

УДК 577.25

Молекулярные инструменты направленного контроля электрической активности нервных клеток. Часть II

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.11415

РЕФЕРАТ Проблема специфического воздействия на биохимические процессы в клетке актуальна для современной биологической науки. В случае электровозбудимых клеток конечной целью такого воздействия 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 настоящее время, когда нейробиология отказывается от редуционистского подхода в пользу прямого изучения сложных нейрональных систем, основой технического арсенала этой науки становятся малоинвазивные методы стимуляции активности мозговых структур. В настоящем обзоре рассмотрены три группы подходов, основанных на доставке в нервную ткань генетически кодируемых молекул, чувствительных к внешним стимулам. Эти подходы – оптогенетика (ей посвящена часть I работы), хемогенетика и термогенетика (описаны во II 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 ИК – инфракрасный; ADPR – аденозиндифосфатрибоза (Adenosine DiPhosphoRibose); BL-OG – биолюминесцентная оптогенетика (BioLuminescent OptoGenetics); CID – химически индуцируемая димеризация (Chemically Induced Dimerization); CNO – клозапин-N-оксид (Clozapine N-Oxide); DAAO – оксидаза D-аминокислот (D-Amino Acids Oxidase); DHFR – дигидрофолат-редуктаза (dihydrofolate reductase); DREADD – химерные рецепторы, активируемые исключительно синтетическими агонистами (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs); FKBP – FK506-связывающий белок (FK506 Binding Protein); FRB – домен, связывающий FKBP12-рапамицин (FKBP12-Rapamycin Binding domain); GABA – гамма-аминомасляная кислота (Gamma-AminoButyric Acid); GFP – зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein); GPCR – рецептор, сопряженный с G-белками (G-protein-coupled receptor); GR – вкусовые рецепторы (Gustatory Receptors); Hsp – белок теплового шока (Heat shock protein); IPD – домен ионной поры (Ion Pore Domain); IR – ионотропные рецепторы (ionotropic receptors); KOR – каппа-опиоидный рецептор (K-Opioid Receptor); LBD – лигандсвязывающий домен (Ligand-Binding Domain); PSAM – фармакологически селективный актуаторный модуль (Pharmacologically Selective Actuator Module); PSEM – фармакологически селективная эффекторная молекула (Pharmacologically Selective Effector Molecule); PYP – фотоактивный желтый белок (Photoactive Yellow Protein); RASSL – рецепторы, активируемые исключительно синтетическими лигандами (Receptors Activated Solely by Synthetic Ligands); RNAT – РНК-термометр (RNA thermometer); TeNT – тетанотоксин; TRP – (каналы) транзиентного рецепторного потенциала (Transient Receptor Potential).

ВВЕДЕНИЕ

Малоинвазивные методы селективной стимуляции активности нервных клеток и мозговых структур занимают важное место в арсенале нейронаук. В I части настоящего обзора мы обсуждали наиболее зрелый из них – оптогенетику, а II часть посвящена перспективным ортогональным подходам – термогенетике и хемогенетике.

ТЕРМОГЕНЕТИКА

Тепловая энергия, как и видимый свет, распространяется в форме колебаний электромагнитного поля, а температура является одним из базовых факторов окружающей среды, с которым взаимодействуют биологические организмы. Сравнительно узкий диапазон температур, при которых возможно функционирование большинства клеточных форм жизни, детерминированный, в свою очередь, термодинамическими и кинетическими особенностями протекания биохимических процессов, способствует выработке разнообразных эволюционных приспособлений (термотаксис, поддержание постоянной температуры тела у гомойотермных животных и пр.), так или иначе связанных с восприятием температуры на клеточном и молекулярном уровнях [1, 2]. Терморесепторы и иные молекулы, специфически воспринимающие колебания температуры, характерны практически для всех живых организмов [3]. Это создает основу для разработки генно-инженерных подходов к воздействию на физиологию и биохимию клеток с помощью нагревания или охлаждения.

Термогенетика – относительно молодая группа методов, в которых термочувствительные генетически кодируемые эффекторные макромолекулы используются для воздействия на различные физиологические и биохимические процессы в живых клетках. Термогенетический подход может рассматриваться как альтернативный или даже ортогональный по отношению к оптогенетическому [4], но лишь с необходимой поправкой на существенно меньшую распространенность и универсальность первого. Так, на текущий момент число научных публикаций, описывающих применение термогенетических методов, не превышает нескольких сотен.

Интересным отличием термогенетики от оптогенетики является технологическое разнообразие способов активации эффекторных молекул. Хронологически первый и до сих пор наиболее распространенный способ – нагревание модельного организма целиком (как правило, речь идет о насекомых в специальном термостате) [5, 6]. Второй способ – локальное нагревание тканей с помощью магнитных наночастиц, диссипирующих тепло под действием внешних полей. Термическая активация рецептора

TRPV1 с помощью наночастиц оксида железа, облучаемых радиоволнами, описана по меньшей мере в трех работах [7–9]. В первой из них продемонстрирован принцип метода: авторы управляли активностью культуры нейронов, экспрессирующих рецептор TRPV1, воздействуя радиочастотами на ферритовые наночастицы, помещенные на поверхность клеток [7]. Во втором исследовании удалось регулировать уровень глюкозы в плазме крови мышей с перевиваемыми опухолями, экспрессирующими ген биоинженерного инсулина под контролем Ca^{2+} -чувствительного промотора. Промотор индуцировался кальциевым током через термочувствительный канал TRPV1, молекула которого была помечена наночастицами с помощью антител к гистидиновой метке [8]. В третьей работе аналогичным способом была осуществлена стимуляция нейронов, временно экспрессирующих TRPV1, в глубине ткани мозга живых мышей [9]. Более подробная информация о применении магнитных наночастиц в термогенетике изложена в материалах тематического обзора [10]. Наконец, третий способ термогенетической стимуляции – облучение лазерами, испускающими в инфракрасном диапазоне [11–13]. Авторы одной из работ разработали установку, обеспечивающую прецизионную активацию нейронов дрозофилы, и дали ей оригинальное название FlyMAD (the fly mind-altering device) [12]. Необходимо отметить, что в природе термогенетического стимула коренятся как фундаментальные недостатки метода, так и его потенциальные преимущества перед оптогенетикой. С одной стороны, необходимость локального изменения температуры заметно снижает временное разрешение стимуляции (что частично решается мощными ИК-лазерами), а подход с общим нагреванием объекта страдает фактической потерей пространственного разрешения. С другой стороны, и для лазерной ИК-стимуляции, и для радиоволнового возбуждения наночастиц характерна высокая степень проникновения стимула в ткань (до нескольких миллиметров), которая дает термогенетике заметное преимущество по сравнению с оптогенетикой в экспериментах по изучению таких органов, как сердце и головной мозг [4, 9, 10].

Несмотря на то что термогенетический подход пока применяется сравнительно редко, репертуар связанных с ним эффекторных молекул и модельных систем характеризуется значительным разнообразием и продолжает расти. Например, в качестве инструмента исследования и модуляции температурозависимой генной экспрессии в бактериях – паразитах теплокровных млекопитающих, использовали так называемые РНК-термометры (RNAT) [14]. Трехмерная укладка этих природных последовательностей, встречающихся в 5'-нетранслиру-

емых областях мРНК некоторых бактериальных генов, изменяется в зависимости от температуры. При низких температурах РНК-термометр ингибирует трансляцию мРНК путем ограничения возможности посадки рибосомы, а при повышении температуры, наоборот, происходит индукция трансляции. Другая техника термогенетического контроля транскрипции получила название IR-LEGO [15]. В этом случае ИК-лазерами облучали живую нематоду *C. elegans*, добиваясь локальной активации транскрипции трансгена (ген *GFP*), контролируемой промотором теплового шока *hsp16-2*. Сходную схему облучения в той же модельной системе недавно применили для демонстрации метода FLIRT (Fast Local InfraRed Thermogenetics) [16]. В данном случае термогенетический эксперимент был направлен на управление активностью белков, а мишенями служили термочувствительные варианты миозина-II, Delta и сук-4.

Исторически первый термогенетический эффектор для нейробиологии – мутант GTP-азы динамина, продукта экспрессии чувствительного к температуре аллеля гена *shibire* (*shi^{ts1}*) *Drosophila* [17]. Динамин играет ключевую роль в регуляции эндоцитоза, в частности, в рециркуляции синаптических везикул, а экспрессия в нейронах его варианта *Shibire* (G273D) приводит к ингибированию их активности за счет истощения пула синаптических везикул и блокирования синаптической передачи [18]. С помощью таргетированной экспрессии *shi^{ts1}* в холинергических нейронах дрозофилы удалось показать обратимый двигательный паралич животных в ответ на повышение температуры до 30° [17]. Сегодня аллельный вариант *shi^{ts1}* – стандартный ингибиторный эффектор в нейробиологических исследованиях *Drosophila* [19–24].

Интересно, что в восприятие температуры у насекомых вовлечены хеморецепторы семейств IR и GR [25, 26]. Эти молекулы представляют собой лиганд-специфические катионнеселективные каналы, а молекулярные механизмы, позволяющие им участвовать в формировании поведения избегания в ответ на охлаждение или нагревание, остаются плохо изученными. Тем не менее, один из рецепторов семейства GR – Gr28bD – стал родоначальником принципиально нового класса термогенетических эффекторов [26]. Установлено, что термостимуляция ооцитов *Xenopus* и моторных нейронов дрозофилы, экспрессирующих *Gr28bD*, приводит к генерации трансмембранного катионного тока, запускающего потенциал действия в нейронах. Gr28bD использовали как активатор дофаминергических нейронов при изучении обучения и памяти у дрозофилы [27].

Наиболее важным классом эффекторных молекул, применяемых в современной термогенетике, особен-

но применительно к нейробиологическим задачам, являются ионные каналы семейства TRP (transient receptor potential channels, TRP channels) [5, 28, 29].

TRP-каналы

TRP-каналы – это суперсемейство ионных каналов, расположенных на плазматической мембране животных клеток многих типов. На данный момент известно около 30 видов TRP-каналов, объединяемых в семь семейств и обладающих общими структурными свойствами (рис. 1). Все TRP-каналы состоят из шести трансмембранных сегментов, имеют в разной степени выраженную гомологию последовательности, а также неселективную катионную проницаемость [30]. От других ионных каналов TRP отличаются впечатляющим разнообразием катионной селективности и механизмов активации. Эти белки участвуют в работе всех сенсорных систем (зрение, вкус, обоняние, слух, осязание, термочувствительность и осмотическая чувствительность). Таким образом, TRP-каналы являются важными участниками формирования ответа на все основные классы внешних стимулов, включая свет, звук, химические вещества, температуру и механическое воздействие. Кроме того, TRP-каналы позволяют клеткам ощущать изменения в их ближайшем окружении, например, изменение осмолярности раствора [30].

TRP-каналы встречаются у большого числа многоклеточных организмов, включая червей, насекомых и позвоночных. Все суперсемейство TRP-каналов по принципу генной организации и топологии молекул можно разделить на две большие группы, включающие семь семейств (рис. 1).

После активации TRP-каналы начинают неселективно пропускать катионы, включая Na⁺, Ca²⁺ и Mg²⁺. Вход ионов в нервные клетки приводит к изменению мембранного потенциала и генерации потенциала действия. Интересно, что проводимость TRP-каналов на три порядка величины выше, чем у канальных родосинов, задействованных в оптогенетике [31].

TRP-каналы могут активироваться различными веществами растительного происхождения, в том числе, обнаруженными в специях, например, в чесноке (аллицин), перце чили (капсаицин), васаби (аллилизотиоцианат), а также ментолом, камфорой, перечной мятой и др. Наибольший интерес для термогенетики представляют TRP-каналы, чувствительные к изменению температуры, так называемые термо-TRP-каналы (thermoTRP, рис. 1). Такие каналы активируются при достижении определенного порога температуры. Термо-TRP-каналы экспрессируются в термочувствительных нейронах и составляют молекулярную основу реакции организма на тепловые воздействия [30].

