

UNIVERSITATEA BABE -BOLYAI CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE BIOLOGIE I GEOLOGIE  
DEPARTAMENTUL DE BIOLOGIE EXPERIMENTAL

Miruna Georgiana Ghinia

**Metode moleculare pentru studiul dezvoltării și  
organizării rețelelor neuronale din retina**

Rezumatul tezei de doctorat

Coordonatori științifici:

Prof. Dr. Octavian Popescu

Dr. Tudor Badea

Cluj – Napoca

2013

## Cuprins

List de abrevieri .....	3
<b>Capitolul I. Introducere</b> .....	8
Retina .....	9
Celulele retinale ganglionare .....	12
Diversitatea în retin .....	15
Metode de studiu al celulelor retinale ganglionare .....	18
Strategii pentru generarea oarecilor mutan i .....	20
Strategii condi ionale .....	22
Molecule “reporter” des folosite .....	24
Optogenetic .....	25
Obiectivele tezei .....	27
<b>Capitolul II. Materiale i metode</b> .....	28
Metode generale .....	29
Immunohistochimie .....	29
Prepararea esutului .....	29
Protocolul pentru imunofluorescen dubl .....	30
Metode de biologie molecular .....	31
Izolarea acizilor nucleici i cuantificarea lor .....	31
Hibridizare In Situ.....	33
Southern blot .....	39
Metode de clonare.....	42
Tehnici de culturi celulare.....	45
Cultura celulelor HEK 293 .....	45
Dezghe area i cre terea celulelor HEK 293 .....	46
Pasajul celulelor HEK 293 .....	46
Crioprezervarea celulelor HEK 293.....	47
1. Analiza stratului plexiform intern a mutan ilor Brn3b <sup>CKOAP/-</sup> .....	48
2. Analiza profilelor de exprimare a genelor în aval fa de Brn3a i Brn3b într-o popula ie purificat de celule retinale ganglionare.....	50
Disec ia i disocierea retinelor .....	50
Purificarea imunomagnetic a celulelor retinale ganglionare.....	53
3. Strategia knock-in condi ional folosind sistemul dublu de recombinare pentru studiul dezvolt rii celulelor retinal ganglionare .....	55
Descrierea general a strategiei folosite .....	55
Elementele vectorului de înlocuit .....	57
Bra ele de omologie i realizarea probelor .....	57
Înlocuirea genelor Brn3a i Brn3b.....	58
Markeri de selec ie .....	59
Tehnici de biologie molecular .....	60
Preg tirea construtelor pentru electroporare .....	61
Manipul rile celulelor stem embrionare i electroporarea.....	61
Screening pentru recombinarea omoloag .....	62
Producerea mutan ilor, injec ia blastocitelor i preg tirea himerelor .....	63
Încruciri pentru validarea sistemului .....	63

4. Instrumente noi ce folosesc optogenetica pentru studiul circuitelor retinale.....	65
Aspect general al strategiei de clonare.....	65
Clonarea casetei CaPoChR2 în vectorul pcDNA5/FRT .....	66
Clonarea genei ChR2 în vectorul pcDNA5/FRT .....	69
Linia gChR2 .....	70
Transfec ia vectorilor în celulele HEK 293 .....	71
Selec ia pozitiv a clonelor .....	71
Validarea datelor .....	72
Controale moleculare interne.....	73
<b>Chapter III. Results and Discussion</b> .....	74
1. Analiza stratului plexiform intern a mutan ilor Brn3b <sup>CKOAP/-</sup> .....	75
Laminarea în stratul plexiform intern.....	75
Celule amacrine i bipolare.....	77
Componente sinaptice în stratul plexiform intern.....	79
2. Analiza profilelor de exprimare a genelor în aval fa de Brn3a i Brn3b într-o popula ie purificat de celule retinale ganglionare .....	81
Popula ii îmbog ite de celule retinale ganglionare .....	81
Controlul primar al secven rii RNA – citirile fosfatazei alcaline.....	82
Exprimarea genelor Brn3 .....	84
Analiza general a genelor.....	86
Valid ri pe baza eviden elor din literatur .....	87
Clasificarea genelor .....	89
Seturi de gene care determina diferite subtipuri de celule retinale ganglionare .....	94
Validarea datelor .....	96
Gene specifice pentru celulele retinale ganglionare cu poten ial efect în timpul dezvolt ri .....	99
3. Strategia knock-in condi ional folosind sistemul dublu de recombinare pentru studiul dezvolt rii celulelor retinal ganglionare.....	102
Generarea liniilor mutante Brn3a <sup>CKOCre</sup> i Brn3b <sup>CKOCre</sup> .....	102
Triplii mutan i: CAG:Dre; Brn3 <sup>CKOCre</sup> ; ROSA26 <sup>iAP/+</sup> .....	104
Recombinarea Dre i Cre în oarecele adult .....	106
Recombinarea timpurie-ubicu a recombinazei Cre de la locusul endogen de Brn3a i Brn3b.....	108
4. Instrumente noi ce folosesc optogenetica pentru studiul circuitelor retinale .....	111
Introducerea genei pentru fluorescen a YFP i exprimarea -galactosidazei în clonele selectate ale liniei CaPoChR2.....	111
Genotiparea diferitelor elemente din celule .....	112
Fluorescen a YFP a diferitelor linii celulare .....	113
Analize Patch Clamp ale liniilor CaPoChR2 and ChR2.....	116
<b>Discu ii generale</b> .....	118
<b>Concluzii</b> .....	126
<b>Bibliografie</b> .....	127

## **Cuvinte cheie**

Retina

Celule retinale ganglionare

Brn3

Dezvoltare

Profile de exprimare genic

Channelrhodopsin

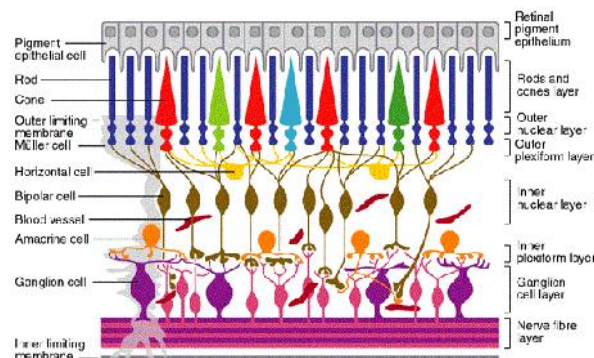
## Introducere

Simul vizual reprezintă cel mai important dintre simuri, furnizând aproximativ 80% din informații referitoare la elementele cu care relaționăm. Cu toate că toate structurile ce alcătuiesc ochiul contribuie la realizarea funcției vizuale, retina reprezintă structura esențială, nu în ultimul rând, cea mai complexă.

### Retina

Asemenea altor structuri din Sistemul Nervos Central, retina este un circuit neuronal complex, cu organizare laminară, responsabil pentru integrarea informației vizuale și transmiterea acesteia către centrul creierului, prin transducerea radiației optice în impulsuri electrice specifice.

Partea neuronală a retinei este compusă din cinci clase diferite de celule (fotoreceptori, celule bipolare, celule amacrine și celule retinale ganglionare) organizate în trei straturi nucleare și două straturi plexiforme, locul unde diferite celule stabilesc conexiuni sinaptice (Fig. 1). În plus, fotoreceptorii sunt protejați și se găsesc în interacțiune cu un strat epitelial alcătuit din epiteliul pigmentat retinal, în timp ce suportul glial este asigurat prin intermediul celulelor gliale Müller, astrocitelor și celulelor microgliale.



**Figure 1.** Structura retinei la mamifere (Wilkinson-Berka, 2004).

Celulele retinale ganglionare, principalul interes al acestei teze, reprezintă neuronii care colectează informația primită de la partenerii pre sinaptici (celulele amacrine și bipolare) și o transmit creierului prin intermediul proiecțiilor axonale, care se fasciculează și formează nervul optic. Axonii celulelor retinale ganglionare provenind de la ambii ochi se întâlnesc la chiasma

optic , segreg în traturi optice de aceea i parte (ipsi-) sau de partea opus (contralateral) a creierului. Precum alte categorii de celule retinale, celulele retinale ganglionare se împart în diferite categorii, al c ror num r este în continu schimbare.

Caracterizarea celulelor retinale ganglionare la mamifere a fost ini iat de studii pe bovine i canine desf urate de Ramon y Cajal (Kolb, <http://webvision.med.utah.edu>), apoi continuate de c tre alte grupuri de cercet tori care au descris variet ile de celule retinal ganglionare in diferite specii: primate, (Rodieck and Watanabe, 1993), pisici (Boycott and Wassle, 1974), iepuri (Rockhill *i colab.*, 2002), obolani (Sun *i colab.*, 2002) i oareci (Badea and Nathans, 2004), acestea fiind doar câteva dintre numeroasele studii. În general, caracterizarea morfologiei se bazeaz pe criterii de m rime a corpului celular, precum i pe cea a arborilor dendritici i a lamin rii acestora în stratul plexiform intern (Coombs *i colab.*, 2006). Dou zeci i dou de subtipuri au fost observate de c tre Cajal în studiile lui ini iale în urm cu 200 de ani, 13 i, respectiv 15 în studii mai recente realizate de c tre Rockhill i colaboratorii, precum i Badea i colaboratorii. În plus, studii recente desf urate pe oareci men ioneaz diferite numere de subtipuri ale celulelor retinal ganglionare, între 11 i 22 (revizuit de c tre Masland, 2012).

Din punct de vedere func ional, este cert faptul c celulele retinale ganglionare sunt diferite prin faptul c primesc informa ii, i, în schimb, proiecteaz informa iile prelucrate diferit unor structuri variate din creier. Fibrele care ajung la coliculul superior integreaz mi c rile capului i ale ochilor, în timp ce acelea care proiecteaz fibrele în nucleul geniculat lateral, iar, mai apoi cortexului vizual, sunt responsabile pentru transmiterea informa iilor legate de contrast, componen cromatic , mi care i form , ce apoi contribuie la formarea vederii con tiente. Nuclei precum cel olivar pretectal i cel suprachismatic primesc fibre care transmit informa ii care nu sunt in leg tura cu vederea propriu-zis , ci cele legate de reflexul pupilar i ritmul circadian. Mai mult, nucleul medial, lateral i cel dorsal proceseaz informa ii referitoare la coordonarea vestibulo-ocular .

Cea mai mare parte a cuno tiin elor legate de fiziologia diferitelor celule retinale ganglionare provine din decursul ultimelor decade. Ace ti neuroni sunt susceptibili diferitor tipuri de stimuli precum direc ia, viteza mi c rii, precum i m rime, luminozitate i culoare (R. Nelson, [webvision.med.utah.edu](http://webvision.med.utah.edu)). În plus, o categorie distinct de celule retinale ganglionare

îndeplinesc funcții legate de reflexe precum cel pupilar și ciclul noapte-zi, numite celule retinale ganglionare cu melanopsin (Hattar *i colab.*, 2002).

Diferențele legate de morfologia și fiziologia celulelor retinale ganglionare sunt generate de diferențele în programul intrinsec, cât și de specificitatea la nivelul sinapselor. Cu siguranță această arhitectură complexă este rezultatul parțial al interacțiunii dintre celulele retinale ganglionare între ele, însă implică și interacțiuni care sunt independente de celule și stadii de dezvoltare. Pe de altă parte, un program genetic activ în timpul dezvoltării asigură faptul că diferite molecule acționează specific dictând celulelor identitate și funcționalitate.

### **Diversitatea în retină**

În ceea ce privește programul genetic ce dictează formarea retinei mamiferelor, multiple cascade de gene interacționează în decursul dezvoltării. Un aspect interesant este faptul că toate cele cinci clase neuronale au un progenitor comun – celula retinală progenitoare (Turner and Cepko, 1987). La oarece, principalul model de studiu în această țesătură, histogeneza are loc începând cu ziua a 11-a embrionară până la ziua a 11-a postnatală. Primii neuroni formați sunt celulele retinale ganglionare, urmate, în ordine, de către celulele orizontale, celulele cu conuri, celulele amacrine, celulele bipolare și celulele cu bastonașe.

Pentru ca toate elementele ochiului să se formeze, un set de factori de transcriere devin activi începând cu ziua a opta embrionară în tubul neural anterior. Aceștia sunt adesea denumiți factori de transcriere a câmpului vizual. În general, ei sunt conservați în evoluție, începând de la *Drosophila*, la *C. Elegans* până la oameni. Cei mai importanți dintre ei, Otx2, Pax6, Rx, Lhx2 și Six3 sunt strict necesari pentru formarea ochiului, lipsa lor cauzând defecte severe ca și fenotipuri de ochi mici până la lipsa completă a formării ochiului (Marquardt *i colab.*, 2001; Porter *i colab.*, 1997; Zuber *i colab.*, 2003; Mawersik and Maas, 2000). Pe lângă acești factori de transcriere, molecule de semnalizare precum Notch, Wnt and Shh joacă un rol important în formarea organului vizual.

