

КАТИОННЫЙ КАНАЛЬНЫЙ РОДОПСИН ИЗ ВОДОРΟΣЛИ *Platymonas subcordiformis* КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ИНСТРУМЕНТ

© 2022 О.С. Иджилова^{1,2}, Г.Р. Смирнова^{1,2}, Л.Е. Петровская³, Д.А. Колотова^{1,2},
М.А. Островский², А.Ю. Малышев^{1*}

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485 Москва, Россия; электронная почта: malyshev@ihna.ru

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.09.2022

После доработки 10.10.2022

Принята к публикации 10.10.2022

Развитие оптогенетики в значительной степени зависит от разработки новых молекулярных инструментов – светоактивируемых белков. Используя культивируемые нейроны гиппокампа, мы провели сравнение двух светоактивируемых катионных каналов: классического канального родопсина-2 из *Chlamydomonas reinhardtii* (CrChR2) и недавно описанного канального родопсина, выделенного из водоросли *Platymonas subcordiformis* (PsChR2). Мы показали, что PsChR2 способен обеспечить генерацию потенциалов действия при импульсной световой стимуляции нейронов вплоть до частот в 40–50 Гц, в то время как верхний предел для CrChR2 составляет 20–30 Гц. Важным преимуществом PsChR2 по сравнению с классическим CrChR2 является сдвиг спектра его возбуждения в синюю область. Это открывает возможность для эффективного использования PsChR2 в экспериментах, построенных по принципу «all-optical electrophysiology», для которых необходимо разнести максимумы спектров канальных родопсинов, используемых для стимуляции нейрона, и спектров возбуждения различных красных флуоресцентных зондов. Мы провели сравнение ответов нейронов (генерации потенциалов действия), экспрессирующих CrChR2 и PsChR2, на световые стимулы с длиной волны 530 и 550 нм – наиболее часто используемые для возбуждения красных флуоресцентных зондов. Было показано, что свет с длиной волны 530 нм для нейронов, экспрессирующих PsChR2, гораздо (в 3,7 раза) менее эффективен, чем для экспрессирующих классический CrChR2. Свет же с длиной волны 550 нм даже при использованной нами максимальной интенсивности вообще не стимулирует нейроны, экспрессирующие любой из изученных опсинов. Это означает, что канальный родопсин PsChR2, выделенный из водоросли *P. subcordiformis*, и по своим частотным характеристикам, и по возможности его использования для стимуляции нейрона коротковолновым (синим, 470 нм) светом и одновременной регистрации различных физиологических процессов с помощью флуоресцентных зондов может рассматриваться как весьма перспективный оптогенетический инструмент.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оптогенетика, нейрон, бактериальный опсин, канальный родопсин, светоиндуцированный ток, пэтч-кламп, внутриклеточная регистрация, *Platymonas subcordiformis*.

DOI: 10.31857/S0320972522110082, EDN: LVZUMG

ВВЕДЕНИЕ

Микробные родопсины – светочувствительные ретиналь-содержащие белки – являются наиболее универсальными и широко применяемыми оптогенетическими инстру-

ментами [1]. При их экзогенной экспрессии в клетках млекопитающих они сохраняют свою функциональную активность и могут служить в качестве светуправляемых ионных каналов или насосов [2]. Благодаря использованию микробных родопсинов, в частности, стала

Принятые сокращения: ПД – потенциал действия; CrChR2 – канальный родопсин из *Chlamydomonas reinhardtii*; НЕК 293 – human embryonic kidney cells, иммортализованная модельная линия клеток эмбриональной почки человека; PsChR2 – канальный родопсин из *Platymonas subcordiformis*.

* Адресат для корреспонденции.

возможной малоинвазивная регуляция активности нейронов с высоким временным и пространственным разрешением как *in vitro* [3, 4], так и *in vivo* [5].

Канальный родопсин-2, клонированный из одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (*CrChR2*) [2], наиболее широко используется в оптогенетике. Он не нуждается для функционирования в дополнительных компонентах, обладает относительно быстрой кинетикой, высоким сродством с мембраной и практически не вызывает побочных эффектов. Однако во многих случаях всего этого оказывается недостаточно. За годы развития оптогенетики были созданы мутантные варианты канальных родопсинов, специализированные под конкретные задачи [6, 7]. Например, были созданы опсины с ускоренной кинетикой, сниженной десенситизацией или модифицированным спектром возбуждения. Особенно большой интерес представляют сообщения об открытии новых микробных опсинов, которые зачастую представляют собой практически готовые инструменты для эффективного решения тех или иных методических научных задач.

Сравнительно недавно был описан новый канальный родопсин, выделенный из другой хлорофитовой водоросли, *Platymonas subcordiformis* [8], который далее будем обозначать как *PsChR2*. Он отличается от *CrChR2* по двум существенным для нас параметрам: более быстрое восстановление пиковой амплитуды фототока и смещённый в коротковолновую область относительно *CrChR2* спектр поглощения [8]. Это делает *PsChR2* потенциальным кандидатом на роль оптогенетического инструмента в экспериментах, построенных по принципу «all-optical electrophysiology», в которых с помощью света осуществляется не только стимуляция нейронов, но одновременно и оптическая регистрация с применением флуоресцентных зондов [9]. Существенным условием в таких экспериментах является то, что спектры возбуждения опсина и флуоресцентного зонда или вовсе не должны перекрываться, или могут перекрываться в самой небольшой степени. В таком случае свет, активирующий зонд, не будет влиять на стимуляцию физиологической активности нейрона.

