

DOI: 10.13376/j.cbls/2017109

文章编号: 1004-0374(2017)08-0797-07

视紫红质通道蛋白2在系统神经科学研究中的应用与展望

王晓敏¹, 于爱萍², 王国宝², 刘亚丰³, 蒋 苏^{2*}, 徐文东²

(1 上海市静安区中心医院复旦大学附属华山医院静安分院手及上肢外科, 上海 200040;
2 复旦大学附属华山医院手外科, 上海 200040; 3 武汉光电国家实验室, 武汉 430074)

摘要: 光遗传学技术因其低组织损伤性、高时空分辨率以及遗传特异性等优势, 虽然历史并不长, 但在近几年来成为最热门的技术之一, 并在神经科学研究中迅速被应用。视紫红质通道蛋白 2 (channelrhodopsin-2, ChR2) 作为光遗传学技术的代表性蛋白质之一, 在系统神经科学领域中已成为非常理想的工具并取得了一系列突破性的进展。现针对 ChR2 的背景、分子结构以及生理学功能, 及其在体脑功能区绘图和在体神经功能调控的研究进展, 进行综述及展望。

关键词: 视紫红质通道蛋白 2; 神经科学; 光遗传学; 基于光的脑功能绘图

中图分类号: Q31 **文献标志码:** A

Application and outlook of channelrhodopsin-2 in system neuroscience

WANG Xiao-Min¹, YU Ai-Ping², WANG Guo-Bao², LIU Ya-Feng³, JIANG Su^{2*}, XU Wen-Dong²

(1 The Department of Hand and Upper Extremity Surgery, Jing'an District Centre Hospital of Shanghai Huashan Hospital Fudan University Jing' An Branch Shanghai 200040, China; 2 Department of Hand Surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 3 Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, Wuhan 430074, China)

Abstract: Optogenetics, a technique to precisely manipulate cell activity by genetically encoded light-sensitive proteins, has been widely and enthusiastically applied as a revolutionary tool in the field of neuroscience. As one of the most representational proteins, channelrhodopsin-2 (ChR2) has been regarded as a prominent tool that contributes to a series of breakthrough in the field of system neuroscience. In this paper, we review the discovery, molecular structure and function of ChR2. We also review the advances of using ChR2 to map cerebral functional connectivity and to study the modulation of neural function, with a prospect for its future application.

Key words: channelrhodopsin-2; neuroscience; optogenetics; light based mapping

在细胞及系统层面的神经科学研究中, 历来十分具有挑战性的工作之一就是中枢神经系统功能环路图谱的绘制。神经元连接环路的连接方式、整合和传递整合神经信息的研究在近几年来为大量的神经科学工作者所关注。病毒转染研究上下游神经元交联的顺向、逆向追踪技术, 以及电生理观测研究固有独立神经环路是截至目前为止解决当前问题的主要手段。同时, 基于现在的技术手段, 利用基因组学方法在特定类群细胞上实现即时诱发出精确电生理活动业已成为神经科学领域常用的技术手段。近些年来, 研究者不仅可以在离体脑组织^[1-2]和非脊椎类动物模型^[3-5]完成对神经元活动的准确调控,

在哺乳类动物神经系统中进行在体神经功能调控也成为现实^[6-8]。

目前在解析神经元连接环路中, 主要运用病毒转染、活体组织染色, 以及转基因表达系统等技术来研究神经元形态以及它们的轴突投射^[9-11]。然而, 环路中某个特定功能连接的直接信息无法被显示是这些解剖学方法普遍存在的缺陷。由此看出, 在体研究十分有价值^[12-14]。目前针对此目的的方法学的

收稿日期: 2017-01-03 修回日期: 2017-04-22

基金项目: 上海市科学技术委员会“扬帆计划”(14YF1-400800)

