

УДК 612.821.6

НЕСЕЛЕКТИВНАЯ ЭКСПРЕССИЯ КОРОТКОВОЛНОВОГО КОЛБОЧКОВОГО ОПСИНА УЛУЧШАЕТ ОБУЧЕНИЕ МЫШЕЙ С ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ СЕТЧАТКИ В ЗАДАЧЕ С ВОСПРИЯТИЕМ ЗРИТЕЛЬНЫХ СТИМУЛОВ

© 2023 г. О. С. Иджилова^{1,2}, Д. Е. Колотова^{1,2}, Г. Р. Смирнова^{1,2}, А. Абонакур^{1,3},
Д. А. Долгих^{2,4,5}, Л. Е. Петровская⁴, академик РАН М. П. Кирпичников^{4,5},
академик РАН М. А. Островский^{2,5}, А. Ю. Малышев^{1,*}

Поступило 16.11.2022 г.

После доработки 20.01.2023 г.

Принято к публикации 21.01.2023 г.

Работа посвящена исследованию возможности использования нетаргетированной экспрессии животного опсина в различных нейрональных элементах дегенеративной сетчатки для восстановления нарушенной зрительной функции. В ходе исследования нокаутным мышам, являющимся моделью дегенеративных заболеваний сетчатки, была произведена интравитреальная инъекция суспензии вирусных частиц, несущих ген коротковолнового колбочкового опсина, связанного с репортерным флуоресцентным белком, или контрольных вирусов, несущих модифицированный флуоресцентный белок с повышенной тропностью к мембране. Было показано, что вирусная трансдукция вызывает выраженную экспрессию опсина в ганглиозных, биполярных и горизонтальных нейронах сетчатки. Поведенческие тестирования инъектированных мышей, проведенные в трапецевидном водном лабиринте Морриса, показали частичное восстановление возможности обучения в задаче с восприятием зрительных стимулов у животных, сетчатка которых была трансдуцирована колбочковым опсином.

Ключевые слова: оптогенетическое протезирование, дегенерация сетчатки, аденоассоциированные вирусы, опсин колбочек

DOI: 10.31857/S268673892360005X, **EDN:** QHNNHW

Наследственные дистрофии сетчатки представляют собой генетически разнородную группу заболеваний, которые приводят к гибели фоторецепторов и, в ряде случаев, к полной слепоте. Одним из перспективных подходов к лечению наследственных дистрофий сетчатки является оптогенетическое протезирование, при котором в

выживших клетках внутренних слоев сетчатки эктопически экспрессируется экзогенный светочувствительный белок, в результате чего эти клетки приобретают светочувствительность [1, 2]. В экспериментальных исследованиях оптогенетического протезирования сетчатки нашли применение опсины обоих классов — как микробные, так и животного происхождения. Микробные опсины, такие как канальный родопсин-2, обладают более быстрыми временными характеристиками, чем животные опсины, однако их светочувствительность невысока. Тем не менее протезирование дегенеративной сетчатки этими опсинами обеспечивало восстановление зрительных функций у грызунов [3–5] и частично у пациентов [6, 7]. Опсины животного происхождения, благодаря сопряжению с внутриклеточными усиленными каскадами, обладают на много порядков более высокой светочувствительностью, существенно более широким динамическим диапазоном световосприятия, а также меньшей вероятностью иммунного ответа. Основное затруднение, которое стоит на пути перед клиническим

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

³ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская область, Россия

⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: malyshev@ihna.ru

применением животных опсинов, заключается в малой изученности особенностей их функционирования в условиях чужеродной клетки. Несмотря на это, имеются сообщения о восстановлении зрительных функций у слепых животных после протезирования сетчатки такими опсинами позвоночных, как меланопсин [8], средневолновой колбочковый опсин [9] и родопсин палочек [10]. Наиболее часто применяемый подход предполагает таргетированную экспрессию гена опсина в определенной субпопуляции клеток сетчатки. Гипотетически, это должно позволить отчасти сохранить в сетчатке естественные сетевые механизмы обработки информации. Мы решили проверить другой подход — неселективную экспрессию опсина в максимально большом количестве разных типов клеток сетчатки, что должно обеспечить максимальный возможный зрительный ответ на свет. Предполагается, что пластичность нервной системы позволит мозгу обрабатывать сложный зрительный сигнал, приходящий от “протезированных” нейронных элементов сетчатки.

