

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491492 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.30

(51) Int. Cl. C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61N 5/06 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.12.20

(54) СВЕРХСВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ИНСТРУМЕНТ НА
ОСНОВЕ НЕЙРОПСИНА ДЛЯ АКТИВАЦИИ G_q-СВЯЗАННОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ
И/ИЛИ АКТИВАЦИИ КЛЕТОК

(31) PCT/CN2021/139751

(32) 2021.12.20

(33) CN

(86) PCT/CN2022/140440

(87) WO 2023/116720 2023.06.29

(71) Заявитель:
ГЕНАНС БАЙОТЕКНОЛОДЖИ КО.,
ЛТД (CN)

(72) Изобретатель:

Юй Тао, Дай Жуйчэн, Вэн Даньвэй,
Ло Миньминь (CN)

(74) Представитель:

Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к выделенному светочувствительному опсину для быстрой, обратимой и точной активации G_q-сигнализации и/или активации клеток.

202491492
A1

202491492
A1

СВЕРХСВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ИНСТРУМЕНТ НА
ОСНОВЕ НЕЙРОПСИНА ДЛЯ АКТИВАЦИИ G_q -СВЯЗАННОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ
И/ИЛИ АКТИВАЦИИ КЛЕТОК

[001] Введение

[002] Рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), модулируют многие внутриклеточные сигнальные пути и представляют собой некоторые из наиболее интенсивно изученных мишеней для лекарственных средств (Hauser et al., 2017). При связывании лиганда GPCR претерпевает конформационное изменение, которое передается гетеротримерным G-белкам, которые представляют собой мультисубъединичные комплексы, содержащие G_α и тесно связанные $G_{\beta\gamma}$ субъединицы. Белки G_q , подсемейство гетеротримерных субъединиц G_α , связываются с классом GPCR для опосредования клеточных ответов на нейротрансмиттеры, сенсорные стимулы и гормоны по всему организму. Их первичные мишени для нисходящей сигнализации включают ферменты фосфолипазы C бета (PLC- β), которые катализируют гидролиз фосфолипидного фосфатидилинозитол бисфосфата (PIP_2) в инозитолтрисфосфат (IP_3) и диацилглицерин (DAG). IP_3 запускает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ в цитоплазму, и Ca^{2+} вместе с DAG активируют протеинкиназу C (PKC). Для изучения механизмов сигнализации и физиологических функций G_q -связанных GPCR и высвобождения внутриклеточного Ca^{2+} было разработано несколько инструментов, включая хемогенетику и фотоактивируемые малые молекулы.

[003] Оптогенетика использует светочувствительные белки для обеспечения оптически контролируемого нарушения клеточной активности с генетической специфичностью и высокой пространственно-временной точностью. С момента ранних открытий оптогенетических инструментов с использованием светочувствительных ионных каналов и транспортеров были разработаны различные технологии, которые в настоящее время содействуют оптическим вмешательствам во внутриклеточные вторичные мессенджеры, взаимодействия и деградацию белков и транскрипцию генов. Opto- $\alpha 1AR$, оригинально разработанная химера G_q -связанный родопсин-GPCR, может индуцировать увеличение внутриклеточного Ca^{2+} в ответ на длительную фотостимуляцию (60 с) (Airan et al., 2009). Однако этот инструмент широко не использовался, возможно, из-за его ограничений, связанных со светочувствительностью и кинетикой ответа (Tichy et al., 2019). Большинство животных улавливают свет с помощью фоторецепторов на основе GPCR, которые содержат как белковый фрагмент (опсин), так и производное витамина А (ретиаль), которое функционирует и как лиганд, и как хромофор. На

сегодняшний день выявлено несколько тысяч опсинов. Два недавних исследования, в которых сообщалось об опсинах на основе G_i комаров и миног для ингибирования пресинаптических терминалов в нейронах, изящно продемонстрировали, что некоторые существующие в природе фоторецепторы пригодны для использования в качестве эффективных оптогенетических инструментов. Что касается G_q -сигнализации, меланопсин (Orn4) в подгруппе ганглиозных клеток сетчатки млекопитающих представляет собой G_q -связанный опсин, который опосредует визуальные функции, не формирующие изображения. Однако клетки HEK293 или Neuro-2a, гетерологично экспрессирующие Orn4, демонстрировали слабые ответы на свет и требовали присутствия дополнительного ретиналя в среде для культивирования. Сообщалось, что Orn5 (нейропсин) и его ортологи у многих позвоночных животных представляет собой чувствительный к ультрафиолету (УФ) опсин, который связывается с белками G_i .

[004] Краткое описание изобретения

[005] Настоящее изобретение относится к выделенному светочувствительному опсину для быстрой, обратимой и точной активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

[006] В первом аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному светочувствительному опсину для активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

[007] В некоторых вариантах осуществления свет имеет длину волны в диапазоне от 360 до 520 нм, предпочтительно от 450 до 500, более предпочтительно от 460 до 480 нм.

[008] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин представляет собой выделенный опсин организма, его гомологи, его ортологи, его паралоги, их фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

[009] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с опсином дикого типа указанного организма, его гомологами, его ортологами, его паралогами, их фрагментами или вариантами и имеет активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

[010] В некоторых вариантах осуществления организм представляет собой животное.

[011] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин представляет собой выделенный опсин 5 (Orn5) животного, его гомологи, его ортологи, его паралоги, их фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении активации G_q -

сигнализации и/или активации клеток.

[012] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Orn5) имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с опсином 5 (Orn5) дикого типа указанного животного, его гомологами, его ортологами, его паралогами, их фрагментами или вариантами и имеет активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

[013] В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой позвоночное животное.

[014] В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой птицу, рептилию или рыбу, амфибию или млекопитающее.

[015] В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой птицу, включая, но не ограничиваясь, курицу, утку, гуся, страуса, эму, нанду, киви, казуара, индейку, перепела, курицу, сокола, орла, ястреба, голубя, попугайчика, какаду, макао, попугая, птицу из отряда воробьинообразных (такую как, певчая птица), сойку, черного дрозда, вьюрка, певуна и воробья.

[016] В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой рептилию, включая, но не ограничиваясь, ящерицу, змею, аллигатора, черепаху, крокодила и сухопутную черепаху.

[017] В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой рыбу, включая, но не ограничиваясь, сома, угрей, акул и рыбу-меч.

[018] В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой амфибию, включая, но не ограничиваясь, жабу, лягушку, тритона и саламандру.

[019] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Orn5) представляет собой выделенный опсин 5 (Orn5) дикого типа курицы или его фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

[020] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Orn5) имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с опсином 5 (Orn5) дикого типа курицы и имеет активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

[021] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Orn5) представляет собой выделенный опсин 5 (Orn5) дикого типа черепахи или его фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или

активации клеток.

[022] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Opn5) имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с опсином 5 (Opn5) дикого типа черепахи и имеет активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

[023] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Opn5) имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:1 (сOpn5), или ее фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

[024] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Opn5) имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:1 (сOpn5), и имеет активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

[025] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Opn5) имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:2 (tOpn5), или ее фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

[026] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Opn5) имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:2 (tOpn5), и имеет активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

[027] Выделенный опсин 5 (Opn5) может быть использован в качестве удобного оптогенетического инструмента, который точно активирует внутриклеточную G_q -сигнализацию и/или активацию клеток.

[028] Во втором аспекте, настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей выделенный опсин согласно первому аспекту.

[029] В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует опсин дикого типа организма, его гомологи, его ортологи, его паралоги, их фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

[030] В третьем аспекте, настоящее изобретение относится к химерному гену, содержащему последовательность выделенной нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту, функционально связанную с подходящими регуляторными последовательностями.

[031] В четвертом аспекте, настоящее изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту согласно второму аспекту или химерный ген согласно третьему аспекту.

[032] Вектор представляет собой эукариотический вектор, прокариотический вектор экспрессии, вирусный вектор или дрожжевой вектор.

[033] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор вируса простого герпеса, вектор вируса осповакцины или аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор, ретровирусный вектор или вектор насекомых.

[034] Предпочтительно, вектор представляет собой рекомбинантный AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVS, AAVO или AAV10.

[035] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии.

[036] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор для генной терапии.

[037] В пятом аспекте, настоящее изобретение относится к выделенной клетке или клеточной культуре, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту согласно второму аспекту, химерный ген согласно третьему аспекту или вектор согласно четвертому аспекту.

[038] В качестве примера, экспрессия cOrn5 в клетках НЕК-293Т эффективно опосредует вызванное синим светом G_q -зависимое увеличение Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ.

[039] В качестве примера, оптогенетическая активация астроцитов, экспрессирующих cOrn5, индуцирует массивное высвобождение аденозинтрифосфата (АТФ) в мозге мыши.