*通信作者: E-mail: oscarjiangsu@126.com

研究中,在限定的空间内针对某种特定类型的细胞进行诱发反应是在体神经电生理研究关注的热点。光解笼锁谷氨酸以及局部电刺激是目前激活神经元较常用的方法。采用基因组学或遗传操作技术对特定类群的神经元在空间、时间上实现精确调控神经元活动,将使人们更为精准地绘制脑功能环路。寻找一种可以简单快速控制神经元放电并且能够实现基因操作的工具对神经元功能领域研究势在必行。光遗传学技术就是一种光学和遗传学相结合的方法,通过转基因技术使特定细胞表达光敏感通道蛋白,进而利用光刺激控制细胞的功能活动。在体、离体、病毒侵染等种种方式自2003年起,被诸多实验室相继应用,其实验结果证实光控阳离子通道蛋白 channelrhodopsin-2 (视紫红质通道蛋白2, ChR2) 是系统神经科学研究一个十分有效的工具,蓝光刺激下 ChR2 的激活可以在空间和时间上精确地调控特定区域神经元的放电活动^[15-17]。

1 ChR2的背景、构架和功能

视紫红质蛋白(channelrhodopsin)由真核生物、古生菌以及原核生物表达,它是能通透阳离子的通道蛋白,在光照刺激下激活。来源于团藻(*Volvox carteri*)的VChR1、VChR2蛋白,以及源自莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的ChR1、ChR2蛋白是目前已被发现的4种通道蛋白。将光照条件控制在最佳范围内,感受光刺激,让微藻具有趋光性,使其能够进行趋光、背光运动,帮助微藻进行光合作用,就是天然通道视紫红质蛋白家族的主要作用。作为光遗传学技术的标志性蛋白,ChR2是一种七次跨膜的非选择性阳离子通道蛋白,分离自单细胞绿藻莱茵藻,其中心波长470 nm,光敏光谱范围350~550 nm^[18]。在470 nm波长光照时,ChR2通道开放,产生内向阳离子流,细胞膜电位去极化。当神经细胞膜电位去极化水平达到钠离子通道激活阈值时就能够产生动作电位,从而实现光刺激促发神经细胞放电活动。470 nm波长的蓝光刺激可激活ChR2通道蛋白,产生内向电流。此特异性的内向电流可在50 μs内在神经元上被记录,并在1~3 ms内诱发动作电位^[19-20]。由此可见,ChR2的响应速度非常快。在哺乳类动物系统中,构建转基因动物、局部注射病毒侵染细胞^[21]以及胚胎电转染^[22]等是实现细胞表达ChR2的常用方法。一方面,激活一个神经元细胞进而产生动作电位必须要有充足的ChR2蛋白通道开放才可以;另一方面,光刺激存

在窗口期,合适的刺激时间才能维持ChR2蛋白通道的激活状态^[23]。

对ChR2蛋白通道的分子结构进行改造,可以得到具有不同特性的变体,它们具有不同的激活光谱,进而获得了更大的电导,更优的激活、失活时间,使得这些变体可应用于更高效、更精准的神经调控研究,并且具备更高光电流强度的特点^[24-25]。点突变产物C128A/S和D156A可使得ChR2通道在光刺激下维持较长时间的去极化状态,使得通道的失活延迟。L132C-ChR2通道对钙离子有更好的通透性^[26]。另外,ChR(iC1C2)是一种200倍光敏感的氯离子电导,蓝光刺激下可以抑制神经元的活性。除了对光更加敏感,iC1C2作用时间更长,刺激后可长达1 min,并且红光照射可使其失活。这种高度的敏感性和长时的通道开放可以缩短激光照射时间,因此,可以减少对组织的热损伤。系统神经科学的研究因为这些ChR2的突变体而有了更加多元化的选择,ChR2通道及其相关改造形式使得研究者可在离体脑片水平^[27]、在体清醒状态^[28-30]进行系统神经科学的研究。ChR2通道在这几年来的神经科学领域中也得到科学家们的广泛应用,用于研究神经功能抑制的光基因学工具,如NpHR、Jaws、Arch等^[31]也得以发展。

阶跃式视紫蛋白(step-function opsins)是ChR2受体家族的另一种类型,其激活态维持时间更加持久,即使撤掉光刺激后其激活态仍能维持,并且在黄光刺激下可立即呈现失活态。新发现的第三代稳定型阶跃式视紫蛋白其失活态时间可恒定在30 min左右,其诱发的峰值电流可超过200 pA^[32]。这种特性尤其适合于在没有持续的激光作用下的行为学研究。高能的激光脉冲会对组织造成热损伤,在这种情况下稳定型阶跃式视紫蛋白可以发挥优势^[7]。另外,对光控制相关的信号通路的研究不断深入,包括Opto-XRs-G蛋白偶联受体介导的信号通路(Gq、Gs或Gi/o-coupled)、光门控酶激活的通路和光敏感蛋白-蛋白的交互作用通路等^[33],使得对与疾病相关的神经通路机制的探究过程,尤其是特异性的细胞类型和环路得到进一步的发展。