В работе были использованы мыши, нокаутные по гену β -субъединицы фосфодиэстеразы 6 типа (*Pde6b*). Данная линия мышей (*rd1* KO) была недавно создана на базе ИТБМ СПбГУ путем делеции двух нуклеотидов в первом экзоне гена *Pde6b* методом CRISPR/Cas9 [11]. У мышей данной линии, так же, как и у широко используемой линии *rd1*, происходит нарушение работы фосфодиэстеразы палочек, что приводит к гибели фоторецепторов и полной потере зрения к 4-й неделе жизни [12]. Однако широко распространенная в мире и единственная доступная в России линия мышей с фенотипом *rd1* — C3H/Crl — несет в себе дополнительную мутацию в гене *Gpr179*, которая приводит к нарушению работы ON-биполярных клеток [13]. Поскольку ключевым для нашего подхода является оптогенетическое протезирование максимально большого количества нейрональных элементов сетчатки, в том числе биполяров, традиционная линия *rd1* не подходила для наших экспериментов. У мышей линии *rd1* KO, так же как у *rd1*, в первый месяц жизни развиваются дегенеративные изменения фоторецепторного слоя сетчатки. В частности, было показано, что примерно к месячному возрасту у мышей линии *rd1* KO полностью пропадает фотоответ на электроретинограмме, а фоторецепторный слой сетчатки практически исчезает [11].

В стекловидное тело глаза мышей в возрасте 3–4 мес вводилась суспензия вирусных частиц в стандартном фосфатно-солевом буфере с добавлением 0.001% плуроника, в объеме около 1.5 мкл на глаз. Контрольной группе животных вводился вирус AAV2-CAG-fGFP в концентрации $2.9 \cdot 10^{12}$ вирусных геномов (вг) в мл, содержащий ген фарнезилированного GFP. Данная

конструкция обладает повышенной способностью к встраиванию в клеточную мембрану, что делает ее более схожей с колбочковым опсином, который применялся в опытной группе. В опытной группе мышам осуществлялась интравитреальная инъекция вируса AAV2-CAG-SWopsin-mCherry (Addgene Plasmid #62932) в концентрации $6.9 \cdot 10^{12}$ вг/мл. Вирусы были синтезированы в ФГБУ Федеральном центре мозга и нейротехнологий ФМБА России. Мы использовали сильный неспецифический промотор CAG, чтобы заразить максимальное количество типов клеток в сетчатке. Через три недели после инъекции мыши были подвергнуты поведенческому тестированию в трапезиевидном лабиринте Морриса. После завершения поведенческих экспериментов животные были декапитированы. Приготовленные препараты сетчатки были подвергнуты морфологическому анализу с использованием традиционного флуоресцентного и лазерного сканирующего конфокального микроскопов. Из 7 мышей, инъектированных вирусом с коротковолновым опсином, 6 показали удовлетворительный уровень экспрессии конструкции, оцениваемый по уровню флуоресценции репортерного белка mCherry, в обоих глазах, хотя уровень экспрессии варьировал между разными сетчатками. Было найдено, что заражение ограничивается тремя типами клеток сетчатки: ганглиозными, биполярными и горизонтальными клетками (рис. 1). Причем в ганглиозных клетках наблюдались скопления флуоресцентного белка в цитоплазме клеток, при этом мембранной локализации конструкции детектировано не было (рис. 1б). В биполярных и горизонтальных клетках, напротив, наблюдалась выраженная мембранная локализация флуоресцентного белка, хотя скопления в цитоплазме также присутствовали (рис. 1, в и г). Одна мышь, у которой экспрессия опсина не была выявлена ни в одном глазу, была исключена из дальнейшего анализа. В контрольной группе, в которой производилось введение вирусов с fGFP, все животные продемонстрировали достаточный уровень экспрессии репортерного флуоресцентного белка.

Поведенческое тестирование в трапезиевидном водном лабиринте Морриса [14] проводилось спустя две недели после инъекции вируса и состояло из одного дня предварительного обучения и шести дней собственно обучения, в каждый из которых каждому животному давалось по 8 попыток. Задачей животных было обучиться находить скрытую под водой платформу, ориентируясь по световому стимулу.

