

НЕЙРОБИОФОТОНИКА
И НЕЙРОГЕНЕТИКА

УДК 612.821.6+612.822.3

ТЕРМОГЕНЕТИКА КАК НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ
КОНТРОЛЯ АКТИВНОСТИ НЕЙРОННОЙ СЕТИ

© 2020 г. Ю. Г. Ермакова¹, М. В. Рошин², А. А. Ланин^{3,4}, П. М. Балабан², А. М. Желтиков^{3,4,5},
В. В. Белоусов^{1,6,7}, Е. С. Никитин^{2,*}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Воробьевы горы, Москва, Россия

⁴ Международный центр квантовой оптики и квантовых технологий (Российский квантовый центр),
Сколково, Московская обл., Россия

⁵ Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

⁶ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Минздрава России,
Москва, Россия

⁷ Institute for Cardiovascular Physiology, Georg August University Göttingen, Göttingen, Germany

* e-mail: nikitin@ihna.ru

Поступила в редакцию 23.05.2019 г.

После доработки 30.08.2019 г.

Принята к публикации 16.09.2019 г.

Термогенетика появилась совсем недавно как эволюционное продолжение методов оптической стимуляции нервных клеток, использующих сфокусированный свет, активирующий фоточувствительные катионные каналы на нейрональной мембране. Активация светом и открытие фоточувствительных каналов, которые можно генетически экспрессировать в любых типах нейронов, вызывает мембранную деполяризацию нейрона и, как следствие, разряд потенциалов действия. В отличие от классических методов оптогенетики, где применяется видимый спектр, термогенетика использует каналы, чувствительные к нагреву. Это позволяет дополнительно использовать активацию этих каналов не только ИК-излучением, но и любыми другими методами нагревания нервной ткани, такими, как ультразвук или микроволновое излучение. Проницаемость живой ткани для стимуляции ИК-излучением на порядки выше, чем для излучений видимого спектра, что позволяет использовать методы термогенетики в экспериментах *in vivo* без инвазивных хирургических методик, “расчищающих проход” для оптогенетической стимуляции. С другой стороны, тепловая природа стимуляции накладывает дополнительные границы применения метода, так как нагревание должно быть достаточно умеренным, чтобы не вызвать тепловой шок на клеточном уровне, а порог активации каналов должен быть достаточно высоким, чтобы открытие каналов не происходило спонтанно при обычных физиологических температурах.

Ключевые слова: термогенетика, нейрон, нагревание, катионный канал, стимуляция, экспрессия

DOI: 10.31857/S0044467720010050

КАНАЛЫ, РЕАГИРУЮЩИЕ
НА ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКУЮ
СТИМУЛЯЦИЮ

Современные подходы термогенетики используют для стимуляции активности клеток термоактивируемые каналы надсемейства TRP, применяемые как в модельных клеточных культурах, так и на животных *in vivo*. Помимо

TRP-каналов, существуют и другие кандидаты на роль инструмента термогенетики: так, в недавнем исследовании на *Drosophila sp.* была показана возможность применения термочувствительного канала Gr28bD из семейства вкусовых рецепторов дрозофилы [Mishra et al., 2018]. Тем не менее на настоящий момент широко применяются только несколько каналов семейства TRP: TRPA1, TRPV1,

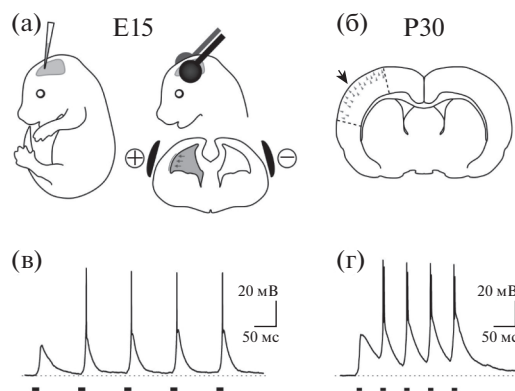


Рис. 1. Термогенетическая стимуляция пирамидных нейронов 2/3 слоя коры мыши на переживающих срезах *ex vivo*. (а) — локальная контролируемая электрофоретическая трансфекция пирамид 2/3 слоя неокортекса на ~15 день эмбриогенеза (E15). Схема показывает расположение накладных электродов для электропорации *in utero* с использованием плазмиды (содержащей канал TRPV1L под рCAG-промотором), инъецированной в левый латеральный желудочек мозга. На фронтальном срезе показаны полярность электродов и направление движения плазмиды под воздействием напряжения (справа снизу). (б) — трансфицированные на E15 предшественники в выстилке желудочка позднее превращаются в пирамидные нейроны 2/3 слоя неокортекса. (в), (г) — примеры регистрации мембранной деполяризации и потенциалов действия методом пэтч-кламп в ответ на термогенетическую стимуляцию TRPV1L-экспрессирующих нейронов с помощью лазера длиной волны 1342 нм. Длительность лазерных импульсов показана снизу.

