

УДК 612.8

ОПСИНЫ И ИХ ТЕСТИРОВАНИЕ В ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПРЕССИОННЫХ СИСТЕМАХ

© 2024 г. Ю. А. Чилигина

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия
e-mail: julchil@mail.ru

Поступила в редакцию 05.12.2023 г.

После доработки 01.09.2024 г.

Принята к публикации 01.09.2024 г.

Светочувствительные белки являются потенциальными оптогенетическими инструментами для восстановления зрительных функций при дегенерации фоторецепторов в сетчатке. Детальное исследование их свойств в гетерологических экспрессионных системах является необходимым этапом, предшествующим экспериментам на животных. Рассматриваются особенности опсинов и факторы, влияющие на их активность в модельных клеточных системах. Особое внимание уделяется опсинам, сопряженным с G-белками, как перспективным инструментам для воссоздания сигнальных каскадных механизмов ON-биполярных клеток сетчатки. Анализируются светоуправляемые сигнальные пути, активируемые натуральными или химерными опсинами, открывающие калиевые каналы внутреннего выпрямления (GIRKs), а также возможная модуляция внутриклеточной сигнализации, опосредованная G-белками. Показано, что сравнение характеристик световой стимуляции (спектральный диапазон, интенсивность, длительность, частота) с полученными фотореологическими ответами клеток (амплитуда канальных токов, кинетика активации и деактивации каналов) в тестовой экспрессионной гетерологической системе позволяет отбирать лучших кандидатов среди светочувствительных белков, перспективных в генной терапии.

Ключевые слова: опсины, родопсин, меланопсин, светочувствительный химерный белок, G-белок-связанный рецептор (GPCR), калиевый канал внутреннего выпрямления (GIRK), гетерологическая экспрессионная система

DOI: 10.31857/S0042132424060032, **EDN:** NRVIEQ

ВВЕДЕНИЕ

Электромагнитное излучение в диапазоне от 380 до 780 нм является важнейшим физическим стимулом, воздействующим на физиологические и биохимические процессы во всех живых системах. Светочувствительные белки способны поглощать кванты света, вызывая в клетке фотореологические ответы. Обнаружено, что в результате экспрессии генов светочувствительных белков в неспециализированных к восприятию света клетках при световой стимуляции возникают ионные токи.

Одна из первых гетерологических систем создана на основе экспрессии гена бактериородопсина в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, где в ответ на свет наблюдали токи через светоуправ-

ляемую протонную помпу (Nagel et al., 1995). Позднее из зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* были выделены светочувствительные белки, названные канальными родопсинами или каналородопсинами: каналородопсин 1 (ChR1) и каналородопсин 2 (ChR2). ChR1 представляет собой избирательно проницаемый для протонов светоуправляемый ионный канал (Nagel et al., 2002, 2003), ChR2 — катион-проводящий канал. Гены каналородопсинов успешно экспрессированы в ооцитах *Xenopus laevis* и в клетках млекопитающих, при стимуляции клеток синим светом в них наблюдали фототоки (Nagel et al., 2002, 2003). Вызываемые световой стимуляцией токи отличались быстрой кинетикой активации и временным разрешением в несколько миллисекунд (Boyden et al., 2005; Deisseroth et al., 2006).

Возможность с помощью света управлять проводимостью ионных каналов, регулировать физиологическую активность нервных клеток и целых нейрональных ансамблей и даже контролировать поведение животных открыла новое оптогенетическое направление (Boyden et al., 2005; Covington et al., 2010; Deisseroth, 2011, 2015; Tye, Deisseroth, 2012; Levitz et al., 2013; Kim et al., 2017; Rost et al., 2017). Одна из важнейших задач оптогенетики — исследование светочувствительных белков как инструментов для восстановления зрительных функций при тяжелых формах наследственных дегенеративных заболеваний, в частности при пигментном ретините, вызывающем дистрофию сетчатки. Пигментный ретинит — это прогрессирующее наследственное заболевание, обусловленное мутациями, возникающими более чем в семидесяти различных генах (Bird, 1988; Wert et al., 2014; Sahel et al., 2021; Wu et al., 2023). При развитии заболевания на фоне продолжающейся гибели фоторецепторных клеток, биполярные, ганглиозные и амакриновые клетки продолжают нормально функционировать, придание этим клеткам восприимчивости к свету (светочувствительности) за счет внедрения генов светочувствительных белков (оптопротезирования) дает надежду на восстановление зрительных функций благодаря активации новых путей передачи информации в сетчатке (Кирпичников, Островский, 2019; Baker, Flanery, 2018; Berry et al., 2019; Firsov, 2019). В экспериментах на модельных животных (мыши линии rd1) с наследственной дегенерацией сетчатки продемонстрировано, что экспрессия экзогенных светочувствительных белков способствовала частичному восстановлению зрения у слепых мышей (Berry et al., 2019; Ganjawala et al., 2019; Kralik et al., 2022). В настоящее время в некоторых странах разрешены и клинические испытания с использованием оптогенетических методик. Однако пока известен один успешный пример генной терапии у человека с пигментным ретинитом (Sahel et al., 2021). В данной работе для оптогенетического протезирования ганглиозных клеток сетчатки использовали каналородопсин Chrimson R. У пациента наблюдали улучшение зрения только при совместном использовании генной терапии и специальных светостимулирующих очков, появилась способность распознавать и считать видимые предметы (Sahel et al., 2021).

В результате накопленных экспериментальных данных по оптогенетическому протезированию слепой сетчатки светочувствительными белками для восстановления утраченных зрительных функций возникли задачи, связанные

с изменением свойств белков и их химерных конструкций. Это повышение светочувствительности и расширение спектров поглощения белков; снижение фототоксичности, возникающей при увеличении интенсивности светового потока; воссоздание системы сигнальных путей, приближенной к здоровой клетке; повышение экспрессии генов экзогенных белков в клетке. Для этого исследуют функциональные особенности тестируемых белков, их чувствительность, проводимость, время активации/инактивации ионного канала. В случае активации внутриклеточных сигнальных путей, опосредованных G-белками, изучают специфичность взаимодействия внутриклеточного домена светочувствительного белка с определенным G-белком.

Для исследования этих вопросов и отбора подходящих кандидатов из числа натуральных и химерных светочувствительных белков применяют тестирование в гетерологических экспрессионных системах (Карпушев, Чилигина, 2023; Ballister et al., 2018; Kralik et al., 2022; Leemann, Kleinlogel, 2023).

Цель настоящего обзора — показать особенности опсины, их сигнальных путей и светоуправляемых сигнальных ответов в гетерологических экспрессионных системах.

СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ

В ходе эволюции во всех царствах живых организмов появлялись светочувствительные молекулы, отличающиеся по строению, функциям, биохимическим свойствам: опсины, фитохромы, бактериофитохромы, криптохромы, ксантопсины, ультрафиолетовые фоторецепторы UVR8 растений (Колесов и др., 2021; Riggsbee, Deiters, 2010; Rost et al., 2017). Особый интерес для оптогенетического протезирования представляют опсины — фоточувствительные белки, содержащие хромофорную группу или ретиналь, который ковалентно связан с остатком лизина через протонированное Шиффово основание. При поглощении кванта света происходит изомеризация хромофора и переход в высокоэнергетическое состояние, при этом белок меняет свою конформацию и активируется. Опсины принято делить на опсины 1-го и 2-го типа.

ОПСИНЫ 1-ГО ТИПА

Опсины 1-го типа характерны для архей, прокариот, водорослей, грибов и представляют собой катионные помпы, транспортеры. К ним относятся канальные родопсины 1 и 2 (проводящие ионы Na^+ , H^+ , K^+ и Ca^{2+} через мембрану), бактериородопсины (протонная помпа) и гало-

родопсины (хлорная помпа). Их отличительная черта — быстрая активация/инактивация. При поглощении света *транс*-ретиналь переходит в 13-*цис*-ретиналь, в результате меняется транспорт ионов через мембрану (Rost et al., 2017), так регулируются фототаксис или бактериальный фотосинтез. После изомеризации у опсинов 1-го типа хромофор остается связанным с белком. Обратная изомеризация происходит самопроизвольно под действием тепловых колебаний молекулы. Свойства опсинов 1-го типа под действием света деполяризовать или гиперполяризовать плазматическую мембрану используют для регулирования физиологической активности клетки. При фотоактивации галородопсинов зеленым, а бактериородопсинов желтым светом возникает гиперполяризация мембранны клетки, при поглощении каналородопсинами синего света — деполяризация. Каналородопин 2 стал одним из первых деполяризующих оптогенетических инструментов, на основе которого создан ряд модифицированных белков (Lin et al., 2011). Выделены и другие каналородопсины, например Chronos из *Stigeoclonium helveticum*, управляемый синим и зеленым светом, с улучшенной кинетикой и с высокой светочувствительностью и Chrimson (из *Chlamydomonas noctigama*) со спектром поглощения, смешенным в красную сторону (600 нм). Попытки изменить некоторые характеристики белков привели к созданию химерных конструкций. Например, C1V1 создан на основе ChR1 и VChR1 (опсин из *Volvox carteri*), обладает максимумом поглощения на 570 нм и более высоким током через канал (Lin et al., 2009); химеры ChEF и ChIEF (ChR1/ChR2) также демонстрируют больший канальный ток и лучше экспрессируются в клетках млекопитающих (Lin et al., 2011); модифицированный каналородопсин ex3mV1Co характеризуется большими токами и максимумом поглощения 505 нм (Watanabe et al., 2021); химеры ChR1/VChR1 отличаются хорошей экспрессией в плазматической мемbrane и повышенным фототоком в клетках HEK (Yizhar et al., 2011).

