

DOI: 10.5862/JPM.225.7

УДК: 577.35

*А.И. Ерофеев, М.В. Матвеев, С.Г. Терехин,
О.А. Захарова, П.В. Плотникова, О.Л. Власова*

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

ОПТОГЕНЕТИКА – НОВЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ НЕЙРОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Статья посвящена вопросам реализации и применения оптогенетических методов для выявления причин различных заболеваний, контроля биохимических процессов клеточной жизнедеятельности и исследований на различных организмах. Рассматривается проблема доставки, встраивания и контроля экспрессии генов опсинов в геном изучаемых клеток. В статье описаны параметры и свойства различных опсинов, а также основные стратегии достижения оптического контроля над клетками с использованием опсинов. Отмечены принципы выбора светового пучка и особенности его транспортировки. Выделяются и описываются характерные особенности различных методов измерения и регистрации показателей эксперимента.

ОПТОГЕНЕТИКА, ОПСИН, СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ, КАНАЛРОДОПСИН, ГАЛОРОДОПСИН, ЛЕНТИВИРУС, ТРАНСГЕННАЯ МЫШЬ, ПОТЕНЦИАЛ ДЕЙСТВИЯ.

Введение

В последнее десятилетие в лаборатории Карла Дайзерота (профессор биоинженерии, психиатрии и поведенческих наук в Стэнфордском университете) был разработан принципиально новый метод исследования – оптогенетика. Он состоит в изучении работы клеток путем внедрения в их мембрану светочувствительных компонентов, которые могут в ответ на освещение световым пучком определенной длины волны изменять свойства клетки-носителя и являться ее флуоресцентными метками.

Важно отметить, что данный метод включает создание генетически кодированных конструкций – оптогенетических инструментов, которые при доставке в специфичные клетки изменяют под действием света их физиологию. Созданные инструменты позволяют контролировать с помощью света электрическую активность определенного вида нейронов, клеточный

сигналинг и другие процессы. Для применения метода необходимо также создание систем доставки света вовнутрь тканей и регистрации результатов экспериментов. Хотя отдельные элементы этих методик уже существовали в 1970-е годы, их объединение и использование для создания оптогенетических методов началось только в 2005 году [1]. Изначально технология разрабатывалась для проведения исследований в области нейронаук. Но оказалось, что возможности оптогенетики гораздо шире. Метод позволяет контролировать определенные события (с временным разрешением порядка миллисекунд, что соответствует временам процессов жизнедеятельности) в определенных типах клеток [2 – 5].

Такой анализ особенно важен, поскольку клеточные события необходимо рассматривать только в контексте других событий, происходящих в отдельных тканях и организме в целом.

Краткая история вопроса

В 1979 году первооткрыватель структуры ДНК Фрэнсис Крик выдвинул предположение, что одной из главных задач в области нейронаук является избирательный контроль одного типа клеток в мозге при условии, что остальные клетки будут оставаться нетронутыми [6]. Поскольку электродами невозможно возбудить определенную область мозга с необходимой точностью, а различные лекарства действуют слишком медленно, Ф. Крик решил, что видимый свет обладает всеми свойствами, чтобы использовать его в качестве инструмента контроля. Но в то время не было никаких методов, чтобы сделать определенные клетки чувствительными к свету.

Еще раньше, в 1971 году, У. Стокениус и Д. Остерхельт показали, что бактериородопсин является ионным «насосом», который можно быстро активировать фотонами видимого света [7]. Позднее были найдены и другие представители этого семейства – галородопсин (1977) и каналородопсин (2002) [8].

Тем не менее, долгое время считалось, что подобное объединение оптических и генетических методов не даст желаемого эффекта. Во-первых, ввиду того, что чужеродные мембранные белки, встроенные в клетку, могут быть токсичными; во-вторых, как многие полагали, индуцированные светом токи будут слишком малы. К тому же, бактериальным опсинам для поглощения фотонов необходим еще и химический кофактор – полностью-*транс*-ретиналь.

Летом 2005 года была опубликована работа, в которой была продемонстрирована возможность использования бактериального опсина без добавления каких-либо других частей, компонентов или реагентов [1]. При этом нейроны становились чувствительными к свету. В следующие несколько лет другими исследователями было показано, что бактериородопсин и галородопсин, как и каналородопсин, также способны включать или выключать нейроны быстро и безопасно для клеток в ответ на облучение светом различных длин волн. Ткани позвоночных животных уже содер-

жат полностью-*транс*-ретиналь, и поэтому оптогенетический контроль возможен в интактных тканях мозга и даже в свободно передвигающихся особях.

Современные достижения

За прошедшие семь лет с помощью новой технологии был проведен ряд интереснейших экспериментов. Разрабатываются новые опсины с целью применения оптогенетики в многообразных исследованиях на различных организмах. В 2008 году, например, из водоросли *Volvox carter* был выделен каналородопсин VChR₁, который чувствителен к желтому, а не синему цвету [9]. Таким образом, используя параллельно несколько типов каналородопсинов, экспериментатор может одновременно контролировать смешанные популяции клеток: одни команды будут отдаваться желтым светом первому типу клеток, другие синим светом – второму. Также генетически были созданы так называемые «быстрые» и «медленные» опсины, которые позволяют осуществлять временной контроль над потенциалом действия. Первые из них способны создавать потенциал действия до 200 раз в секунду [10]. Уже существуют опсины, чувствительные к свету, частота которого находится на границе видимого и инфракрасного диапазонов. Волны с данной частотой проникают глубже вовнутрь ткани и легче фокусируются.

Одной из самых интересных возможностей применения оптогенетических методов является контроль не только за электрическими явлениями в нейроне, но и за определенными биохимическими событиями. Как известно, большое количество медицинских препаратов функционирует через взаимодействие с семейством мембранных рецепторов (GPCR). Эти рецепторы действуют по принципу передачи сигнала извне от какого-либо соединения (лекарства) внутрь клетки, изменяя тем самым внутриклеточный сигналинг, например уровень ионов кальция. Если добавить светочувствительный домен от родопсина к GPCR, то можно получить рецепторы, чувствительные к зеленому свету. Такие

рецепторы получили название optoXR [11]. При доставке с помощью вируса однокомпонентного гена optoXR в мозг лабораторных животных удалось осуществить клеточно-специфичный контроль светом над определенными биохимическими путями передачи сигнала [11].