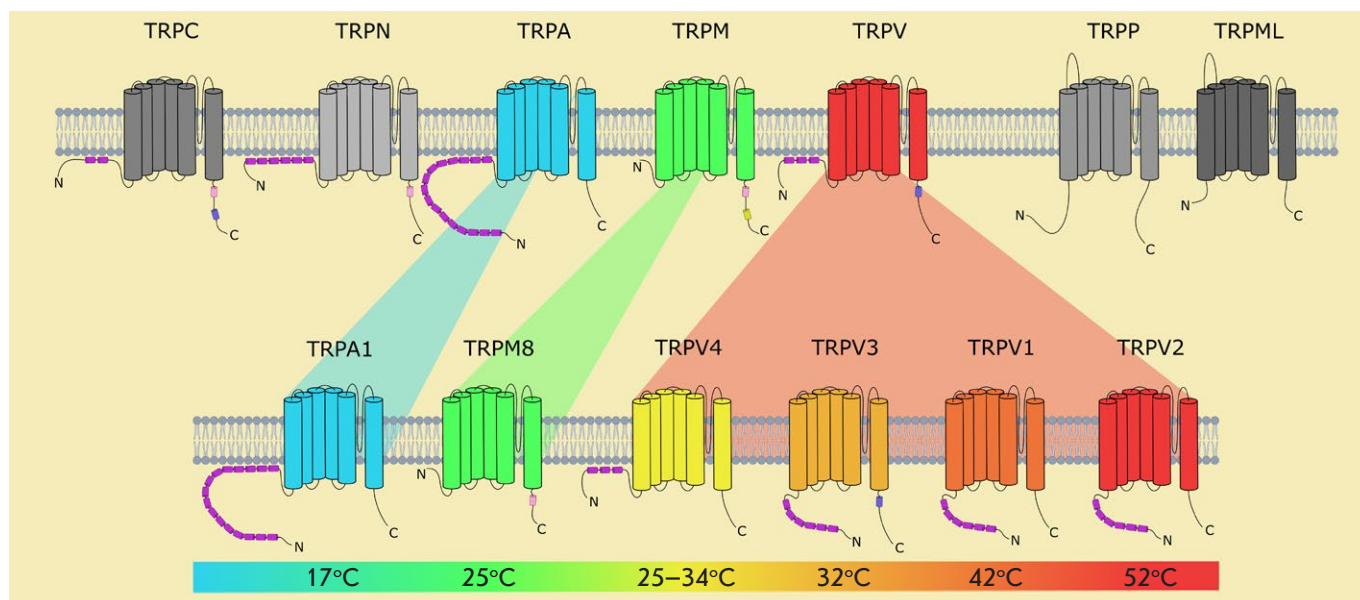


Рис. 1. Суперсемейство TRP-каналов и температурная чувствительность отдельных его представителей. В верхней части рисунка показаны семь семейств TRP, разделенных на две группы. В нижней части рисунка – представители трех семейств, задействованные в термогенетике. На цветовой шкале обозначены температуры активации соответствующих TRP

Известно четыре типа термо-TRP-каналов, активируемых нагреванием (TRPV1–4), и два термо-TRP-канала, активирующихся под воздействием холода (TRPM8 и TRPA1, см. *рис. 1*). При гетерологической экспрессии (в клетках HEK293, CHO, ооцитах *Xenopus*) все шесть TRP обладают удивительным свойством придавать клеткам чувствительность к температуре. Каждый тип термо-TRP-каналов имеет свой уникальный температурный порог активации [30, 32]. Их тепловая чувствительность такова, что нейрон, экспрессирующий thermoTRP, может активироваться при изменении температуры на 1–2°C [5, 33]. Высокая ионная проводимость делает эти рецепторы особенно удачными нейробиологическими инструментами. Даже при более низком уровне экспрессии thermoTRP вызывают деполяризацию стабильнее, чем каналы родопсины. Способность thermoTRP обеспечивать надежную активацию при умеренных уровнях экспрессии означает, что в генетических векторах могут использоваться относительно «слабые» промоторы. Кроме того, низкий уровень экспрессии сводит к минимуму потенциальную токсичность, связанную с экспрессией экзогенных белков. На сегодняшний день в нейробиологии дрозофилы широко применяются два инструмента на основе thermoTRP, TRPM8 крысы (rTRPM8) [34] и собственный рецептор дрозофилы TRPA1 (dTRPA1) [5] (более подробно – в разделе «Термогенетика в нейробиологии»). rTRPM8 – «холодный» канал, активируемый при температурах 25°C и ниже, а также чувствительный

к ментолу [28, 35]. На практике надежная активация нейронов мух с использованием гетерологической экспрессии rTRPM8 требует охлаждения животного до $\leq 18^\circ\text{C}$ [34]. dTRPA1 – терморептор дрозофилы, реагирующий на нагревание и участвующий в формировании у личинок мух поведения избегания повышенных температур [5]. Интересно, что гомологи этого рецептора у млекопитающих, напротив, чувствительны к холоду [36]. dTRPA1 активируется при умеренном нагревании в диапазоне температур 25–29°C или несколько выше [5, 36–38]. Температурные режимы активации rTRPM8 и dTRPA1 делают эти рецепторы малоприспособными для экспериментов с теплокровными животными (и даже с их нейрональными культурами). На сегодняшний день большинство термогенетических экспериментов с клетками и тканями млекопитающих проведено с использованием «горячего» ванилоидного канала TRPV1 [7–9, 39], чувствительного к капсаицину и активирующегося при достаточно высоких температурах ($> 42^\circ\text{C}$) [31, 40]. В единичных работах описано использование в роли термоэффекторов других thermoTRP: TRPV2 и 3 (в клетках HEK293) [41], TRPV4 (на первичной культуре нейронов крысы) [11], TRPA1 из термосенсорного аппарата гремучей змеи (на первичной культуре нейронов мыши) [13].

Термогенетика в нейробиологии

Если в нейробиологической оптогенетике главным модельным организмом служит мышь, то нейроби-

ологическая термогенетика – практически исключительно «территория» плодовой мухи дрозофилы [20, 42]. За последнее десятилетие с помощью набора из двух thermoTRP-каналов (активаторы нейронов *rTRPM8* и *dTRPA1*) и термочувствительного динамина (ингибитор нейронов *Shibire^{ts}*) исследователям удалось совершить настоящий прорыв в понимании функционирования нервной системы этих насекомых. Термогенетический подход использовали при изучении памяти дрозофилы [21–23, 37], ее двигательной активности [19, 24, 34, 43], биологических ритмов [38, 44], пищевого [45, 46] и полового [6, 47] поведения, коннектома и механизмов обучения [48]. Чувствительные к температуре эффекторы применяли в оригинальных работах по исследованию влияния экспрессии микроРНК [49] и состава кишечного микробиома [50] на поведение плодовой мухи. На основе терморцептора *dTRPA1* разработан учебный набор для демонстрации 60 различных типов поведения дрозофилы, инициируемых термогенетически [51].

Приложение термогенетического подхода к нейробиологии позвоночных пока не носит систематического характера. Описана активация thermoTRP *in vivo* в нейронах рыбы *Danio rerio* [13, 52] и мыши [8, 9]. Как уже упомянуто выше, принцип метода термогенетической активации продемонстрирован на культуре нейронов млекопитающих *in cellulo* [7, 11, 13] и на срезах мозга мыши *ex vivo* [39].

Ограничения и перспективы метода

Современная термогенетика существенно уступает оптогенетике в пространственном и временном разрешении стимуляции. Так, thermoTRP активируют нейроны в течение секунд [5, 33], что, вероятно, отражает кинетику нагрева и охлаждения ткани. При планировании термогенетического эксперимента *in vivo* возникает необходимость координирования температурного режима активации эффектора и температурного оптимума экспериментального животного. Выход за рамки температурного оптимума может привести к активации собственных терморцепторов у животного, а иногда даже вызвать тепловой шок. Особую сложность представляет работа с теплокровными животными, так как в этом случае разница между нормальной температурой тела и температурой, при которой происходит разрушение тканей, составляет всего 6–7°C. Нагревание (или охлаждение) ткани с высоким пространственным разрешением – существенно более сложная задача, чем ее облучение светом видимой части спектра. С другой стороны, при необходимости воздействия на глубинные структуры мозга или на нервную систему в целом термогенетический подход может

быть предпочтительней оптогенетического (что подтверждается успешным его применением в нейробиологии насекомых).

Дальнейший прогресс термогенетики во многом связан с поиском новых эффекторных молекул, в частности, обладающих быстрой кинетикой активации/инактивации и/или функционирующих в температурном диапазоне 38–42°C (т.е. хорошо совместимых с физиологией теплокровных животных). В качестве теоретической возможности рассмотрено применение термогенетической нейростимуляции в терапевтических целях, например, для функционирования кохлеарных имплантатов [53].

ХЕМОГЕНЕТИКА

Хемогенетика – семейство методов, подразумевающих химическую стимуляцию биологических систем малыми молекулами, опосредованную генетически введенными в эти системы эффекторами, обладающими: а) специфической чувствительностью к лигандам-стимулам; б) физиологически/биохимически значимой активностью, развивающейся в ответ на связывание лиганда. Из трех подходов, которые мы рассматриваем в настоящем обзоре, хемогенетика на сегодняшний момент, несомненно, развивается наиболее бурно. Так, если в 2013 году общее число опубликованных работ, в которых использовали хемогенетический арсенал, не превышало двух десятков (из которых лишь единицы в области нейробиологии), то в прошлом, 2019 году, выпущено не менее 300 хемогенетических исследований (в основном включающих эксперименты *in vivo* нейробиологической направленности). Экспоненциальная динамика роста интереса к инструментам специфической химической стимуляции наметилась примерно в 2014–2015 годах и, похоже, сохранится в ближайшие годы. Такой «хемогенетический бум», отчасти обусловленный общей «мобилизацией» нейронаук (в том числе подстегиваемой успехами оптогенетики), в высокой степени связан и с небывалым разнообразием механизмов стимуляции, доступных с привлечением малых молекул.

Сам термин «хемогенетика» допускает широкую трактовку. Мы перечислим основные хемогенетические подходы, двигаясь в направлении наиболее значимых для нейробиологии.

I. К хемогенетическим инструментам относят белки/РНК-флуорогены и малые молекулы, выступающие в роли экзогенных хромофоров для этих макромолекул [54]. Здесь реализуется принцип флуоресцентного мечения *dye in box* (краситель в коробочке), когда молекула красителя, способная проникнуть в клетку и самостоятельно не флуоресцирующая, нековалентно, с высокой спе-

цифичностью связывается с генетически введенной в клетку макромолекулой, приобретая способность к флуоресценции [55, 56]. Ярким примером воплощения этой концепции служит система FAST (fluorescence-activating and absorption shifting tag), в первоначальной форме представленная мономерным генно-инженерным вариантом апо-формы фотоактивного желтого белка (photoactive yellow protein, PYP) из галофильной протеобактерии *Halorhodospira halophila*, образующего флуоресцентные комплексы с производными 4-гидроксibenзилиденроданина [57]. В рамках FAST разработаны хемогенетические инструменты для многоцветного мечения [58], включая флуорофоры с эмиссией флуоресценции в дальнекрасной области [59]. Как флуоресцентные метки флуорогенные пары обладают рядом преимуществ и перед однокомпонентными генетически кодируемыми красителями (GFP и сходными), и перед малыми органическими флуорофорами. В частности, для них характерна высокая фотостабильность и устойчивость к фотоусталости, которые критичны в контексте новейших методов микроскопии [60, 61].

II. Ряд авторов относит к хемогенетическим подходам создание искусственных ферментов (в основном металлоэнзимов) и управление их активностью с помощью биотин-(стрепт)авидинового таргетинга [62–65]. Принцип состоит в доставке металлорганических катализаторов в биотинилированной форме к молекуле стрептавидина или его вариантов. Хемогенетическая оптимизация каталитической активности таких гибридных молекул может осуществляться комбинированием библиотеки биотинилированных катализаторов с библиотекой мутантов стрептавидина [65].