2 基于光遗传学技术的在体脑功能区绘图

在神经元及皮层区域之间绘制结构及功能连接图能够使人们更深入理解大脑内神经元的连接性。研究神经系统连接性时可利用光敏感蛋白具有快速激活和区域定位的特性轻易达到单个神经元水平以

及毫秒级别的时间特异性。光遗传学的单点刺激技术刺激啮齿类动物脑区并在体绘制脑功能图谱在近年来越来越多地被报道, 运动反应则由肌电记录、电生理、诱发运动反应等技术来评估。

早期皮层绘图时区分皮层区域之间的界限主要基于细胞构架以及解剖结构特点。要绘制皮层的功能图谱, 需要一种即时刺激皮层及检测信号输出的技术手段。单根穿刺微电极刺激皮层并观察行为输出是最早且应用十分普遍的方法^[34]。Hira等^[23]和Ayling等^[35]在2009年报道了利用基于光刺激的绘图技术(light-based mapping, LBM)在体绘制小鼠的运动皮层图谱。转基因小鼠Thy1-ChR2-YFP(Jackson实验室, line 18)在大脑皮层第V层锥体细胞中特异性表达光敏通道ChR2, 通过在运动皮层上给予473 nm波长的激光刺激并同时记录诱发运动反应(肌电活动), 可以绘制小鼠运动皮层功能区。

皮层图谱的绘制虽然可以通过皮层内微电极刺激(intracortical microstimulation, ICMS)的方法加以实现^[34], 但无法真实代表内源性的皮层活动。因为电刺激不加分辨地激活靶区域内所有的细胞和突触, 且将同时兴奋顺行及逆行的神经活动^[35-38]。此外, 需要长时间、多次刺激的研究并不适合采用ICMS的方法。ICMS绘制的运动皮层拥有相对较高的精度, 但是ICMS不可避免地会对脑组织造成损伤, 影响部分大脑皮层的功能, 操作过程效率低下(每一个刺激点均需插拔电极)。然而, LBM与ICMS相比对组织的损伤更小, 短时间之内(几分钟)可以对数百个皮层位点进行刺激, 并且可以在无创情况下进行反复刺激绘图^[39]。另外, 不同的麻醉深度会对皮层活动产生影响, 所以快捷的刺激方式对于在体麻醉实验非常重要^[40]。

与ICMS对比, LBM有许多优势, 但重叠的树突棘以及组织内的光散射会对其空间分辨率产生影响^[35]。由于红光在组织中不如蓝光易发生散射, 红色激发波长的ChR2^[41]可能会更具优势。ChR2介导的LBM可在多物种模型得以实现, 此亦为其特点之一。目前, LBM仅能在小鼠上绘制运动皮层, 且因其空间分辨率较低, 尚不足以在相对小的小鼠运动皮层上绘制精确的细节。转基因品系(如大鼠)的研究进展^[42-43]以及胚胎电转技术表达ChR2^[22]等技术手段的进一步成熟, 将使得在相对更大的运动皮层上精确绘图成为可能^[44]。Roe等^[8]利用病毒载体技术表达ChR2, 在灵长类动物模型中, 刺激弓状沟前后侧的ChR2位点诱发快速眼动, 以研究执

行眼球运动行为的额叶环路。另外, 运动皮层内特定细胞的图谱绘制基于特定细胞内表达ChR2技术的进步得以实现^[8]。通过LBM来研究复杂前肢运动已经被Harrison等^[39]所报道, 他们发现外展和内收这两类的前肢运动通过对运动皮层持续地进行光刺激可以稳定地被诱发, 且外展动作的代表区位于内收动作代表区前方。另外, LBM也被应用于在做舔舐动作的清醒小鼠(头部固定)中绘制舌部运动皮层代表区图谱^[45]。今后, 通过LBM在疾病、外伤或运动、认知学习后的模型中研究皮层图谱随时间发生动态变化将成为可能^[39,46]。

