



新一代基于G蛋白偶联受体构建的高灵敏红色和绿色荧光多巴胺探针

周小娟, 李莹*

北京脑科学与类脑研究所, 北京 102206

* 联系人, E-mail: liying@cibr.ac.cn

A new generation of highly sensitive green and red GRAB_{DA} sensors

Xiaojuan Zhou & Ying Li*

Chinese Institute for Brain Research, Beijing 102206, China

* Corresponding author, E-mail: liying@cibr.ac.cn

doi: [10.1360/TB-2023-1311](https://doi.org/10.1360/TB-2023-1311)

多巴胺(dopamine, DA)是哺乳动物神经系统中最重要神经递质之一。从运动控制到学习动机, DA几乎直接或间接参与中枢神经系统中所有生理过程^[1]。除了具有神经递质的作用外, DA还是其他儿茶酚胺如去甲肾上腺素和肾上腺素的前体, 参与体内稳态的维持^[2]。DA失调可能导致许多精神疾病, 如抑郁症、精神分裂症和帕金森氏症等^[3]。因此, 在分子、细胞、环路等层面精确地检测DA如何参与并调节正常生理和病理过程, 对更深入地了解疾病的发病机制和临床药物的开发具有重要意义。

DA是由多巴胺能神经元产生和释放的, 这些神经元主要分布在黑质致密部(substantia nigra pars compacta, SNc)和腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)^[4]。多巴胺能神经元轴突末梢投射到整个中枢神经系统并具有高度空间异质性^[5]。正因如此, DA释放模式呈现高度的时空差异性和复杂性, 使得精确检测其释放的难度大大增加。长久以来, 研究者开发了一系列检测DA的方法, 如微透析法^[6]、电化学法^[7]和荧光成像法^[8-13]。其中, 近期逐步发展起来的可遗传编码的荧光探针成像法, 尤其是基于G蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR)构建的DA荧光探针(Grab_{DA}和dLight等)表现出较高的灵敏度、分子特异性和时空分辨率^[10-13]。大部分神经递质都有相应的GPCR作为受体。基于已解析的DA相应的GPCR受体晶体结构, 结构生物学家发现DA与GPCR结合后, 主要引起后者的第五和第六个跨膜区构象的改变^[14-17]。因此, 通过将构象变化敏感的循环重排绿色荧光蛋白(circularly permuted enhanced green fluorescent protein, cpEGFP)或红色荧光蛋白(circular-permuted mApple, cpmApple)插入到人源多巴胺受体连接第五和第六个跨

膜区的第三个胞内环(intracellular loop 3, ICL3)的位置, DA与GPCR的结合会引起后者构象的改变, 而这种变化又引起cpEGFP或cpmApple发生构象变化, 进一步影响其发色团周围的微环境, 最终导致其荧光强度的改变(图1)。这些可遗传编码的DA荧光探针, 可通过病毒注射或者构建转基因动物的方法将探针表达在目的脑域, 为研究内源DA的释放提供了强有力的工具。

早期一代Grab_{DA}以及dLight系列的DA荧光探针在果蝇、斑马鱼和小鼠等多种模式生物的不同行为范式中特异性地检测DA的释放, 扩展了人们对奖励、强化学习和运动功能中DA释放的时空动力学的了解^[10,19]。这些研究主要在接受多巴胺能神经元密集投射的背侧纹状体(dorsal striatum)和伏隔核(nucleus accumbens, NAc)开展。然而, 由于灵敏度的限制, 这些探针难以追踪体内多巴胺能神经元投射相对稀疏的脑区内DA水平的“微小”变化, 如内侧前额叶皮层(medial prefrontal cortex, mPFC)和杏仁核(amygdala)^[5]。因此, 开发能实现更高时空精度DA成像的、具有更高灵敏度和信噪比的DA荧光探针, 对人们理解DA在整个大脑中活动的时空动态十分必要。此外, 多巴胺能信号往往与神经元活动或其他神经调质(neuromodulator)共同作用进而调控生理过程。为了了解多巴胺能信号与神经元活动或其他神经调质之间的相互影响, 高灵敏度测量DA的同时, 往往需要同步记录神经元钙信号或其他神经调质信号。因此, 开发光谱上不重叠的探针十分必要。与绿色荧光探针相比, 先前开发的红移DA探针的性能还有待提高。为了解决这些问题, 近期李毓龙团队^[18]通过理性设计和高通量筛选, 开发了具有极高灵敏度、信噪比和更宽浓度检测范围的新一代系列红绿荧光Grab_{DA}探针,