[040] В шестом аспекте, настоящее изобретение относится к применению выделенного опсина согласно первому аспекту, выделенной нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту, химерного гена согласно третьему аспекту, вектора согласно четвертому аспекту или выделенной клетки или клеточной культуры согласно пятому аспекту для лечения заболевания или состояния, опосредованного активацией G_q -сигнализации и/или активацией клеток или сопряженного с ними.

[041] Оптогенетика, опосредованная cOrn5, может быть применена для

активации нейронов и контроля поведения животных в зависимости от нейронной цепи.

[042] В седьмом аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, опосредованного активацией G_q -сигнализации и/или активацией клеток или сопряженного с ними, у субъекта, включающему введение выделенного опсина согласно первому аспекту, выделенной нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту, химерного гена согласно третьему аспекту, вектора согласно четвертому аспекту или выделенной клетки или клеточной культуры согласно пятому аспекту.

[043] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние, опосредованное активацией G_q -сигнализации и/или активацией клеток или сопряженное с ними, включает, но не ограничивается, заболевания или состояния, на которые оказывает благоприятное действие активация G_q -сигнализации и/или активация клеток, например, на которые оказывает благоприятное действие активация астроцитов, сильное высвобождение АТР или повышение активности нейронов.

[044] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние, опосредованное активацией G_q -сигнализации и/или активацией клеток или сопряженное с ними, включает, но не ограничивается, заболевания или состояния, на которые оказывает благоприятное действие активация клеток, таких как островковые клетки, иммунные клетки, нервные клетки, например, центральные нейроны, астроциты, глиальные клетки, мышечные клетки, скелетные клетки, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки, клетки нервной системы, клетки кожи, клетки легких, клетки почек и клетки печени, клетки сердца или сосудистые эндотелиальные клетки.

[045] В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние включает, но не ограничивается, диабет, иммуносупрессивное заболевание, болезнь Альцгеймера, депрессию, невроз тревожности, кровоизлияние в мозг и так далее.

[046] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает применение синего света, имеющего длину волны в диапазоне от 360 до 520 нм, предпочтительно от 450 до 500, более предпочтительно от 460 до 480 нм.

[047] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает применение двухфотонной активации с использованием длинноволнового (920 нм или более) света.

[048] Выделенный опсин согласно настоящему изобретению чувствителен к свету, имеющему длину волны в диапазоне от 360 до 550 нм, предпочтительно от 450 до 500, более предпочтительно от 460 до 480 нм. В частности, синий свет с длиной волны 470 нм вызывает самые сильные скачки концентрации Ca^{2+} в клетках, что означает, что

выделенный опсин согласно настоящему изобретению является сверхчувствительным к свету с длиной волны 470 нм.

[049] Изобретение охватывает все комбинации конкретных вариантов осуществления, приведенных в настоящем документе.

[050] Краткое описание графических материалов

[051] На фиг. 1 показано, что сOrn5 опосредует индуцированную светом сильную активацию G_q -сигнализации в клетках НЕК 293Т.

[052] На фиг. 2 показано, что сOrn5 связан с G_q -сигнализацией, но не с G_i -сигнализацией.

[053] На фиг. 3 показано, что сOrn5 чувствительно опосредует оптический контроль G_q -сигнализации с высоким временным и пространственным разрешением.

[054] На фиг. 4 показано, что сOrn5 опосредует более быстрый и чувствительный ответ на свет, чем орто-a1AR, hM3Dq или orn4.

[055] На фиг. 5 показано, что сOrn5 эффективно опосредует активацию астроцитов.

[056] На фиг. 6 показано, что сOrn5-опосредованная активация астроцитов индуцирует массивные вспышки АТФ и активацию нейронов *in vivo*.

[057] На фиг. 7 показано, что сOrn5 опосредует стойкое, надежное высвобождение АТФ в астроцитах и активацию окружающих нейронов.

[058] На фиг. 8 показано, что оптогенетика, опосредованная сOrn5, изменяет поведение мыши в зависимости от нейронной цепи.

[059] На фиг. 9 показано, что оптогенетика, опосредованная сOrn5, надежно активизирует нейроны.

[060] На фиг. 10 показаны места инъекции и размещение оптических волокон.

[061] Описание конкретных вариантов осуществления изобретения

[062] В настоящем изобретении тестировали способность опсина, в частности ортологов Orn5 нескольких видов, и было обнаружено, что многие опсины чувствительно и сильно опосредовали светоиндуцированную активацию G_q -сигнализации и/или активацию клеток.

[063] Предпочтительно ортологи Orn5 представляют собой ортолог курицы (сOrn5 для простоты) или ортолог черепахи (tOrn5 для простоты).

[064] Подробные характеристики Orn5, в частности сOrn5, показывают, что он обладает сверхчувствительностью к синему свету (уровень мкВт/мм², приблизительно на 3 порядка более чувствителен, чем существующие инструменты на основе опсина, связанного с G_q : орто-a1AR и orn4), высоким временным (в ответ на световые импульсы

10 мс, приблизительно на 3 порядка быстрее, чем opto-a1AR или орn4) и пространственным (субклеточный уровень) разрешением, и не требует добавления хромофора. В частности, эндогенный ретиналь является достаточным, и добавление ретиналя не требуется.

[065] Настоящее изобретение дополнительно показывает сOrn5-оптогенетику в качестве высокоэффективного подхода для активации астроцитов для индуцирования массивного высвобождения АТФ *in vivo*, а также для активации нейронов для обеспечения устойчивых изменений поведения у свободно движущихся мышей. Эти результаты показывают, что сOrn5 и потенциально другие ортологи Orn5 могут быть использованы в качестве эффективных оптогенетических инструментов для содействия экспериментальным исследованиям физиологических и поведенческих функций, связанных с G_q-сигнализацией и/или активацией клеток, как в невозбудимых клетках, так и в возбудимых клетках.

[066] сOrn5 опосредует оптогенетическую активацию G_q-сигнализации и/или активацию клеток.

[067] В частности, в настоящем изобретении ортологи Orn5 курицы, черепах, людей и мышей (которые имеют 80-90% идентичность белковой последовательности друг с другом) тестировали, чтобы определить, обладают ли они способностью опосредовать индуцированную синим светом активацию G_q-сигнализации в клетках НЕК 293Т. Для контроля относительного ответа Ca²⁺ использовали синий свет для стимуляции и красный внутриклеточный кальциевый индикатор CalbryteTM 630 AM. Было установлено, что ортологи Orn5 курицы (сOrn5) и черепахи (tOrn5) опосредуют немедленное и сильное светоиндуцированное увеличение сигнала Ca²⁺ (приблизительно 3 ΔF/F), тогда как световой эффект от клеток, экспрессирующих ортологи Orn5 человека или мыши, не наблюдается. Как показано на примере куриного ортолога, сOrn5 совместно локализовался с мембранным маркером EGFP-CAAX, что указывает на то, что он эффективно транспортируется к плазматической мембране. В среду для культивирования не нужно добавлять экзогенный ретиналь, что позволяет предположить, что эндогенный ретиналь является достаточным для обеспечения функциональности сOrn5. Сигналы Ca²⁺ являются устойчивыми к удалению внеклеточного Ca²⁺, что указывает на высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных хранилищ. Предварительная инкубация с ингибитором белков G_q, например, с YM-254890, высокоселективным ингибитором белков G_q, обратимо устраняла индуцированные светом скачки концентрации Ca²⁺ в обеих сOrn5-экспрессирующих клетках. В клетках, экспрессирующих сOrn5, но не в клетках, экспрессирующих OPN5 человека, наблюдалось светоиндуцированное увеличение уровня

инозитолфосфата (IP_1), продукта быстрой деградации IP_3 ; более того, степень такого увеличения уменьшалась при обработке YM-254890. В клетках, экспрессирующих cOrn5, например, клетках НЕК 293Т, синий свет также запускал фосфорилирование белка MARCKS, хорошо известной мишени PKC, в зависимости от активности PKC. В противоположность этому, освещение синим светом эффективно снижало уровни цАМФ (циклический аденозинмонофосфат) в клетках, экспрессирующих Orn5 человека и мыши, с ретиналем, но не оказывало такого эффекта в клетках, экспрессирующих cOrn5, без ретиналя. В совокупности эти данные подтверждают, что освещение синим светом обеспечивает связь cOrn5 с G_q -сигнализацией в клетках НЕК 293Т.

[068] Оптогенетика, опосредованная cOrn5, является чувствительной и точной.