3 基于光遗传学技术的在体神经功能调控

基于ChR2的光遗传学技术与早前使用金属、玻璃电极的电刺激技术相比, 具备以下三大优势: 第一, ChR2可以表达在特定类型的神经元或皮层区域, 光刺激蛋白通道激活后产生的电信号将沿着神经通路固有的传导方向传递^[47]; 第二, 由于是采用特定波长的光照射在神经元上, 避开与神经的直接接触, 避免对组织的刺激和损伤, 可以进行多次重复刺激; 第三, 通过在特定的神经元上表达光敏感蛋白而实现选择性地兴奋特定类型细胞, 如以Thy1为启动子的转基因C57小鼠中, 在大脑皮层的第五层锥体细胞高水平表达的ChR2-YFP, 为研究活动依赖的或者发育相关的可塑性或者行为相关的环路绘图提供了绝佳的模型^[48-49]。此外, Feng实验室利用细菌人工染色体(BAC)转基因技术构建了多种细胞类型特异ChR2表达转基因小鼠^[49]。例如, 在蓝色激光下, 通过转基因小鼠(Pvalb-ChR2-EYFP、TPH2-ChR2-EYFP或ChAT-ChR2-EYFP)可以分别选择性地激活和调控胆碱能、5-羟色胺能或PV中间神经元动作电位的发放。Gourine等^[50]在2010年的研究利用病毒载体AAV将ChR2在小鼠脑干的星型胶质细胞中表达以控制其活动, 详细阐述了星型胶质细胞从血液中获得机体内环境信息, 然后将信息传递给调节呼吸频率的神经元, 直接操控神经元的活动。精确绘制神经连接及阐述行为背后的神经环路基础需要这种细胞类型特异的ChR2小鼠^[49]。此外, 启动子-ChR2后接所需的荧光蛋白可标识释放不同递质的神经元群。例如, 接GFP则转染细胞在荧光镜下呈现绿色, Cherry在荧光镜下呈现樱桃红色, YFP在荧光镜下则呈现黄色。

此外, 基于光遗传学技术的发展, 在精神疾病, 诸如自闭症、成瘾症、焦虑等研究领域的模型中对

某一特定细胞类型或神经通路进行精确的在体功能调控得以实现,为更深入地研究疾病的病理模式提供了技术条件。Tye等^[51]将ChR2特异性表达在基底侧杏仁核(BLA)至中央杏仁核(CeA)的神经通路,研究小鼠焦虑样行为的神经机制。给予光照刺激激活ChR2会产生急性的抗焦虑效应;反之,在相同通路上表达抑制性光敏感蛋白eNpHR并给予光照刺激,焦虑样行为加重。此外,Alilain等^[52]将ChR2转入颈部脊髓损伤动物的膈神经及其周围神经元细胞内,在光照诱导下可以恢复呼吸运动。Tomita等^[43]利用腺相关病毒将ChR2表达于遗传性视杆细胞、视锥细胞变性小鼠视网膜内层神经细胞后,在给予460 nm闪光刺激后记录到视觉诱发电位(VEP)波形,但是在给予580 nm的闪光刺激后记录不到VEP,证实将ChR2转入原先不能感光的视网膜内层细胞后,光信号编码转变成电信号传入视皮层,并引起视觉高级中枢的响应,但是,Thyaqarajan等^[42]将视网膜退变的小鼠(Pde6b)与以Thy1作为启动子在神经节细胞表达ChR2的序列杂交,结果并未发现这些转基因小鼠较视网膜退变小鼠表现出更好的视觉功能。