În retină, diferențierea finală a celulelor precursorare retinale în celule specializate începe cu decizia unora dintre ele de a deveni celule retinale ganglionare, acestea fiind primele celule retinale formate. Pentru aceasta, primul factor de transcriere activ este Math5, un omolog al genei *Athonal* de la *Drosophila* (Brown *i colab.*, 1998). Oarecui căroră le lipsește această genă

au mai puțin de 1% celule retinale ganglionare (Brown *i colab.*, 2001; Wang *i colab.*, 2001). Mai mult, exprimarea lui Math5 se observă și în alte tipuri de celule (Yang *i colab.*, 2003), inclusiv în precursori. Un factor de transcriere important, de data aceasta la momentul în care precursorii devin celule post-mitotice, este Brn3b(Pou4f2) (Xiang *i colab.*, 1995, Xiang *i colab.*, 1996, Erkman *i colab.*, 1996), lipsa lui afectând majoritatea celulelor retinale ganglionare. Mai târziu, Brn3a și Brn3c, doi alți factori de transcriere din aceeași familie, sunt exprimați în celulele retinale ganglionare selective. În timpul dezvoltării, alte seturi de factori de transcriere contribuie la generarea celulelor retinale ganglionare: membrii familiei de molecule Iroquois - Irx1, Irx2, și Irx6, factori de transcriere din categoria celor cu domeniu lim - Islet1 and Islet2, degete de zinc ca și Gfi1, Olf 1 și Olf2 (revizuit de către Mu and Klein, 2004), precum și Dlx1 and Dlx2 (Eisenstat *i colab.*, 1999).

Ca și în cazul celulelor retinale ganglionare, toate celelalte celule necesită activitatea unor factori de transcriere pentru îndeplinirea deciziei asupra tipului de celulă post-mitotic. Mash1 (omolog al factorului Achete-Scute de la *Drosophila*) este important pentru formarea și diferențierea corectă a celulelor bipolare și orizontale, și, într-o oarecare măsură, a fotoreceptorilor (Tomita *i colab.*, 2000). NeuroD influențează decizia asupra devenirii neuron sau celulă glială, precum și dezvoltării propice a celulelor amacrine și bipolare (Yan *et al.*, 2005). Nr1, Crx, Nr2E3 sunt factori de transcriere cheie pentru dezvoltarea fotoreceptorilor (Swaroop *i colab.*, 1992; Cheng *i colab.*, 1997; Chen 1999).

### **Factorii de transcriere Brn3**

În decursul ultimelor două decade numărul informațiilor s-au adunat în legătură cu factorii de transcriere Brn3, în special despre funcția exercitată în retină, prin intermediul liniilor de oareci mutații create și analizate de către numeroase grupuri de cercetători: Xiang, Nathans, Erkman, Turner, Rosenfeld, Gan, Klein, Wang, Mu, Badea.

Factorii Brn3 joacă un rol important în dezvoltarea unor organe senzitive la mamifere (Xiang *i colab.*, 1998), toți cei trei (Brn3a, Brn3b and Brn3c) fiind exprimați într-unul sau mai multe dintre organe ca și retina, neuronii sistemului acustico-vestibular precum și în ganglionii trigeminal sau rahidian.



În retină, factorii Brn3 sunt exprimați în seturi de neuroni în diferite combinații (Badea and Nathans, 2011), fiind specifici pentru celulele retinale ganglionare. Din punct de vedere cronologic, Brn3b este primul factor de transcriere din familia lui care este exprimat, exprimarea începând cu a 11-a zi embrionară, aproximativ când primul precursor devine post-mitotic, devenind o celulă retinală ganglionară. Pe măsură ce se înaintează în dezvoltare, exprimarea lui Brn3b se propagă spre periferia retinei, având cel mai înalt nivel de exprimare între a 12-a zi embrionară și a 15-a, atunci când majoritatea celulelor retinale ganglionare se formează. Exprimarea lui Brn3a începe o zi mai târziu, urmată de Brn3c, acesta fiind ultimul dintre cei trei care se exprimă în retină (Xiang *et al.*, 1995; Gan *et al.*, 1999).

Diferite linii de șoareci ce poartă mutații în genele Brn3 prezintă fenotipuri interesante, în special mutații de Brn3b. Eliminarea lui Brn3b are ca urmare pierderea a 70-80% dintre celulele retinale ganglionare, cele 30% rămase suferind de efecte intra și extra retinale, majoritatea în legătură cu integritatea axonilor și corectitudinea fasciculării în nervul optic (Erkman *et al.*, 1996; Gan *et al.*, 1996; Erkman *et al.*, 2000; Badea *et al.*, 2009a). În ceea ce privește Brn3a, analiza mutațiilor homozigote este imposibilă post-natal, acestea fiind letale datorită unor mutații severe la nivelul ganglionilor trigeminali și rahidiani (McEvelly *et al.*, 1996; Xiang *et al.*, 1996; Eng *et al.*, 2001). Cu toate acestea, eliminarea lui Brn3a la nivelul retinei rezultă în defecte ale arborizării celulelor retinale ganglionare și distribuția lor în stratul plexiform intern (Badea *et al.*, 2009a). În contrast, aspectul general al retinei pare să fie neafectat în urma eliminării lui Brn3c, cel de-al treilea membru.

## Obiectivele tezei

Din punct de vedere funcțional retina este compusă din trei părți generale: detectorii informației luminoase (fotoreceptorii), circuitul care codifică informația furnizată de către fotoreceptori (celulele orizontale, celulele bipolare și amacrine) precum și proiecția (celulele retinale ganglionare). Principalul interes al acestei teze este reprezentat de către celulele retinale ganglionare, considerând în special următoarele aspecte:

Se cunoaște faptul că într-o retină careia îi lipsesc fotoreceptorii neuronii de ordin secundar se reorganizează suferind degenerare parțială. Acest proces pare să fie evitat în cazul celulelor retinale ganglionare, fapt ce sugerează independența parțială a acestor celule față de ceilalți neuroni din retină. În această teză este testată situația contrară, anume care sunt modificările suferite de retină în situația în care o populație majoră de celule retinale ganglionare lipsește.

În al doilea rând atenția a fost concentrată pe dezvoltarea celulelor retinale ganglionare, întrebându-se care sunt diferitele seturi de gene care determină diferite atribuții ale celulelor retinale ganglionare. Aceste molecule, dacă sunt exprimate în condiții controlate pot, eventual, reprezenta soluții pentru regenerarea acestui tip de neuroni.

Cel de-al treilea obiectiv este generarea a două linii mutante de oareci generate prin strategia de înlocuire pe baza recombinării omoloage în speranța facilitării unor studii viitoare de înaltă rezoluție pentru analiza celulelor retinale ganglionare. Aceste experimente pot furniza noi date care pot deveni ulterior instrumente utilizabile în tratarea diferitelor patologii ce afectează aceste celule.

În final, cel de-al patrulea obiectiv este dezvoltarea unor linii celulare care utilizează un instrument optogenetic – canalul sensibil la lumină Channelrhodopsin. Aceste linii celulare pot genera informații utile pentru investigarea circuitelor neuronale.

## Materiale și metode

### 1. Analiza stratului plexiform intern a mutanilor Brn3b<sup>CKOAP/-</sup>

Retinele provenind de la oareci adulți cu genotipurile Pax6 Cre;Brn3b<sup>CKOAP/-</sup> (KO) și Pax6 Cre;Brn3b<sup>CKOAP/+</sup> (WT) au fost analizate prin studii de imunohistochimie. Mutanii ce poartă genotipul Pax6 :Cre; Brn3b<sup>CKOAP/-</sup> prezintă un aspect al recombinării inedit, observat prin exprimarea moleculei “reporter”, fosfataza alcalină (AP). Retinele prezintă o porțiune în care recombinația se produce la o intensitate redusă și o altă unde recombinația se produce la maxim, rezultând fenotipul mutant complet (Marquardt *et al.*, 2001). Diferite combinații dintre anticorpii prezentați în tabelul 1 au fost folosiți pentru analiza prin imunofluorescență a retinelor prezentate mai sus.

**Tabelul 1. Anticorpi primari folosiți pentru secțiuni**

Antigen	Antiser	Localizare	Diluție	Furnizor	Număr de catalog
Brn3b	Rabbit anti-Brn3b	Ganglion cells	1:10	Xiang <i>et al.</i> , 1995	
Cabp5	Rabbit anti-Cabp5	Bipolar cells	1:200	Haeseleer <i>et al.</i> , 2004	
Calbindin	Rabbit anti-calbindin	Horizontal cells	1:500	Sigma	C2724
Calretinin	Rabbit anti-calretinin	Cone bipolar cells	1:1000	Swant	7699/4
Choline acetyltransferase (ChAT)	Goat anti-ChAT	Cholinergic amacrine cells	1:1000	Chemicon	AB1144P
Connexin36	Rabbit anti-Cnx36	Electric synapses	1:500	Invitrogen	364600
CtBP2	Mouse anti-Ctbp2	Ribbon synapses	1:500	BD	612044
Neurofilament 200	Mouse anti-NF200	GCs arborization	1:200	Sigma	N0142
PKC	Mouse anti-PKC	Rod bipolar cells	1:800	SantaCruz	Sc-208
PSD95	Mouse anti-PSD95	Post-synaptic densities	1:500	Ab Cam	Ab13552
Synaptotagmin	Mouse anti-ZNP1	Cone bipolar cells	1:1000	ZIRC	

## **2. Analiza profilelor de exprimare a genelor în aval fa de Brn3a și Brn3b într-o populație purificată de celule retinale ganglionare**

Retinele extrase din animale produse al încrucișării  $Brn3^{WT/KO}; Pax6 :Cre$  cu  $Brn3^{CKOAP/CKOAP}$  au fost dissociate fie în a 15-a zi embrionară, fie în a treia zi postnatală. Prin urmare, celulele retinale ganglionare sunt fie  $Brn3^{AP/WT}$  (WT) or  $Brn3^{AP/KO}$  (KO), prin urmare fiind similare din punct de vedere fenotipic fie cu animale control (WT) fie cu mutații complete (KO).

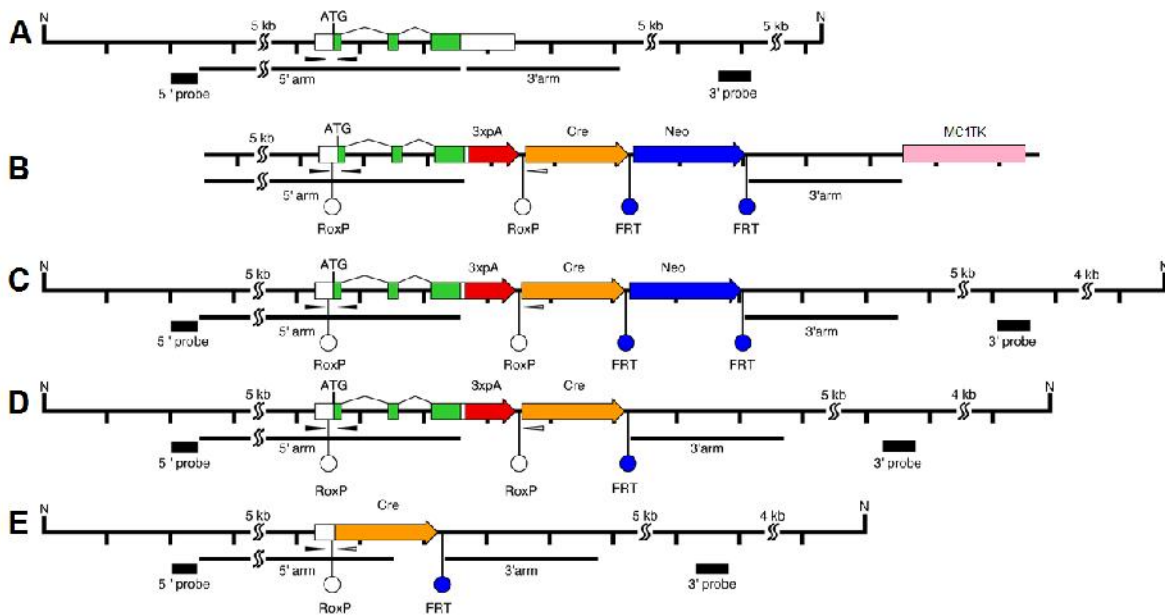
Pentru disocierea esutului a fost folosit un protocol pe bază de papain. Pentru a obține o populație purificată de celule retinale ganglionare, retinele dissociate au fost procesate folosind un protocol de purificare imunomagnetică, pe baza unor sfere Dynal™ Beads Pan Mouse IgG (Invitrogen, USA). Din celulele izolate purtând același genotip a fost extrasă RNA care a fost mai apoi prelucrat pentru experimentul principal – secvențiere RNA (RNAseq).