[069] В частности, в настоящем изобретении были охарактеризованы активирующиеся светом свойства cOrn5. cOrn5 может гетерологично экспрессироваться в клетках, например, в клетках НЕК 293Т. Хотя Orn5 ранее рассматривался как чувствительный к ультрафиолету (УФ) фоторецептор, сопоставление с набором длин волн в диапазоне от 365 до 630 нм при фиксированной интенсивности света (100 мкВт/мм^2) показало, что синий свет 470 нм вызывает самые сильные скачки концентрации Ca^{2+} , при этом УФА свет (365 и 395 нм) является менее эффективным, а видимый свет с большей длиной волны (561 нм или более) является полностью неэффективным. Тестировали влияние различной продолжительности света на клетки НЕК 293Т, экспрессирующие cOrn5, и стимулирование короткими световыми импульсами (1, 5, 10, 20, 50 мс; 16 мкВт/мм^2 ; 470 нм) показало, что ответ Ca^{2+} достигает режима насыщения при продолжительности света более 10 мс. Более длительные значения продолжительности света дополнительно не увеличивают амплитуду сигнала Ca^{2+} при этой интенсивности света (16 мкВт/мм^2 ; 470 нм). Подача света 470 нм с различной интенсивностью показала, что синий свет приблизительно $4,8 \text{ мкВт/мм}^2$ и 16 мкВт/мм^2 дает приблизительно половину максимального и полный максимальный ответы, соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что светочувствительность cOrn5 на 2-3 порядка выше, чем зарегистрированные значения обычно используемого оптогенетического инструмента Channelrhodopsin-2 (ChR2, каналный родопсин 2). Вместе результаты настоящего изобретения показали, что cOrn5 может функционировать как однокомпонентный оптогенетический инструмент без дополнительного ретиналя и что cOrn5 является сверхчувствительным к синему свету с точки зрения его полной активации, требующей низкой интенсивности света (16 мкВт/мм^2) и короткой продолжительности (10 мс).

[070] Сравнивали производительность cOrn5 с производительностью opto-a1AR,

химерным GPCR, сконструированным путем смешивания родопсина с G_q -связанным адренергическим рецептором. В соответствии с протоколом согласно предыдущему отчету, было обнаружено, что очень длительное воздействие сильного освещения (60 с; 7 мВт/мм²) требуется для запуска медленного и небольшого (приблизительно 0,5 $\Delta F/F$) увеличения сигнала Ca^{2+} в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих opto-a1AR, и освещение 15 с является неэффективным. Сравнивали производительность cOrn5 с производительностью orn4, природного опсина, который, как сообщается, является инструментом для активации G_q -сигнализации. Было установлено, что длительное воздействие сильного освещения (25 с; 40 мВт/мм²) и дополнительный ретиналь требуются для запуска медленного (приблизительно 1 $\Delta F/F$) увеличения сигнала Ca^{2+} в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих orn4. Следовательно, по сравнению с существующими инструментами на основе опсина (opto-a1AR и orn4), cOrn5 намного более светочувствителен (приблизительно на 3 порядка более чувствителен), требует гораздо более короткого времени воздействия (10 мс по сравнению с 60 с) и обеспечивает более сильные ответы.

[071] Кроме того, сравнивали производительность cOrn5 с производительностью популярного G_q -связанного хомогенетического инструмента hM3Dq, который активируют путем добавления экзогенного низкомолекулярного лиганда клозапин-N-оксида (CNO). Светоиндуцированная активация клеток НЕК 293Т, экспрессирующих cOrn5, имеет аналогичную амплитуду пикового ответа сигнала Ca^{2+} , что и CNO-индуцированная активация клеток НЕК 293Т, экспрессирующих hM3Dq. Между тем, клетки НЕК 293Т, экспрессирующие cOrn5, имеют более быстрый и более точный по времени ответ, а также более быстрое время восстановления, чем клетки НЕК 293Т, экспрессирующие hM3Dq. Эти результаты указывают на то, что оптогенетика, опосредованная cOrn5, более контролируема с точки зрения временной точности, чем в случае hM3Dq.

[072] cOrn5-оптогенетика позволяет пространственно точно контролировать клеточную активность. Ограничение кратковременной световой стимуляции (63 мс) субклеточной областью отдельной клетки НЕК 293Т, экспрессирующей cOrn5, приводит к немедленной активации одной клетки. Интересно, что в области с высокой степенью слияния клеток сигналы Ca^{2+} распространяются на окружающие клетки, что позволяет предположить межклеточную коммуникацию между клетками НЕК 293Т через еще не идентифицированный механизм. cOrn5 экспрессируется в культурах первичных астроцитов, полученных из мозга новорожденных мышей, с векторами AAV для бицистронной экспрессии cOrn5 и маркерного белка EGFP. При использовании красителя Calbryte 630 AM для мониторинга уровней Ca^{2+} , было обнаружено, что освещение синим

светом астроцитов, экспрессирующих cOrn5, вызывает сильные скачки концентрации Ca^{2+} (приблизительно $8 \Delta F/F$). Когда световая стимуляция (63 мс) точно ограничена только субклеточной областью отдельного астроцита, экспрессирующего cOrn5, наблюдается распространение сигнала Ca^{2+} внутри отдельной клетки. Подобно тестированиям в клетках НЕК 293Т, наблюдалось волнообразное распространение сигналов Ca^{2+} от стимулированного астроцита, которые постепенно переходили в более удаленные, нестимулированные астроциты. Таким образом, эти эксперименты демонстрируют, что cOrn5-оптогенетика позволяет точно контролировать пространство, и предполагается, что может быть полезно изучить динамику астроцитарных сетей, которая была первоначально обнаружена при использовании нейрохимической и механической стимуляции.

[073] cOrn5-оптогенетическая активация астроцитов индуцирует массивное высвобождение АТР и активацию нейронов *in vivo*

[074] Тестировали производительность оптогенетики, опосредованной cOrn5, *in vivo*. Астроциты представляют собой важную популяцию невозбудимых клеток в центральной нервной системе, в отношении которых оптогенетические инструменты достигли на сегодняшний день только ограниченного успеха. АТР известен как мессенджер для межастроцитарной коммуникации; однако влияние внутриклеточного Ca^{2+} на высвобождение АТР в реальном времени не было визуализировано. Недавно зарегистрированный сверхчувствительный сенсор АТР на основе активации GPCR GRAB_{АТР} использовался для мониторинга изменений уровней внеклеточного АТР. В частности, cOrn5 и сенсор GRAB_{АТР} экспрессируются в сенсорной коре S1 мыши после инфузии векторов AAV, содержащих промотор GfaABC1D, который обычно используется для управления экспрессией генов в астроцитах.

[075] Осуществляли двухфотонную визуализацию сигналов GRAB_{АТР} от мышей, демонстрирующих нормальные поведенческие реакции и находящихся в состоянии бодрствования с фиксированной головой. Поразительно, что сам по себе свет 920 нм, подаваемый для осуществления визуализации, вызывает массивные вспышки АТР у мышей, экспрессирующих cOrn5 и GRAB_{АТР}, но не у мышей, которые экспрессируют сенсор АТР, но не экспрессируют cOrn5. Импульсы синего света не требуются для стимуляции сигналов АТР. Индивидуальные вспышки АТР обычно имеют диаметр от 20 до 100 мкм и длятся приблизительно 1 мин. Частота вспышек постепенно увеличивается после приблизительно 1 мин начального покоя и достигает пика на уровне приблизительно 50 вспышек в минуту в области визуализации (640×640 мкм²) за приблизительно 5 мин. Более того, высокочастотные вспышки АТР также происходили

при повторных испытаниях. У мышей, экспрессирующих только GRAB_{АТР}, наблюдаются спорадические АТР-события (приблизительно 0,3 вспышки в минуту в области визуализации); через восемь часов после провоспалительной обработки путем внутривбрюшинных инъекций липополисахарида (LPS) количество событий АТР-вспышки увеличивалось почти в 6 раз относительно основного состояния (приблизительно 2 вспышки в минуту), но демонстрировало довольно стабильную частоту, что подтверждало, что воспаление индуцирует высвобождение АТР в мозге. Учитывая, что наблюдаемая частота вспышек АТР у мышей, экспрессирующих сOrn5, была приблизительно в 25 раз больше, чем при провоспалительной обработке мышей, не экспрессирующих сOrn5, было продемонстрировано, что сOrn5-опосредованная световая активация астроцитов индуцирует непрерывное массивное высвобождение АТР и *in vivo*.