III. Схожий, но более биологически релевантный принцип реализован в хемогенетике (или даже хемогеномике) как инструменте скрининга библиотек малых молекул (drug discovery & screening) [66–69]. Метод, как правило, предполагает воздействие на биологическую модельную систему целевыми соединениями с селекцией по функционально значимому параметру, например, фенотипическому проявлению ферментативной активности. Он позволяет как выявить наиболее активное вещество в составе химической библиотеки, так и наоборот – вариант белка (или генотипа), наиболее чувствительного к заданному индивидуальному веществу. Хемогенетический скрининг в дрожжевой системе позволил обнаружить новые ингибиторы протеинкиназ [66], гистоновых ацетилтрансфераз [69], новые фунгициды [70]. В недавнем масштабном проекте [71] был охарактеризован резистом (т.е. набор генов и их аллельных вариантов, связанных с устойчивостью к веществу) возбудителя малярии к нескольким десяткам противомалярийных препаратов.

Обнаружены генетические детерминанты множественной лекарственной устойчивости.

IV. Контроль белок-белковых взаимодействий с помощью малых молекул также концептуально относится к хемогенетическим подходам. Здесь особенно значимы системы химически индуцируемой димеризации (CID) [72], позволяющие инициировать взаимодействие между белками-мишенями, слитыми с лиганд-активируемыми димеризующими доменами. Хорошо зарекомендовали себя CID-системы, основанные на гомодимеризации белка FKBP [73], гетеродимеризации белков FKBP/FRB [74] и их производные [75, 76]. В нейробиологии такие CID применяют для обратимой инактивации синаптической передачи сигнала *in vivo* (на трансгенных мышах) за счет подавления слияния синаптических везикул [77]. В другом семействе систем химически индуцируемой димеризации используется фермент дигидрофолатредуктаза (DHFR) и его синтетические ингибиторы (метотрексат, триметоприм). Для гетеродимеризации мишеней DHFR комбинируют с другими лигандсвязывающими белками [78, 79]. Большой интерес представляют основанные на этой CID-системе наноантитела (nanobodies) с химическим контролем аффинности к мишени [80, 81]. В частности, описано антитело, связывание которого с GFP включается и выключается лигандами NADPH и TMP соответственно [80]. Эта технология обеспечивает химически контролируемое обратимое флуоресцентное мечение.

В последнее время разрабатываются методы компьютерного дизайна белковых молекул, которые, будучи экспрессированными в виде двух комплементарных фрагментов, могут ассоциировать при связывании лиганда [82].

Взаимодействие FKBP с его партнером FRB и модуляция активности этих белков малыми молекулами (рапамицином и др.) нашли применение не только в системах димеризации, но и в хемогенетическом управлении стабильностью белков-мишеней [83–85]. Интересная система контроля стабильности белка разработана на основе протеазы вируса гепатита С [86, 87]. Вирусный полипептид при его интеграции в химерный белок по умолчанию проявляет автопротеолитическую активность, которая блокируется введением в систему молекулы ингибитора. Таким образом, химерный белок сохраняет целостность и активность, пока ингибитор присутствует в клетке, и разрушается при его удалении. Удалось адаптировать различные фармакологические препараты к ингибированию протеолиза и показать потенциал этой системы дестабилизации белков в экспериментах с контролем транскрипции, редактирования генома, апоптоза.

V. В обиход входят хомогенетические генераторы малых молекул. Яркий пример – оксидаза *D*-аминокислот (DAAO) для генерирования пероксида водорода в клетках [88]. Этот дрожжевой фермент катализирует превращение *D*-аминокислот в соответствующие альфа-кето-производные с выделением молекулы пероксида [89]. Таким образом, для активации генератора H_2O_2 можно использовать практически любую *D*-аминокислоту. DAAO как хомогенетический эффектор нашел применение в изучении активности антиоксидантных систем [90] и клеточного сигналинга [91] на культуре клеток, а также влияния пероксида на сердечную деятельность *in vivo* [92]. В перечисленных работах DAAO активировали совместно с мониторингом уровня пероксида с помощью флуоресцентных индикаторов.

VI. Принципы хомогенетики используются при конструировании флуоресцентных индикаторов мембранного потенциала. В одних случаях потенциал-чувствительные красители таргетируются на клеточную мембрану при помощи белковых молекул (как правило, с ковалентным присоединением к последним) [93, 94] или даже флуорогенно активируются заякоренными в мембране ферментами [95]. В других – ассоциированный с плазматической мембраной флуоресцентный белок играет роль донора FRET для органического флуорофора, мигрирующего в липидном бислое в ответ на изменение электрического потенциала [96]. В третьих, наоборот, потенциал-чувствительной единицей служит молекула микробного родопсина, а его флуоресцентный сигнал усиливается за счет резонансного переноса энергии с яркого флуоресцентного красителя, добавляемого в клетки экзогенно [97, 98]. Подобные индикаторы – перспективные нейробиологические инструменты, уже сегодня они используются для мониторинга электрической активности нейронов *in vivo* [98].

VII. Химическая индукция транскрипции генов бактериальных ферментов, вероятно, один из первых прототипов хомогенетических методов [99, 100]. В свою очередь, гетерологическая экспрессия бактериальных ферментов для внутриклеточной модификации малых молекул служит основной хомогенетических систем, в которых фармакологически релевантные соединения модулируют активность эндогенных белков в специфических типах клеток. Так, воздействие дауномицином (daun02, производным галактозы) на эукариотические клетки, экспрессирующие бактериальную бета-галактозидазу, применяли в качестве модельного инструмента терапии опухолей [101]. Ферментативная активность бета-галактозидазы конвертирует фармакологически инертный daun02 в антибиотик даунорубин, который вызывает апоптоз клеток. В контексте нейронаук приме-

чательны эксперименты на линии трансгенных крыс, в клетках которых бета-галактозидаза экспрессируется под контролем промотора *c-fos*. Авторы воспользовались феноменом дифференциального усиления экспрессии эндогенного транскрипционного трансактиватора Fos в нейронах, восприимчивых к воздействию кокаина, для селективного блокирования кальциевого сигналинга в этих клетках. Таким образом, введение дауномицина в мозг крыс позволило заблокировать ионные каналы (и, соответственно, передачу двигательных сигналов) только в нейронах, сенситизованных кокаином [102]. Хорошим потенциалом для нейробиологического применения в системах экспрессии с химической индукцией обладают некоторые природные нейротоксины. В частности, легкая цепь столбнячного токсина (TeNT), блокирующая синаптическую передачу путем протеолитического расщепления белков синаптических везикул [103], экспрессируемая в нейронах под контролем тетрациклин-чувствительных регуляторных элементов, используется (совместно с тетрациклиновым трансактиватором) как обратимый хомогенетический ингибитор [104–106].

VIII. Наконец, обширная и весьма гетерогенная в структурном и функциональном смысле группа хомогенетических эффекторов используется практически исключительно в нейробиологических исследованиях. Подробная характеристика этой группы представлена в следующем разделе.

Хомогенетические эффекторы для нейробиологии

Все эффекторные молекулы, применяемые в нейробиологической хомогенетике, можно разделить на два типа: лиганд-зависимые ионные каналы и химически активируемые G-белок-сопряженные рецепторы [107]. Эволюция молекулярных инструментов обоих типов чаще всего направлена от применения природных рецепторов к инжинирингу химерных молекул, оптимизированных для эффективного решения частных научных задач.

Среди природных лиганд-зависимых катионных каналов в качестве хомогенетических эффекторов применяли уже упомянутые в разделе «Термогенетика» TRP-рецепторы. Напомним, что для этих катионных каналов характерна не только температурная, но и химическая чувствительность. При расшифровке роли эндогенного рецептора TRPM2, экспрессирующегося в клетках гипоталамуса млекопитающих, в центральной регуляции температуры тела активировали этот белок природным агонистом – аденозиндифосфатрибозой (ADPR), а также модулировали его активность сенсibilизатором – пероксидом водорода

[108]. Активацию ванилоидного рецептора TRPV1 капсаицином применяли для возбуждения культивируемых нейронов [109], а также *in vivo*, в мозге трансгенных мышей [110, 111], в том числе для изучения пищевого поведения [112] и боли [113]. Описана также стимуляция ментолом нейронов, экспрессирующих холодовой рецептор TRPM8 [109]. Существенный недостаток TRP-каналов как хомогенетических эффекторов – их присутствие в тканях мозга млекопитающих в качестве эндогенных рецепторов, чреватое развитием неспецифических ответов на стимуляцию. В этой связи в работах *in vivo* используют линии мышей с нокаутами генов TRP [107].

Важнейшая группа химически активируемых ионных каналов, нашедших применение в нейробиологии, – рецепторы с цистеиновой петлей (Cys-loop receptors) [107, 114]. Это семейство пентамерных молекул, несущих характерный цистеин-богатый структурный элемент, контролирующей проницаемость ионной поры, включает никотиновые, глициновые, серотониновые и GABA-рецепторы, а также

глутаматные хлорные каналы [107]. Хотя в единичных работах для контроля активности нейронов использовали и Cys-loop-рецепторы дикого типа (в частности, GABA(C) и его агонист *цис*-4-аминокроtonовую кислоту [115], а также GluCl и ивермектин [116]), большее распространение в качестве нейромодуляторов получили их искусственные варианты с повышенной чувствительностью [117, 118] и модифицированной специфичностью [119] к лиганду, а также с измененной ионной селективностью [120]. Однако наиболее востребованный хомогенетический инструмент, разработанный на основе Cys-loop-рецепторов, – это семейство химерных модульных ионных каналов (PSAM) и их лигандов (PSEM) [107, 120, 121]. Первый вариант фармакологически селективного активаторного модуля PSAM – продукт генетической модификации лигандсвязывающего домена (LBD) $\alpha 7$ -никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR), направленной на снижение его сродства к ацетилхолину и выработку специфичности к синтетическим соединениям, не активирующим nAChR дикого типа. Последние