Разработка новых оптоволоконных приборов позволила осуществить доставку светового пучка в любую область мозга свободно двигающихся животных. Кроме того, была создана методика, позволяющая одновременно исследовать оптическое возбуждение и регистрацию электрических импульсов. В настоящее время возможно, например, прямо измерять электрическую активность в нейронных ансамблях, ответственных за моторную деятельность, одновременно контролируя их с помощью опсинов.

Первые оптогенетические исследования, выполненные на свободно двигающихся животных, были направлены на исследование нейронов, синтезирующих нейротрансмиттер гипокретин [12]. Эти клетки считаются ответственными за одно из нарушений сна – нарколепсию. Именно в этих клетках были обнаружены специфические типы электрической активности, которые в совокупности приводят к пробуждению. С помощью оптогенетики также было показано, как допамин-синтезирующие нейроны отвечают за чувство радости [13].

Одними из самых известных экспериментов с применением оптогенетики являются опыты по исследованию новейших методов лечения болезни Паркинсона [14, 15]. Данная патология характеризуется нарушением передачи информации в нейронах *Substantia nigra pars compacta*, ответственных за моторную деятельность. Для лечения болезни Паркинсона с начала 1990-х годов применяется глубокая стимуляция мозга. При этой методике переменный электронный импульс подается в определенные отделы мозга с помощью имплантируемых инструментов. Тем не менее, потенциально эффективная стратегия лечения сильно ограничена, так как электроды стимулируют отдельные клетки мозга не избирательно. Фундаментальное понимание данного

метода лечения было получено с применением оптогенетики. При переключении различных типов нейронов у лабораторных мышей моделей болезни Паркинсона были обнаружены неожиданные результаты. Наибольший терапевтический эффект достигается не стимуляцией определенного вида клеток, а воздействием на активность соединительных аксонов.

Генетические методы доставки генов опсинов в специфичные популяции нейронов

Гены опсинов могут селективно экспрессироваться в определенном, заранее выбранном типе нейронов в мозге. Рассмотрим основные стратегии, эффективность которых была доказана для достижения экспрессии *in vivo*. Один из наиболее распространенных способов доставки генетического материала – использование лентивирусов. Оптимальное время для экспрессии генов составляет две недели после введения. Основным преимуществом этого метода является высокий уровень экспрессии генов и длительность поддержания необходимой экспрессии на протяжении нескольких лет. К недостаткам использования лентивирусов следует отнести недостаточную специфичность, низкую точность стереотоксического введения, а также низкий уровень экспрессии некоторых клеточно-специфичных промоторов. В настоящее время доставка генетического материала с помощью лентивирусов используется почти во всех опытах такого рода над экспериментальными животными-млекопитающими. Другой, также распространенный, способ – доставка указанного материала аденоассоциированными вирусами (AAV). Оптимальное время для экспрессии генов составляет 3 недели после введения. Третий, наименее распространенный способ – это Cre-зависимые системы экспрессии AAV. Время экспрессии составляет 3 недели. Преимущества и недостатки второго и третьего методов аналогичны таковым для метода использования лентивирусов.

Вирусные системы. В отличие от большинства генетических методов, вирусные векторы, основанные на лентивирусах и аденоассоциированных вирусах (AAV),

не требуют использования трансгенных животных-моделей. Подобные методы позволяют достичь высокого уровня экспрессии генов опсинов и в грызунах, и в приматах на период до нескольких месяцев. Векторы, основанные на лентивирусах и аденоассоциированных вирусах, используемые в экспериментах, обладают следующими параметрами:

трансдуцирующих единиц для лентивирусов – более 10^9 ;

геномных копий для AAV – более 10^{12} .

В общем случае экспрессия генов опсинов в мозге грызунов достигает необходимого уровня спустя три недели после введения AAV и две недели – после введения лентивируса. Для достижения стационарного уровня экспрессии в дистальных частях аксонов может понадобиться уже более шести недель.

Электропорация. Для достижения экспрессии в некоторые типы клеток можно использовать метод электропорации *in utero* в определенные дни развития эмбриона. С помощью этого метода можно обеспечить таргетную доставку гена в корковые слои II и III, в нейроны стриатума и гиппокампа [16 – 19]. В отличие от вирусных методов, с помощью электропорации можно доставлять ДНК любого размера с большими промотерными сегментами для достижения большей клеточной специфичности. Электропорация также позволяет внедрить большее количество копий гена.

Трансгенные мыши. Необходимую экспрессию генов опсинов можно достичь, если использовать трансгенные кассеты, несущие рекомбинантные промотеры, и трансгенные конструкции, основанные на бактериальных искусственных хромосомах. Было получено несколько линий трансгенных мышей без изменений их репродуктивных свойств и без заметных изменений в поведении, экспрессирующих ChR₂ под Thy-1 промотером [20, 21].

Cre-зависимые системы экспрессии. Хотя клеточно-специфичные промотеры эффективны для достижения необходимого уровня экспрессии в определенных типах нейронов, некоторые промотеры обладают слабой транскрипционной активностью.

С их помощью невозможно достичь экспрессии, при которой опсины смогут эффективно создавать потенциал действия. Для увеличения транскрипционной активности были созданы специальные Cre-зависимые AAV-векторы. Такие векторы содержат трансгенные кассеты, которые активируются только в присутствии Cre в трансгенных линиях животных. Таким образом, для увеличения экспрессии в определенном типе клеток необходимо выбрать нужную линию мышей.

Основные стратегии оптического контроля с помощью опсинов

Рассмотрим основные экспериментальные способы, с помощью которых может достигаться оптический контроль с использованием опсинов.

