

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 612.821.6

БИЦИСТРОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ
ДЛЯ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОТЕЗИРОВАНИЯ РЕЦЕПТИВНОГО ПОЛЯ
ГАНГЛИОЗНОЙ КЛЕТКИ ДЕГЕНЕРАТИВНОЙ СЕТЧАТКИ

Л. Е. Петровская^{1,2}, М. В. Рошин³, Г. Р. Смирнова³, Д. Е. Колотова^{3,4},
член-корреспондент РАН П. М. Балабан³, академик РАН М. А. Островский^{4,5},
А. Ю. Малышев^{3,*}

Поступило 20.12.2018 г.

С целью оптогенетического протезирования рецептивного поля ганглиозной клетки сетчатки глаза была создана бицистронная генетическая конструкция, несущая гены возбуждающего (канальный родопсин2) и тормозного (анионный канальный родопсин GtACR2) родопсинов. Отличительной особенностью данной конструкции стало объединение в её составе двух генов с помещением между ними мутантной IRES-вставки, обеспечивающей точное соотношение уровней экспрессии первого и второго генов в каждой трансфицированной клетке. Освещение центральной части нейрона светом с длиной волны 470 нм вызывало в клетке генерацию потенциалов действия. Световая стимуляция периферии нейрона индуцировала угнетение генерации потенциалов действия. Таким образом, нам удалось оптогенетическими методами смоделировать ON-OFF взаимодействия рецептивного поля ганглиозной клетки сетчатки. Данная конструкция теоретически может быть использована для оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки в случае её доставки к ганглиозным клеткам при помощи лентивирусных векторов.

Ключевые слова: оптогенетика, канальный родопсин2, анионный канальный родопсин, GtACR2, IRES, бицистронная конструкция, оптогенетическое протезирование.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524862258-261>

Одним из перспективных направлений восстановления зрения на поздних стадиях дегенерации сетчатки, когда фоторецепторные клетки погибли, является её оптогенетическое протезирование. Идеологически простейшим вариантом такого протезирования, которое в настоящее время находится на стадии клинических испытаний во Франции и США, является наделение световой чувствительностью сохранившихся нервных элементов сетчатки — ган-

глиозных клеток — путём гетерологической экспрессии в них канального родопсина при помощи вирусной трансдукции. Однако недостатком такого “прямого” подхода является то, что в случае протезирования ганглиозных клеток теряется обработка зрительной информации, происходящая на всех уровнях сетчатки — от фоторецепторов до ганглиозных клеток. Чтобы обойти хотя бы частично это ограничение, был предложен подход, заключающийся в воссоздании ON-OFF рецептивного поля ганглиозной клетки сетчатки путём субклеточного таргетирования возбуждающего опсина в центральной (сома и проксимальные дендриты нейрона) части клетки, а тормозного — на периферии. В доступной литературе мы обнаружили всего лишь две работы, в которых была продемонстрирована работоспособность этого подхода на препаратах изолированной сетчатки [1, 2]. Очевидно, что для создания полноценного ON-OFF рецепторного поля необходимо соблюсти чёткий баланс между возбуждающими и тормозными опсинами. Все предыдущие подходы к оптогенетическому воссозданию ON-OFF взаимодействий в рецептивном поле ганглиозных

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Москва

²Институт биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии наук, Москва

³Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии Российской Академии наук,
Москва

⁴Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

⁵Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской Академии наук, Москва

*E-mail: malyshev@ihna.ru

клеток, известные в мировой литературе, заключались в использовании двух экспрессионных векторов (двух плазмид или двух вирусов), один из которых нес ген возбуждающего, а другой ген — тормозного опсина [1, 2]. При таких способах отношение уровней экспрессии каждого гена будет сильно изменяться от клетки к клетке в зависимости от того, сколько копий ДНК первого и второго вектора попадёт внутрь клетки.

Мы разработали подход, при котором можно было бы поместить оба гена возбуждающего и тормозного опсинов внутрь одной конструкции, разделив их специальной вставкой, позволяющей контролировать уровень экспрессии второго гена относительно первого, что и стало предметом настоящего сообщения.

