

DOI: 10.7868/S0869813918060023

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗАЯКОРИВАЮЩИХ МОТИВОВ  
ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ  
ИЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ОПСИНОВ  
В ОПТОГЕНЕТИКЕ**

© Г. Р. Смирнова, М. В. Рошин, А. Х. Винарская, Д. Е. Колотова,  
Н. А. Симонова, П. М. Балабан, А. Ю. Малышев

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,  
Москва, Россия  
E-mail: malyshev.ihna@gmail.com

Одним из вариантов оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки является подход, связанный с воссозданием ON/OFF рецептивного поля ганглиозных нейронов путем таргетированной экспрессии возбуждающего светоактивируемого белка в центральной части ганглиозной клетки, а тормозного — в периферической. В рамках данного подхода мы исследовали возможность использования различных заякоривающих мотивов для обеспечения соматической или дендритной локализации опсинов. Было показано, что мотив калиевого канала Kv2.1 не всегда обеспечивает исключительно центральную локализацию светоактивируемого белка, что может быть связано со значительной оверэкспрессией конструкции при использовании сильных универсальных промоторов. Кроме того, нами была продемонстрирована возможность использования одного из белков, входящего в состав постсинаптического уплотнения — белка Homer1, в качестве заякоривающего мотива для периферического таргетирования родопсинов.

*Ключевые слова:* оптогенетика, оптогенетическое протезирование, сетчатка, заякоривающий мотив, нейрон, каналородопсин-2.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 6. С. 630—634. 2018

G. R. Smirnova, M. V. Roshchin, A. Kh. Vinarskaya, D. E. Kolotova, N. A. Simonova, P. M. Balaban, A. Yu. Malyshev. ANCHORING MOTIFS FOR CENTRAL OR PERIPHERAL LOCALIZATION OF OPSINS IN OPTOGENETICS. Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the RAS, Moscow, Russia, e-mail: malyshev.ihna@gmail.com.

One of the ways of optogenetic prosthetics of the degenerative retina is the approach aimed to the reconstruction of the ON/OFF receptive field of ganglionic neurons by targeting the exciting light-activated protein to the central part of the ganglion cell, and the inhibitory one to the periphery. Within the framework of this approach, we investigated the possibility of using various anchoring motifs to provide somatic or dendritic localization of opsins. It has been shown that the Kv2.1 potassium channel motif does not always provide exclusively central localization of the light-activated protein, which may be due to significant overexpression of the construct when strong ubiquitous promoters are used. In addition, we demonstrated the possibility of using one of the proteins that is part of the postsynaptic density, the Homer1 protein, as an anchoring motif for peripheral targeting of rhodopsin.

Одним из многообещающих подходов в генетической терапии пигментного ретинита — заболевания, сопровождающегося гибелью фоторецепторов сетчатки, — является ее оптогенетическое протезирование. Принцип данного подхода состоит в том, что сохранившиеся нейронные элементы сетчатки (биполярные или ганглиозные клетки) искусственно наделяются фоточувствительностью путем гетерологической экспрессии в них бактериальных или эукариотических родопсинов. Однако при этом значительная часть зрительной информации, обработка которой происходит за счет внутрисетчаточных взаимодействий, оказывается утраченной. В связи с этим был предложен подход к оптогенетическому протезированию сетчатки, связанный с воссозданием ON/OFF рецептивного поля ганглиозных клеток путем таргетированной экспрессии возбуждающего светоактивируемого белка в центральной части ганглиозной клетки, а тормозного — в периферической [1, 4]. Для таргетирования родопсинов в различные части клетки используются мотивы некоторых клеточных белков, имеющих поляризованный паттерн экспрессии. Эти мотивы узнаются транспортными системами клетки и направляются в соответствующие компартменты нейрона. Для центральной локализации опсинов широко используется мотив калиевых каналов Kv2.1. Было показано, что небольшая часть молекулы канала достаточна для обеспечения центрального (сома и проксимальные дендриты) таргетирования конструкции [2]. Мы создали экспрессионный вектор вида pCAG-CHR2-Venus-Kv2.1, который был экспрессирован в первичной культуре нейронов гиппокампа методом электропорации в суспензии, а также в пирамидных нейронах коры мозга крыс и мышей посредством *in utero* электропорации. Были использованы нейроны центральной нервной системы в качестве первого этапа тестирования созданных генетических конструкций, которые в дальнейшем предполагается экспрессировать в ганглиозных нейронах сетчатки мышей линии RD1, являющихся генетической моделью пигментного ретинита. Нейроны в культуре были подвергнуты морфологическому и электрофизиологическому анализу начиная с 14-го дня культивирования, пирамидные нейроны коры анализировались на переживающих срезах мозга на 21—30-й постнатальный день. Анализ распределения флуоресцентного белка Venus показал, что приблизительно 2/3 трансфицированных нейронов (как в культуре, так и на срезах мозга) демонстрируют свечение исключительно в соме и проксимальных отростках нейронов, включая дендриты и аксон. Однако в оставшейся 1/3 трансфицированных клеток флуоресценция прослеживалась на значительном расстоянии от сомы, при этом попадались нейроны, в которых Venus был равномерно распределен по всему дендритному дереву клетки. Подобная картина наблюдалась как в культивируемых нейронах гиппокампа, так и в пирамидных нейронах коры, трансфицированных *in utero*. Таким образом, «правильное» центральное таргетирование конструкции обеспечивается лишь в приблизительно 2/3 трансфицированных нейронов. Такой результат можно объяснить чрезмерной сверхэкспрессией конструкции, обеспечиваемой сильным промотором CAG, а также, возможно, трансфекцией эмбриональных нейронов, которая использовалась во всех наших экспериментах. Сверхэкспрессия приводит к «истощению» таргетирующей способности Kv2.1, после чего продукт распространяется безадресно по всей поверхности клетки, как это наблюдалось при таргетировании метаботропных глутаматных рецепторов, экспрессированных в нейронах гиппокампа при помощи дефектных вирусных векторов [3]. Решение данной проблемы нам видится в использовании более слабых промоторов (таких как CamKII, синапсин) и/или в использовании вирусной трансдукции для экспрессии конструкции в более зрелых нейронах.