Быстрое возбуждение – каналородопсины (ChR). В некоторых случаях ген микробного родопсина, встроенный в нейроны, может привести к светоиндуцированному фототоку. В настоящее время в основном используются модифицированные виды опсинов. В частности, некоторые кодоны водорослей были заменены кодонами млекопитающих, что значительно повысило экспрессию данных генов. Безусловно, изменение кодонов может привести к непредвиденным эффектам, когда наряду с повышенной экспрессией в нейронах млекопитающих также наблюдается снижение других функций или экспрессии в других типах клеток. Например, внедрение мутации H134R в ChR₂ привело к увеличению фототока в два раза при длительной стимуляции, однако временная точность резко снизилась на фоне уменьшения скорости закрытия каналов [22].

Существенное смещение в красную область спектра оптического поглощения (вместо белка) VChR₁ [23], который возбуждают желтым светом (длина волны возбуждения – 590 нм) и который не оказывает воздействия на ChR₂ (длина волны возбуждения – 470 нм), дает возможность установить комбинированный контроль возбуждения в естественных условиях. Большинство ChR, изученных на сегодняшний день, характеризуются относитель-



но низкой одноканальной проводимостью и широкой катионной избирательностью. Комбинированные методики, в том числе с использованием $VChR_1$, дают возможность получить различные характеристики клеточных фототоков.

При изучении, например *L132Cmutant* [24], было установлено, что его активация приводит к незначительным фототокам ионов кальция при его физиологических концентрациях, а увеличение концентрации этих ионов в цитозоле обусловлено, в основном, активацией эндогенных потенциал-зависимых кальциевых каналов из-за деполяризации мембраны нейронов [25]. Уровни проводимости второго и даже третьего порядков всегда следует учитывать, особенно когда наблюдается высокая проводимость ионов кальция.

Различные типы клеток или даже разные отделы одной и той же клетки могут вызывать, переносить или отвечать на повышенные концентрации ионов кальция по-разному. Последние работы по моделированию, в которых ответы клетки на фотостимуляцию были интегрированы с моделью нейрона Ходжкина – Хаксли [26], можно расширить и дополнить проводимостями второго порядка, а это означает, что появляется возможность точнее прогнозировать клеточные ответы в рамках различных способов фотостимуляции.

Быстрое ингибирование – галородопсины (NpHR). Для изучения активности нейронов и нейронных ансамблей ингибирование также играет важную роль в оптогенетических исследованиях. Для достижения этих целей используется галородопсин *Halobacterial HR* (индуцирует электрогенный ток ионов хлора), однако для него характерно десенсибилизирующее действие. Тем не менее, гомологичный ген от *Natronomonas pharaonis* [32–34] способен вызвать стабильный фототок [35] с максимумом на длине волны 590 нм (воздействие с такой длиной волны не вызывает какого-либо ответа от ChR_2 , что позволяет осуществить активации ChR_2 и NpHR независимо для двунаправленной модуляции активности). В отличие от возбуждающих ChR , NpHR требует постоянного светового облучения. Хотя торможе-

ние с использованием NpHR было успешно доказано в модели свободно движущихся червей и тонких срезов мозга млекопитающих [35], а также в культуре нейронов [36], потребовалось несколько лет, прежде чем удалось достигнуть подобных результатов у интактных млекопитающих, из-за проблем мембранного транспорта, которые требуют использования дополнительных методик.

Различными инженерными методами был создан опсин eNpHR2.0, для которого характерны более высокие значения токов [37, 21]. Это позволило его применить для интактной ткани грызунов [38], а также тканей приматов и человека [39]. В конечном итоге был получен eNpHR3.0 с еще большими значениями фототоков при умеренной интенсивности света в желтом диапазоне длин волн или смещенным в красную зону оптического спектра (до 680 нм) [26].

Следует отметить, что для опытов по ингибированию функции нейронов целесообразно использовать двунаправленный контроль, а также учитывать влияние стабильности фототоков ингибирующих опсинов. Наконец, необходимо проявлять осторожность с дозами светового облучения, в частности, чтобы избежать перегрева тканей при непрерывном воздействии. В связи с этим важно контролировать интенсивность света, необходимую для торможения [40].

Ступенчато-функциональные опсины (SFO). Проводимость дикого типа ChR_2 деактивируется после прекращения фотостимуляции (она длится около 10 мс), тогда как мутантный ChR_2 (C128X) (мутации в цистеин-128 и аспартат-156) деактивируется гораздо медленнее [27, 28]. Например, мутантные белки с заменами C128T, C128A и C128S характеризуются постоянными времени 2, 42 и 100 с, соответственно [27]. Прекратить этот стабильный, вызванный голубым светом фототок можно путем применения импульсов желтого света (560 – 590 нм). Мутантные гены этого класса называют ступенчато-функциональными опсинами (SFO), так как они делают возможным ступенчатый контроль мембранного потенциала. Подобный контроль

вероятнее приведет к порогу потенциала действия и увеличит вероятность эндогенных синаптических выходов [27].

Ключевые различия между SFO и ChR.

Отметим два таких различия. Во-первых, это увеличение клеточной светочувствительности SFO, по сравнению с ChR; оно является результатом накопления открытых каналов во время светового импульса. [27, 29]. Во-вторых, отличие SFO от ChR обусловлено асинхронной природой SFO-опосредованной активности нейронов, которая не вовлекает все экспрессирующие нейроны в единый паттерн, вызванный фотостимуляцией.

Сейчас существуют SFO с постоянной времени деактивации до 30 мин [30]; это дает возможность приблизить экспрессирующие нейроны к стабильному потенциалу покоя с последующим удалением источника света, т. е. позволяет проводить последующий поведенческий или физиологический эксперимент при полном отсутствии света или другого оборудования. Более того, использование длительных низкоинтенсивных импульсов света обеспечивает устранение неравномерности ответа экспрессирующих клеток. В этом случае даже большие объемы ткани могут быть доведены до уровня насыщения с течением времени.

Но, несмотря на широкие экспериментальные возможности SFO, его использование всегда должно сопровождаться дополнительными электрофизиологическими исследованиями. Это необходимо для правильной интерпретации полученных данных.

