

УДК 577.25

Молекулярные инструменты направленного контроля электрической активности нервных клеток. Часть I

Д. В. Колесов, Е. Л. Соколинская, К. А. Лукьянов, А. М. Богданов*

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

*E-mail: noobissat@ya.ru

Поступила в редакцию 24.08.2020

Принята к печати 14.05.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11414

РЕФЕРАТ Проблема специфического воздействия на биохимические процессы в клетке остается актуальной для современной биологической науки. Конечной целью такого воздействия на электровозбудимые клетки является управление электрической активностью: возбуждение с последующей генерацией потенциала действия или торможение с угнетением волны возбуждения. Особую значимость технологии управления активностью электровозбудимых клеток приобретают в контексте решения крупнейшей фундаментальной задачи – изучения функционирования нервной системы высших многоклеточных организмов. В текущий момент, когда нейробиология отказывается от редукционистского подхода в пользу прямого изучения сложных нейрональных систем, малоинвазивные методы стимуляции активности мозговых структур становятся основой технического арсенала этой науки. В настоящем обзоре мы описываем три группы подходов, основанных на доставке в нервную ткань чувствительных к внешним стимулам генетически кодируемых молекул. Эти подходы – оптогенетика (ей посвящена первая часть работы), хемогенетика и термогенетика (описаны во второй части обзора) – отличаются не только природой стимулов и структурой соответствующих эффекторных белков, но и своеобразием экспериментального применения. Последнее обстоятельство заставляет рассматривать их не как конкурирующие, а, скорее, как взаимодополняющие технологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА оптогенетика, хемогенетика, термогенетика, потенциал действия, мембранный потенциал, нейроинтерфейс, ионные каналы, каналный родопсин, хеморецепторы, GPCR, стимуляция активности нейронов, возбуждение нейронов, торможение нейронов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АФК – активные формы кислорода; ИК – инфракрасный; AAV – аденоассоциированный вирус (Adeno-Associated Virus); BLUF – sensors of Blue Light Using Flavin adenine dinucleotide; ChR – каналный родопсин (ChannelRhodopsin); CIB1 – Cryptochrome Interacting BHLH 1; COP1 – coat protein complex 1; DBS – глубокая стимуляция мозга (Deep Brain Stimulation); GFP – зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein); LOV – Light-Oxygen-Voltage; PhoCl – фоторасщепляемый (Photo Cleavable); PHR – Photolyase Homology Related domain; PICCORO – P1xD Complex dependent COntROL of transcription; PIF – Phytochrome-Interacting Factor; UVR8 – UV-B resistance 8 protein.

ВВЕДЕНИЕ

Расшифровка принципов функционирования нервной системы высших многоклеточных – крупнейшая фундаментальная проблема. Традиционным подходом к ее решению многие десятилетия был редукционизм, т.е. экстраполяция результатов наблюдений в простых модельных системах на сложнейшие нейрональные ансамбли, не поддающиеся прямому анализу (такие, как головной мозг млекопитающих). Многочисленные недостатки этого пути, а также по-

явление революционных технологий визуализации и стимуляции клеточных процессов подтолкнули нейробиологов к прямому изучению всех уровней организации нервной системы и сложных биологических феноменов, связанных с ее функционированием.

Сегодня важное место в арсенале нейронаук занимают малоинвазивные методы селективной стимуляции активности нервных клеток и мозговых структур. Здесь мы описываем главные из них –

оптогенетику (первая часть обзора), хемогенетику и термогенетику (вторая часть), – делая акцент на природе, физико-химических свойствах и принципах разработки эффекторных молекул, опосредующих клеточную стимуляцию и задействованных в биохимических и нейробиологических экспериментах. Также мы остановимся на молекулярных механизмах, лежащих в основе функционирования этих генетически кодируемых инструментов.

В обзоре уделено внимание ключевым характеристикам описываемых подходов (пространственному и временному разрешению, токсичности, инвазивности и пр.), проведен сравнительный анализ этих характеристик применительно к актуальным задачам современной нейробиологии, обсуждаются перспективы совершенствования инструментов нейростимуляции.

ОПТОГЕНЕТИКА

Оптогенетика – это группа методов, в которых облучение светом видимой части спектра используют для контроля функциональной активности клеток посредством светочувствительных белков, гены которых вносятся в биологическую систему заранее (для детального обзора см. [1–7]). Свет – не только основной источник первичной энергии анаболических процессов для всей биоты, но и важнейший физический стимул, играющий ключевую роль в физиологии и биохимии организмов всех царств живого. В ходе эволюции сформировался богатый репертуар светочувствительных молекул, различающихся по своим физическим и биохимическим свойствам, структуре и функциям [8–14]. Это обстоятельство создает предпосылки для применения в оптогенетике широкого спектра генетически кодируемых эффекторных молекул для воздействия на самые разнообразные биохимические мишени [2, 3, 7].

До разработки оптогенетических инструментов для воздействия светом на клеточную физиологию использовали химические соединения, имеющие фотолабильные связи. Фотоэффекторы такого типа, включающие фотоактивируемые аминокислоты, олигонуклеотиды и соединения для светозависимого высвобождения других молекул, активно разрабатываются и применяются до сих пор, развиваясь независимо от генетически кодируемых инструментов [15–17].

Оптогенетика в молекулярной биологии

В молекулярной биологии оптогенетический подход применяется прежде всего для контроля и управления белок-белковыми взаимодействиями [2, 18, 19]. Эффекторными молекулами здесь служат природные белки или отдельные домены, олигомерное со-

стояние которых или взаимодействие с другими белками изменяется при поглощении света, например, фитохромы, бактериофитохромы и криптохромы.

Фитохромы – растительные фоторецепторы, несущие ковалентно связанный тетрапиррольный хромофор, чувствительный в красной области спектра [18, 20]. Оптогенетическое применение этих белков основано в первую очередь на природном светозависимом обратимом взаимодействии фитохрома PhyV с транскрипционными факторами PIF3 и PIF6, а наиболее яркими примерами служат системы оптического контроля активности фактора транскрипции Gal4 [21] и активации белкового сплайсинга [22] в клетках дрожжей, быстрой обратимой транслокации активаторов GTP-аз семейства Rho на плазматическую мембрану клеток млекопитающих [23]. Криптохромы – FAD-содержащие, чувствительные в сине-фиолетовой спектральной области фоторецепторы, найденные во всех клеточных формах жизни, также способны к фотодимеризации с белками-партнерами. В частности, феномен фотодимеризации растительного криптохрома CRY2 с транскрипционным фактором CIB1 [24–27] использовали для демонстрации светозависимой рекомбинации ДНК [28] и управления эпигенетическим статусом хроматина [29] в клетках млекопитающих. Описано также применение CRY/CIB-системы для управления транскрипцией в дрожжах [30] и контроля активности метаболизма фосфоинозиотида в клетках COS-7 с высоким пространственным разрешением [31]. На основе светочувствительных PHR-доменов CRY2 разработаны инструменты управления выбросом внутриклеточного кальция [32], в том числе, функционирующие в индивидуальных T-клетках *in vivo* [33].

Трехмерная укладка некоторых фотобелков способна существенно изменяться в ответ на поглощение света [2, 18, 19]. В оптогенетике это свойство используется для воздействия на молекулярные мишени. Ярким примером здесь служат белки LOV (Light-Oxygen-Voltage), крупного семейства светочувствительных флавопротеинов, обнаруженных в клетках растений, грибов и бактерий [34–36]. На основе LOV-доменов созданы десятки оптогенетических методик [2, 18], например, управление генной экспрессией [37, 38], модуляция ферментативной активности [39] и сигналинга с участием циклических нуклеотидов [40], регулирование редактирования генома [41], фотосенсибилизация [42].

Флавопротеины семейства BLUF (sensors of Blue Light Using Flavin adenine dinucleotide), имеющие в основном бактериальное происхождение, подвергаются подобно LOV-доменам фотоактивации, сопровождаемой структурными перестройками [43–47].

Среди оптогенетических применений этих флавопротеинов – система активации транскрипции PICCOLO [48], фотоактивация аденилатциклаз [49, 50] и гуанилатциклаз [51].

Отдельную группу оптогенетических эффектов образуют фоторецепторы UVR8, поглощающие в УФ-диапазоне за счет собственных остатков триптофана и задействованные в фотопротекторных реакциях у растений [52]. В растительных клетках гомодимеры UVR8 диссоциируют под действием ультрафиолета, а мономеры связываются с Е3-убиквитинлигазой COP1 [52–56]. Описано применение этого белка для направленной регуляции транскрипции [19, 57, 58] и управления внутриклеточным транспортом белков и их секрецией [59]. В оптогенетическом контроле транскрипции находят применение и прокариотические белки семейства ксантопсинов [60, 61], несущие ковалентно связанный хромофор на основе *n*-кумаровой кислоты и обладающие необычным фотоциклом [62].