Datele obținute au fost analizate urmând anumite criterii de selecție. Pentru început, probele WT au provenit mereu de la secvențierea RNA-ului extras de la celule ce poartă genotipul  $Brn3a/b^{AP/WT}$ . Pe de altă parte, probele KO reprezintă rezultatele secvențierii RNA-ului extras de la animale ce poartă genotipul  $Brn3a/b^{AP/KO}$ . Probele “retin ” reprezintă informația obținută în urma procesării RNA-ului extras din supernatantul fie cu genotipul WT, fie KO. O analiză adițională compară probele RGC (celule retinale ganglionare) care sunt fie WT fie KO, cu cele “retin ” (WT sau KO).

De la începutul analizei toate probele care au avut valori de exprimare, exprimate în unitatea FPKM, mai mici decât 2 au fost excluse din setul de date. În plus, pentru diferitele comparații expuse mai sus, diferența dintre cele două seturi comparate trebuie să fie de cel puțin 2 ori.

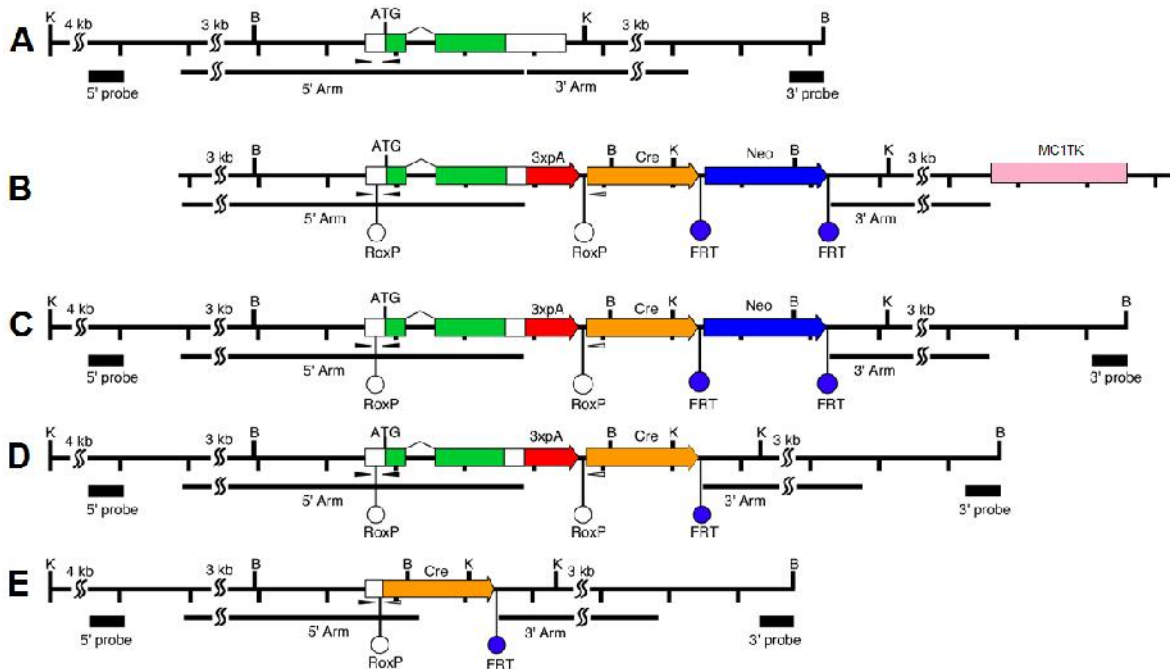
### 3. Strategia knock-in condi ional folosind sistemul dublu de recombinare pentru studiul dezvolt rii celulelor retinal ganglionare

Crearea unor noi linii mutante necesit o analiz prealabil extensiv a genei de înlocuit cât i a strategiei urmate. În afara elementelor de baz care înlocuiesc o gen , componente precum semnale aditionale de terminare sunt foarte importante. Mai mult, metodele de screening pentru confirmarea integrarii muta iei în celule stem embrionare necesit planificare. În vederea generarii unor linii mutante pe baz de recombinare omoloag , urm torii pa i trebuie urm ri i: schi a teoretic a vectorului de targeting, clonarea acestuia, transfec ia lui în celule stem embrionare, producerea himerelor i a homozigo ilor mutan i.



**Figure 2.** Strategia de introducere a muta iei pentru linia  $Brn3a^{CKOCre}$ . (A) Configura ia structurii genei  $Brn3a$ , locusul WT. Regiunile codificatoare sunt marcate prin blocuri verzi, UTR-urile în alb, în timp ce jonc iunile de procesare sunt reprezentate prin linii sub iri negre. Liniile negre de dedesubt reprezint bra ele de omologie. Probele pentru Southern Blot sunt reprezentate prin cutii negre. N-enzima de restric ie NheI. (B) Vectorul  $Brn3a^{CKOCre}$ . Primul situs RoxP a fost inserat în regiunea netranscris de la cap tul (UTR) 5' al genei, înainte de ATG, iar cel de-al doilea în UTR-ul de la 3', precedat de un semnal stop adi ional -3xpA. Secven a codificatoare a recombinazei Cre (caseta portocalie) urmeaz dup cel de-al doilea situs RoxP, apoi caseta pentru selec ia pozitiv -Neo (albastru) flancat doua situsuri de recombinare FRT. Caseta pentru selec ia negativ -MC1TK (roz) este plasat la cap tul bra ului de omologie de la 3'. (C)  $Brn3a^{CKOCre}$  dup modificare i recombinare omoloag . (D)  $Brn3a^{CKOCre}$  dup dele ia casetei de selec ie pozitiv , în urma încruc i rii cu o linie ce poart recombinaza Flp. (E)  $Brn3a^{Cre}$ . În urma recombinarii celor dou situsuri RoxP, secven a recombinazei Cre este exprimat la locusul  $Brn3a$ . Segmentele negre reprezint o kilobaz .

În *Mus musculus* gena Brn3a (Pou4f1) este compus din 3 exoni (cu lungimea de 358, 1186 i, respectiv 2224 perechi de baze), în timp ce Brn3b (Pou4f2) are doar 2 exoni (294 i 942 perechi de baze). În vectorul de portare mutaia, Brn3a<sup>CKOCre</sup>, respectiv Brn3b<sup>CKOCre</sup>, primul situs de recombinare (RoxP) necesar pentru activitatea recombinazei Dre, este amplasat la 42, respectiv, 98 perechi de baze în amonte față de codonul de inițiere ATG. În aval față de porțiunea netranscrisă de la capătul 3' (3' UTR) trei structuri repetitive ale semnalului de terminare a transcrierii SV40 au fost adăugate la 48 de perechi de baze în cazul mutaiei lui Brn3a, și la 340 perechi de baze în cazul mutaiei lui Brn3b, secvența este urmată de cel de-al doilea situs RoxP. Imediat după secvența celui de-al doilea situs de recombinare se află secvența care codifică recombinaza Cre, care, după recombinarea celor două situri RoxP sub acțiunea recombinazei Dre, înlocuiește gena Brn3, fiind exprimat apoi sub controlul promoterului respectiv.



**Figure 3.** Strategia de targeting pentru linia Brn3b<sup>CKOCre</sup>. (A) Configurația structurii genei Brn3a, locusul WT. Regiunile codificatoare sunt marcate prin blocuri verzi, UTR-urile în alb, în timp ce joncțiunile de procesare sunt reprezentate prin linii subiri negre. Liniile negre de dedesubt reprezintă brațele de omologie. Probele pentru Southern Blot sunt reprezentate prin cutii negre. K- enzima de restricție KpnI, B - BamHI. (B) Vectorul Brn3b<sup>CKOCre</sup>. Primul situs RoxP a fost inserat în UTR-ul 5' al genei, înainte de ATG, iar cel de-al doilea în UTR-ul de la 3', precedat de un semnal stop adițional -3xpA. Secvența codificatoare a recombinazei Cre (casetă portocalie) urmează după cel de-al doilea situs RoxP, apoi caseta pentru selecția pozitivă -Neo (albastru)

flancat două situsuri de recombinare FRT. Caseta pentru selecția negativă – MC1TK (roz) este plasată la capătul brațului de omologie de la 3'. (C) Brn3a<sup>CKOCre</sup> după modificarea și recombinare omoloagă. (D) Brn3b<sup>CKOCre</sup> după deleția casetei de selecție pozitivă, în urma încrucișării cu o linie ce poartă recombinaza Flp. (E) Brn3b<sup>Cre</sup>. În urma recombinării celor două situsuri RoxP, secvența recombinazei Cre este exprimată la locusul Brn3b. Segmentele negre reprezintă o kilobază.

#### **4. Instrumente noi ce folosesc optogenetica pentru studiul circuitelor retinale**

Trei linii celulare au fost create pentru acest proiect. Prima, CaPoChR2 constă în trei elemente – un canal de calciu, unul de potasiu și un al treilea, un canal cationic, sensibil la lumină – Channelrhodopsina (ChR2). Toate cele trei elemente au fost inserate la o anumită locație în celulele HEK293 FlpIn, prin intermediul sistemului ce utilizează vectorul pcDNA5/FRT. În al doilea rând, doar secvența codificatoare a ChR2 a fost introdusă în același tip de celule, utilizând aceeași strategie. În final, cea de-a treia linie celulară este reprezentată de către prima, în care secvența codificatoare a genei de ChR2 a fost supraexprimată prin inserarea întâmplătoare.

## Rezultate și discuții

### 1. Analiza stratului plexiform intern a mutanilor Brn3b<sup>CKOAP/-</sup>

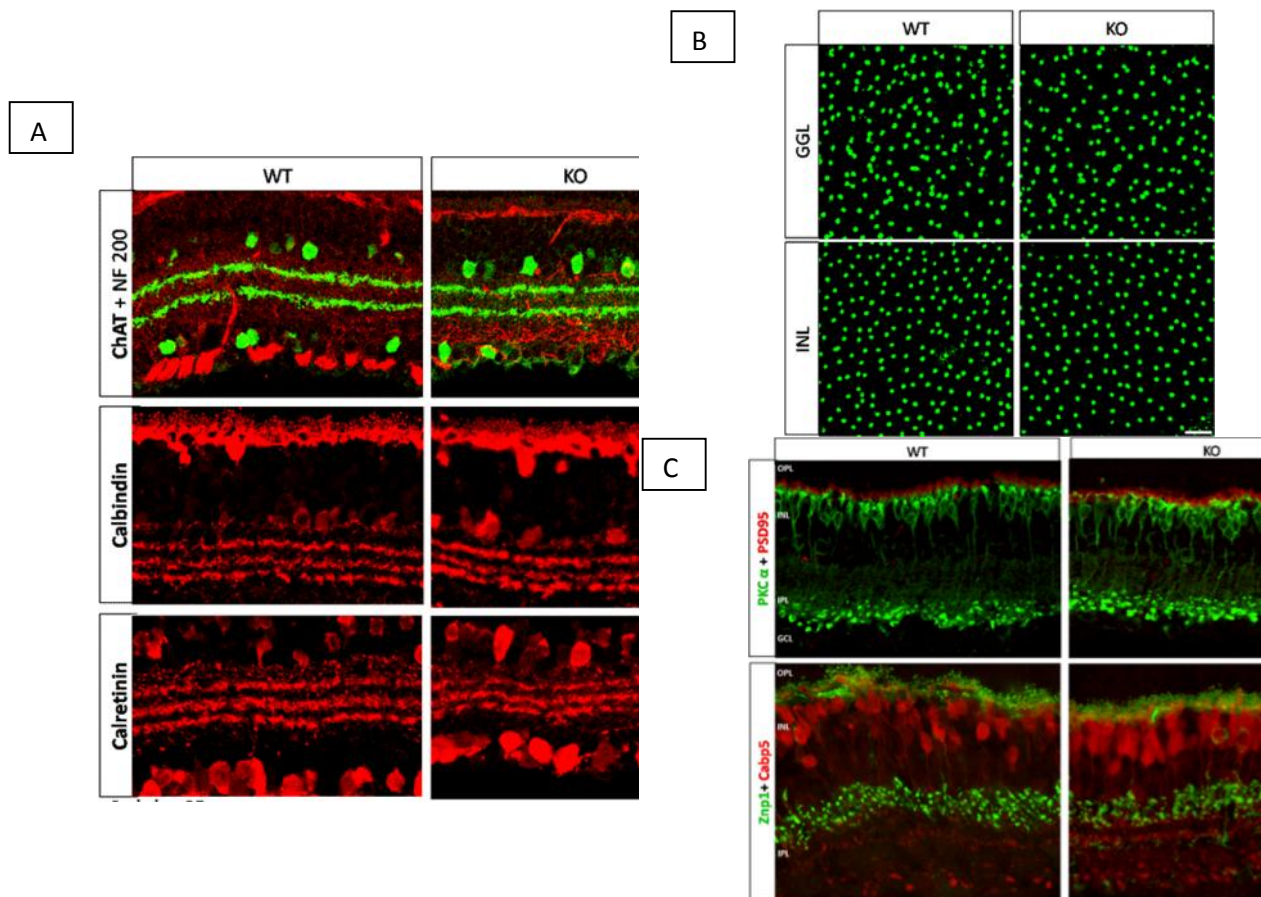
Acest subcapitol prezintă analiza neuronilor din retină, pre-sinapticele celulelor retinale ganglionare în stratul plexiform intern, în contextul unei absențe severe a celulelor retinale ganglionare. Utilizând markeri celulari specifici s-a realizat o analiză cantitativă și calitativă a diferitelor populații celulare.