Но даже при множестве полезных свойств, ни один из перечисленных выше ChR не способен вызывать серии пиков с частотой выше 40 Гц, в то время как многие типы нейронов и их физиологические процессы требуют высокочастотных серий пиков (более 40 Гц). Даже дикий тип ChR₂ (10 мс), а также H134R (20 мс) не способны к точному управлению на высоких частотах. Замена в ChR₂ остатков глутамата-123 треонином или аланином привела к ускорению кинетики закрытия канала с 10 до 4 мс за счет умеренного снижения величины фототока, и это значительно повы-

сило точность оптогенетического контроля [10]. Мутации E123 являются уникальными среди ChR, так как устраняют чувствительность кинетики канала к мембранным потенциалам, действуя они отдельно или в комбинации с другими мутациями H134R и T159C [10, 31]. После устранения этих нелинейных и нестационарных эффектов ответ каналов становится более предсказуемым и легко моделируемым. Опсины этого класса (отдельно мутации E123 или в комбинации с другими изменениями [10]) называются ChETAs (ChRE123T/A). ChETAs можно использовать не только для нейронов, требующих высокочастотные серии пиков, так как их использование приводит к снижению количества появляющихся дополнительных пиков, наряду со снижением ложно-продолженной деполяризации. Было показано, что ChETAs обеспечивают повышенную производительность в пределах интактных тканей мозга млекопитающих [10]; в то же время быстрая деактивация, как правило, приводит к снижению эффективной клеточной чувствительности к длительным импульсам света, так как меньше каналов остаются открытыми.

Фармакологическая, оптогенетическая и электро-стимуляции. Они будут отличаться от естественной синаптической передачи ввиду изменения проводимости потоков ионов и мембранного потенциала. Любой из этих типов стимуляции может повлиять на внутриклеточные мембраны, эндоплазматический ретикулум, ядерный аппарат, синаптические везикулы и митохондрии. Эти факторы необходимо учитывать, особенно при изучении одиночных нейронов. И несмотря на новизну, точность и специфичность оптогенетических методов, необходимо сопоставлять их результаты с результатами электростимуляции в подобных условиях. Хотя оптогенетика дает возможность понять, как именно функционируют нейроны и нейронные ансамбли, экспериментальные результаты обычно сильнее всего зависят от типа нейронов и параметров стимуляции (частота, длительность, амплитуда и т. п.). Огромное значение имеет также выбор опсина (например, H134R или L132C).

Существуют большие возможности для создания новых оптогенетических инструментов, если принять во внимание огромное разнообразие микробных генов опсинов, встречающихся в природе.

Инструменты для модуляции биохимического сигналинга

Микробные гены опсинов (тип I), описанные выше, кодируют ионные каналы, которые контролируют возбудимость нейронов, изменяя их мембранный потенциал выше или ниже порога генерации потенциала действия. Такой подход имеет преимущества в отношении скорости и точности воздействия, однако в некоторых экспериментах необходима временная и точная модуляция внутриклеточных процессов.

Существует еще один тип опсинов (тип II), например светочувствительные белки глаз млекопитающих; эти белки способны не только индуцировать фототок под действием света, но и выступать в качестве семейства рецепторов GPCR, а значит участвовать во внутриклеточной сигнализации. Таким образом можно осуществлять медленный тормозящий [41] или возбуждающий [42] контроль. В настоящее время разрабатывается большое количество химер [43] между родопсинами позвоночных и семействами GPCRs, которые могут служить однокомпонентными инструментами контроля (в их числе дофаминергический, серотонинергический и адренергический рецепторы, играющие важную роль в нейротрансмиссии и нейромодуляции). Такие оптогенетические инструменты получили название *optoXRs*, они позволяют осуществлять контроль над внутриклеточной сигнализацией для изучения поведения свободно движущихся мышей [11].

Скорость и точность, которые достигаются с помощью методов биохимической оптогенетики, раскрывают возможности, недостижимые для фармакологических и генетических методов. Активное развитие этой области оптогенетики дает возможность расширить применение этих технологий практически на все типы клеток.

Выбор параметров светового пучка и доставка света

После того как опсины начали экспрессироваться в нейронах, представляющих интерес для исследователей, встала задача доставки светового пучка. Требования к его параметрам различны и зависят от условий эксперимента. Например, для изучения быстрых осцилляций в тонких срезах мозга при использовании нескольких опсинов *in vitro*, необходимы параметры пучка, которые отличаются от таковых для исследования эффектов длительной стимуляции *in vivo* определенных отделов мозга животных [44]. Параметры фототоков, индуцированных в нейронах световыми импульсами, зависят от многих факторов. К таковым относятся тип экспрессируемого опсина, длина волны облучения, его интенсивность и время, и даже события, происшедшие до момента облучения. Если не все молекулы каналородопсина вернулись в исходное состояние после предыдущего воздействия, начальный ответ на импульс света окажется меньше.

Параметры активации различных опсинов. Для семейства опсинов ChR_2 , $ChR_2(H134R)$, $ChR1/2$ химеры, $ChETA$ (выделены из *Chlamydomonas reinhardtii*) длина волны возбуждения составляет 470 нм. При этом их основная функция — это деполяризация клеточной мембраны. Модуляторными возможностями этого семейства опсинов является быстрое включение/выключение, поэтому лучше всего эти опсины подходят для точной активации нейронов. Замена $H134R$ дает больше фототоков по отношению к диким типам ChR_2 . В частности, ChR_1/ChR_2 химеры и $ChETA$ дают пики до 200 Гц.

Следующая группа опсинов — ступенчато-функциональные опсины (SFO): $ChR_2(C128A)$, $ChR_2(C128S)$, $ChR_2(C128T)$ (выделены из *Chlamydomonas reinhardtii*). Длина волны возбуждения составляет 470 нм, для ингибирования используют световой пучок с длиной волны 546 нм. При этом их основная функция — также деполяризация клеточной мембраны. ChR_2 (с точечными мутациями) характеризуются

медленной или оптически переключаемой деактивацией. Замены C128A и C128S дают наиболее длительную активацию и высокую светочувствительность, а C128T сохраняет высокую временную точность активации. SFOs можно включать и выключать синими и зелеными световыми импульсами.

VChR₁ (выделен из *Volvox carteri*) имеет длину волны возбуждения – 535 нм, его основная функция – также деполяризация клеточной мембраны. Смещение спектра действия в красную область (по отношению к ChR₂) позволяет проводить комбинированный контроль.