Обратимое светоиндуцируемое взаимодействие бактериального фитохрома VphP1 и его нативного белка-партнера PpsR2 легло в основу еще одной платформы для оптогенетических экспериментов на основе бактериальных белков [63]. К уникальным характеристикам системы VphP1–PpsR2 относятся ее активация в диапазоне волн ближнего ИК-излучения (740–780 нм), способность использовать в качестве хромофора эндогенный биливердин эукариот, включая млекопитающих, а также спектральная совместимость с оптогенетическими системами на основе синего света [63]. Дальнейшее изучение системы привело к созданию ее модернизированного варианта, где в качестве партнера VphP1 вместо нативного PpsR2 используется белок Q-PAS, полученный методами генной инженерии [64]. Система на основе Q-PAS не имеет ограничений, вызванных такими свойствами белка PpsR2, как крупный размер, мультидоменная структура и склонность к олигомеризации [64].

Систему на основе бактериального фитохрома VphP1 также использовали для оптогенетического контроля активности рецепторных тирозинкиназ [65]. С этой целью каталитический домен тропомизоиновых киназ TrkA и TrkB, присутствующих на клеточной мембране в форме инактивированных димеров, слили с фоточувствительным кором VphP1. Димеризация VphP1 под воздействием дальнекрасного (640–680 нм) и ближнего инфракрасного (740–780 нм) излучения активировала киназный димер и позволяла обратимо модулировать активность фермента при помощи света [65].

Белки семейства зеленого флуоресцентного белка (Green Fluorescent Protein, GFP) широко применя-

ются как полностью генетически кодируемые флуоресцентные метки. Вместе с тем, известно несколько примеров использования GFP-подобных белков в оптогенетике. Так, обнаружено, что у обратимо фотопереключаемого белка Dronpa одновременно с изменением флуоресцентных свойств изменяется олигомерное состояние – он мономеризуется после облучения синим светом [66]. Это свойство использовали для светозависимого включения активности целевых белков (например, протеинкиназ), фланкированных с N- и C-концов мономерами Dronpa и неактивных в темноте из-за стерического блокирования димером флуоресцентного белка [66, 67]. Другой пример – создание фоторазрезаемого белка на основе mMarle [68], который характеризуется необратимой фотоконверсией из зеленого в красное флуоресцентное состояние. Хотя эта фотоконверсия сопровождается разрывом полипептидной цепи перед хромофором, две части белка остаются прочно связанными за счет множества нековалентных взаимодействий. Получен [69] пермутированный вариант mMarle, названный PhoCl (**Ph**oto **C**leavable), который спонтанно диссоциирует на две части после воздействия светом 405 нм. PhoCl использовали для создания белков со светоиндуцируемой активностью: рекомбиназы Cre, транскрипционного фактора Gal4, вирусной протеазы HCVp, а также фоторасщепляемого кадгерина, для изучения передачи механического натяжения между клетками [69, 70].

Отдельным направлением оптогенетики является использование фототоксичных белков, т.е. белков, которые под действием света производят существенные количества активных форм кислорода (АФК) [71, 72]. Наибольшую популярность получили фототоксичные белки KillerRed (GFP-подобный красный флуоресцентный белок) и miniSOG (флавинсвязывающий белок на основе LOV-домена), а также их мутированные варианты [42, 73–75]. К преимуществам таких генетически кодируемых фотосенсибилизаторов (по сравнению с обычными – химическими) относится возможность направить их в любые клеточные компартменты и субкомпартменты с помощью белковых сигналов локализации, а на уровне организма – в целевые клеточные популяции с помощью тканеспецифических или индуцируемых промоторов. Локальная продукция АФК позволяет направленно влиять на биологические системы, например, инактивировать целевые белки [73, 76], запускать различные пути клеточной гибели [77–79], вносить повреждения в геномную ДНК [80], уничтожать целевые клетки в модельных организмах [81–83].

В конструировании оптогенетических систем широко применяется белковая инженерия [2, 18], что позволяет не только встраивать молекулы эф-

фактора в контекст целевых внутриклеточных взаимодействий, но и адаптировать их функционирование к выполнению конкретной экспериментальной задачи. Подобную адаптацию можно проиллюстрировать на примере *optobody* – оптогенетически активируемого внутриклеточного антитела (Intracellular antibody, *iB*), построенного на основе модифицированных LOV-доменов (а именно, так называемых Magnets – химерных вариантов фоторецептора Vivid, способных к светозависимой гетеродимеризации [84]) и фрагментов наноантитела к GFP [85]. Составной оптогенетический инструмент на основе рекомбинантных *iBs* был использован для обратимой регуляции активности эндогенных белков в клетках млекопитающих [86]. Направляя эффекторы двух оптогенетических систем (*BphP1-Q-PAS*, чувствительной к ближнему ИК-излучению, и LOV, активируемой синим светом) с помощью флуоресцентно меченного *iB*, можно воздействовать на функционирование эндогенного актина и GTP-азы RAS [86].

Выделяют две группы оптогенетических манипуляций по их молекулярному механизму: аллостерические, где светочувствительный домен влияет на ферментативную активность или доступ к сайту связывания субстрата, и димеризационные, т.е. связанные со светозависимым изменением олигомерного статуса эффекторных доменов, влияющим на активность целевых белков в составе химерной молекулы. Возможны и комбинации двух подходов [18]. Как мы проиллюстрировали выше, такое косвенное участие оптических эффекторов применяется в широком спектре модельных систем, однако оно не характерно для нейробиологической оптогенетики. Для контроля активности электровозбудимых клеток используют эффекторные молекулы, оказывающие прямое воздействие на физиологический статус клеток.

Оптогенетика в нейробиологии

Активность электровозбудимых клеток тесно связана с электрическим потенциалом на их плазматической мембране [87]. Он создается, в частности, благодаря функционированию управляемых потенциалом селективных ионных каналов, т.е. каналов, пропускающих определенные ионы при определенном уровне поляризации мембраны [87]. Благодаря наличию трансмембранного градиента ионов, к которым потенциал-зависимые каналы селективны (в первую очередь, Na^+ , K^+ , Cl^-), происходит кратковременный сдвиг мембранного потенциала, называемый потенциалом действия. При деполяризации мембраны ниже порогового уровня или при ее гиперполяризации возникающий ток быстро затухает или интегрируется с другими ионными токами, что может, в за-

висимости от направления интегрируемых токов, инициировать или наоборот препятствовать возникновению нового потенциала действия. Таким образом, путем изменения величин трансмембранных ионных токов и соотношения количеств ионов внутри и снаружи клетки можно управлять функциональной активностью клеток, используя различные ионные транспортеры.

Первое сообщение об активации нейронов светом датируется 1971 годом, когда обнаружили, что лазерное излучение способно неспецифически возбуждать нервные клетки в тканях моллюска аплизии [88]. Способность генетически кодируемых эффекторных молекул влиять на трансмембранные ионные токи при активации светом впервые наблюдали при гетерологической экспрессии бактериородопсина в ооцитах *Xenopus laevis* [89]. В этой же системе показана индукция фототоков при экспрессии канального родопсина 1 (*channelopsin-1*) [90], ретинолсодержащего протонного канала из зеленой одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Примечательно, что этот фоторецептор, обладающий высокой гомологией с бактериородопсинами, играет роль в фототаксисе клеток водоросли [91]. Позже была осуществлена функциональная экспрессия канального родопсина 2 (*ChR2*) из *C. reinhardtii* в клетках млекопитающих, описана его активность как светозависимого катионного канала, способного деполяризовать клеточную мембрану [92]. Один из первых примеров применения оптогенетического инструмента для стимуляции нейронов связан с экспрессией родопсина из *Drosophila* в первичной культуре нейронов крысы [93]. В этом случае, однако, минимальный набор трансгенов, обеспечивающий функционирование эффектора, составлял три кодирующие последовательности (собственно родопсин, аррестин-2 и α -субъединица G-белка), латентность электрических ответов – от сотен миллисекунд до секунд, а сам эксперимент требовал добавления к клеткам раствора ретиналя. Наконец, почти одновременно в четырех работах показано управление нейрональной активностью с помощью однокомпонентных оптогенетических эффекторов на основе канального родопсина 2 (*ChR2*) [94–97]. С методологической точки зрения эти работы являются фундаментом современной нейробиологической оптогенетики. Примечательно, что эффективность канального родопсина позволила уже в ранних экспериментах использовать сложные модельные системы, в частности, управлять поведением нематоды *Caenorhabditis elegans* [96] и частично восстанавливать зрительную чувствительность трансгенных мышей с дегенеративными нарушениями сетчатки [97]. В этих пионерских работах описано высокое пространственное

и временное разрешение активации: сообщается о стимуляции в миллисекундной временной шкале [94] или с частотами до 20 Гц [96], а также о возможности прицельного воздействия на тонкие субклеточные структуры нейронов.