Эктопическая экспрессия генов микробных канальных родопсинов (ChR2) и их химерных конструкций (CoChR-L112C и CoChR-H94E/L112C/K264T0) в выживших нейронах сетчатки (биполярные и ганглиозные клетки-мишени) слепых животных вызвала частичное восстановление зрения (Bi et al., 2006; Lagali et al., 2008; Doroudchi et al., 2011; Ganjawala et al., 2019). Химерный белок mVChR1, созданный на основе каналородопсина1 *Volvox* (VChR1) и *Chlamydomonas*, при эктопической экспрессии в гетерологических системах показал в ответ на фотостимуляцию (450 нм) большие ка-

нальные токи (626.3 ± 89.0 pA), по сравнению с VChR1 (18.4 ± 2.3 pA). При селективной экспрессии данного белка в ганглиозных клетках сетчатки крыс с пигментной дистрофией наблюдали улучшение зрения, животные реагировали на синие, зеленые, желтые и красные световые полосы, проецируемые на экран (Tomita et al., 2014). В качестве гиперполяризующих оптогенетических инструментов генной терапии можно назвать анионный канал с улучшенной световой чувствительностью и кинетикой (Долгих и др., 2015) или анион-переносящий канальный родопсин из криптофитовой одноклеточной водоросли *Guillardia theta*, последний характеризуется большим фототоком и большой гиперполяризацией клетки (Govorunova et al., 2015). Гиперполяризующие анионные и протонные помпы имеют особое значение для создания OFF-путей и регулирования рецептивных полей ганглиозных клеток в дегенеративной сетчатке.

В здоровой сетчатке человека существует три типа ганглиозных клеток (ON-типа, OFF-типа и ON-OFF-типа). Ганглиозная клетка ON-типа получает информацию от центральных фоторецепторов и биполярных клеток, при освещении центра рецептивного поля происходит ее деполяризация, а при действии светового раздражителя на периферии — гиперполяризация. Ганглиозные клетки OFF-типа возбуждаются при освещении периферии рецептивного поля и тормозятся при раздражении центра рецептивного поля, информация к ним приходит от фоторецепторов, расположенных на периферии. Рецептивные поля ганглиозных клеток этих двух типов слабо отвечают на равномерное освещение, но обеспечивают передачу информации о контрастных по свету стимулах, что обеспечивает восприятие границы объекта. Кроме того, у млекопитающих есть ганглиозные клетки ON-OFF-типа, они дают короткий ON-ответ на стационарный световой стимул и кратковременную OFF-реакцию на ослабление света. Одновременное применение катион- и анион-переносящих каналородопсинов дает перспективу создания ON-OFF- и OFF-ON-рецептивных полей ганглиозных клеток, что крайне важно для восстановления качественного зрительного восприятия. Недавно создан такой бицистронный продукт на основе катионного и анионного каналородопсинов (Петровская и др., 2019).

В целом опсины 1-го типа как оптогенетические инструменты характеризуются высокой эффективностью экспрессии в клетках млекопитающих, быстрой активацией/инактивацией, достаточным временными и пространственным разрешением, но использование каналородопсинов связано с применением высоконтен-

сивного коротковолнового света, а это создает риск фототоксичности. Кроме того, микробные опсины обладают низкой чувствительностью — один квант света открывает только один канал. В этой связи представляют интерес опсины 2-го типа, которые являются G-белок-связывающими рецепторами, обеспечивающими фоторецепцию и регуляцию циркадных ритмов, и характеризуются сигнальными каскадными механизмами, позволяющими усиливать исходный световой сигнал.

ОПСИНЫ 2-ГО ТИПА И ИХ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ

Опсины 2-го типа относятся к семейству рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCRs) класса A (родопсиноподобные рецепторы). Обладая консервативной структурой, семью трансмембранными альфа-спиральными сегментами с чередующимися вне- и внутриклеточными петлями, внутриклеточным C-концом, они отличаются в основном внеклеточным N-концевым доменом (Stenkamp et al., 2002; Rosenbaum et al., 2009; Mathes, 2016). В результате фотоактивации опсинов в клетке запускаются сигнальные пути, опосредованные различными семействами гетеротримерных G-белков. Избирательное связывание GPCRs с α -субъединицей G-белка (G_{α}) имеет решающее значение для точной передачи сигнала (Flock et al., 2017). На основании структурного сходства субъединицы G_{α} делят на 4 семейства: G_i , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$, каждое из которых реализует специфический сигнальный путь в клетке (Neves et al., 2002; Milligan, Kostenis, 2006; Kleinlogel, 2016). Существует специфичность взаимодействия опсина с определенным G-белком. Для зрительных опсинов позвоночных (родопсин и колбочковые опсины) это трансдуцин G_i , который относится к G_i -семейству. Активированный трансдуцин стимулирует фосфодиэстеразы, гидролизующие молекулы цГМФ. Все незрительные опсины, к ним относится меланопсин, имеют сродство к G_q (активирует фосфолипазу C) (Kleinlogel, 2016). Энцефалопсины, опсины костных тканей (TMT-опсины) и опсины моллюсков взаимодействуют с G_o , а нейропсины человека и перопсин активируют G_i , эти белки ингибируют аденилатциклазу (Kato et al., 2016; Nagata et al., 2018). Нейропсины книдарий связываются с G_s , что приводит к активации аденилатциклазы (Terakita, 2005; Guido et al., 2022). Опсинам 2-го типа свойственна каскадная сигнализация, опосредованная G-белками с участием циклических нуклеотидов.

Функционально можно выделить два пути сигнальной трансдукции:

с участием циклических нуклеотидов и фосфоинозитольный путь. Первый характерен для рецепторов цилиарного типа, например каскад фототрансдукции в фоторецепторе (через G_i) с участием фосфодиэстеразы и цГМФ — для энцефалопсина и TMT-опсина (через G_i , G_o), а также передача через G_o — в клетках морского гребешка или через G_s — у кнайдарий. Для незрительных опсинов позвоночных (меланопсин) и зрительных опсинов моллюсков и артропод характерен фосфоинозитольный путь, опосредованный G_q (Terakita, 2005; Koyanagi, Terakita, 2014). Все опсины ковалентно связаны с хромофором: зрительные, незрительные, а также G_i - и G_o -опсины — с 11-*цис*-ретиналом (альдегид витамина A), а перопсин и ретинальные фотоизомеризованные опсины — с *транс*-ретиналом. Наиболее хорошо изучен сигнальный каскад фототрансдукции в палочках, обеспечивающих сумеречное зрение, и колбочках, ответственных за фотопическое зрение у позвоночных.

Фототрансдукция в палочке позвоночных

При поглощении фотона хромофор родопсина изомеризуется из 11-*цис*- в *транс*-форму, что индуцирует перевод пигmenta в физиологически активное состояние — в форму метародопсина II (рис. 1а).

После изомеризации хромофор отделяется от белковой части. Конформационные перестройки необходимы для передачи сигнала от родопсина к трансдуцину. *Транс*-ретиналь опсина инициирует смещение внутримембранных альфа-спиральных сегментов и разрушение цитоплазматического ионного замка Шиффова основания, что приводит к образованию щели, в которую входит C-конец α -субъединицы трансдуцина, таким образом активируя G-белок (Островский, 2020; Hofmann, Lamb, 2022). В результате такого взаимодействия происходит высвобождение связанного ГДФ в обмен на ГТФ, и α -субъединица трансдуцина диссоциирует от комплекса β - γ -субъединиц. Комплекс α -субъединицы трансдуцина (G_{ta}) и ГТФ активирует фосфодиэстеразу (ФДЭ) и стимулирует ее активность. ФДЭ гидролизует цГМФ, образуя ГМФ. Внутриклеточная концентрация цГМФ снижается, что в конечном итоге приводит к закрытию неселективных катионных цГМФ-зависимых каналов в наружном сегменте фоторецепторов, возникает гиперполяризация клеточной мембраны палочки, что и является началом фотоответа (Pugh, Lamb, 2000; Terakita, 2005; Arshavsky, Burns, 2014) (рис. 1а). Одна фотоактивная молекула пигmenta активирует