NpHR, eNpHR (выделены из *Natronomonas pharaonis*) имеют длину волны возбуждения 589 нм, но их основная функция – гиперполяризация клеточной мембраны. Эта группа опсинов представляет собой активируемый светом «насос» для ионов хлора. Используется для гиперполяризации нейронов с высокой временной точностью и устойчивым торможением в течение нескольких минут.

Opto-α1AR, opto-β2AR (получены синтетическим способом) имеют длину волны возбуждения – 500 нм; при этом их основная функция – биохимическое воздействие на клеточную мембрану. Эта группа опсинов представляет собой активируемый светом GPCR (через G-белок).

При разработке системы доставки света для активации опсинов, прежде всего необходимо учитывать такой параметр, как коэффициент поглощения фотонов определенной длины волны. Он пропорционален потоку света, который в свою очередь представляет собой количество фотонов на единицу площади в единицу времени. Однако в эксперименте удобнее пользоваться другой величиной. Это плотность потока света, которая измеряется в мВт/мм² и определяется как произведение потока света на энергию одного фотона. Для каналородопсина ChR₂ дикого типа при стандартном уровне экспрессии и облучении светом с длиной волны 473 нм, плотность потока света, необходимая для инициирования аксонного потенциала, составляет 1–5 мВт/мм².

Как отмечалось ранее, требования к

длительности светового облучения зависят от условий различных оптогенетических экспериментов. В случае оптогенетического ингибирования интервал времени определяется длительностью этого ингибирования (плотность потока света 1–5 мВт/мм²), тогда как при бистабильном оптогенетическом контроле требуется короткий промежуток времени, а пучок света должен иметь гораздо меньшую плотность потока (менее 0,01 мВт/мм²).

Для экспериментов *in vitro*, когда образец ткани наблюдают под микроскопом, наиболее подходящие источники света – галогеновые/ксеноновые лампы, светодиоды, лазеры – могут быть размещены прямо вдоль направления луча микроскопа. Для некоторых экспериментов требуется импульсное облучение. Для создания кратковременных импульсов света можно использовать быстрые затворы (например, Lambda DG-4 или Uniblitzshutter) или непосредственно импульсные лазеры. Для исследований *in vivo* в свободно двигающихся животных больше всего подходят источники с высокими значениями мощности (10–15 мВт на краю волокна сечением 100 мкм). Для стимуляции коркового слоя мозга можно также использовать светодиоды. При контроле более глубоких областей мозга необходимо использовать тонкое оптоволокно. Оптоволокно применяют для изготовления так называемых оптоотродов – инструментов для одновременной регистрации электрофизиологических параметров и оптического возбуждения опсинов. Толщина волокна выбирается также в зависимости от природы изучаемого объекта. Так, для мышей, без ограничения их движения, необходимая величина составляет не более 300 мкм, а для крыс – 400 мкм. При постановке экспериментов необходимо также учитывать, что ткани мозга млекопитающих сильно поглощают свет; например, на 500 мкм от края волокна интенсивность светового пучка составляет примерно 10 % от исходной.

В настоящее время в лаборатории молекулярной нейродегенерации разрабатывается аппаратно-программный комплекс (АПК) для оптогенетических исследований.



Предлагаемый АПК представляет собой источник светового воздействия, состоящий из нескольких ярких светодиодов, со специальным программным обеспечением, в котором заложены необходимые параметры диодов для опсинов, подобранные экспериментальным путем.

Способы регистрации экспериментальных данных

Для оптогенетического контроля применяются различные методы измерения параметров эксперимента. Во-первых, это методы получения и анализа изображения с использованием различных красителей. В качестве последних используются Ca^{2+} -специфичные красители (например, Fura-2, Fluo-5F), а также красители, чувствительные к изменению напряжения (VSD – Voltage-Sensitive Dye), например RH-155. Подобный метод эффективен для измерения электрической активности в больших популяциях клеток *ex vivo* и *in vivo* с высоким временным разрешением. В случае применения Ca^{2+} -специфичных красителей для получения изображения можно использовать двухфотонный микроскоп, так как при двухфотонном возбуждении практически отсутствуют шумы от фотоактивации каналородопсинов. Красители, чувствительные к изменению напряжения, представляют собой липофильные молекулы, оптическое поглощение которых зависит от потенциала на мембране. Наряду с высокоскоростными камерами для регистрации изменений оптического сигнала, работают с изображением, полученным с помощью VSD и позволяющим определять изменения электрической активности в нейронах с высоким пространственно-временным разрешением (порядка мс и мкм). Максимум поглощения для красителя RH-155 составляет 700 нм, а пики возбуждения опсинов находятся в пределах 470 – 590 нм. Такая разница в длинах волн позволяет одновременно проводить опти-

ческую стимуляцию опсинов и детектировать изображение.

Другой класс методов измерения параметров оптогенетических экспериментов включает одновременный контроль поведения животных и электрофизиологическую регистрацию. Для этого были созданы специальные приборы на основе оптоволокон для доставки светового пучка в область экспрессии гена опсина и электрофизиологических измерений.

Заключение

В данной статье мы изложили суть оптогенетической методики, ее основные составляющие и области применения. В настоящее время эта методика интенсивно развивается, совершенствуется и находит применение в новых сферах научного познания. Наибольший интерес для авторов статьи представляет применение оптогенетического подхода к изучению нарушений синаптической передачи при развитии различных нейродегенеративных заболеваний. Так, в 2013 году на мышинных моделях болезни Хантингтона при помощи оптогенетической методики уже были продемонстрированы нарушения в синаптической передаче в кортико-стриатной культуре нейронов [45]. Исследование проблем такого рода является предметом нынешних и дальнейших научных изысканий авторов статьи.

Благодарности

Авторы выражают благодарность заведующему лабораторией молекулярной нейродегенерации (ЛМН), доктору биологических наук, именному профессору им. Карла и Гортензии Томсен в области исследования болезни Альцгеймера, профессору И.Б. Безпрозванному, а также всему коллективу ЛМН СПбПУ за консультации и помощь в проведении исследований.

Работа в части постановки и отработки оптогенетических методик поддержана грантом Российского научного фонда № 14-25-0024.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity// Nat. Neurosci. 2005.