Эффекторные молекулы

Итак, важнейшим классом эффекторных молекул в оптогенетике электровозбудимых клеток служат родопсины [1, 3, 98, 99] (разнообразие родопсинов проиллюстрировано на *рис. 1*). Эти светочувствительные трансмембранные белки несут хромофорную группу на основе ретиналя, которая в форме протонированного основания Шиффа ковалентно (через остаток лизина) пришта к седьмой трансмембранной спирали белкового остова [100, 101]. Родопсины образуют два независимых семейства – микробные родопсины (или родопсины типа 1) и родопсины животных (или родопсины типа 2). Несмотря на структурное сходство, представители родопсинов этих двух типов характеризуются чрезвычайно низкой гомологией аминокислотных последовательностей, возникнув, по-видимому независимо, в результате конвергентной эволюции [102]. Родопсины типа 2 известны прежде всего как зрительные пигменты, специфически экспрессирующиеся в клетках (палочках) сетчатки животных, однако белки этого семейства вовлечены и в другие физиологические процессы как связанные, так и не связанные с фоторецепцией [100, 102]. Механизм трансдукции сигнала при фоторецепции является важной отличительной особенностью родопсинов типа 2. Так, зрительный (палочковый) родопсин вовлекает в свой функциональный цикл как минимум три цитоплазматических белка: G-белок трансдукцин, родопсинкиназу и аррестин. Это обстоятельство затрудняет использование родопсинов животных в гетерологических системах и тем самым снижает их ценность как оптогенетических эффекторов. Микробные родопсины обнаружены в археях, бактериях, эукариотических микроорганизмах (водорослях и грибах) и даже в составе гигантских вирусов [100–105]. Молекулы этого семейства выполняют широкий спектр функций, связанных со светочувствительностью: светозависимая ферментативная активность, фоторецепция, транспорт ионов [100, 103, 106]. Родопсины, участвующие в транспорте ионов, в свою очередь, подразделяются по принципу функционирования на ионные помпы и каналы. Именно ионотранспортирующие родопсины, способные создавать токи в клеточной мембране и изменять ее поляризацию, применяются в оптогенетике в качестве эффекторов (*рис. 1*). Среди микробных родопсинов дикого типа к ним относятся бактериородопсины, протон-

ные помпы, выкачивающие эти катионы из клетки; галородопсины, хлоридные помпы, закачивающие Cl^- в клетку, и каналные родопсины – катионно-селективные каналы, проводящие через мембрану ионы H^+ , Na^+ , K^+ и Ca^{2+} [3, 107, 108]. Белки первых двух групп при фотоактивации (зеленым и желтым светом соответственно) вызывают гиперполяризацию мембраны, что в случае электровозбудимых клеток приводит к угнетению потенциала действия, выступая тем самым в роли ингибиторных эффекторов [107] (*рис. 1*). Канальные родопсины, поглощая синий свет, напротив, деполяризуют мембрану и способствуют возбуждению нервных клеток. Разрешение пространственной структуры канальных родопсинов [109] позволило применить принципы рационального дизайна при разработке химерных вариантов этих белков и изменить селективность ионной поры с катионной на анионную [110, 111], расширив репертуар оптогенетических ингибиторов. Чуть позже были обнаружены и природные каналные родопсины, проводящие хлорид-анион [112]. Помимо отмеченных выше ингибиторных канальных родопсинов, методами белковой инженерии разработана целая палитра искусственных вариантов канальных родопсинов, оптимизированных для решения частных оптогенетических задач. Сюда относятся «быстрые» каналные родопсины (например, ChETA, ChIEF, Chronos), позволяющие, в частности, производить высокочастотную (до 200 Гц) стимуляцию нейронов [1, 113–115], так называемые step-function-опсины [116], характеризующиеся существенно увеличенным временем инактивации и позволяющие при малой продолжительности светового стимула сравнительно долго поддерживать соответствующий трансмембранный ток (существуют варианты как вызывающие деполяризацию мембраны [117], так и ингибиторные, гиперполяризующие [110]).

Канальные родопсины дикого типа активируются синим светом, который плохо проникает в толщу биологической ткани и может быть токсичным для нейронов. Кроме того, синим светом возбуждается большинство существующих флуоресцентных индикаторов катионов кальция, которые могут использоваться совместно с оптогенетическими инструментами. В этой связи был разработан ряд спектрально оптимизированных вариантов канальных родопсинов с максимумами поглощения, сдвинутыми в красную область (к ним относятся VChR1, C1V1, Chrimson, ReaChR и др.) [1, 114, 117–120] (*рис. 1*). Родопсины с искусственно измененной катионной проницаемостью представлены, в частности, таким вариантом, как CatCh (calcium-translocating channelrhodopsin), предпочтительно проводящим ионы Ca^{2+} и востребованным в исследованиях, посвященных кальциево-

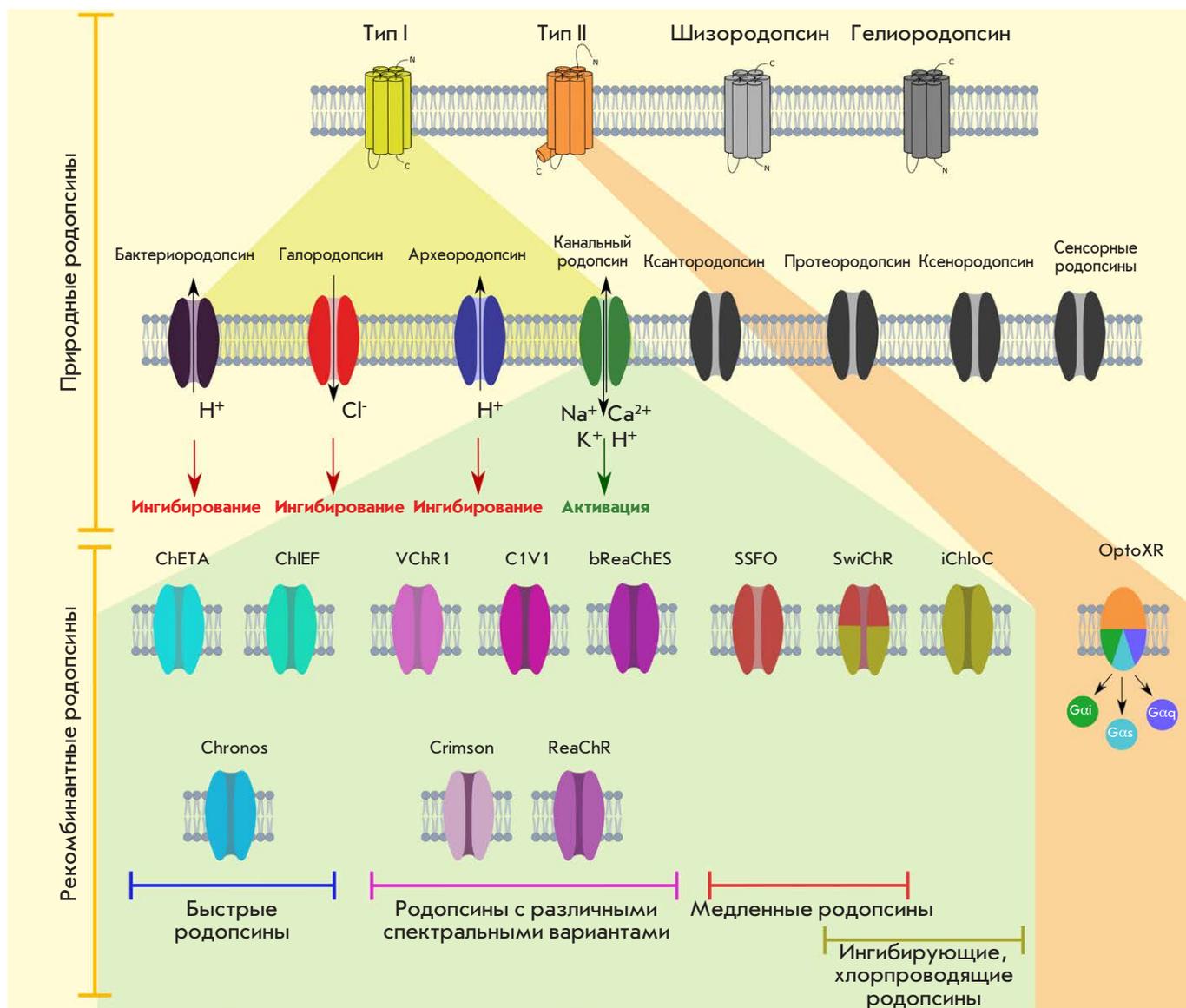


Рис. 1. Разнообразие родопсинов и их использование в оптогенетике. В верхнем ряду – четыре крупнейших семейства природных родопсинов. Во втором ряду сверху – основные группы микробных родопсинов. Ниже – химерные каналные родопсины (слева) и производные родопсинов высших многоклеточных животных (справа), оптимизированные для выполнения специальных оптогенетических задач. В двух верхних рядах серым цветом показаны семейства/типы родопсинов, пока не нашедшие применения в оптогенетике; спектральными цветами – задействованные в оптогенетике. Для химерных молекул введена цветовая дифференциация в связи с их функциональными особенностями (расшифровка цветовой легенды в нижней части рисунка)

му сигналингу [121]. Кроме того, у морских бактерий открыты уникальные родопсины, функционирующие как Na^+ -помпы [122], на основе которых удалось создать селективные переносчики катионов калия, рубидия и цезия [123, 124]. Недавно был предложен изящный метод генно-инженерной модификации мутанта ChR2, приводящий к инверсии топологии встройки этого белка в клеточную мембрану и изме-

нению эффекта его фотоактивации с активирующего на ингибирующий [125, 126].

