

**Воссоздание On-Off рецептивных полей в нейронах при помощи бицистронной генетической конструкции для применения в оптогенетическом протезировании дегенеративной сетчатки**

**Научный руководитель – Малышев Алексей Юрьевич**

**Колотова Дарья Евгеньевна**

*Студент (магистр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра физиологии человека и животных, Москва, Россия

*E-mail: l-f-i-f\_dasha@mail.ru*

При дегенеративных заболеваниях сетчатки происходит гибель фоторецепторов, которая приводит к слепоте. Одним из подходов к восстановлению зрения при таких заболеваниях является оптогенетический подход, который заключается в наделении выживших нейронов сетчатки светочувствительностью за счёт экспрессии в них светочувствительных белков - опсинов. Перспективным направлением в рамках данного подхода является воссоздание On-Off рецептивных полей ганглиозных клеток сетчатки с целью частичного восстановления обработки зрительной информации в сетчатке [1].

В нашей работе для моделирования On-Off рецептивных полей была создана генетическая конструкция, содержащая гены возбуждающего (CHR2) и тормозного (GtACR2) опсинов. Особенность данной конструкции заключается в разделении двух генов мутантной IRES-вставкой, которая обеспечивает строго контролируемое соотношение уровней экспрессии генов двух опсинов в каждом трансфицированном нейроне [2]. Данная конструкция была испытана нами на пирамидных нейронах мышей и крыс, использованных здесь в качестве модельной системы.

Конструкция имела вид CHR2-Venus-Kv2.1-IRESv10-GtACR2. С помощью мотива Kv2.1 осуществлялось таргетирование возбуждающего опсина CHR2 в сому клетки. Созданной конструкцией были трансфицированы нейроны первичной культуры гиппокампа крыс методом электропорации в суспензии, а также пирамидные нейроны коры мозга мышей методом *in utero* электропорации. Электрическая активность клеток регистрировалась с помощью метода петч-клямпы в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока или потенциала. Параллельно с регистрацией электрической активности осуществлялась стимуляция светом длиной волны 470 нм центральной или периферической области клетки.

При световой стимуляции центральной области нейрона наблюдалась генерация потенциалов действия. В то же время световая стимуляция периферической области клетки вызывала подавление генерации потенциалов действия.

Таким образом, в нашей работе были успешно смоделированы On-Off рецептивные поля в нейронах с помощью бицистронной генетической конструкции. Данная конструкция потенциально может быть использована для оптогенетического протезирования ганглиозных клеток дегенеративной сетчатки путем доставки конструкции при помощи вирусных векторов достаточной емкости.

**Источники и литература**

- 1) Greenberg K.P., Pham A., Werblin F.S. Differential Targeting of Optical Neuromodulators to Ganglion Cell Soma and Dendrites Allows Dynamic Control of Center-Surround Antagonism // *Neuron*. Elsevier Inc. 2011. T. 69. № 4. С. 713–720.

- 2) Koh E.Y.C. и др. An internal ribosome entry site (IRES) mutant library for tuning expression level of multiple genes in mammalian cells // PLoS One. 2013. Т. 8. № 12. С. e82100.