



Введение оптогенетических векторов в мозг неонатальным животным для исследования функции нейронов в последующие периоды онтогенеза

Д.А. Ланшаков¹✉, У.С. Дрозд², Т.А. Запара³, Н.Н. Дыгало^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Конструкторско-технологический институт вычислительной техники Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Управление активностью клетки светом определенной длины волны с помощью светочувствительных ионных каналов, опсинов, (оптогенетика) все более широко используется для исследования работы и функции нейронов. Внедрение в клеточную мембрану опсинов с последующим приобретением клеткой чувствительности к свету достигается с помощью вирусных векторов, созданных чаще всего на основе лентивирусов или аденоассоциированных вирусов (AAV) и несущих нуклеотидные последовательности, кодирующие белки фотоканалов. Введение в трансген-экспрессирующую кассету специфического для интересующего типа клеток промотора позволяет целенаправленно продуцировать опсин только в клетках-мишенях. Целью данной работы явились краткое описание оптогенетического подхода, а также анализ возможности его использования при введении вирусных векторов в мозг неонатальных животных для исследования функции нейронов *in vivo* в последующие периоды онтогенеза. В данной работе трехдневным крысам под холодным наркозом вводили в головной мозг оптовектор (pAAV-CAMKIIa-ChR2_{h134}-YFP), кодирующий фотоканал, активирующий нейрон, и маркерный желтый флуоресцентный белок под контролем CAMKIIa промотора, специфического для глутаматергических нейронов. Пик экспрессии внесенного гена, как правило, приходится на 3–5-ю неделю после введения вектора, что наблюдалось и в нашем случае. Фотостимуляция нейронов гиппокампа 20-дневных животных, которым на третий день жизни вводили оптовектор, повышала разрядную активность этих нейронов, а также увеличивала в них экспрессию белка c-Fos, являющегося общепризнанным маркером нейрональной активации. В результате проведения такого исследования в более поздние сроки, через 60 дней после неонатального введения гена оптоканала, не было обнаружено ни его заметной экспрессии, ни фотоактивации нейронов-мишеней гиппокампа. Таким образом, неонатальное введение вирусного вектора, несущего ген оптоканала, эффективно при исследовании функции нейронов мозга в ювенильном возрасте крыс и требует дополнительной проверки экспрессии гена в последующие периоды онтогенеза.

Ключевые слова: оптогенетика; фоточувствительные белки; активность нейронов; аденоассоциированные вирусы; онтогенез; экспрессия.

Transfer of optogenetic vectors into the brain of neonatal animals to study neuron functions during subsequent periods of development

D.A. Lanshakov¹✉, U.S. Drozd², T.A. Zapara³, N.N. Dygalo^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Design Technology Institute of Digital Techniques SB RAS, Novosibirsk, Russia

Optogenetics, that is, the control of cell activity using light-sensitive ion channels opsins with light of a specific wavelength, is increasingly being used to study activities and functions of neurons. Expression of opsins in the cell membrane, followed by the acquisition by the cell of the sensitivity to light is achieved by means of viral vectors, often created on the basis of lentiviral or adeno-associated (AAV) viruses bearing the nucleotide sequence encoding the photo-channel proteins. Inclusion of the cell-specific promoter of interest into the transgene-expression cassette allows opsin to be produced only in the target cells. The aim of this work was to briefly describe the optogenetic method, as well as to analyze the possibility to use administration of viral vectors into the brain of neonatal animals to study the function of neurons *in vivo* during subsequent periods of development. In this analysis, 3-day-old rat pups received intracerebroventricular injections of optovector (pAAV-CAMKIIa-ChR2_{h134}-YFP), coding for a photo channel, which activates neurons, and the yellow fluorescent protein under the CAMKIIa promoter specific for glutamatergic neurons under cold anesthesia. The peak expression of the transferred gene is usually achieved at week 3–5 after the transfer of the vector, which is what was also observed in our experiments. Stimulation of the hippocampal neurons with blue light in the 20-day-old animals, to which optovector was transferred at the 3rd day of life, increased the discharge activity of these neurons. This light stimulation increased expression of the

recognized marker of neuronal activation protein c-Fos in these photosensitive cells too. The same experiments with older animals, 60 days after the neonatal opto-channel gene transfer, revealed no noticeable expression of this channel or photo-activation of target neurons of the hippocampus. Thus, neonatal administration of a viral vector carrying an opto-channel gene is suitable for the study of brain neurons in rats of juvenile age, and requires additional control for gene expression during subsequent periods of development.