Во время предварительного обучения животное помещалось в воду непосредственно возле скрытой платформы. Световой стимул представлял собой съёмную металлическую пластину с закрепленными на ней светодиодами с максиму-

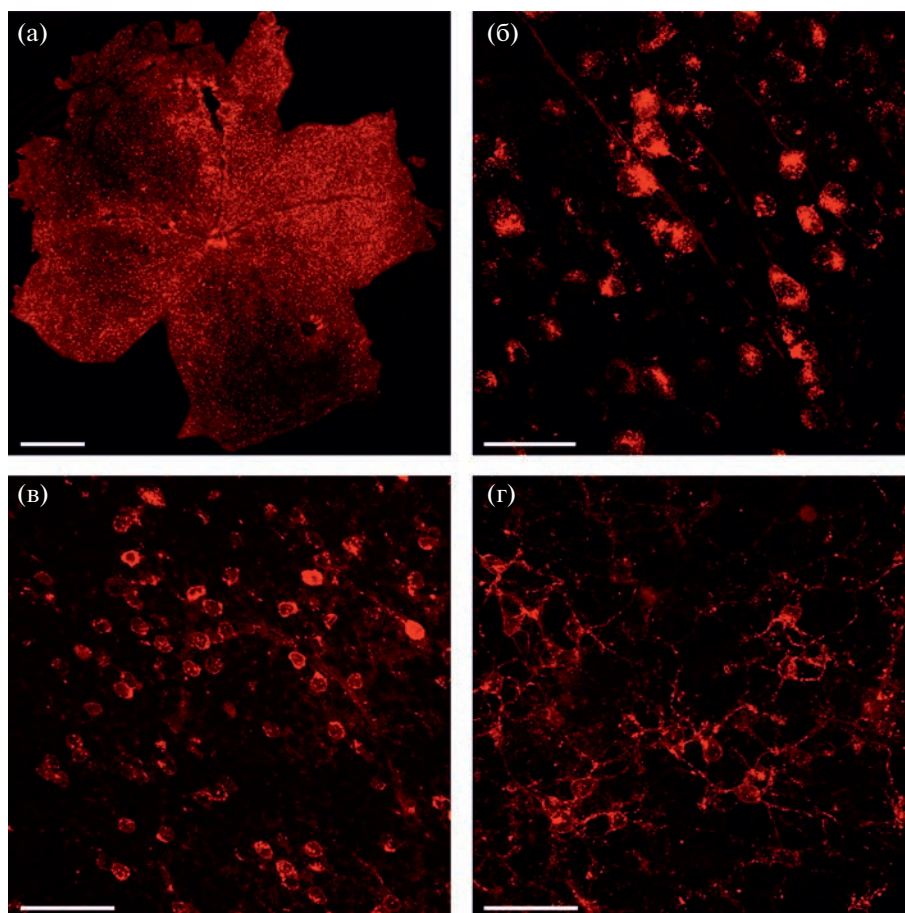


Рис. 1. Экспрессия коротковолнового колбочкового опсина, детектируемая по флуоресценции mCherry, в сетчатке мышей после интравитреальной инъекции вируса AAV2-CAG-SWOpSin-mCherry. (а) Общий вид трансдуцированной сетчатки. Шкала — 1 мм. (б) Конфокальная микрофотография трансдуцированных ганглиозных нейронов сетчатки. (в) Биполярные нейроны. (г) Горизонтальные клетки. Шкала на в и г — 50 мкм.

мом излучения на длине волны 470 нм. Светодиоды были сгруппированы в пять вертикальных полос с шириной полосы 4 см и длиной 40 см; расстояние между полосами также было 4 см (рис. 2а). Таким образом, общий размер светового стимула составлял 40 × 36 см. Результирующая интенсивность излучения была 380 мВт/см² у конца разделительной перегородки, где животное должно было принять решение, в какой отсек ему плыть. Положение стимула (левый либо правый рукав лабиринта) чередовалось в псевдослучайном порядке, причем стимул всегда располагался в одном отсеке со скрытой платформой. По итогам каждого дня обучения рассчитывался процент успешных решений (доплывтий), когда животное находило платформу, ориентируясь на световой стимул. Успешность решения оценивалась по двум критериям: по длительности попытки менее минуты и по отсутствию неверного решения — когда животное заплывало за разделитель в неосвещенный рукав лабиринта (белая пунктирная линия на рис. 2а). Для исключения

возможного эффекта теплового излучения от светового стимула был произведен замер температуры на данной линии в центре каждого рукава (один был освещен, второй — не освещен), в непосредственной близости от уровня поверхности воды. Даже спустя один час после включения стимула температуры в двух этих точках не различались в пределах погрешности измерений ($\pm 0.1^\circ\text{C}$).