[076] Астроциты высвобождают АТР и другие глутрансмиттеры, которые также действуют на нейронные рецепторы для модуляции активности нейронов. Выполняли двухфотонную визуализацию нейрональных сигналов Ca²⁺ с сOrn5-опосредованной активацией астроцитов у мышей, демонстрирующих нормальные поведенческие реакции и находящихся в состоянии бодрствования с фиксированной головой. Клетки, экспрессирующие сOrn5 (n=406), совместно локализуются с GFAP-окрашенными клетками (n=397), но не с GCaMP7b-экспрессирующими нейронами. Примеры необработанных данных и сгруппированные данные показывают, что, при сравнении 15-20 минут и 0-5 минут, сOrn5-опосредованная активация астроцитов значительно повышает активность нейронов. сOrn5 строго экспрессируется в астроцитах, что демонстрируется совместной локализацией клеток, экспрессирующих сOrn5, и сигналов окрашивания GFAP, которые отличаются от сигналов GCaMP7b нейронов. Было продемонстрировано, что сOrn5-опосредованная световая активация астроцитов повышает активность окружающих нейронов *in vivo*. Более того, в настоящем изобретении было продемонстрировано, что длинноволновый (920 нм) свет от импульсного лазера для двухфотонной визуализации способен активировать сOrn5, что указывает на возможность двухфотонной оптогенетики для сOrn5.

[077] сOrn5-оптогенетика активирует нейроны и модулирует поведение животных.

[078] Исследовалось применение оптогенетики, опосредованной сOrn5, в нейронах. Сначала изучалось, может ли сOrn5 опосредовать светоиндуцированные сигналы Ca²⁺. С помощью AAV и пан-нейронального промотора SYN, сOrn5 и генетически закодированный сенсор Ca²⁺ jRGECO1a экспрессируются в кортикальных нейронах мыши (фиг. 8а). В образцах срезов головного мозга применение импульсов

синего света (10 с; 100 мкВт/мм²; 473 нм) надежно вызывало скачки концентрации Ca²⁺ в нейронах (фиг. 8b, c). Таким образом, сOrn5 также обеспечивает индуцированную светом активацию в нейронах.

[079] Исследовали влияние светоиндуцированной активации сOrn5 на электрофизиологические свойства нейронов в образцах срезов моторной коры, гиппокампа и дорсального стриатума (фиг. 8d). Наблюдаются два типа паттернов активации. В большинстве зарегистрированных нейронов импульсы синего света индуцируют небольшой деполяризующий ток (приблизительно 20 пА) в режиме фиксации напряжения и индуцируют замедленную, но значительную генерацию потенциалов действия в режиме фиксации тока (фиг. 8e, слева, n = 12 нейронов). На более высоких частотах световых импульсов сOrn5 вызывал больше спайков с более короткой задержкой (от приблизительно 5 с до приблизительно 3 с) после первоначального светового импульса, в то время как входящий ток существенно не изменялся (фиг. 9a). В другом подмножестве нейронов короткие световые импульсы быстро вызывали сильные входящие токи (от 100 до 1000 пА) и вызывали взрывную генерацию потенциалов действия (фиг. 8e, справа, n = 6 нейронов). Нейроны неоднократно стимулировались 10 мс/импульс при 10 Гц и демонстрировали неослабленный режим с точки зрения степени генерации при повторяющихся испытаниях световой стимуляции (фиг. 9b). Следует отметить, что в отличие от ChR2-оптогенетики, потенциал действия, вызванный сOrn5 фотостимуляцией, не привязан по времени к световым импульсам.

[080] Наконец, оценивали пригодность оптогенетики, опосредованной сOrn5, для модуляции поведения животных. Латеральный гипоталамус (LH) представляет собой мозговой центр с известными функциями по обработке информации, связанной с вознаграждением, и поведению при кормлении. Авторы изобретения экспрессировали сOrn5 в ГАМКергических нейронах LH у мышей VGAT-Cre и имплантировали оптические волокна для доставки световых импульсов в LH свободно ведущих себя мышей (фиг. 8g). Согласно с предыдущими выводами о том, что активация ГАМК-нейронов LH стимулирует поведение при кормлении 56, световая стимуляция (20 Гц; 5 мс/импульс; 473 нм; 0,75 мВт выход из кончика волокна) вызывает значительное увеличение потребления пищи у мышей, экспрессирующих сOrn5, но не у контрольных мышей, экспрессирующих EGFP (фиг. 8h). Задача, связанная с поиском корма, также использовалась для тестирования эффекта сOrn5-опосредованной оптогенетической активации ГАМК-нейронов в неопределенной зоне (zona incerta, ZI) (фиг. 8i), области, которая, как известно, стимулирует компульсивное пищевое поведение. Мыши, экспрессирующие сOrn5, по сравнению с мышами, экспрессирующими EGFP,

демонстрируют значительное увеличение времени поиска гранул корма с высоким содержанием жира при повторной световой стимуляции (фиг. 8j). Регистрацию электрофизиологических сигналов на нейронах LH и ZI, экспрессирующих cOrn5, выполняли для характеристики профилей ответа. Места инъекции и размещение оптических волокон подтверждаются с помощью цельных срезов головного мозга (фиг. 10a-c). Примечательно, что мыши сохраняли поведение (поведение при кормлении или поведение по поиску корма с высоким содержанием жиров), когда свет был включен, и немедленно прекращали поведение, когда свет был выключен. Таким образом, cOrn5 является эффективным для быстрой, точной и обратимой модуляции поведенческих состояний животных.

[081] В настоящем изобретении продемонстрировано применение Orn5 согласно настоящему изобретению в качестве чрезвычайно эффективного оптогенетического инструмента для активации G_q -сигнализации и/или активации клеток. Предыдущие исследования охарактеризовали Orn5 млекопитающих как чувствительный к УФ G_i -связанный опсин; авторы изобретения неожиданно обнаружили, что видимый синий свет может индуцировать быстрые скачки концентрации Ca^{2+} , накопление IP^1 и активацию PKC в экспрессирующих Orn5, например, экспрессирующих cOrn5 или экспрессирующих tOrn5, клетках млекопитающих. Настоящее изобретение раскрывает, что Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности cOrn5, в астроцитах мыши эффективно опосредует вызванное светом сильное высвобождение АТР и повышает активность нейронов *in vivo*. Настоящее изобретение также демонстрирует, что Orn5, в частности, cOrn5, обеспечивает быструю, выраженную и обратимую оптическую активацию нейронов и использует ее для селективной модуляции поведения животных. Важно отметить, что Orn5 согласно настоящему изобретению, например cOrn5, представляет собой эффективную, но простую в использовании однокомпонентную систему, которая не требует экзогенного хромофора. В настоящем изобретении предполагается, что оптогенетика на основе Orn5, например, оптогенетика на основе cOrn5, будет представлять собой метод, обеспечивающий возможность исследования важных физиологических и поведенческих функций, регулируемых G_q -связанной сигнализацией и/или активацией клеток, как в невозбудимых, так и в возбудимых клетках.

[082] В таблице 6 перечислены обеспечивающие такую возможность характеристики cOrn5 путем прямого сравнения его амплитуд ответа, светочувствительности, временного разрешения и требования к присутствию дополнительного хромофора с другими оптогенетическими инструментами. Для клеток, экспрессирующих cOrn5, импульсы синего света длительностью всего лишь 10 мс с

интенсивностью 16 мВт/мм² вызывают быстрое увеличение сигналов Ca²⁺ с пиковыми амплитудами от 3 до 8 ΔF/F. В противоположность этому, до настоящего изобретения было обнаружено, что активация opto-a1AR или Orn4 млекопитающих, двух предлагаемых оптогенетических инструментов для G_q-сигналикации, требует приблизительно в 3 раза большей интенсивности света (от 7 до 40 мВт/мм²) и длительного воздействия света (от 20 до 60 с) и вызывает только слабые сигналы Ca²⁺ (от 0,25 до 0,5 ΔF/F). Следовательно, opto-a1AR или Orn4 млекопитающих не могут воспроизводить профили быстрой активации эндогенных G_q-связанных рецепторов, которые часто запускают сильную G_q-сигналикацию при субсекундном применении их соответствующих лигандов. Авторами изобретения продемонстрирована эффективность сOrn5-оптогенетики путем демонстрации неожиданных физиологических и поведенческих эффектов в ответ на сOrn5-опосредованную оптическую активацию астроцитов и нейронов *in vivo*. В противоположность этому, недавние систематические характеристики демонстрировали, что opto-a1AR- и Orn4-опосредованные оптогенетические стимуляции не увеличивают амплитуды сигналов Ca²⁺ и лишь слегка модулируют частоту скачков концентрации Ca²⁺ и синаптических событий даже после длительного освещения (Gerasimov et al., 2021; Mederos et al., 2019). За счет преодоления ограничений, связанных с светочувствительностью, временным разрешением и амплитудами ответов, opto-a1AR- и Orn4-опосредованной оптогенетики, Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности, сOrn5 или tOrn5, найдет широкую применимость при изучении механизмов и функций G_q-сигналикации и/или активации клеток в многочисленных клетках и тканях.