4 有临床转化潜力的研究进展

4.1 神经网络连接研究

Arenkiel等^[21]首次报道了在中枢神经系统表达ChR2-YFP融合蛋白的转基因小鼠上进行在体光刺激,并同时绘制神经环路。他们对麻醉后小鼠的嗅球和梨状皮层区域进行研究,发现嗅球可以被光刺激诱发出单个僧帽细胞的动作电位,并且其他共激活的嗅小球(co-stimulated glomeruli)不会影响它的发放频率。然而,在梨状皮层,靶区域的神经元活动随着更大范围嗅小球被激活而增加。这一结果进一步证明了嗅觉处理是依赖于僧帽细胞汇聚并整合至皮层细胞的模式。同时,这一经典工作展示了两个优势:(1)在体精确调控哺乳类动物大脑皮层神经活动可通过光遗传学方法实现;(2)完整大脑内探索复杂神经环路的功能连接可使用表达ChR2的小鼠。Choi等^[53]将ChR2特异地表达在小鼠梨状皮层,对小鼠进行行为学方面的研究,发现这些小鼠梨状皮层中的神经元集合在受到光遗传学随机刺激之后,其可重复产生相同的厌恶或欲求行为,证明同源神经元集合产生的兴奋在小鼠梨状皮层中可使其产生不同类型的已习得行为。

Cre诱导形成的ChR2转基因鼠或者病毒载体

表达ChR2,结合能够表达跨突触传递的示踪物质的病毒载体,使得光遗传学可用来研究特定的细胞类型和神经环路,如植物凝集素中的麦胚凝集素(WGA)可以在突触后目标神经元进行逆行/顺行往复运动。这种物质可以应用到各种研究特定环路的方法中^[54]。Cheng等^[55]利用病毒载体将CamKII-ChR2注入丘脑的特定细胞内,使其激活时表达ChR2,结合示踪技术能够显示神经投射的特点,研究丘脑特定细胞激活后运动前区皮质神经元等的激活情况,以了解固有神经环路的功能联系。对于丘脑和皮质之间未知投射关系的深部核团,可将逆行示踪剂WGA-Cre和Cre-dependent ChR2分别注入皮质和丘脑内的特定神经元,利用光遗传技术研究两者之间的功能联系。

4.2 特异性新皮质定位研究

神经科学领域的研究者一直在寻找能够特异性定位新皮质皮层的方法。如今,利用皮层特异性的由Cre启动表达的蛋白技术或者子宫内电穿孔法(in utero electroporation, IUE)可以实现这一目的。多个实验室利用行为学模型和神经网络拓扑模型已经成功梳理出皮层特异性神经元的作用^[56]。光遗传学工具可以很好地被利用到子宫电穿孔处理小鼠胚胎的过程中^[57]。子宫内电穿孔法可以在胚胎发育的特定时期将DNA转入神经元以标记特异性的皮质皮层。同病毒转染相比,IUE转基因小鼠的主要优势在于视蛋白在出生时就已经表达,这使得在较早发育时期就能获得准确的脑部切片,以研究特定皮层的功能发育^[58]。不过,缺点是转基因小鼠通常表达较低水平的视蛋白,原因可能是基因复制的数量下降。

5 展望

视紫红质通道蛋白在光遗传学领域日益成为一个被广泛应用的重要工具,尤其是在神经科学研究领域中更是突出。然而,它自身也存在着一些不足之处,主要表现为通透离子的电导率仍不高,并且非常容易失活。一些生物学研究因为通道视紫红质蛋白的这些特点而不能开展。另外,天然的视紫红质通道蛋白的吸收光通常都不会超过520 nm,必须对通道视紫红质蛋白进行进一步的改造和优化,才能对大脑这一类具有高光散射性质的深层结构进行在体深入研究^[59]。

通过对视紫红质通道蛋白进行改造可以获得更高性能的通道,从而扩大了它们在光遗传学领域里的应用范围。这些改造有:新视紫红质通道蛋白的

基因组发掘技术、不同视紫红质通道蛋白之间的结构域调换技术、定点突变技术, 以及视紫红质通道蛋白 N 末端及 C 末端修饰技术。这些技术的实现能够让通道视紫红质拥有以下新特性: (1) 改变视紫红质通道蛋白的吸收光谱, 因为光敏感度属于视黄醛分子的内在特性, 需要对现有视紫红质蛋白中与视黄醇结合的区域进行改造; (2) 提高通道电导率, 改善易失活的特性, 包括增强蛋白对阳离子的转导效率、延长通道开放时间和提高蛋白表达水平。改变视紫红质蛋白吸收光谱的同时又不影响它的功能是技术难点, 例如通道蛋白的稳定性、动力学特性和蛋白的离子转运效率等。Yawo 实验室报道构建了 ChR1 蛋白与 ChR2 蛋白的杂合体蛋白 ChRGR, 并与 Deisseroth 研究组合作获得了 VChR1 蛋白与 ChR1 蛋白的杂合体 C1V1 蛋白^[60]。然而, 对于通道视紫红质蛋白的吸光光谱受哪些因素的影响还不太了解, 因此, 下一轮吸收光谱改造工作的首选也许是 C1V1 和 ChRGR 这两种杂合蛋白。