Fig. 1. Thermogenetic stimulation of pyramidal neurons of layer 2/3 of mouse neocortex in acute brain slices *ex vivo*. (a) — local targeted electrophoretic transfection of L2/3 pyramidal neurons of neocortex at ~15th embryonic day (E15). The scheme shows positions of plate electrodes for electroporation of plasmids (with TRPV1L channels under pCAG promoter), injected into the left lateral brain ventricle. Frontal projection shows electrode polarities and direction of plasmid relocation driven by voltage. (b) — transfected neuronal precursors at the ventricular lining are transforming into pyramidal neurons of neocortical layer 2/3. (v), (r) — examples of electrophysiological recording of membrane depolarization and action potentials induced by IR-stimulation of the neurons expressing TRPV1L-channels. Pulse duration is shown below.

TRPV3-4 [Bath et al., 2014; Caterina et al., 1999; Chen et al., 2016; Gau et al., 2013]. Все они, включая упомянутый Gr28bD, являются не-селективными катионными каналами. При этом исследователи обычно используют собственные или эволюционно близкие механо-

и термочувствительные каналы для активации клеток (пример на рис. 1), что часто ограничивает возможности локальной и быстрой стимуляции. Терморецепторы большинства организмов, представленные каналами TRPA1 [Gracheva et al., 2010], TRPV1 [Gracheva et al., 2011], являются каналами, способными при активации пропускать через себя гидратированные катионы Na^+ , H^+ , K^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} .

TRPA1 и TRPV1-каналы большинства организмов формируют гомотетрамеры, каждый мономер длиной около 985–1113 аминокислотных остатков имеет крупный N-концевой цитоплазматический домен, несущий 14–18 анкирин-подобных повторов (10–12 аминокислотных остатков), 6 мембранных α -спиралей и короткую цитоплазматическую С-петлю, участвующую в тетрамеризации и связывании химических агонистов [Cordero-Morales et al., 2011; Liao et al., 2013; Paulsen et al., 2015a]. Между трансмембранными спиралями S5 и S6 формируются 2 короткие спирали, образующие погружающийся внутрь поровый элемент, отвечающий за низкую селективность и высокую катионную проводимость каналов TRPA1, TRPV1.

Через TRPA1 и TRPV1 в клетку преимущественно поступают катионы Ca^{2+} и Na^+ , так как градиент между внутри- и внеклеточной концентрациями этих катионов максимален. TRP-каналы относительно быстро (30–100 мс) активируются и инактивируются, так как являются рецепторами физического воздействия (температуры). Кроме того, они реагируют на ряд химических агонистов, способных приводить к их активации (алилизотионинат АИТС, капсаицин Csn и др.) за счет окисления аминокислотных остатков реактивного цистеина в белковой структуре канала [Oda et al., 2016; Paulsen et al., 2015b].

МЕХАНИЗМ РАБОТЫ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАНАЛОВ

Механизм работы TRPA1, TRPV1 до сих пор полностью неизвестен, хотя, по-видимому, он отличается у различных подсемейств, поскольку функция термочувствительности возникла и исчезла в процессе эволюции у довольно далеких представителей подсемейств TRP, а также претерпела разделение с восприятием боли и холодовой чувствительности в подсемействе TRPM [Wetsel, 2011].

Эмпирический механизм работы TRP-каналов предполагает, что при повышении тем-

пературы до определенного значения (температурный порог) канал открывается и пропускает через себя катионы, что приводит к деполяризации нервной клетки. Чем быстрее повышается температура, тем быстрее активируется канал, что аналогично зависимости от интенсивности света кинетики активации каналов ChR (channelrhodopsin) видимым светом, используемым в оптогенетике [Gracheva et al., 2010; 2011]. Для TRPV1 профиль ионной проводимости индивидуального тетрамера коррелирует с профилем тепловой стимуляции, тогда как период рефрактерности настолько короток, что его зачастую невозможно измерить [Yao et al., 2009]. Предложено несколько моделей тепловой активации TRPV1, основанных на миграции гидрофобных остатков, находящихся в верхнем липидном слое мембраны, во внеклеточную среду, что приводит к разрушению структуры боковых β -листов в субъединицах канала [Chugunov et al., 2016; Yang et al., 2014].