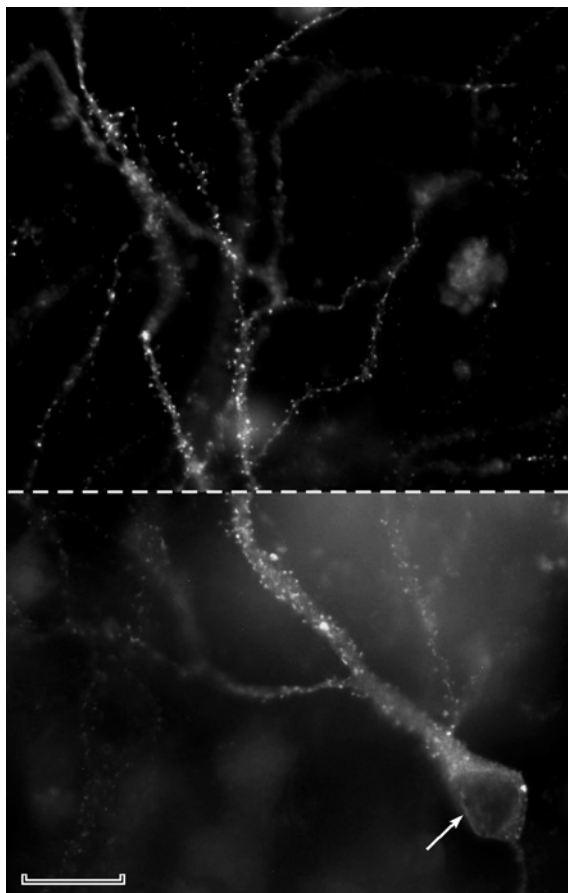


Рис. 1. Нейрон первичной гиппокампальной культуры, экспрессирующий pLU-CamKII-Номег1-tdTomato. Обращает на себя внимание почти полное отсутствие флуоресценции в соме клетки (*стрелка*) и наличие большого количества светящихся точек (*шпиков*) по ходу дендритов. Показаны центральный (*внизу*) и периферический (*вверху*) фрагменты одного и того же нейрона. Калибровка: 20 мкм.

Для периферической локализации тормозных светоактивируемых белков в целях воссоздания OFF-компоненты рецептивного поля ганглиозных клеток был предложен целый ряд таргетирующих мотивов, наиболее многообещающими из которых оказались белок постсинаптических уплотнений PSD95 [1] и мотив молекулы клеточной адгезии, функционирующей в постсинаптической части клетки, — нейролигина [4]. Однако анализ доступных данных литературы показывает, что предложенные для периферической локализации мотивы не элиминируют таргетируемые светоактивируемые белки из сомы, но лишь незначительно увеличивают их содержание в дистальных дендритах нейрона. Поэтому особенно актуальным для оптогенетического воссоздания OFF-компоненты рецептивного поля ганглиозных клеток становится поиск таргетирующего мотива, способного обеспечить значительное снижение экспрессии тормозного опсина в соме и проксимальных дендритах нейрона. В нашей работе мы исследовали возможность использования в качестве такого таргетирующего мотива другого белка, входящего в состав постсинаптического уплотнения, — Номег1. Номег1 является тетрамерным скаффолд-белком, принимающим участие в формировании постсинаптической структуры нейронов. Трансфекция культивируемых гиппокампальных

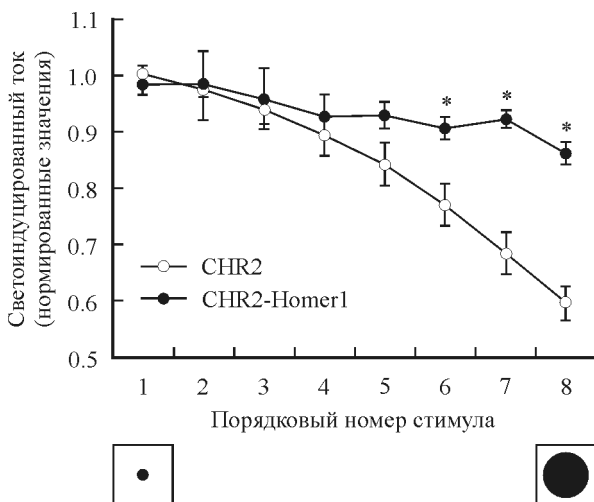


Рис. 2. Изменение амплитуды светоиндуцированного тока при стимуляции нейронов, экспрессирующих таргетированный и нетаргетированный канал родопсин-2, световыми стимулами с увеличивающимся размером центральной темной части. Снизу приведено схематичное изображение первого и последнего стимулов в серии. Представлены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Звездочкой указаны достоверные различия ( $p < 0.05$ , критерий Манна—Уитни).