Последние несколько лет были насыщены открытиями новых групп и даже целых семейств родопсинов, которые могут рассматриваться как перспективные оптогенетические инструменты. Так, каналные родопсины *Gt_CCR1-4* жгутиковой одноклеточной водоросли *Guillardia theta*, представляю-

щие собой светочувствительные катионные каналы, оказались структурно ближе к родопсинам галоархей, чем к «классическому» ChR2 [106, 127, 128]. Недавно показали, что *Gt_CCR4*, имеющий схожую с ChR2 кинетику активации/инактивации, обладает существенно большей светочувствительностью, а также большей селективностью в отношении катионов натрия [106, 129]. В 2018 году методами функциональной метагеномики открыли совершенно новое семейство родопсинов – гелиородопсины [103]. Эти белки, как и родопсины типа 1, связывающие ретиналь в стереоконформации *all-trans*, широко распространены и обнаруживаются в археях, бактериях, микроводорослях и их вирусах. Данные о пространственной структуре гелиородопсинов [130, 131] подтверждают их структурное родство с бактериородопсинами и необычную, «перевернутую» относительно других родопсинов, ориентацию в мембране (с цитоплазматическим N- и внеклеточным C-концом, *рис. 1*). Биологическая функция этих пигментов пока неизвестна, однако неспособность гелиородопсинов к переносу ионов и их сравнительно медленный (в секундной шкале) фотоцикл свидетельствуют в пользу их фоторецепторной роли [103]. Наличие структурных данных высокого разрешения позволяет надеяться, что гелиородопсины в ближайшем будущем станут объектом белковой инженерии, направленной, в том числе, на оптимизацию их молекул для нужд оптогенетики. Потенциальными оптогенетическими активаторами могут стать представители двух семейств светозависимых протонных помп – ксенородопсины [132] и шизородопсины [133]. Интересно, что белки обоих семейств закачивают протоны внутрь клетки, что отличает их от ранее описанных бактерио- и археородопсинов, осуществляющих транспорт H^+ в обратном направлении.

Наконец, самобытный класс оптогенетических инструментов составляют химерные светочувствительные G-белок-сопряженные рецепторы (Opto GPCRs), например, optoXR. Эти молекулы построены на основе родопсинов типа 2 (зрительные родопсины животных), в которых внутриклеточные петли родопсина заменены петлями, например, из адренергического или дофаминового рецепторов [134, 135]. В этом случае фотостимуляция родопсина может инициировать в клетках различные внутриклеточные сигнальные каскады в зависимости от типа рецептора-«донора» внутриклеточных петельных участков (*рис. 1*) [136–139]. Подробнее о работах, связанных с Opto GPCR, можно узнать из специализированных обзоров [5].

Биофизические свойства родопсинов, применяемых в оптогенетике, детально изучены [100, 140, 141]. Так, разрешены трехмерные структуры канальных родопсинов из *C. reinhardtii* [109, 142], а фотоцикл

микробных родопсинов исследован не только методами времязрешенной спектроскопии [100], но и времязрешенного рентгеноструктурного анализа [143, 144] (подробное их описание выходит за рамки настоящего обзора). Стоит, однако, упомянуть два факта, принципиальных для оптогенетического применения микробных родопсинов: (i) все родопсины типа 1 используют в качестве хромофора ретиналь в форме *all-trans*-стереоизомера. Успешное развитие так называемой однокомпонентной (т.е. использующей эффектор, кодируемый одним трансгеном) оптогенетики во многом предопределяется наличием в нервных тканях позвоночных достаточного количества эндогенного ретиналя, исключаящим добавление этого кофактора извне [145]; (ii) в ходе фотоцикла ретиналь фотоизомеризуется в *13-cis*-конформацию и затем, оставаясь ковалентно связанным с белковым остовом, спонтанно возвращается в прежнее *all-trans*-состояние [108]. Отсутствие в этом процессе стадии диссоциации определяет возможность многократного задействования эффекторной молекулы, а его протекание во временной шкале 10–20 мс – высокое временное разрешение оптической стимуляции.

Оптогенетический эксперимент

Согласно свидетельствам ключевых исследователей, участвовавших в развитии методов нейробиологической оптогенетики, примерно 5 первых лет ее развития были посвящены разработке и отладке методик оптогенетического эксперимента [3]. Помимо выбора удачных фотоэффекторных молекул (см. предыдущий раздел), важную роль здесь играет доставка трансгена в целевую модельную систему и конструктивные особенности постановки эксперимента. Здесь мы кратко остановимся на этих аспектах.

В самом общем виде стратегии доставки и реализации генетического материала родопсиновых эффекторов могут быть сведены либо к транзientной экспрессии в специфических популяциях нервных клеток с помощью вирусных векторов, несущих гены родопсинов [3], либо к стабильной экспрессии этих генов в мозгу трансгенных животных [3, 146–148]. В первом случае, как правило, вирусные частицы вводят в мозг животного. Если в ранних оптогенетических работах предпочтение отдавалось ретровирусным векторам, то сейчас чаще всего применяют высокие титры аденоассоциированных вирусов (AAV), последовательности геномов которых зачастую оптимизированы для обеспечения высокого уровня экспрессии в специфических типах клеток мозга [1]. В последние несколько лет для так называемой ретроградной (т.е. направленной к телам пресинаптических нейронов) таргетной экспрессии родопсинов используют модифицированные вирусы

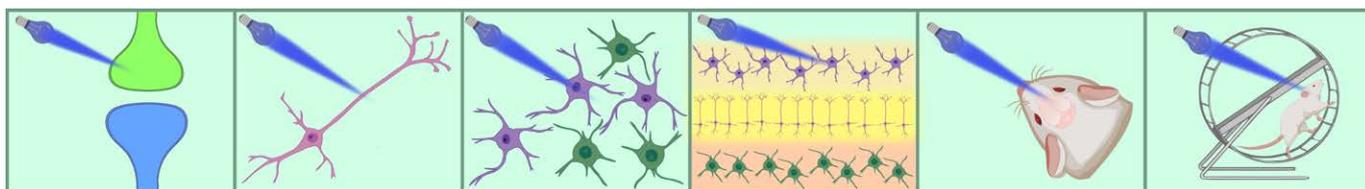


Рис. 2. Применение оптогенетики на разных уровнях организации нервной системы. Схематически показана фотоактивация родопсинов (слева направо): в синаптической терминали аксона, в единичном нейроне *in cellulo*, в нейрональной популяции *in cellulo*, в срезе нервной ткани *ex vivo*, в мозгу живой и свободнодвижущейся мыши *in vivo*. Адаптировано из [159]

бешенства [149, 150]. С целью увеличения селективности «мечения» при гетерологической экспрессии родопсинов используют промоторы, специфичные для определенного типа клеток [1, 3] (например, промотор гипокретина (Hcrt) [151]). В экспериментах на живых срезах мозга эмбрионов трансген можно доставлять с помощью электропорации *in utero*, а в организме трансгенных животных родопсин экспрессируется с рождения. Увеличение специфичности оптогенетической стимуляции, эффективное как при транзиторной, так и при стабильной экспрессии родопсинов, может обеспечиваться генетическими манипуляциями с использованием сайт-специфической рекомбинации [1, 3]. Так, рекомбиназы типа Cre или Flp, которые могут быть доставлены в мозг отдельным вектором или стабильно экспрессироваться в клетках трансгенных животных, позволяют с высокой селективностью включать/выключать экспрессию гена фотоэфектора в исследуемых клеточных популяциях [152].

Тканевая и клеточная специфичность оптогенетики применительно к стимуляции интактного мозга экспериментальных животных обеспечивается сочетанием генетического подхода (специфичной таргетированной экспрессии) и аппаратных решений для прецизионного оптического воздействия. Так, «подача» света в головной мозг обеспечивается при помощи оптоволоконного кабеля, закрепленного на черепе животного, через имплантированную оптическую канюлю. Фиброоптический нейроинтерфейс – одно из ключевых технологических решений, обеспечивающих успех оптогенетического подхода [151, 153, 154]. Наиболее актуальная разработка в области нейроинтерфейсов для свободно движущихся животных – автономные беспроводные имплантаты [155–157].

Важным аспектом экспериментов по оптическому манипулированию нейрональной активностью является контроль результатов стимуляции на уровне отдельных клеток и клеточных популяций. Наряду с классическими подходами к прямому мониторингу электрической активности (например, patch-clamp),

часто ограниченно применимыми при стимуляции интактного мозга, здесь могут использоваться флуоресцентные методы, такие, как визуализация генетически кодируемых индикаторов кальция и мембранного потенциала [1, 3]. Некоторые авторы относят к оптогенетическим инструментам не только фотоэфекторные молекулы, но и флуоресцентные индикаторы для нейробиологии [158, 159]. Получила развитие концепция совмещения оптической стимуляции и мониторинга нейрональной активности в рамках одного эксперимента, или полностью оптическая электрофизиология (all-optical electrophysiology) [4, 158, 160].

Современное применение

Уникальная особенность оптогенетического подхода – его универсальная применимость в модельных системах разной сложности (рис. 2). Этот подход используется в изучении всех уровней организации нервной системы: на культуре нейронов *in cellulo*, на живых срезах мозга *ex vivo*, *in vivo* на целом мозге (в том числе бодрствующих свободнодвижущихся млекопитающих) [159, 161]. Молекулы, опосредующие оптическую стимуляцию, могут быть доставлены в большинство высокоспециализированных типов клеток нервной системы и в их субклеточные компартменты, а функциональные параметры, которые отслеживаются по результатам оптогенетической стимуляции, варьируют от электрической активности единичной возбудимой клетки до влияния на высшие поведенческие функции млекопитающих, обучение, память и т.д.