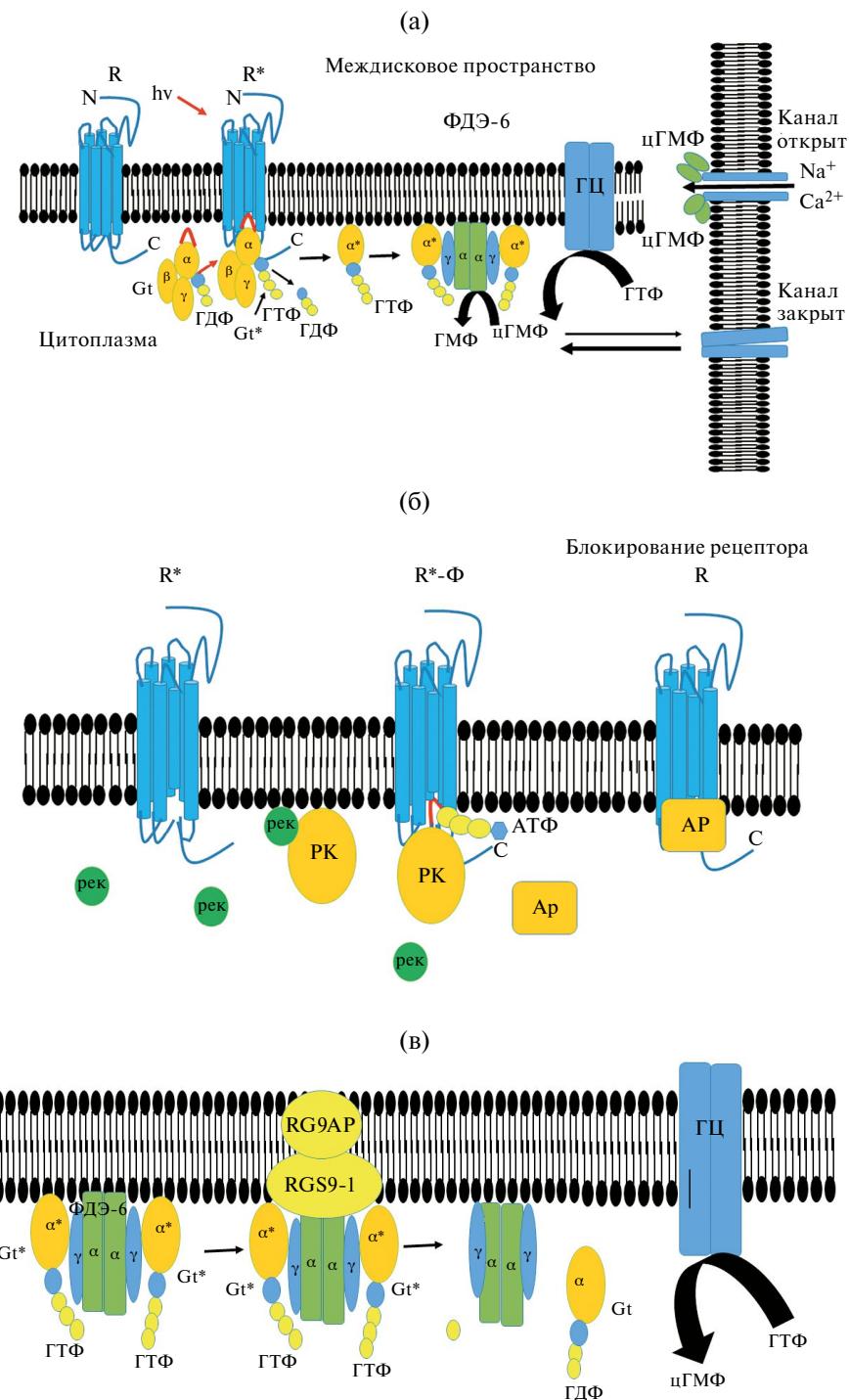


Рис. 1. Схема каскада фототрансдукции в палочке.

(а) активация рецептора на свету. В результате поглощения фотона возникает активация рецептора и передача сигнала от активированного рецептора (родопсина) к трансдуцину, в результате каскада реакций происходит за-крытие неселективных катионных цГМФ-зависимых каналов. (б) деактивация рецептора. Возвращение родопсина в темновое состояние в результате последовательных взаимодействий: рековерин—родопсинкиназа, родопсинкиназа—активированный рецептор, арестин—фосфорилированный метародопсин, блокирование рецептора. (в) выключение фосфодиэстеразы. Белок RGS9-1 связывается с комплексом Gt*-ФДЭ-6, в результате происходит диссоциация комплекса. R — родопсин, R* — активированный родопсин, Gt — трансдуцин, Gt* — активированный трансдуцин, GDP — гуанозиндифосфат, GTP — гуанозинтрифосфат, ФДЭ-6 — фосфодиэстераза-6, цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат, ГМФ — гуанозинмонофосфат, ГЦ — гуанилатциклаза, рек — рековерин, РК — родопсинкиназа, Ap — арестин, R*-Ф — фосфорилированный метародопсин.

несколько G-белков, это и представляет собой первую стадию амплификации (усиление сигнала) в каскаде фототрансдукции, что приводит к открытию нескольких тысяч каналов. После генерации ответа фоторецептор возвращается в исходное темновое состояние, в котором цГМФ-зависимые каналы открыты. Регуляция происходит по принципу обратной связи. Закрытие цГМФ-зависимых каналов прекращает вход ионов натрия и кальция в клетку, при этом ток кальция из цитоплазмы продолжается, что приводит к снижению концентрации кальция в цитоплазме, в ответ активируются кальций-зависимые гуанилаткиназы, увеличивается концентрация цГМФ, каналы открываются. Снижение внутриклеточного кальция влияет и на другие кальций-связывающие белки-посредники (рековерин, GCAP, кальмодулин). В частности, рековерин меняет чувствительность родопсинкиназы к кальцию, происходит активное фосфорилирование метародопсина II, это подготавливает активированный receptor (R^*) к связыванию с арестином, последний блокирует каталитические центры рецептора (Arshavsky, Burns, 2014; Lamb, 2022) (рис. 1б). Безусловно, снижение уровня кальция играет значительную роль в возвращении фоторецептора в темновое состояние, но существуют и другие механизмы регуляции. Например, выключение активных форм фосфодиэстераз путем ускорения ГТФ-азной активности. Ключевым фактором будет белок RGS9-1, который связывается с активированным комплексом ($G_t^*—\text{ФДЭ-6}$), в результате происходит диссоциация G_{ta} —ГДФ и ФДЭ-6 (рис. 1в). Высокая чувствительность к свету делает родопсин хорошим кандидатом для оптопротезирования, тем не менее, для повторной активации родопсина необходима регенерация и наличие специализированных для фоторецепторных клеток ферментных систем и транспортеров, что нужно учитывать в искусственных гетерологических системах.

Вторым нейроном, получающим сигнал от фоторецепторов, является bipolarная клетка, поэтому при гибели фоторецепторов слой bipolarных клеток может быть использован для экспрессии генов светочувствительных белков, таким образом превращая их в псевдорецепторы. В первом синапсе зрительной системы от фоторецептора к bipolarной клетке происходит разделение на ON- и OFF-пути, которые кодируют увеличение и уменьшение интенсивности света соответственно. Такое разделение поддерживается и в высших зрительных центрах. Наиболее изучен сигнальный каскад в ON-bipolarных клетках. Это сложный механизм, опосредованный G-белком, позволя-

ющим регулировать чувствительность в темноте и в то же время передавать сигналы при ярком освещении с высоким времененным разрешением. В темноте фоторецепторами в синаптическую щель непрерывно высвобождается глутамат, на свету выход глутамата значительно снижается. Глутамат связывается с метаботропным рецептором (mGluR6) ON-bipолярных клеток, что приводит к активации сигнального пути через G_o . Активация α -субъединицы G-белка происходит путем связывания с ГТФ, комплекс G_{ao} —ГТФ взаимодействует с C-концом TRPM1, а комплекс субъединиц $G_\beta G_\gamma$ с N-концом TRPM1, что приводит к конформационным изменениям, в результате которых канал TRPM1 закрывается. При воздействии света возникает гиперполяризация фоторецептора, количество глутамата в синаптической щели уменьшается, происходит деактивация mGluR6, большая часть белка G_o находится в неактивной форме, где G_{ao} —ГДФ связан с $G_\beta G_\gamma$ и канал TRPM1 открывается (рис. 2) (Xu et al., 2016).

Метаботропные глутаматные рецепторы (mGluRs) широко распространены в сетчатке и играют значительную роль в передаче сигнала от фоторецепторов. Различные типы mGluRs (от mGluR1 до mGluR8) обнаружены не только в bipolarных клетках, но и горизонтальных, амакриновых, ганглиозных и даже фоторецепторных клетках различных представителей царства животных (Dhingra, Vardi, 2012). Все mGluRs модулируют ионные токи опосредованно через G-белки, в большинстве через G_q . Таким образом, внутриклеточный домен метаботропного глутаматного рецептора способен селективно связываться с G-белками, активируя каскадный механизм передачи сигнала, что используют при создании химерных конструкций.

