (2 мг/кг, внутривенно) использовался для предотвращения воспаления после операции. Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы серотипа 2 (AAV2), содержащие фарнезилированный EGFP под промотором CAG, были синтезированы в ФГБУ Федеральном центре мозга и нейротехнологий ФМБА России. Вирус медленно вводили интракраниально в правое полушарие на 200 мкм ниже поверхности мозга (1 мкл в концентрации 1,49E+12 vg/ml в PBS, скорость инъекции 0,06 мкл в минуту).

**Приготовление первичных нейрональных культур из неокортекса мышей.** Животное декапитировали с помощью острых медицинских ножниц и извлекали мозг. Выделение ткани производилось на льду в растворе DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific Inc., США)

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности праймеров и F мотива

Название	Нуклеотидная последовательность	Матрица	Амплифицированный продукт
EGFP_NheI_for	5'ttgcttagcatggtagcaaggcgaggag	pAAV_CaMKII_oChIEF_EGFP	EGFP_F
EGFP_F_EcoRI_rev	5'tttgaattttttagtcacgcacgcattgcagtcatgcaggccaggccagactcatcaggggggttcagcttgctccgcaggcgcgttgcacagctcgccatgcccag		
F мотив	aagctgaacccccctgtatgagtctggccctggctgcatgagctgcaaatgcgtgcgtgac		

с добавлением 15 мМ HEPES. Под бинокулярным микроскопом отделяли неокортекс и снимали с полушарий сосудистую оболочку. Полученную ткань тщательно измельчали скальпелем, переносили в теплый (37°C) 0,08% раствор трипсина в DMEM и оставляли инкубироваться на протяжении 15 мин, в течение которых происходила ферментативная дезагрегация ткани. После этого пробирку центрифугировали, отмывали ткань от трипсина и ресусPENDИРОвали ее в стандартной нейробазальной среде (Neurobasal™-A Medium, Thermo Fisher Scientific), обогащенной B-27™ (50X) (Thermo Fisher Scientific) и 200 мМ аланил-глутамина (ПанЭко, РФ). Далее несколько раз производились следующие процедуры:

- ткань тщательно ресусPENDИРОвали в 8 мл питательной среды с помощью автоматической пипетки;
- в течение нескольких минут происходило расслоение неоднородной супензии на фракции под действием силы тяжести;
- по истечении этого времени с помощью автоматической пипетки из-под поверхности жидкости отбирали 1 мл супензии (фракцию одиночных клеток) и переносили его в чистую пробирку;
- объем исходной супензии восполняли с помощью 1 мл чистой питательной среды.

Для высеваания культур были подготовлены стандартные 4-луночные планшеты. На дно лунок были помещены покровные стекла для микроскопии диаметром 10 мм. Стекла были покрыты водным раствором полилизина (Poly-L-Lysine (10X), Gibco, США), затем отмыты и высушены. По центру каждого стекла был помещен стеклянный цилиндр объемом около 100 мкл, внутрь которого и высевались клетки. Благодаря этому плотность клеточной культуры увеличивалась приблизительно до 4 тыс. клеток на 1 мм<sup>2</sup> (что стимулирует образование синаптических контактов и нормальное созревание *in vitro*), в то время как общее количество клеток в культуре оставалось небольшим.

Из числа всех выделенных клеток приблизительно 1/4 подвергались процедуре электропорации

(описание см. ниже), после этого все клетки снова равномерно перемешивались и высевались на покровные стекла из расчета около 125 тыс. клеток на одну культуру.

Культуры содержались в стерильном инкубаторе при температуре 37°C, содержании CO<sub>2</sub> 5% и относительной влажности 95%. По необходимости производилось регулярное частичное обновление среды культивации на свежую.

**Электропорация.** Используемую плазмиду, содержащую ген EGFP либо модифицированного fEGFP под универсальным промотором CAG, добавляли в количестве 10 мкг к 100 мкл супензии клеток в Opti-MEM™ (Thermo Fisher Scientific, США). Электропорацию производили с помощью NEPA21 (Nepa Gene Co., Ltd, Япония), после чего клетки возвращали обратно и смешивали с остальными 3/4. За счет такой выборочной электропорации достигается более высокий уровень выживаемости электропорированных клеток.

**Иммуноцитохимия и морфологический анализ.** На 15-й день культивирования первичную культуру нейронов коры мышей фиксировали 4% раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Промывали 3 раза по 5 мин в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (Эко-сервис, Россия) на качалке со скоростью 50 об/мин (BioSan, Латвия).