Inițial, au fost analizați diferiți anticorpi ce marchează benzile formate de arborii dendritici, în stratul plexiform intern. Prima observație generală confirmă rezultatul observat de către Badea și colaboratorii (Badea *et al.*, 2009a), anume că, exceptând o minimă micorare a lății stratului plexiform intern la mutanți, nici o altă modificare nu are loc cu privire la marcharea laminară (Fig. 4A).

Ulterior, s-a realizat o analiză cantitativă și calitativă a întregii retine, urmărind celulele cu care celulele retinale ganglionare au contact direct. Nu s-a observat nicio diferență semnificativă între numărul de celule amacrine colinergice la mutanți, comparativ cu animalele control (Fig. 4B). Celulele bipolare au fost observate utilizându-se anticorpi precum Cabp5, ZNP1 și PKC (Fig. 4C). Examinarea secțiunilor verticale sugerează că morfologia și stratificarea acestor tipuri de neuroni, cât și poziția terminalelor sinaptice nu au fost afectate de absența celor 70% celule retinale ganglionare.

Mai mult, pentru a analiza integritatea componentelor sinaptice în stratul plexiform intern doi markeri diferiți au fost utilizați - CtBP2 (Ribeye), parte constitutivă din sinapsele în panglică, și Cnx36, componentă a sinapselor electrice din stratul plexiform intern. Nicio diferență nu a fost remarcată între punctele specifice pentru cei doi markeri la cele două loturi comparate.





**Figure 4.** Analiza cantitativ și calitativ a laminării stratului plexiform intern, a celulelor amacrine și bipolare în mutații ce Brn3b. (A) Grosimea stratului plexiform intern nu este afectată în mutant. Marcajul cu NF200 în cadranul din dreapta, sus arată că analiza a fost realizată în zona de recombinare completă. Scala: 25μm. (B) Celulele amacrine colinergice analizate în întreaga retină. Corpurile celulare au fost cuantificate atât în stratul celulelor retinale ganglionare cât și în stratul plexiform intern. Scala: 50μm. (C) Markerii pentru celulele bipolare. Nici o diferență nu se poate observa între mutant și control referitor la aceste tipuri de celule, însă nici în cazul densității postsinaptice (PSD95) care marchează terminațiile din stratul plexiform extern. Scala: 25μm.

## **2. Analiza profilurilor de exprimare a genelor în avalfa de Brn3a și Brn3b într-o populație purificată de celule retinale ganglionare**

### **Generarea populației purificate de celule retinale ganglionare**

Cu scopul în elegerii reglatoare de gene care dirijează formarea și specificarea anumitor tipuri de celule într-un esut este foarte important ca acea populație de celule studiate să fie cât mai pură cu puțin pentru acel tip de celulă. În retina oarecelui, celulele retinale

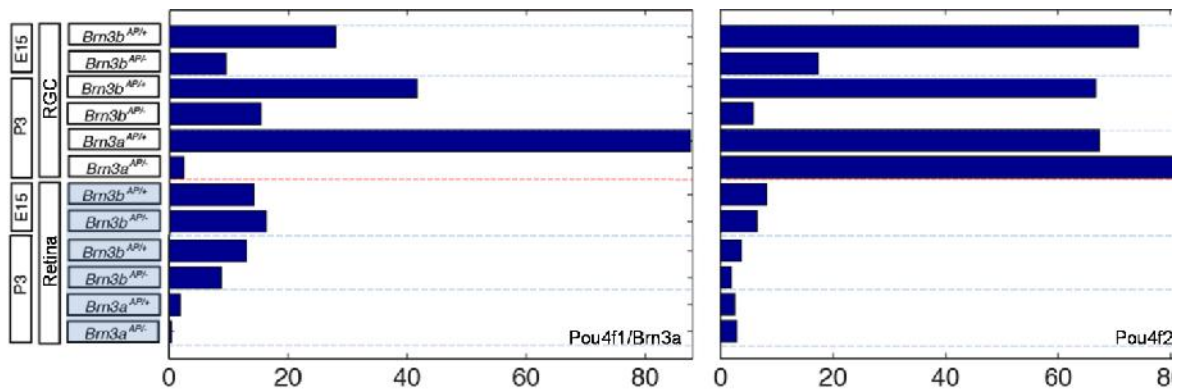
ganglionare reprezintă mai puțin de 1% din numărul total de celule, acest fapt îngreunând procesul de purificare.

Pentru a contrabalansa acest neajuns s-a folosit o metodă imunomagnetică de purificare. Datorită faptului că animalele experimentale au purtat genotipurile  $Brn3^{AP/WT}$  și  $Brn3^{AP/KO}$  a fost posibil izolarea celulelor care exprimă acest gen “reporter”. Fosfataza alcalină (AP) este o proteină fixată la membrană prin glicosilfosfatidilinositol, fiind exprimată doar pe membranele celulare (Berger *et al.*, 1987). Un alt avantaj îl reprezintă faptul că acest model folosit, prin gena de fosfatază alcalină, marchează doar celulele retinale ganglionare, fiind exprimată sub controlul promotorului de  $Brn3a/b$ , factori de transcriere ce se exprimă exclusiv în celulele retinale ganglionare.

Această populație cu puritate înaltă de celule retinale ganglionare a fost apoi procesată în vederea extragerii RNA-ului, urmând ca acesta să fie prelucrat pentru experimentul de secvențiere RNA.

### **Exprimarea genelor Brn3**

Una dintre validările inițiale ale datelor obținute de la secvențiator a fost analiza genelor  $Brn3a$  și  $Brn3b$  în diferitele probe. Rezultatele analizei sunt prezentate în Figura 5. Valorile de exprimare obținute pentru  $Brn3a/b$  în celulele retinale ganglionare versus probele “retina” în cazul datelor provenite de la WT confirmă încă o dată eficiența protocolului de purificare. Ambii factori de transcriere au valori de exprimare ridicate în probele “celule retinale ganglionare WT”, în timp ce valoarea lor în probele “retina” este mică. Compararea exprimării factorilor  $Brn3$  în WT versus mutant, în celulele retinale ganglionare indică faptul că, după cum era de așteptat, exprimarea în mutant este mult mai mică decât în WT. Interesant, exprimarea lui  $Brn3a$  pare să fie reglată negativ în mutantul de  $Brn3b$ , în timp ce exprimarea lui  $Brn3b$  apare ușor reglată pozitiv în mutantul de  $Brn3a$ . Concluzia ce reiese din aceste descoperiri este că cei doi factori de transcriere își influențează exprimarea unul altuia.



**Figure 5.** Analiza exprimării lui Brn3a și a lui Brn3b în celulele retinale ganglionare și în retina (supernatant). Prima jumătate a figurii reprezintă citirile pentru probele provenite de la celulele retinale ganglionare, iar partea de jos este reprezentată de probele “retina”. Valorile de exprimare sunt redată în FPKM.

### Validarea datelor de exprimare pe baza literaturii disponibile

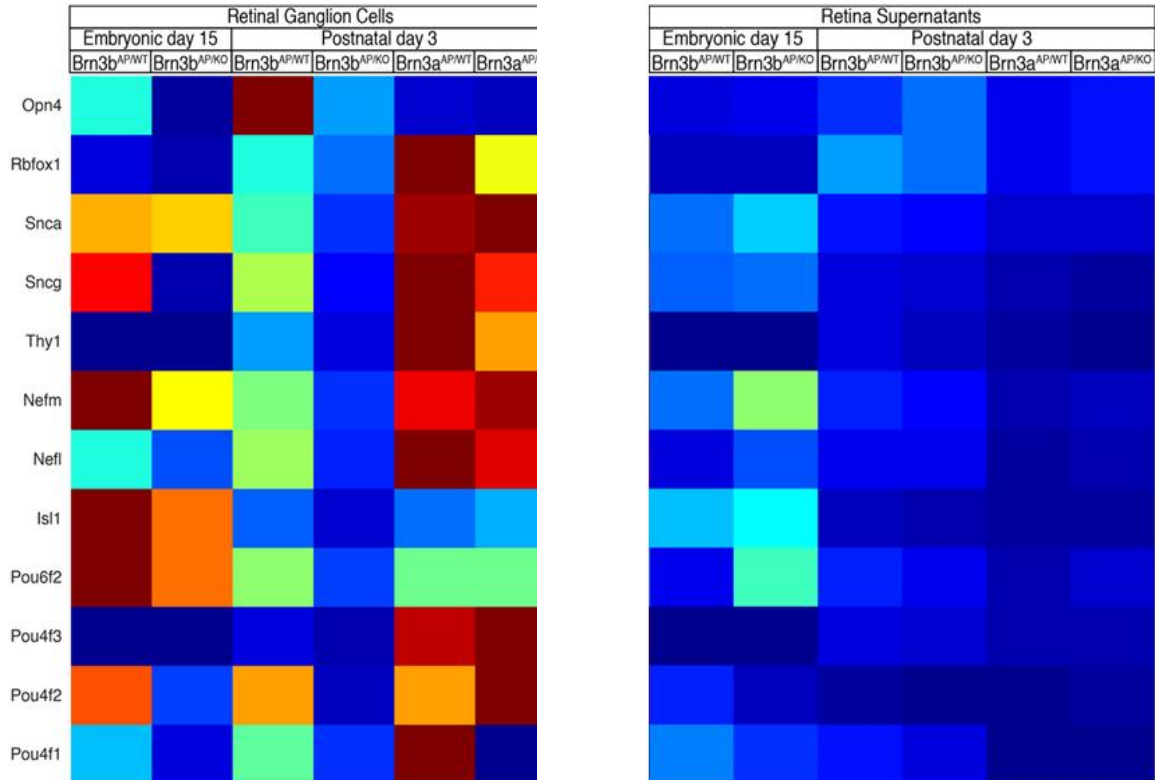
Rezultatele obținute au fost comparate cu date provenind de la publicații ce menționează aceste tipuri de celule și unele gene exprimate la nivelul lor, subliniind genele care sunt înalt exprimate în celulele retinale ganglionare la vârstele analizate.

Figura 6 menționează parte dintre aceste gene, împreună cu valorile lor de exprimare în celulele retinale ganglionare, prezentate în cadranul din stânga, și cele din supernatant (probele “retina”) în partea dreaptă. Nivelurile de exprimare ridicate sunt reprezentate de culori calde (roșu spre galben), iar cele scăzute prin culori reci (nuanțe de albastru). Se poate remarca imediat faptul că toate aceste gene – care au fost selectate pentru exprimarea lor specifică în celulele retinale ganglionare – au niveluri de exprimare foarte scăzute în probele “retina” atât în WT cât și în mutant.

În celulele retinale ganglionare cei doi factori de transcriere Brn3a (Pou4f1) și Brn3b (Pou4f2) prezintă niveluri foarte scăzute în mutațiile lor.

Chiar și din această parte generală, genele par să se grupeze în câteva categorii. Gene precum Snca, Sncg, Nefm, Isll, Pou6f2 prezintă niveluri de exprimare ridicate la E15 (ziua a 15-a embrionară) comparativ cu P3 (ziua a treia postnatal), sugerând faptul că activitatea lor este necesară îndeosebi în timpul dezvoltării în celulele care exprimă factorul Brn3b. Pe de altă parte, genele care sunt exprimate la un nivel ridicat la E15 în probele Brn3b, dar la unul mai scăzut la P3, se observă creșterea în probele de la celulele retinale ganglionare Brn3a, sugerând o interacțiune a celor doi factori de transcriere în vederea specificării și a dezvoltării corecte a

acestor celule. Mai mult, pentru acest set de gene Brn3b pare să fie factorul ce reglează în principal genele la P3, iar în unele cazuri ca Sncg și Nefm, chiar și la E15.