В данной работе мы исследовали функциональные свойства *PsChR2*, экспрессированного в первичных культурах нейронов гиппокампа, в сравнении с *CrChR2* в качестве контроля. Мы выяснили, что *PsChR2* в нейронах обеспечивает существенно лучшие частотные характеристики стимуляции по сравнению с *CrChR2* в диапазоне 20–50 Гц. Мы показали,

что обычно применяемый для возбуждения флуоресцентных зондов свет с длиной волны 530 нм способен стимулировать нейроны, экспрессирующие оба опсина – как *CrChR2*, так и *PsChR2*. В то же время более длинноволновый свет – 550 нм – не вызывал практически никакого ответа в нейронах, несущих оба изученных опсина. Это обстоятельство следует учитывать при планировании оптогенетических экспериментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аденоассоциированные вирусы серотипа 2 (pAAV-CAG-*PsChR2*-Venus и pAAV-CAG-*CrChR2*-Venus) были синтезированы в ФГБУ Федерального центра мозга и нейротехнологий ФМБА России. Титры вирусов составляли $5,5 \times 10^9$ геномов/мкл и $7,2 \times 10^9$ геномов/мкл соответственно.

Приготовление первичных нейронных культур выполнялось по стандартной методике [10] из гиппокампа новорождённых мышат линии ICR на 0–2 постнатальный день. Выделение гиппокампа производили в холодном растворе модифицированной базовой среды для культивации клеток млекопитающих (DMEM, «ThermoFisher Scientific» США) с 15 мМ Hepes («Sigma-Aldrich», США). Гиппокампы были механически измельчены и перенесены в 0,08%-ный (w/v) раствор трипсина в DMEM, после чего в течение 15 мин при 37 °С происходила ферментативная дезагрегация ткани. После её окончания и центрифугирования раствор заменяли на инкубационную среду (см. ниже), клетки несколько раз ресуспендировали. Полученную суспензию одиночных клеток распределяли по лункам культуральных планшетов на 12-мм покровные стекла, покрытые поли-D-лизином («Sigma-Aldrich»). Культуры содержались в стерильном инкубаторе в нейробазальной среде Neurobasal™-A medium с добавлением B27™ и GlutaMAX™, согласно рекомендациям производителя («ThermoFisher Scientific»). В инкубаторе поддерживалась температура 37 °С, содержание углекислого газа – 5% и относительная влажность – 95%.

Вирусную трансдукцию культур клеток производили на 5–6 сутки *in vitro*. Культуру инкубировали в течение суток в 0,1%-ном растворе (v/v) вируса в инкубационной среде. После окончания инкубации среда была полностью обновлена.

Электрофизиологическая регистрация активности нейронов производилась на 14–20 сутки методом пэтч-кламп в конфигурации «целая

клетка» при комнатной температуре в режиме фиксации тока или фиксации потенциала. Сигнал регистрировался с помощью усилителя Multiclamp™ 700B с преобразовательной головкой CV-7B («Molecular Devices»), оцифровывался с помощью АЦП (аналогово-цифрового преобразователя) Axon™ Digidata® 1550A («Molecular Devices») с частотой дискретизации 10 кГц и после фильтрации (фильтр низких частот Бесселя, частота среза – 10 кГц) записывался на компьютер при помощи программного обеспечения pCLAMP™ 10 («Molecular Devices»).

Ванночка с культурой была закреплена на предметном столике эпифлуоресцентного микроскопа Olympus BX51WI («Olympus Corporation», Япония) и заполнена стандартным буфером Хэнкса с глюкозой и Hepes: 10 mM Glc; 10 mM Hepes; 139 mM NaCl; 5,3 mM KCl; 1,26 mM CaCl₂·(2H₂O); 0,5 mM MgCl₂·(6H₂O); 4,16 mM NaHCO₃; 0,34 mM Na₂HPO₄; 0,44 mM KH₂PO₄; 0,4 mM MgSO₄·(7H₂O) (pH 7,4). Пэтч-пипетка из боросиликатного стекла была заполнена раствором, имитирующим внутриклеточный, следующего состава: 140 mM глюконата калия; 10 mM Hepes; 5 mM KCl; 10 mM фосфокреатина; 4 mM Mg-ATP и 0,3 mM Na₂-GTP (pH 7,31). Спротивление регистрирующего электрода при этом составляло 4–7 МОм.

Присутствие в пирамидном нейроне продукта экспрессии определялось по сигналу флуоресценции белка Venus. Световая стимуляция производилась с помощью трёх светодиодов: M470L2 (максимум 470 нм), M530L3 (максимум 530 нм) («Thorlabs Inc.», США) и pE-100 (максимум 550 нм) («CoolLED Ltd.», Великобритания), через объектив микроскопа.

Интенсивность освещения под объективом при различных токах питания диодов была предварительно измерена с помощью PM16-130 («Thorlabs Inc.»), и были построены калибровочные кривые, которые затем использовали для установки тока питания диода для достижения требуемой мощности светового стимула.

Во всех экспериментах поперечный размер светового пучка был максимально ограничен (примерно до 100 мкм в диаметре) при закрытой полевой диафрагме микроскопа, а пятно отцентрировано на сому клетки, чтобы минимизировать нецелевую стимуляцию соседних трансфицированных нейронов в культуре.