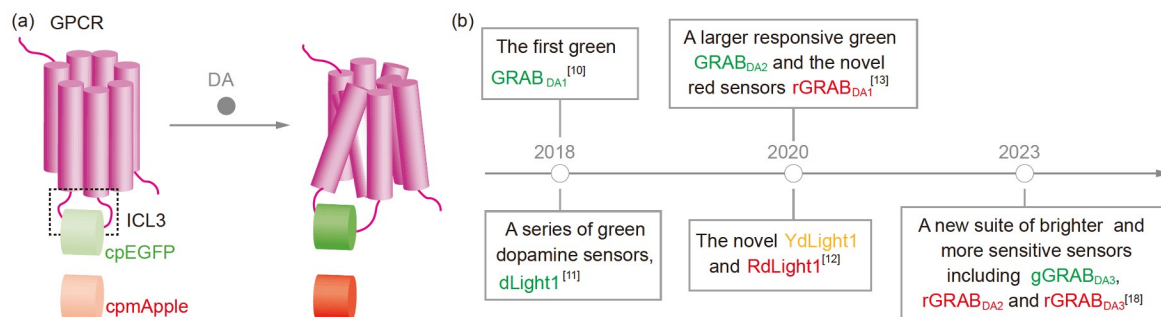


图1 (网络版彩色)基于GPCR的DA荧光探针的设计原理和发展史

Figure 1 (Color online) The GPCR-based fluorescent dopamine sensor design principle and development history

该成果发表于*Nature Methods*杂志。

研究人员使用来自多个物种的各种DA受体亚型(GPCRs)作为探针的骨架,使用现有gDA2m、dLight1.3和rDA1m等荧光探针的ICL3取代受体的ICL3。首先,通过对插入位点、连接肽段等一系列条件的优化,筛选得到了6个表现大幅提升的DA探针,包括绿色gDA3m探针(基于人源D1R)和gDA3h探针(基于牛源D1R)、红色rDA2m和rDA2h探针(基于红火蚁D2R),以及红色rDA3m和rDA3h探针(基于人源D1R)。然后,通过一系列的实验验证了这些探针保持了各自亲本受体的药理特异性,且具有亚秒级动力学,并且不会偶联GPCR下游信号通路。这些探针与之前的GRAB_{DA}和dLight探针相比,整体表现出更高的荧光强度、信噪比和分子特异性。研究者又利用双光子成像,在急性脑切片中,通过检测NAc、纹状体和SNc内源DA动态,评估gDA3m和rDA3m探针的灵敏度和动力学。和体外细胞中的结果一致,与之前的DA探针相比,gDA3m和rDA3m探针对于DA灵敏度和响应能力均显著提高。

为了进一步探索新一代DA探针在体内是否也有更高的灵敏度和分子特异性。研究者检测了小鼠在接受饮水奖励时NAc中的DA动态,发现与之前的gDA2m、rDA1m和RdLight1探针相比,新一代gDA3m和rDA3m探针的荧光反应和信噪比均显著增加,并可以有效区分奖励大小的变化。在此基础上,研究者进一步探索灵敏度更高的新一代DA探针能否记录多巴胺神经元投射稀疏的脑区DA的释放。光遗传激活VTA神经元,通过光纤记录的方法检测到gDA3h、rDA2m和rDA3m探针荧光在mPFC和中央杏仁核具有稳健的、瞬时的和激活强度依赖的增加。在同时接受多巴胺能和去甲肾上腺素能神经支配的mPFC检测新一代DA探针对于DA和去甲肾上腺素选择性,发现rDA3m和gDA3h在生理相关浓度下对DA表现出良好的选择性。此外,使用头部固定双光子成像,在M1/M2运动皮层监测到gDA3h和gDA3m探针荧光强度随着强迫跑步和尾部电击的开始增加,且表现出行为特异的空间特征。而之前的dLight1.3b探针的灵敏度不足以报告这

些轻微的DA变化。

最后,研究者利用红色DA探针与其他绿色荧光探针的光谱兼容性,使用光纤记录的方法,在多个脑区多种行为过程中对DA和其他神经化学物质的进行体内双色成像。研究者成功在NAc同时监测rDA3m和G-Flamp1(环磷酸腺苷cAMP的绿色荧光探针)两种探针在雄性小鼠交配过程的信号变化,并发现DA信号与细胞内cAMP水平密切相关。在小鼠基底外侧杏仁核(basolateral amygdala, BLA)同时监测rDA2m和eCB2.0(内源大麻素的绿色荧光探针)两种探针在施加轻度足部电击时的信号变化,并发现rDA2m和eCB2.0荧光在足部电击时具有可重复的、时间锁定的短暂快速增加。此外,还在小鼠NAc和mPFC中同时监测rDA3m和ACh3.0(乙酰胆碱的绿色荧光探针)两种探针在听觉巴甫洛夫条件反射任务中的信号变化,揭示了DA和ACh释放在强化学习过程中的动态关系。