Было обнаружено, что у TRPA1 змей (eol-TRPA1, saTRPA1) перенос части ключевых анкириновых повторов рецептора может изменять его термочувствительность [Gracheva et al., 2010]. Так, повторы 3–8 формируют термоэнхансер, усиливающий реакцию рецептора на изменение температуры, а повторы 10–15 формируют первичный термочувствительный центр [Ibsen et al., 2015]. Если перенести эти элементы от TRPA1 змей (eol-TRPA1 или saTRPA1) на место аналогичных в гене TRPA1 человека, который утратил чувствительность к температуре, то у TRPA1 человека появится термочувствительность, аналогичная донорному TRPA1 змей. При переносе только повторов 3–8 эта функция будет почти на порядок слабее исходного канала, а при переносе только термоэнхансера 10–15, термочувствительность у канала TRPA1 человека не проявится.

СПОСОБЫ АКТИВАЦИИ TRP-КАНАЛОВ В ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В наиболее простых экспериментальных схемах термогенетическая активация экто-термных животных достигается за счет изменения температуры окружающей среды, что приближает данный подход к хомогенетическому: медленной ненаправленной активации и инактивации большой популяции ней-

ронов. В этом случае образец помещают в камеру с регулируемой температурой и проводят анализ поведения животного в зависимости от температуры. Этот подход часто используется в работе с пойкилотермными (холоднокровными) животными, такими как *Drosophila sp.* (дрозофила) [Kohatsu et al., 2011; Pulver et al., 2009] и *Danio rerio* (рыбка-зебра) [Chen et al., 2016; Gau et al., 2013], а специфичность активации регулируется с помощью ткане- или органоспецифического контроля экспрессии TRPs на молекулярно-генетическом уровне.

Термоактивируемые каналы позволяют использовать для активации длины волн так называемого “оптического окна” (960–2100 нм) – диапазона, где основные пигменты живых организмов: меланины, кератины, гемоглобин – практически не поглощают, что критически важно для такого плотного и объемного органа, как мозг. Для стимуляции TRP-каналов ИК-спектром наиболее предпочтителен лазерный источник излучения. Он позволяет четко воспроизводить длительность и амплитуду тепловых стимулов, а также обеспечивает точную локализацию и фокусировку излучения. При этом достигается значительно более высокая скорость переключения TRP-каналов между открытым и закрытым состоянием, чем при использовании методов нагревания окружающей среды [Erмаkova et al., 2017]. Кроме того, выбор метода нагревания может отражаться на числовом значении температурного порога активации термочannels [Hamada et al., 2008; Gracheva et al., 2010; 2011]. Система лазерной стимуляции сочетает оптический волновод для проецирования лазерного пучка на препарат, и обязательную термометрию для контроля и калибровки профиля достигаемой температуры при подаче лазерного импульса.

Выбор оптимальной длины волны используемого ИК-излучения для используемой модели в значительной степени определяет успешность термогенетического эксперимента. Стимуляция нейронов личинки рыбки *Danio rerio* лазером с длиной волны 1440 нм оказалась малоэффективной из-за высокой абсорбции водной средой, в которой проводились эксперименты, в то время как переключение на источник излучения 1350 нм значительно улучшило результаты стимуляции [Erмаkova et al., 2017]. Также при стимуляции нейронов срезов мозга лазером длиной волны 1342 нм требовалось почти на порядок

меньше энергии импульса лазера, чтобы достичь порога и вызвать потенциал действия в нейроне по сравнению с использованием лазера с длиной волны 1050 нм.

Кроме того, TRP-каналы могут быть активированы СВЧ-излучением и высокочастотным магнитным полем путем нагревания специфических магнитных наночастиц, предварительно введенных в мозг [Chen et al., 2015; Stanley et al., 2012; Fedotov et al., 2015; Saffronov et al., 2015]. В этом случае проникаемость живых организмов для магнитного поля позволяет проводить стимуляцию *in vivo* практически на любой глубине.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ TRPV-КАНАЛОВ

Применение TRPV1-каналов для безволевой стимуляции глубоких слоев мозга крысы явило собой один из самых пионерских экспериментов в данной области. Этот рецептор относится к одним из наиболее изученных и характеризуется нестабильным и высоким порогом активации, который в зависимости от системы активации колеблется от 39 до 43°C [Caterina et al., 1999]. Авторы встраивали в первую внеклеточную петлю TRPV1-канала эпитоп HisTag (6xHis), который служил местом связывания антител к нему. Магнитные частицы покрывали антителами к HisTag, делая возможной специфическую доставку магнитных частиц к рецептору.