[083] Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности, оптогенетика на основе сOrn5 или tOrn5, также обладает преимуществом с точки зрения безопасности и удобства. Хотя сообщается, что Orn5 многих видов реагирует на УФ-излучение (Kojima et al., 2011), сOrn5 оптимально активируется синим светом 470 нм, который проникает лучше, чем УФ-излучение, и позволяет избежать возникновения УФ-ассоциированной клеточной токсичности. Его сверхчувствительность к свету также сводит к минимуму потенциальный нежелательный эффект нагрева. Он является двухфотонно активируемым с использованием длинноволнового (920 нм или более) света, что позволяет предположить, что он является подходящим для еще более глубокой активации тканей с использованием импульсного лазера. сOrn5 или tOrn5 сильно и многократно активируется светом без необходимости присутствия экзогенного ретиналя, возможно, потому, что сOrn5 или tOrn5 является бистабильным опсином, который ковалентно связывается с эндогенным ретиналем и, таким образом, является устойчивым к

фотодеградации (Koyanagi and Terakita, 2014; Tsukamoto and Terakita, 2010). В противоположность этому, эксперименты с Orn4 на млекопитающих требуют присутствия дополнительного ретиналя и демонстрируют длительное время ответа и низкую светочувствительность. Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности сOrn5 или tOrn5, в качестве однокомпонентной системы особенно применим для исследований *in vivo*, поскольку он позволяет избежать сложностей, связанных с доставкой соединения в ткань во время эксперимента.

[084] Orn5-оптогенетика согласно настоящему изобретению, в частности сOrn5-или tOrn5-оптогенетика, также имеет некоторые серьезные преимущества по сравнению с хемогенетическими инструментами и инструментами разарретирования (uncaging). Он гораздо более точен во времени и обеспечивает одноклеточное или даже субклеточное пространственное разрешение. Хотя CNO/hM3Dq-опосредованная хемогенетика была использована для исследования физиологических и поведенческих функций невозбудимых клеток, таких как астроциты в головном мозге (Agulhon et al., 2013; Shen et al., 2021), ее использование *in vivo* обычно занимает много минут, необходимых, чтобы CNO достиг своих целевых клеток и тканей. Диффузионная природа соединений указывает на то, что практически невозможно хемогенетически стимулировать G_q-сигнализацию с клеточным и субклеточным разрешением. Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности сOrn5 или tOrn5, также отличается от инструментов «разарретирования» на основе заключенных соединений, таких как заключенный кальций и заключенный IP₃, поскольку эти инструменты требуют предварительной загрузки соединения и только частично воспроизводят Ca²⁺-связанные пути, связанные с G_q-сигнализацией и/или активацией клеток. Существуют другие инструменты «разарретирования», такие как заключенный глутамат и заключенный АТФ (Ellis-Davies, 2007; Lezmy et al., 2021), которые воздействуют на эндогенные GPCR. Однако эти заключенные соединения требуют их введения во внеклеточную среду или внутриклеточную цитоплазму, что ограничивает их применение у животных, демонстрирующих нормальные поведенческие реакции (Adams and Tsien, 1993b). Преимущества Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности сOrn5 или tOrn5, по сравнению с инструментами «разарретирования» явно продемонстрированы экспериментами, в которых показано, что Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности сOrn5 или tOrn5, аналогичен с точки зрения его удобного использования существующим инструментам на основе ChR2 для модуляции поведения животных.

[085] Оптогенетика на основе Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности сOrn5 или tOrn5, должна быть особенно пригодна для точной активации

внутриклеточной G_q -сигнализации и/или активации клеток, которая впоследствии запускает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ и активирует РКС. *Orn5* согласно настоящему изобретению, в частности *sOrn5* или *tOrn5*, отличается от оптогенетических инструментов на основе ионных каналов, таких как *ChR2* или его варианты, которые перемещают катионы через плазматическую мембрану. За счет контролирования потенциалов клеточных мембран и, таким образом, генерации потенциала действия, *ChR2* и его варианты внесли огромный вклад в детальное изучение нервных цепей; однако их успехи были более ограниченными при изучении невозбудимых клеток, у которых отсутствуют активные ионные каналы для генерации потенциалов действия (Gourine et al., 2010). В дополнение к применениям на невозбудимых клетках, оптогенетика на основе *Orn5* согласно настоящему изобретению, в частности *sOrn5* или *tOrn5*, также может стимулировать G_q -сигнализацию в нейронах и/или активировать нейроны и контролировать поведение животных в зависимости от цепи. Следует отметить, что G_q -связанные GPCR могут беспорядочно рекрутировать G-белки и влиять на вариабельную нисходящую сигнализацию рецепторно- и клеточно-специфическим образом. Действительно, авторы изобретения наблюдали, что одни и те же параметры освещения светом вызывают разные паттерны активации у разных нейронов. *Orn5* согласно настоящему изобретению, в частности *sOrn5* или *tOrn5*-опосредованная оптогенетическая активация, не генерирует строго блокированную по времени генерацию потенциала действия так же точно, как *ChR2* в нейронах. Это может быть полезно, поскольку позволяет избежать искусственно синхронизированной активации нейронов. Однако, если необходим точный во времени контроль генерации потенциала действия, авторы изобретения рекомендуют оптогенетические инструменты на основе ионных каналов.

[086] В дополнение к техническим достижениям результаты, полученные авторами изобретения, также имеют ряд функциональных значений для сигнализации и/или активации астроцитов *in vivo*. Хотя АТР считается важным глиотрансмиттером, предыдущие исследования выявили множество механизмов высвобождения, которые зависят от методов обработки, наличия внеклеточного Ca^{2+} и точной формы подготовленных образцов клеток и тканей (Figueiredo et al., 2014; Hamilton and Attwell, 2010). Кроме того, наличие высвобождения АТР часто контролируют опосредованно. Остается неясным, вызывает ли активация астроцитов высвобождение АТР, и если да, то как это высвобождение проявляется *in vivo*. В настоящем документе авторы изобретения представляют первую демонстрацию того, что стимуляция сигнального пути G_q в астроцитах вызывает массивное высвобождение АТР в виде вспышек АТР. Оптогенетика

на основе Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности cOrn5 или tOrn5, таким образом, обеспечивает идеальную методику для изучения молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе высвобождения АТФ. В дополнение к АТФ активация астроцитов приводит к высвобождению других глиотрансмиттеров, таких как D-серин, глутамат и ГАМК. АТФ также может быть превращен в другие метаболиты, такие как аденозин. Глиотрансмиттеры и их метаболиты могут оказывать комплексное модулирующее действие на возбудимость нейронов и синаптическую силу. Например, в то время как АТФ может активировать нейроны через различные рецепторы P2X и P2Y, аденозин сильно ингибирует нейроны через рецепторы A1 (Lezmy et al., 2021; Zhang et al., 2003). Остается неясным, как эти различные эффекты интегрируются для модуляции активности нейронов *in vivo*. В настоящем документе авторы изобретения демонстрируют, что оптогенетическая активация астроцитов, экспрессирующих cOrn5, значительно возбуждает нейроны в коре S1 мышей. Оптогенетика на основе Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности cOrn5 или tOrn5, таким образом, закладывает основу для детального изучения молекулярных, клеточных и цепных механизмов, лежащих в основе сложных взаимодействий между астроцитами и нейронами. Эксперименты *in vivo* также продемонстрировали, что Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности cOrn5 или tOrn5, обладают совместимостью с оптогенетическими зондами и датчиками изображения, такими как генетически кодируемые индикаторы Ca²⁺ и сенсоры нейротрансмиттеров на основе GPCR. Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности cOrn5 или tOrn5, вместе с этими датчиками потенциально обеспечивают полностью оптический подход для временной активации G_q-сигнализации и/или активации клеток и одновременного мониторинга соответствующих эффектов.

[087] Таким образом, настоящее изобретение демонстрирует Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности cOrn5 или tOrn5, в качестве чувствительного к синему свету опсина для быстрой, обратимой и точной активации G_q-сигнализации и/или активации клеток. Настоящее изобретение также определяет Orn5 согласно настоящему изобретению, в частности cOrn5 или tOrn5, в качестве эффективного и простого в использовании оптогенетического инструмента для активации как невозбудимых клеток, так и нейронов. Учитывая важность G_q-связанных GPCR, ожидается, что cOrn5 найдет широкое применение для детального изучения механизмов и функций G_q-сигнализации во всех основных типах клеток и тканях.

[088] Описания конкретных вариантов осуществления и примеры представлены в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения. Специалисты в данной области

техники легко распознают множество несущественных параметров, которые могут быть изменены или модифицированы для получения по существу схожих результатов.