Обучение продолжалось на протяжении шести дней. Для статистического анализа мы суммировали данные по последним четырем дням обучения, что существенно снизило разброс данных.

Оказалось, что нокаутные мыши контрольной группы, которым был введен вирус с fGFP, но без гена колбочкового опсина, демонстрировали в среднем $70.5 \pm 1.9\%$ правильных выборов. Это значение значительно выше, чем можно было бы ожидать от полностью слепых животных, которые должны были бы показать результат на уровне 50%.

По всей видимости, это связано с тем, что у данной линии к тому возрасту, в котором в нашем

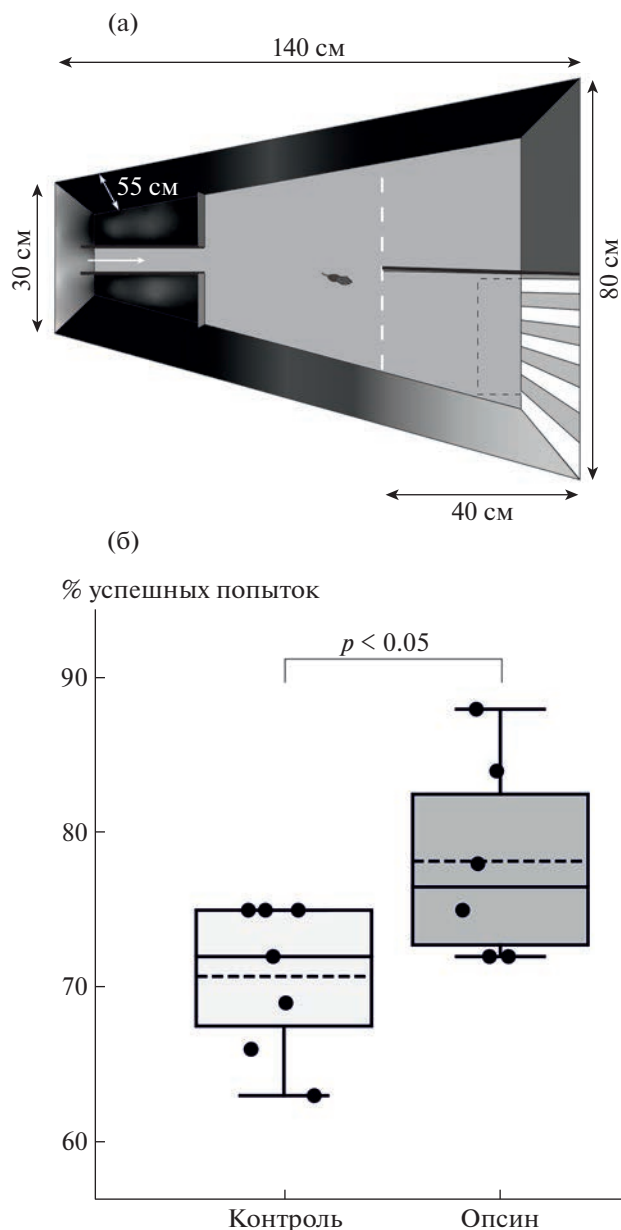


Рис. 2. Поведенческое тестирование мышей после интравитреальной инъекции вирусных частиц. (а) Внешний вид трапециевидного водного лабиринта Морриса. Животное помещали в стартовый отсек (отмечен белой стрелкой), из которого оно выплывало на середину лабиринта. На рисунке в правом рукаве лабиринта пунктиром показана скрытая платформа, над которой располагался стимул в виде вертикальных светящихся полос. Белой пунктирной линией показан уровень, на котором производилось измерение яркости стимула. (б) Процент правильных доплываний у мышей контрольной и опытной групп, усредненный за последние 4 дня обучения. Вертикальные отрезки на диаграммах размаха охватывают все точки данных, лежащие в пределах 1.5 межквартильных расстояний от первого либо третьего квартилей. Горизонтальные линии — медианы, пунктирные линии — средние значения. Каждая точка соответствует одному животному.