В другой работе сайт специфического связывания магнитных частиц у TRPV1 отсутствовал, а магнитные частицы для стимуляции высокочастотным магнитным полем (465 кГц, радиоволны) были введены в мозг экспрессирующей TRPV1 мыши с помощью стереотаксиса. При включении магнитного поля наблюдали нагрев мозга в области локализации магнитных частиц и активацию нейронов, которую регистрировали по активации синтеза EGFP под контролем *c-fos*, однако, не регистрируя функциональную электрическую активность напрямую [Chen et al., 2015].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ TRPA-КАНАЛОВ

Впервые ИК излучение для активации организма *in vivo* было применено на модели

стимуляции двигательной активности и брачного поведения мухи *Drosophila sp.*, получившей название FlyMAD [Bath et al., 2014]. Авторами были получены линии мух, конститутивно экспрессирующих собственные dTRPA1 дрозофилы под общим нейрональным промотором, а также с использованием промоторов, специфических для мотонейронов и нейронов, активирующихся при брачном поведении. Была создана установка, позволяющая удерживать в фокусе лазерного пучка (800 мкм) как всю муху, так и фокусироваться на отдельных ее частях (усики, торекс, брюшко) и нагревать их. Активация поведения была достигнута за счет стимуляции с помощью dTRPA1 двигательных нервов, а остановка — за счет стимуляции ингибиторных нервов мухи. Авторам впервые удалось продемонстрировать относительно локальный (на уровне части тела) регулируемый температурный контроль поведения животного *in vivo* с помощью термогенетики.

Недавно были проведены важные эксперименты по контролю поведения рыбки *Danio rerio* с использованием змеиных каналов caTRPA1, экспрессированных в 5–10 сенсорных нейронах. Активация этих нейронов приводила к имитации тактильного контакта, активирующего поведение избегания у личинки *Danio rerio*, выражающееся в высокоамплитудном взмахе хвостом, с помощью которого закрепленная за голову в агарозном геле рыбка пыталась избавиться от стимула [Ermaikova et al., 2017]. Температурный порог caTRPA1 канала составляет ~28°C, что было всего на 1–2°C выше нормальной температуры в аквариуме, поэтому было возможно термогенетически активировать каналы caTRPA1, не запуская собственные TRPV1-рецепторы *Danio rerio*, порог активации которых выше значений использованной тепловой стимуляции.

КОНТРОЛЬ СОБСТВЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ В ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Поскольку термогенетика оперирует таким базовым свойством объекта, как температура, в процессе эксперимента необходимо проводить тщательный температурный контроль, так как все живые организмы имеют собственный температурный оптимум, нарушение его пределов приведет к активации эндогенных температурных рецепторов, боле-

вому шоку или гибели нейронов. Также важно уделять внимание сочетанию живой модели термочувствительного канала (его порог должен находиться в пределах физиологической нормы модели и желательнее быть ниже, чем порог собственных терморепцепторов) и способа доставки излучения. Например, существуют данные о неспецифической стимуляции нейронов, а также эукариотических клеток НЕК293 с помощью ИК [Tseeb et al., 2009], и специфические методы повреждения клеток с помощью фемтосекундных ИК импульсов, используемые, как способ трансфекции с помощью микропорации мембраны клетки [Voronin, Zheltikov, 2010]. Для модельных организмов, имеющих собственные высокочувствительные температурные каналы, (например, dTRPA1 у плодовой мушки *Drosophila sp.*, drTRPV1 у рыбки *Danio rerio*, mmTRPV1 и mmTRPV3 у мыши *Mus musculus*), возможно использование как собственных TRPs, так и TRPs других организмов, например, TRPV1L летучих мышей *Desmodus rotundus* [Roshchin et al., 2018] или различных видов змей. В случае использования собственных каналов, которые экспрессируются в различных органах и тканях животного, экспериментатор вынужден использовать локальные методы активации либо, как это было сделано для TRPV1 мыши, необходимо инактивировать экспрессию собственных терморепцепторов в тех областях, которые не должны быть активированы во время эксперимента. Кроме того, существует риск вторичной регуляции активности TRPs с помощью клеточных белков, так как высока вероятность встречи термоканалов и их потенциальных белков-партнеров, а также ферментов, регулирующих активность TRPs в данном организме [Wang et al., 2008; Takahashi, Mori, 2011].