Оптогенетические инструменты позволили нейробиологам контролировать активность нейронов и клеток нейроглии с высоким временным и пространственным разрешением. Это преимущество метода особенно важно при изучении физиологии тканей *in vivo* и поведения животных. Разрешение, свойственное оптогенетическим инструментам, не могло быть достигнуто ранее при использовании других нейробиологических методов, например, при глубокой стимуляции мозга (deep brain stimulation, DBS) или пу-

тем введения различных препаратов. Появление оптогенетических методов в арсенале нейробиологов способствовало значительному прогрессу в понимании формирования и функционирования нейронных сетей и сигнальных путей в мозгу млекопитающих [1, 3, 162]. Оно дало возможность выявить причинно-следственные связи между клеточной активностью и функциональным ответом, в частности, в экспериментах по изучению связи между активностью нейронных сетей и спецификой поведения животных [163], получить новую информацию о различных поведенческих паттернах в норме и при патологии [164, 165].

Мелкие грызуны (мыши и крысы) – главный модельный объект нейробиологических исследований, в которые вовлечены инструменты оптогенетики. Опубликованы сотни работ, посвященных изучению нейрональных ансамблей, сетей, ритмической деятельности мозга, передачи, запоминания и хранения информации в мозгу, обучения, синаптической пластичности, нейрогенеза, регуляции двигательной активности, голода и жажды, сна и бодрствования, органов чувств, биологических ритмов, дыхательной деятельности, социального поведения этих животных [1, 3, 6, 148, 164, 166, 167]. Вовлечен оптогенетический арсенал и в изучение нейробиологии рыб [168], птиц [169], приматов [170, 171]. Разумеется, огромный интерес представляет применение микробных родопсинов в медицине и изучении физиологии высшей нервной деятельности человека. Здесь можно выделить несколько тесно перекликающихся направлений исследований: это изучение механизмов нейродегенеративных заболеваний (болезни Альцгеймера [172, 173] и Паркинсона [174, 175], эпилепсии [176] и др.), психических нарушений и болезней сердца на моделях животных и нейронов человека, поиск подходов к диагностике этих патологий на основании полученных данных и скрининг химических веществ, потенциально пригодных для их терапии [3, 158]. Наконец, разрабатываются подходы к непосредственному терапевтическому применению оптогенетического инструментария. В настоящий момент в США проводятся два клинических исследования в области генной терапии восстановления зрения с помощью канальных родопсинов [177]. В ближайшей перспективе – лечение эпилепсии [176] и нарушений слуха [178].

Ограничения метода

Парадоксально, но именно необычайная широта охвата и эффективность оптогенетического подхода заставляют исследователей уделять существенное внимание его недостаткам и ограничениям. Речь в данном случае идет не об абстрактных изъянах ме-

тодики, которую могут воспроизвести всего несколько лабораторий в мире, а об инструменте, ставшем *de facto* стандартом для десятков научных направлений.

Здесь мы приведем перечень наиболее значимых проблем однокомпонентной оптогенетики:

- Экспрессия микробных родопсинов с ограничениями применима при работе с беспозвоночными. Как уже упомянуто, нейроны млекопитающих содержат достаточное количество ретиналя для включения в состав гетерологически экспрессируемых родопсинов, но в таких моделях, как *Drosophila* или *Caenorhabditis*, требуется как минимум добавление ретиналя в рацион экспериментальных животных [3].

- Спектральный репертуар микробных родопсинов (во всяком случае, если отдельно рассматривать активирующие и ингибирующие молекулы) достаточно беден. Даже у новых вариантов канальных родопсинов с максимумами поглощения, смещенными в красную область, велико спектральное перекрытие с пигментами дикого типа. И хотя потенциально использование нескольких эффекторов с отличающимися профилями активации позволяет селективно возбуждать отдельные популяции нейронов в мозгу [179], на практике эта возможность применяется редко.

- Сверхэкспрессия микробных родопсинов в нервной ткани может негативно сказываться на физиологии нейронов [180], а их активация синим светом потенциально фототоксична.

- Несомненное ограничение метода представляет необходимость использования сложных волоконно-оптических устройств, закрепляемых на черепе животных. Методики облучения тканей мозга без специального интерфейса [181, 182] оказались менее эффективными и пока не получили широкого распространения [3].

- Наконец, интенсивность оптогенетической стимуляции (как возбуждения, так и торможения нейронов) не всегда можно точно контролировать, и она может выходить за физиологические пределы. Проблема осложняется неоднородностью экспрессии эффектора и распределения световой энергии в ткани мозга, а в глубине ткани прецизионная стимуляция и вовсе невозможна [159].

Во II части обзора мы познакомим читателя с альтернативными подходами к специфической нейро-стимуляции – термогенетикой и хемогенетикой. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках научного проекта № 19-14-50116.

Acknowledgments: The reported study was funded by RFBR, project number 19-14-50116.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim C.K., Adhikari A., Deisseroth K. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2017. V. 18. № 4. P. 222–235.
2. Losi A., Gardner K.H., Möglich A. // *Chem. Rev.* 2018. V. 118. № 21. P. 10659–10709.
3. Deisseroth K. // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 18. № 9. P. 1213–1225.
4. Cohen A.E. // *Biophys. J.* 2016. V. 110. № 5. P. 997–1003.
5. Lesca E. // *J. Membr. Biol.* 2020. V. 253. № 2. P. 81–86.
6. Prestori F., Montagna I., D'Angelo E., Mapelli L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 7. P. 2494.
7. Tischer D., Weiner O.D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. V. 15. № 8. P. 551–558.
8. Fraikin G.Y., Strakhovskaya M.G., Rubin A.B. // *Biochemistry (Moscow)*. 2013. V. 78. № 11. P. 1238–1253.
9. Nowicka B., Kruk J. // *Microbiol. Res.* 2016. V. 186–187. P. 99–118.
10. Hohmann-Marriott M.F., Blankenship R.E. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2011. V. 62. P. 515–548.
11. Tisch D., Schmoll M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 85. № 5. P. 1259–1277.
12. Cronin T.W., Johnsen S. // *Integr. Comp. Biol.* 2016. V. 56. № 5. P. 758–763.
13. Besharse J.C., McMahon D.G. // *J. Biol. Rhythms.* 2016. V. 31. № 3. P. 223–243.
14. Palczewski K. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 3. P. 1612–1619.
15. Gardner L., Deiters A. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2012. V. 16. № 3–4. P. 292–299.
16. Feng Z., Zhang W., Xu J., Gauron C., Ducos B., Vriz S., Volovitch M., Jullien L., Weiss S., Bensimon D. // *Rep. Prog. Phys.* 2013. V. 76. № 7. P. 072601.
17. Li J., Wang L., Tian J., Zhou Z., Li J., Yang H. // *Chem. Soc. Rev.* 2020. V. 49. № 5. P. 1545–1568.
18. Kim B., Lin M.Z. // *Biochem. Soc. Trans.* 2013. V. 41. № 5. P. 1183–1188.
19. Pathak G.P., Vrana J.D., Tucker C.L. // *Biol. Cell.* 2013. V. 105. № 2. P. 59–72.
20. Riggsbee C.W., Deiters A. // *Trends Biotechnol.* 2010. V. 28. № 9. P. 468–475.
21. Shimizu-Sato S., Huq E., Tepperman J.M., Quail P.H. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. № 10. P. 1041–1044.
22. Tyszkiewicz A.B., Muir T.W. // *Nat. Methods.* 2008. V. 5. № 4. P. 303–305.
23. Levskaia A., Weiner O.D., Lim W.A., Voigt C.A. // *Nature.* 2009. V. 461. № 7266. P. 997–1001.
24. Liu H., Yu X., Li K., Klejnot J., Yang H., Lisiero D., Lin C. // *Science.* 2008. V. 322. № 5907. P. 1535–1539.
25. Shao K., Zhang X., Li X., Hao Y., Huang X., Ma M., Zhang M., Yu F., Liu H., Zhang P. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. V. 27. № 5. P. 480–488.
26. Ma L., Wang X., Guan Z., Wang L., Wang Y., Zheng L., Gong Z., Shen C., Wang J., Zhang D., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. V. 27. № 5. P. 472–479.
27. Wang Q., Lin C. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. V. 27. № 5. P. 401–403.
28. Kennedy M.J., Hughes R.M., Peteya L.A., Schwartz J.W., Ehlers M.D., Tucker C.L. // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. № 12. P. 973–975.
29. Konermann S., Brigham M.D., Trevino A., Hsu P.D., Heidenreich M., Cong L., Platt R.J., Scott D.A., Church G.M., Zhang F. // *Nature.* 2013. V. 500. № 7463. P. 472–476.
30. Hughes R.M., Bolger S., Tapadia H., Tucker C.L. // *Methods.* 2012. V. 58. № 4. P. 385–391.
31. Idevall-Hagren O., Dickson E.J., Hille B., Toomre D.K., De Camilli P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 35. P. E2316–E2323.
32. Kyung T., Lee S., Kim J.E., Cho T., Park H., Jeong Y.-M., Kim D., Shin A., Kim S., Baek J., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. № 10. P. 1092–1096.
33. Bohineust A., Garcia Z., Corre B., Lemaître F., Bousso P. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 1143.
34. Huala E., Oeller P.W., Liscum E., Han I.S., Larsen E., Briggs W.R. // *Science.* 1997. V. 278. № 5346. P. 2120–2123.
35. Christie J.M., Reymond P., Powell G.K., Bernasconi P., Raibekas A.A., Liscum E., Briggs W.R. // *Science.* 1998. V. 282. № 5394. P. 1698–1701.
36. Glantz S.T., Carpenter E.J., Melkonian M., Gardner K.H., Boyden E.S., Wong G.K.-S., Chow B.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 11. P. E1442–E1451.
37. Strickland D., Moffat K., Sosnick T.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 31. P. 10709–10714.
38. Motta-Mena L.B., Reade A., Mallory M.J., Glantz S., Weiner O.D., Lynch K.W., Gardner K.H. // *Nat. Chem. Biol.* 2014. V. 10. № 3. P. 196–202.
39. Lee J., Natarajan M., Nashine V.C., Socolich M., Vo T., Russ W.P., Benkovic S.J., Ranganathan R. // *Science.* 2008. V. 322. № 5900. P. 438–442.
40. Jansen V., Jikeli J.F., Wachten D. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017. V. 48. P. 15–20.
41. Richter F., Fonfara I., Bouazza B., Schumacher C.H., Bratovič M., Charpentier E., Möglich A. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № 20. P. 10003–10014.
42. Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 4. P. e1001041.
43. Gauden M., Yeremenko S., Laan W., van Stokkum I.H.M., Ihalainen J.A., van Grondelle R., Hellingwerf K.J., Kennis J.T.M. // *Biochemistry.* 2005. V. 44. № 10. P. 3653–3662.
44. Domratcheva T., Hartmann E., Schlichting I., Kottke T. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 22669.
45. Domratcheva T., Grigorenko B.L., Schlichting I., Nemukhin A.V. // *Biophys. J.* 2008. V. 94. № 10. P. 3872–3879.
46. Stelling A.L., Ronayne K.L., Nappa J., Tonge P.J., Meech S.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. № 50. P. 15556–15564.
47. Gauden M., Grinstead J.S., Laan W., van Stokkum I.H.M., Avila-Perez M., Toh K.C., Boelens R., Kaptein R., van Grondelle R., Hellingwerf K.J., et al. // *Biochemistry.* 2007. V. 46. № 25. P. 7405–7415.
48. Masuda S., Nakatani Y., Ren S., Tanaka M. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 12. P. 2649–2653.
49. Iseki M., Matsunaga S., Murakami A., Ohno K., Shiga K., Yoshida K., Sugai M., Takahashi T., Hori T., Watanabe M. // *Nature.* 2002. V. 415. № 6875. P. 1047–1051.
50. Schröder-Lang S., Schwärzel M., Seifert R., Strünker T., Kateriya S., Looser J., Watanabe M., Kaupp U.B., Hegemann P., Nagel G. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. № 1. P. 39–42.
51. Barends T.R.M., Hartmann E., Griese J.J., Beilich T., Kirienko N.V., Ryjenkov D.A., Reinstein J., Shoeman R.L., Gomelsky M., Schlichting I. // *Nature.* 2009. V. 459. № 7249. P. 1015–1018.
52. Brown B.A., Cloix C., Jiang G.H., Kaiserli E., Herzyk P., Kliebenstein D.J., Jenkins G.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 50. P. 18225–18230.
53. Favory J.-J., Stec A., Gruber H., Rizzini L., Oravec A., Funk M., Albert A., Cloix C., Jenkins G.I., Oakeley E.J., et al. // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 5. P. 591–601.
54. Rizzini L., Favory J.-J., Cloix C., Faggionato D., O'Hara A., Kaiserli E., Baumeister R., Schäfer E., Nagy F., Jenkins G.I., et al. // *Science.* 2011. V. 332. № 6025. P. 103–106.