эксперименте были использованы животные, произошла не полная дегенерация фоторецепторов (в частности, колбочек) и какое-то остаточное зрение у них еще сохранилось. В то же время мыши, инъецированные вирусом с колбочковым опсином, продемонстрировали существенно больший процент верных доплываний до платформы — $78.1 \pm 2.7\%$ ($p < 0.05$, t -критерий Стьюдента).

Дополнительно мы провели серию экспериментов в трапециевидном водном лабиринте с нормальными зрячими мышами линии C57BL/6J. Выяснилось, что нормально видящие животные всего за четыре дня обучаются находить скрытую платформу, находящуюся под световым стимулом. Уже на четвертый день обучения процент правильных доплываний в этой группе нормальных, зрячих мышей составлял $98.4 \pm 1.6\%$.

Если рассматривать нокаутных животных с экспрессированным опсином индивидуально, то следует отметить, что две мыши при усреднении за четыре последние дня обучения продемонстрировали очень высокий уровень правильных решений — 87.5 и 84.4%. Более того, одна из этих мышей в последний, шестой день обучения продемонстрировала 100% правильных ответов (8 попыток из 8). Таким образом, можно заключить, что неселективная экспрессия колбочкового опсина может существенно улучшить зрительную функцию у нокаутных мышей с дегенерацией фоторецепторного слоя сетчатки.

Для выяснения причин неравномерного распределения результатов поведенческих тестирований мы проверили корреляцию уровня экспрессии опсина в нейронах сетчатки с результатом обучения. Для этого препараты сетчатки животных опытной группы с экспрессированным опсином были с одинаковой экспозицией сняты на CCD камеру, установленную на эпифлуоресцентный микроскоп. После этого на полученных фотографиях мы подсчитали количество пикселей, уровень яркости которых был выше определенного порога, установленного чуть выше уровня фоновой флуоресценции сетчатки. Таким образом, можно считать, что количество этих пикселей было прямо пропорционально количеству трансфицированных клеток. Оказалось, что значимой корреляции между процентом правильных доплываний в лабиринте и уровнем экспрессии опсина, оцененным по среднему уровню флуоресценции, не наблюдалось ($r = 0.33$, $p = 0.52$, критерий Пирсона).

Одно из возможных объяснений того, что не у всех животных зрение восстановилось после оптогенетического протезирования, может заключаться в разной степени дегенерации (ремоделирования) нейронов сетчатки у разных животных, что могло выражаться в разной степени нарушения функционирования биполярных кле-

ток. Именно в биполярных клетках сетчатки наблюдался правильный мембранный паттерн экспрессии опсина. Исходя из этого, можно полагать, что, скорее всего, именно эти клетки вносили основной вклад в восстановление зрительной функции у нокаутных мышей. Иными словами, восстановления зрения не произошло у животных с большей степенью дегенерации сетчатки и нарушенной функцией биполяров, несмотря на правильную, мембранную экспрессию опсина.

Особенностью экспрессии опсина в ганглиозных клетках сетчатки в наших экспериментах являлось отсутствие мембранной локализации конструкции, что могло приводить к тому, что опсин в этих клетках был нефункционален. Возможным путем повышения вероятности мембранной локализации опсина в трансдуцированных и биполярных, и ганглиозных клетках сетчатки является включение в состав нашей генетической конструкции специфических мотивов (например, мотивов ER и TS), облегчающих встраивание белка именно в плазматическую мембрану [15].