Еще один кандидат для оптопротезирования — незрительный пигмент меланопсин позвоночных, который синтезируется в субпопуляции внутренних ганглиозных клеток сетчатки. Филогенетически меланопсин близок к рабдомерным опсинам беспозвоночных (R-опсинам), после выцветания или отбеливания способен к восстановлению. В результате фотостимуляции синим светом меланопсин переходит в *транс*-форму — метамеланопсин, но в отличие от метародопсина сохраняет свой хромофор и регенерирует в 11-*цис*-форму. Благодаря способности конвертировать хромофор между 11-*цис*- и *транс*-формой и возвращаться в темновое состояние после поглощения кванта света меланопсин называют бистабильным пигментом. В клетках млекопитающих меланопсин регулирует различные процессы (синхронизация циркадных ритмов

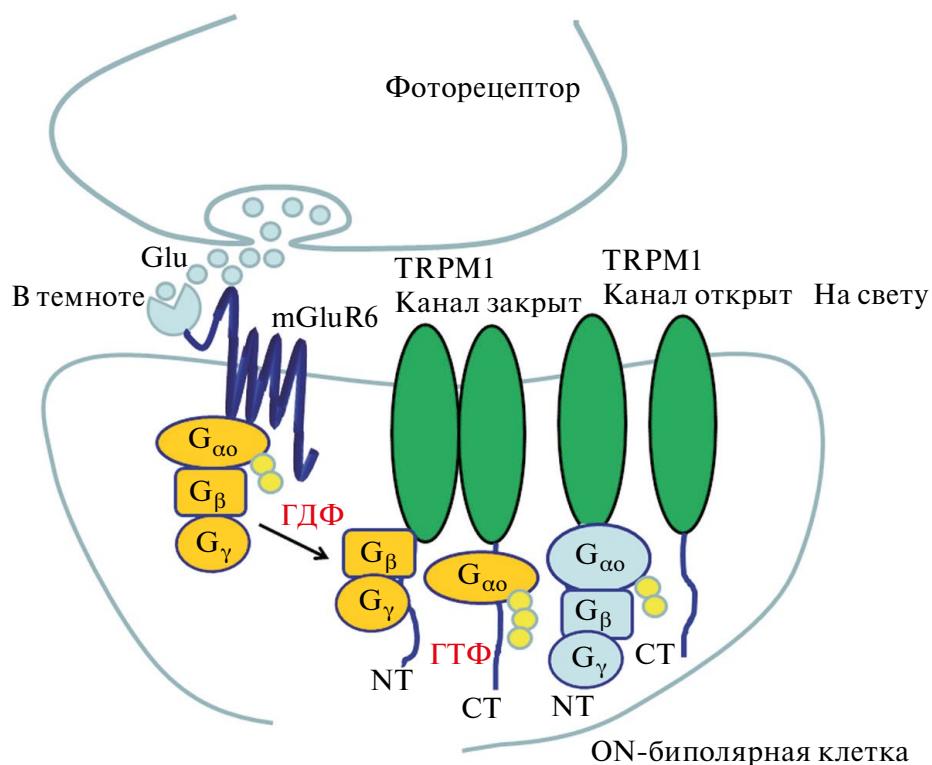


Рис. 2. Схема активации TRPM1-канала в ON-биполярных клетках.

Обозначения: Glu — глутамат, mGluR6 — метаботропный рецептор mGluR6 ON-биполярных клеток, TRPM1 — канал переходного рецепторного потенциала подсемейства M, ГДФ — гуанозиндифосфат, ГТФ — гуанозинтрифосфат, NT — N-конец, CT — C-конец.

со светом: регуляция размера зрачка, модуляция сна, подавление мелатонина шишковидной железой), активируется синим, деактивируется желтым светом. Меланопсин и другие рабдомерные опсины арthropод и моллюсков активируют в клетках G_{α_{q/11}}-сигнализацию (Terakita, 2005; Bailes, Lucas, 2013). В гетерологических системах меланопсин человека активирует также и G_{i/o} пути, а куриный меланопсин и G_s-активность. Меланопсин способен обеспечить клетке достаточно высокую чувствительность к свету (в 3 раза больше, чем опсины 1-го типа), для физиологического ответа клеткам требуется 10¹² фотонов/(см²×с) (Baker, Flannery, 2018).

Возможный кандидат для оптопротезирования — колбочковый опсин, который также обеспечивает достаточную высокую чувствительность клетке. Продемонстрировано (Berry et al., 2019), что опсин зеленых колбочек человека, экспрессированный в ганглиозных клетках сетчатки и в модельных клеточных системах (HEK293) имеет значительно более быстрый ответ на световую стимуляцию, чем родопсин (почти в 10 раз быстрее).

Один из факторов, влияющих на ответ клетки на свет, — специфичность связывания с G-белком. Показано, что опсины способны взаимодействовать более чем с одним G-белком (Bailes, Lucas, 2013; Masuho et al., 2015; Ballister et al., 2018). Например, родопсин и опсин длинноволновых колбочек связываются с G_t и с G_o, которые принадлежат семейству G_{i/o}. Человеческий меланопсин способен взаимодействовать не только с G_q, но и с G_{i/o} (Bailes, Lucas, 2013). Исследована (Ballister et al., 2018) активность натуральных и химерных опсинов и способность связывания их с различными G-белками в модельных клетках. Наибольшая неселективная активность обнаружена у родопсина по отношению к G_{i/o/t}, в частности бычий родопсин способен связываться с G_i и в меньшей степени с G_o (Leemann, Kleinlogel, 2023). Как показало тестирование в гетерологических системах, опсин длинноволновых колбочек и химерный опсин (AmphiOp1), созданный на основе родопсина человека и ланцетника *Branchiostoma belcheri*, характеризуется высокой селективностью к G_i и G_o. Опсины некоторых беспозвоночных (*Jellyfish*) показывают сродство

к G_s , сигнальный путь приводит к увеличению цАМФ в клетке.

Понимание специфичности клеточных сигнальных путей, опосредованных G-белками, — важнейший шаг для разработки новых оптогенетических инструментов на основе опсинов 2-го типа.

ХИМЕРНЫЕ СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ GPCRs

Химеры на основе каналородопсинов (C1V1, ChEF и ChIEF) характеризуются низкой чувствительностью (один квант света открывает один ионный канал). Альтернативным решением стало создание химерных конструкций на основе GPCRs (opto-GPCRs). Такие белки состоят из светочувствительного домена и измененного C-конца, активирующего G-белок. Первые химеры (opto- β 2AR) были созданы на основе родопсина и β 2-адренорецептора (β 2AR), при этом были сохранены внеклеточные домены родопсина, а внутриклеточные домены были заменены на β 2AR (Kim et al., 2005). Позднее появились химерные белки (opto- α 1AR), созданные на основе α 1-адренорецептора (α 1AR) (Airan et al., 2009). Химерный опсин opto- α 1AR, трансдуцированный в гетерологическую систему, при световой стимуляции активировал G_q , что привело к повышению Ca^{2+} , а в результате фотостимуляции химерного белка opto- β 2AR через G_q -сигнализацию увеличилась концентрация цАМФ в клетке. Модифицированные белки на основе родопсина изменили свою специфичность связывания с G_t на G_q и G_s , полученные ответы на световую стимуляцию сопоставимы с ответами адренорецепторов дикого типа (Airan et al., 2009).

Еще один светочувствительный химерный белок создан на основе родопсина с заменой C-конца на СТ-домен метаботропного серотонинового рецептора (5-HT1A). Такая химера (Rh-CT5-HT1A) активировала $G_{i/o}$ -сигнализацию (Oh et al., 2010).

Обсуждаемые выше химерные конструкции были созданы на основе GPCRs класса A. Однако идея придания светочувствительности ON-биполярным клеткам сетчатки, сигнальный каскад в которых запускается метаботропными глутаматными рецепторами, привела к созданию химеры opto-mGluR6, сочетающей в себе внутриклеточный домен от метаботропного глутаматного рецептора mGluR6 (GPCR класс C) и внеклеточный домен от меланопсина (GPCR класс A) (Wyk et al., 2015; Kleinlogel, 2016). Выбор меланопсина в качестве свето-

чувствительного белка обусловлен его особенностями — устойчивостью к обесцвечиванию и связанностью хромофора с белковой частью опсина после фотоизомеризации. Внутриклеточные домены меланопсина, а именно: вторая и третья внутриклеточные петли (IL-2 и IL-3) заменены на соответствующие петли mGluR6. Таким образом, меланопсиновая часть рецептора выполняет светочувствительную функцию, а внутриклеточный домен mGluR6 (IL-2, IL-3 и C-конец белковой молекулы) активирует сигнальные пути клетки (Wyk et al., 2015; Kleinlogel, 2016; Leemann, Kleinlogel, 2023). В химере β Rhod- β 2AR последовательно заменили IL-2, IL-3 и C-конец родопсина гомологичными доменами β 2AR. Замена IL-3 привела к изменению селективности G-белка по пути G_q -активности (Leemann, Kleinlogel, 2023). А в химере Mela(trunc)-mGluR6(IL-3⁺CT) стимулировали G_i -сигнализацию. Показано также, что mGluR6 может не только активировать G_o и G_i , но и G_t (Tian, Kammermeier, 2006; Leemann, Kleinlogel, 2023). Продемонстрировано (Ballister et al., 2018), что в тестовых клеточных системах родопсин человека является $G_{i/o/t}$ -связанным опсином. Опсин длинноволновых колбочек оказался активен в отношении G_i и G_o . Это и объясняет эффективность применения родопсина и опсина средневолновых колбочек сетчатки в ON-биполярных клетках для восстановления зрения (Gaub et al., 2014; Cehajic-Kapetanovic et al., 2015).