Key words: optogenetics; photosensitive proteins; neuronal activity; adeno-associated viruses; ontogeny; expression.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ланшаков Д.А., Дрозд У.С., Запара Т.А., Дыгало Н.Н. Введение оптогенетических векторов в мозг неонатальным животным для исследования функции нейронов в последующие периоды онтогенеза. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):255-261. DOI 10.18699/VJ16.157

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Lanshakov D.A., Drozd U.S., Zapara T.A., Dygalo N.N. Transfer of optogenetic vectors into the brain of neonatal animals to study neuron functions during subsequent periods of development. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):255-261. DOI 10.18699/VJ16.157

Прогресс в изучении сложных физиологических систем и признаков, особенно головного мозга, требует новых, все более совершенных методов исследования. До недавнего времени при анализе функций центральной нервной системы (ЦНС) для модуляции активности нейронов использовали лишь фармакологические и электрофизиологические методы. При выяснении механизмов мультигенных и плейотропных признаков возникла необходимость в более избирательных подходах к манипуляции состоянием работающих клеток ЦНС. В настоящее время исследователи располагают обширным набором моделей и методов, таких как трансгенные и нокаутные животные, биотехнологические подходы и недавно получившие широкое распространение методы оптогенетики. В оптогенетической области нейробиологических исследований опубликованы сотни статей, охватывающих широкий спектр функций нейронов и их сетей у самых разнообразных объектов: от нематоды, плодовой мушки и аквариумной рыбки до лабораторных грызунов и даже приматов (Deisseroth, 2011; Diester et al., 2011; Zhao et al., 2011; Дыгало, 2015). Суть оптогенетических подходов состоит в управляемом изменении мембранного потенциала клеток путем активации светом внедренных в их мембрану светочувствительных ионных каналов. Такой подход может быть использован для исследования причинно-следственной связи между активностью определенных нейронов и, например, поведением или экспрессией интересующих исследователя генов. Целью данной работы явилось рассмотрение наиболее часто используемых в настоящее время средств реализации этого подхода, а также анализ особенностей его применения при вирусной доставке оптогенетических векторов в мозг неонатальных животных для исследования функции нейронов *in vivo* в последующие периоды онтогенеза.

Светочувствительные ионные каналы, изменяющие активность нейронов

Оптогенетика использует методы геной инженерии для внедрения в клеточную мембрану исследуемых нейронов

белков, опсинов, способных менять мембранный потенциал клетки в ответ на активацию светом определенной длины волны. Среди опсинов выделяют активаторы, деполяризующие мембрану, и ингибиторы, гиперполяризующие ее. Эти генетические инструменты могут использоваться как по отдельности, так и в сочетании (Glock et al., 2015).

Наиболее часто используются родопсины. Эти белки имеют в своей структуре семь трансмембранных доменов, образующих канал. Они сопряжены с ретиналем, являющимся кофактором этих опсинов. Поглощая фотон, ретиналь изомеризуется, проводя изменение конформации белка, что приводит к изменению проницаемости мембраны для ионов, индуцируя ток одновалентных (H^+ , Na^+ , K^+) и небольшого количества некоторых двухвалентных (Ca^{2+}) катионов, вызывающих деполяризацию мембраны нейрона.

Каналородопсин-2 (ChR2) был первым бактериальным белком, использованным для изменения активности нейрона, а именно его деполяризации, а также для управления поведением нематоды *C. elegans* (Boyden et al., 2005). Спектр поглощения ChR2 находится между 350 и 530 нм, тогда как максимальная активация достигается при стимуляции светом с длиной волны около 460 нм (синий свет). После того как канал открывается, он может медленно спонтанно закрываться в темноте, но его закрытие так же может быть индуцировано зеленым светом. Скорость тока ионов через этот канал сравнительно мала (1,21 мс при освещении 20 мВт/мм²) (Lin, 2011), поэтому для достижения функционально значимого результата требуется присутствие большого количества каналов на мембране (Boyden et al., 2005). Сейчас получены каналы с большей светочувствительностью и скоростью тока ионов, но и в настоящее время ChR2 является наиболее используемым в оптогенетических исследованиях. Усовершенствование функций этого канала методами молекулярной инженерии за счет изменения спектральных свойств, проводимости или кинетики этого белка активно ведется в ряде лабораторий. Было показано, например, что

одна точечная мутация (H134R) в гене каналородопсина-2 повышает ток ионов в 2–3 раза за счет замедления деактивации канала (Gradinaru et al., 2007), а C128S мутанты способны деактивироваться под действием импульса зеленого света (542 нм), сохраняя при этом способность активироваться синим светом. Такие свойства могут быть использованы для более точного регулируемого импульсного включения или выключения канала и, соответственно, повышения или снижения активности нейрона (Zhang et al., 2010).

Торможение нейрональной активности впервые было достигнуто с помощью галородопсина (NpHR), найденного в археях *Natronomonas pharaonis* (Zhang et al., 2007). NpHR является насосом, активируемым желтым светом с пиком возбуждения 590 нм. Он индуцирует ток ионов хлора в клетку, гиперполяризуя ее мембрану. В отличие от каналородопсина, который является каналом и в открытом состоянии способен пропускать множество ионов, галородопсин – насос, который способен транспортировать только один ион за один цикл. В связи с этим NpHR имеет низкую скорость работы и нуждается, как и ChR2, в высоком уровне экспрессии для осуществления физиологического эффекта.