55. Christie J.M., Arvai A.S., Baxter K.J., Heilmann M., Pratt A.J., O'Hara A., Kelly S.M., Hothorn M., Smith B.O., Hitomi K., et al. // *Science*. 2012. V. 335. № 6075. P. 1492–1496.
56. Wu D., Hu Q., Yan Z., Chen W., Yan C., Huang X., Zhang J., Yang P., Deng H., Wang J., et al. // *Nature*. 2012. V. 484. № 7393. P. 214–219.
57. Crefcoeur R.P., Yin R., Ulm R., Halazonetis T.D. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 1779.
58. Müller K., Engesser R., Schulz S., Steinberg T., Tomakidi P., Weber C.C., Ulm R., Timmer J., Zurbriggen M.D., Weber W. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 12. P. e124.
59. Chen D., Gibson E.S., Kennedy M.J. // *J. Cell Biol.* 2013. V. 201. № 4. P. 631–640.
60. Morgan S.-A., Al-Abdul-Wahid S., Woolley G.A. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 399. № 1. P. 94–112.
61. Fan H.Y., Morgan S.-A., Brechun K.E., Chen Y.-Y., Jaikaran A.S.I., Woolley G.A. // *Biochemistry*. 2011. V. 50. № 7. P. 1226–1237.
62. Genick U.K., Borgstahl G.E., Ng K., Ren Z., Pradervand C., Burke P.M., Srajer V., Teng T.Y., Schildkamp W., McRee D.E., et al. // *Science*. 1997. V. 275. № 5305. P. 1471–1475.
63. Kaberniuk A.A., Shemetov A.A., Verkhusha V.V. // *Nat. Methods*. 2016. V. 13. № 7. P. 591–597.
64. Redchuk T.A., Omelina E.S., Chernov K.G., Verkhusha V.V. // *Nat. Chem. Biol.* 2017. V. 13. № 6. P. 633–639.
65. Leopold A.V., Chernov K.G., Shemetov A.A., Verkhusha V.V. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 1129.
66. Zhou X.X., Chung H.K., Lam A.J., Lin M.Z. // *Science*. 2012. V. 338. № 6108. P. 810–814.
67. Zhou X.X., Fan L.Z., Li P., Shen K., Lin M.Z. // *Science*. 2017. V. 355. № 6327. P. 836–842.
68. McEvoy A.L., Hoi H., Bates M., Platonova E., Cranfill P.J., Baird M.A., Davidson M.W., Ewers H., Liphardt J., Campbell R.E. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 12. P. e51314.
69. Zhang W., Lohman A.W., Zhuravlova Y., Lu X., Wiens M.D., Hoi H., Yaganoglu S., Mohr M.A., Kitova E.N., Klassen J.S., et al. // *Nat. Methods*. 2017. V. 14. № 4. P. 391–394.
70. Endo M., Iwawaki T., Yoshimura H., Ozawa T. // *ACS Chem. Biol.* 2019. V. 14. № 10. P. 2206–2214.
71. Lukyanov K.A., Serebrovskaya E.O., Lukyanov S., Chudakov D.M. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2010. V. 9. № 10. P. 1301–1306.
72. Jiang H.N., Li Y., Cui Z.J. // *Front. Physiol.* 2017. V. 8. P. 191.
73. Bulina M.E., Chudakov D.M., Britanova O.V., Yanushevich Y.G., Staroverov D.B., Chepurnykh T.V., Merzlyak E.M., Shkrob M.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. № 1. P. 95–99.
74. Takemoto K., Matsuda T., Sakai N., Fu D., Noda M., Uchiyama S., Kotera I., Arai Y., Horiuchi M., Fukui K., et al. // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 2629.
75. Westberg M., Bregnhøj M., Etzerodt M., Ogilby P.R. // *J. Phys. Chem. B*. 2017. V. 121. № 40. P. 9366–9371.
76. Lin J.Y., Sann S.B., Zhou K., Nabavi S., Proulx C.D., Malinow R., Jin Y., Tsien R.Y. // *Neuron*. 2013. V. 79. № 2. P. 241–253.
77. Ryumina A.P., Serebrovskaya E.O., Shirmanova M.V., Snopova L.B., Kuznetsova M.M., Turchin I.V., Ignatova N.I., Klementieva N.V., Fradkov A.F., Shakhov B.E., et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1830. № 11. P. 5059–5067.
78. Wang B., van Veldhoven P.P., Brees C., Rubio N., Nordgren M., Apanasets O., Kunze M., Baes M., Agostinis P., Franssen M. // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. V. 65. P. 882–894.
79. Serebrovskaya E.O., Ryumina A.P., Boulina M.E., Shirmanova M.V., Zagaynova E.V., Bogdanova E.A., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A. // *J. Biomed. Opt.* 2014. V. 19. № 7. P. 071403.
80. Petrova N.V., Luzhin A., Serebrovskaya E.O., Ryumina A.P., Velichko A.K., Razin S.V., Kantidze O.L. // *Aging (Albany, NY)*. 2016. V. 8. № 10. P. 2449–2462.
81. Del Bene F., Wyart C., Robles E., Tran A., Looger L., Scott E.K., Isacoff E.Y., Baier H. // *Science*. 2010. V. 330. № 6004. P. 669–673.
82. Williams D.C., Bejjani R.El, Ramirez P.M., Coakley S., Kim S.A., Lee H., Wen Q., Samuel A., Lu H., Hilliard M.A., et al. // *Cell Rep.* 2013. V. 5. № 2. P. 553–563.
83. Young L.E.A., Shoben C., Ricci K., Williams D.C. // *J. Neurogenet.* 2019. V. 33. № 1. P. 1–9.
84. Kawano F., Suzuki H., Furuya A., Sato M. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 6256.
85. Yu D., Lee H., Hong J., Jung H., Jo Y., Oh B.-H., Park B.O., Heo W.D. // *Nat. Methods*. 2019. V. 16. № 11. P. 1095–1100.
86. Redchuk T.A., Karasev M.M., Verkhusha P.V., Donnelly S.K., Hülsemann M., Virtanen J., Moore H.M., Vartiainen M.K., Hodgson L., Verkhusha V.V. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 605.
87. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular biology of the cell*. Sixth ed. New York: Garland Science, 2015. 1464 p.
88. Fork R.L. // *Science*. 1971. V. 171. № 3974. P. 907–908.
89. Nagel G., Möckel B., Büldt G., Bamberg E. // *FEBS Lett.* 1995. V. 377. № 2. P. 263–266.
90. Nagel G., Ollig D., Fuhrmann M., Kateriya S., Musti A.M., Bamberg E., Hegemann P. // *Science*. 2002. V. 296. № 5577. P. 2395–2398.
91. Harz H., Hegemann P. // *Nature*. 1991. V. 351. № 6326. P. 489–491.
92. Nagel G., Szellas T., Huhn W., Kateriya S., Adeishvili N., Berthold P., Ollig D., Hegemann P., Bamberg E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 24. P. 13940–13945.
93. Zemelman B.V., Lee G.A., Ng M., Miesenböck G. // *Neuron*. 2002. V. 33. № 1. P. 15–22.
94. Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. № 9. P. 1263–1268.
95. Li X., Gutierrez D.V., Hanson M.G., Han J., Mark M.D., Chiel H., Hegemann P., Landmesser L.T., Herlitze S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 49. P. 17816–17821.
96. Nagel G., Brauner M., Liewald J.F., Adeishvili N., Bamberg E., Gottschalk A. // *Curr. Biol.* 2005. V. 15. № 24. P. 2279–2284.
97. Bi A., Cui J., Ma Y.-P., Olshevskaya E., Pu M., Dizhoor A.M., Pan Z.-H. // *Neuron*. 2006. V. 50. № 1. P. 23–33.
98. Knöpfel T., Lin M.Z., Levskaya A., Tian L., Lin J.Y., Boyden E.S. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 45. P. 14998–15004.
99. Rein M.L., Deussing J.M. // *Mol. Genet. Genomics*. 2012. V. 287. № 2. P. 95–109.
100. Ernst O.P., Lodowski D.T., Elstner M., Hegemann P., Brown L.S., Kandori H. // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. № 1. P. 126–163.
101. Govorunova E.G., Sineshchekov O.A., Li H., Spudich J.L. // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. V. 86. P. 845–872.
102. Spudich J.L., Yang C.S., Jung K.H., Spudich E.N. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2000. V. 16. P. 365–392.
103. Pushkarev A., Inoue K., Larom S., Flores-Urbe J., Singh M., Konno M., Tomida S., Ito S., Nakamura R., Tsunoda S.P., et al. // *Nature*. 2018. V. 558. № 7711. P. 595–599.
104. Yutin N., Koonin E.V. // *Biol. Direct*. 2012. V. 7. P. 34.
105. Filosof A., Béjà O. // *Environ. Microbiol. Rep.* 2013. V. 5. № 3. P. 475–482.
106. Hososhima S., Shigemura S., Kandori H., Tsunoda S.P. // *Biophys. Rev.* 2020. V. 12. № 2. P. 453–459.
107. Chow B.Y., Han X., Dobry A.S., Qian X., Chuong A.S., Li M., Henninger M.A., Belfort G.M., Lin Y., Monahan P.E., et al. // *Nature*. 2010. V. 463. № 7277. P. 98–102.