После промывки к клеткам добавляли раствор РТА (фосфатно-солевой буфер, 0.5% Triton X-100, азид натрия 0.01%) с козьей сывороткой 5% (Capricorn, Индонезия) с первичными антителами (мышьиные моноклональные антитела на синаптофизин в разведении 1:500 (Праймбиомед, Россия); мышиные моноклональные антитела на PSD95 в разведении 1:200 (Invitrogen, США)) и инкубировали в течение 18 часов при +4. После промывки к клеткам добавляли разведенные в РТА с 5% козьей сывороткой вторичные антитела goat anti-mouse AlexaFluor 594 (Invitrogen, США) в разведении 1:400, инкубировали на качалке со скоростью 50 об/мин (BioSan, Латвия) в течение 2 ч при комнатной температуре. Промывали раствором PBS 1 раз/5 мин, затем 1 раз/5 мин водой mQ, 1 раз/5 мин водным раствором DAPI (1 : 40000),

1 раз/5 минут раствором PBS и помещали на предметное стекло в каплю раствора AquaPolyMount (Polysciences, США).

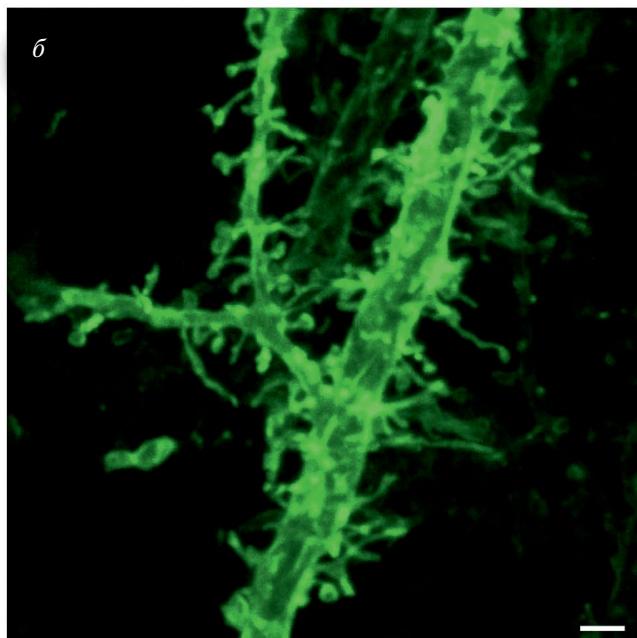
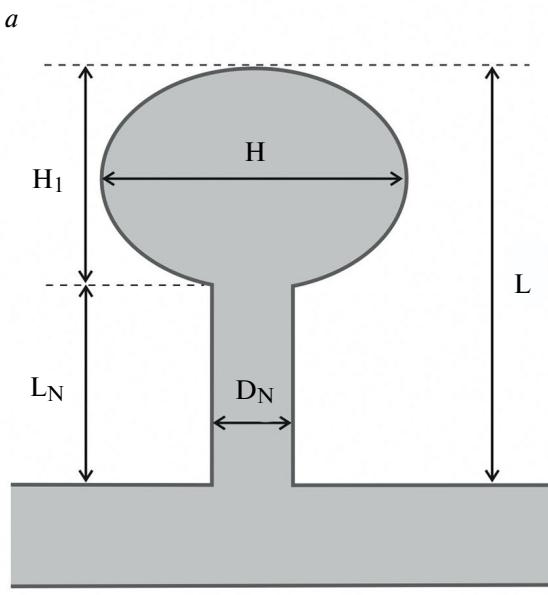
Далее препараты были отсняты на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе (Thorlabs, USA) в зеленом (EGFP) и красном (AlexaFluor 594) каналах. Для количественной оценки изменения морфологии дендритных шипиков для каждого нейрона выбирался фрагмент дендрита длиной 50–100 мкм с достаточной плотностью шипиков, и на этом фрагменте анализировались все шипики подряд. Анализировалась длина дендритных шипиков, а также их морфологический тип. Традиционно шипики делят на четыре разных типа: грибовидный, пенек, тонкий и филоподия [16, 17]. Шипики относили к тому или иному классу при одновременном выполнении 2 условий: грибовидный –  $H \geq H_1$  и  $L_N \leq H_1$ ; тонкий –  $H \approx H_1$  и  $L_N \geq H_1$ ; филоподия –  $H = D_N$  и  $L_N > d_N$ ; пенек –  $L_N = D_N$  (рис. 1 $a$ , 2 $a$ ,  $\delta$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предварительной серии экспериментов мы экспрессировали фарнезилированный EGFP в пирамидных нейронах коры головного мозга мышей. Для этой цели в неокортекс взрослых мышей была введена суспензия адено-ассоциированных вирусных частиц (AAV) второго серотипа, несущих ген