В настоящее время для торможения активности нейронов путем гиперполяризации также используются протонные насосы Arch и Mac, которые выкачивают протоны из клетки. Arch (Arch) был обнаружен в археях *Halorubrum sodomense* (Husson et al., 2012). Этот насос активируется желто-зеленым светом и вызывает самую мощную по сравнению с другими белками гиперполяризацию при освещении светом с длиной волны 566 нм. Mac, найденный в грибе *Leptosphaeria maculans*, активируется сине-зеленым светом (550 нм). В целом эти белки имеют более высокую скорость транспортировки ионов, чем NpHR. Кроме того, спектры активации этих белков позволяют использовать их совместно с ChR2 при мультимодальных стратегиях освещения.

Трансгенные животные в оптогенетических исследованиях

Изучение функции интересующих исследователя нейронов возможно при их активации светом, если эти нейроны имеют в своей мембране ChR2. Для этого создаются трансгенные ChR2 животные, у которых опсин экспрессируется в определенном типе клеток, что обеспечивает специфичный для этих клеток промотор. Такие линии крыс и мышей могут быть использованы для изучения функциональных связей в сложных и еще не известных нейронных цепях в естественных условиях с высоким пространственным и временным разрешением. Уже создано большое число таких линий. Животные этих линий не имеют каких-либо заметных поведенческих или репродуктивных дефектов (Arenkiel et al., 2007; Wang et al., 2007).

Для анализа сложных форм поведения животных с помощью оптогенетической стимуляции применяют контролирующую экспрессию фотоактивируемых белков, которая либо запускается, либо прекращается в ответ на определенный триггер. Такие системы обеспечивают изменение содержания опсинов в контрастных ситуациях поведенческого теста. Для этих целей часто используют

тетрациклиновые Tet-off и Tet-on системы. Tet-off система, например, была успешно использована в эксперименте, нацеленном на выявление клеток, контролирующей реакцию страха у мышей. Трансгенным мышам, экспрессирующим тетрациклиновый активатор tTA под промотором гена раннего ответа c-fos, экспрессия которого является маркером активации нейронов, в гиппокамп вводили вирусную конструкцию, в которой ChR2 находился под промотором, содержащим тетрациклин-отвечающий элемент (TRE). Животным с пищей давали доксициклин (синтетический аналог тетрациклина), который связывается с tTA, что препятствует включению экспрессии ChR2. Как только доксициклин прекращает поступать с пищей, становится возможной экспрессия ChR2, но она происходит только в активированных нейронах, у которых запущен механизм, участником и показателем активности которого является белок c-Fos. В этих опытах незадолго до помещения в стрессовую ситуацию, вызывающую у мышей реакцию страха, им прекращали давать доксициклин, а уже в угрожающей ситуации снова давали данный препарат. Этим обеспечивали экспрессию каналородопсина-2 только в тех нескольких «нейронах страха», которые были активны в ситуации стресса. Однажды запущенная экспрессия ChR2 в этих «нейронах страха» достаточно устойчива, что позволило избирательно активировать их светом. Оптогенетической стимуляции этих нескольких нейронов в условиях, в которых животное обычно не проявляет реакцию страха, было достаточно, чтобы вызвать реакцию страха в спокойной, неугрожающей обстановке (Liu et al., 2012).

Одной из проблем оптогенетики является получение стабильной экспрессии ChR2 под слабым или же жестко регулируемым промотором. Для повышения экспрессии фотоканала его ставят под контроль сильного конститутивного промотора (например, EF1- α), находящегося в обратной ориентации к промотору опсина и фланкированного двумя loxP сайтами, обычным и мутированным (EF1 α -DIO-гало/опсин). После восстановления нормальной ориентации Cre-рекомбиназой последовательность, кодирующая мРНК опсина или галородопсина, разворачивается, что обеспечивает высокий уровень экспрессии фотоканала. Часто используются конструкции, в которых после сильного промотора находится stop-кассета, фланкированная loxP сайтами (EF1 α -loxSTOP-lox-гало/опсин).

Чтобы добиться сильной специфичной экспрессии опсинов в нейронах тех типов, которые представляют интерес, либо в клетках, экспрессирующих исследуемый ген, используют трансгенных животных, у которых Cre-рекомбиназа экспрессируется только под промотором, работающим исключительно в необходимом типе клеток либо под промотором исследуемого гена. Применяют как введение вирусов (EF1 α -DIO-гало/опсин) этим трансгенным животным, экспрессирующим Cre-рекомбиназу, так и скрещивание мышей двух трансгенных линий. При введении вируса в мозг Cre-экспрессирующих трансгенных опсина с сильным EF1- α промотором попадает во все клетки в зоне инъекции вирусной конструкции, но лишь в тех клетках, где имеется Cre, произойдет увеличение уровня экспрессии этого гена (Gompf et al., 2015).

Наряду с трансгенными линиями мышей используется вирусная доставка генов опсинов в клетки интересующих исследователя областей головного мозга.

Вирусные векторы доставки опсинов в мозг

Для экспрессии в клетках исследуемых отделов мозга активированных светом каналов их часто доставляют к этим клеткам в составе ленти- или аденоассоциированных (AAV) вирусов. Эти векторы обеспечивают устойчивую экспрессию доставляемого гена в различных типах клеток при минимальном ответе иммунной системы.