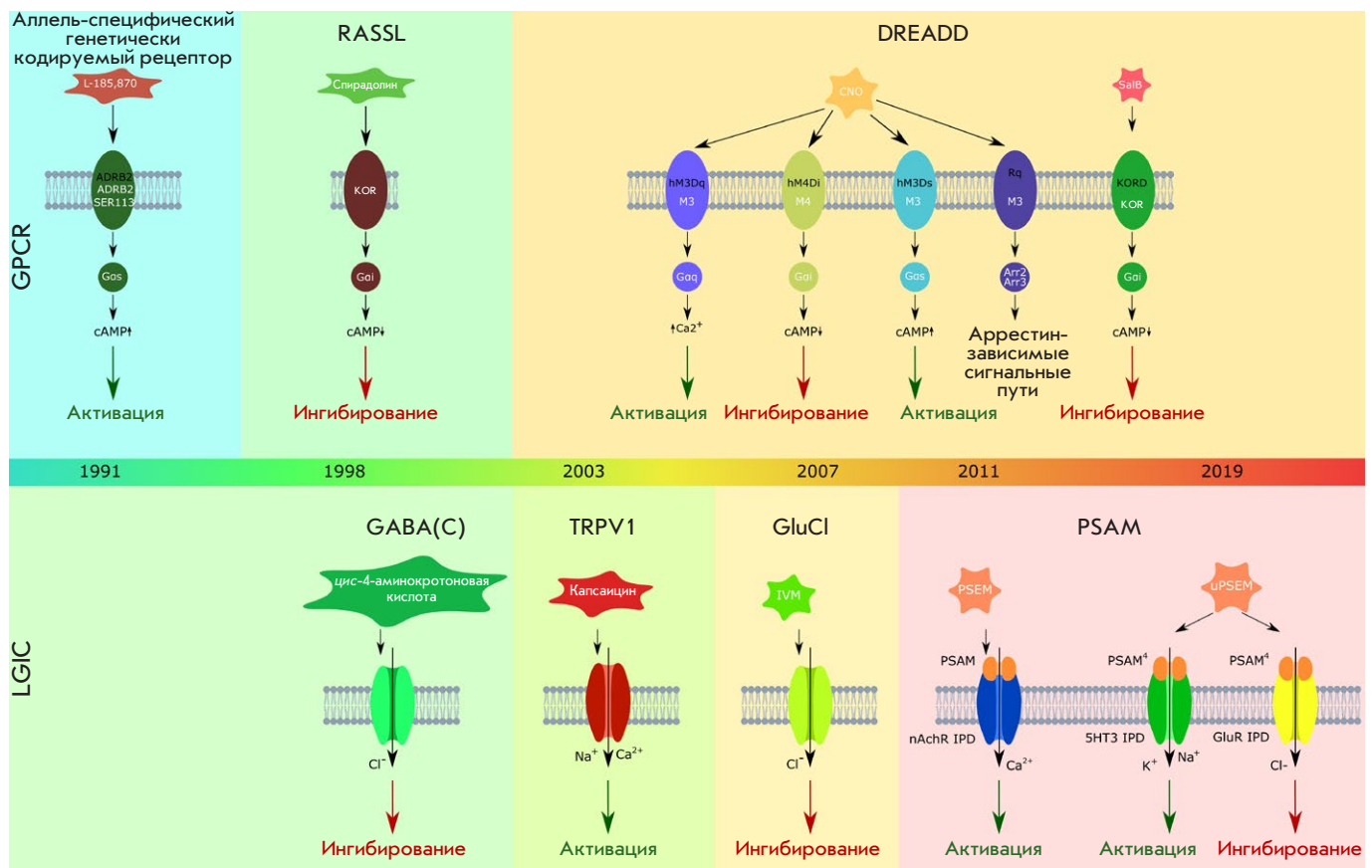


Рис. 2. Временная шкала, отражающая появление различных хомогенетических подходов. Показаны основные инструменты хомогенетики и их предшественники (сверху – на основе GPCR, снизу – лиганд-зависимых ионных каналов (ligand-gated ion channels, LGIC)), а также схематически изображены молекулярные механизмы активации этих молекул

были названы фармакологически селективными эффекторными модулями – PSEM [122]. Особенности молекулярной организации Cys-loop-рецепторов, а именно, относительная структурная независимость лигандсвязывающего домена (LBD) и домена ионной поры (IPD) [123], сделали возможным модульный инжиниринг рецепторов на основе PSAM. Так, селективный к PSEM-лигандам LBD был скомбинирован с доменами ионной поры других Cys-loop-рецепторов [122]. В сочетании с IPD серотонинового рецептора 5HT₃ активированный PSAM обеспечивает Na⁺/K⁺-токи внутрь клетки, деполяризацию мембраны и возбуждение нейрона, с IPD-рецептора nAChR – кальциевый ток внутрь клетки, а с IPD глицинового или GABA-рецептора – входящий ток Cl⁻, сопровождаемый гиперполяризацией мембраны и сайленсингом нейрональной активности (рис. 2). Каждый из хомогенетических модулей – PSAM, IPD и PSEM – может быть объектом дальнейших модификаций, направленных на расширение палитры доступных лигандов, увеличения специфичности и сродства к лиганду, проводимости ионной поры [107, 121]. В прошлом году были опубликованы результаты масштабной работы по рациональному дизайну нового активатора PSAM4, специфичного к антитабачному препарату варениклину, а также нового семейства лигандов uPSEM, обладающих субнаномолярным сродством к PSAM4 [124] (рис. 2). Потенциал этих инструментов показан в *in vivo* экспериментах по активации и подавлению нейрональной активности в мозге мышей и обезьян.

Система хомогенетической нейромодуляции на основе PSAM/PSEM использована в ряде важных работ по изучению механизмов памяти и обучения [125–129], боли [68], мотивационных эффектов голода и жажды [130], двигательной и поведенческой активности [131, 132] *in vivo*. Рассматриваются клинико-терапевтические перспективы этого подхода [133].

Как и оптогенетические инструменты на базе микробных родопсинов, лиганд-зависимые ионные каналы (TRP, Cys-loop) обладают ионотропным механизмом нейромодуляции, т.е. создают трансмембранные ионные токи, изменяющие поляризацию мембраны нейронов. Однако в хомогенетике существенно более широко, чем в оптогенетике, используют рецепторы с метаботропным механизмом активации – химически активируемые G-белок-сопряженные рецепторы (GPCR). Формирование пула хомогенетических GPCR, пригодных для нейробиологических экспериментов *in vivo*, заняло около 20 лет и происходило в несколько этапов (рис. 2). В ходе изучения молекулярных механизмов распознавания лиганда бета-адренергическими метаботропными рецепторами установлены ключевые аминокислотные положения,

связанные со специфичностью связывания адреналина, и на основе этих данных созданы варианты рецепторов, активируемые синтетическими производными катехола [134, 135]. Так появились первые аллель-специфические генетически кодируемые рецепторы [121, 134]. Сами модифицированные бета-адренергические рецепторы не нашли применения в нейробиологии, однако концепция изменения лиганд-специфичности средствами рационального дизайна стала ключевой для разработки семейства RASSL – рецепторов, активируемых исключительно синтетическими лигандами [136, 137].

Первые RASSL были получены в результате мутагенеза каппа-опиоидного рецептора (k-opioid receptor, KOR) [136]. Модифицированный KOR утратил чувствительность к эндогенным пептидным лигандам, однако стал активироваться синтетическим агонистом – спирадолином. Хомогенетические эксперименты *in vivo* с ранними вариантами RASSL позволили осуществить модуляцию сердечной деятельности мыши [138]. Позднее специфическую стимуляцию вкусовых нейронов с помощью RASSL использовали для расшифровки механизмов восприятия сладкого, умами и горького вкусов [139, 140]. RASSL нашли ограниченное применение в нейробиологии прежде всего из-за чувствительности к их лиганду, спирадолину, эндогенных опиоидных рецепторов [107].

Недостатки, характерные для RASSL, в основном устранены в следующем поколении химерных GPCR, названных DREADD (designer receptors exclusively activated by designer drugs, рис. 2) [141]. На сегодняшний день именно эти молекулы являются наиболее востребованными хомогенетическими инструментами.

DREADD

Систематическое изучение молекулярной структуры и механизмов активации природных GPCR [142] обеспечило концептуальную основу для дизайна химерных молекул, активирующихся фармакологически инертным веществом [143]. Пилотной мишенью для мутагенеза стал мускариновый ацетилхолиновый рецептор hM3, который в результате модификации приобрел высокую селективность в отношении клозапин-N-оксида (CNO) и практически потерял сродство к природному агонисту, ацетилхолину [143]. Этот рецептор, ставший первым представителем семейства DREADD, получил название hM3Dq, поскольку связывает G-белки типа Gq. Выбор CNO как лиганда продиктован тем, что это вещество имеет благоприятную фармакокинетику в организме мыши и человека, а также практически не активирует эндогенные GPCR. Потенциал hM3Dq вскоре показали в экспериментах *in vivo*, где этот рецептор селек-

тивно активировал нейроны гиппокампа мыши [144]. Механизм возбуждения нейронов при активации GPCR гораздо сложнее, чем у ионотропных рецепторов. Например, активация hM3Dq приводит к запуску фосфоинозитольного сигналинга, повышающего возбудимость нейронов, а также к выбросу катионов кальция из внутриклеточных депо, которые, в свою очередь, способствуют запуску $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипорта, деполяризующего мембрану [107]. Как и в случае с Cys-loop-рецепторами, «модульность» молекул GPCR облегчает дизайн их новых вариантов. Так, на основе упомянутого выше hM3Dq путем замены внутриклеточного G-белоксвязывающего модуля (на Gs-сопряженный из бета-адренергического рецептора) получен hM3Ds [145] – DREADD, активирующий продукцию cAMP в ответ на связывание CNO [146]. По аналогии с hM3 были модифицированы и другие мускариновые рецепторы, в результате чего семейство чувствительных к CNO DREADD расширилось. Помимо hM3Dq/hM3Ds, оно включает в себя hM1Dq, hM2Di, hM4Di, hM5Dq, некоторые из которых нашли широкое применение в нейробиологии [121, 143, 147]. В частности, hM4Di представляет собой ингибиторный эффектор, снижающий продукцию cAMP и обеспечивающий гиперполяризацию мембран нейронов, опосредованную открытием калиевых каналов [143]. В дальнейшем показали, что hM4Di также является мощным ингибитором синаптической передачи сигнала [148, 149]. Таким образом, в семейство DREADD входят как активирующие, так и ингибирующие нейрональную активность эффекторы, воздействующие на клеточную физиологию с помощью трех канонических G-белковых каскадов (Gas, Gaq, Gai). Кроме того, внесение дополнительной мутации в hM3Dq позволило получить DREADD[Rq(R165L)], не взаимодействующий с G-белками, но селективно запускающий β -аррестинный сигналинг [150]. Принципы молекулярного дизайна DREADD применили для инжиниринга других GPCR. Так, модификация капаопиоидного рецептора (KOR) позволила изменить лиганд-специфичность: вместо природного агониста, психоактивного сальвинорина А, его мутантный вариант KORDi – сайленсер нейрональной активности – активируется фармакологически инертным сальвинорином В [151].

Стратегии доставки генов DREADD в целевые клетки в целом схожи со стратегиями доставки канальных родопсинов и других оптогенетических эффекторов (см. I часть обзора) и включают транзентную экспрессию с помощью вирусных векторов и трансгенез [107]. При этом DREADD активируются исключительно специфическим химическим лигандом (CNO), который не присутствует в стимулируемых клетках и проявляет чрезвычайно слабую

активность в отношении эндогенных рецепторов. Можно выделить следующие преимущества использования DREADD для нейростимуляции [121]:

а) CNO может быть доставлен в мозг животного не только инвазивными методами (инъекции), но и перорально (с пищей или питьевой водой), а активация DREADD не требует специальных технических приспособлений и манипуляций (например, вживления в мозг экспериментального животного оптоволоконного кабеля или носимого имплантата);

б) фармакокинетика CNO подразумевает пролонгированное воздействие на нервные клетки (от минут до часов), что позволяет проводить эксперименты, предполагающие долговременную стимуляцию. Кроме того, при введении в организм животного лиганд DREADD достаточно равномерно распределяется в тканях и достигает самых глубоких областей мозга, исключая характерные для оптогенетики сложности со стимуляцией крупных популяций нейронов и труднодоступных участков нервной ткани.

Таким образом, не обладая высоким пространственным и временным разрешением и будучи малопригодной к анализу быстрых физиологических процессов, хемогенетическая стимуляция прекрасно подходит для изучения влияния на клетки различных хронических эффектов или для имитации протяженных во времени биохимических циклов, например циркадных ритмов.

Определенные сложности в применении DREADD создают высокие дозы CNO, необходимые для достижения достаточной интенсивности стимуляции [152], и связанные с этим побочные эффекты [153], а также пробелы в понимании молекулярных механизмов проникновения CNO в мозговую ткань. В 2017 году было показано, что в мозге крыс активация DREADD осуществляется не самим CNO (который плохо проникает через гематоэнцефалический барьер), а метаболически образованным клозапином [154]. Эти факты побудили к разработке новых агонистов DREADD, лучше проникающих в мозг и обладающих более высоким сродством к химерным рецепторам [155, 156]. Также предлагаются усовершенствованные технологии доставки лигандов, в частности, акустический таргетинг [157] и хемомагнитная модуляция с помощью рассеивающих тепло наночастиц [158], облегчающие локальное прохождение гематоэнцефалического барьера.