С другой стороны, использование собственных TRPs увеличивает вероятность эффективной работы канала в выбранном модельном организме, а также того, что порог активации TRPs будет лежать в области физиологических температур животного. Использование TRPs, привнесенных в организм из других источников, может нести риск иммунного ответа на чужеродный белок или изменения исходных параметров работы канала, например, его кинетики работы или порога активации. С другой стороны, этот подход позволяет наиболее оптимально подобрать порог активации для модельного организма,

задать специфичность и/или возможность индукции экспрессии TRPs.

Недавняя работа по экспрессии каналов TRPV1L во 2/3 слое неокортекса мыши показала важность того, чтобы тип выбранного канала попадал в допустимый диапазон рабочих температур термогенетического эксперимента [Roshchin, 2018]. Температурный порог этого канала составляет около 40°C [Gracheva et al., 2011], что несколько выше нормальной температуры неокортекса грызунов (37–38°C, [DeBow, Colbourne, 2003]), и канал, очевидно, не активируется в мозге в физиологических условиях. С другой стороны, значение порога канала TRPV1L выгодно отличает его от ранее использовавшейся короткой изоформы этого же канала – TRPV1, порог активации которого составляет ~43°C. Температура в 43°C является нижней границей теплового шока нейронов, поскольку необратимые тепловые изменения могут возникнуть в нейронах даже после нагревания до этой температуры в течении 10 секунд [Yarmolenko et al., 2011].

ИЗМЕРЕНИЕ ЗНАЧЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И КАЛИБРОВКА В ТЕРМОГЕНЕТИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Для точного контроля значений температуры, до которых нагревается препарат, необходимо провести калибровку источника нагревания. В случае с подогревом окружающего раствора достаточно просто поместить детектор температуры (термопару) в камеру с препаратом. При использовании более сложных, точечных методов нагревания, например, с помощью импульса сфокусированного ИК-лазера, заранее проводят калибровку. Для этого можно использовать микропипетки и стандартный усилитель пэч-кламп [Yao et al., 2009]. Кончик микропипетки (диаметр 2–3 мкм) заполняют раствором электролита (например, NaCl) и измеряют его сопротивление при различных температурах для построения калибровочной кривой. После этого кончик нагревают локально с помощью лазера и получают профиль температурного стимула в середине фокуса ИК-лазера [Ermaikova et al., 2017]. Измерения производят в той же среде и при условиях реального эксперимента. Также могут быть использованы волоконнооптические методы измерения локальной температуры с точностью выше 0.1°C при регистрации флуоресценции примесей азот-

вакансия в микрокристалле алмаза, размещенного рядом с клеткой [Lanin et al., 2016].

СРАВНЕНИЕ ТЕРМОГЕНЕТИКИ С ОПТОГЕНЕТИКОЙ

Методы оптогенетики имеют ряд недостатков, связанных в основном с ограничениями по доставке активирующего видимого света в глубокие слои ткани и низкой проводимостью индивидуальных белков-опсинов, бактериальных опсинов, являющихся главными инструментами быстрой оптогенетики. При оптоволоконной доставке излучения в диапазоне 350–635 нм на расстоянии 1 мм от торца оптоволокна теряется около 90% мощности излучения [Yizhar et al., 2011], что приводит к использованию избыточных мощностей стимуляции, которые обладают фототоксическим эффектом [Richter et al., 2014]. Использование двухфотонной стимуляции [Prakash et al., 2012] требует дополнительных исследований по эффективности активации опсинов в двухфотонном режиме, а также может быть связано с нагревом ткани и различными побочными эффектами активации. Кроме того, недостаточная проникающая способность видимого спектра в реальных экспериментах не позволяет оптически стимулировать глубокие структуры мозга, например гиппокамп, без частичного разрушения вышележащих областей во время имплантации световода [Liu et al., 2012]. Термогенетика позволяет “сместить” возбуждение рецепторов в область длинноволнового ИК-излучения, которое более эффективно проникает в ткани живых организмов, а также использовать СВЧ и радиоволновое излучение для активации объектов. Кроме того, диаметр поры каналов семейства TRP на 3 порядка больше, чем у светочувствительных каналов ChR [Adamantidis et al., 2014], являющихся наиболее широко распространенными каналами для оптогенетической стимуляции, что приводит к существенно большей величине тока через канал при его открытии.