Анализ данных был выполнен с использованием пакета программ pCLAMP™ 10 и Python [11]. Нейроны, мембранный потенциал которых превышал –40 мВ, а также клетки, не способные стабильно генерировать потенциалы действия (ПД) при инъекции тока, были исключены из анализа.

Для статистического анализа данных использовали критерий Манна–Уитни и *t*-критерии Уэлча и Стьюдента (для нормально распределённых данных); для оценки нормальности распределения использовался критерий Шапиро–Уилка. В качестве статистических оценок везде приведены средние значения ± стандартные ошибки среднего, если не указано иное.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В культурах, трансдуцированных обоими вирусами, наблюдался высокий уровень экспрессии флуоресцентного продукта как в нейронах, так и в небольшом количестве глиальных клеток. Все зарегистрированные светящиеся нейронные клетки отвечали деполяризацией на стимуляцию световым стимулом с длиной волны 470 нм. Максимум поглощения PsChR2 составляет 445 нм [8], однако нам показалось интересным сравнить ответы обоих опсинов на стимуляцию светом с длиной волны 470 нм, поскольку таким источником света по умолчанию оснащаются эпифлуоресцентные микроскопы, на базе которых, как правило, создаются электрофизиологические установки для проведения оптогенетических экспериментов *in vitro*. Интенсивность светового стимула в первой серии экспериментов подбиралась индивидуально для каждого нейрона как максимально возможная интенсивность, при которой стимул не приводил к генерации ПД. Таким образом, мы компенсировали возможную разницу в уровне экспрессии опсинов в разных клетках. В этой серии регистрировался входящий светоиндуцированный ток, вызванный активацией канального родопсина, в режиме фиксации потенциала (voltage clamp). Средняя интенсивность таких стимулов составила для PsChR2 $0,20 \pm 0,16$ мкВт/мм² ($n = 19$) и для CrChR2 – $0,25 \pm 0,13$ мкВт/мм² ($n = 16$) ($p = 0,34$; *t*-критерий Стьюдента). Типичная форма фототока, вызываемого световой стимуляцией нейронов, экспрессирующих канальный родопсин, представлена на рис. 1, а и б.

Ответ включает в себя быстрый пиковый компонент и медленный стационарный. Максимальные амплитуды стационарного компонента фототока, измеренные во время непрерывной стимуляции, в двух экспериментальных группах нейронов были близки и достоверно не различались: 320 ± 30 пА – для PsChR2 ($n = 19$) и 300 ± 40 пА – для CrChR2 ($n = 16$) ($p = 0,73$; *t*-критерий Стьюдента). В то время как пиковые значения ответа были достоверно выше в нейронах, экспрессирующих CrChR2, по срав-

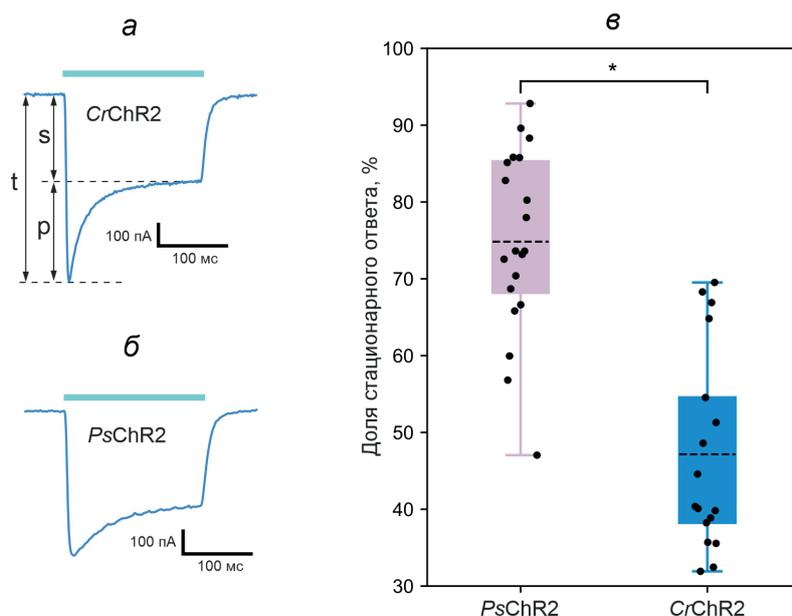


Рис. 1. Кинетические характеристики трансмембранных токов, индуцированных световой стимуляцией культивируемых нейронов гиппокампа, экспрессирующих родопсины *CrChR2* и *PsChR2*. *a* и *б* – Примеры внутриклеточной записи фототоков в нейронах, экспрессирующих каналы родопсины в ответ на световой стимул длительностью 200 мс с длиной волны 470 нм (стимул показан горизонтальной голубой полосой). *s* – Стационарный компонент ответа, *p* – пиковый компонент, *t* – весь ответ. *б* – Доля стационарного компонента фототока в общем ответе. Статистически достоверное различие, * $p < 0,001$; *t*-критерий Стьюдента