fEGFP под сильным неселективным промотором CAG. Через две недели после инъекции вируса мыши были перфузированы, после чего были подготовлены срезы мозга толщиной 50 мкм. Морфологический анализ срезов, проведенный с использованием конфокального микроскопа, показал наличие ярко флуоресцирующих нейронов, причем флуоресценция была сосредоточена преимущественно вдоль мембраны клетки. Тела клеток практически не детектировались, однако дендриты были видны очень хорошо со значительной степенью детализации (рис. 1 $b$ ).

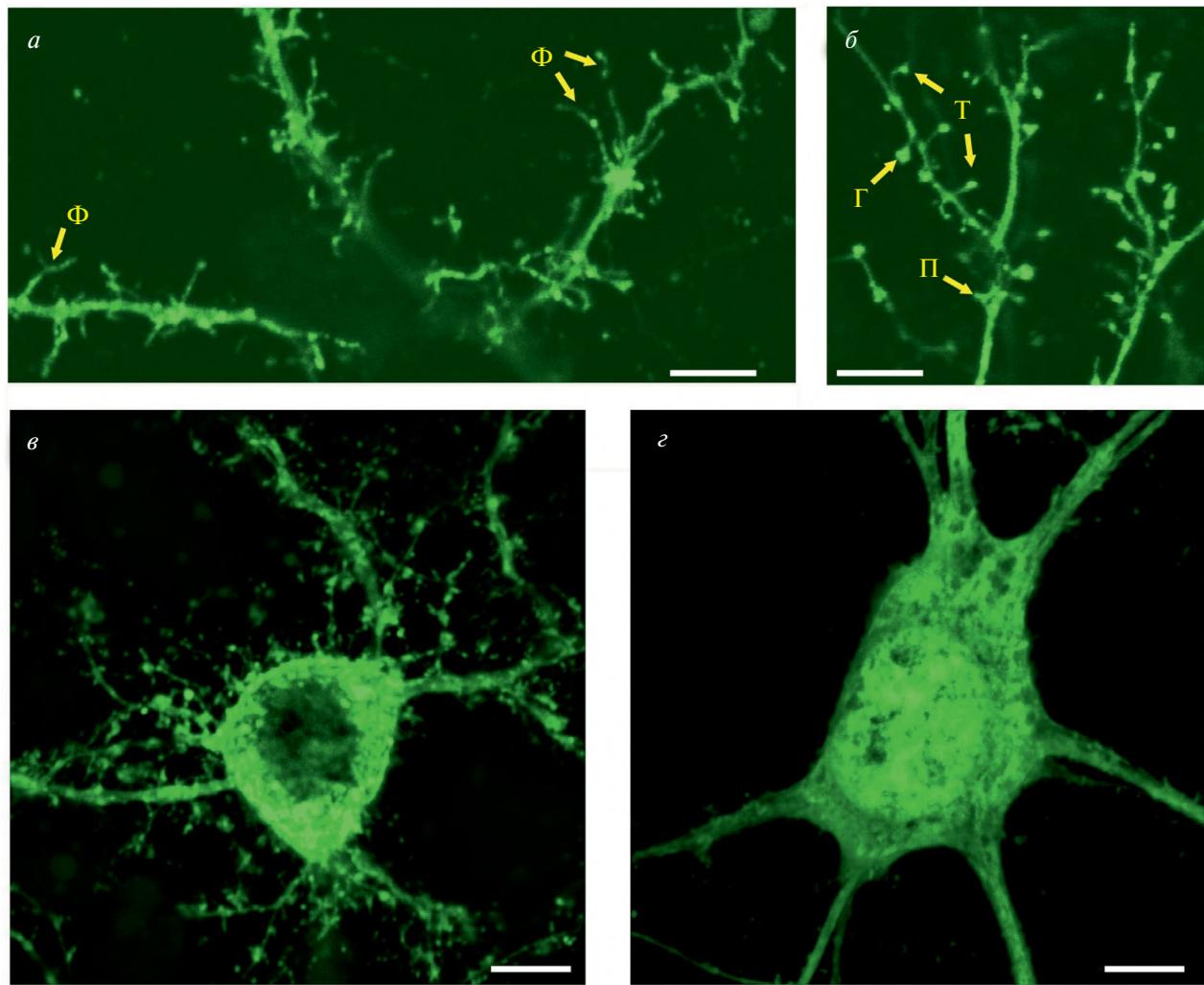
После этого мы начали основную серию экспериментов, направленных на изучение возможности применения fEGFP в условиях его долговременной экспрессии в целях изучения динамики изменения морфологии шипиков. Для этого мы трансфицировали культивируемые нейроны неокортекса мыши плазмидой, несущей последовательность fEGFP. Морфологический анализ нейронов, выполненный на 15–20 день культивирования, показал наличие яркой флуоресценции в клетках, с хорошей детализацией шипиков. Однако форма и длина шипиков сильно отличались от обычной: у fEGFP-содержащих нейронов шипики были более длинными и извитыми по сравнению с клетками, трансфицированными немодифицированным EGFP (рис. 2 $a$ ,  $\delta$ ). Более того, довольно часто попадались нейроны, у которых наблюдались тонкие