ТЕСТИРОВАНИЕ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИНСТРУМЕНТОВ В ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПРЕССИОННЫХ СИСТЕМАХ

В настоящее время достаточно широко используют гетерологические экспрессионные системы для воссоздания различных сигнальных путей в клетке. Использование управляемой стимуляции внутриклеточных молекулярных механизмов в модельной клетке позволяет протестировать активность белков, каналов, рецепторов еще до внедрения генетических конструктов в организм животного. Для подобных исследований часто используют различные клеточные линии, например HEK293 (human embryonic kidney 293), COS (фибробластоподобные клетки, полученные из ткани почек обезьяны), СНО (эпителиальные клетки, производные клеток яичника китайского хомячка), ВНК (линия клеток, полученная из почек детенышем хомячка). Клеточная линия HEK293 получена путем трансформации эмбриональных клеток почек человека с помощью редуцированного адено-вируса человека 5-го типа (Graham et al., 1977),

позднее появились ее подтипы и производные HEK293-T и HEK293-F. Преимущества таких клеточных линий — простота культивирования, высокая трансфективность, использование легкодоступных реагентов трансфекции — фосфата кальция или полиэтиленимина (PEI), быстрая скорость роста и способность рости в среде без сыворотки. Клетки одной линии однородны по составу, размеру, форме, им свойственна высокая эффективность экспрессии и низкие эндогенные токи (Thomas, Smart, 2005). Для тестирования в качестве гетерологической экспрессионной системы часто выбирают клетки линии HEK293-T (Карпушев, Чилигина 2023; Masseck et al., 2014; Wyk et al., 2015; Spoida, 2016; Ballister et al., 2018; Kralik et al., 2022). В такую модельную систему путем трансфекции (трансдукции) встраивается генетический конструкт (вектор), содержащий гены светочувствительного белка, а также, если это необходимо, гены ионных каналов, обеспечивающих реализацию сигнальных путей внутри клетки. Активация светочувствительного белка будет отражаться в изменении канальных ионных токов, регистрируемых электрофизиологическими методиками, в частности методом patch-clamp. В случае опсинов 1-го типа исследуются катионные или анионные токи, проходящие непосредственно через сам светочувствительный белок-канал (Boyden et al., 2005; Tomita et al., 2014; Govorunova et al., 2015). При исследовании активности опсинов 2-го типа проводят совместную трансфекцию векторов, содержащих гены светочувствительных белков и ионных каналов, управляемых G-белками, или используют клеточные линии HEK293, стабильно экспрессирующие ионные каналы, например G-белок-связанные калиевые каналы внутреннего выпрямления GIRKs (G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels) или Kir3. При тестировании опсинов 2-го типа в гетерологических системах возникает ряд вопросов. Во-первых, обеспечена ли клетка необходимым количеством эндогенных G-белков для реализации сигнальных путей? Показано, что некоторые G-белки, например G_i , действительно присутствуют в клетках HEK293-T, однако белок G_o не был обнаружен (Law et al., 1993; Thomas, Smart, 2005). Во-вторых, как добиться регенерации опсинов после стимуляции светом? Это особенно важно при использовании режима многократной повторной световой стимуляции. Выбор GIRKs при тестировании активности опсинов определяется их функциональной регуляцией. Считается, что внутреннее выпрямление, наблюдаемое во всех GIRKs, возникает в результате внутренней блокады канала внутриклеточными катионами,

которые блокируют внешний калиевый ток за счет прикрепления к трансмембранным и цитоплазматическим доменам канала, образуя внутренний шлюз. Каналы семейства GIRKs представляют собой гомомерные или гетеромерные комплексы субъединиц (GIRK1 ($Kir3.1/Kcnj3$), GIRK2 ($Kir3.2/Kcnj6$), GIRK3 ($Kir3.3/Kcnj9$) и GIRK4 ($Kir3.4/Kcnj5$), каждый имеет два трансмембранных домена и внутриклеточные N- и C-концевые домены. GIRKs сопряжены с G-белками, при этом $G_{i/o}$ активируют, а G_q ингибируют каналы (Lei et al., 2000; Bünenmann et al., 2001). В результате активации GPCR происходит диссоциация тримерного G-белка на содержащую ГТФ α -субъединицу и димер из $\beta\gamma$ -субъединиц ($G_{\beta\gamma}$), происходит активация калиевого канала внутреннего выпрямления, что приводит к открытию канала и гиперполяризации клетки. Таким образом, фотоактивация опсинов 2-го типа как рецепторов, сопряженных с G-белками, встроенных в результате экзогенной экспрессии в модельную клетку, будет изменять ток калиевых каналов внутреннего выпрямления. Исследование активности GIRKs в функциональной тестовой клеточной системе позволит смоделировать сигнальные пути передачи светового сигнала внутри ON-биполяров. Работа GIRKs зависит от концентрации $\beta\gamma$ -димеров G-белков (Hommers et al., 2003; Skylar, Bruchas, 2017). Известно, что TRPM1-канал ON-биполярных клеток закрывается комплексом $G_{\beta\gamma}$ при участии G_{ao} ГДФ. Однако эффекты взаимодействия субъединиц G-белка с GIRK и TRPM1 противоположны: комплекс $G_{\beta\gamma}$ открывает GIRK, но закрывает TRPM1, $G_{ai/o}$ ГДФ снижает базовый ток GIRK, G_{ao} ГДФ, по-видимому, увеличивает ток TRPM1. Тем не менее тестирование различных опсинов в гетерологических клеточных системах, содержащих GIRKs, будет отражать и особенности взаимодействия субъединиц G-белков в TRPM1-каналах. В модельных клетках исследуют активность натуральных светочувствительных белков: родопсина позвоночных vRh (Masseck et al., 2014), опсина коротковолновых колбочек vSWO (Masseck et al., 2014), опсина средневолновых колбочек OPN1MW (Berry et al., 2019; Kralik et al., 2022), опсина длинноволновых колбочек vLWO, меланопсина мыши mOpn4L, меланопсина человека hOpn4L (Spoida, 2016; Kralik et al., 2022), опсина медузы JellyOp (Wyk, Kleinlogel, 2023), сравнивая белки дикого типа с различными химерными конструкциями: opto-mGluR6, Mela(CT+IL-3mGluR6), Mela(CTmGluR6), OPN1MW(CTmGluR6) (Wyk et al., 2015; Kralik et al., 2022). Активность опсинов при световой стимуляции оценивают на основе

Таблица 1. Характеристики сигнального пути, реализуемого в ответ на световую стимуляцию натуральных и химерных опсинов в гетерологической экспрессионной системе (HEK293)

Светочувствительный белок	Характеристика световой стимуляции	Путь G-белка	τ_{ON} , с	τ_{OFF} , с	Источник
vRh	475	$G_{i/o}$	3.4	33	Masseck et al., 2014
vSWO	450	$G_{i/o}$	1.2	12	Masseck et al., 2014
vLWO	590	$G_{i/o}$	1.1	11	Masseck et al., 2014
Rh	485	$G_{i/o}$	9–10	43–53	Oh et al., 2010
5-HT _{1A}	485	$G_{i/o}$	1–2	35–48	Oh et al., 2010
Rh-CT _{5-HT1A}	485	$G_{i/o}$	9–10	48–55	Oh et al., 2010
JellyOp-Gas	490	G_s	0.03 ± 0.001	15.3 ± 0.1	Wyk, Kleinlogel, 2023
hOpn4L	479 — активация 560 — деактивация	$G_q, G_{i/o}$	2.0–2.4	10–12	Spoida, 2016
mOpn4L	479 — активация 560 — деактивация	$G_q, G_{i/o}$	1.4–1.7	9–10	Spoida, 2016
Melanopsin WT	470	G_q, G_i	1.6 ± 0.3	17.6 ± 4.8	Kralik et al., 2022
OPN1MW	470	G_i	0.9 ± 1.2	8.1 ± 4.3	Kralik et al., 2022
Mela(CT+IL-3mGluR6)	470	G_o	1.6 ± 0.3	12.8 ± 1.7	Kralik et al., 2022
Mela(CTmGluR6)	470	G_o	0.7 ± 0.2	12.1 ± 2.3	Kralik et al., 2022
OPN1MW(CTmGluR6)	470	G_o	0.8 ± 0.2	9.8 ± 2.2	Kralik et al., 2022

Примечание: τ_{ON} (с) — постоянная времени активации калиевого канала внутреннего выпрямления (GIRK) на включение светового стимула, τ_{OFF} (с) — постоянная времени деактивации GIRK на выключение светового стимула; vSWO — коротковолновой опсин колбочек мыши, vLWO — длинноволновой опсин человека, vRh — родопсин позвоночных, Rh — родопсин, 5-HT_{1A} — подтип серотонинового рецептора, Rh-CT_{5-HT1A} — химерный белок с заменой С-терминального домена на домен 5-HT_{1A}, JellyOp-Gas — химерный опсин кубомедузы с усиленной селективностью к G_s , hOpn4L — меланопсин человека, mOpn4L — меланопсин мыши, Melanopsin WT — меланопсин дикого типа, OPN1MW — средневолновой опсин колбочек, Mela(CT+IL-3mGluR6) — химерный белок на основе меланопсина и метаботропного глутаматного рецептора mGluR6, в котором третья внутриклеточная петля IL-3 была заменена на такую же mGluR6, Mela(CTmGluR6) — химерный белок на основе меланопсина и метаботропного глутаматного рецептора mGluR6, OPN1MW(CTmGluR6) — химерный белок, на основе средневолнового опсина и метаботропного глутаматного рецептора mGluR6.