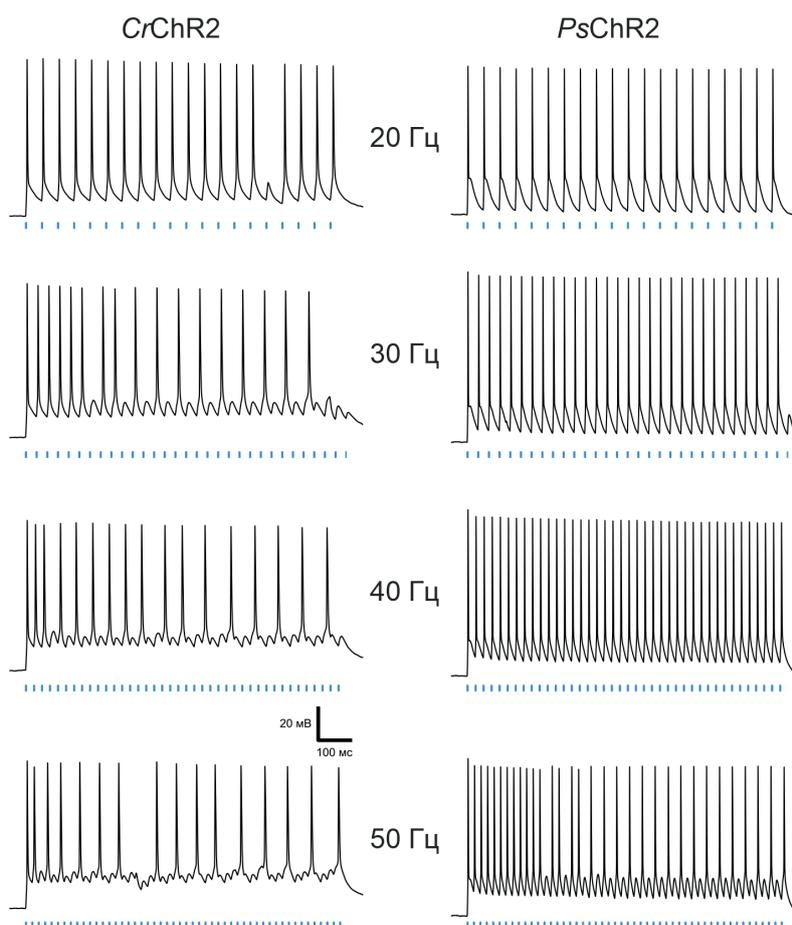


Рис. 2. Генерация потенциалов действия культивируемыми нейронами, экспрессирующими родопсины *CrChR2* и *PsChR2*, в ответ на импульсную стимуляцию короткими (3 мс) световыми импульсами, следующими с разной частотой (от 20 до 50 Гц). Световые импульсы схематически показаны синими вертикальными черточками

нению с ответами клеток с *PsChR2* (620 ± 80 пА и 420 ± 40 пА соответственно, $p < 0,05$; t -критерий Стьюдента). Такая разница обусловлена в том числе различным соотношением пиковой и стационарной компоненты ответа у двух исследованных нами канальных родопсинов (рис. 1, а и б). Вклад стационарной компоненты в общий ответ был значительно и достоверно выше у нейронов с *PsChR2* по сравнению с клетками с *CrChR2* ($75 \pm 3\%$ и $47 \pm 3\%$ соответственно, $p < 0,001$; t -критерий Стьюдента) (рис. 1, в). Следует отметить, что средние значения мембранных потенциалов покоя для этих групп клеток не различались (-59 ± 7 мВ – для *PsChR2* и -62 ± 8 мВ – для *CrChR2*, $p = 0,34$; t -критерий Стьюдента).

Импульсная стимуляция. Ранее было показано, что при стимуляции клеток НЕК 293 (иммортилизованная модельная линия клеток эмбриональной почки человека), экспрессирующих *PsChR2*, следующими друг за другом парными световыми стимулами ответ, вызванный вторым стимулом, восстанавливается гораздо лучше, чем при стимуляции клеток, экспрессирующих *CrChR2*, в широком диапазоне частот стимуляции [8]. В этой связи мы решили охарактеризовать максимальные частоты генерации потенциалов действия, которые можно индуцировать импульсной световой стимуляцией культивируемых нейронов гиппокампа, экспрессирующих *PsChR2*

и *CrChR2*. Интенсивность светового стимула в данных экспериментах подбиралась как пороговое для генерации ПД значение, умноженное на 2 (две реобазы). Нейроны обеих экспериментальных групп стабильно генерировали ПД в ответ на импульсную стимуляцию короткими световыми стимулами (3 мс) на частоте 5–20 Гц (рис. 2). При повышении частоты импульсов в ответах возникало всё больше и больше пропущенных ПД, причём в нейронах, экспрессирующих *PsChR2*, пропуски возникали при больших частотах следования световых стимулов (рис. 2). Частотные характеристики усреднённых ответов имели S-образную форму (рис. 3). В среднем частотном диапазоне (20–40 Гц) у нейронов, экспрессирующих *PsChR2*, доля успешных ПД была статистически значимо выше, чем у нейронов, экспрессирующих *CrChR2* ($p < 0,05$; критерий Манна–Уитни).