Наиболее эффективный способ активации нейронов должен быть как можно менее инвазивен и как можно более незаметен для мозга. Излучение, необходимое для активации термочаналов, невидимо для живых организмов, что снижает влияние стресса животного в процессе стимуляции. Кроме того, термогенетическая стимуляция может без ограничений использоваться в эксперимен-

тах в сочетании со зрительной стимуляцией, поскольку фоновая засветка или утечка ИК-излучения не будет вызывать фотостимуляцию зрительных органов, поскольку ИК-излучение ими не воспринимается. За счет низкого поглощения собственными пигментами, инфракрасное и СВЧ-излучение не вызывает фототоксических эффектов в верхних слоях тканей биологического объекта, так как нет нужды 50–90-кратно увеличивать дозу излучения, как это делается в случае синего света, используемого для активации ChR, из-за поглощения в верхних слоях образца.

В экспериментах с генетической экспрессией фотоактивируемых каналов в нейронах почти всегда необходимо использовать дополнительную метку для определения того, какие именно нейроны были заражены вектором, экспрессирующим термочувствительный канал для проведения на них дальнейших экспериментов. Например, в широко распространенной трансгенной линии мышей Thy1-ChR2-YFP используется флуоресцентный белок слияния, в котором фотоактивируемый канал ChR2 ковалентно связан с желтым флуоресцентным белком YFP, по которому можно выбирать экспрессирующие нейроны в пятом слое неокортекса или поле CA1 гиппокамп [Никитин и др., 2017]. При этом оптимальная длина волны 532 нм, используемая в этих экспериментах для возбуждения флуоресценции YFP, также и возбуждает фотоактивируемые каналы ChR2, вызывая потенциалы действия из-за значительного перекрытия их спектров возбуждения, что негативно отражается на состоянии этих нейронов и уменьшает выход оптогенетического эксперимента. В похожих термогенетических экспериментах на неокортексе для поиска трансфицированных нейронов также используется флуоресцентный маркер экспрессии, например, красный tdTomato [Roshchin et al., 2018]. Однако возбуждение этого белка не оказывает заметного активирующего воздействия на термочаналы, которые не чувствительны к видимому спектру.

Работа поддержана грантами: РФФИ 17-00-00216, 19-015-00022, 17-00-00212, 17-00-00214, 17-04-01690, 17-00-00217.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Никитин Е.С., Роцин М.В., Иерусалимский В.Н., Егоров А.В., Балабан П.М. Оптогенетическая