[089] Примеры

[090] Материалы и методы:

[091] Таблица 1: Праймеры для клонирования

Прямой праймер V5-cOpn5	5'-cgtgaggtaccggatcctctagaatgggcaagccatccccaacc ccctgctgggcctggacagcaccatgagtgggatggcatcggac-3'
Обратный праймер V5-cOpn5	5'-tcgataagcttgatcgaattcttagactccagttgggtccgct-3'
Прямой праймер cOpn5-T2A-eGFP для промотора hSyn	5'-tagagtcgagctcaagcttgccaccatgagtgggatggcatcggactgca-3'
Обратный праймер cOpn5-T2A-eGFP для промотора hSyn	5'-aacccgggccctctagagcatatgttactgtacagctcgtccatgccg-3'
Прямой праймер cOpn5-T2A-eGFP для промотора GfaABC1D	5'-acctccgctgctcgcgggtctagaatgagtgggatggcatcggactgca-3'
Обратный праймер cOpn5-T2A-eGFP для промотора GfaABC1D	5'-tatcgataagcttgatcgaattcttactgtacagctcgtccatgccg-3'
Прямой праймер cOpn5-T2A-eGFP для промотора EF1a	5'-tacattatacgaagttatggcgccttattactgtacagctcgtccatg-3'
Обратный праймер cOpn5-T2A-eGFP для промотора EF1a	5'-atacttatacgaagttatgctagccaccatgagtgggatggcatcggactg-3'
Прямой праймер cOpn5-T2A-mCherry	5'-gcatcacctccgctgctcgcgggtatgagtgggatggcatcggactgca-3'
Обратный праймер cOpn5-T2A-mCherry	5'-tcaccatggtggcgaccgggggatctgggccaggattctcctcgacgtca-3'

[092] Таблица 2: Рекомбинантная ДНК

pcDNA3.1-opto-a1AR-EYFP	плазмида Addgene №20947
EGFP-CAAX	дар от Yulong Li
pLJM1-EGFP	плазмида Addgene №19319
pAAV-GfaABC1D-hM3D(Gq)-mCherry	плазмида Addgene №50478
pAAV-EF1a-DIO-eGFP-WPRE-pA	н/д (нет данных)
pAAV-hSyn-GOI	н/д
pLJM1-cmv-cOpn5	н/д
pLJM1-cmv-tOpn5	н/д

pLJM1-cmv-hOPN5	н/д
pLJM1-cmv-mOpn5	н/д
pLJM1-cmv-V5-Opn5	н/д
pLJM1-cmv-cOpn5-T2A-eGFP	н/д
PAAV-hSyn-cOpn5-T2A-eGFP-WPR-pA	н/д
PAAV-GfaABC1D-cOpn5-T2A-eGFP-WPR-pA	н/д
pAAV-EF1a-DIO-cOpn5-T2A-eGFP-WPRE-pA	н/д
PAAV-GfaABC1D-cOpn5-T2A-mCherry-WPR-pA	н/д

[093] Таблица 3: Вирусные штаммы

Lenti-cmv-cOpn5-puro	Китайский институт исследований мозга, Пекин
Lenti-cmv-hOPN5-puro	Китайский институт исследований мозга, Пекин
Lenti-cmv-tOpn5-puro	Китайский институт исследований мозга, Пекин
Lenti-cmv-mOpn5-puro	Китайский институт исследований мозга, Пекин
Lenti-cmv-hM3Dq-puro	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/9-EF1a-DIO-cOpn5-T2A-eGFP	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/9-hSyn-cOpn5-T2A-eGFP	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/9-Ef1a-DIO-cOpn5-T2A-eGFP	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/8-GFaABC1D-cOpn5-T2A-eGFP	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/8-GfaABC1D-cOpn5-T2A-mCherry	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/9-EF1a-EGFP	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2-EF1 α -DIO-GCaMP6m	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/9-GfaABC1D-ATP1.0	WZ Biosciences Inc. Кат. №YL006003-AV9
AAV9-hSyn-NES-jRGECO1a-WPRE	WZ Biosciences Inc. Кат. №BS8-NOAAAV9
AAV2/9-mCaMKIIa-jGCaMP7b-WPRE-pA	Shanghai Taitool Bioscience CO., Ltd Кат. №S0712-9-H20

[094] Таблица 4: Источники светового возбуждения

Фиг. 1f, 1g, фиг. 2c, 2d, 2e, 2f, фиг. 3b, 3c; фиг. 4a, 4b, 4e, 4f, 4h; фиг. 5a, 5e, 5f, 5g, 8b	470 нм установленный на поверхности LED (светодиод)	Thorlabs	M470L3
---	---	----------	--------

Фиг. 1b, 1d, 1e; фиг. 2a, 2b, фиг. 3d, 3f, 3g;	488 нм от источника света микроскопа	Nikon	A1R MP
Фиг. 3a	365 нм установленный на поверхности LED	LG3535	диапазон длины волны: от 360 до 370 нм
Фиг. 3a	395 нм установленный на поверхности LED	LG3535	диапазон длины волны: от 390 до 400 нм
Фиг. 3a	561 нм лазер	Changchun New Industries Optoelectronics Technology, Китай	MGL-FN-561
Фиг. 3a	590 нм установленный на поверхности LED	CREE XP-E2	диапазон длины волны: от 570 до 615 нм
Фиг. 3a	630 нм установленный на поверхности LED	CREE XP-E2	диапазон длины волны: от 615 до 660 нм
Фиг. 4c, 4d	515 нм лазер	Changchun New Industries Optoelectronics Technology, Китай	MGL-F-515

[095] Таблица 5: Оборудование для микроскопии

Фиг. 1b, 1d, 1e; фиг. 2a, 2b	Мультифотонные конфокальные микроскопы	Nikon	A1R MP
Фиг. 3a, 3b, 3c; фиг. 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f	Вращающийся диск	Nikon	ECLIPASE Ti
Фиг. 8a, 8b, 8c	Двухфотонный микроскоп	Olympus	BX61W1
Фиг. 5a	Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп	Zeiss	LSM 880
Фиг. 6, фиг. 7	Мультифотонный микроскоп	Olympus	FluoView FVMPE-RS

[096] Таблица 6: Статистический анализ

Фиг.	Условия	n на	Анализ	Значение P
------	---------	------	--------	------------

		группу		
1f	контроль по сравнению со светом	4, 4	Тест множественных сравнений Тьюки	P менее 0,0001
	свет по сравнению с свет + YM-254890	4, 4	Тест множественных сравнений Тьюки	P равно 0,0128
1g	контроль по сравнению со светом	4, 4	Тест множественных сравнений Тьюки	P равно 0,0096
	свет по сравнению с свет + стауроспорин	4, 4	Тест множественных сравнений Тьюки	P равно 0,0004
6h	события в минуту: 0-5 мин по сравнению с 15-20 мин	193, 193	Непарный t-критерий	P менее 0,0001
7d	Частота спайка: 0-5 мин по сравнению с 15-20 мин	193, 193	Непарный t-критерий	P менее 0,0001
8f	Основное по сравнению со светом	18, 18	Непарный t-критерий	P равно 0,0005
8h	Группа LH ^{cOrn5} : включенный свет по сравнению с выключенным	5, 5	Непарный t-критерий	P равно 0,0003
	Группа LH ^{EGFP} : включенный свет по сравнению с выключенным	5, 5	Непарный t-критерий	P равно 0,3466
8j	Группа ZI ^{cOrn5} : включенный свет по сравнению с выключенным	5, 5	Непарный t-критерий	P менее 0,0001
	Группа ZI ^{EGFP} : включенный свет по сравнению с выключенным	4, 4	Непарный t-критерий	P равно 0,7608
2b	Группа cOrn5:	19, 15	Тест множественных	P менее 0,0001

	свет по сравнению с УМ-254890		сравнений Тьюки	
	Группа сOpn5: УМ-254890 по сравнению со смывкой	15, 11	Тест множественных сравнений Тьюки	P менее 0,0001
	Группа сOpn5: свет по сравнению со смывкой	19, 11	Тест множественных сравнений Тьюки	P равно 0,2239
	Группа tOpn5: свет по сравнению с УМ-254890	15, 17	Тест множественных сравнений Тьюки	P менее 0,0001
	Группа tOpn5: УМ-254890 по сравнению со смывкой	17, 13	Тест множественных сравнений Тьюки	P менее 0,0001
	Группа tOpn5: свет по сравнению со смывкой	15, 13	Тест множественных сравнений Тьюки	P равно 0,9388
2d	контроль по сравнению со светом	4, 4	Непарный t- критерий	P равно 0,4338
2f- слева	контроль по сравнению со светом	3, 3	Тест множественных сравнений Тьюки	P равно 0,992
2f- справа	Группа сOpn5: контроль по сравнению со светом	4, 4	Тест множественных сравнений Сидака	P равно 0,0223
	Группа tOpn5: контроль по сравнению со светом	4, 4	Тест множественных сравнений Сидака	P равно 0,4174
	Группа hOPN5: контроль по сравнению со светом	4, 4	Тест множественных сравнений Сидака	P менее 0,0001
	Группа mOpn5: контроль по сравнению со светом	4, 4	Тест множественных сравнений Сидака	P менее 0,0001
7c	Основное по	6, 4	Непарный t-	P равно 0,0066