Ответы на световые стимулы зелёной области спектра. Существенной особенностью *PsChR2* является то, что спектр его возбуждения сдвинут в коротковолновую область по отношению к *CrChR2*, что делает его более подходящим кандидатом для проведения экспериментов, в которых стимуляция и регистрация активности нейронов на препарате происходит при помощи света с разной длиной волны. Поэтому мы задались целью проверить, насколько у нейронов, экспрессирующих *PsChR2* и *CrChR2*, раз-

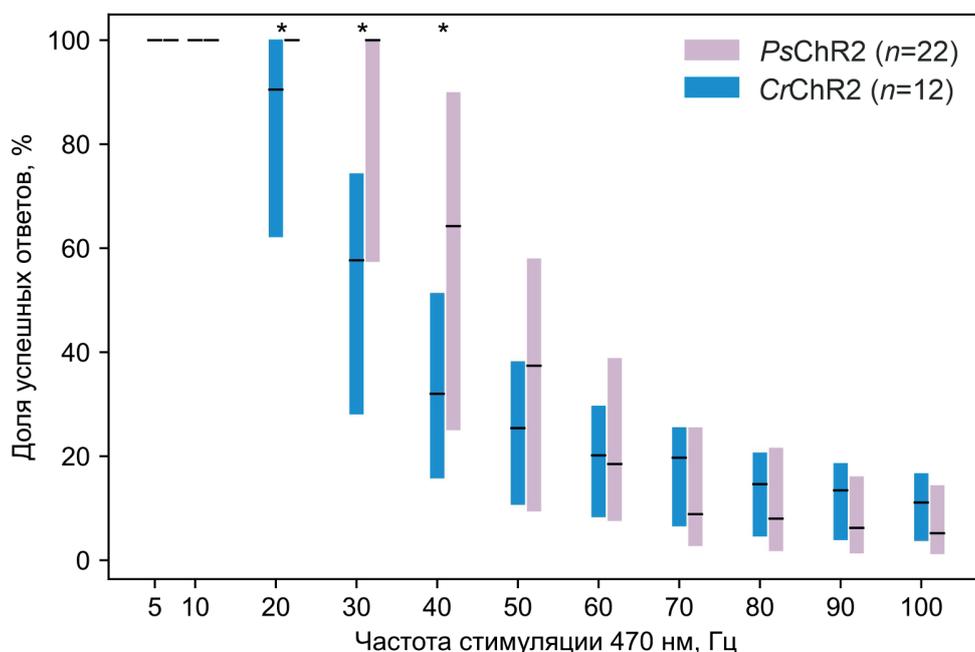


Рис. 3. Доля потенциалов действия, сгенерированных в ответ на импульсную стимуляцию, относительно общего количества поданных световых стимулов. Цветом закрашена область межквартильного размаха (ящик без усов), поперечные линии – медианы. Звёздочками отмечено наличие статистически значимого различия между распределениями по критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$). При стимуляции на частотах 5 и 10 Гц все нейроны в обеих группах достигли 100%-ного количества «успешных» ответов

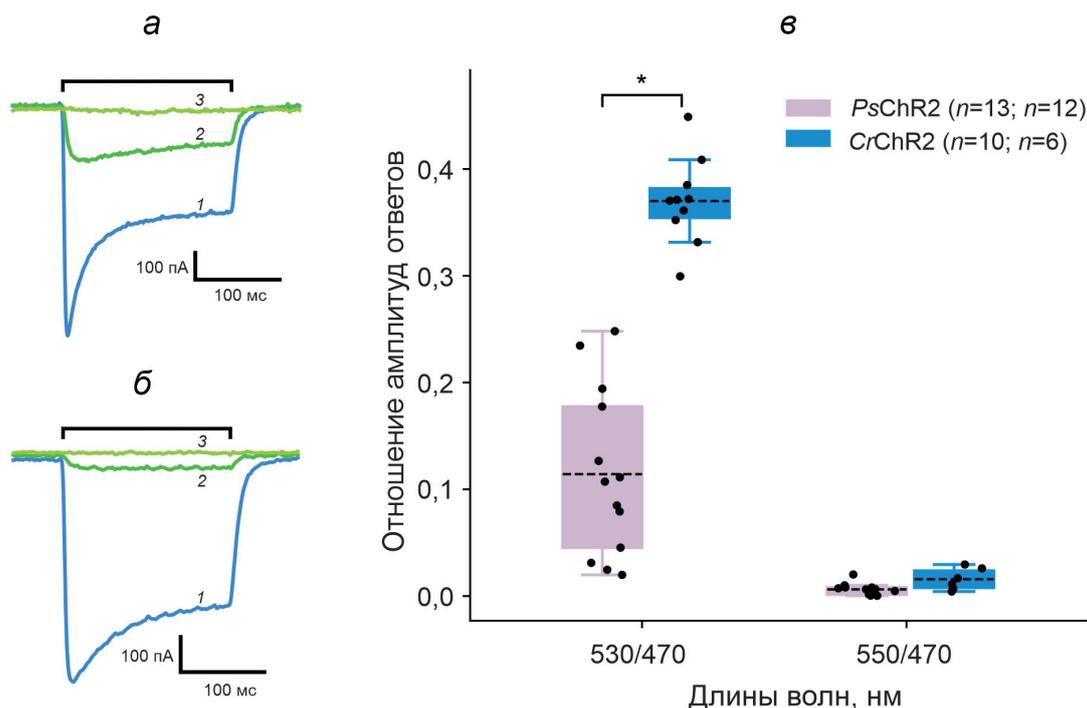


Рис. 4. Трансмембранные токи, индуцированные в культивируемых нейронах гиппокампа, экспрессирующих родопсины *CrChR2* и *PsChR2*, световыми стимулами с длиной волны 470, 530 и 550 нм одинаковой интенсивности. *а* и *б* – Примеры внутриклеточной записи фототоков в нейронах, экспрессирующих каналные родопсины, в ответ на световой стимул длительностью 200 мс с длинами волн 470 нм (1), 530 нм (2) и 550 нм (3) (в скобках указана цифра возле соответствующей кривой). Время светового стимула обозначено черной скобкой. *в* – Отношение амплитуд стационарного ответа на световые стимулы с длиной волны 530 нм и 550 нм к амплитуде ответа на стимул 470 нм. Статистически значимое различие, * $p < 0,01$; t -критерий Уэлча