Специфический клеточный промотор способен обеспечить селективную экспрессию опсина в нужных типах нейронов, а также отделах головного мозга. Вирусные векторы на основе ленти- и AAV вирусов могут быть использованы на организмах, для которых полностью недоступны либо имеется лишь ограниченное число трансгенных моделей, например на приматах. Вирусные конструкции способны преодолевать низкую транскрипционную активность некоторых специфичных промоторов путем встраивания множества копий гена. При достаточно высоком титре введенного вируса высокий уровень экспрессии опсина в нейронах достигается через 2–3 недели и может наблюдаться в течение нескольких месяцев. (Dittgen et al., 2004; Zhang et al., 2010; Kim et al., 2013).

Данный подход в сочетании с последними достижениями в фотолитографии позволяет перейти на новый уровень в изучении функций нейронов *in vivo*. Коммерческие компании (Neuropexus, Neuralynx, Omnetics, Atlas Neuroengineering, ИМТЕК, Multichannel system, Intan Blackrock) предлагают различные многоканальные полупроводниковые (с микроусилителем для каждого канала на плате) оптоотроды (оптоволокно + электрод), при помощи которых возможны одновременные стимуляция светом и запись локальных потенциалов клеток (Davis et al., 2008; Tan et al., 2008). Плотность печати микроплат позволяет вести запись до 256 каналов, регистрируя популяционные спайки малого количества нейронов (Buzsaki et al., 2015). Прогресс в технических науках обеспечил создание микро-оптоволокна, эмитирующего свет с разной длиной волны в разных точках для одновременной стимуляции и ингибирования нейронов, расположенных в зонах эмиссии возбуждающего и тормозного света, что позволяет мультимодально манипулировать различными популяциями нейронов (Pisanello et al., 2014). Имеющиеся оптоотроды и микросхемы достаточно миниатюрны. После вживления в мозг они могут быть закреплены на голове и служить при долговременных хронических опытах на животных, что открыло путь применения оптогенетики для исследования депрессивно-подобного поведения, тревожности, агрессии, памяти, стресса и других функций организма.

Ген *c-fos* в оптогенетических исследованиях

Активацию нейронов в мозге можно выявить не только по частоте и амплитуде их электрических разрядов, но и по всплеску экспрессии генов раннего ответа, таких как *c-fos* или *arc*. Это установлено многими исследователями методами *in situ* гибридизации и иммуногистохимии (Lanshakov et al., 2016). Повышение экспрессии *c-fos*

может наблюдаться уже через 5 мин после активации нейрона, поэтому трансгены и генетические конструкты на основе промотора *c-fos* часто используются в оптогенетике. Активированные клетки и целые нейронные сети можно маркировать и выявлять по экспрессии *c-fos*, используя трансгенных мышей с репортерным флюоресцентным белком под его промотором. Маркировать активные нейроны позволяет и подход TRAP (Targeted Recombination in Active Populations), включающий два компонента: трансген с ERTCre-рекомбиназой под промотором *c-fos* и трансген (или вирус), который экспрессирует репортерный флюоресцентный белок рекомбиназозависимым образом. В отсутствие тамоксифена Cre-рекомбиназа остается в цитоплазме неактивной, рекомбинация не происходит и белок не экспрессируется. Важно, что неактивные клетки не экспрессируют Cre-рекомбиназу и в них не происходит рекомбинации даже в присутствии тамоксифена. Этот подход отличается более высоким временным разрешением по сравнению с TET-off системой, так как экспрессия *c-fos* происходит только в течение короткого времени после активации нейрона и активность тамоксифена ограничена его метаболизмом и экскрецией. В результате помечаются только те нейроны, которые были активны в течение непродолжительного отрезка времени. (Guenther et al., 2013). Отметим, что все описанные системы, использующие Cre- и ERTCre-рекомбиназы, могут быть совмещены с современными репортерами, такими как флюоресцентные белки, например brainbow, а также генетически кодируемыми фотосенсорами ионов кальция или глутамата.

Ответы на фотостимуляцию клеток, экспрессирующих каналородопсин

Каналородопсины способны осуществлять трансмембранный ток ионов под влиянием фотонов определенной длины волны в клетках любых типов. Это свойство фотоканалов привлекает к ним внимание даже в качестве потенциальных регуляторов сердечной деятельности при экспрессии в кардиомиоцитах (Ambrosi et al., 2015).

Экспрессия использованного в нашей работе каналородопсина H134 *in vitro* в составе плазмиды pAAV-SAMKIIa-ChR2_{h134}-YFP в клетках линии HEK293 эмбриональной почки человека, трансфицированных этой плазмидой при помощи липофектамина, придавала данным клеткам чувствительность к свету. В этих опытах через сутки после трансфекции клетки, экспрессирующие опсин H134, освещали синим светом (480 нм ~ 1,2 мВт/мм²) и измеряли трансмембранный ток методом патч-кламп (Zapara et al., 1989). При освещении клеток наблюдали деполяризацию их мембран, что подтверждает фотоактивность этого опсина (рис. 1).