Vol. 8. No. 9. Pp. 1263–1268.

[2] Deisseroth K., Feng G., Majewska A.K., et al. Next-generation optical technologies for

illuminating genetically targeted brain circuits// *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26. No. 41. Pp. 10380–10386.

[3] **Scanziani M., Häusser M.** Electrophysiology in the age of light// *Nature.* 2009. Vol. 461. No. 7266. Pp. 930–939.

[4] **Deisseroth K.** Controlling the brain with light// *Sci. Am.* 2010. Vol. 303. No. 5. Pp. 48–55.

[5] **Deisseroth K.** Optogenetics // *Nat. Methods.* 2011. Vol. 8. No. 1. Pp. 26–29.

[6] **Crick F.H.** Thinking about the brain// *Sci. Am.* 1979. Vol. 241. No. 3. Pp. 219–232.

[7] **Oesterhelt D., Stoerkenius W.** Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*// *Nat. New Biol.* 1971. Vol. 233. No. 39. Pp. 149–152.

[8] **Nagel G., Ollig D., Fuhrmann M., et al.** Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae// *Science.* 2002. Vol. 296. No. 5577. Pp. 2395–2398.

[9] **Zhang F., Prigge M., Beyriere F., et al.** Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*// *Nat. Neurosci.* 2008. Vol. 11. No. 6. Pp. 631–633.

[10] **Gunaydin L.A., Yizhar O., Berndt A., et al.** Ultrafast optogenetic control // *Nat. Neurosci.* 2010. Vol. 13. No. 3. Pp. 387–392.

[11] **Airan R.D., Thompson K.R., Fenno L.E., et al.** Temporally precise in vivo control of intracellular signaling// *Nature.* 2009. Vol. 458. No. 7241. Pp. 1025–1029.

[12] **Adamantidis A.R., Zhang F., Aravanis A.M., et al.** Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons// *Nature.* 2007. Vol. 450. No. 7168. Pp. 420–424.

[13] **Tsai H.C., Zhang F., Adamantidis A., et al.** Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning // *Science.* 2009. Vol. 324. No. 5930. Pp. 1080–1084.

[14] **Gradinaru V., Mogri M., Thompson K.R., et al.** Optical deconstruction of Parkinsonian neural circuitry // *Science.* 2009. Vol. 324. No. 5925. Pp. 354–359.

[15] **Kravitz A.V., Freeze B.S., Parker P.R., et al.** Regulation of Parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry// *Nature.* 2010. Vol. 466. No. 7306. Pp. 622–626.

[16] **Adesnik H., Scanziani M.** Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits// *Nature.* 2010. Vol. 464. No. 7292. Pp. 1155–1160.

[17] **Gradinaru V., Thompson K.R., Zhang F., et al.** Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo// *J. Neurosci.* 2007. Vol. 27. No. 52. Pp. 14231–1438.

[18] **Lewis T.L., Mao T., Svoboda K., Arnold D.B.** Myosin-dependent targeting of transmembrane

proteins to neuronal dendrites// *Nat. Neurosci.* 2009. Vol. 12. No. 5. Pp. 568–576.

[19] **Petreaanu L., Huber D., Sobczyk A., Svoboda K.** Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections// *Nat. Neurosci.* 2007. Vol. 10. No. 5. Pp. 663–668.

[20] **Arenkiel B.R., Peca J., Davison I.G., et al.** In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2// *Neuron.* 2007. Vol. 54. No. 2. Pp. 205–218.

[21] **Zhao S., Cunha C., Zhang F., et al.** Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity// *Brain Cell Biol.* 2008. Vol. 36. No. 1–4. Pp. 141–154.

[22] **Nagel G., Brauner M., Liewald J.F., et al.** Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses// *Curr. Biol.* 2005. Vol. 15. No. 24. Pp. 2279–2284.

[23] **Zhang F., Prigge M., Beyriere F., Tsunoda S.P., Mattis J.** Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri* // *Nat. Neurosci.* 2008. Vol. 11. No. 6. Pp. 631–633.

[24] **Kleinlogel S., Feldbauer K., Dempski R.E., et al.** Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh// *Nat. Neurosci.* 2011. Vol. 14. No. 4. Pp. 513–518.

[25] **Zhang Y.P., Oertner T.G.** Optical induction of synaptic plasticity using a light-sensitive channel// *Nat. Methods.* 2007. Vol. 4. No. 2. Pp. 139–141.

[26] **Gradinaru V., Zhang F., Ramakrishnan C., et al.** Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics// *Cell.* 2010. Vol. 141. No. 1. Pp. 154–165.

[27] **Berndt A., Yizhar O., Gunaydin L.A., et al.** Bi-stable neural state switches// *Nat. Neurosci.* 2009. Vol. 12. No. 2. Pp. 229–234.

[28] **Bamann C., Gueta R., Kleinlogel S., et al.** Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond// *Biochemistry.* 2010. Vol. 49. No. 2. Pp. 267–278.

[29] **Diester I., Kaufman M.T., Mogri M., et al.** An optogenetic toolbox designed for primates// *Nat. Neurosci.* 2011. Vol. 14. No. 3. Pp. 387–397.

[30] **Yizhar O., Fenno L., Prigge M., et al.** Neocortical excitation/inhibition balance in social dysfunction and information processing// *Nature.* 2011. Vol. 477. No. 7363. Pp. 171–178.

[31] **Berndt A., Schoenenberger P., Mattis J., et al.** High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels// *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011. Vol. 108. No. 18. Pp. 7595–7600.