借由不同种类的嗜神经工具病毒或其组合和 Cre-loxp 等系统, 光敏感蛋白还可以顺向或逆向表达在靶神经元下游或上游的神经元胞体, 因此, 光遗传学技术又具有细胞空间投射的特异性, 这对于神经环路中各脑区特定细胞群的调控具有无与伦比的精确性。工具病毒与光遗传学的结合可以实现光遗传的细胞选择性表达以及神经网络上的选择性表达。目前常用的方法基于 Cre/DIO、Flp/Fdio 等元件, 或者细胞特异性启动子, 利用工具病毒载体注射特定的转基因动物, 即可实现对特定类型神经元的选择性光遗传或化学遗传调控。而对于更进一步的需求, 例如只需要激活或抑制特异细胞类群的亚类等, 也可结合 Cre 和 Flp 转基因动物, 构建 Cre-ON/Flp-ON、Cre-ON/Flp-OFF 等工具病毒元件, 实现对特定类型神经元亚类等选择性光遗传或化学遗传调控。此过程通常利用 AAV、HSV、LV 等实现, 而光遗传技术和各种工具病毒的联合亦是将来研究的一个重要的方向。

除了进行神经调控, 通过基因改造研发新型的钙离子、pH 值、电压等敏感的荧光蛋白基因, 共同导入到大脑执行特定功能区域中的某几类神经细胞中, 在大脑执行感知觉任务的同时, 可视化地调控和记录细胞亚群的反应, 然后让细胞将这种反应进行重现, 从而明确这一类细胞对生物个体行为的功能性作用, 这也是光遗传学发展的一个新的方向。

此外, 在刺激 ChR2 时可能会发生相对更大的

细胞内钙离子浓度的瞬间变化, 从而引起神经递质释放与神经环路内的可塑性变化, 这点在设计光遗传学实验时需要注意^[61]。同时, 神经的功能和其生存能力可能会受到 ChR2 过度表达的影响^[62]。

6 结语

综上所述, ChR2 对于神经科学领域来说是具有划时代意义的, 它所带来的是革命性的变化。Nature Method 也把以它为代表的光遗传学实至名归地评选为 2010 年度方法学明星。目前, 部分将表达光感蛋白的灭活病毒基因注射入人类大脑的临床试验已经得到美国 FDA 批准。对此, 有理由相信, 与 ChR2 相关的技术手段, 结合双光子激光扫描显微镜、在体光纤以及基于受体-配体偶联或化学阻断突触传递的异质性刺激方法, 必定能够对神经系统的整体连接和功能的在体研究产生更为深远的影响。

[参考文献]

- [1] Zemelman BV, Lee GA, Ng M, et al. Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron*, 2002, 33: 15-22
- [2] Zemelman BV, Nesnas N, Lee GA, et al. Photochemical gating of heterologous ion channels: remote control over genetically designated populations of neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 1352-7
- [3] Liedtke W, Tobin DM, Bargmann CI, et al. Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 14531-6
- [4] Lima MG. Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons. *Cell*, 2005, 121: 141-52
- [5] Nagel G, Brauner M, Liewald JF, et al. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol*, 2005, 15: 2279-84
- [6] Jiang S, Liu YF, Wang XM, et al. Automated, highly reproducible, wide-field, light-based cortical mapping method using a commercial stereo microscope and its applications. *Biomed Opt Express*, 2016, 7: 3478-90
- [7] Klapper SD, Swiersy A, Bamberg E, et al. Biophysical properties of optogenetic tools and their application for vision restoration approaches. *Front Syst Neurosci*, 2016, 10: 74
- [8] Roe AW, Chernov MM, Friedman RM, et al. *In vivo* mapping of cortical columnar networks in the monkey with focal electrical and optical stimulation. *Front Neuroanat*, 2015, 9: 135
- [9] Chen BE, Lendvai B, Nimchinsky EA, et al. Imaging high-resolution structure of GFP-expressing neurons in neocortex *in vivo*. *Learn Memory*, 2000, 7: 433-41