личаются характеристики ответа на зелёный свет (530 нм и 550 нм), используемый обычно для имажинга красных флуоресцентных белков, который для проведения вышеописанных экспериментов должен вызывать минимальную (или, в идеале, нулевую) активацию канального родопсина. Как и в предыдущей серии экспериментов, интенсивность светового стимула подбиралась индивидуально для каждого нейрона при длине волны 470 нм (как максимальная интенсивность, не вызывающая ПД), и затем стимул с той же абсолютной интенсивностью использовался при длине волны 530 и 550 нм. Фототоки регистрировались в режиме фиксации потенциала в ответ на световой стимул длительностью 200 мс.

Оказалось, что соотношение амплитуд 530/470 в группе *PsChR2* в 3,7 раза ниже, чем в группе *CrChR2* (*PsChR2*: $0,10 \pm 0,08$; *CrChR2*: $0,37 \pm 0,04$; $p < 0,01$; t -критерий Уэлча) (рис. 4). В данной серии экспериментов измерение амплитуды пикового ответа не проводилось, ввиду его практически полного отсутствия при стимуляции зелёным светом. При этом на стимуляцию светом с длиной волны 550 нм такой же интенсивности ответ клеток в обеих группах был минимальным (*PsChR2*: $0,006 \pm 0,005$; *CrChR2*: $0,014 \pm 0,009$; $p = 0,076$; t -критерий

Уэлча). Оба результата согласуются с измерениями спектров поглощения *CrChR2* и *PsChR2*, проведёнными ранее на клетках линии НЕК 293 [8]. Важно отметить, что при достаточно высокой интенсивности световой стимуляции (порядка 4–5 мкВт/мм²) удавалось индуцировать потенциалы действия в нейронах, экспрессирующих как *CrChR2*, так и *PsChR2*, в то время как свет с длиной волны 550 нм даже при максимальной интенсивности не приводил к надпороговой активации нейронов.

Апликация полностью-транс ретиналя не влияет на активность канальных родопсинов. В оригинальной статье, впервые описывающей свойства *PsChR2*, сообщалось, что культивирование нейронов, экспрессирующих данный канальный родопсин, в среде с повышенным содержанием полностью-транс ретиналя приводит к значительному увеличению амплитуды светоиндуцированного тока. В данной работе авторы, помимо 0,5 мкМ ацетата ретинила, который по умолчанию содержится в стандартной культуральной среде и служит для клеток источником полностью-транс ретиналя, дополнительно вносили в чашку ретиналь в полностью-транс форме до достижения его финальной концентрации 0,4 мкМ [8]. В этой связи мы решили проверить, не усиливает ли ответ

на свет нейронов, экспрессирующих канальные родопсины, добавление ретиналя непосредственно в культуральную чашку во время проведения электрофизиологического эксперимента, поскольку известно, что микробные родопсины способны быстро захватывать и ковалентно связывать ретиналь из окружающей среды [12]. Ответы нейронов на световой стимул с длиной волны 470 нм и длительностью 200 мс регистрировались до добавления 0,4 мкМ полностью-*транс* ретиналя, а также через 20 мин после добавления. Было найдено, что аппликация ретиналя значимо не повлияла на ответы клеток. Если принять амплитуду ответа, вызванного стимулом 470 нм, за единицу, то спустя 20 мин после аппликации полностью-*транс* ретиналя доля быстрого компонента ответа в нейронах, экспрессирующих *CrChR2*, составила $0,93 \pm 0,05$, тогда как в клетках с *PsChR2* — $0,87 \pm 0,05$. Доля постоянного медленного компонента ответа — $0,86 \pm 0,06$ и $0,82 \pm 0,06$ соответственно (все различия были статистически недостоверны, *t*-критерий Стьюдента).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

PsChR2, предположительно, является одним из по крайней мере трёх типов рецепторов фототаксиса водоросли *P. subcordiformis*, и, как было показано ранее, по своей первичной структуре и свойствам этот белок схож с другими канальными родопсинами зелёных водорослей [8]. Тем не менее описанные здесь электрофизиологические свойства делают его особенным в этом ряду. Поэтому *PsChR2* и был выбран нами для изучения в целях дальнейшего применения в оптогенетических экспериментах. Мы показали, что, несмотря на сходство с «классическим» канальным родопсином *CrChR2*, *PsChR2* способен стабильно обеспечивать более высокую частоту потенциалов действия при импульсной световой стимуляции. По всей видимости, одним из объяснений этой особенности может являться ранее показанная в работе Govorunova et al. [8] пониженная десенситизация *PsChR2* в процессе освещения, что проявляется как меньшая доля быстрой компоненты в общем ответе на свет в наших экспериментах. При этом необходимо учитывать, что нейроны в культуре не являются зрелыми, поскольку их источником является мозг новорождённых животных, и по ряду причин они не могут развиваться полноценно. Как следствие, частоты генерации ПД свыше 50 Гц являются для них труднодостижимыми. Поэтому диапазон 20–50 Гц можно считать их

продуктивным рабочим диапазоном, и именно в этом диапазоне *PsChR2* обладает ощутимым преимуществом над *CrChR2*. Возможность световой стимуляции нейронов на этих частотах является ключевой для экспериментов с индукцией долговременной синаптической пластичности, а также для экспериментов по изучению особенностей и механизмов кодирования и передачи информации между нейронами.