нейронов плазмидным вектором pLU-CamKII-Homer1-tdTomato (полученным в дар из лаборатории В. В. Белоусова, ИБХ РАН) приводила к возникновению флуоресценции в виде ярких точек, очевидно соответствующих шипикам, по всему дендритному дереву клетки (рис. 1). Особенно ценно, что при умеренном уровне экспрессии конструкции в клетке флуоресценция сомы оставалась на низком уровне. После этого нами были созданы фьюженHomer1 с канал родопсином-2 (в дальнейшем планируется замена CHR2 на хлорный канал родопсин GtACR2) вида pCAG-CHR2-Venus-Homer1. Между Venus и Homer1 был помещен серин-глициновый линкер вида GGSGGGSGG для уменьшения напряжения между белками. Данная конструкция была экспрессирована в пирамидных нейронах коры мыши методом *in utero* электропорации. Морфологический анализ трансфицированных нейронов показал, что клетки демонстрируют яркую флуоресценцию в соматической области с образованием внутриклеточных светящихся конгломератов. Однако по ходу дендритов нейронов наблюдались яркие флуоресцентные точки, в целом соответствующие расположению дендритных шипиков. В то же время количество флуоресцирующих точек при экспрессии pCAG-CHR2-Venus-Homer1 было существенно меньше, чем при трансфекции нейронов плазмидным вектором pLU-CamKII-Homer1-tdTomato.

Было проведено функциональное изучение распределения канал родопсина-2 по дендритному дереву нейронов, экспрессирующих CHR2-Venus-Homer1, и клеток с контрольным CHR2. Трансфицированные нейроны регистрировались внутриклеточно методом патч-кламп в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации потенциала на переживающих срезах мозга. Во время эксперимента производилась световая стимуляция нейронов при помощи фотостимулятора Polygon 400. Стимулы представляли собой прямоугольное поле, содержащее в центре темные концентрические круги увеличивающегося диаметра, т. е. освещалась площадь, лежащая за пределами круга (рис. 2, внизу). Тело нейрона при этом располагалось в центре окружности. Было найдено, что при стимуляции контрольных нейронов, экспрессирующих нетаргетированный CHR2, по мере увеличения размера темной части стимула наблюдается резкое падение амплитуды

светоиндуцированного трансмембранного тока. В то же время при аналогичной стимуляции нейронов, экспрессирующих CHR2-Venus-Homer1, падение амплитуды тока было достоверно меньше (рис. 2). Данный эксперимент показывает, что в нейронах, экспрессирующих CHR2, связанных с Homer1, относительная плотность родопсина в дистальных дендритах по сравнению с проксимальными выше, чем у контрольных нейронов. Результаты экспериментов указывают на то, что в созданной нами конструкции Homer1 обеспечивал перераспределение родопсина из центральной области нейрона на периферию клетки, хотя при этом наблюдалось значительное снижение встраивания каналородопсина-2 в мембрану. Мы предполагаем, что решение данной проблемы может быть достигнуто увеличением длины аминокислотного линкера между Homer1 и CHR2.

Таким образом, в данной работе продемонстрировано, что при использовании мотива калиевого канала Kv2.1 возможно нарушение центральной локализации созданных конструкций, по всей видимости, вследствие их оверэкспрессии. Мотив Homer1 является весьма перспективным для обеспечения периферической локализации опсинов в целях воссоздания OFF-компоненты рецептивного поля ганглиозных клеток при оптогенетическом протезировании дегенеративной сетчатки.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 16-15-00291.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Greenberg K. P., Pham A., Werblin F. S.* Differential targeting of optical neuromodulators to ganglion cell soma and dendrites allows dynamic control of center-surround antagonism. *Neuron*. 69 : 713—720. 2011.
- [2] *Lim S. T., Antonucci D. E., Scannevin R. H., Trimmer J. S.* A novel targeting signal for proximal clustering of the Kv2.1 K<sup>+</sup> channel in hippocampal neurons. *Neuron*. 25 (2) : 385—397. 2000.
- [3] *Stowell J. N., Craig A. M.* Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxy-terminal domains. *Neuron*. 22 : 525—536. 1999.
- [4] *Wu C., Ivanova E., Zhang Y., Pan Z. H.* rAAV-mediated subcellular targeting of optogenetic tools in retinal ganglion cells in vivo. *PLoS One*. 8 : e66332. 2013.

Поступила 9 IV 2018