Для экспериментов *in vivo* вирусные векторы были собраны, очищены и сконцентрированы в лаборатории функциональной нейрогеномики ИЦиГ СО РАН на основе плазмид, созданных группой К. Deisseroth (США). Частицы AAV вирусов смешанных первого и второго серотипов получали, как это принято, путем трансфекции HEK293 клеток смесью плазмид для сборки вирусов pDP1, pDP2 и плазмидой pAAV-SAMKIIa-ChR2_{h134}-YFP, несущей последовательность каналородопсина-2 H134.

Вирусные частицы выделяли на гепарин-сефарозных колонках и концентрировали при помощи центрифужных концентраторов Millipore (США) до титра 10^{11} . В этих векторах экспрессия каналородопсина контролируется промотором САМКПа, активным только в глутаматергических нейронах. В качестве контроля использовали вектор AAV-САМКПа-EGFP, имеющий те же компоненты, что и фотовектор, за исключением фотоканала.

Внедрение генетических конструкций в мозг взрослых грызунов связано с необходимостью проведения сложной операции, включающей трепанацию черепа (Shishkina et al., 2001). Вводить препараты в головной мозг новорожденных или неонатальных животных существенно легче, поскольку их кожные покровы прозрачны, а кости черепа еще не сформированы, как это уже было показано нами ранее (Shishkina et al., 2004; Dygalo et al., 2008). Поэтому использование неонатальных животных для инъекций им в головной мозг векторов, экспрессирующих каналородопсина, для последующего исследования взрослых животных представляет особый интерес.

Для оценки применимости такого подхода с использованием вектора, в котором экспрессия каналородопсина контролируется промотором САМКПа, активным в глутаматергических нейронах, трехдневным крысятам под холловым наркозом в боковые желудочки головного мозга было введено 5 μ l вирусных частиц, кодирующих канал и флюоресцентный маркер, или контрольные вирусные частицы, несущие лишь зеленый флюоресцентный белок.

Через 3 и 9 нед был проведен анализ электрической активности клеток мозга при фотостимуляции. Для этого животных наркотизировали уретаном и помещали в стереотаксис. Через небольшое отверстие в черепа, расположенное над гиппокампом, в его СА1 область вводили 16-канальный оптодод А1 \times 16-5mm-100-177-0A16LP фирмы Neuronexus (США), позволяющий осуществлять оптическую стимуляцию ткани в области расположения окончания оптодод и регистрировать электрическую активность клеток этого участка мозга. Запись популяционных спайков вели с помощью прибора SmartBox компании Neuronexus (США). Стимуляцию светом 1,2 мВт/мм² проводили при помощи фотодиода фирмы Thorlabs (США), дающего синий свет с длиной волны 480 нм. Эксперимент начинали 10-минутной регистрацией фоновой разрядной активности нейронов без фотостимуляции. Последующие 10 мин электрическую активность этих нейронов регистрировали при подаче через оптоволоконно синего света (480 нм \sim 1,2 мВт/мм²), входящее в состав оптодод (рис. 2). Через 3 нед после введения вируса, как отчетливо видно на этом рисунке, при стимуляции мозга светом происходит увеличение электрической активности клеток гиппокампа. Активация гиппокампа неонатальных животных светом подтверждалась и количественным анализом разрядной активности его нейронов (рис. 2, б).

После завершения опто-электрофизиологической части эксперимента стимулирующее действие синего света на клетки дополнительно было определено по общепринятому критерию активации нейронов – повышению экспрессии белка раннего ответа c-Fos. Для этого наркотизированных животных транкардиально перфузировали 1 \times PBS и 4 %-м параформальдегидом (PFA). Извлекали

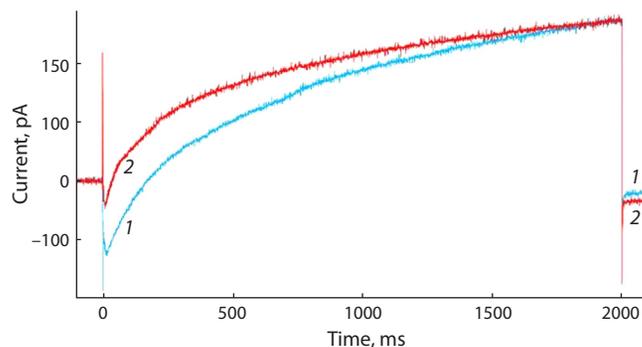


Fig. 1. Whole-cell patch-clamp recordings from HEK293 cell expressing channelrhodopsin-2 H134. Current variation: (1) in response to light of the wavelength 470 nm, (2) in the control.

мозг, постфиксировали 4 ч в 4 %-м PFA и делали 300 μ m срезы на вибраторе. Иммуногистохимию белков проводили согласно общепринятым методикам (Lanshakov et al., 2016). Иммуногистохимический анализ показал, что фотостимуляция разрядной активности нейронов вызывает увеличение экспрессии белка раннего ответа c-Fos в тех же клетках, которые экспрессируют каналородопсин H134.