амплитуды канальных токов и кинетики GIRKs, используя постоянную времени на включение (τ_{ON}) и выключение (τ_{OFF}) светового стимула (табл. 1).

Параметры световой стимуляции, а именно: длительность, интенсивность, частота, а также индивидуальный диапазон спектров поглощения опсинов будут влиять на токи GIRK в гетерологической системе (Oh et al., 2010; Masseck et al., 2014; Wyk et al., 2015; Spoida, 2016; Kralik et al., 2022; Wyk, Kleinlogel, 2023). Показано (Masseck et al., 2014), что длительность световой стимуляции опсинов влияет на амплитуду тока GIRK. Авторы сравнили между собой различные опсины: родопсин позвоночных (vRh), коротковолновые опсины колбочек мыши (vSWO) и длинноволновые опсины колбочек человека (vLWO). Для достижения 50% канального тока

GIRK достаточно 50 мс световой стимуляции в случае vRh, 200 мс — для vLWO, а 500 мс — для vSWO. Многократная ритмическая фотостимуляция vLWO и vSWO в течение 1 с не повлияла на амплитуду канального тока GIRK, но при повторной световой стимуляции vRh амплитуда ответа снизилась до 20% (Masseck et al., 2014). Интенсивность светового потока также отражается на величине канальных токов, при ее снижении до 0.002 мВт/мм² амплитуда ответа уменьшилась до 70% для vRh, до 30% — для vLWO и до 20% — для vSWO от исходного уровня. Максимальный ток GIRK был получен при 2 мВт/мм². Для каждого опсина (vRh, vSWO, vLWO) подобраны соответствующие индивидуальным пикам максимальной спектральной чувствительности параметры фотостимуляции (475, 360, 550–560 нм соответственно). Напри-

мер, при стимуляции vSWO в диапазоне от 380 до 400 нм наблюдали наибольшую активацию канальных токов GIRK, а уже при 510 нм токи были не более 10% от максимальных. В тестовых системах родопсин проявил себя как наиболее чувствительный к интенсивности светового потока, но вместе с тем и наиболее уязвимый к выцветанию пигмент, по кинетике уступающий колбочковым опсинам. Интересно, что ответы на световую стимуляцию меланопсина отличались в зависимости от воздействующего стимула. При фотостимуляции мышного и человеческого меланопсина (*mOpn4L* и *hOpn4L*) синим светом (470 нм 1.8 мВ/мм²) на 10 с обнаружены значительные токи GIRK. В то же время в ответ на включение желтого света (560 нм 1.2 мВ/мм²) на 50 с регистрировали деактивацию канальных токов, которая для *hOpn4L* начиналась с 560 нм и продолжалась до 620 нм для *mOpn4L*. Максимум поглощения меланопсина находится в диапазоне от 460 до 490 нм. Возможно, светоиндуцированное фосфорилирование на С-конце вызвало деактивацию меланопсина (Blasic et al., 2012). Повторная ритмическая стимуляция в режиме 20 вспышек с частотой 1/30 с и со спектральным максимумом 470 и 560 нм соответственно для каждого меланопсина привела к снижению амплитуды канальных токов на 50%. Минимальная длительность световой стимуляции для получения 90% активации канала составила 100 мс в случае *mOpn4L* и более 500 мс для *hOpn4L*, при этом мышный меланопсин давал более быстрый ответ на включение и на выключение стимула (Spoida, 2016). Для меланопсина характерен определенный диапазон наибольшей чувствительности от 410 до 470 нм, в котором для получения максимального тока GIRK достаточно 10 с стимуляции (0.03 мВт/мм², 470 нм). Основной путь, реализуемый в ответ на световую сигнализацию опсинов, — это внутриклеточная сигнализация, опосредованная G_{i/o}-белками, вызывающая токи GIRKs (Masseck et al., 2014). Однако на примере человеческого меланопсина (*hOpn4L*) доказана (Spoida, 2016) возможность активации G_q-внутриклеточного пути в гетерологической системе. В тестовых системах меланопсин обладает достаточно высокой чувствительностью, быстрой кинетикой и, по сравнению с родопсином, является устойчивым к выцветанию (табл. 1). При разработке химерных конструкций ставили задачу ускорить кинетику активации при сохранении высокой светочувствительности химерного белка. В одной из последних работ (Wyk, Kleinlogel, 2023) описан новый оптогенетический инструмент, исследованный в тестовых клеточных системах, — это химерный опсин кубомедузы с усиленной

селективностью к G_s — JellyOp-Gas. Химерный JellyOp-Gas продемонстрировал высокую скорость внутриклеточной сигнализации, работая в 30 раз быстрее, чем любой опсин сопряженный с G_{i/o}. Полученные канальные токи GIRK значительно превышали токи, вызываемые JellyOp дикого типа. Такая активность химерного белка обусловлена, по мнению авторов, конститутивным связыванием JellyOp-Gas с G_s, что обеспечило большую диссоциацию комплекса G_{βγ}, что и способствовало увеличению канальных токов GIRK (Wyk, Kleinlogel, 2023).

В последнее время при разработке химерных рецепторов на основе opto-GPCRs все большее внимание уделяют изменению внутриклеточной сигнализации, опосредованной G-белками (G_{i/o/t} или G_q) (Masseck et al., 2014; Wyk et al., 2015; Kleinlogel, 2016; Spoida, 2016; Kralik et al., 2022; Wyk, Kleinlogel, 2023). Особенный интерес для генной терапии вызывают химерные конструкции светочувствительных белков, разработанные на основе метаботропного глутаматного рецептора opto-mGluR6, с заменой внутриклеточной петли (IL-3) от mGluR6 и светочувствительного домена от меланопсина или средневолнового опсина колбочек (OPN1MW). Модификации внутриклеточных петель и проксимального С-конца химерных белков позволяют увеличить кинетику и амплитуду светоуправляемых ответов за счет изменения тропизма G-белков. Химера opto-mGluR6, где светочувствительным доменом является меланопсин, меняет тропизм G_{α_q} на G_{α_o}, свойственный ON-биполярным клеткам. В тестовых системах показано, что канальные токи, вызванные фотостимуляцией химерных белков Mela(CT+IL-3mGluR6) (44.0 ± 3.7 pA/pF), Mela(CTmGluR6) (98.0 ± 9.7 pA/pF), OPN1MW(CTmGluR6) (78.0 ± 9.6 pA/pF), значительно выше, по сравнению с токами, инициируемыми меланопсином дикого типа (22 ± 5.7 pA/pF) и OPN1MW (46.1 ± 7.8 pA/pF) (Kralik et al., 2022). Химеры также характеризовались улучшенной кинетикой и на включение, и на выключение световой стимуляции (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимым этапом в исследовании светочувствительных белков как оптогенетических инструментов для терапевтического восстановления зрительных функций при тяжелых формах наследственных дегенеративных заболеваний является тестирование натуральных и химерных белков в экспрессионных гетерологических системах. Сопоставление параметров световой стимуляции (спектральный диапазон, интен-