Применение в нейробиологии и перспективы метода

Как мы уже отмечали, в последние 4–5 лет наблюдается настоящий бум нейробиологической хемогенетики. В основной массе новых работ используются рецепторы семейства DREADD, эксперименты про-

водят *in vivo*, а спектр модельных систем по широте (от мышей до обезьян) не уступает таковому в оптогенетике. Примечательно, что потребовалось почти десятилетие, чтобы подход, связанный с дизайнерскими хеморецепторами, стал общеупотребимым в нейронауках. Мы связываем это со сложностью молекулярных механизмов стимуляции нейронов с помощью экзогенных GPCR. Здесь мы приведем лишь отдельные яркие примеры хомогенетических работ, не имея возможности в формате обзора охватить все их разнообразие.

Хомогенетический подход позволил разобраться в механизмах регенерации аксонов [159], организации коннектома и взаимодействии крупных популяций нейронов [160–162], изучить нейрофизиологические основы когнитивной дисфункции на генетических моделях шизофрении [163, 164] и аутизма [165, 166]. В ряде работ селективную стимуляцию нейронов, экспрессирующих DREADD, использовали для изучения поведенческих эффектов кокаина [167] и алкоголя [168], а также нарушений в функционировании мозга потомства, обусловленных приемом алкоголя беременной самкой [169]. Множество «хомогенетических» публикаций посвящено расшифровке механизмов памяти [170–174] и сна [175–178]. В нескольких крупных работах рассмотрены необычные взаимосвязи функционирования нервной и пищеварительной систем: роль специфических популяций нейронов в развитии ожирения [179], гастронейральные пути выработки предпочтений в потреблении сахара [180], влияние микробиоты кишечника на активность симпатических нейронов [181]. В недавно проведенном изящном исследовании рецепторы DREADD помогли в установлении взаимосвязи стресса и появления седых волос [182]. Пожалуй, самый крупный и значимый блок научных проектов, в которых задействован хомогенетический арсенал, связан с изучением нейрофизиологических детерминант поведения животных. Здесь охвачены как традиционные темы – пищевое [183], защитное [184] поведение и внимание [185], так и специфические поведенческие паттерны, например, родительская забота [186] и вокализация при материнской коммуникации с новорожденным [187]. Хомогенетические инструменты нашли применение даже при изучении механизмов восприятия мышью запаха кошки [188, 189].

Обсуждается вопрос клинико-терапевтического применения хомогенетики. Речь идет и о системах рецептор–лиганд на основе GPCR [178, 190], и о лиганд-зависимых ионных каналах [133].

Невероятное разнообразие природных хеморецепторов (как их химической специфичности, так и механизмов активации) открывает широкие перспективы дальнейшего развития хомогенетического подхода.

КОМБИНАЦИИ ПОДХОДОВ

Итак, мы рассмотрели три современных подхода к контролю биохимических процессов, сделав акцент на управлении активностью нервных клеток, а также молекулярные инструменты, связанные с реализацией этих подходов. У каждого из них – оптогенетического, термогенетического и хомогенетического – есть сильные и слабые стороны, причем преимущества одного подхода зачастую комплементарны недостаткам другого. Это позволяет в каждом отдельном случае применять более эффективный и релевантный инструмент и даже комбинировать разные принципы воздействия на клетки в одной модельной системе. Свою роль здесь играет и ортогональность механизмов стимуляции: например, кратковременное оптическое воздействие через ионные каналы и пролонгированная химическая стимуляция через G-белковый сигналинг с очевидностью могут дополнять друг друга.

Действительно, примеры взаимодополняющего использования опто- и хомогенетики можно найти в значительном числе нейробиологических экспериментов. Так, совместную оптогенетическую и хомогенетическую стимуляцию *in vivo* используют для изучения механизмов мотивации [191] и поведенческих адаптаций [192, 193], установления роли катиона натрия в регуляции циркадных ритмов [194] и роли микроглии в регуляции миелинизации [195], исследования эпилепсии [196], физиологии сна [197], регуляции пищевого поведения [198] и болевого восприятия [199].

Вместе с тем, существуют системы, где принципы оптической и химической стимуляции переплетены на молекулярном уровне, формируя не отдельно работающие, а по-настоящему гибридные молекулярные инструменты.

Пожалуй, первый пример такого рода относится к периоду зарождения нейробиологической оптогенетики, когда в 2003 году удалось осуществить стимуляцию нейронов гиппокампа, экспрессирующих лиганд-зависимые катионные каналы TRPV1 и P2X2, фотовысвобождаемыми лигандами (капсаицином и АТФ соответственно) [109]. Позже гибридную фотохимическую стимуляцию канала P2X2 применяли *in vivo* для контроля поведения дрозофилы [200]. Описано несколько систем обратимой фотохимической стимуляции, основанных на ковалентной модификации белка малой молекулой, пришитой через фотоизомеризующуюся (азобензольную) группу. В одном случае фотоизомеризация позволяла открывать (длинноволновым светом) и закрывать (коротковолновым) калиевый канал [201], в другом – обратимо презентировать лиганд ионотропному глутаматному рецептору (iGluR) [202]. Дальнейшим развитием это-

го подхода стала модификация эндогенных калиевых каналов и опосредованная ими фотохимическая стимуляция нейронов крысы *in cellulo* и *ex vivo* [203], а также появление новых «дизайнерских» калиевых каналов [204], ацетилхолиновых [205] и глутаматных [206] рецепторов с аналогичным принципом активации. Последние – из семейства LiGluR – использовали в экспериментах *in vivo* [206, 207]. В 2020 году появилось первое сообщение о фотохимически активируемом GPCR – эндогенном метаботропном глутаматном рецепторе (mGluR2), способном обратимо стимулировать нейроны [208].

К хемооптогенетическим эффекторам относится и флуорогенактивирующий пептид Mito-FAR, доставляющий в митохондрии фотосенсибилизатор MG-2I [209].

Наконец, самой изящной реализацией гибридного фотохимического подхода к контролю клеточной активности можно назвать систему BL-OG (BioLuminescent OptoGenetics), в которой эффектор представляет собой слитый белок (люминопсин), состоящий из люциферазы и канального родопсина [210–214]. Молекула родопсина активируется люминесценцией люциферазы, включение и интенсивность эмиссии которой, в свою очередь, может регулироваться составом и количеством добавляемых в систему кофакторов (люциферина и его транспортера). Метафорически BL-OG можно охарактеризовать как систему адресной доставки света в мозг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Оптогенетика – зрелый и чрезвычайно продуктивный метод, получивший широкое признание в научном сообществе. Так, в 2010 году оптогенетика была признана Методом Года по версии авторитетного

журнала Nature Methods [215] и заняла почетное место в сборнике Прорывы Десятилетия (Breakthroughs of the Decade), выпущенном журналом Science [216]. Исключительно высокая ценность оптогенетического подхода для нейробиологических исследований отмечена престижной премией Brain Prize, врученной в 2013 году шести исследователям, внесшим ключевой вклад в разработку и развитие оптогенетических инструментов. Оптогенетика включена в перечень базовых подходов к реализации крупнейшей научной программы BRAIN initiative (<https://braininitiative.nih.gov/>), курируемой американским Национальным институтом здоровья (NIH). Более того, с нашей точки зрения, успех оптогенетики оказал глобальное влияние на развитие научной методологии, став мощным катализатором развития самых разнообразных генетически кодируемых инструментов. Вероятно, лучшее свидетельство этому – сотни прорывных работ, увидевших свет за последнее десятилетие и демонстрирующих гибкость и эффективность новых подходов – хемогенетики, термогенетики и гибридных фотохимических методов. В дополнение к этим оформившимся и хорошо себя зарекомендовавшим методикам появляются и совершенно новые, например, ультразвуковая стимуляция нейронов, опосредованная активацией катионных каналов (соногенетика) [217] и однокомпонентная магнитная стимуляция (магнетогенетика), осуществляемая с помощью железосодержащих белков [218]. Пожелаем им успехов. ●

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

- Abram P.K., Boivin G., Moiroux J., Brodeur J. // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 2017. V. 92. № 4. P. 1859–1876.
- Garrity P.A., Goodman M.B., Samuel A.D., Sengupta P. // Genes Dev. 2010. V. 24. № 21. P. 2365–2382.
- McKemy D.D. // Pflugers Arch. 2007. V. 454. № 5. P. 777–791.
- Bernstein J.G., Garrity P.A., Boyden E.S. // Curr. Opin. Neurobiol. 2012. V. 22. № 1. P. 61–71.
- Hamada F.N., Rosenzweig M., Kang K., Pulver S.R., Ghezzi A., Jegla T.J., Garrity P.A. // Nature. 2008. V. 454. № 7201. P. 217–220.
- Kohatsu S., Koganezawa M., Yamamoto D. // Neuron. 2011. V. 69. № 3. P. 498–508.
- Huang H., Delikanli S., Zeng H., Ferkey D.M., Pralle A. // Nat. Nanotechnol. 2010. V. 5. № 8. P. 602–606.
- Stanley S.A., Gagner J.E., Damanpour S., Yoshida M., Dordick J.S., Friedman J.M. // Science. 2012. V. 336. № 6081. P. 604–608.
- Chen R., Romero G., Christiansen M.G., Mohr A., Anikeeva P. // Science. 2015. V. 347. № 6229. P. 1477–1480.
- Tay A., Di Carlo D. // Curr. Med. Chem. 2017. V. 24. № 5. P. 537–548.
- Albert E.S., Bec J.M., Desmadryl G., Chekroud K., Travo C., Gaboyard S., Bardin F., Marc I., Dumas M., Lenaers G., et al. // J. Neurophysiol. 2012. V. 107. № 12. P. 3227–3234.
- Bath D.E., Stowers J.R., Hörmann D., Poehlmann A., Dickson B.J., Straw A.D. // Nat. Methods. 2014. V. 11. № 7. P. 756–762.
- Ermakova Y.G., Lanin A.A., Fedotov I.V., Roshchin M., Kelmanson I.V., Kulik D., Bogdanova Y.A., Shokhina A.G., Bilan D.S., Staroverov D.B., et al. // Nat. Commun. 2017. V. 8. P. 15362.
- Klinkert B., Cimdins A., Gaubig L.C., Roßmanith J., Aschke-Sonnenborn U., Narberhaus F. // J. Biotechnol. 2012. V. 160. № 1–2. P. 55–63.
- Kamei Y., Suzuki M., Watanabe K., Fujimori K., Kawasaki T., Deguchi T., Yoneda Y., Todo T., Takagi S., Funatsu T., et al. // Nat. Methods. 2009. V. 6. № 1. P. 79–81.
- Hirsch S.M., Sundaramoorthy S., Davies T., Zhuravlev Y., Waters J.C., Shirasu-Hiza M., Dumont J., Canman J.C. // Nat. Methods. 2018. V. 15. № 11. P. 921–923.
- Kitamoto T. // J. Neurobiol. 2001. V. 47. № 2. P. 81–92.