Таким образом, результаты наших экспериментов позволяют заключить, что проведенная впервые неселективная экспрессия колбочкового опсина в нервных клетках сетчатки приводит к достоверному улучшению зрительной функции восприятия света у нокаутных мышей с дегенерацией фоторецепторного слоя. Данный подход перспективен для дальнейших исследований с целью создания эффективных методов оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность коллегам из ИЭФБ РАН и ИТБМ СПбГУ и лично А.Ю. Ротову за предоставленную группу мышей линии rd1_KO.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-795, внутренний номер 13.1902.21.0027).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам ФГБУН ИВНД и НФ РАН и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Островский М.А., Курпичников М.П.* Перспективы оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки глаза // Биохимия, 2019. Т. 84. № 5. С. 634–647.
2. *Sahel J., Marazova K., Audo I.* Clinical characteristics and current therapies for inherited retinal degenerations // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2014. V. 5. № 2. P. a017111.
3. *Bi A., Cui J., Ma Y., et al.* Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration // Neuron, 2006. V. 50. № 1. P. 23–33.
4. *Tomita H., Sugano E., Yawo H., et al.* Restoration of visual response in aged dystrophic RCS rats using AAV-mediated channelopsin-2 gene transfer // Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2007. V. 48. № 8. P. 3821–3826.
5. *Doroudchi M., Greenberg K., Liu J., et al.* Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness // Molecular Therapy, 2011. V. 19. № 7. P. 1220–1229.
6. *Prosseda P., Tran M., Kowal T., et al.* Advances in Ophthalmic Optogenetics: Approaches and Applications // Biomolecules, 2022. V. 12. № 2. P. 269.
7. *Sahel J., Boulanger-Scemama E., Pagot C., et al.* Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy // Nature Medicine, 2021. V. 27. P. 1223–1229.
8. *Lin B., Koizumi A., Tanaka N., et al.* Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. V. 105. № 41. P. 16009–16014.
9. *Berry M., Holt A., Salari A., et al.* Restoration of high-sensitivity and adapting vision with a cone opsin // Nature Communications, 2019. V. 10. P. 1221.
10. *Cehajic-Kapetanovic J., Eleftheriou C., Allen A., et al.* Restoration of Vision with Ectopic Expression of Human Rod Opsin // Current Biology, 2015. V. 25. № 16. P. 2111–2122.
11. *Ермолаева М.Э., Ротов А.Ю., Сопова Ю.В., и др.* Механизмы дегенерации сетчатки при пигментном ретините – роль ответа на несвернутый белок. В сб.: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Пушино: ФГБУН ФИЦ “Пушинский научный центр биологических исследований РАН”, 2021. С. 525–530.
12. *Bowes C., Li T., Danciger M., et al.* Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase // Nature, 1990. V. 347. P. 677–680.
13. *Nishiguchi K., Carvalho L., Rizzi M., et al.* Gene therapy restores vision in rd1 mice after removal of a confounding mutation in Gpr179 // Nature Communications, 2015. V. 6. № 1. P. 1–10.
14. *Prusky G., West P., Douglas R.* Behavioral assessment of visual acuity in mice and rats // Vision Research, 2000. V. 40. № 16. P. 2201–2209.
15. *Gradinaru V., Zhang F., Ramakrishnan C., et al.* Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics // Cell, 2010. V. 141. №1. P. 154–165.

NON-SELECTIVE EXPRESSION OF SHORT-WAVELENGTH CONE OPSIN IMPROVES LEARNING IN MICE WITH RETINAL DEGENERATION IN A VISUALLY GUIDED TASK

O. S. Idzhilova^{a,b}, D. E. Kolotova^{a,b}, G. R. Smirnova^{a,b}, A. Abonakour^{a,c}, D. A. Dolgikh^{b,d,e},
L. E. Petrovskaya^d, Academician of the RAS M. P. Kirpichnikov^{d,e},
Academician of the RAS M. A. Ostrovsky^{b,e}, and A. Yu. Malyshev^{a,#}

^a *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b *Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^c *Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russian Federation*

^d *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^e *Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: malyshev@ihna.ru*

Here, we explore the potential of an animal opsin non-selectively expressed in various neuronal elements of the degenerative retina to restore impaired visual function. In this study, a knockout murine model of inherited retinal dystrophy was used. Animals were injected intravitreally with either a virus carrying gene of the short-wavelength cone opsin associated with a reporter fluorescent protein, or a control virus carrying the sequence of a modified fluorescent protein that had an enhanced membrane tropism. The viral transduction induced pronounced opsin expression in ganglion, bipolar, and horizontal retinal neurons. Behavioral testing of the treated mice in the visually guided task in the trapezoid Morris water maze showed a partial recovery of learning ability in animals whose retinas had been transduced with the cone opsin.

Keywords: optogenetic prosthetics, retinal degeneration, adeno-associated viruses, cone opsin