108. Zhang F, Vierock J, Yizhar O, Fenno L.E., Tsunoda S., Kianianmomeni A., Prigge M., Berndt A., Cushman J., Polle J., et al. // *Cell*. 2011. V. 147. № 7. P. 1446–1457.
109. Kato H.E., Zhang F, Yizhar O, Ramakrishnan C., Nishizawa T., Hirata K., Ito J., Aita Y., Tsukazaki T., Hayashi S., et al. // *Nature*. 2012. V. 482. № 7385. P. 369–374.
110. Berndt A., Lee S.Y., Ramakrishnan C., Deisseroth K. // *Science*. 2014. V. 344. № 6182. P. 420–424.
111. Wietek J., Wiegert J.S., Adeishvili N., Schneider F., Watanabe H., Tsunoda S.P., Vogt A., Elstner M., Oertner T.G., Hegemann P. // *Science*. 2014. V. 344. № 6182. P. 409–412.
112. Govorunova E.G., Sineshchekov O.A., Janz R., Liu X., Spudich J.L. // *Science*. 2015. V. 349. № 6248. P. 647–650.
113. Gunaydin L.A., Yizhar O, Berndt A., Sohal V.S., Deisseroth K., Hegemann P. // *Nat. Neurosci.* 2010. V. 13. № 3. P. 387–392.
114. Klapoetke N.C., Murata Y., Kim S.S., Pulver S.R., Birdsey-Benson A., Cho Y.K., Morimoto T.K., Chuong A.S., Carpenter E.J., Tian Z., et al. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 3. P. 338–346.
115. Berndt A., Schoenenberger P., Mattis J., Tye K.M., Deisseroth K., Hegemann P., Oertner T.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 18. P. 7595–7600.
116. Berndt A., Yizhar O, Gunaydin L.A., Hegemann P., Deisseroth K. // *Nat. Neurosci.* 2009. V. 12. № 2. P. 229–234.
117. Yizhar O, Fenno L.E., Prigge M., Schneider F., Davidson T.J., O’Shea D.J., Sohal V.S., Goshen I., Finkelstein J., Paz J.T., et al. // *Nature*. 2011. V. 477. № 7363. P. 171–178.
118. Zhang F, Prigge M., Beyrière F., Tsunoda S.P., Mattis J., Yizhar O, Hegemann P., Deisseroth K. // *Nat. Neurosci.* 2008. V. 11. № 6. P. 631–633.
119. Lin J.Y., Knutsen P.M., Muller A., Kleinfeld D., Tsien R.Y. // *Nat. Neurosci.* 2013. V. 16. № 10. P. 1499–1508.
120. Rajasethupathy P., Sankaran S., Marshel J.H., Kim C.K., Ferenczi E., Lee S.Y., Berndt A., Ramakrishnan C., Jaffe A., Lo M., et al. // *Nature*. 2015. V. 526. № 7575. P. 653–659.
121. Kleinlogel S., Feldbauer K., Dempski R.E., Fotis H., Wood P.G., Bamann C., Bamberg E. // *Nat. Neurosci.* 2011. V. 14. № 4. P. 513–518.
122. Inoue K., Ono H., Abe-Yoshizumi R., Yoshizawa S., Ito H., Kogure K., Kandori H. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 1678.
123. Kato H.E., Inoue K., Abe-Yoshizumi R., Kato Y., Ono H., Konno M., Hososhima S., Ishizuka T., Hoque M.R., Kunitomo H., et al. // *Nature*. 2015. V. 521. № 7550. P. 48–53.
124. Konno M., Kato Y., Kato H.E., Inoue K., Nureki O., Kandori H. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2016. V. 7. № 1. P. 51–55.
125. Brown J., Behnam R., Coddington L., Tervo D.G.R., Martin K., Proskurin M., Kuleshova E., Park J., Phillips J., Bergs A.C.F., et al. // *Cell*. 2018. V. 175. № 4. P. 1131–1140.e11.
126. Gao K. // *Nat. Methods*. 2018. V. 15. № 12. P. 1003.
127. Govorunova E.G., Sineshchekov O.A., Spudich J.L. // *Biophys. J.* 2016. V. 110. № 11. P. 2302–2304.
128. Yamauchi Y., Konno M., Ito S., Tsunoda S.P., Inoue K., Kandori H. // *Biophys. Physicobiol.* 2017. V. 14. P. 57–66.
129. Shigemura S., Hososhima S., Kandori H., Tsunoda S.P. // *Appl. Sci.* 2019. V. 9. № 17. P. 3440.
130. Shihoya W., Inoue K., Singh M., Konno M., Hososhima S., Yamashita K., Ikeda K., Higuchi A., Izume T., Okazaki S., et al. // *Nature*. 2019. V. 574. № 7776. P. 132–136.
131. Kovalev K., Volkov D., Astashkin R., Alekseev A., Gushchin I., Haro-Moreno J.M., Chizhov I., Siletsky S., Mamedov M., Rogachev A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. № 8. P. 4131–4141.
132. Inoue K., Ito S., Kato Y., Nomura Y., Shibata M., Uchihashi T., Tsunoda S.P., Kandori H. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 13415.
133. Inoue K., Tsunoda S.P., Singh M., Tomida S., Hososhima S., Konno M., Nakamura R., Watanabe H., Bulzu P.-A., Banciu H.L., et al. // *Sci. Adv.* 2020. V. 6. № 15. P. eaaz2441.
134. Kim J.-M., Hwa J., Garriga P., Reeves P.J., RajBhandary U.L., Khorana H.G. // *Biochemistry*. 2005. V. 44. № 7. P. 2284–2292.
135. Airan R.D., Thompson K.R., Fenno L.E., Bernstein H., Deisseroth K. // *Nature*. 2009. V. 458. № 7241. P. 1025–1029.
136. Siuda E.R., Copits B.A., Schmidt M.J., Baird M.A., Al-Hasani R., Planer W.J., Funderburk S.C., McCall J.G., Gereau R.W., Bruchas M.R. // *Neuron*. 2015. V. 86. № 4. P. 923–935.
137. Gunaydin L.A., Grosenick L., Finkelstein J.C., Kauvar I.V., Fenno L.E., Adhikari A., Lammel S., Mirzabekov J.J., Airan R.D., Zalocusky K.A., et al. // *Cell*. 2014. V. 157. № 7. P. 1535–1551.
138. Oh E., Maejima T., Liu C., Deneris E., Herlitze S. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 40. P. 30825–30836.
139. van Wyk M., Pielecka-Fortuna J., Löwel S., Kleinlogel S. // *PLoS Biol.* 2015. V. 13. № 5. P. e1002143.
140. Kandori H. // *Biophys. Rev.* 2020. V. 12. № 2. P. 355–361.
141. Deisseroth K., Hegemann P. // *Science*. 2017. V. 357. № 6356. P. eaan5544.
142. Volkov O., Kovalev K., Polovinkin V., Borshchevskiy V., Bamann C., Astashkin R., Marin E., Popov A., Balandin T., Willbold D., et al. // *Science*. 2017. V. 358. № 6366. P. eaan8862.
143. Nango E., Royant A., Kubo M., Nakane T., Wickstrand C., Kimura T., Tanaka T., Tono K., Song C., Tanaka R., et al. // *Science*. 2016. V. 354. № 6319. P. 1552–1557.
144. Nogly P., Weinert T., James D., Carbajo S., Ozerov D., Furrer A., Gashi D., Borin V., Skopintsev P., Jaeger K., et al. // *Science*. 2018. V. 361. № 6398. P. eaat0094.
145. Zhang F, Wang L.-P., Boyden E.S., Deisseroth K. // *Nat. Methods*. 2006. V. 3. № 10. P. 785–792.
146. Wang H., Peca J., Matsuzaki M., Matsuzaki K., Noguchi J., Qiu L., Wang D., Zhang F, Boyden E., Deisseroth K., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 19. P. 8143–8148.
147. Arenkiel B.R., Peca J., Davison I.G., Feliciano C., Deisseroth K., Augustine G.J., Ehlers M.D., Feng G. // *Neuron*. 2007. V. 54. № 2. P. 205–218.
148. Häggglund M., Borgius L., Dougherty K.J., Kiehn O. // *Nat. Neurosci.* 2010. V. 13. № 2. P. 246–252.
149. Lammel S., Lim B.K., Ran C., Huang K.W., Betley M.J., Tye K.M., Deisseroth K., Malenka R.C. // *Nature*. 2012. V. 491. № 7423. P. 212–217.
150. Reardon T.R., Murray A.J., Turi G.F., Wirblich C., Croce K.R., Schnell M.J., Jessell T.M., Losonczy A. // *Neuron*. 2016. V. 89. № 4. P. 711–724.
151. Adamantidis A.R., Zhang F, Aravanis A.M., Deisseroth K., de Lecea L. // *Nature*. 2007. V. 450. № 7168. P. 420–424.
152. Fenno L.E., Mattis J., Ramakrishnan C., Hyun M., Lee S.Y., He M., Tucciarone J., Selimbeyoglu A., Berndt A., Grosenick L., et al. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 7. P. 763–772.
153. Aravanis A.M., Wang L.-P., Zhang F, Meltzer L.A., Mogri M.Z., Schneider M.B., Deisseroth K. // *J. Neural Eng.* 2007. V. 4. № 3. P. S143–156.
154. Warden M.R., Cardin J.A., Deisseroth K. // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2014. V. 16. P. 103–129.
155. Montgomery K.L., Yeh A.J., Ho J.S., Tsao V., Mohan Iyer S., Grosenick L., Ferenczi E.A., Tanabe Y., Deisseroth K., Delp S.L., et al. // *Nat. Methods*. 2015. V. 12. № 10. P. 969–974.
156. Goncalves S.B., Ribeiro J.F., Silva A.F., Costa R.M., Correia J.H. // *J. Neural Eng.* 2017. V. 14. № 4. P. 041001.
157. Park S., Brenner D.S., Shin G., Morgan C.D., Copits B.A., Chung H.U., Pullen M.Y., Noh K.N., Davidson S., Oh S.J., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. № 12. P. 1280–1286.
158. Song C., Knöpfel T. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016. V. 15.