- стимуляция аксонов пирамидных нейронов зрительной коры и гиппокампа на переживающих срезах мозга. Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. 2017. 67 (5): 101–108.
- Adamantidis A.R., Zhang F., de Lecea L., Deisseroth K.* Optogenetics: opsins and optical interfaces in neuroscience. Cold Spring Harbor protocols. 2014. 2014: 815–822.
- Bath D.E., Stowers J.R., Hörmann D., Poehlmann A., Dickson B.J., Straw A.D.* FlyMAD: rapid thermogenetic control of neuronal activity in freely walking *Drosophila*. Nat. Methods. 2014. 11 (7): 756–762.
- Caterina M.J., Rosen T.A., Tominaga M., Brake A.J., Julius D.* A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. Nature. 1999. 398 (6726): 436–441.
- Chen R., Romero G., Christiansen M.G., Mohr A., Anikeeva P.* Wireless magnetothermal deep brain stimulation. Science. 2015. 347 (6229): 1477–1480.
- Chen S. et al.* TRP channel mediated neuronal activation and ablation in freely behaving zebrafish. Nat. Methods. 2016. 13 (2): 147–150.
- Chugunov A.O., Volynsky P.E., Krylov N.A., Nolde D.E., Efremov R.G.* Temperature-sensitive gating of TRPV1 channel as probed by atomistic simulations of its trans- and juxtamembrane domains. Sci. Rep. 2016. 6: 33112.
- Cordero-Morales J.F., Gracheva E.O., Julius D.* Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. 108 (46): E1184–E1191.
- DeBow S., Colbourne F.* Brain temperature measurement and regulation in awake and freely moving rodents. Methods. 30 (2003): 167–171.
- 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., Balaban P.M., Fedotov A.B., Sidorov-Biryukov D.A., Nikitin E.S., Zheltikov A.M., Belousov V.V.* Thermogenetic neurostimulation with single-cell resolution. Nature Communications. 2017. 8: 15362.
- Fedotov I.V., Safronov N.A., Ermakova Y.G., Matlashov M.E., Sidorov-Biryukov D.A., Fedotov A.B., Belousov V.V., Zheltikov A.M.* Fiber-optic control and thermometry of single-cell thermosensation logic. Scientific reports. 2015. 5: 15737.
- Gau P., Poon J., Ufret-Vincenty C., Snelson C.D., Gordon S.E., Raible D.W., Dhaka A.* The zebrafish ortholog of TRPV1 is required for heat-induced locomotion. J. Neurosci. 2013. 33 (12): 5249–5260.
- Gracheva E.O., Cordero-Morales J.F., González-Caracía J.A., Ingolia N.T., Manno C., Aranguren C.I., Weissman J.S., Julius D.* Ganglion-specific splicing of TRPV1 underlies infrared sensation in vampire bats. Nature. 2011. 476 (7358): 88–91.
- Gracheva E.O., Ingolia N.T., Kelly Y.M., Cordero-Morales J.F., Hollopeter G., Chesler A.T., Sánchez E.E., Perez J.C., Weissman J.S., Julius D.* Molecular basis of infrared detection by snakes. Nature. 2010. 464 (7291): 1006–1011.
- Hamada F.N., Rosenzweig M., Kang K., Pulver S.R., Ghezzi A., Jegla T.J., Garrity P.A.* An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. Nature. 2008. 454: 217–220.
- Ibsen S., Tong A., Schutt C., Esener S., Chalasani S.H.* Sonogenetics is a non-invasive approach to activating neurons in *Caenorhabditis elegans*. Nat Commun. 2015. 6: 8264.
- Kohatsu S., Koganezawa M., Yamamoto D.* Female contact activates male-specific interneurons that trigger stereotypic courtship behavior in *Drosophila*. Neuron. 2011. 69 (3): 498–508.
- Lanin A.A., Stepanov E.A., Tikhonov R.A., Sidorov-Biryukov D.A., Fedotov A.B., Zheltikov A.M.* A compact laser platform for nonlinear Raman microspectroscopy: multimodality through broad chirp tunability. J. Raman Spectrosc. 2016. 47: 1042–1048.
- Lanin A.A., Fedotov I.V., Ermakova Yu G., Sidorov-Biryukov D.A., Fedotov A.B., Hemmer P., Belousov V.V., Zheltikov A.M.* Fiber-optic electron-spin-resonance thermometry of single laser-activated neurons. Optics Letters. 2016. 41 (23): 5563–5566.
- Liao M., Cao E., Julius D., Cheng Y.* Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. Nature. 2013. 504 (7478): 107–112.
- Liu X., Ramirez S., Pang P.T., Puryear C.B., Govindarajan A., Deisseroth K., Tonegawa S.* Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. Nature. 2012. 484: 381–385.
- 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., Zars T.* The *Drosophila* Gr28bD product is a non-specific cation channel that can be used as a novel thermogenetic tool. Sci. Rep. 2018. 8 (1): 901.
- Oda M., Kurogi M., Kubo Y., Saitoh O.* Sensitivities of Two Zebrafish TRPA1 Paralogs to Chemical and Thermal Stimuli Analyzed in Heterologous Expression Systems. Chem. Senses. 2016. 41 (3): 261–272.
- Paulsen C.E., Armache J.P., Gao Y., Cheng Y., Julius D.* Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. Nature. 2015a. 525 (7570): 552.
- Paulsen C.E., Armache J.P., Gao Y., Cheng Y., Julius D.* Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. Nature. 2015b. 520 (7548): 511–517.
- Prakash R., Yizhar O., Grewe B., Ramakrishnan C., Wang N., Goshen I., Packer A.M., Peterka D.S., Yuste R., Schnitzer M.J., Deisseroth K.* Two-photon optogenetic toolbox for fast inhibition, excitation and bistable modulation. Nat. Methods. 2012. 9: 1171–1179.