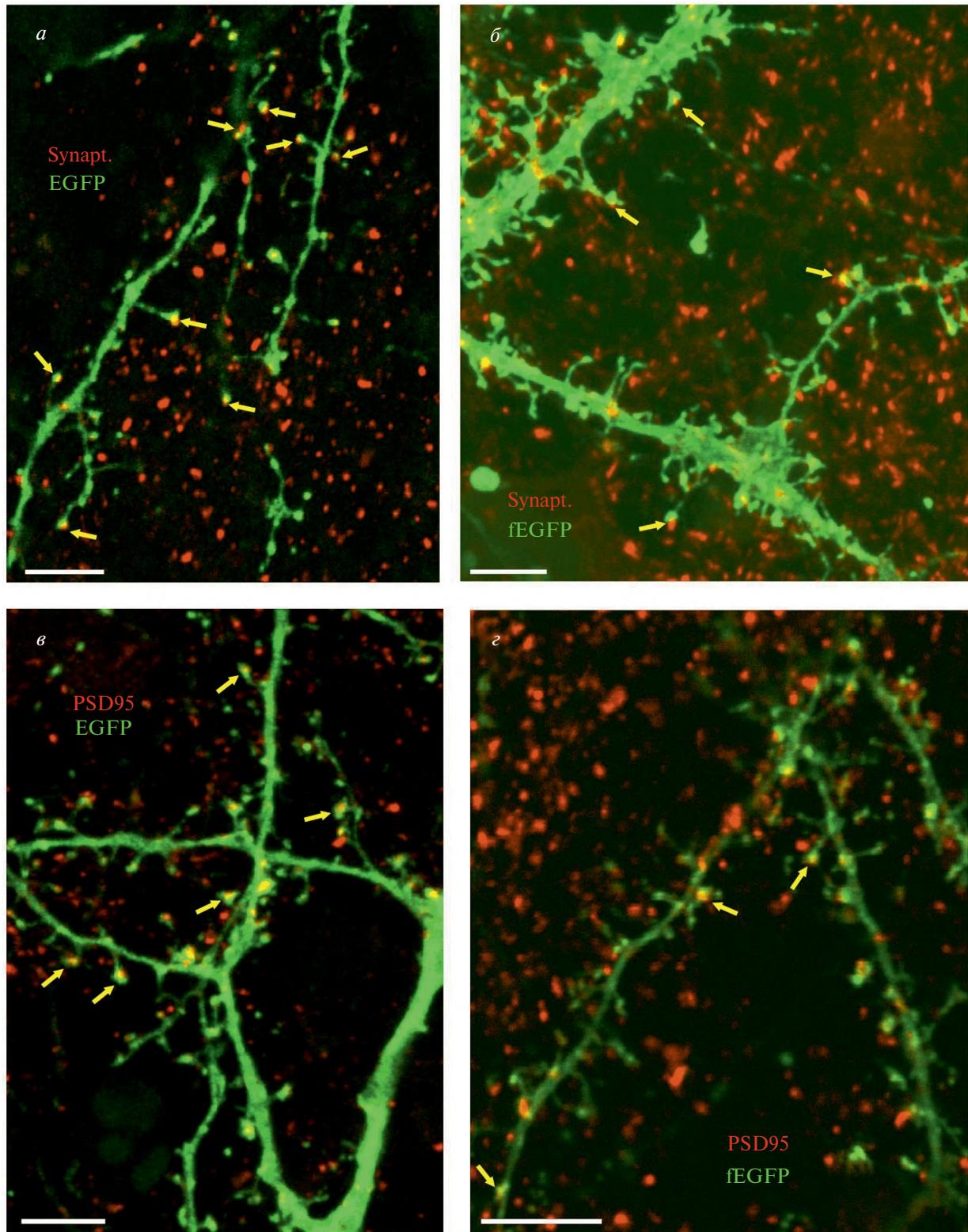
**Рис. 1.** Морфология дендритных шипиков. *а* – Схематическое изображение шипика с отображенными параметрами, которые использовались для отнесения шипика к одному из четырех морфологических типов: грибовидный, пенек, тонкий и филоподия. *б* – Конфокальная микрофотография, демонстрирующая фрагмент дендрита пирамидного нейрона неокортекса мыши, трансдуцированного *in vivo* адено-ассоциированным вирусом, несущим фарнезилированный EGFP. Калибровка 2 мкм.