Световые стимулы в нашей работе генерировались с помощью стандартного светодиода с максимумом излучения 470 нм и шириной спектра 40 нм, рутинно применяемого для активации *CrChR2* в оптогенетических экспериментах, в то время как максимум спектра активации *PsChR2*, измеренный в клетках НЕК 293, находится в области 445 нм [8]. Этим можно объяснить тот факт, что амплитуда светоиндуцированных токов в нейронах, экспрессирующих *PsChR2*, была практически такой же, как и в клетках с *CrChR2*. В то же время было показано, что при использовании светового стимула 440 нм *PsChR2* генерирует больший фототок, чем *CrChR2* при стимуляции светом с длиной волны 470 нм. Тем не менее мы показали, что, применяя стандартный диод 470 нм, всё равно можно успешно активировать *PsChR2*, достигая высоких частот генерации ПД.

Ранее на ооцитах *Xenopus laevis* было показано, что экзогенный канальный опсин *C. reinhardtii* более устойчив к деградации в присутствии связанного с ним хромофора полностью-*транс* ретиналя [13]. Длительное инкубирование клеток в среде с повышенной концентрацией ретиналя приводило к повышению уровня флуоресценции, связанной с опсином метки, а также к увеличению амплитуды фототока. Однако оставалось неизвестным, проявляется ли этот или сходный эффект другого механизма на более коротких временных масштабах инкубации, порядка десятков минут. Нам не удалось зафиксировать сколько-нибудь существенного влияния аппликации ретиналя на активность как *PsChR2*, так и *CrChR2*, экспрессируемых в культурированных нейронах гиппокампа.

Одной из важных особенностей нового канального родопсина *PsChR2* является сдвиг спектра его возбуждения влево (в синюю область) по сравнению с классическим *CrChR2*. Это открывает возможности для использования *PsChR2* в экспериментах, построенных по принципу «all-optical electrophysiology», когда стимуляция и регистрация активности нейронов на препарате происходят при помощи света с разной длиной волны. В частности, в нейронной культуре можно стимулировать нейроны,

экспрессирующие канальный родопсин, при помощи световых стимулов 470 нм и при этом регистрировать высвобождение медиатора из синаптической везикулы при помощи красных флуоресцентных зондов, схожих с рН-флуорином. рН-Флуорин встраивается в синаптическую везикулу и меняет свой уровень флуоресценции при высвобождении везикулы вследствие разницы рН между содержимым везикулы и внеклеточной средой [14]. Другим вариантом возможного эксперимента, построенного по принципу «all-optical electrophysiology», является оптогенетическая стимуляция нейронов и одновременная оптическая регистрация изменения уровня кальция в клетке при помощи таких кальций-чувствительных красных флуоресцентных зондов, как R-GECO.

Для выяснения возможностей проведения подобного рода экспериментов с использованием рассматриваемых здесь канальных родопсинов мы сравнили ответы нейронов, экспрессирующих *CrChR2* и *PsChR2*, на освещение при помощи светодиодов с длиной волны 530 и 550 нм — наиболее часто используемых для возбуждения флуоресценции красных флуоресцентных белков. Оказалось, что амплитуда фототока, индуцированного в нейронах, экспрессирующих *PsChR2*, светом 530 нм, была существенно меньше, чем в клетках, экспрессирующих *CrChR2*. Тем не менее стимуляция светом с длиной волны 530 нм высокой интенсивности все-таки могла приводить к генерации потенциалов действия в нейронах с *PsChR2*, хотя частота ПД была ожидаемо ниже, чем в нейронах с *CrChR2*. В связи с этим мы изучили ответ нейронов на свет с длиной волны 550 нм. Оказалось, что световые стимулы этой длины волны даже при максимальной интенсивности не вызывают генерацию ПД в нейронах, экспрессирующих любой из изученных опсинов. Из этого следует, что свет с длиной волны 550 нм предпочтительней для возбуждения флуоресценции зонда.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы показали, что катионный канальный родопсин из одноклеточной водоросли *P. subcordiformis* по своим функциональным свойствам превосходит широко используемый в оптогенетике канальный родопсин-2 из *C. reinhardtii*. Во-первых, он обеспечивает возможность достижения более высоких частот стимуляции нейронов, и, во-вторых, *PsChR2* больше подходит для проведения экспериментов с одновременной световой стимуляцией трансфицированных нейронов и оптической регистрацией их ответов при помощи красных флуоресцентных зондов. Однако в этом случае для возбуждения флуоресценции красных зондов необходимо использовать свет с длиной волны 550 нм.

Вклад авторов. А.Ю. Малышев, М.А. Островский — концепция и руководство работой; Г.Р. Смирнова, Л.Е. Петровская — проведение молекулярно-биологических экспериментов; О.С. Иджилова и Д.А. Колотова — проведение электрофизиологических экспериментов; А.Ю. Малышев, О.С. Иджилова и М.А. Островский — написание и редактирование текста.