	сравнению с LPS		критерий	
	Основное по сравнению с Orn5	6, 2	Непарный t-критерий	P равно 0,0002
	LPS по сравнению с Orn5	4, 2	Непарный t-критерий	P равно 0,0031

[097] Пример 1 сOrn5 опосредует оптогенетическую активацию G_q-сигнализации

[098] Тестировали, обладает ли гетерологичная экспрессия ортологов Orn5 курицы, черепах, людей и мышей (которые имеют 80-90% идентичность белковой последовательности) способностью опосредовать активацию G_q-сигнализации, индуцированную синим светом, в клетках НЕК 293Т (фиг. 1а и таблица 7). Для контроля относительного ответа Ca²⁺ использовали синий свет для стимуляции и красный внутриклеточный кальциевый индикатор Calbryte™ 630 AM. Ортологи Orn5 курицы (сOrn5) и черепахи (tOrn5) опосредовали немедленное и сильное светоиндуцированное увеличение сигнала Ca²⁺ (приблизительно 3 ΔF/F), тогда как световой эффект от клеток, экспрессирующих ортологи Orn5 человека или мыши, не наблюдался (фиг. 1d и фиг. 2а, b). Как показано на примере куриного ортолога, сOrn5 совместно локализовался с мембранным маркером EGFP-СААХ, что указывает на то, что он эффективно транспортировался к плазматической мембране (фиг. 1с). В среду для культивирования не добавляли экзогенный ретиналь, что позволяет предположить, что эндогенный ретиналь является достаточным для обеспечения функциональности сOrn5. Сигналы Ca²⁺ были устойчивыми к удалению внеклеточного Ca²⁺, что указывает на высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных хранилищ (фиг. 2с). Предварительная инкубация с YM-254890, высокоселективным ингибитором белков G_q³³, обратимо устраняла индуцированные светом скачки концентрации Ca²⁺ в обеих сOrn5-экспрессирующих клетках (фиг. 1е). В клетках, экспрессирующих сOrn5, но не в клетках, экспрессирующих OPN5 человека, обнаруживали светоиндуцированное увеличение уровня инозитолфосфата (IP₁), продукта быстрой деградации IP₃; более того, степень такого увеличения уменьшалась при обработке YM-254890 (фиг. 1f и фиг. 2d). В клетках НЕК 293Т, экспрессирующих сOrn5, синий свет также запускал фосфорилирование белка MARCKS, хорошо известной мишени PKC³⁴, в зависимости от активности PKC (фиг. 1g и фиг. 2е). В противоположность этому, освещение синим светом эффективно снижало уровни цАМФ в клетках, экспрессирующих Orn5 человека и мыши, с ретиналем, но не оказывало такого эффекта в клетках, экспрессирующих сOrn5, без ретиналя (фиг. 2f). В совокупности эти данные подтверждают, что освещение синим светом обеспечивает связь сOrn5 с G_q-

сигнализацией в клетках НЕК 293Т.

[099] Таблица 7. Опсины и виды

	Альтернативное название	Виды	
Opn5 курицы	cOpn5	Gallus gallus	GenBank NM_001130743.1
Opn5 черепахи	tOpn5	Chelonia mydas	GenBank XM_007068312.4
Opn5 человека	hOPN5	Homo sapiens	GenBank AY377391.1
Opn5 мыши	mOpn5	Mus musculus	GenBank NM_181753.4

[0100] На фиг. 1 показано, что cOpn5 опосредует индуцированную светом сильную активацию G_q -сигнализации в клетках НЕК 293Т.

[0101] а, Схематическая диаграмма предполагаемой внутриклеточной сигнализации в ответ на светоиндуцированную активацию cOpn5. PLC: фосфолипаза C; PIP_2 : фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат; IP_3 : инозитол-1,4,5-трисфосфат; IP_1 : инозитолмонофосфат; DAG: диацилглицерин; PKC: протеинкиназа C; YM-254890: селективный ингибитор белка G_q .

[0102] b, Псевдоцветные изображения сигнала Ca^{2+} до и после стимуляции синим светом (10 с; 100 мкВт/мм²; 488 нм) в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих Opn5 трех видов (Gallus gallus, Homo sapiens и Mus musculus). Масштабная линейка, 10 мкм.

[0103] с, Су3-контрастно окрашенный слитый белок V5-cOpn5 (красный) совместно локализовался с мембранно-меченным EGFP-CAAX (зеленый) в клетках НЕК 293Т. Контрастно окрашенный DAPI (синий) указывает на клеточные ядра. Масштабная линейка, 10 мкм.

[0104] d, Временные изменения вызванных светом сигналов Ca^{2+} для клеток, показанных в с.

[0105] е, Ингибитор белка G_q YM-254890 (10 нМ) обратимо блокировал cOpn5-опосредованные, светоиндуцированные сигналы Ca^{2+} .

[0106] f, YM подавлял накопление IP_1 , вызванное непрерывной световой стимуляцией (3 мин; 100 мкВт/мм²; 470 нм) в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих cOpn5 (слева). ***P менее 0,0001, *P равно 0,0128; тест множественных сравнений Тьюки.

[0107] g, Фосфорилирование MARCKS в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих cOpn5, в контрольной группе (без световой стимуляции), группе световой стимуляции и группе свет + стауроспорин (ST, ингибитор PKC). Количество p-MARCKS в той же фракции нормализовали относительно количества α -тубулина. **P равно 0,0096, ***P равно 0,0004; тест множественных сравнений Тьюки.

[0108] На фиг. 2 показано, что сOrn5 связан с G_q -сигнализацией, но не с G_i -сигнализацией

[0109] a, Псевдоцветные изображения сигнала Ca^{2+} до и после стимуляции синим светом (10 с; 100 мкВт/мм²; 488 нм) в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих Orn5 из видов черепах (*Chelonia mydas*). Масштабная линейка, 10 мкм (слева); Временные изменения вызванных светом сигналов Ca^{2+} для ответивших клеток (справа).

[0110] b, Сгруппированные данные ингибитора белка G_q YM-254890 (10 нМ), который обратимо блокировал опосредованные сOrn5 и Orn5 черепахи, светоиндуцированные сигналы Ca^{2+} . ****P менее 0,0001, однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Планки погрешностей показывают S.E.M. (стандартная ошибка среднего).

[0111] c, Временные изменения сигнала Ca^{2+} с фотостимуляцией (10 мс; 16 мкВт/мм²; 470 нм) без внеклеточного Ca^{2+} .

[0112] d, Накопление IP_1 в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих Orn5 человека, с или без световой стимуляции (справа). n.s., без существенного различия; непарный t-критерий.

[0113] e, Один представитель фосфорилирования MARCKS в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих сOrn5, в контрольной группе (без световой стимуляции), группе световой стимуляции и группе свет + стауроспорин. Количество p-MARCKS в той же фракции нормализовали относительно количества α -тубулина.

[0114] f, Свет не влияет на уровни цАМФ (предварительная инкубация с 10 мкМ форсколина) в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих сOrn5, без присутствия дополнительного ретиналя в среде (левая панель). На правой панели показано влияние фотостимуляции на концентрации цАМФ для клеток НЕК 293Т, экспрессирующих Orn5 четырех различных видов, после предварительной инкубации с 10 мкМ ретиналя.

[0115] Планки погрешностей в d и f показывают S.E.M.

[0116] Пример 2 Оптогенетика, опосредованная сOrn5, является чувствительной и точной

[0117] Проводили характеристику активирующихся светом свойств сOrn5, гетерологично экспрессирующегося в клетках НЕК 293Т. Хотя Orn5 ранее рассматривался как чувствительный к ультрафиолету (УФ) фоторецептор²⁷, картирование с набором длин волн в диапазоне от 365 до 630 нм при фиксированной интенсивности света (100 мкВт/мм²) показывало, что синий свет 470 нм вызывал самые сильные скачки концентрации Ca^{2+} , при этом свет UVA (365 и 395 нм) являлся менее эффективным, а видимый свет с большей длиной волны (561 нм или более) являлся полностью

неэффективным (фиг. 3а). Тестировали влияние различной продолжительности света на клетки НЕК 293Т, экспрессирующие сOrn5. При стимуляции короткими световыми импульсами (1, 5, 10, 20, 50 мс; 16 мкВт/мм²; 470 нм) было продемонстрировано, что ответ Ca²⁺ достигал режима насыщения при продолжительности света более 10 мс (фиг. 3б). Более длительная продолжительность света дополнительно не увеличивала амплитуду сигнала Ca²⁺ при этой интенсивности света (16 мкВт/мм²; 470 нм) (фиг. 4а). Подача 470 нм света с различной интенсивностью показала, что синий свет приблизительно 4,8 мкВт/мм² и 16 мкВт/мм² давал приблизительно половину максимального и полный максимальный ответы, соответственно (фиг. 3с и фиг. 4б). Таким образом, светочувствительность сOrn5 на 3-4 порядка выше, чем зарегистрированные значения светочувствительных G_q-связанных GPCR, и даже на 2-3 порядка выше, чем у обычно используемого оптогенетического инструмента Channelrhodopsin-2 (ChR2) (Lin, 2011; Zhang et al., 2006) (таблица 8). Вместе эти результаты показывают, что сOrn5 может функционировать как однокомпонентный оптогенетический инструмент без дополнительного ретиналя и что сOrn5 является сверхчувствительным к синему свету с точки зрения его полной активации, требующей низкой интенсивности света (16 мкВт/мм²) и короткой продолжительности (10 мс).