филоподия-подобные отростки, отходящие непосредственно от сомы, чего никогда не встречалось в клетках, трансфицированных EGFP (рис. 2 $\delta$ ,  $\varepsilon$ ). Для того чтобы систематически оценить влияние экспрессии фарнезилированного белка на морфологию шипиков, мы поставили специальные серии экспериментов, в которых при посадке суспензия нейронов разделялась на две части; одна из них трансфицировалась плазмидой с фарнезилированным EGFP, другая – с немодифицированным EGFP. Всего было выполнено три таких посадки и на каждом стекле было проанализировано несколько нейронов. Для выяснения функциональности шипиков трансфицированных нейронов мы произвели иммунохимическое окрашивание культур на два синаптических белка: пресинаптический белок PSD95. Нейроны, трансфицированные

белок PSD95. Нейроны, трансфицированные плазмидой с fEGFP, как и контрольной плазмидой с EGFP, демонстрировали выраженное иммунохимическое окрашивание с характерным паттерном. Иммунохимическая метка в большинстве случаев колокализовалась с окончаниями шипиков (рис. 3). Причем, как и ожидалось, иммунореактивные к синаптофизину точки (по всей видимости соответствующие пресинаптическим терминалам) локализовались преимущественно рядом с головкой шипика с небольшими визуальными перекрытием, объясняющимся, скорее всего, светорассеиванием, тогда как иммунореактивность к постсинаптическому PSD95 была сосредоточена преимущественно внутри головки шипика (рис. 3). Для объективной оценки мы подсчитали проценты шипиков, головка которых была колокализована