18. Kawasaki F, Hazen M, Ordway R.W. // *Nat. Neurosci.* 2000. V. 3. № 9. P. 859–860.
19. Scaplen K.M., Mei N.J., Bounds H.A., Song S.L., Azanchi R., Kaun K.R. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 4427.
20. Luo L., Callaway E.M., Svoboda K. // *Neuron.* 2018. V. 98. № 2. P. 256–281.
21. Felsenberg J., Jacob P.F., Walker T., Barnstedt O., Edmondson-Stait A.J., Pleijzier M.W., Otto N., Schlegel P., Sharifi N., Perisse E., et al. // *Cell.* 2018. V. 175. № 3. P. 709–722.e15.
22. Senapati B., Tsao C.-H., Juan Y.-A., Chiu T.-H., Wu C.-L., Waddell S., Lin S. // *Nat. Neurosci.* 2019. V. 22. № 12. P. 2029–2039.
23. Zhao B., Sun J., Zhang X., Mo H., Niu Y., Li Q., Wang L., Zhong Y. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 4550.
24. Kohsaka H., Zwart M.F., Fushiki A., Fetter R.D., Truman J.W., Cardona A., Nose A. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 2654.
25. Ni L., Klein M., Svec K.V., Budelli G., Chang E.C., Ferrer A.J., Benton R., Samuel A.D., Garrity P.A. // *Elife.* 2016. V. 5. P. e13254.
26. Mishra A., Salari A., Berigan B.R., Miguel K.C., Amirshenava M., Robinson A., Zars B.C., Lin J.L., Milescu L.S., Milescu M., et al. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 901.
27. Mishra A., Cronley P., Ganesan M., Schulz D.J., Zars T. // *J. Neurogenet.* 2020. V. 34. № 1. P. 115–122.
28. McKemy D.D., Neuhusser W.M., Julius D. // *Nature.* 2002. V. 416. № 6876. P. 52–58.
29. Dhaka A., Viswanath V., Patapoutian A. // *Annu. Rev. Neurosci.* 2006. V. 29. P. 135–161.
30. Venkatachalam K., Montell C. // *Annu. Rev. Biochem.* 2007. V. 76. P. 387–417.
31. Tominaga M., Caterina M.J. // *J. Neurobiol.* 2004. V. 61. № 1. P. 3–12.
32. Jordt S.-E., McKemy D.D., Julius D. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2003. V. 13. № 4. P. 487–492.
33. Pulver S.R., Pashkovski S.L., Hornstein N.J., Garrity P.A., Griffith L.C. // *J. Neurophysiol.* 2009. V. 101. № 6. P. 3075–3088.
34. Peabody N.C., Pohl J.B., Diao F., Vreede A.P., Sandstrom D.J., Wang H., Zelensky P.K., White B.H. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 11. P. 3343–3353.
35. Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C., Reeve A.J., Andersson D.A., Story G.M., Earley T.J., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S., et al. // *Cell.* 2002. V. 108. № 5. P. 705–715.
36. Viswanath V., Story G.M., Peier A.M., Petrus M.J., Lee V.M., Hwang S.W., Patapoutian A., Jegla T. // *Nature.* 2003. V. 423. № 6942. P. 822–823.
37. Krashes M.J., DasGupta S., Vreede A., White B., Armstrong J.D., Waddell S. // *Cell.* 2009. V. 139. № 2. P. 416–427.
38. Parisky K.M., Agosto J., Pulver S.R., Shang Y., Kuklin E., Hodge J.J.L., Kang K., Kang K., Liu X., Garrity P.A., et al. // *Neuron.* 2008. V. 60. № 4. P. 672–682.
39. Roshchin M., Ermakova Y.G., Lanin A.A., Chebotarev A.S., Kelmanson I.V., Balaban P.M., Zheltikov A.M., Belousov V.V., Nikitin E.S. // *Neurosci. Lett.* 2018. V. 687. P. 153–157.
40. Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T.A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. // *Neuron.* 1998. V. 21. № 3. P. 531–543.
41. Yao J., Liu B., Qin F. // *Biophys. J.* 2009. V. 96. № 9. P. 3611–3619.
42. Guo C., Pan Y., Gong Z. // *Neurosci. Bull.* 2019. V. 35. № 6. P. 1058–1072.
43. Park J., Kondo S., Tanimoto H., Kohsaka H., Nose A. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 10307.
44. Dreyer A.P., Martin M.M., Fulgham C.V., Jabr D.A., Bai L., Beshel J., Cavanaugh D.J. // *PLoS Genet.* 2019. V. 15. № 11. P. e1008478.
45. Youn H., Kirkhart C., Chia J., Scott K. // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 6. P. e0198362.
46. Poças G.M., Domingos P.M., Mirth C.K. // *J. Vis. Exp.* 2020. № 160. P. e61323.
47. Agrawal S., Dickinson M.H. // *J. Exp. Biol.* 2019. V. 222. № 16. P. jeb203414.
48. Warth Pérez Arias C.C., Frosch P., Fiala A., Riemensperger T.D. // *Front. Physiol.* 2020. V. 11. P. 53.
49. Picao-Osorio J., Johnston J., Landgraf M., Berni J., Alonso C.R. // *Science.* 2015. V. 350. № 6262. P. 815–820.
50. Schretter C.E., Vielmetter J., Bartos I., Marka Z., Marka S., Argade S., Mazmanian S.K. // *Nature.* 2018. V. 563. № 7731. P. 402–406.
51. McKellar C.E., Wytenbach R.A. // *J. Undergrad. Neurosci. Edu.* 2017. V. 15. № 2. P. A110–A116.
52. Chen S., Chiu C.N., McArthur K.L., Fetcho J.R., Prober D.A. // *Nat. Methods.* 2016. V. 13. № 2. P. 147–150.
53. Richter C.-P., Rajguru S., Bendett M. // *Proc. SPIE—the Int. Soc. Opt. Eng.* 2013. V. 8565. P. 85651Y.
54. Broch F., Gautier A. // *Chempluschem.* 2020. V. 85. № 7. P. 1487–1497.
55. Szent-Gyorgyi C., Schmidt B.F., Schmidt B.A., Creeger Y., Fisher G.W., Zakel K.L., Adler S., Fitzpatrick J.A.J., Woolford C.A., Yan Q., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 2. P. 235–240.
56. Gallo E. // *Bioconjug. Chem.* 2020. V. 31. № 1. P. 16–27.
57. Plamont M.-A., Billon-Denis E., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Quérard J., Pan B., Rossignol J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 3. P. 497–502.
58. Tebo A.G., Moeyaert B., Thauvin M., Carlon-Andres I., Böken D., Volovitch M., Padilla-Parra S., Dedecker P., Vriz S., Gautier A. // *Nat. Chem. Biol.* 2020. V. 17. № 1. P. 30–38.
59. Li C., Tebo A.G., Thauvin M., Plamont M.-A., Volovitch M., Morin X., Vriz S., Gautier A. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2020. V. 59. № 41. P. 17917–17923.
60. Li H., Vaughan J.C. // *Chem. Rev.* 2018. V. 118. № 18. P. 9412–9454.
61. Kiuchi T., Higuchi M., Takamura A., Maruoka M., Watanabe N. // *Nat. Methods.* 2015. V. 12. № 8. P. 743–746.
62. Collot J., Gradinaru J., Humbert N., Skander M., Zocchi A., Ward T.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. № 30. P. 9030–9031.
63. Klein G., Humbert N., Gradinaru J., Ivanova A., Gilardoni F., Rusbandi U.E., Ward T.R. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005. V. 44. № 47. P. 7764–7767.
64. Zimbron J.M., Sardo A., Heinisch T., Wohlschlagler T., Gradinaru J., Massa C., Schirmer T., Creus M., Ward T.R. // *Chemistry.* 2010. V. 16. № 43. P. 12883–12889.
65. Heinisch T., Ward T.R. // *Acc. Chem. Res.* 2016. V. 49. № 9. P. 1711–1721.
66. Bishop A.C., Ubersax J.A., Petsch D.T., Matheos D.P., Gray N.S., Blethrow J., Shimizu E., Tsien J.Z., Schultz P.G., Rose M.D., et al. // *Nature.* 2000. V. 407. № 6802. P. 395–401.
67. Deb Roy A., Gruschow S., Cairns N., Goss R.J.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 35. P. 12243–12245.
68. Ren W., Centeno M.V., Berger S., Wu Y., Na X., Liu X., Kondapalli J., Apkarian A.V., Martina M., Surmeier D.J. // *Nat. Neurosci.* 2016. V. 19. № 2. P. 220–222.
69. Secci D., Carradori S., Bizzarri B., Bolasco A., Ballario P., Patramani Z., Fragapane P., Vernarecci S., Canzonetta C., Filetici P. // *Bioorg. Med. Chem.* 2014. V. 22. № 5. P. 1680–1689.