**Figure 6.** Profile de exprimare a unor gene specifice pentru celulele retinale ganglionare în diferitele probe. Reprezentarea genelor specifice pentru celulele retinale ganglionare (stânga), și a celor din probele retin (dreapta). Valorile de exprimare în unitatea FPKM sunt reprezentate ca o hartă de culoare, pe o scală colorată roșu fiind exprimare ridicată, iar albastru exprimare scăzută. Valorile de exprimare sunt normalizate la nivelul maxim de exprimare pentru fiecare gen.

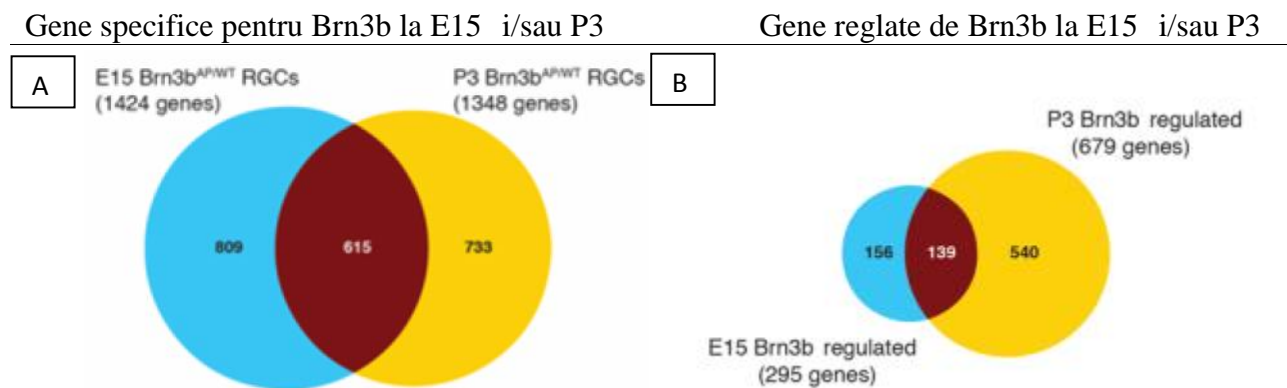
## Clasificarea genelor

### În funcție de specificitatea probelor

Ulterior, întregul set de gene exprimate fie la P3 fie la E15 în probele  $Brn3b^{AP/WT}$  RGC (celule retinale ganglionare,  $Brn3b$  WT) au fost analizate. Aceste gene ar putea eventual să facă distincția dintre neuronii care exprimă  $Brn3b$  și alte tipuri de celule în retină, în timpul dezvoltării. O analiză inițială sugerează că, un număr similar de gene sunt exprimate în probele “ $Brn3b$  RGC” la cele două vârste analizate – 1424 gene la E15 și 1348 de gene la P3 (cercurile

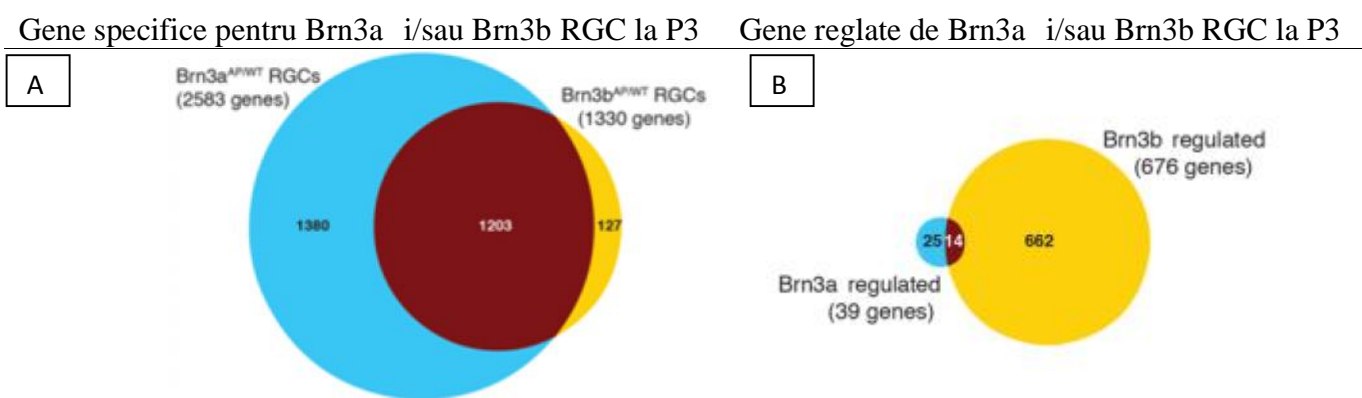
albastre și galbene, Fig. 7, cadranul din stânga). Cu toate acestea, mai puțin de 50% dintre ele (615) exercită același nivel de exprimare la cele două vârste analizate (suprapunerea celor două cercuri în Fig. 7, stânga).

Mai departe, seturi de gene exprimate diferențial în Brn3b KO versus WT RGCs au fost identificate. La E15 se găsesc 156 de gene care sunt exprimate diferențial între WT și mutant (cercuri albastre, Fig. 7, dreapta), în timp ce la P3, 540 de gene au fost identificate ca fiind exprimate diferențial (cercuri galbene, Fig. 7, dreapta). Dintre cele 139 de gene exprimate diferențial la ambele vârste analizate, marea majoritate pare să fie reglate negativ în mutant.



**Figure 7.** Seturi de gene exprimate la E15 versus P3 (A) și seturi de gene potențial reglate de Brn3b (B). Toate genele selectate au nivelul de exprimare mai mare sau egal cu 2 FPKM. Diferența dintre probele RGC și retina, cât și între Brn3b<sup>AP/WT</sup> și Brn3b<sup>AP/KO</sup> este mai mare sau egal cu 2.

Un alt aspect interesant urmărit în acest set de date este identificarea genelor care fac distincția între neuronii care exprimă fie Brn3a fie Brn3b, comparativ cu alte tipuri de celule din retina la P3. Pentru aceasta, genele care sunt specifice pentru probele “celulele retinal ganglionare” (RGC) au fost grupate pe baza specificității lor pentru neuronii care exprimă Brn3a și/sau Brn3b. Genele exprimate în Brn3a<sup>AP/WT</sup> RGCs și the Brn3b<sup>AP/WT</sup> RGCs au fost comparate cu cele din probele “retin”.



**Figure 8.** Seturi de gene exprimate la P3. Toate genele selectate au un nivel de exprimare mai mare sau egal cu 2 FPKM. Diferen a dintre probele “celule retinale ganglionare” (RGC) i “retin ”, ca i diferen a dintre Brn3<sup>AP/WT</sup> i Brn3<sup>AP/KO</sup> este mai mare sau egal cu 2.

Aplicând aceste criterii, 3913 gene au fost observate ca fiind exprimate specific în Brn3a i în Brn3b RGC. Interesant, genele exprimate specific în Brn3a RGC (1380) sunt cu aproximativ de 10 ori mai multe decât cele exprimate în Brn3b RGC (127), mare parte din ele fiind exprimata atât în celulele retinale ganglionare “dublu pozitive” pentru Brn3a/Brn3b (supapunerea celor dou cercuri în Fig. 8).

Informa ii importante reies din analiza genelor care sunt reglate fie de Brn3a sau de Brn3b sau de amandoi factorii de transcriere la P3. Se poate presupune ca aceste gene mediaz diferitele func ii ale celulelor retinal ganglionare Brn3a i Brn3b positive la P3. Cu acest scop, genele exprimate în celulele retinale ganglionare au fost analizate pentru a clasifica genele reglate fie pozitiv fie negativ de c tre Brn3a i/sau Brn3b, comparând datele ob inute de la mutan i (KO) i control (WT). Un aspect interesant este faptul c , dintre numeroasele gene specifice pentru Brn3a sau Brn3a/Brn3b în celulele retinale ganglionare (RGC) – 2583, doar 39 sunt reglate de acest factor de transcriere. Pe de alt parte, Brn3b pare sa fie responsabil pentru reglarea unui num r mai mare de gene specifice celulelor retinale ganglionare. Genele care sunt sub controlul lui Brn3b reprezint aproximativ jum tate din genele care sunt specifice pentru celulele retinale ganglionare care sunt pozitive fie pentru Brn3a i Brn3a/Brn3b (676 versus 1330). Doar 14 gene sunt reglate de c tre ambii factori de transcriere la P3.

### Dup func ia exercitat în esut

Dup analiza seturilor de gene bazat pe specificitatea lor, am desf urat o macro analiz pentru a afla ce fel de categorii de molecule sunt codate de genele rezultate în urma screening-ului. Am realizat o c utare extins în literatura de specialitate c utând eviden e care s atribuie diferitelor molecule func ii fie în diferen ierea celular a neuronilor, morfogenez , interac iuni celul -celul , precum i referitoare la conexiunile sinaptice. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.

Factorii de transcriptie sunt exprima i la nivel înalt în setul de gene exprimate specific în popula iile de celule retinale ganglionare la E15 i la P3, fiind importan i în specificarea celular i localizarea corect la nivelul esutului.

**Table 2. Gene cu func ii în dezvoltarea neuronal , morfogenez , interac iuni celul -celul , precum i în conetivitatea la nivelul sinapselor. Caracterizarea func ional este bazat pe date ob inute din liteatur .**

Familii moleculare	Num r de membrii
Factori de transcriptie	81
Integrine	48
Caderine	11
Protocaderine	18
Efrine (ligan i sau receptori)	3
Semaforine-Plexine-Neuropiline	13
Robo-Slit	2
Domeniu Ig	115
GTPaze mici (GAP, GEF, GDI)	87
Adaptori de structur celular (actin , dinein , kinesin , miosin )	50
Molecule sinaptice (receptori, transportori, canale ionice)	40

### Validarea seturilor de gene ob inute prin secven are RNA

Pentru validarea informa iilor ob inute referitoare la diferitele seturi de gene identificate în urma screening-ului, în special pentru confirmarea faptului ca acele molecule se g sesc în stratul celulelor retinale ganglionare s-a desfa urat un screening folosind metoda hibridiz rii in-situ.

Pentru confirmarea datelor obținute pentru E15 am profitat de baza de date Allen Brain Atlas (ABA). 210 gene care sunt specifice sau regulate de către Brn3b din prezentul set de date apar exprimate în stratul celulelor retinale ganglionare ale unui șoarece normal de laborator C57BL/6, conform ABA.

Referitor la datele obținute la vârsta P3, un screening folosind aceeași metodă a fost dezvoltat pentru confirmarea exprimării genelor la acest moment al dezvoltării, în retină. Criteriile de selecție au fost legate de nivelul de exprimare a genelor respective în celulele retinale ganglionare și/sau să fie reglate fie de Brn3a, fie de Brn3b.

### **Gene specifice pentru celulele retinale ganglionare cu potențial important în dezvoltarea neuronală**

În plus față de analiza generală a genelor care cădeau sub criteriile de 2FPKM/2 ori exprimarea setului de comparație, am realizat o analiză utilizând criterii mai severe. Astfel, au fost alese 14 gene care nu fuseseră analizate anterior ca markeri pentru celulele retinale ganglionare, anume Slc11a1, Slc17a6, Dpp10, Chl1, Adap1, Clstn2, Htr1b, Epb4.9, Slc6a4, Igf1, Kitl, Ctxn3, Synpr and Trhde. Analiza acestor gene scoate în evidență faptul că diferența dintre probele RGC și retina este mai mare decât 10 ori. Majoritatea moleculelor selectate după acest criteriu au fost confirmate în baza de date a Allen Brain Atlas prin hibridizare in situ a retinelor extrase din embrioni de E15, iar parte din ele au fost confirmate ca fiind prezente în stratul celulelor retinale ganglionare și în cursul screeningului realizat pentru retinele extrase de la animale aflate la ziua a treia postnatal.