- Pulver S.R., Pashkovski S.L., Hornstein N.J., Garrity P.A., Griffith L.C.* Temporal dynamics of neuronal activation by Channelrhodopsin-2 and TRPA1 determine behavioral output in *Drosophila* larvae. *J. Neurophysiol.* 2009. 101 (6): 3075–3788.
- Richter C.P., Tan X.* Photons and neurons. *Hear Res.* 2014. 311: 72–88.
- 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.* Thermogenetic stimulation of single neocortical pyramidal neurons transfected with TRPV1-L channels. *Neurosci. Letters.* 2018. 687: 153–157.
- Safronov N.A., Fedotov I.V., Ermakova Yu G., Matlashov M.E., Sidorov-Biryukov D.A., Fedotov A.B., Belousov V.V., Zheltikov A.M.* Microwave-induced thermogenetic activation of single cells. *Applied Physics Letters.* 2015. 106 (16): 163702.
- Stanley S.A., Gagner J.E., Damanpour S., Yoshida M., Dordick J.S., Friedman J.M.* Radio-wave heating of iron oxide nanoparticles can regulate plasma glucose in mice. *Science.* 2012. 336 (6081): 604–608.
- Takahashi N., Mori Y.* TRP Channels as Sensors and Signal Integrators of Redox Status Changes. *Front Pharmacol.* 2011. 2: 58.
- Tseeb V., Suzuki M., Oyama K., Iwai K., Ishiwata S.* Highly thermosensitive Ca dynamics in a HeLa cell through IP(3) receptors. *HFSP J.* 2009. 3 (2): 117–123.
- Voronin A.A., Zheltikov A.M.* Ionization penalty in nonlinear optical bioimaging. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys.* 2010. 81 (5, Pt 1): 051918.
- Wetsel W.C.* Sensing hot and cold with TRP channels. *Int. J. Hyperthermia.* 2011. 27 (4): 388–398.
- Wang Y.Y., Chang R.B., Waters H.N., McKemy D.D., Liman E.R.* The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J Biol. Chem.* 2008. 283 (47): 32691–32703.
- Yang F., Zheng J.* High temperature sensitivity is intrinsic to voltage-gated potassium channels. *Elife.* 2014. 3: e03255.
- Yao J., Liu B., Qin F.* Rapid Temperature Jump by Infrared Diode Laser Irradiation for Patch-Clamp Studies. *Biophysical Journal.* 2009. 96: 3611–3619.
- Yarmolenko P.S., Moon E.J., Landon C., Manzoor A., Hochman D.W., Viglianti B.L., Dewhirst M.W.* Thresholds for thermal damage to normal tissues: An update. *International Journal of Hyperthermia. The Official Journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group.* 2011. 27: 320–343.
- Yizhar O. et al.* Optogenetics in neural systems. *Neuron.* 2011. 71 (1): 9–34.

THERMOGENETICS AS A NEW METHOD TO CONTROL NEURONAL ACTIVITY

Y. G. Ermakova^a, M. Roshchin^b, A. A. Lanin^{c,d}, P. M. Balaban^b, A. M. Zheltikov^{c,d,e}, V. V. Belousov^{a,f,g}, and E. S. Nikitin^{b,#}

^a Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^b Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

^c Physics Department, International Laser Center, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

^d Russian Quantum Center, Skolkovo, Moscow Region, Russia

^e Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

^f Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

^g Institute for Cardiovascular Physiology, Georg August University Göttingen, Göttingen, Germany

[#] e-mail: nikitin@ihna.ru

Thermogenetics has emerged recently as an evolving extension of optical methods for neuronal stimulation that employs focused light to activate photosensitive cationic channels in neuronal membrane. Light-activation to open photosensitive channels that can be expressed genetically in all types of neurons is aimed to induce depolarization of neuronal membrane followed by a neuronal discharge. Unlike conventional optogenetics that employs visible spectrum, thermogenetics uses channels gated by heating. It provides the possibility to activate the channels not only with IR-radiation, but also with any other way to heat nervous tissue such as ultrasound or microwave radiation. The permeability of living tissue to IR-radiation is orders higher than that to visible light spectra, which allows use of thermogenetic stimulation in the experiments *in vivo* without invasive surgery to make access for optogenetic stimulation. On the other hand, the thermal nature of stimulation imposes additional limitations to application of thermogenetics as heating should be quite reasonable to avoid heat shock response at cellular level, while the threshold of activation of channels should be high enough to rule out their activation at normal physiological temperatures.

Keywords: thermogenetics, neuron, heating, cationic channel, stimulation, expression