В отличие от ювенильных животных, в головном мозге взрослых 9-недельных крыс практически не было найдено клеток, экспрессирующих репортер. В согласии с этим у взрослых животных отсутствовал также и ответ со стороны разрядной активности нейронов головного мозга при стимуляции синим светом как *in vivo*, так и на срезах гиппокампа *in vitro*. В большинстве экспериментов с вирусной доставкой опсинов в мозг взрослых животных стимуляцию проводят через 20–30 дн (Stuber et al., 2011; Warden et al., 2012). В некоторых исследованиях конструкции с САМКПа промотором обеспечивали в течение 8–9 нед экспрессию внутриклеточных белков, которые не экспонированы на поверхности клеток (Hioki et al., 2007; Watakabe et al., 2015). Явное снижение количества клеток, экспрессирующих H134 у животных 9-недельного возраста, может объясняться рядом причин. Прежде всего, спустя несколько недель после доставки вектора в клетку обнаруживаются метилирование и инактивация его промотора, что существенно снижает экспрессию регулируемого им гена (Watakabe et al., 2015). С другой стороны, каналородопсин – чужеродный белок, встраивающийся в мембрану нейронов и экспонирующийся на их поверхности, что способно индуцировать развитие реакции микроглии и элиминацию этих клеток. Даже экспрессия внутриклеточного чужеродного белка, обеспеченная его доставкой в клетки мозга AAV2 вирусом, способна, хотя и в меньшей степени, чем доставка AAV9 вирусом, индуцировать элиминацию клеток, экспрессирующих этот белок (Samaranch et al., 2014). Оба предложенных механизма снижения экспрессии H134 у животных 9-недельного возраста представляются вполне реальными, поскольку убедительно показаны на генетических конструкциях, подобных нашей. Таким образом, несмотря на технологичность введения в головной мозг неонатальным животным вектора, экспрессирующего фоточувствительный канал,

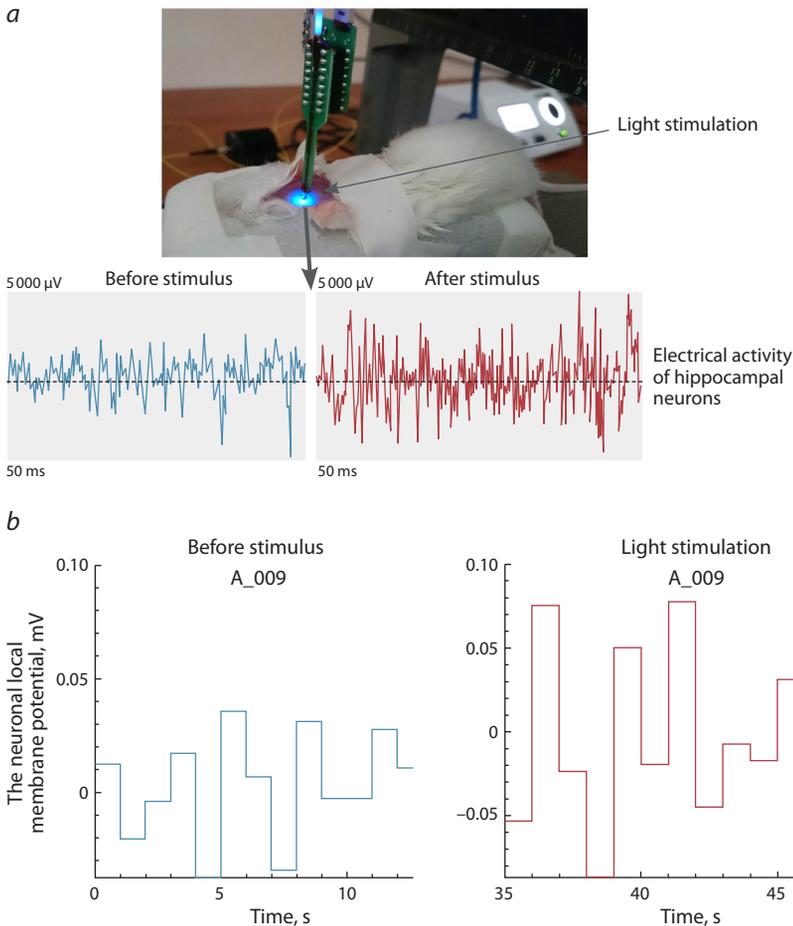


Fig. 2. The electrical activity of hippocampal neurons in juvenile (20-day-old) animals after intracerebroventricular administration of adeno-associated viruses carrying a photosensitive channel and the reporter protein (CAMKIIa-ChR2_{h134}-YFP) during neonatal development before and after stimulation of the neurons with blue light.

(a) The experimental device and example records of the discharge activity of hippocampal neurons. (b) The frequency histogram of the hippocampal neuron activity obtained through channel A_009 of the optotrod and averaged over 1-sec intervals before and after photo stimulation. Y-axis, the neuronal local membrane potential, mV.