该研究首先利用多种DA受体亚型开发了一系列具有高灵敏度、选择性和信噪比,具有亚秒级响应动力学的绿色和红色的GRAB_{DA}荧光探针。然后通过一系列在体实验证实这些探针能够检测多个脑区不同水平的DA释放,揭示了DA释放时的高度时空异质性。优化的红色GRAB_{DA}荧光探针能够与其他的荧光探针(如cAMP、eCB和ACh等探针)同时使用,促进人们更好地理解大脑生理过程中的复杂性。研究者建议使用者在选择DA荧光探针时,需要根据自身实验需求综合考虑探针的亲合力、动力学和光谱特性。尽管研究者提到,这些探针在体内对DA/NE有较高的选择性,但这个选择性可能在不同的行为环境中有所不同。鉴于DA和NE在许多区域共存,开发具有不重叠的DA和NE特异性的下一代GRAB_{DA}探针至关重要。大脑内复杂的生理过程通常由多种神经调质和不同神经元活动共同调控,开发红绿之外的其他光谱的下一代GRAB_{DA}探针,有助于实现同时检测DA和多种其他内源神经递质/神经活动的动态变化。总之,这些新一代GRAB_{DA}探针将成为各种生理和病理条件下成像DA活动的强大工具。

参考文献

- 1 Teleanu R I, Niculescu A G, Roza E, et al. Neurotransmitters—Key factors in neurological and neurodegenerative disorders of the central nervous system. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 5954
- 2 Franco R, Reyes-Resina I, Navarro G. Dopamine in health and disease: Much more than a neurotransmitter. *Biomedicines*, 2021, 9: 109
- 3 Poulin J F, Lerner T N, Howe M W. Editorial: Dopamine neuron diversity in circuits and diseases. *Front Neural Circuits*, 2022, 16: 856716
- 4 Zaborszky L, Vadasz C. The midbrain dopaminergic system: Anatomy and genetic variation in dopamine neuron number of inbred mouse strains. *Behav Genet*, 2001, 31: 47–59
- 5 Beier K T, Steinberg E E, DeLoach K E, et al. Circuit architecture of VTA dopamine neurons revealed by systematic input-output mapping. *Cell*, 2015, 162: 622–634
- 6 Nandi P, Lunte S M. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: A review. *Anal Chim Acta*, 2009, 651: 1–14
- 7 Zhang T, Xuan X, Li M, et al. Molecularly imprinted Ni-polyacrylamide-based electrochemical sensor for the simultaneous detection of dopamine and adenine. *Anal Chim Acta*, 2022, 1202: 339689
- 8 Inagaki H K, Ben-Tabou de-Leon S, Wong A M, et al. Visualizing neuromodulation *in vivo*: TANGO-mapping of dopamine signaling reveals appetite control of sugar sensing. *Cell*, 2012, 148: 583–595
- 9 Muller A, Joseph V, Slesinger P A, et al. Cell-based reporters reveal *in vivo* dynamics of dopamine and norepinephrine release in murine cortex. *Nat Methods*, 2014, 11: 1245–1252
- 10 Sun F, Zeng J, Jing M, et al. A genetically encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. *Cell*, 2018, 174: 481–496.e19
- 11 Patriarchi T, Cho J R, Merten K, et al. Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science*, 2018, 360: eaat4422
- 12 Patriarchi T, Mohebi A, Sun J, et al. An expanded palette of dopamine sensors for multiplex imaging *in vivo*. *Nat Methods*, 2020, 17: 1147–1155
- 13 Sun F, Zhou J, Dai B, et al. Next-generation GRAB sensors for monitoring dopaminergic activity *in vivo*. *Nat Methods*, 2020, 17: 1156–1166
- 14 Wang S, Che T, Levit A, et al. Structure of the D2 dopamine receptor bound to the atypical antipsychotic drug risperidone. *Nature*, 2018, 555: 269–273
- 15 Yin J, Chen K Y M, Clark M J, et al. Structure of a D2 dopamine receptor-G-protein complex in a lipid membrane. *Nature*, 2020, 584: 125–129
- 16 Zhuang Y, Xu P, Mao C, et al. Structural insights into the human D1 and D2 dopamine receptor signaling complexes. *Cell*, 2021, 184: 931–942.e18
- 17 Xiao P, Yan W, Gou L, et al. Ligand recognition and allosteric regulation of DRD1-Gs signaling complexes. *Cell*, 2021, 184: 943–956.e18
- 18 Zhuo Y, Luo B, Yi X, et al. Improved green and red GRAB sensors for monitoring dopaminergic activity *in vivo*. *Nat Methods*, 2023, doi: 10.1038/s41592-023-02100-w
- 19 Roeser A, Gadagkar V, Das A, et al. Dopaminergic error signals retune to social feedback during courtship. *Nature*, 2023, 623: 375–380