Данная конструкция должна была обеспечить соматическую локализацию возбуждающего опсина при помощи мотива Kv2.1, при этом экспрессия тормозного опсина никак пространственно не ограничивалась. Уровень экспрессии тормозного опсина должен был быть значительно снижен таким образом, чтобы в центральной части возбуждающий опсин функционально “перевешивал” тормозный и в результате суммарной реакцией на свет было возбуждение, а на периферии, где представлен исключительно анионный опсин, наблюдалось торможение.

В качестве возбуждающего опсина мы выбрали канальный родопсин2, в качестве тормозного — анионный канальный родопсин GtACR2, который, как мы показали ранее, является эффективным оптогенетическим инструментом для торможения активности нейронов [3]. Для реализации этого подхода мы создали генетические конструкции *pCAG-CHR2-Venus-Kv2.1-IRES_X-GtACR2-FLAG*, где *IRES_X* были разные мутанты *IRES* — участка внутренней посадки рибосомы вируса энцефаломиокардита дикого типа (мы ориентировались на результаты работы [4]) — варианты v5, v11 и v13, которые в оригинальной статье обеспечивали снижение экспрессии второго гена до 45, 24 и 9% соответственно (эффект *IRES* дикого типа был принят за 100%). Поскольку, как мы показали в своей предыдущей работе [5], в нейронах ген *IRES* дикого типа сам по себе вызывал ослабление экспрессии второго гена до 40%, то можно было бы предположить, что мутанты v5, v11 и v13 ослабят экспрессию второго гена до 18, 9 и 4% соответственно. Однако, как показали электрофизиологические эксперименты со световой стимуляцией нейронов, экспрессирующих данные конструкции, последние не смогли обеспечить правиль-

ного соотношения возбуждения и торможения при световой стимуляции центральной и периферической областей нейрона.

Далее мы разработали аналогичную конструкцию с использованием *IRESv10*, которая должна была обеспечить снижение экспрессии второго гена по расчётам до 11,6%. Для оценки параметров искусственного рецептивного поля, возникающего в клетках при экспрессии в них конструкции *pCAG-CHR2-Venus-Kv2.1-IRESv10-GtACR2-FLAG*, данный вектор был экспрессирован в пирамидных нейронах крыс и мышей, которые были использованы здесь в качестве модельной системы. Трансмембранные токи отдельных нейронов регистрировали при помощи метода локальной фиксации потенциала в конфигурации “целая клетка”. Нейроны выбирали под визуальным контролем с использованием флуоресценции в зелёной области спектра и дифференциальной интерференционно-контрастной видеомикроскопии. Пэтч-пипетки заполняли раствором на основе глюконата калия (в мМ): 130 глюконата калия, 4 KCl, 4 Mg-АТФ; 0,3 Na₂-GTP, 8 натрийфосфокреатинин; 0,2 ЭГТА, 10 Hepes), пэтч-пипетки имели сопротивление 4–6 МОм. Регистрацию проводили с помощью усилителя MultiClamp 700B (“Molecular Devices”, США) в режиме фиксации тока или потенциала. После усиления и фильтрации частот выше 10 кГц данные оцифровывали с частотой 20 кГц и вводили в компьютер с использованием аналого-цифрового преобразователя Digidata 1500 и программного обеспечения pCLAMP (“Molecular Devices”). Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с Директивой ЕС 86/609/ЕЕС об экспериментах на животных при одобрении этическим Комитетом Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

Для оптической стимуляции применяли специализированный фотостимулятор Polygon400 (“Mightex”, США), представляющий собой управляемую матрицу микрозеркал (DMD-матрица) и оснащённый светодиодом с выходной мощностью 400 мВт и длиной волны излучения 470 нм. Фотостимулятор был установлен на эпифлуоресцентном порту микроскопа Olympus BX51 (“Olympus”, Япония). Для световой стимуляции использовали водно-иммерсионный объектив 20× Olympus с числовой апертурой 0,8.