сивность, длительность, частота) с характеристиками ответа (амплитуда канальных токов, кинетика активации и деактивации каналов) позволяет комплексно оценить активность опсинов в тестовых системах. Опсины 2-го типа как рецепторы, сопряженные с G-белками, способные активировать внутриклеточные каскадные сигнальные механизмы, обеспечивают большую чувствительность клеток к свету и становятся наиболее перспективными оптогенетическими инструментами для генной терапии. Реконструкция сигнальных путей в гетерологических экспрессионных системах нацелена на моделирование механизмов передачи светового сигнала в специализированных клетках сетчатки. Для воспроизведения каскада ON-биполярных клеток в экспрессионных гетерологических системах применяют химерные конструкции на основе метаботропного глутаматного рецептора (opto-mGluR6). Модификация внутриклеточных доменов и C-конца химерных белков дает возможность влиять на тропизм G-белков регулировкой светоуправляемого ответа. Активация сигнального пути посредством световой стимуляции белка и возникающий ответ каналов внутреннего выпрямления GIRKs позволяют проводить отбор оптогенетических инструментов в клетке, которая становится функциональной тестовой системой. Химерный светочувствительный белок должен сочетать в себе высокую чувствительность, улучшенные кинетические свойства, обеспечивая ON- и OFF-пути передачи светового сигнала, приближенные к таковым в здоровой сетчатке. В дальнейшем использование тестовых систем позволит повысить эффективность оптогенетического протезирования сетчатки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю свою благодарность и признательность Михаилу Леонидовичу Фирсову за ценные замечания и редактирование текста рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2022-296, на создание и развитие научного центра мирового уровня Павловский центр “Интегративная физиология — медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов изучения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Как автор данной работы я заявляю, что у меня нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dolgov D.A., Malyshov A.YU., Salojzin S.B.* Анионный канальный родопсин, экспрессированный в культуре нейронов и *in vivo* в мозге мыши: светоиндуцированное подавление генерации потенциалов действия // ДАН. 2015. Т. 465 (6). С. 737–740.
- Karpushov A.B., Chiligina Yu.A.* Электрофизиологическое тестирование активации G-белок-зависимого сигнального каскада светочувствительными химерными рецепторами // Мат. III Всерос. науч. конф. с междунар. уч. “Оптогенетика+ 2023” (СПб., 6–8 апреля 2023 г.). СПб.: ИЭФБ, 2023. С. 48–49.
- Kirpichnikov M.P., Ostromyskii M.A.* Оптогенетика и зрение // Вестн. РАН. 2019. Т. 89 (2). С. 125–30.
- Kolesov D.B., Sokolinskaya E.L., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M.* Молекулярные инструменты направленного контроля электрической активности нервных клеток. Ч. I // Acta Naturae. 2021. Т. 13 (3). С. 52–64.
- Ostromyskii M.A.* Молекулярная физиология зрительного пигмента родопсина: актуальные направления // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2020. Т. 106 (4). С. 401–420.
- Petrovskaya L.E., Rozhin M.V., Smirnova G.R. и др.* Бицистронная генетическая конструкция для оптогенетического протезирования рецептивного поля ганглиозной клетки дегенеративной сетчатки // ДАН. 2019. Т. 486. С. 258–261.
- Airan R.D., Thompson K.R., Feno L.E. et al.* Temporally precise *in vivo* control of intracellular signaling // Lett. Nat. 2009. V. 458. P. 1025–1029.
- Arshavsky V., Burns M.* Current understanding of signal amplification in phototransduction // Cell. Logist. 2014. V. 4 (2). P. e28680.
<https://doi.org/10.4161/cl.29390>
- Bailes H., Lucas R.* Human melanopsin forms a pigment maximally sensitive to blue light ($\lambda_{max} \approx 479$ nm) supporting activation of Gq/11 and Gi/o signalling cascades // Proc. Biol. Sci. 2013. V. 280. P. 20122987.
<http://doi.org/10.1098/rspb.2012.2987>
- Baker C., Flannery J.* Innovative optogenetic strategies for vision restoration // Front. Cell. Neurosci. 2018. V. 12. P. 316.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00316>
- Ballister E.R., Rodgers J., Martial F., Lucas R.J.* A live cell assay of GPCR coupling allows identification of optogenetic tools for controlling Go and Gi signaling // BMC Biol. 2018. V. 16. P. 10.
<https://doi.org/10.1186/s12915-017-0475-2>
- Berry M.H., Holt A., Salari A. et al.* Restoration of high-sensitivity and adapting vision with a cone opsin // Nat. Com. 2019. V. 10. P. 1221.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09124-x>

- Bi A., Cui J., Ma Yu-P. et al.* Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration // *Neuron*. 2006. V. 50. P. 23–33.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.02.026>
- Bird A.C.* Clinical investigation of retinitis pigmentosa // *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* 1988. V. 16. P. 189–198.
- Blasic J.R.Jr., Brown L.R., Robinson Ph.R.* Light-dependent phosphorylation of the carboxy tail of mouse melanopsin // *Cell. Mol. Life Sci.* 2012. V. 69 (9). P. 1551–1562.
<https://doi.org/10.1007/s00018-011-0891-3>
- Boyden E., Zhang F., Bamberg E. et al.* Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. P. 1263–1268.
<http://dx.doi.org/10.1038/nn1525>
- Bünemann M., Bucheler M.M., Philipp M. et al.* Activation and deactivation kinetics of alpha 2A- and alpha 2C-adrenergic receptor-activated G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel currents // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 47512–47517.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m108652200>
- Cehajic-Kapetanovic J., Eleftheriou C., Allen A.E. et al.* Restoration of vision with ectopic expression of human rod opsin // *Curr. Biol.* 2015. V. 25. P. 2111–2122.
<https://doi.org/10.1016%2Fj.cub.2015.07.029>
- Covington H.E., Lobo M.K., Maze I. et al.* Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex // *J. Neurosci.* 2010. V. 30 (48). P. 16082–16090.
<https://doi.org/10.1523%2FJNEUROSCI.1731-10.2010>
- Deisseroth K., Feng G., Majewska A. et al.* Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits // *J. Neurosci.* 2006. V. 26 (41). P. 10380–10386.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.3863-06.2006>
- Deisseroth K.* Optogenetics // *Nat. Methods.* 2011. V. 8 (1). P. 26–29.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.f.324>
- Deisseroth K.* Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 8 (9). P. 1213–1225.
<https://doi.org/10.1038/nn.4091>
- Dhingra A., Vardi N.* “mGlu receptors in the retina” — WIREs membrane transport and signaling // *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 2012. V. 1 (5). P. 641–653.
<https://doi.org/10.1002/wmts.43>
- Doroudchi M., Greenberg K., Liu J. et al.* Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. P. 1220–1229.
<https://doi.org/10.1038/mt.2011.69>
- Firsov M.L.* Perspective for the optogenetic prostheticization of the retina // *Neurosci. Behav. Physi.* 2019. V. 49. P. 192–198.
<https://doi.org/10.1007/s11055-019-00714-2>
- Flock T., Hauser A., Lund N. et al.* Selectivity determinants of GPCR-G-protein binding // *Nature*. 2017. V. 545 (7654). P. 317–322.
<https://doi.org/10.1038/nature22070>
- Ganjawala T.H., Lu Q., Fenner M.D. et al.* Improved CoChR variants restore visual acuity and contrast sensitivity in a mouse model of blindness under ambient light conditions // *Mol. Ther.* 2019. V. 27 (6). P. 1195–1205.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.04.002>
- Gaub B.M., Berry M.H., Holt A.E. et al.* Restoration of visual function by expression of a light-gated mammalian ion channel in retinal ganglion cells or ON-bipolar cells // *PNAS USA*. 2014. V. 111 (51). P. E5574–83.
- Gorovunova E.G., Sineshchekov O.A., Janz R. et al.* Natural light-gated anion channels: a family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics // *Science*. 2015. V. 349 (6248). P. 647–650.
<https://doi.org/10.1126/science.aaa7484>
- Graham F.L., Russell W.C., Smiley J. et al.* Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5 // *J. Gen. Virol.* 1977. V. 36. P. 59–72.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Guido M.E., Marchese N.A., Rios M.N. et al.* Non-visual opsins and novel photo-detectors in the vertebrate inner retina mediate light responses within the blue spectrum region // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2022. V. 42 (1). P. 59–83.
<https://doi.org/10.1007/s10571-020-00997-x>
- Hofmann K.P., Lamb T.D.* Rhodopsin, light-sensor of vision // *Prog. Retin. Eye Res.* 2022. V. 93. P. 101116.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2022.101116>
- Hommers L.G., Lohse M.J., Bünemann M.* Regulation of the inward rectifying properties of G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels by Gβγ subunits // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278 (2). P. 1037–1043.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m205325200>
- Kato M., Sugiyama T., Sakai K. et al.* Two opsin 3-related proteins in the chicken retina and brain: a TMT-type opsin 3 is a blue-light sensor in retinal horizontal cells, hypothalamus, and cerebellum // *PLoS One*. 2016. V. 11 (11). P. e0163925.
<https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0163925>
- Kim J.-M., Hwa J., Garriga P.* Light-driven activation of beta 2-adrenergic receptor signaling by a chimeric rhodopsin containing the beta 2-adrenergic receptor cytoplasmic loops // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 2284–2292.
<https://doi.org/10.1021/bi048328i>
- Kim C.K., Adhikari A., Deisseroth K.* Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience // *Nat. Rev. Neurosci.* 2017. V. 18 (4). P. 222–235.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.15>
- Kleinlogel S.* Optogenetic user’s guide to opto-GPCRs // *Front. Biosci.* 2016. V. 21. P. 794–805.
<https://doi.org/10.2741/4421>