**Table 3. Gene selectate după criteriile de selecție mai stringente**

	Brn3a P3	Brn3b E15	Brn3b P3
Diferența dintre WT vs KO >5	0	<b>Slc6a4,</b> <b>Ctxn3,</b> Synpr, <b>Igf1,</b> Trhde, Kitl, Slc17a6, Chl1	Ctxn3, Clstn2, <b>Synpr</b>
Diferența dintre RGC vs Ret >10	<b>Slc11a1,</b> <b>Slc17a6,</b> Dpp10, <b>Chl1,</b> <b>Adap1,</b> Clstn2, Htr1b, Epb4.9, Slc6a4	<b>Ctxn3,</b> <b>Slc11a1</b>	Ctxn3, <b>Slc11a1, Slc6a4</b>



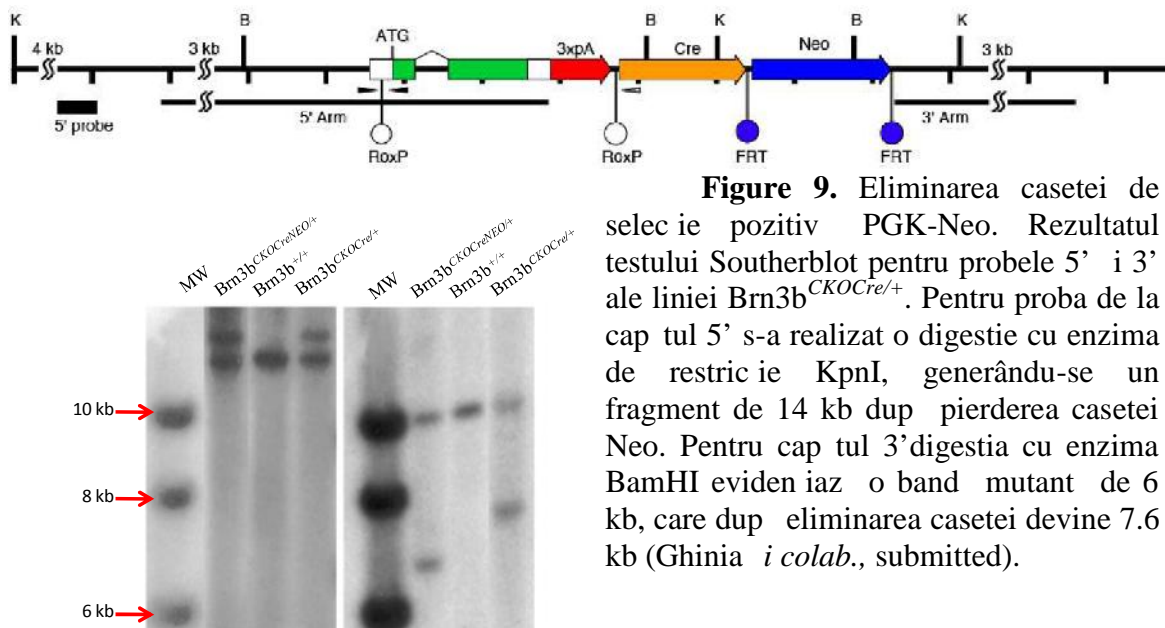
În final, aceste gene, deși nu au fost anterior analizate ca fiind markeri de celule retinale ganglionare, sunt totuși menționate în literatura de specialitate în contextual profilelor de exprimare genică preluate de la celule retinale ganglionare sau de la diferite organe sensoriale, în diferite stadii de dezvoltare (Eng *i colab.*, 2007; Ivanov *i colab.*, 2008; Lu *i colab.*, 2011; Qiu *i colab.*, 2008; Siegert *i colab.*, 2012). Parte din aceste gene au fost analizate anterior în studii referitoare la dezvoltarea neuronală (Matsuyoshi *i colab.*, 2012; Moore *i colab.*, 2007; La Torre *i colab.*, 2012; Rodriguez-de la Rosa *i colab.*, 2012; Upton *i colab.*, 1999; Upton *i colab.*, 2002; Venkateswarlu *i colab.*, 2007).

### **3. Strategia knock-in condițional folosind sistemul dublu de recombinare pentru studiul dezvoltării celulelor retinale ganglionare**

#### **Generarea liniilor mutante $Brn3a^{CKOCre}$ și $Brn3b^{CKOCre}$**

#### **Confirmarea integrării mutației în celulele stem embrionare**

Probele de ADN extrase de la colonii individuale de celule embrionare stem cu genotipul  $Brn3a/b^{CKOCre/+}$  au fost analizate pentru cele două probe, cea de 5' și cea de 3'. Primul test Southernblot a fost desfășurat pe 96 de clone diferite pentru fiecare linie, obținându-se un rezultat pozitiv în 68% din clone, fapt ce indică un randament ridicat al integrării și selecției. Integrarea este reprezentată de prezența atât a unei benzi WT (de 19 kb pentru  $Brn3a$  și de 6 kb pentru  $Brn3b$ ) și a unei benzi mutante (23.5 kb și, respectiv 10 kb).



**Figure 9.** Eliminarea casetei de selec ie pozitiv PGK-Neo. Rezultatul testului Southernblot pentru probele 5' i 3' ale liniei  $Brn3b^{CKOCre/+}$ . Pentru proba de la cap tul 5' s-a realizat o digestie cu enzima de restric ie KpnI, generându-se un fragment de 14 kb dup pierderea casetei Neo. Pentru cap tul 3' digestia cu enzima BamHI eviden iaz o band mutant de 6 kb, care dup eliminarea casetei devine 7.6 kb (Ghinia *i colab.*, submitted).

Dup propagarea a 12 clone alese dintre cele pozitive la prima testare, un al doilea test southernblot a fost desf urat pentru a reconfirma rezultatul. Mai mult, dup încruci area liniilor cu o linie ce poart recombinaza Flp, probele de ADN extrase din prima generatie de mutan i au fost testate cu acelasi test pentru verificarea elimin rii casetei pentru selec ie pozitiv , acesta prezentând un randament de 100%.

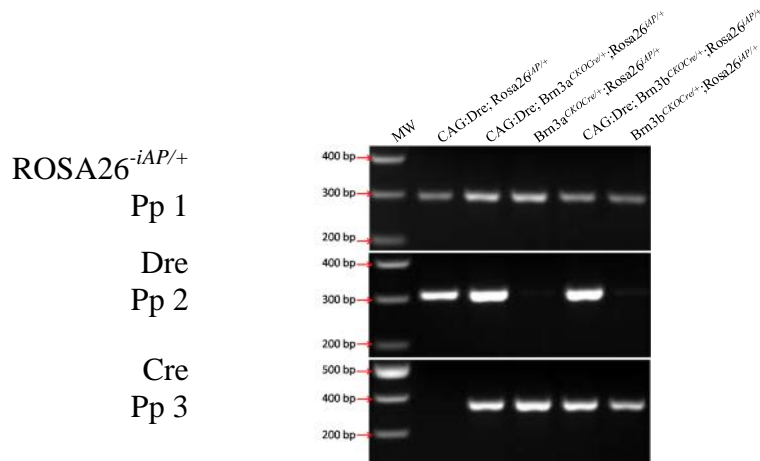
### Mutan i tripli: $CAG:Dre$ ; $Brn3^{CKOCre}$ ; $ROSA26^{iAP/+}$

Ini ial, pentru a testa recombinarea Dre a celor dou situsuri RoxP, am profitat de transgena  $CAG:Dre$  (Anastasiadis *i colab.*, 2009), care exprim ubicuu recombinaza Dre. În ceea ce prive te linia “reporter”,  $ROSA26^{iAP}$  (Badea *i colab.*, 2003) a fost folosit pentru exprimarea fosfatazei alcaline, dup recombinarea Cre. Secven a evenimentelor de recombinare începe cu exprimarea recombinazei Dre devreme în timpul dezvolt rii sau în linia germinativ , urmat de eliminarea conditionat a genei  $Brn3$ , care induce exprimarea recombinazei Cre sub controlul promoterului de  $Brn3$ .

În linia  $ROSA26^{iAP}$  cel de-al doilea exon urmat de semnale adi ionale de terminare este inversat i flancat de dou situsuri LoxP, prin urmare, în absen a recombin rii transcriptia

fosfatazei alcaline este imposibil. După recombinarea celor două situsuri *LoxP* sub acțiunea recombinazei Cre, componentele inversate se poziționează în orientare normală, permițând procesarea corectă a celor doi exoni, și, prin urmare, transcrierea fosfatazei alcaline (AP) (Badea *et al.*, 2009b).

Reacții PCR au fost realizate pentru genotiparea ADN-ului în vederea identificării diferitelor elemente: fosfataza alcalină (AP), recombinazele Cre și Dre (Fig. 10). După cum era de așteptat, în combinația CAG:Dre; ROSA26<sup>iAP/+</sup> au rezultat produse perechi de amorse pentru recombinaza Dre și pentru fosfataza alcalină. În combinația Brn3a/b<sup>CKOCre/+</sup>; ROSA26<sup>iAP/+</sup> au prezentat produs de PCR amorsele pentru fosfataza alcalină și recombinaza Cre, în timp ce în cazul tripului transgenic, toate cele trei perechi de amorse (1, 2, 3) au rezultat produs de PCR.



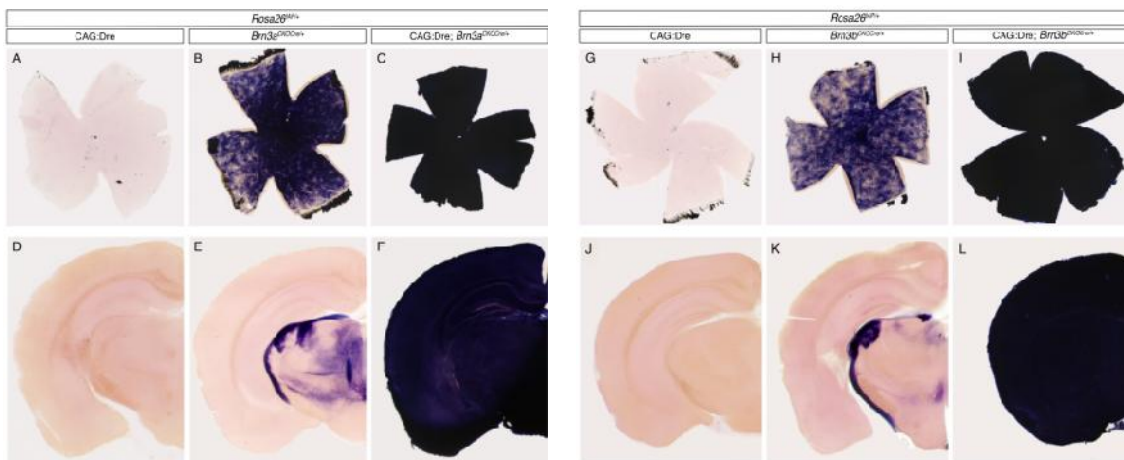
**Figure 10.** PCR de genotipare a animalelor mutante ce poartă diferitele elemente. Analiza ADN-ului de la CAG:Dre; ROSA26<sup>iAP/+</sup> a prezentat produs de PCR pentru AP și Dre. Cele trei perechi de amorse (1, 2 and 3) au rezultat produs PCR în CAG:Dre; Brn3a/b<sup>CKOCre/+</sup>; ROSA26<sup>iAP/+</sup> iar în cazul mutantului Brn3a/b<sup>CKOCre/+</sup>; ROSA<sup>iAP/+</sup> nici o bandă pentru perechea de amorse 2 (Dre).

### Recombinare Dre și Cre în oarecele adult

Atât retinele cât și secțiunile din creierul celor trei tipuri de animale mutante au fost analizate în vederea depistării exprimării genei “reporter”, fosfataza alcalină (AP). Surprinzător, ambele tipuri de preparate în cazul mutantului triplu au prezentat reactivitate completă pentru fosfataza alcalină, indicând recombinație ubiquină a recombinazei Cre.

esuturi procesate în condiții similare extrase de la animale purtând genotipul CAG:Dre; ROSA26<sup>iAP/+</sup> au fost complet negative pentru reacția fosfatazei alcaline, confirmând că recombinaza Dre nu poate media recombinația între două situsuri LoxP.

În plus, retinele animalelor cu genotipul Brn3a/b<sup>CKOCre/+</sup>; ROSA26<sup>iAP/+</sup> prezintă puține în reactivitate a fosfatazei alcaline în celulele retinale ganglionare, sugerând exprimarea independentă a recombinazei Dre față de Cre exprimat din alela Brn3a/b<sup>CKOCre</sup>, posibil datorat unui fenomen de citire-prin (read through) sau a codificării a recombinazei Cre, în ciuda semnalului de terminare adițional prezent în ambele constructe.



**Figure 11.** Analiza tesuturilor prelevate de la animale ce poartă sistemul dublu de recombinație, sugerând exprimarea ubiquit timpurie a recombinazei Cre. Preparate întregi de retină extrase din animale adulte (A-C, G-I), cât și emisfere ale secțiunilor coronare de creier (D-F, J-L) au fost examinate pentru activitatea fosfatazei alcaline. În cazul mutantului CAG:Dre; ROSA26<sup>iAP/+</sup> (A, D, G, J), exprimarea recombinazei Dre în linia germinativă nu rezultă în exprimarea fosfatazei alcaline. Esuturi cu genotipul Brn3<sup>CKOCre/+</sup>; ROSA26<sup>iAP/+</sup> prezintă exprimarea fosfatazei alcaline în background, în absența recombinazei Dre. În cazul mutantilor tripli fosfataza alcalină este exprimată ubiquit ca rezultat al recombinației Cre la locusul ROSA26<sup>iAP/+</sup> în întregul esut sau marea majoritate a acestuia. A, C, D, F n=4, G, J n=6, B, E n=9, H, I, K, L n=13 (Ghinia *in colab.*, submis).