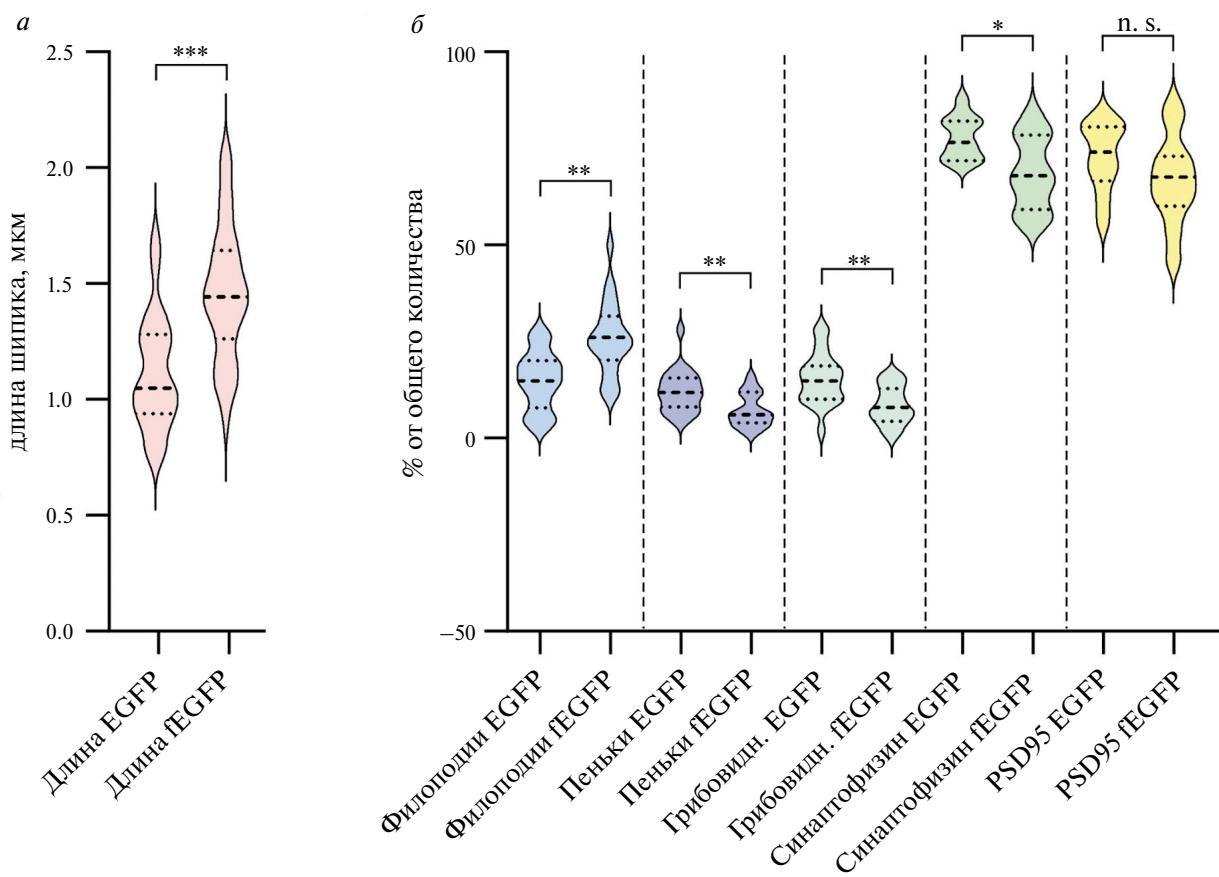
**Рис. 2.** Культивируемые нейроны, трансфицированные фарнезилированным EGFP, демонстрируют выраженные аномалии развития по сравнению с клетками, экспрессирующими немодифицированный EGFP. *a, б* – фрагменты дендритов нейронов, экспрессирующих fEGFP (*a*) и EGFP (*б*). Стрелками с буквами обозначены примеры шипиков, отнесенных к тому или иному морфологическому классу: Ф – филоподия, Г – грибовидный, П – пенькообразный, Т – тонкий. *б, г* – тела клеток, трансфицированных плазмидой с fEGFP (*б*) и EGFP (*г*). Калибровка 5 мкм.



**Рис. 3.** Иммунохимическое окрашивание нейронов, экспрессирующих EGFP и fEGFP, антителами к синаптическим белкам. *а, б* – Фрагменты дендритов нейронов, экспрессирующих EGFP (*а*) и fEGFP (*б*) (зеленое), окрашенные антителами к пресинаптическому белку синаптофизину (красное). Стрелками отмечены некоторые шипики, у которых головка соседствует с иммуноположительной меткой. *в, г* – Нейроны, трансфицированные плазмидами с EGFP и fEGFP, окрашенные антителами к постсинаптическому белку PSD95 (красное). Стрелками отмечены совпадения иммунореактивной метки с головкой шипика. Калибровка 5 мкм.

с иммунохимической меткой к синаптофизину или PSD95. Мы сравнивали шипики культивируемых нейронов, трансфицированных фарнезилированным и немодифицированным EGFP по 6 различным параметрам (средняя длина шипика, процент филоподий, пеньков, грибовидных, содержащих метку синаптофизина и PSD95), поэтому для коррекции результатов статистической обработки мы применили коррекцию на множественные сравнения Холма–Бонферони. Все распределения изучаемых величин прошли тест на нормальность, поэтому во всех случаях для попарных сравнений использовался параметрический *t*-критерий. Анализ препаратов показал, что нейроны, экспрессирующие фарнезилированный EGFP, в среднем характеризуются значительно более длинными шипиками ( $1,46 \pm 0,04$  мкм,  $N = 42$  нейрона) по сравнению с клетками, трансфицированными EGFP ( $1,12 \pm 0,04$  мкм,  $N = 31$  нейрона,  $p < 0,001$ ) (рис. 4). При этом клетки с fEGFP имели существенно большее количество филоподий по