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

Благодарности. Авторы благодарят О.Г. Щербакову за предоставление плазмиды с *PsChR2*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Montagni, E., Resta, F., Mascaro, A. L. A., and Pavone, F. S. (2019) Optogenetics in brain research: from a strategy to investigate physiological function to a therapeutic tool, *Photonics*, **6**, 92, doi: 10.3390/photonics6030092.
2. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., et al. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13940-13945, doi: 10.1073/pnas.1936192100.
3. Boyden, E., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nat. Neurosci.*, **8**, 1263-1268, doi: 10.1038/nn1525.
4. Govorunova, E., Sineshchekov, O., Janz, R., Liu, X., and Spudich, J. (2015) Natural light-gated anion channels: a family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics, *Science*, **349**, 647-650, doi: 10.1126/science.aaa7484.
5. Arenkiel, B., Peca, J., Davison, I., Feliciano, C., Deisseroth, K., et al. (2007) *In vivo* light-induced activation

- of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2, *Neuron*, **54**, 205-218, doi: 10.1016/j.neuron.2007.03.005.
6. Duan, X., Nagel, G., and Gao, S. (2019) Mutated channelrhodopsins with increased sodium and calcium permeability, *Appl. Sci.*, **9**, 664, doi: 10.3390/app9040664.
 7. Wietek, J., and Prigge, M. (2016) Enhancing channelrhodopsins: an overview, in *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N. J., ed) **1408**, pp. 141-165, doi: 10.1007/978-1-4939-3512-3_10.
 8. Govorunova, E., Sineshchekov, O., Li, H., Janz, R., and Spudich, J. (2013) Characterization of a highly efficient blue-shifted channelrhodopsin from the marine alga *Platymonas subcordiformis*, *J. Biol. Chem.*, **288**, 29911-29922, doi: 10.1074/jbc.M113.505495.
 9. Hochbaum, D., Zhao, Y., Farhi, S., Klapoetke, N., Werley, C. A., et al. (2014) All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins, *Nat. Methods*, **11**, 825-833, doi: 10.1038/nmeth.3000.
 10. Beaudoin, G., Lee, S.-H., Singh, D., Yuan, Y., Ng, Yu-G., et al. (2012) Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex, *Nat. Protoc.*, **7**, 1741-1754, doi: 10.1038/nprot.2012.099.
 11. Van Rossum, G., and Drake, F. (2009) *Python 3 Reference Manual*, Scotts Valley, CA: CreateSpace.
 12. Nakanishi, K., and Crouch, R. (1995) Application of artificial pigments to structure determination and study of photoinduced transformations of retinal proteins, *Isr. J. Chem.*, **35**, 253-272, doi: 10.1002/ijch.199500030.
 13. Ullrich, S., Gueta, R., and Nagel, G. (2013) Degradation of channelrhodopsin-2 in the absence of retinal and degradation resistance in certain mutants, *Biol. Chem.*, **394**, 271-280, doi: 10.1515/hsz-2012-0256.
 14. Miesenböck, G., De Angelis, D., and Rothman, J. (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins, *Nature*, **394**, 192-195, doi: 10.1038/28190.

CATIONIC CHANNELRHODOPSIN FROM THE ALGAE *Platymonas subcordiformis* AS A PROMISING OPTOGENETIC TOOL

O. S. Idzhilova^{1,2}, G. R. Smirnova^{1,2}, L. E. Petrovskaya³, D. A. Kolotova^{1,2},
M. A. Ostrovsky², and A. Y. Malyshev^{1*}

¹ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 117485 Moscow, Russia; E-mail: malyshev@ihna.ru

² Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

³ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

The progress of optogenetics largely depends on the development of new molecular tools – light-activated proteins. Using cultured hippocampal neurons, we compared properties of two light-activated cation channels: the classical channelrhodopsin-2 from *Chlamydomonas reinhardtii* (*CrChR2*) and the recently described channelrhodopsin isolated from the algae *Platymonas subcordiformis* (*PsChR2*). We have shown that *PsChR2* is capable to induce generation of action potentials during pulsed light stimulation of neurons up to frequencies of 40-50 Hz, while the upper limit for *CrChR2* is 20-30 Hz. An important advantage of *PsChR2* compared to classical *CrChR2* is the blue shift of its excitation spectrum. This opens up the possibility for its effective use in experiments based on the “all-optical electrophysiology” principle, for which it is necessary to separate the maxima of the spectra of channelrhodopsins used to stimulate a neuron and the excitation spectra of various red fluorescent probes. We compared the responses of neurons (generation of action potentials) expressing *CrChR2* and *PsChR2* to light stimuli with a wavelength of 530 and 550 nm, the most commonly used for excitation of red fluorescent probes. It was shown that light with a wavelength of 530 nm for neurons expressing *PsChR2* is much (3.7 times) less effective than for those expressing classical *CrChR2*. Light with a wavelength of 550 nm, even at its maximum used intensity, does not stimulate neurons expressing any of the studied opsins at all. This means that the *PsChR2* channelrhodopsin isolated from the algae *P. subcordiformis*, both in terms of its frequency characteristics and the possibility of its use for stimulating a neuron with short-wavelength (blue, 470 nm) light and simultaneous recording of various physiological processes using fluorescent probes, can be considered as a very promising optogenetic tool.

Keywords: optogenetics, neuron, bacterial opsin, channelrhodopsin, light-induced current, patch clamp, intracellular recording, *Platymonas subcordiformis*