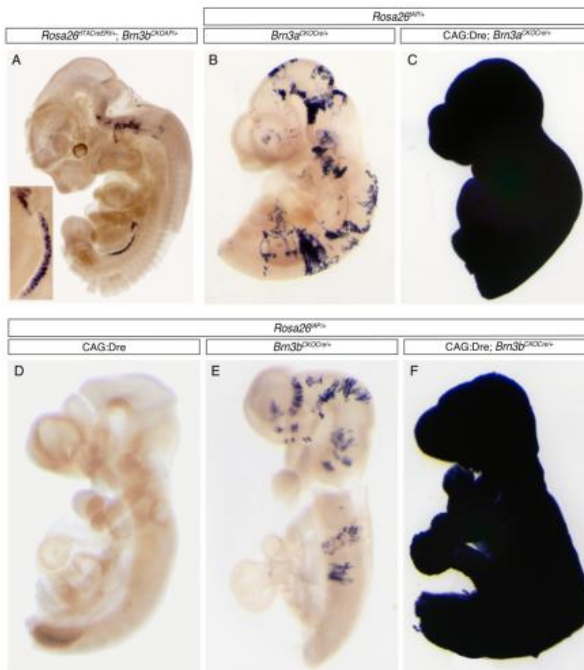
### Recombinația timpurie-ubiquit a recombinazei Cre de la locusul endogen de Brn3a și Brn3b

Pentru a analiza exprimarea recombinazei Cre de la alelele Brn3a/b<sup>CKOCre</sup> câiva mutații având cele trei elemente au fost analizate la a 9-a zi embrionară. Mutațiile tripli CAG:Dre; Brn3<sup>CKOCre/+</sup>; ROSA26<sup>iAP/+</sup> prezintă exprimarea omogenă a genei “reporter” AP, indicând

exprimarea ubiquitoasă sau în linia germinativă a recombinazei Cre sub controlul promoterilor de Brn3a/Brn3b.

În experimente anterioare, oareci cu genotipul  $ROSA26^{rtTACreER}; Brn3b^{CKOAP}$  (Badea *i colab.*, 2009b) au fost folosiți pentru investigarea specificității promoterului genei Brn3b în diverse esuturi, în timpul dezvoltării. În aceste oareci, inducerea recombinării Cre de la locusul ROSA26 rezultă în recombinația la locusul Brn3, rezultând o alelă de unde AP este exprimat sub controlul promoterului Brn3. După cum se poate observa în Fig. 12 (A), activitatea fosfatazei alcaline în embrionii acestei linii mutante poate fi detectată în creștele germinative. Aceste descoperiri sugerează că promoterul genei Brn3 este activ în linia germinativă. Prin urmare, este foarte posibil ca exprimarea omogenă a genei “reporter” AP în transgenele triple  $CAG:Dre; Brn3^{CKOCre/+}; ROSA26^{iAP/+}$  să fie rezultatul recombinării mediate de Cre în linia germinativă.

În cazul transgenelor duble ( $CAG:Dre; ROSA26^{iAP/+}$  și  $Brn3^{CKOCre/+}; ROSA26^{iAP/+}$ ) se pot observa tiparuri de exprimare asemănătoare celor din adult, anume, nici un fel de exprimare în prima, și exprimare pe alocuri în cea de-a doua. Toate încrucișările, atât la masculi cât și la femele, au purtat alelele  $Brn3^{CKOCre}$ .



**Figure 12.** Expresia timpurie a recombinazei Cre în oarecii având genotipul  $CAG:Dre; Brn3^{CKOCre}; ROSA26^{APi/WT}$ . Marcarea întregii retine extras de la embrioni de E12.5 cu genotipul  $ROSA26^{rtTACreER}; Brn3b^{CKOAP}$  sugerează exprimarea fosfatazei alcaline în creștele germinative (A, stânga). Embrioni cu vârsta E9.5 prezintă exprimarea fosfatazei alcaline în întreg esutul animalelor  $CAG:Dre; Brn3^{CKOCre}; ROSA26^{APi/WT}$  și pe alocuri în cele  $Brn3^{CKOCre}; ROSA26^{iAP/WT}$ . Ca și în esuturile extrase de la adult, nu s-a constatat exprimarea genei “reporter” în animale cu genotipul  $CAG:Dre; ROSA26^{iAP/WT}$ . B n=9, C n=6, D, E n=4, F n=1 Ghinea *i colab.*, submis).

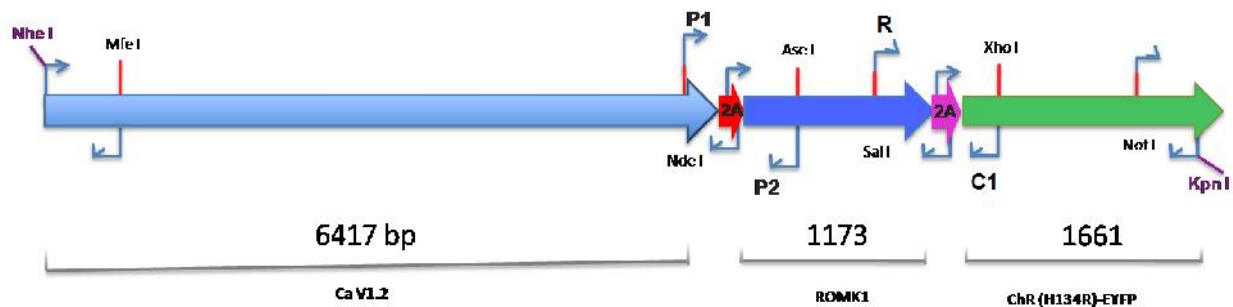
#### 4. Noi instrumente pentru viitorul studiu al circuitelor neuronale retinale

În acest proiect, trei linii de celule au fost create. Inițial, linia CaPoChR2 constă în trei elemente: un canal de calciu, unul de potasiu precum și un canal cationic, sensibil la lumină – Channelrhodopsin (ChR2). Toate cele trei elemente au fost inserate la o singură locație în genomul celulelor HEK293 FlpIn prin intermediul vectorului pcDNA5/FRT. Ulterior, secvența codificatoare a genei de ChR2 a fost clonată în același vector folosindu-se aceeași strategie. În final, cea de-a treia linie de celule a pornit având la bază linia CaPoChR2, asupra căreia cADN-ul genei de ChR2 a fost supraexprimat prin exprimare randomică.

##### Genotiparea diferentelor elemente din celule

Pentru a verifica prezența fiecărui element din diferitele linii celulare, mai multe clone au fost dissociate, ADN-ul genomic fiind extras și au fost efectuate reacții de PCR.

Pentru linia CaPoChR2 cât și pentru cea gChR2, integrarea corectă a elementelor a fost verificată folosind perechile de amorse P1-P2, respective R-C1. Prin folosirea acestor combinații a fost posibil verificarea capătului 3' al secvenței canalului de Calciu și capătul 5' al celei de ROMK1, iar în cel de-al doilea caz, capătul 3' al secvenței genei ROMK1 și capătul 5' al ChR2-EYFP.



**Figure 13.** Constructul CaPoChR2. Cele trei elemente – canalul de Ca, cel de K și Channelrhodopsin au fost asamblate împreună prin intermediul secvențelor peptidice 2A. Perechile de amorse P1-P2 și R-C1 au fost folosite atât pentru construcția secvențelor 2A cât și pentru genotiparea diferentelor linii de celule.

Pentru faptul că linia gChR2 a fost creată pe baza liniei HEK293-CaPoChR2, clonele au fost testate pentru aceleași elemente, folosindu-se aceleași seturi de amorse. În plus, acestea au mai fost testate și cu perechile Ca1 și Ca2, precum și C2-C3.

Pentru linia care conține doar secvența de codificare a ChR2 singura validare prin reacție PCR a fost pentru capătul 3' a ChR2-EYFP.

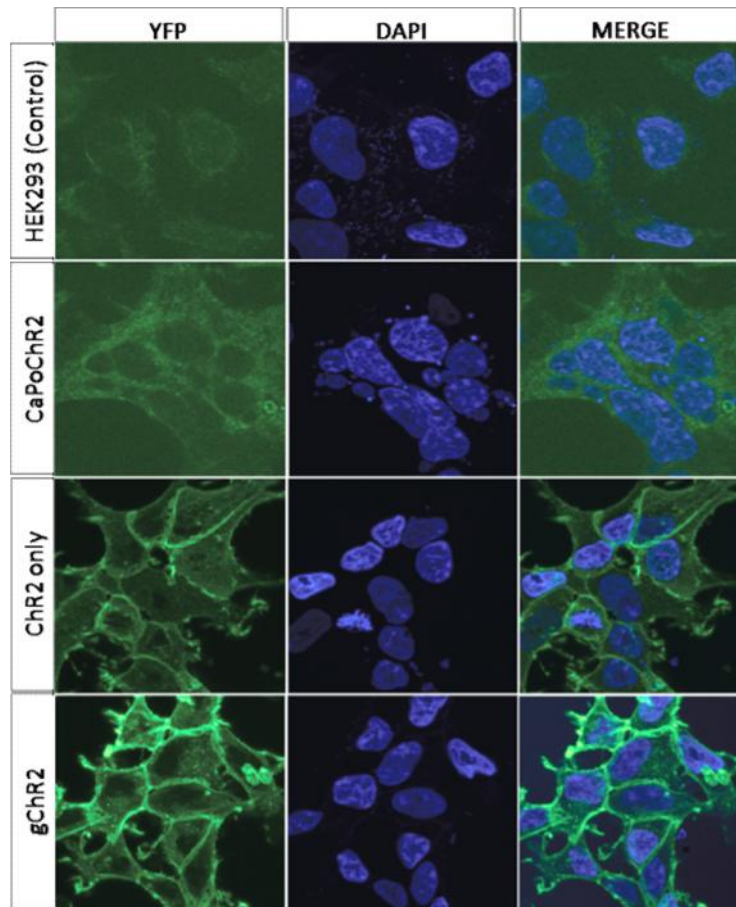
### **Fluorescența YFP în diferitele linii celulare**

Controlul inițial al integrității fluorescenței YFP în prima linie de celule CaPoChR2 a scos în evidență faptul că acestea prezintă fluorescență în comparație cu controlul negativ, celulele HEK293 FlpIn. Cu toate acestea, un experiment pilot în care celule HEK293 FlpIn au fost transfectate transient cu ChR2-EYFP, a scos în evidență faptul că nivelul de fluorescență acestora este mult mai ridicat în comparație cu cel obișnuit de la linia CaPoChR2.

Acest aspect a generat crearea liniei ChR2 în care secvența de codificare a genei ChR2-EYFP este exprimată unic în celulele HEK293 FlpIn prin intermediul sistemului de recombinare FlpIn. Intensitatea fluorescenței EYFP în celulele acestei linii este de cel puțin 10 ori mai mare comparativ cu cea exprimată de linia CaPoChR2.

În ciuda acestui fapt, linia care exprimă doar ChR2 nu este suficientă pentru a atinge scopul inițial al proiectului.

Prin urmare linia gChR a fost creată pentru a îndeplini scopul principal, acela de a conține cele trei elemente CaV1.2, ROMK1 și ChR2-EYFP. În plus, prin supra exprimarea secvenței de codificare de ChR2-EYFP, nivelul de fluorescență, deci nivelul de sensibilitate la lumină a fost crescut. Fig. 14 prezintă nivelele de intensitate ale fluorescenței ale tuturor celor 3 linii de celule.



**Figure 14.** Fluorescența YFP în diferite celule apar în rândul diferitelor linii. CaPoChR2, linie ce conține calciu, potasiu și ChR2. gChR2 – linia CaPoChR2 în care este supraexprimat secvența ChR2. DAPI – marker nuclear.

### **Analiza Patch Clamp a liniilor CaPoChR2 și ChR2**

Celule ce poartă mutația CaPoChR2 răspund la lumină când sunt supuse unor diferiți stimuli cu curenți care ajung la 150 pA când lumină constantă a fost transmisă prin stimuli lungi de 0.2 s, de 10 ori. În schimb, prin transmiterea stimulului luminos constant și variat pentru 10 ori, 2s, curentul rezultat este mai scăzut, cu toate că răspunsul este mai lung. În general, același tipar a fost observat și în cazul celulelor cu ChR2 unic. Cu toate acestea, răspunsul de depolarizare în acest caz este de 8 nA, similar în aceleași condiții testate, de 53 de ori mai mare decât cea testată anterior.

Aceste descoperiri sugerează că proteina ChR2 nu este exprimată în linia CaPoChR2 atât de intens ca și în cea care conține doar secvența ChR2. Acest efect poate fi datorat imposibilității peptidelor de legătură 2A de a oferi o rație molară egală între cele două proteine legate.