[32] **Lanyi J.K., Oesterhelt D.** Identification of the retinal-binding protein in halorhodopsin// *J.*



- Biol. Chem. 1982. Vol. 257. No. 5. Pp. 2674–2677.
- [33] **Scharf B., Engelhard M.** Blue halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*: wavelength regulation by anions// *Biochemistry*. 1994. Vol. 33. No. 21. Pp. 6387–6393.
- [34] **Sato M., Kubo M., Aizawa T., et al.** Role of putative anion-binding sites in cytoplasmic and extracellular channels of *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin// *Biochemistry*. 2005. Vol. 44. No. 12. Pp. 4775–4784.
- [35] **Zhang F., Wang L.P., Brauner M., et al.** Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry// *Nature*. 2007. Vol. 446. No. 7136. Pp. 633–639.
- [36] **Han X., Boyden E.S.** Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution// *Plos One*. 2007. Vol. 2. No. 3. Pp. e299.
- [37] **Gradinaru V., Thompson K.R., Deisseroth K.** eNpHR: a *Natronomonas halorhodopsin* enhanced for optogenetic applications// *Brain Cell Biol.* 2008. Vol. 36. No. 1–4. Pp. 129–139.
- [38] **Sohal V.S., Zhang F., Yizhar O., Deisseroth K.** Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance// *Nature*. 2009. Vol. 459. No. 7247. Pp. 698–702.
- [39] **Busskamp V., Duebel J., Balya D., et al.** Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa// *Science*. 2010. Vol. 329. No. 5990. Pp. 413–417.
- [40] **Aravanis A.M., Wang L.P., Zhang F., et al.** An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology// *J. Neural Eng.* 2007. Vol. 4. No. 3. Pp. 143–156.
- [41] **Li X., Gutierrez D.V., Hanson M.G., et al.** Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin// *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. Vol. 102. No. 49. Pp. 17816–17821.
- [42] **Melyan Z., Tarttelin E.E., Bellingham J., et al.** Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive// *Nature*. 2005. Vol. 433. No. 7027. Pp. 741–745.
- [43] **Kim J.M., Hwa J., Garriga P., et al.** Light-driven activation of beta 2-adrenergic receptor signaling by a chimeric rhodopsin containing the beta 2-adrenergic receptor cytoplasmic loops// *Biochemistry*. 2005. Vol. 44. No. 7. Pp. 2284–2292.
- [44] **Bruegmann T., Malan D., Hesse M., et al.** Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo// *Nat. Methods*. 2010. Vol. 7. No. 11. Pp. 897–900.
- [45] **Артамонов Д.Н., Коржова В.В., Ву Д., и др.** Нарушения синаптической передачи при болезни Хантингтона на кортико-стриатной модели культуры нейронов// *Биологические мембраны*. 2013. Т. 30. № 4. С. 1–13.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ЕРОФЕЕВ Александр Игоревич – аспирант кафедры медицинской физики, лаборант лаборатории молекулярной нейродегенерации Научно-образовательного центра «Фундаментальные основы медицинских и биомедицинских технологий» (НОЦ ФОМБТ) Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
alexandr.erofeew@gmail.com

МАТВЕЕВ Максим Валерьевич – аспирант кафедры медицинской физики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
m.v.matveev@bk.ru

ТЕРЕХИН Станислав Георгиевич – магистрант кафедры медицинской физики, лаборант лаборатории молекулярной нейродегенерации НОЦ ФОМБТ Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
Stasok32@yandex.ru

ЗАХАРОВА Ольга Александровна – аспирантка кафедры медицинской физики, лаборант лаборатории молекулярной нейродегенерации НОЦ ФОМБТ Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
ozakharpba92@gmail.com

ПЛОТНИКОВА Полина Владимировна — кандидат физико-математических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной нейродегенерации НОЦ ФОМБТ Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
plopolina@yandex.ru

ВЛАСОВА Ольга Леонардовна — доктор физико-математических наук, профессор кафедры медицинской физики, директор НОЦ ФОМБТ Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
olvlasova@yandex.ru

Erofeev A.I., Matveev M.V., Terekhin S.G., Zakharova O.A., Plotnikova P.V., Vlasova O.L. THE NEW METHOD FOR STUDYING NEURONAL ACTIVITY: OPTOGENETICS.

The article is devoted to problems of realization and application of optogenetic methods used to identify reasons of various diseases, to monitor the biochemical processes of cell activity and to study various organisms. The problems of delivery, embedding and monitoring the expression of opsin genes into the cell genome of interest have been considered. In the article, the parameters and properties of various opsins and also the main ways of achievement of precise optical control over cell using opsins were presented. The rules for choosing the parameters of a light beam and the features of its putting were pointed out. The characteristic properties of the different measurement technique and recording the experimental quantities were analyzed and given.

OPTOGENETICS, OPSIN, PHOTOSENSITIVITY, CHANNELRHODOPSIN, HALORHODOPSIN, LENTIVIRUS, TRANSGENIC MOUSE, ACTION POTENTIAL. FIBER

REFERENCES

- [1] **E.S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, et al.**, Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nat. Neurosci.* 8 (9) (2005) 1263–1268.
- [2] **K. Deisseroth, G. Feng, A.K. Majewska, et al.**, Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits, *J. Neurosci.* 26 (41) (2006) 10380–10386.
- [3] **M. Scanziani, M. Häusser**, Electrophysiology in the age of light, *Nature*. 461 (7266) (2009) 930–939.
- [4] **K. Deisseroth**, Controlling the brain with light, *Sci. Am.* 303 (5) (2010) 48–55.
- [5] **K. Deisseroth**, Optogenetics, *Nat. Methods*. 8 (1) (2011) 26–29.
- [6] **F.H. Crick**, Thinking about the brain, *Sci. Am.* 241 (3) (1979) 219–232.
- [7] **D. Oesterhelt, W. Stoeckenius**, Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Nat. New Biol.* 233 (39) (1971) 149–152.
- [8] **G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, et al.**, Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae, *Science*. 296 (5577) (2002) 2395–2398.
- [9] **F. Zhang, M. Prigge, F. Beyriere, et al.**, Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carterii*, *Nat. Neurosci.* 11 (6) (2008) 631–633.
- [10] **L.A. Gunaydin, O. Yizhar, A. Berndt, et al.**, Ultrafast optogenetic control, *Nat. Neurosci.* 13 (3) (2010) 387–392.
- [11] **R.D. Airan, K.R. Thompson, L.E. Fenno, et al.**, Temporally precise in vivo control of intracellular signaling, *Nature*. 458 (7241) (2009) 1025–1029.
- [12] **A.R. Adamantidis, F. Zhang, A.M. Aravanis, et al.**, Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons, *Nature*. 450 (7168) (2007) 420–424.
- [13] **H.C. Tsai, F. Zhang, A. Adamantidis, et al.**, Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning, *Science*. 324 (5930) (2009) 1080–1084.
- [14] **V. Gradinaru, M. Mogri, K.R. Thompson, et al.**, Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry, *Science*. 324 (5925) (2009) 354–359.
- [15] **A.V. Kravitz, B.S. Freeze, P.R. Parker, et al.**, Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry, *Nature*. 466 (7306) (2010) 622–626.
- [16] **H. Adesnik, M. Scanziani**, Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits, *Nature*. 464 (7292) (2010) 1155–1160.
- [17] **V. Gradinaru, K.R. Thompson, F. Zhang, et**