применимость этого подхода, по крайней мере относительно используемых в нашей работе конструкторов, имеет ограничение по сроку после вирусной доставки вектора в мозг и может эффективно применяться лишь у ювенильных животных.

Результаты свидетельствуют, что малотравмирующее и нетрудоемкое введение вирусных конструкций в головной мозг новорожденным или неонатальным животным может быть использовано для последующего изучения эффектов оптогенетической активации нейронов ЦНС у животных ювенильного или подросткового возраста. В то же время для оптогенетического управления разрядной активностью нейронов ЦНС взрослых животных и анализа свойств этих клеток необходимо введение векторов, в которых экспрессия каналородопсина контролируется промотором САМКIIа в сроки, предшествующие стимуляции нейронов светом и обеспечивающие проявление высокого уровня экспрессии фотоканала в период исследования.

Acknowledgments

This work was supported by: State Budgeted Project 0324-2015-0004 (sections «Photosensitive ion channels modulating neuron activity» and «Transgenic animals in optogenetic studies»); the Russian Foundation for Basic Research, project 16-

34-60103 (sections «Viral vectors for opsin delivery to the brain» and «The c-fos gene in optogenetic studies»); and the Russian Science Foundation, project 14-15-00115 (section «The response to light stimulation in cells expressing channelrhodopsin»).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ambrosi C.M., Boyle P.M., Chen K., Trayanova N.A., Entcheva E. Optogenetics-enabled assessment of viral gene and cell therapy for restoration of cardiac excitability. *Sci. Rep.* 2015;5(17350). DOI 10.1038/srep17350
- Arenkiel B.R., Peca J., Davison I.G., Feliciano C., Deisseroth K., Augustine G.J., Ehlers M.D., Feng G. In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron.* 2007;54(2):205-218. DOI 10.1016/j.neuron.2007.03.005
- Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 2005;8(9):1263-1268. DOI 10.1038/nn1525
- Buzsaki G., Stark E., Berenyi A., Khodagholi D., Kipke D.R., Yoon E., Wise K.D. Tools for probing local circuits: high-density silicon probes combined with optogenetics. *Neuron.* 2015;86(1):92-105. DOI 10.1016/j.neuron.2015.01.028
- Davis B.J., Marks D.L., Ralston T.S., Carney P.S., Boppart S.A. Interferometric synthetic aperture microscopy: Computed imaging for scanned coherent microscopy. *Sensors (Basel).* 2008;8(6):3903-3931. DOI 10.3390/s8063903
- Deisseroth K. Optogenetics. *Nat. Methods.* 2011;8(1):26-29. DOI 10.1038/nmeth.f.324
- Diester I., Kaufman M.T., Mogri M., Paschaie R., Goo W., Yizhar O., Ramakrishnan C., Deisseroth K., Shenoy K.V. An optogenetic toolbox designed for primates. *Nat. Neurosci.* 2011;14(3):387-397. DOI 10.1038/nn.2749
- Dittgen T., Nimmerjahn A., Komai S., Licznerski P., Waters J., Margrie T.W., Helmchen F., Denk W., Brecht M., Osten P. Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004;101(52):18206-18211. DOI 10.1073/pnas.0407976101
- Dygalo N.N. Optogenetics in Investigations of Brain Mechanisms of Behavior. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk=Advance in Physiological Sciences (Moscow).* 2015;46(2):17-23.
- Dygalo N.N., Kalinina T.S., Shishkina G.T. Neonatal programming of rat behavior