сравнению с нейронами, экспрессирующими EGFP ( $25,9 \pm 2,1\%$  ( $N = 21$  нейрон) и  $14,9 \pm 1,6\%$  ( $N = 21$  нейрон);  $p < 0,01$ ). У некоторых нейронов, трансфицированных плазмидой с fEGFP, около половины всех шипиков составляли филоподии (см. пример на рис. 2а). Кроме того, нейроны, трансфицированные фарнезилированным EGFP, демонстрировали достоверно меньшее количество грибовидных ( $8,6 \pm 1,0\%$  ( $N = 21$ ) и  $15,3 \pm 1,4\%$  ( $N = 23$ );  $p < 0,01$ ) и пеньковых ( $7,1 \pm 1,0\%$  ( $N = 19$ ) и  $12,0 \pm 1,2\%$  ( $N = 21$ );  $p < 0,01$ ) шипиков. Морфометрический анализ препаратов, окрашенных антителами к синаптофизину и PSD95, показал, что большинство шипиков характеризовалось наличием иммунохимической флуоресцентной метки (рис. 3). При этом шипики нейронов с fEGFP в меньшем количестве несли метку синаптофизина, чем контрольные нейроны с немодифицированным EGFP ( $68,6 \pm 2,6\%$  ( $N = 13$ ) и  $77,8 \pm 1,7\%$  ( $N = 11$ ),  $p < 0,05$ ). В то же время по количеству шипиков, демонстрирующих наличие



**Рис. 4.** Скрипичные диаграммы, демонстрирующие распределения величин различных характеристик шипиков в нейронах, экспрессирующих EGFP и fEGFP. Толстая пунктирная линия показывает медиану, точечные линии – первые квартили. *а* – Длина шипиков; *б* – количество шипиков данного морфологического типа или колокализованных с иммунохимической меткой к синаптическому белку в процентах по отношению к общему количеству проанализированных шипиков; правая ось ординат. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ; n.s. – различия недостоверны, критерий Стьюдента с поправкой Холма–Бонферони.

PSD95 иммунореактивности, нейроны двух групп достоверно не различались ( $66,8 \pm 3,5\%$  для fEGFP ( $N = 11$ ) и  $72,8 \pm 2,8\%$  для EGFP ( $N = 10$ )), (рис. 4).

Таким образом, экспрессия в нейронах флуоресцентных белков с мотивом фарнезилирования, повышающим их встраивание в мембрану, приводит к изменению соотношения различных типов дендритных шипиков. Каждый тип шипиков в нейронах имеет свое функциональное значение. Например, грибовидные шипики образуют прочные синаптические связи, имеют самую большую продолжительность жизни и поэтому считаются местами долговременного хранения памяти [18, 19]. Филоподии, как считается, представляют собой первый этап формирования синапсов [20]. При этом избыток филоподий во взрослом мозге может быть свидетельством протекания тех или иных патологических процессов, например дендриты у умственно отсталых взрослых людей часто покрыты дендритными филоподиями вместо шипиков [21]. Снижение количества шипиков, рядом с которыми присутствует иммунохимическая метка к синаптофизину, найденное в наших экспериментах, свидетельствует о том, что в нейронах, экспрессирующих фарнезилированный EGFP, происходит снижение количества функционирующих шипиков. Таким образом, изменение популяционного состава шипиков неизбежно будет сопровождаться нарушением функции синаптических входов, приходящих на данный нейрон и, как следствие, к изменению работы всей нейронной сети, элементы которой экспрессируют фарнезилированный флуоресцентный белок. Возможно, активное встраивание в мембрану дополнительного белка приводит к увеличению площади мембранны, что в конечном итоге приводит к наблюдаемым нарушениям в развитии дендритных шипиков.

В наших экспериментах мы трансфицировали нейроны в день посадки, то есть флуоресцентный белок присутствовал в нейронах на всем протяжении развития шипиков. Возможно, что при трансфекции фарнезилированными белками уже зрелых нейронов, как это происходило в наших пилотных экспериментах с вирусной трансдукцией нейронов зрелых мышей fEGFP, нарушения структуры шипиков не происходит, однако этот вопрос требует дальнейших исследований.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, экспрессия в нейронах флуоресцентных белков с мотивом фарнезилирования, повышающим их встраивание в мембрану, может приводить к нарушению развития дендритных шипиков, что, по всей видимости, может отражаться на функциональных свойствах синаптических входов клетки. Такие конструкции следует