- [10] Song CK, Enquist LW, Bartness TJ, et al. New development in tracing neural circuits with herpesviruses. *Virus Res*, 2005, 111: 235-49
- [11] Maskos U, Kissa K, St Cloment C, et al. Retrograde trans-synaptic transfer of green fluorescent protein allows the genetic mapping of neuronal circuits in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 120-5
- [12] Deuschl G, Herzog J, Kleiner-Fisman G, et al. Deep brain stimulation: postoperative issues. *Mov Disord*, 2006, 21 Suppl 14: S219-37
- [13] Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 2005, 8: 1263-8
- [14] Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, et al. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *Neurosci*, 2006, 26: 380-6
- [15] Nagel G, Szellas T, Huhn W, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3940-5
- [16] Nagel G, Brauner M, Liewald JF, et al. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol*, 2005, 15: 2279-84
- [17] Zhang Y, Oertner TG. Optical induction of synaptic plasticity using a light-sensitive channel. *Nat Methods*, 2007, 2: 139-41
- [18] Nagel G, Szellas T, Kateriya S, et al. Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33: 863-6
- [19] Zhang F, Wang LP, Boyden ES, et al. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods*, 2006, 3: 785-92
- [20] Lin JY. A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Exp Physiol*, 2011, 96: 19-25
- [21] Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, et al. *In vivo* light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron*, 2007, 54: 205-18
- [22] Petreanu L, Huber D, Sobczyk A, et al. Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat Neurosci*, 2007, 10: 663-8
- [23] Hira R, Honkura N, Noguchi J, et al. Transcranial optogenetic stimulation for functional mapping of the motor cortex. *J Neurosci Methods*, 2009, 179: 258-63
- [24] Lin JY, Lin MZ, Steinbach P, et al. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys J*, 2009, 96: 1803-14
- [25] Berndt SP, Mattis J, Tye KM, et al. High-efficiency channelrhodopsin for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 7595-600
- [26] Kleinlogel FK, Dempski RE, Fotis H, et al. Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 513-8
- [27] Mateo C, Avermann M, Gentet LJ, et al. *In vivo* optogenetic stimulation of neocortical excitatory neurons drives brain-state-dependent inhibition. *Curr Biol*, 2011, 21: 1593-602
- [28] Desai KI, Knoblich U, Bernstein J, et al. Mapping brain networks in awake mice using combined optical neural control and fMRI. *Neurophysiol*, 2010, 105: 1393-405
- [29] Huber D, Petreanu L, Ghitani N, et al. Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature*, 2008, 451: 61-4
- [30] Poulet JF, Fernandez LM, Crochet S, et al. Thalamic control of cortical states. *Nat Neurosci*, 2012, 15: 370-2
- [31] Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. The development and application of optogenetics. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34: 389-412
- [32] Diester I, Kaufman MT, Mogri M, et al. An optogenetic toolbox designed for primates. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 387-97
- [33] Glock C, Nagpal J, Gottschalk A. Microbial rhodopsin optogenetic tools: application for analyses of synaptic transmission and of neuronal network activity in behavior. *Methods Mol Biol*, 2015, 1327: 87-103
- [34] Neafsey BE, Haas G, Hurley-Gius KM, et al. The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res*, 1986, 396: 77-96
- [35] Ayling OG, Harrison TC, Boyd JD, et al. Automated light-based mapping of motor cortex by photoactivation of channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Nat Methods*, 2009, 6: 219-24
- [36] Tehovnik EJ. Electrical stimulation of neural tissue to evoke behavioral responses. *J Neurosci Methods*, 1996, 65: 1-17
- [37] Griffin DM, Hudson HM, Belhaj-Saif A, et al. Hijacking cortical motor output with repetitive microstimulation. *JNeuroscience*, 2011, 31: 13088-96
- [38] Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, et al. Long-term *in vivo* imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, 2002, 420: 788-94
- [39] Harrison TC, Ayling OG, Murphy TH. Distinct cortical circuit mechanisms for complex forelimb movement and motor map topography. *Neuron*, 2012, 74: 397-409
- [40] Erchova IA, Lebedev MA, Diamond ME. Somatosensory cortical neuronal population activity across states of anaesthesia. *Eur J Neurosci*, 2002, 15: 744-52
- [41] Zhang PM, Beyriere F, Tsunoda SP, et al. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat Neurosci*, 2008, 11: 631-3
- [42] Thyagarajan S, van Wyk M, Lehmann K, et al. Visual function in mice with photoreceptor degeneration and transgenic expression of channelrhodopsin 2 in ganglion cells. *J Neurosci*, 2010, 30: 8745-58
- [43] Tomita H, Sugano E, Fukazawa Y, et al. Visual properties of transgenic rats harboring the channelrhodopsin-2 gene regulated by the thy-1.2 promoter. *PLoS One*, 2009, 4: e7679
- [44] Jazayeri M, Lindbloom-Brown Z, Horwitz GD. Saccadic eye movements evoked by optogenetic activation of primate V1. *Nat Neurosci*, 2012, 15: 1368-70
- [45] Komiyama T, Sato TR, O'Connor DH, et al. Learning-related fine-scale specificity imaged in motor cortex circuits