- Koyanagi M., Terakita A.* Diversity of animal opsin-based pigments and their optogenetic potential // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1837. P. 710–716.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.09.003>
- Kralik J., Wyk M., Stocker N., Kleinlogel S.* Bipolar cell targeted optogenetic gene therapy restores parallel retinal signaling and high-level vision in the degenerated retina // *Comm. Biol.* 2022. V. 5. P. 1116.
<https://doi.org/10.1038/s42003-022-04016-1>
- Lagali P., Balya D., Awatramani G. et al.* Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration // *Nat. Neurosci.* 2008. V. 11. P. 667–675.
<https://doi.org/10.1038/nn.2117>
- Lamb T.D.* Photoreceptor physiology and evolution: cellular and molecular basis of rod and cone phototransduction // *J. Physiol.* 2022. V. 600 (21). P. 4585–4601.
- Law S., Yasuda K., Bell G., Reisine T.* Gi alpha 3 and G(o) alpha selectively associate with the cloned somatostatin receptor subtype SSTR2 // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 10721–10727.
- Lei Q., Jones M.B., Talley E.M. et al.* Activation and inhibition of G protein coupled inwardly rectifying potassium (Kir3) channels by G protein $\beta\gamma$ subunits // *PNAS USA.* 2000. V. 97. P. 9771–9776.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.17.9771>
- Leemann S., Kleinlogel S.* Functional optimization of light-activatable opto-GPCRs: illuminating the importance of the proximal C-terminus in G-protein specificity // *Front. Cell Dev. Biol.* 2023. V. 11. P. 1053022.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1053022>
- Levitz J., Pantoja C., Gaub B. et al.* Optical control of metabotropic glutamate receptors // *Nat. Neurosci.* 2013. V. 16. P. 507–516.
<https://doi.org/10.1038/nn.3346>
- Lin J.Y., Lin M.Z., Steinbach P., Tsien R.Y.* Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics // *Biophys. J.* 2009. V. 96 (5). P. 1803–1814.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.034>
- Lin J.Y.* A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments // *Exp. Physiol.* 2011. V. 96. P. 19–25.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.051961>
- Mathes T.* Natural resources for optogenetic tools // *Optogenetics* / Ed. A. Kianianmomeni. N.Y.: Springer, 2016. P. 19–36.
- Masseck O., Spoida K., Dalkara D. et al.* Vertebrate cone opsins enable sustained and highly sensitive rapid control of Gi/o signaling in anxiety circuitry // *Neuron.* 2014. V. 81. P. 1263–1273.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.041>
- Masuho I., Ostrovskaya O., Kramer G.* Distinct profiles of functional discrimination among G proteins determine the actions of G protein-coupled receptors // *Sci. Signal.* 2015. V. 8 (405). P. ra123.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aab4068>
- Milligan G., Kostenis E.* Heterotrimeric G-proteins: a short history // *Br. J. Pharmacol.* 2006. V. 147 (1). P. S46–S55.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706405>
- Nagata T., Koyanagi M., Lucas R., Terakita A.* An all-trans-retinal-binding opsin peropsin as a potential dark-active and light-inactivated G protein-coupled receptor // *Sci. Rep.* 2018. V. 8 (3535). P. 1–7.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21946-1>
- Nagel G., Mockel B., Buldt G., Bamberg E.* Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H⁺ pumping // *FEBS Lett.* 1995. V. 377. P. 263–266.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01356-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01356-3)
- Nagel G., Ollig D., Fuhrmann M. et al.* Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae // *Science.* 2002. V. 296 (5577). P. 2395–2398.
<https://doi.org/10.1126/science.1072068>
- Nagel G., Szellas T., Huhn W. et al.* Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel // *PNAS USA.* 2003. V. 100 (24). P. 940–945.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1936192100>
- Neves S.R., Ram P.T., Iyengar R.* G-protein pathways // *Science.* 2002. V. 296 (5573). P. 1636–1639.
<https://doi.org/10.1126/science.1071550>
- Oh E., Maejima T., Liu C. et al.* Substitution of 5-HT1A receptor signaling by a light-activated G protein-coupled receptor // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285 (40). P. 30825–30836.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m110.147298>
- Pugh E.N., Lamb T.D.* Phototransduction in vertebrate rods and cones: molecular mechanisms of amplification, recovery and light adaptation. Ch. 5 // *Handbook of biological physics* / Eds D.G. Stavenga, W.J. DeGrip, E.N. Pugh Jr. North-Holland, 2000. V. 3. P. 183–255.
- Riggsbee C.W., Deiters A.* Recent advances in the photochemical control of protein function // *Trends Biotechnol.* 2010. V. 28 (9). P. 468–475.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.06.001>
- Rosenbaum D.M., Rasmussen S.G., Kobilka B.K.* The structure and function of G-protein-coupled receptors // *Nature.* 2009. V. 459 (7245). P. 356–363.
<https://doi.org/10.1038/nature08144>
- Rost B.R., Schneider-Warmer F., Schmitz D., Hegemann P.* Optogenetic tools for subcellular applications in neuroscience // *Neuron.* 2017. V. 96 (3). P. 572–603.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.047>
- Sahel J.-A., Boulanger-Scemama E., Pagot Ch. et al.* Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy // *Nat. Med.* 2021. V. 27. P. 1223–1229.
<https://doi.org/10.1038/s41591-021-01351-4>
- Skylar M.S., Bruchas M.R.* Optogenetic approaches for dissecting neuromodulation and GPCR signaling in neural circuits // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2017. V. 32. P. 56–70.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.11.001>

- Spoida K.* Melanopsin variants as intrinsic optogenetic on and off switches for transient versus sustained activation of G protein pathways // *Curr. Biol.* 2016. V. 26. P. 1206–1212.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.007>
- Stenkamp R.E., Filipek S., Driessens C.A. et al.* Crystal structure of rhodopsin: a template for cone visual pigments and other G protein-coupled receptors // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1565 (2). P. 168–182.
[https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00567-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00567-9)
- Terakita A.* The opsins // *Genome Biol.* 2005. V. 6 (3). P. 213.
<https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-3-213>
- Tian L., Kammermeier P.J.* G protein coupling profile of mGluR6 and expression of G alpha proteins in retinal ON bipolar cells // *Vis. Neurosci.* 2006. V. 23 (6). P. 909–916.
<https://doi.org/10.1017/s0952523806230268>
- Thomas P., Smart T.G.* HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins // *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 2005. V. 51. P. 187–200.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>
- Tomita H., Sugano E., Murayama N. et al.* Restoration of the majority of the visual spectrum by using modified *Volvox* channelrhodopsin-1 // *Mol. Ther.* 2014. V. 22. P. 1434–1440.
<https://doi.org/10.1038/mt.2014.81>
- Tye K.M., Deisseroth K.* Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models // *Nat. Rev. Neurosci.* 2012. V. 13 (4). P. 251–266.
<https://doi.org/10.1038/nrn3171>
- Watanabe Y., Sugano E., Tabata K. et al.* Development of an optogenetic gene sensitive to daylight and its implications in vision restoration // *Regen. Med.* 2021. V. 6 (1). P. 64.
<https://doi.org/10.1038/s41536-021-00177-5>
- Wert K., Lin J.H., Tsang S.H.* General pathophysiology in retinal degeneration // *Dev. Ophtalmol.* 2014. V. 53. P. 33–43.
<https://doi.org/10.1159%2F000357294>
- Wu K., Kulbay M., Toameh D et al.* Retinitis pigmentosa: novel therapeutic targets and drug development // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15 (2). P. 685.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020685>
- Wyk M., Kleinlogel S.A.* A visual opsin from jellyfish enables precise temporal control of G protein signaling // *Nat. Comm.* 2023. V. 14 (1). P. 2450.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1723578/v1>
- Wyk M., Pielecka-Fortuna J., Löwel S., Kleinlogel S.* Restoring the on switch in blind retinas: opto-mGluR6, a next-generation, cell tailored optogenetic tool // *PLoS Biol.* 2015. V. 13 (5). P. e1002143.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002143>
- Xu Y., Orlandi C., Cao Y. et al.* The TRPM1 channel in ON-bipolar cells is gated by both the α and the $\beta\gamma$ subunits of the G-protein Go // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 20940.
- Yizhar O., Fennell L.E., Prigge M. et al.* Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction // *Nature.* 2011. V. 477. P. 172–178.
<https://doi.org/10.1038/nature10360>

Opsins and Their Testing in Heterological Expression Systems

Y. A. Chilagina

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

e-mail: julchil@mail.ru

The study of photosensitive proteins as optogenetic tools for the therapeutic restoration of visual functions in heterologous expression systems is a necessary step prior to their optogenetic prostheticization in the retina. The review considers the features of opsins and factors affecting their activity in model cell systems. Particular attention is paid to G-protein-coupled opsins as promising tools for recreating the signaling cascade mechanisms in retinal ON-bipolar cells. Based on the analysis of light-controlled responses of natural and chemical light-sensitive proteins in tests, the selection of the best, promising in gene therapy is made.

Keywords: opsins, rhodopsin, melanopsin, light-sensitive chimeric proteins, G protein-coupled receptor (GPCR), G protein-gated inwardly rectifying potassium channel (GIRK), heterologous expression system