- by downregulation of alpha2A-adrenoreceptor gene expression in the brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008;1148:409-414. DOI 10.1196/annals.1410.063
- Glock C., Nagpal J., Gottschalk A. Microbial rhodopsin optogenetic tools: Application for analyses of synaptic transmission and of neuronal network activity in behavior. *Meth. Mol. Biol.* 2015;1327:87-103. DOI 10.1007/978-1-4939-2842-2_8
- Gompf H.S., Budygin E.A., Fuller P.M., Bass C.E. Targeted genetic manipulations of neuronal subtypes using promoter-specific combinatorial AAVs in wild-type animals. *Front. Behav. Neurosci.* 2015;9:152. DOI 10.3389/fnbeh.2015.00152
- Gradinaru V., Thompson K.R., Zhang F., Mogri M., Kay K., Schneider M.B., Deisseroth K. Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 2007;27(52):14231-14238. DOI 10.1523/JNEUROSCI.3578-07.2007
- Guenther C.J., Miyamichi K., Yang H.H., Heller H.C., Luo L. Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: targeted recombination in active populations. *Neuron.* 2013;78(5):773-784. DOI 10.1016/j.neuron.2013.03.025
- Hioeki H., Kameda H., Nakamura H., Okunomiya T., Ohira K., Nakamura K., Kuroda M., Furuta T., Kaneko T. Efficient gene transduction of neurons by lentivirus with enhanced neuron-specific promoters. *Gene Ther.* 2007;14(11):872-882. DOI 10.1038/sj.gt.3302924
- Husson S.J., Liewald J.F., Schultheis C., Stirman J.N., Lu H., Gottschalk A. Microbial light-activatable proton pumps as neuronal inhibitors to functionally dissect neuronal networks in *C. elegans*. *PLoS One.* 2012;7(7):e40937. DOI 10.1371/journal.pone.0040937
- Kim J.Y., Ash R.T., Ceballos-Diaz C., Levites Y., Golde T.E., Smirnakis S.M., Jankowsky J.L. Viral transduction of the neonatal brain delivers controllable genetic mosaicism for visualising and manipulating neuronal circuits in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 2013;37(8):1203-1220. DOI 10.1111/ejn.12126
- Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Dexamethasone-induced acute excitotoxic cell death in the developing brain. *Neurobiol. Dis.* 2016;91:1-9 DOI 10.1016/j.nbd.2016.02.009
- Lin J.Y. A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Exp. Physiol.* 2011;96(1):19-25. DOI 10.1113/expphysiol.2009.051961
- Liu X., Ramirez S., Pang P.T., Puryear C.B., Govindarajan A., Deisseroth K., Tonegawa S. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature.* 2012;484(7394):381-385. DOI 10.1038/nature11028
- Pisanello F., Sileo L., Oldenburg I.A., Pisanello M., Martiradonna L., Assad J.A., Sabatini B.L., De Vittorio M. Multipoint-emitting optical fibers for spatially addressable in vivo optogenetics. *Neuron.* 2014;82(6):1245-1254. DOI 10.1016/j.neuron.2014.04.041
- Samaranch L., San Sebastian W., Kells A.P., Salegio E.A., Heller G., Bringas J.R., Pivrotto P., DeArmond S., Forsayeth J., Bankiewicz K.S. AAV9-mediated expression of a non-self protein in non-human primate central nervous system triggers widespread neuroinflammation driven by antigen-presenting cell transduction. *Mol. Ther.* 2014;22(2):329-337. DOI 10.1038/mt.2013.266
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Attenuation of alpha2A-adrenergic receptor expression in neonatal rat brain by RNA interference or antisense oligonucleotide reduced anxiety in adulthood. *Neuroscience.* 2004;129(3):521-528. DOI 10.1016/j.neuroscience.2004.08.015
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Sournina N.Y., Dygalo N.N. Effects of antisense to the (alpha)2A-adrenoceptors administered into the region of the locus ceruleus on behaviors in plus-maze and sexual behavior tests in sham-operated and castrated male rats. *J. Neurosci.* 2001;21(2):726-731.
- Stuber G.D., Sparta D.R., Stamatakis A.M., van Leeuwen W.A., Hardjoprajitno J.E., Cho S., Tye K.M., Kempadoo K.A., Zhang F., Deisseroth K., Bonci A. Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. *Nature.* 2011;475(7356):377-380. DOI 10.1038/nature10194
- Tan E.L., Pereles B.D., Horton B., Shao R., Zourob M., Ong K.G. Implantable biosensors for real-time strain and pressure monitoring. *Sensors (Basel).* 2008;8(10):6396-6406. DOI 10.3390/s8106396
- Wang H., Peca J., Matsuzaki M., Matsuzaki K., Noguchi J., Qiu L., Wang D., Zhang F., Boyden E., Deisseroth K., Kasai H., Hall W.C., Feng G., Augustine G.J. High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007;104(19):8143-8148. DOI 10.1073/pnas.0700384104
- Warden M.R., Selimbeyoglu A., Mirzabekov J.J., Lo M., Thompson K.R., Kim S.Y., Adhikari A., Tye K.M., Frank L.M., Deisseroth K. A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature.* 2012;492(7429):428-432. DOI 10.1038/nature11617
- Watakabe A., Ohtsuka M., Kinoshita M., Takaji M., Isa K., Mizukami H., Ozawa K., Isa T., Yamamori T. Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. *Neurosci. Res.* 2015;93:144-157. DOI 10.1016/j.neures.2014.09.002
- Zapara G.A., Ratushnyak A.S., Shtark M.B. Local changes in transmembrane ionic currents during plastic reorganizations of electrogenesis of isolated neurons of the pond snail. *Neurosci. Behav. Physiol.* 1989;19(3):224-229.
- Zhang F., Gradinaru V., Adamantidis A.R., Durand R., Airan R.D., de Lecea L., Deisseroth K. Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nat. Protoc.* 2010;5(3):439-456. DOI 10.1038/nprot.2009.226
- Zhang F., Wang L.P., Brauner M., Liewald J.F., Kay K., Watzke N., Wood P.G., Bamberg E., Nagel G., Gottschalk A., Deisseroth K. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature.* 2007;446(7136):633-639. DOI 10.1038/nature05744
- Zhao S., Ting J.T., Atallah H.E., Qiu L., Tan J., Gloss B., Augustine G.J., Deisseroth K., Luo M., Graybiel A.M., Feng G. Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nat. Meth.* 2011;8(9):745-752.