70. Chaillot J., Tebbji F., García C., Wurtele H., Pelletier R., Sellam A. // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 1956.
71. Cowell A.N., Istvan E.S., Lukens A.K., Gomez-Lorenzo M.G., Vanaerschot M., Sakata-Kato T., Flannery E.L., Magistrado P., Owen E., Abraham M., et al. // *Science*. 2018. V. 359. № 6372. P. 191–199.
72. Voß S., Klewer L., Wu Y.-W. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015. V. 28. P. 194–201.
73. Spencer D.M., Wandless T.J., Schreiber S.L., Crabtree G.R. // *Science*. 1993. V. 262. № 5136. P. 1019–1024.
74. Ho S.N., Biggar S.R., Spencer D.M., Schreiber S.L., Crabtree G.R. // *Nature*. 1996. V. 382. № 6594. P. 822–826.
75. Liberles S.D., Diver S.T., Austin D.J., Schreiber S.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 15. P. 7825–7830.
76. Wu H.D., Kikuchi M., Dagliyan O., Aragaki A.K., Nakamura H., Dokholyan N.V., Umehara T., Inoue T. // *Nat. Methods*. 2020. V. 17. № 9. P. 928–936.
77. Karpova A.Y., Tervo D.G.R., Gray N.W., Svoboda K. // *Neuron*. 2005. V. 48. № 5. P. 727–735.
78. Lin H., Abida W.M., Sauer R.T., Cornish V.W. // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. V. 122. № 17. P. 4247–4248.
79. Czlapinski J.L., Schelle M.W., Miller L.W., Laughlin S.T., Kohler J.J., Cornish V.W., Bertozzi C.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. № 40. P. 13186–13187.
80. Farrants H., Tarnawski M., Müller T.G., Otsuka S., Hiblot J., Koch B., Kueblbeck M., Kräusslich H.-G., Ellenberg J., Johnsson K. // *Nat. Methods*. 2020. V. 17. № 3. P. 279–282.
81. Marzilli A.M., McMahan J.B., Ngo J.T. // *Nat. Methods*. 2020. V. 17. № 3. P. 259–260.
82. Dagliyan O., Krokhotin A., Ozkan-Dagliyan I., Deiters A., Der C.J., Hahn K.M., Dokholyan N.V. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 4042.
83. Banaszynski L.A., Chen L.-C., Maynard-Smith L.A., Ooi A.G.L., Wandless T.J. // *Cell*. 2006. V. 126. № 5. P. 995–1004.
84. Banaszynski L.A., Sellmyer M.A., Contag C.H., Wandless T.J., Thorne S.H. // *Nat. Med.* 2008. V. 14. № 10. P. 1123–1127.
85. Glass M., Busche A., Wagner K., Messerle M., Borst E.M. // *Nat. Methods*. 2009. V. 6. № 8. P. 577–579.
86. Tague E.P., Dotson H.L., Tunney S.N., Sloas D.C., Ngo J.T. // *Nat. Methods*. 2018. V. 15. № 7. P. 519–522.
87. Jacobs C.L., Badiie R.K., Lin M.Z. // *Nat. Methods*. 2018. V. 15. № 7. P. 523–526.
88. Stein K.T., Moon S.J., Sikes H.D. // *ACS Synth. Biol.* 2018. V. 7. № 9. P. 2037–2044.
89. Pollegioni L., Langkau B., Tischer W., Ghisla S., Piloni M.S. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 19. P. 13850–13857.
90. Mishina N.M., Bogdanova Y.A., Ermakova Y.G., Panova A.S., Kotova D.A., Bilan D.S., Steinhorn B., Arnér E.S.J., Michel T., Belousov V.V. // *Antioxid. Redox Signal.* 2019. V. 31. № 9. P. 664–670.
91. Saeedi Saravi S.S., Eroglu E., Waldeck-Weiermair M., Sorrentino A., Steinhorn B., Belousov V., Michel T. // *Redox Biol.* 2020. V. 36. P. 101605.
92. Steinhorn B., Sorrentino A., Badole S., Bogdanova Y., Belousov V., Michel T. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 4044.
93. Sundukova M., Prifti E., Bucci A., Kirillova K., Serrao J., Raymond L., Umebayashi M., Hovius R., Riezman H., Johnsson K., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2019. V. 58. № 8. P. 2341–2344.
94. Grenier V., Daws B.R., Liu P., Miller E.W. // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. V. 141. № 3. P. 1349–1358.
95. Liu P., Grenier V., Hong W., Muller V.R., Miller E.W. // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. № 48. P. 17334–17340.
96. Chanda B., Blunck R., Faria L.C., Schweizer F.E., Mody I., Bezanilla F. // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. № 11. P. 1619–1626.
97. Xu Y., Peng L., Wang S., Wang A., Ma R., Zhou Y., Yang J., Sun D.-E., Lin W., Chen X., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2018. V. 57. № 15. P. 3949–3953.
98. Abdelfattah A.S., Kawashima T., Singh A., Novak O., Liu H., Shuai Y., Huang Y.-C., Campagnola L., Seeman S.C., Yu J., et al. // *Science*. 2019. V. 365. № 6454. P. 699–704.
99. Pardee A.B., Jacob F., Monod J. // *J. Mol. Biol.* 1959. V. 1. № 2. P. 165–178.
100. Jacob F., Monod J. // *J. Mol. Biol.* 1961. V. 3. P. 318–356.
101. Farquhar D., Pan B.F., Sakurai M., Ghosh A., Mullen C.A., Nelson J.A. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002. V. 50. № 1. P. 65–70.
102. Koya E., Golden S.A., Harvey B.K., Guez-Barber D.H., Berkow A., Simmons D.E., Bossert J.M., Nair S.G., Uejima J.L., Marin M.T., et al. // *Nat. Neurosci.* 2009. V. 12. № 8. P. 1069–1073.
103. Link E., Edelmann L., Chou J.H., Binz T., Yamasaki S., Eisel U., Baumert M., Südhof T.C., Niemann H., Jahn R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 189. № 2. P. 1017–1023.
104. Nakashiba T., Young J.Z., McHugh T.J., Buhl D.L., Tonegawa S. // *Science*. 2008. V. 319. № 5867. P. 1260–1264.
105. Wahl A.S., Omlor W., Rubio J.C., Chen J.L., Zheng H., Schröter A., Gullo M., Weinmann O., Kobayashi K., Helmchen F., et al. // *Science*. 2014. V. 344. № 6189. P. 1250–1255.
106. Kinoshita M., Matsui R., Kato S., Hasegawa T., Kasahara H., Isa K., Watakabe A., Yamamori T., Nishimura Y., Alstermark B., et al. // *Nature*. 2012. V. 487. № 7406. P. 235–238.
107. Atasoy D., Sternson S.M. // *Physiol. Rev.* 2018. V. 98. № 1. P. 391–418.
108. Song K., Wang H., Kamm G.B., Pohle J., Reis F. de C., Heppenstall P., Wende H., Siemens J. // *Science*. 2016. V. 353. № 6306. P. 1393–1398.
109. Zemelman B.V., Nesnas N., Lee G.A., Miesenbock G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 3. P. 1352–1357.
110. Arenkiel B.R., Klein M.E., Davison I.G., Katz L.C., Ehlers M.D. // *Nat. Methods*. 2008. V. 5. № 4. P. 299–302.
111. Güler A.D., Rainwater A., Parker J.G., Jones G.L., Argilli E., Arenkiel B.R., Ehlers M.D., Bonci A., Zweifel L.S., Palmiter R.D. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 746.
112. Dietrich M.O., Zimmer M.R., Bober J., Horvath T.L. // *Cell*. 2015. V. 160. № 6. P. 1222–1232.
113. Wang S., Bian C., Yang J., Arora V., Gao Y., Wei F., Chung M.-K. // *eNeuro*. V. 7. № 3. P. ENEURO.0118-20.2020.
114. Sine S.M., Engel A.G. // *Nature*. 2006. V. 440. № 7083. P. 448–455.
115. Cheng Q., Kulli J.C., Yang J. // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 10. P. 3419–3428.
116. Slimko E.M., McKinney S., Anderson D.J., Davidson N., Lester H.A. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. № 17. P. 7373–7379.
117. Lerchner W., Xiao C., Nashmi R., Slimko E.M., van Trigt L., Lester H.A., Anderson D.J. // *Neuron*. 2007. V. 54. № 1. P. 35–49.
118. Lin D., Boyle M.P., Dollar P., Lee H., Lein E.S., Perona P., Anderson D.J. // *Nature*. 2011. V. 470. № 7333. P. 221–226.
119. Obenaus H.A., Rozov A., Bertocchi I., Tang W., Kirsch J., Betz H., Sprengel R. // *Front. Mol. Neurosci.* 2016. V. 9. P. 75.
120. Islam R., Keramidis A., Xu L., Durisic N., Sah P., Lynch J.W. // *ACS Chem. Neurosci.* 2016. V. 7. № 12. P. 1647–1657.
121. Sternson S.M., Roth B.L. // *Annu. Rev. Neurosci.* 2014. V. 37. P. 387–407.
122. Magnus C.J., Lee P.H., Atasoy D., Su H.H., Looger L.L., Sternson S.M. // *Science*. 2011. V. 333. № 6047. P. 1292–1296.
123. Eiselé J.L., Bertrand S., Galzi J.L., Devillers-Thiéry A., Changeux J.P., Bertrand D. // *Nature*. 1993. V. 366. № 6454.

- P. 479–483.
124. Magnus C.J., Lee P.H., Bonaventura J., Zemla R., Gomez J.L., Ramirez M.H., Hu X., Galvan A., Basu J., Michaelides M., et al. // *Science*. 2019. V. 364. № 6436. P. eaav5282.
 125. Donato F., Rompani S.B., Caroni P. // *Nature*. 2013. V. 504. № 7479. P. 272–276.
 126. Lovett-Barron M., Kaifosh P., Kheirbek M.A., Danielson N., Zaremba J.D., Reardon T.R., Turi G.F., Hen R., Zemelman B.V., Losonczy A. // *Science*. 2014. V. 343. № 6173. P. 857–863.
 127. Donato F., Chowdhury A., Lahr M., Caroni P. // *Neuron*. 2015. V. 85. № 4. P. 770–786.
 128. Basu J., Zaremba J.D., Cheung S.K., Hitti F.L., Zemelman B.V., Losonczy A., Siegelbaum S.A. // *Science*. 2016. V. 351. № 6269. P. aaa5694.
 129. Karunakaran S., Chowdhury A., Donato F., Quairiaux C., Michel C.M., Caroni P. // *Nat. Neurosci.* 2016. V. 19. № 3. P. 454–464.
 130. Betley J.N., Xu S., Cao Z.F.H., Gong R., Magnus C.J., Yu Y., Sternson S.M. // *Nature*. 2015. V. 521. № 7551. P. 180–185.
 131. Esposito M.S., Capelli P., Arber S. // *Nature*. 2014. V. 508. № 7496. P. 351–356.
 132. Muñoz W., Tremblay R., Levenstein D., Rudy B. // *Science*. 2017. V. 355. № 6328. P. 954–959.
 133. Vogt N. // *Nat. Methods*. 2019. V. 16. № 5. P. 363.
 134. Strader C.D., Gaffney T., Sugg E.E., Candelore M.R., Keys R., Patchett A.A., Dixon R.A. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 1. P. 5–8.
 135. Small K.M., Brown K.M., Forbes S.L., Liggett S.B. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 34. P. 31596–31601.
 136. Coward P., Wada H.G., Falk M.S., Chan S.D., Meng F., Akil H., Conklin B.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. № 1. P. 352–357.
 137. Conklin B.R., Hsiao E.C., Claeysen S., Dumuis A., Srinivasan S., Forsayeth J.R., Guettier J.-M., Chang W.C., Pei Y., McCarthy K.D., et al. // *Nat. Methods*. 2008. V. 5. № 8. P. 673–678.
 138. Redfern C.H., Coward P., Degtyarev M.Y., Lee E.K., Kwa A.T., Hennighausen L., Bujard H., Fishman G.I., Conklin B.R. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. № 2. P. 165–169.
 139. Zhao G.Q., Zhang Y., Hoon M.A., Chandrashekar J., Erlenbach I., Ryba N.J.P., Zuker C.S. // *Cell*. 2003. V. 115. № 3. P. 255–266.
 140. Mueller K.L., Hoon M.A., Erlenbach I., Chandrashekar J., Zuker C.S., Ryba N.J.P. // *Nature*. 2005. V. 434. № 7030. P. 225–229.
 141. Zhu H., Roth B.L. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014. V. 18. № 1. P. pyu007.
 142. Armbruster B.N., Roth B.L. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 7. P. 5129–5132.
 143. Armbruster B.N., Li X., Pausch M.H., Herlitze S., Roth B.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 12. P. 5163–5168.
 144. Alexander G.M., Rogan S.C., Abbas A.I., Armbruster B.N., Pei Y., Allen J.A., Nonneman R.J., Hartmann J., Moy S.S., Nicoletis M.A., et al. // *Neuron*. 2009. V. 63. № 1. P. 27–39.
 145. Guettier J.-M., Gautam D., Scarselli M., Ruiz de Azua I., Li J.H., Rosemond E., Ma X., Gonzalez F.J., Armbruster B.N., Lu H., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 45. P. 19197–19202.
 146. Farrell M.S., Pei Y., Wan Y., Yadav P.N., Daigle T.L., Urban D.J., Lee H.-M., Sciaky N., Simmons A., Nonneman R.J., et al. // *Neuropsychopharmacology*. 2013. V. 38. № 5. P. 854–862.
 147. Whissell P.D., Tohyama S., Martin L.J. // *Front. Genet.* 2016. V. 7. P. 70.
 148. Mahler S.V., Vazey E.M., Beckley J.T., Keistler C.R., McGlinchey E.M., Kaufling J., Wilson S.P., Deisseroth K., Woodward J.J., Aston-Jones G. // *Nat. Neurosci.* 2014. V. 17. № 4. P. 577–585.
 149. Stachniak T.J., Ghosh A., Sternson S.M. // *Neuron*. 2014. V. 82. № 4. P. 797–808.
 150. Nakajima K., Wess J. // *Mol. Pharmacol.* 2012. V. 82. № 4. P. 575–582.
 151. Vardy E., Robinson J.E., Li C., Olsen R.H.J., DiBerto J.F., Giguere P.M., Sassano F.M., Huang X.-P., Zhu H., Urban D.J., et al. // *Neuron*. 2015. V. 86. № 4. P. 936–946.
 152. Roth B.L. // *Neuron*. 2016. V. 89. № 4. P. 683–694.
 153. MacLaren D.A.A., Browne R.W., Shaw J.K., Krishnan Radhakrishnan S., Khare P., España R.A., Clark S.D. // *eNeuro*. V. 3. № 5. P. ENEURO.0219-16.2016.
 154. Gomez J.L., Bonaventura J., Lesniak W., Mathews W.B., Sysa-Shah P., Rodriguez L.A., Ellis R.J., Richie C.T., Harvey B.K., Dannals R.F., et al. // *Science*. 2017. V. 357. № 6350. P. 503–507.
 155. Bonaventura J., Eldridge M.A.G., Hu F., Gomez J.L., Sanchez-Soto M., Abramyan A.M., Lam S., Boehm M.A., Ruiz C., Farrell M.R., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 4627.
 156. Nagai Y., Miyakawa N., Takuwa H., Hori Y., Oyama K., Ji B., Takahashi M., Huang X.-P., Slocum S.T., DiBerto J.F., et al. // *Nat. Neurosci.* 2020. V. 23. № 9. P. 1157–1167.
 157. Szablowski J.O., Lee-Gosselin A., Lue B., Malounda D., Shapiro M.G. // *Nat. Biomed. Eng.* 2018. V. 2. № 7. P. 475–484.
 158. Rao S., Chen R., LaRocca A.A., Christiansen M.G., Senko A.W., Shi C.H., Chiang P.-H., Varnavides G., Xue J., Zhou Y., et al. // *Nat. Nanotechnol.* 2019. V. 14. № 10. P. 967–973.
 159. Jaiswal P.B., Mistretta O.C., Ward P.J., English A.W. // *Brain Sci.* 2018. V. 8. № 5. P. 93.
 160. Wall N.R., Neumann P.A., Beier K.T., Mokhtari A.K., Luo L., Malenka R.C. // *Neuron*. 2019. V. 104. № 5. P. 916–930.e5.
 161. Zhang D., Yan X., She L., Wen Y., Poo M.-M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. № 33. P. 20254–20264.
 162. Peeters L.M., Hinz R., Detrez J.R., Missault S., De Vos W.H., Verhoye M., van der Linden A., Keliris G.A. // *Neuroimage*. 2020. V. 220. P. 117088.
 163. Marissal T., Salazar R.F., Bertollini C., Mutel S., De Roo M., Rodriguez I., Müller D., Carleton A. // *Nat. Neurosci.* 2018. V. 21. № 10. P. 1412–1420.
 164. Mukherjee A., Carvalho F., Eliez S., Caroni P. // *Cell*. 2019. V. 178. № 6. P. 1387–1402.e14.
 165. Krishnan V., Stoppel D.C., Nong Y., Johnson M.A., Nadler M.J.S., Ozkaynak E., Teng B.L., Nagakura I., Mohammad F., Silva M.A., et al. // *Nature*. 2017. V. 543. № 7646. P. 507–512.
 166. Trakoshis S., Martínez-Cañada P., Rocchi F., Canella C., You W., Chakrabarti B., Ruigrok A.N., Bullmore E.T., Suckling J., Markicevic M., et al. // *Elife*. 2020. V. 9. P. e55684.
 167. Bariselli S., Miyazaki N.L., Creed M.C., Kravitz A.V. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3996.
 168. Valyear M.D., Glovaci I., Zaari A., Lahlou S., Trujillo-Pisanty I., Andrew Chapman C., Chaudhri N. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3764.
 169. Cuzon Carlson V.C., Gremel C.M., Lovinger D.M. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 2555.
 170. Adamsky A., Kol A., Kreisel T., Doron A., Ozeri-Engelhard N., Melcer T., Refaeli R., Horn H., Regev L., Groysman M., et al. // *Cell*. 2018. V. 174. № 1. P. 59–71.e14.
 171. Khalaf O., Resch S., Dixsaut L., Gorden V., Glauser L., Gräff J. // *Science*. 2018. V. 360. № 6394. P. 1239–1242.
 172. Zhu B., Eom J., Hunt R.F. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 5156.
 173. Shrestha P., Ayata P., Herrero-Vidal P., Longo F., Gastone