Конструкцией *pCAG-CHR2-Venus-Kv2.1-IRESv10-GtACR2-FLAG* были трансфицированы культивируемые гиппокампальные нейроны крыс. Через 14 сут культивирования (так называемые дни *in vitro*, DIV)

флуоресцирующие нейроны были подвергнуты электрофизиологическому анализу с одновременной оптической стимуляцией. Световые стимулы наносили на центральную и периферическую части нейронов и измеряли возникающий светоиндуцированный ток при разных значениях мембранного потенциала. Далее определяли величину потенциала реверсии светоиндуцированного тока. Очевидно, что при наличии в клетке двух родопсинов (катионного и анионного) с разными потенциалами реверсии суммарный потенциал реверсии (точнее, его близость к потенциалу реверсии первого или второго опсинов) будет являться критерием, позволяющим определить соотношение уровней экспрессии этих светоактивируемых белков. Мы обнаружили, что величина среднего потенциала реверсии светоиндуцированного тока, вызванного световой стимуляцией сомы нейронов, экспрессирующих конструкцию *pCAG-CHR2-Venus-Kv2.1-IREsV10-GtACR2-FLAG*, составила $32,5 \pm 3,3$ мВ (с учётом коррекции на потенциал жидкостного сопряжения). При периферической стимуляции тех же нейронов в них возникал светоиндуцированный ток со средним потенциалом реверсии $-46,2 \pm 1,1$ мВ.

Таким образом, при световой стимуляции центральной части клетки, содержащей генетическую конструкцию *pCAG-CHR2-Venus-Kv2.1-IREsV10-GtACR2-FLAG*, возникал трансмембранный ток, который индуцировал генерацию потенциалов дей-

ствия в нейроне, а при освещении периферической части клетки приводил к угнетению этого процесса.

Для изучения свойств конструкции *pCAG-CHR2-Venus-Kv2.1-IREsV10-GtACR2-FLAG* при её экспрессии в нейронах *in vivo* мы провели серию экспериментов с трансфекцией данной конструкцией пирамидных корковых нейронов мышей методом электропорации *in utero*. По достижении животными возраста 21–30 дней свойства трансфицированных нейронов изучали на переживающих срезах головного мозга. Нейроны исследовали внутриклеточно методом patch-clamp в конфигурации “целая клетка” в режиме фиксации тока. Мы обнаружили, что освещение центральной части нейрона светом с длиной волны 470 нм индуцировало в клетке генерацию потенциалов действия. Световая стимуляция периферии нейрона — угнетение генерации потенциалов действия, вызванных внутриклеточной инъекцией деполяризующего тока (рис. 1).

Таким образом, мы разработали и протестировали генетическую конструкцию, несущую в себе гены катионного и анионного канальных родопсинов и обеспечивающую воссоздание ON-OFF взаимодействий рецептивного поля ганглиозной клетки сетчатки. Данная конструкция теоретически может быть использована для терапии пигментного ретинита в случае её доставки к ганглиозным нейронам сетчатки при помощи лентивирусных векторов.