## Discu ii Generale

Este cunoscut faptul c sistemul nervos central posed plasticitate având capacitatea de a se adapta i reorganiza în cursul dezvolt rii, procesului de învațare iar de asemenea in condiții patologice. Retina, parte a sistemului nervos central, este un țesut foarte dinamic iar drept urmare sufer diverse grade de reorganizare în decursul dezvolt rii sale. Celulele retinale ganglionare trec prin diverse etape de dezvoltare, de la decizia de a deveni o clasa particular de celule, până la adoptarea unui tip specific de arbore dendritic i interacțiunea cu celulele învecinate.

Diverse modific ri patologice la nivelul retinei au fost caracterizate în ultimii ani, în special la nivelul fotoreceptorilor. Așa numitele remodelări la nivelul retinei, consecința a degener rii fotoreceptorilor, sunt caracterizate de modific ri severe în ceea ce prive te integritatea diverselor tipuri de neuroni situați distal, uneori ducând până la moartea anumitor tipuri de cellule, precum cele bipolare sau amacrine. Celulele retinale ganglionare, însa, tind s ramân neafectate, sugerând faptul c acestea reprezint o populație de neuroni intrinsec stabilă.

În prima parte a acestei teze am luat în considerare situația opusă – i anume care este impactul unei reduceri drastice in numarul celulelor retinale ganglionare asupra structurii globale aretinei. Pentru aceasta, am folosit un model experimental de soarece, la care am înl turat factorul de transcripție Brn3b, o moleculă strict specifică pentru celulele retinale ganglionare de la nivelul retinei de soarece, cu rol esențial pentru dezvoltarea normală a acestei clase de celule.

Diverși marcări utilizați pentru aprecierea modului de laminare a stratului plexiform intern , au fost direcționați către identificarea celulelor presinaptice precum și a celulelor bipolar și a moleculelor ce reflectă densitatea sinapselor panglică și a celor electrice. Toți acești markeri nu au ar tat modific ri la nivelul mutan ilor de Brn3b comparativ cu lotul control.

Aceast dependență relativă a celulelor din straturile interne ale retinei a fost demonstrată în cadrul mai multor studii. De exemplu, se cunoa te faptul c celulele amacrine sunt în mare parte independente de celulele retinale ganglionare, în ciuda faptului c acestea din urm reprezint un partener post-sinaptic major. Studiile în care nervul optic a fost lezat, ducând la moartea acestora au demonstrat faptul c celulele amacrine r mân intacte, men inându- i stratificarea lor normal la nivelul stratului plexiform intern (revizuit in Chalupa and Gunhan,

2004). Eliminarea genetică a unui număr mare de celule retinale ganglionare la animalele mutante la nivelul genei *Math5*, au demonstrat rezultate similare (Brown *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001).

Rezultatele prezentate în prima parte a tezei întresc cele menționate mai sus, sugerând faptul că neuronii de la nivelul retinei prezintă autonomie în timpul fazelor de arborizare, laminare iar, mai târziu, supraviețuire. Acest aspect prezintă interes în patologia retiniană din două puncte de vedere. În primul rând, oferă noi posibilități în potențiala tratare a bolilor care afectează primar nervul optic, cum ar fi nevrita optică. Tratamentele cu celule stem care urmăresc regenerarea celulelor retinale ganglionare pot aduce beneficii doar în cazul în care restul retinei rămâne intactă. În al doilea rând, în bolile degenerative care afectează primar fotoreceptorii, implanturile protetice pot beneficia de faptul că celulele retinale ganglionare rămân în mare parte intacte.

Pentru a investiga în detaliu care sunt programele genetice care duc la dezvoltarea celulelor retinale ganglionare, în cadrul acestei teze au fost investigate efectele înlocuirii genice prin recombinare omoloagă a genelor care codifică factorii de transcriere *Brn3a* și *Brn3b*. Analiza fenotipurilor *Brn3 a/b* dezvoltată o parte din programele genetice care duc la dezvoltarea celulelor retinale ganglionare. Folosind un tip particular de mutații *Brn3a* și *Brn3b* a fost posibil izolarea unor populații îmbogățite de celule retinale ganglionare la anumite momente specifice în decursul dezvoltării lor, urmat de studii de expresie genetică la nivelul acestora.

Gena “reporter” folosită, fosfataza alcalină (AP) care înlocuiește gena *Brn3* în urma procesului de recombinare genetică, permite vizualizarea și de asemenea purificarea acestor celule, prin folosirea unor anticorpi direcționați împotriva AP exprimată la nivelurile membranei celulare. Rezultatul acestui proces este o populație îmbogățită în celule retinale ganglionare care ARN-ul a fost izolat și utilizat în scopul secvențierii RNA (RNA-seq).

Acest screening a urmărit să identifice dacă există variații la nivelul tiparelor de exprimare genetică în cursul dezvoltării celulelor retinale ganglionare; drept urmare, populațiile de celule care exprimă *Brn3b* au fost analizate la două momente cheie – E15 și P3, iar cele care exprimă *Brn3a* doar la P3. Diferite etape de dezvoltare, precum dezvoltarea axonului, a arborelui dendritic sau interacțiunea cu celulele vecine, implică activarea unor seturi diferite de molecule.

Datele obținute în acest fel permit analiza comparativă a genelor specifice pentru Brn3a și/sau Brn3b la P3, iar, de asemenea, a celor specifice pentru Brn3b la E15.

În primul rând, așa cum am ilustrat în secțiunea de Rezultate, există de 10 ori mai multe gene induse de c tre Brn3a față de Brn3b atunci când comparăm datele de exprimare genică obținute de la celulele retinale ganglionare care exprimă unul sau celalalt factor de transcriere.

Marea majoritate a genelor care sunt induse de c tre Brn3b se suprapun cu cele induse de c tre Brn3a, în proporție de 90%. Cu toate acestea, genele induse de către Brn3a se suprapun cu cele induse de c tre Brn3b doar în proporție de 47%. Se cunoaște faptul că celulele retinale ganglionare pozitive pentru Brn3b prezintă un arbore dendritic mai lat și mai puțin arborizat. La nivel funcțional, dimensiunea arborelui dendritic prezintă o caracteristică importantă, deoarece reflectă dimensiunea câmpului dendritic (Masland, 2012).

În ceea ce privește specificarea celulelor retinale ganglionare, există câteva aspecte diferite între cele pozitive pentru Brn3a comparativ cu cele pozitive pentru Brn3b. Mai multe grupuri au dezvoltat faptul că, pe lângă rolul lor de dicta diferențele dintre diverse tipuri de celule, factorii de transcriere Brn3 au de asemenea funcții generale. Brn3b joacă un rol important în dezvoltarea axonilor, în timp ce Brn3a este necesar pentru dezvoltarea corectă a arborilor dendritici (Erkman *et al.*, 1996; Gan *et al.*, 1996; Erkman *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Badea *et al.*, 2009a; Badea and Nathans, 2011). Întrebarea principală este cum ajung programele genetice controlate de c tre diverși membri ai familiei Brn3 să confere o anumită structură și funcție celulelor care le exprimă.

Experimentele realizate în această teză oferă un set enorm de date care pot fi explorate pe viitor. Ideea generală este de a identifica conexiuni funcționale între aceste gene, care n-au fost descrise anterior, în special cele care determină ca diverse celule retinale ganglionare să adopte o anumită structură și funcție. Un alt aspect important este identificarea genelor care sunt esențiale pentru acest proces și de a le utiliza, posibil, pentru terapii genetice care vizează restaurarea anumitor funcții.

În cadrul acestei teze am prezentat de asemenea dezvoltarea unor instrumente genetice care să permită studierea cu înaltă rezoluție a rolului pe care aceste gene îl joacă în cadrul procesului de diferențiere a celulelor retinale ganglionare. Au fost create două linii mutante, în care, prin folosirea sistemului de recombinare dublă, se poate asigura exprimarea unei anumite

gene doar la nivelul unui anumit tip de țesut. Ca un exemplu teoretic, propun gena X din setul de gene care sunt specifice pentru i reglate de c tre Brn3b, situat in aval de Brn3b. Sa presupunem c gena X conține o secvență specifică în promoterul său, de care factorul de transcriere Brn3b se leag în mod direct. Se poate în felul aceasta proiecta un mutant în care gena “reporter” este flancat de doua situsuri LoxP, urmat de secven a codificatoare a genei X, construct care poate fi integrat prin transducție virală la nivelul retinei unei linii de șoarece Brn3b<sup>CKOCre</sup>. Ca urmare a recombinării celor doua situsuri LoxP, gena “reporter” este eliminat iar gena X devine activ sub controlul direct al promoterului de Brn3b, asigurand expresia acesteia doar în celulele pozitive pentru Brn3b. În momentul de față, aceasta reprezintă singura posibilitate de a testa influența genei X asupra unui subset de celule retinale ganglionare. Cu toate acestea, așa cum am aratat în capitolul III, acest sistem are anumite limit ri. În primul rând, pentru a obține rezultatul dorit la sfârșitul recombinării, liniile necesit a fi încruciate cu o recombinaz Dre care s se exprime specific la nivelul retinei. Într-adevar, cea folosita până în momentul de față, care exprim Dre în linia germinativ , (CAG:Dre) duce la exprimarea genei “reporter” la nivelul întregului organism. Ca și soluție, transgenele pot fi generate în așa fel încat recombinaza Dre să fie sub controlul unor gene specifice pentru retin (ca de exemplu, Pax6).

În final, trei linii celulare au fost generate, în care instrumentul optogenetic Channelrhodopsin (ChR) a fost exprimat în mod diferit, împreun cu canale adiționale de calciu i potasiu. Liniile celulare au fost generate în a a fel încat s fie adecvate pentru studii de electrofiziologie la nivel neuronal, far s fie necesar lezarea oric rui tip de țesut neuronal.

În ceea ce prive te elaborarea acestor linii celulare, în special linia CaPoChR2 care contine toate cele trei elemente – canalele de Ca i K, precum i ChR2 - s-a urmarit ca toate acestea s fie exprimate la un locus unic în cadrul genomului celular. Studiile de fluorescență au aratat, îns , c exprimarea de ChR-EYFP este mai redusa în liniile care exprim canalele de Ca i K comparativ cu linia în care doar ChR2 este exprimat de c tre vectorul pcDNA5/FRT. Aceasta sugereaz ca faptul c peptidele de leg turp 2A prezint limitari în ceea ce prive te rata de exprimare a elementelor pe care le leag . O explicație poate fi faptul că toate cele trei canale sunt proteine complexe ce necesit diverse rearanjamente pentru a- i exercita funcțiile, mai ales în cazul lui ChR2, care este o protein transmembranar .

## Concluzii

Această teză furnizează noi informații despre biologia celulelor retinale ganglionare, clarificând diferite aspecte.

În primul rând, în prezenta teză s-a arătat faptul că diverse tipuri de neuroni aparținând retinei (fotoreceptori, celule orizontale, bipolare și amacrine) și, de asemenea, densitatea sinapselor panglice și cea a celor electrice nu sunt semnificativ afectate de reducerea drastică a numărului de celule retinale ganglionare. Aceste evidențe susțin ipoteza că arhitectura generală a retinei și conexiunile care se stabilesc la nivelul ei sunt dictate de programe genetice, care sunt în mare parte autonome la nivelul celulei și nu pot fi afectate în mod specific prin manipularea acestor factori de transcriere.

În al doilea rând, au fost investigate programele genetice care duc la dezvoltarea și diferențierea normală a diferitelor seturi de celule retinale ganglionare. Folosind un protocol relativ rapid, am reușit să purificăm o populație de celule îmbogățită în celule retinale ganglionare, optimă pentru experimente subsecvente de exprimare genetică la nivel de ARN-ului. Analiza profilurilor de exprimare genică a fost realizată utilizând metode de generație nouă (RNA-seq), ceea ce a furnizat informații importante privind diferite seturi de gene care determină seturi distincte la nivelul celulei retinale ganglionare; o mare parte din date au fost confirmate prin hibridizare *in situ*.

Două linii de oareci mutanți au fost generate, în care genele *Brn3a* și *Brn3b* au fost înlocuite cu recombinaza Cre. În cadrul acestor linii, exprimarea recombinazei Cre este condiționată de recombinarea celor două situsuri RoxP care este marcată prin gena *Brn3* respectiv și care sunt foarte specifice pentru recombinaza Dre. Acest sistem de recombinare dublă permite analiza diverselor evenimente a căror țintă sunt subseturi de celule retinale ganglionare.

În final, au fost generate linii stabile de celule HEK293, care exprimă diferite combinații dintre un canal cationic sensibil la lumină (ChR2), un canal de calciu dependent de voltaj (CaV1.2) și un canal de potasiu (ROMK1). Acest tip de linii celulare își vor găsi aplicații largi în cadrul studiilor ce implică procese de depolarizare cu temporizare precisă la nivelul membranei.