- A., LeDoux J.E., Heintz N., Klann E. // *Nat. Neurosci.* 2020. V. 23. № 2. P. 281–292.
174. Keinath A.T., Nieto-Posadas A., Robinson J.C., Brandon M.P. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3026.
175. Eban-Rothschild A., Rothschild G., Giardino W.J., Jones J.R., de Lecea L. // *Nat. Neurosci.* 2016. V. 19. № 10. P. 1356–1366.
176. Holth J.K., Fritsch S.K., Wang C., Pedersen N.P., Cirrito J.R., Mahan T.E., Finn M.B., Manis M., Geerling J.C., Fuller P.M., et al. // *Science.* 2019. V. 363. № 6429. P. 880–884.
177. Feng H., Wen S.-Y., Qiao Q.-C., Pang Y.-J., Wang S.-Y., Li H.-Y., Cai J., Zhang K.-X., Chen J., Hu Z.-A., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3661.
178. Fleury Curado T., Pho H., Freire C., Amorim M.R., Bonaventura J., Kim L.J., Lee R., Cabassa M.E., Streeter S.R., Branco L.G., et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2020. V. 203. № 1. P. 102–110.
179. Ewbank S.N., Campos C.A., Chen J.Y., Bowen A.J., Padilla S.L., Dempsey J.L., Cui J.Y., Palmiter R.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 34. P. 20874–20880.
180. Tan H.-E., Sisti A.C., Jin H., Vignovich M., Villavicencio M., Tsang K.S., Goffer Y., Zuker C.S. // *Nature.* 2020. V. 580. № 7804. P. 511–516.
181. Muller P.A., Schneeberger M., Matheis F., Wang P., Kerner Z., Ilanges A., Pellegrino K., Del Marmol J., Castro T.B.R., Furuichi M., et al. // *Nature.* 2020. V. 583. № 7816. P. 441–446.
182. Zhang B., Ma S., Rachmin I., He M., Baral P., Choi S., Gonçalves W.A., Shwartz Y., Fast E.M., Su Y., et al. // *Nature.* 2020. V. 577. № 7792. P. 676–681.
183. Barbier M., Chometton S., Pautrat A., Miguët-Alfonsi C., Datiche F., Gascuel J., Fellmann D., Peterschmitt Y., Coizet V., Risold P.-Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 27. P. 15967–15976.
184. Barbano M.F., Wang H.-L., Zhang S., Miranda-Barrientos J., Estrin D.J., Figueroa-González A., Liu B., Barker D.J., Morales M. // *Neuron.* 2020. V. 107. № 2. P. 368–382.e8.
185. Nabel E.M., Garkun Y., Koike H., Sadahiro M., Liang A., Norman K.J., Taccheri G., Demars M.P., Im S., Caro K., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3983.
186. Bendesky A., Kwon Y.-M., Lassance J.-M., Lewarch C.L., Yao S., Peterson B.K., He M.X., Dulac C., Hoekstra H.E. // *Nature.* 2017. V. 544. № 7651. P. 434–439.
187. Tasaka G.-I., Feigin L., Maor I., Groysman M., DeNardo L.A., Schiavo J.K., Froemke R.C., Luo L., Mizrahi A. // *Neuron.* 2020. V. 107. № 3. P. 566–579.e7.
188. Kondoh K., Lu Z., Ye X., Olson D.P., Lowell B.B., Buck L.B. // *Nature.* 2016. V. 532. № 7597. P. 103–106.
189. Tong W.H., Abdulai-Saiku S., Vyas A. // *Neuroendocrinology.* 2020. V. 111. № 6. P. 505–520.
190. Shchepinova M.M., Hanyaloglu A.C., Frost G.S., Tate E.W. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2020. V. 56. P. 98–110.
191. Parker K.E., Pedersen C.E., Gomez A.M., Spangler S.M., Walicki M.C., Feng S.Y., Stewart S.L., Otis J.M., Al-Hasani R., McCall J.G., et al. // *Cell.* 2019. V. 178. № 3. P. 653–671.e19.
192. Han W., Tellez L.A., Rangel M.J., Motta S.C., Zhang X., Perez I.O., Canteras N.S., Shammah-Lagnado S.J., van den Pol A.N., de Araujo I.E. // *Cell.* 2017. V. 168. № 1–2. P. 311–324.e18.
193. Mu Y., Bennett D.V., Rubinov M., Narayan S., Yang C.-T., Tanimoto M., Mensh B.D., Looger L.L., Ahrens M.B. // *Cell.* 2019. V. 178. № 1. P. 27–43.e19.
194. Gizowski C., Bourque C.W. // *Nature.* 2020. V. 583. № 7816. P. 421–424.
195. Hughes A.N., Appel B. // *Nat. Neurosci.* 2020. V. 23. № 9. P. 1055–1066.
196. Chen B., Xu C., Wang Y., Lin W., Wang Y., Chen L., Cheng H., Xu L., Hu T., Zhao J., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 923.
197. Zhong P., Zhang Z., Barger Z., Ma C., Liu D., Ding X., Dan Y. // *Neuron.* 2019. V. 104. № 4. P. 795–809.e6.
198. Bai L., Mesgarzadeh S., Ramesh K.S., Huey E.L., Liu Y., Gray L.A., Aitken T.J., Chen Y., Beutler L.R., Ahn J.S., et al. // *Cell.* 2019. V. 179. № 5. P. 1129–1143.e23.
199. Yin L., Li L., Deng J., Wang D., Guo Y., Zhang X., Li H., Zhao S., Zhong H., Dong H. // *Front. Neural Circuits.* 2019. V. 13. P. 73.
200. Lima S.Q., Miesenböck G. // *Cell.* 2005. V. 121. № 1. P. 141–152.
201. Banghart M., Borges K., Isacoff E., Trauner D., Kramer R.H. // *Nat. Neurosci.* 2004. V. 7. № 12. P. 1381–1386.
202. Volgraf M., Gorostiza P., Numano R., Kramer R.H., Isacoff E.Y., Trauner D. // *Nat. Chem. Biol.* 2006. V. 2. № 1. P. 47–52.
203. Fortin D.L., Banghart M.R., Dunn T.W., Borges K., Wagenaar D.A., Gaudry Q., Karakossian M.H., Otis T.S., Kristan W.B., Trauner D., et al. // *Nat. Methods.* 2008. V. 5. № 4. P. 331–338.
204. Fortin D.L., Dunn T.W., Fedorchak A., Allen D., Montpetit R., Banghart M.R., Trauner D., Adelman J.P., Kramer R.H. // *J. Neurophysiol.* 2011. V. 106. № 1. P. 488–496.
205. Tochitsky I., Banghart M.R., Mourouf A., Yao J.Z., Gaub B., Kramer R.H., Trauner D. // *Nat. Chem.* 2012. V. 4. № 2. P. 105–111.
206. Szobota S., Gorostiza P., Del Bene F., Wyart C., Fortin D.L., Kolstad K.D., Tulyathan O., Volgraf M., Numano R., Aaron H.L., et al. // *Neuron.* 2007. V. 54. № 4. P. 535–545.
207. Wyart C., Del Bene F., Warp E., Scott E.K., Trauner D., Baier H., Isacoff E.Y. // *Nature.* 2009. V. 461. № 7262. P. 407–410.
208. Donthamsetti P.C., Broichhagen J., Vyklicky V., Stanley C., Fu Z., Visel M., Levitz J.L., Javitch J.A., Trauner D., Isacoff E.Y. // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. V. 141. № 29. P. 11522–11530.
209. Qian W., Kumar N., Roginskaya V., Fouquerel E., Opreško P.L., Shiva S., Watkins S.C., Kolodieznyi D., Bruchez M.P., van Houten B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 37. P. 18435–18444.
210. Berglund K., Clissold K., Li H.E., Wen L., Park S.Y., Gleixner J., Klein M.E., Lu D., Barter J.W., Rossi M.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 3. P. E358–E367.
211. Park S.Y., Song S.-H., Palmateer B., Pal A., Petersen E.D., Shall G.P., Welchko R.M., Ibata K., Miyawaki A., Augustine G.J., et al. // *J. Neurosci. Res.* 2020. V. 98. № 3. P. 410–421.
212. Zenchak J.R., Palmateer B., Dorka N., Brown T.M., Wagner L.-M., Medendorp W.E., Petersen E.D., Prakash M., Hochgeschwender U. // *J. Neurosci. Res.* 2020. V. 98. № 3. P. 458–468.
213. Berglund K., Fernandez A.M., Gutekunst C.-A.N., Hochgeschwender U., Gross R.E. // *J. Neurosci. Res.* 2020. V. 98. № 3. P. 422–436.
214. Gomez-Ramirez M., More A.I., Friedman N.G., Hochgeschwender U., Moore C.I. // *J. Neurosci. Res.* 2020. V. 98. № 3. P. 471–480.
215. Method of the Year 2010. // *Nat. Methods.* 2011. V. 8. № 1. P. 1. doi: 10.1038/nmeth.f.321.
216. News Staff. // *Science.* 2010. V. 330. № 6011. P. 1612–1613.
217. Ibsen S., Tong A., Schutt C., Esener S., Chalasani S.H. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 8264.
218. Wheeler M.A., Smith C.J., Ottolini M., Barker B.S., Purohit A.M., Grippo R.M., Gaykema R.P., Spano A.J., Beenhakker M.P., Kucenas S., et al. // *Nat. Neurosci.* 2016. V. 19. № 5. P. 756–761.