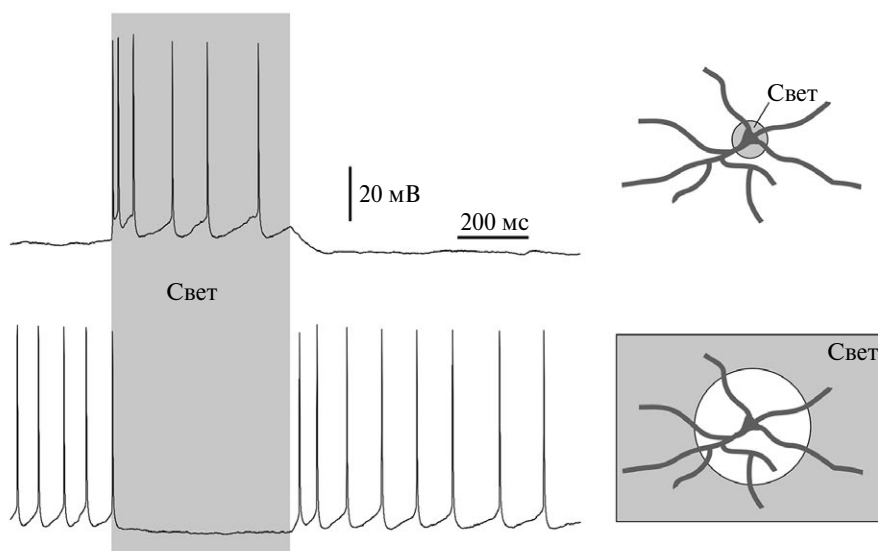


Рис. 1. Световая стимуляция центральной части нейрона, экспрессирующего *pCAG-CHR2-Venus-Kv2.1-IREsV10-GtACR2-FLAG*, вызывает активацию клетки (вверху), в то время как стимуляция периферии вызывает торможение (внизу). Время стимуляции показано серым прямоугольником. Справа — схематическое представление соотношения стимула и дендритного дерева нейрона. Для облегчения генерации потенциалов действия при световой стимуляции центральной части нейрона в клетку подавали подпороговый деполяризующий ток.

В качестве тормозного опсина мы впервые применили светоактивируемый анионный канал, а не светоактивируемые ионные помпы, как это было сделано в предыдущих работах на эту тему [1, 2]. Хлорпроводящий канальный родопсин GtACR2 является в 1000 раз более эффективным оптогенетическим инструментом по сравнению с катионным канальным родопсином [6], поэтому для обеспечения функционирования тормозного компонента рецептивного поля требуется на несколько порядков меньшее количество молекул GtACR2, чем при использовании тормозных ионных помп. Это создаёт значительно меньшую нагрузку на клетку в плане синтеза чужеродных молекул, что является несомненным преимуществом при оптогенетическом протезировании дегенеративной сетчатки.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках Государственного задания ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

и при поддержке гранта Российского научного фонда 16–15–00291.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greenberg K.P., Pham A., Werblin F.S. // *Neuron*. 2011. V. 69. P. 713–720.
2. Wu C., Ivanova E., Zhang Y., Pan Z.H. // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e66332.
3. Долгих Д.А., Малышев А.Ю., Роцин М.В., Смирнова Г.Р., Некрасова О.В., Петровская Л.Е., Фельдман Т.Б., Балабан П.М., Кирпичников М.П., Островский М.А. // *ДАН*. 2016. Т. 471. № 6. С. 729–731.
4. Koh E.Y., Ho S.C., Mariati, Song Z., Bi X., Bardor M., Yang Y. // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e82100.
5. Петровская Л.Е., Штефанюк В.С., Балабан П.М., Островский М.А., Малышев А.Ю. // *Нейрохимия*. 2017. Т. 34. № 4. С. 275–280.
6. Govorunova E.G., Sineshchekov O.A., Janz R., Liu X., Spudich J.L. // *Science*. 2015. V. 349. № 6248. P. 647–650.

BICYCRONIC CONSTRUCT FOR OPTOGENETIC PROSTHESIS OF GANGLION CELL RECEPTIVE FIELD OF DEGENERATED RETINA

L. E. Petrovskaya^{1,2}, M. V. Roshchin³, G. R. Smirnova³, D. E. Kolotova^{3,4},
Corresponding Member of the RAS P. M. Balaban³, Academician of the RAS M. A. Ostrovsky^{4,5},
A. Y. Malyshev³

¹The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

²Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

³Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

⁴Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

⁵Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Received December 20, 2018

For the purpose of optogenetic prosthetics of the receptive field of the retinal ganglion cell, we have created a bicistronic genetic construct that carries genes of excitatory (channelrhodopsin2) and inhibitory (anionic channelrhodopsin) rhodopsins. A distinctive feature of this construct is the combination of two genes into one construct with the mutant IRES inserted between them, which ensures precise ratio of the expression levels of the first and second gene in each transfected cell. It was found that the illumination of the central part of transfected neuron with light with a wavelength of 470 nm causes the generation of action potentials in the cell. At the same time, light stimulation of the periphery of the neuron causes cessation of the generation of action potentials. Thus, we were able to simulate the ON-OFF interaction of the receptive field of the retinal ganglion cell using optogenetic methods. Theoretically, this construction can be used for optogenetic prosthetics of degenerative retina in case of its delivery to ganglion cells using lentiviral vectors.

Keywords: optogenetics, channelrhodopsin2, anionic channelrhodopsin, GtACR2, IRES, bicistronic construct, optogenetic prosthetics.