- of behaving mice. *Nature*, 2010, 464: 1182-6
- [46] Madisen L, Mao T, Koch H, et al. A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat Neurosci*, 2012, 15: 793-802
- [47] Dancause N, Nudo RJ. Shaping plasticity to enhance recovery after injury. *Prog Brain Res*, 2011, 192: 273-95
- [48] Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, et al. Optogenetics in neural systems. *Neuron*, 2011, 71: 9-34
- [49] Zhao S, Ting JT, Atallah HE et al. Cell-type specific optogenetic mice for dissecting neural circuitry function. *Nat Methods*, 2011, 8: 745-52
- [50] Gourine AV, Kasymov V, Marina N, et al. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science*, 2010, 329: 571-5
- [51] Tye KM, Prakash R, Kim SY, et al. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, 2011, 471: 358-62
- [52] Alilain WJ, Li X, Horn KP, et al. Light-induced rescue of breathing after spinal cord injury. *J Neurosci*, 2008, 28: 11862-70
- [53] Choi GB, Stettler DD, Kallman BR, et al. Driving opposing behaviors with ensembles of piriform neurons. *Cell*, 2011, 146: 1004-15
- [54] Gompf HS, Budygin EA, Fuller PM, et al. Targeted genetic manipulations of neuronal subtypes using promoter-specific combinatorial AAVs in wild-type animals. *Front Behav Neurosci*, 2015, 9: 152
- [55] Cheng MY, Aswendt M, Steinberg GK. Optogenetic approaches to target specific neural circuits in post-stroke recovery. *Neurotherapeutics*, 2016, 13: 325-34
- [56] Kramer RH, Mourot A, Adesnik H. Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 816-23
- [57] Cardin JA, Carlen M, Meletis K, et al. Targeted optogenetic stimulation and recording of neurons *in vivo* using cell-type-specific expression of Channelrhodopsin-2. *Nat Protoc*, 2010, 5: 247-54
- [58] Naka A, Adesnik H. Inhibitory circuits in cortical layer 5. *Front Neural Circuits*, 2016, 10: 35
- [59] Flusberg JJ, Cocker ED, Anderson EP, et al. *In vivo* brain imaging using a portable 3.9 gram two-photon fluorescence microendoscope. *Opt Lett*, 2005, 30: 2272-4
- [60] Wen L, Wang H, Tanimoto S, et al. Opto-current-clamp actuation of cortical neurons using a strategically designed channelrhodopsin. *PLoS One*, 2010, 5: e12893
- [61] Schoenenberger P, Scharer YP, Oertner TG. Channelrhodopsin as a tool to investigate synaptic transmission and plasticity. *Exp Physiol*, 2011, 96: 34-9
- [62] Miyashita T, Shao YR, Chung J, et al. Long-term channelrhodopsin-2 (ChR2) expression can induce abnormal axonal morphology and targeting in cerebral cortex. *Front Neural Circuits*, 2013, 7: 8