с осторожностью использовать в прижизненных экспериментах по изучению физиологии нейронов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим М.П. Смирнову за помощь с инъекцией вирусов.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда, грант № 20-15-00398П.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

*Конфликт интересов.* Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Day R.N., Davidson M.W. // Chem. Soc. Rev. 2009. V. 38. P. 2887–2921.
2. Cranfill P.J., Sell B.R., Baird M.A., Allen J.R., Lavagnino Z., de Gruiter H.M., Kremers G.-J., Davidson M.W., Ustione A., Piston D.W. // Nat. Methods. 2016. V. 13. P. 557–562.
3. Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S. // Gene. 1996. V. 173. P. 33–38.
4. Kostyuk A.I., Demidovich A.D., Kotova D.A., Belousov V. V, Bilan D.S. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 4200.
5. Craven S.E., El-Husseini A.E., Bredt D.S. // Neuron. 1999. V. 22. P. 497–509.
6. Grabrucker A.M., Vaida B., Bockmann J., Boeckers T.M. // J. Neurosci. Methods. 2009. V. 181. P. 227–234.
7. Cane M., Maco B., Knott G., Holtmaat A. // J. Neurosci. 2014. V. 34. P. 2075–2086.
8. Lim S.T., Antonucci D.E., Scannevin R.H., Trimmer J.S. // Neuron. 2000. V. 25. P. 385–397.
9. Kitamura A., Nakayama Y., Kinjo M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015. V. 463. P. 401–406.
10. Lu J., Wu T., Zhang B., Liu S., Song W., Qiao J., Ruan H. // Cell Commun. Signal. 2021. V. 19. P. 60.
11. Амая М., Айзенхабер Б., Айзенхабер Ф., ван Хук М.Л. // Молекулярная биология. 2013. Т. 47. С. 717–730.
12. Kim A.K., Wu H.D., Inoue T. // Sci. Rep. England, 2021. V. 11. P. 16421.
13. Watts S.D., Suchland K.L., Amara S.G., Ingram S.L. // PLoS One. 2012. V. 7 P. e35373–e35373.
14. Rodgers W. // Biotechniques. 2002. V. 32 P. 1044–1051.
15. Keiser M.S., Chen Y.H., Davidson B.L. // Curr. Protoc. Mouse Biol. 2018. V. 8. e57
16. Yuste R. Dendritic Spines. The MIT Press, 2010.

17. Son J., Snng S., Lee S., Chang S., Kim M. // *J. Microsc.* 2011. V. 241. P. 261–272.
18. Hayashi Y., Majewska A.K. // *Neuron*. 2005. V. 46. P. 529–532.
19. Bourne J., Harris K.M. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2007. V. 17. P. 381–386.
20. Fiala J.C., Feinberg M., Popov V., Harris K.M. // *J. Neurosci.* 1998. V. 18. P. 8900–8911.
21. Wisniewski K.E., Segal S.M., Miezejeski C.M., Sersen E.A., Rudelli R.D. // *Am. J. Med. Genet.* 1991. V. 38. P. 476–480.

## Expression of Farnesylated EGFP in Primary Neocortex Culture Neurons Results in Impairs Dendritic Spike Development

G. R. Smirnova<sup>1</sup>, O. S. Idzhilova<sup>1</sup>, A. Abonakour<sup>1</sup>, and A. Yu. Malyshev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, RAS, Moscow, Russia*

Genetically encoded fluorescent proteins are widely used in biological research in general and in neurobiology in particular. When using these tools, it is important that the expression of the fluorescent protein does not disrupt the natural physiological processes in the cell. Addition of the farnesylation motif to fluorescent proteins leads to their anchoring in the plasma membrane, which is often used to visualize fine details of cell morphology, such as dendritic spines. In our work, we investigated the development of spines in primary cultured neocortical neurons by transfecting cells with farnesylated and unmodified EGFP by electroporation in suspension on the day of planting. It was found that neurons expressing farnesylated EGFP demonstrate pronounced disturbances in spine development, in particular, these cells were characterized by longer spines with more filopodia-like structures, which is typical for various pathological conditions. Therefore, when using farnesylated fluorescent proteins in experiments, it is necessary to take into account their possible negative impact on the development of various membrane structures of the cell, in particular neuronal spines.

*Keywords:* EGFP, transfection, farnesylation, neuron, spine, neuronal culture