- № 2. P. 97–109.
159. Häusser M. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 10. P. 1012–1014.
160. Hochbaum D.R., Zhao Y., Farhi S.L., Klapoetke N., Werley C.A., Kapoor V., Zou P., Kralj J.M., Maclaurin D., Smedemark-Margulies N., et al. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 8. P. 825–833.
161. Deisseroth K. // *Nat. Methods*. 2011. V. 8. № 1. P. 26–29.
162. Sizemore R.J., Seeger-Armbruster S., Hughes S.M., Parr-Brownlie L.C. // *J. Neurophysiol.* 2016. V. 115. № 4. P. 2124–2146.
163. Bernstein J.G., Boyden E.S. // *Trends Cogn. Sci.* 2011. V. 15. № 12. P. 592–600.
164. Kravitz A.V., Freeze B.S., Parker P.R.L., Kay K., Thwin M.T., Deisseroth K., Kreitzer A.C. // *Nature*. 2010. V. 466. № 7306. P. 622–626.
165. Aquili L., Liu A.W., Shindou M., Shindou T., Wickens J.R. // *Learn. Mem.* 2014. V. 21. № 4. P. 223–231.
166. Mager T., Lopez de la Morena D., Senn V., Schlotte J., D Errico A., Feldbauer K., Wrobel C., Jung S., Bodensiek K., Rankovic V., et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 1750.
167. Proville R.D., Spolidoro M., Guyon N., Dugué G.P., Selimi F., Isope P., Popa D., Léna C. // *Nat. Neurosci.* 2014. V. 17. № 9. P. 1233–1239.
168. Thiele T.R., Donovan J.C., Baier H. // *Neuron*. 2014. V. 83. № 3. P. 679–691.
169. Roberts T.F., Gobes S.M.H., Murugan M., Ölveczky B.P., Mooney R. // *Nat. Neurosci.* 2012. V. 15. № 10. P. 1454–1459.
170. Lu Y., Truccolo W., Wagner F.B., Vargas-Irwin C.E., Ozden I., Zimmermann J.B., May T., Agha N.S., Wang J., Nurmikko A.V. // *J. Neurophysiol.* 2015. V. 113. № 10. P. 3574–3587.
171. Galvan A., Stauffer W.R., Acker L., El-Shamayleh Y., Inoue K.-I., Ohayon S., Schmid M.C. // *J. Neurosci.* 2017. V. 37. № 45. P. 10894–10903.
172. Yamamoto K., Tanei Z.-I., Hashimoto T., Wakabayashi T., Okuno H., Naka Y., Yizhar O., Fenno L.E., Fukayama M., Bitto H., et al. // *Cell Rep.* 2015. V. 11. № 6. P. 859–865.
173. Suberbielle E., Sanchez P.E., Kravitz A.V., Wang X., Ho K., Eilertson K., Devidze N., Kreitzer A.C., Mucke L. // *Nat. Neurosci.* 2013. V. 16. № 5. P. 613–621.
174. Gradinaru V., Mogri M., Thompson K.R., Henderson J.M., Deisseroth K. // *Science*. 2009. V. 324. № 5925. P. 354–359.
175. Steinbeck J.A., Choi S.J., Mrejeru A., Ganat Y., Deisseroth K., Sulzer D., Mosharov E.V., Studer L. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. № 2. P. 204–209.
176. Walker M.C., Kullmann D.M. // *Neuropharmacology*. 2020. V. 168. P. 107751.
177. Shen Y., Campbell R.E., Côté D.C., Paquet M.-E. // *Front. Neural Circuits*. 2020. V. 14. P. 41.
178. DiGuiseppe J., Zuo J. // *Neurosci. Lett.* 2019. V. 701. P. 175–179.
179. Han X., Boyden E.S. // *PLoS One*. 2007. V. 2. № 3. P. e299.
180. Miyashita T., Shao Y.R., Chung J., Pourzia O., Feldman D.E. // *Front. Neural Circuits*. 2013. V. 7. P. 8.
181. Gradinaru V., Thompson K.R., Zhang F., Mogri M., Kay K., Schneider M.B., Deisseroth K. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 52. P. 14231–14238.
182. Huber D., Petreanu L., Ghitani N., Ranade S., Hromádka T., Mainen Z., Svoboda K. // *Nature*. 2008. V. 451. № 7174. P. 61–64.