- al., Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo, *J. Neurosci.* 27 (52) (2007) 14231–1438.
- [18] **T.L. Lewis, T. Mao, K. Svoboda, D.B. Arnold**, Myosin-dependent targeting of transmembrane proteins to neuronal dendrites, *Nat. Neurosci.* 12 (5) (2009) 568–576.
- [19] **L. Petreanu, D. Huber, A. Sobczyk, K. Svoboda**, Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections, *Nat. Neurosci.* 10 (5) (2007) 663–668.
- [20] **B.R. Arenkiel, J. Peca, I.G. Davison, et al.**, In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2, *Neuron.* 54 (2) (2007) 205–218.
- [21] **S. Zhao, C. Cunha, F. Zhang, Q. Liu, B. Gloss**, Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity, *Brain Cell Biol.* 36 (1-4) (2008) 141–154.
- [22] **G. Nagel, M. Brauner, J.F. Liewald, et al.**, Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses, *Curr. Biol.* 15 (24) (2005) 2279–2284.
- [23] **F. Zhang, M. Prigge, F. Beyriere, et al.**, Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*, *Nat. Neurosci.* 11 (6) (2008) 631–633.
- [24] **S. Kleinlogel, K. Feldbauer, R.E. Dempster, et al.**, Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh, *Nat. Neurosci.* 14 (4) (2011) 513–518.
- [25] **Y.P. Zhang, T.G. Oertner**, Optical induction of synaptic plasticity using a light-sensitive channel, *Nat. Methods.* 4 (2) (2007) 139–141.
- [26] **V. Gradinaru, F. Zhang, C. Ramakrishnan, et al.**, Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics, *Cell.* 141(1) (2010) 154–165.
- [27] **A. Berndt, O. Yizhar, L.A. Gunaydin, et al.**, Bi-stable neural state switches, *Nat. Neurosci.* 12(2) (2009) 229–234.
- [28] **C. Bamann, R. Gueta, S. Kleinlogel, et al.**, Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond, *Biochemistry.* 49 (2) (2010) 267–278.
- [29] **I. Diester, M.T. Kaufman, M. Mogri, et al.**, An optogenetic toolbox designed for primates, *Nat. Neurosci.* 14 (3) (2011) 387–397.
- [30] **O. Yizhar, L. Fenno, M. Prigge, et al.**, Neocortical excitation/inhibition balance in social dysfunction and information processing, *Nature.* 477(7363) (2011) 171–178.
- [31] **A. Berndt, P. Schoenenberger, J. Mattis, et al.**, High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (18) (2011) 7595–7600.
- [32] **J.K. Lanyi, D. Oesterhelt**, Identification of the retinal-binding protein in halorhodopsin, *J. Biol. Chem.* 257 (5) (1982) 2674–2677.
- [33] **B. Scharf, M. Engelhard**, Blue halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*: wavelength regulation by anions, *Biochemistry.* 33 (21) (1994) 6387–6393.
- [34] **M. Sato, M. Kubo, T. Aizawa, et al.**, Role of putative anion-binding sites in cytoplasmic and extracellular channels of *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin, *Biochemistry.* 44 (12) (2005) 4775–4784.
- [35] **F. Zhang, L.P. Wang, M. Brauner, et al.**, Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry, *Nature.* 446 (7136) (2007) 633–639.
- [36] **X. Han, E.S. Boyden**, Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution, *Plos One.* 2 (3) (2007) e299.
- [37] **V. Gradinaru, K.R. Thompson, K. Deisseroth, et al.**, eNpHR: a *Natronomonas* halorhodopsin enhanced for optogenetic applications, *Brain Cell Biol.* 36 (1-4) (2008) 129–139.
- [38] **V.S. Sohal, F. Zhang, O. Yizhar, K. Deisseroth**, Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance, *Nature.* 459 (7247) (2009) 698–702.
- [39] **V. Busskamp, J. Duebel, D. Balya, et al.**, Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa, *Science.* 329(5990) (2010) 413–417.
- [40] **A.M. Aravanis, L.P. Wang, F. Zhang, et al.**, An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology, *J. Neural Eng.* 4 (3) (2007) 143–156.
- [41] **X. Li, D.V. Gutierrez, M.G. Hanson, et al.**, Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (49) (2005) 17816–17821.
- [42] **Z. Melyan, E.E. Tarttelin, J. Bellingham, et al.**, Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive, *Nature.* 433 (7027) (2005) 741–745.
- [43] **J.M. Kim, J. Hwa, P. Garriga, et al.**, Light-driven activation of beta 2-adrenergic receptor signaling by a chimeric rhodopsin containing the beta 2-adrenergic receptor cytoplasmic loops, *Biochemistry.* 44 (7) (2005) 2284–2292.
- [44] **T. Bruegmann, D. Malan, M. Hesse, et al.**, Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo, *Nat. Methods.* 7 (11) (2010) 897–900.
- [45] **D.N. Artamonov, V.V. Korzhova, D. Vu, et al.**, Violations of synaptic transmission in Huntington's disease in the cortico-striatal neuronal culture models. 30 (4) (2013) 1–13.

THE AUTHORS

EROFEEV Alexander I.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation
alexandr.erofeew@gmail.com

MATVEEV Maxim V.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation m.v.matveev@bk.ru

TEREKHIN Stanislav G.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation Stasok32@yandex.ru

ZAKHAROVA Olga A.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation ozakharpba92@gmail.com

PLOTNIKOVA Polina V.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation plopolina@yandex.ru

VLASOVA Olga L.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation olvlasova@yandex.ru