[0118] Таблица 8: Сравнение сOrn5 с другими оптогенетическими инструментами

	Длина волны λ_{\max} (нм)	Светочувствительность	Продолжительность стимуляции	Необходимость экзогенных химических веществ (ретиналь)	Амплитуда ответа	Модель
Дикий тип ChR2 ^{1,2}	470 нм	от 8 до 12 мВт/мм ²	2,3±1,1 мс	Нет	Устойчивое состояние: отношение пикового тока: 0,4±0,04; (731±100 пА)	Гиппокампальная клеточная культура
ChR2 H134R ³	450 нм	приблизительно 10 мВт/мм ² (470 нм)	0,96±0,12 мс	Нет	4,47 нА	НЕК 293Т

ChETA ⁴	490 нм	приблизительно 10 мВт/мм ²	0,9±0,1 мс	Нет	устойчивое состояние: отношение пикового тока: 0,6±0,04; (645± 7 пА	Гиппокампальная клеточная культура
ChrimsonR ⁵	590 нм	4,6 мВт/мм ²	0,9±0,1 мс	Нет	приблизительно 300 пА	культивируемые нейроны
меланопсин мыши (Orn4) ⁶	480 нм	1015 фотонов с ⁻¹ см ⁻² (500 нм)	более 60 с	11-цис-ретинальдегид	приблизительно 0,1 (ΔF/F) амплитуда ответа Ca ²⁺	Клетки HEK293-TRPC3
меланопсин мыши (Orn4) и его мутанты ⁷	488 нм	источник белого флуоресцентного света (интенсивность не определена)	60 с	11-цис-ретиналь	приблизительно 0,25 (ΔF/F) амплитуда ответа Ca ²⁺ , наилучший мутант Orn4 ^{9A}	СНО клетки
hOrn4-меланопсин человека ⁸	473 нм	7 мВт/мм ²	20 с	неизвестно	приблизительно 2 (ΔF/F) частота событий Ca ²⁺ , но без существенного изменения амплитуды Ca ²⁺	астроциты in vivo

opto- α 1AR ⁹	500 нм	7 мВт/мм ²	60 с	Нет	приблизительно 0,227 ($\Delta F/F$) амплитуда ответа Ca ²⁺	Клетки HEK
opto- α 1AR ¹⁰	473 нм	20 Гц, 45 мс световые импульсы, 5 мВт	5 мин	Нет	более чем 20% увеличение частоты sIPSC (спонтанные ингибиторные постсинаптические токи)	астроциты in vitro
меланопсин человека	470 нм	40 мВт/мм ²	25 с	ATR	приблизительно 0,646 ($\Delta F/F$) амплитуда ответа Ca ²⁺	HEK 293T
opto- α 1AR	510 нм	7 мВт/мм ²	60 с	Нет	приблизительно 0,5 ($\Delta F/F$) амплитуда ответа Ca ²⁺	HEK 293T

hM3Dq				CNO	приблизительно 1,6 (ΔF/F) частота событий Ca ²⁺ , но без существенного изменения амплитуды Ca ²⁺	НЕК 293Т
cOrn5	470 нм	16 мкВт/мм ²	10 мс	Нет	приблизительно 3,0 (ΔF/F) амплитуда ответа Ca ²⁺	клетки НЕК-293Т
	470 нм	0,026 мкВт/мм ²	более 2 с	Нет	приблизительно 1 (ΔF/F) амплитуда ответа Ca ²⁺	клетки НЕК-293Т

[0119] Сравнивали производительность cOrn5 с производительностью opto-a1AR, химерного GPCR, сконструированного путем смешивания родопсина с G_q-связанным адренергическим рецептором. В соответствии с протоколом в предыдущем отчете¹⁴, было обнаружено, что очень длительное воздействие сильного освещения (60 с; 7 мВт/мм²) требуется для запуска медленного и небольшого (приблизительно 0,5 ΔF/F) увеличения сигнала Ca²⁺ в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих opto-a1AR, и освещение 15 с является неэффективным (фиг. 4с, d). Также сравнивали производительность cOrn5 с производительностью orn4, природного опсина, который, как сообщалось, является инструментом для активации G_q-сигнализации. Установлено, что длительное воздействие сильного освещения (25 с; 40 мВт/мм²) и присутствие дополнительного ретиналя требуется для запуска медленного (приблизительно 1 ΔF/F) увеличения сигнала Ca²⁺ в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих orn4 (фиг. 4е, f). Следовательно, по сравнению с существующими инструментами на основе опсина (opto-a1AR и orn4), cOrn5 намного более светочувствителен (на примерно 3 порядка более чувствителен), требует гораздо более короткого времени воздействия (10 мс по сравнению с 60 с) и обеспечивает более

сильные ответы.

[0120] Сравнивали производительность сOrn5 с производительностью популярного G_q -связанного хемогенетического инструмента hM3Dq, который активируют путем добавления экзогенного низкомолекулярного лиганда клозапин-N-оксида (CNO)³⁷⁻³⁹. Светоиндуцированная активация клеток НЕК 293Т, экспрессирующих сOrn5, имеет аналогичную амплитуду пикового ответа сигнала Ca^{2+} , что и CNO-индуцированная активация клеток НЕК 293Т, экспрессирующих hM3Dq. Между тем, клетки НЕК 293Т, экспрессирующие сOrn5, имеют более быстрый и более точный по времени ответ, а также более быстрое время восстановления, чем клетки НЕК 293Т, экспрессирующие hM3Dq (фиг. 4g-i). Эти результаты указывают на то, что оптогенетика, опосредованная сOrn5, более контролируема с точки зрения временной точности, чем hM3Dq.

[0121] сOrn5-оптогенетика позволяет пространственно точно контролировать клеточную активность. Ограничение кратковременной световой стимуляции (63 мс) субклеточной областью отдельной клетки НЕК 293Т, экспрессирующей сOrn5, приводило к немедленной активации одной клетки. Интересно, что в области с высокой степенью слияния клеток сигналы Ca^{2+} распространялись на окружающие клетки, что позволяет предположить межклеточную коммуникацию между клетками НЕК 293Т через еще не идентифицированный механизм (фиг. 3d, e). Полученные результаты распространяются на культуры первичных клеток. сOrn5 экспрессируется в культурах первичных астроцитов, полученных из мозга новорожденных мышей, с векторами AAV для бицистронной экспрессии сOrn5 и маркерного белка EGFP (фиг. 5a). При использовании красителя Calbryte 630 AM для мониторинга уровней Ca^{2+} было обнаружено, что освещение синим светом астроцитов, экспрессирующих сOrn5, вызывало сильные скачки концентрации Ca^{2+} (приблизительно $8 \Delta F/F$) (фиг. 5b, c). Если световая стимуляция (63 мс) точно ограничена только субклеточной областью отдельного астроцита, экспрессирующего сOrn5, наблюдалось распространение сигнала Ca^{2+} внутри отдельной клетки (фиг. 3f). Подобно тестированиям в клетках НЕК 293Т, наблюдалось волнообразное распространение сигналов Ca^{2+} от стимулированного астроцита, которые постепенно переходили в более удаленные, нестимулированные астроциты (фиг. 3g, h). Таким образом, эти эксперименты демонстрируют, что сOrn5-оптогенетика позволяет точно контролировать пространство, и предполагается, что может быть полезно изучить динамику астроцитарных сетей, которая была первоначально обнаружена при использовании нейрхимической и механической стимуляции^{40,41}.

[0122] На фиг. 3 показано, что сOrn5 чувствительно опосредует оптический контроль G_q -сигнализации с высоким временным и пространственным разрешением.

[0123] a, Схематическая диаграмма выбранных длин волн (365, 395, 470, 515, 561, 590 и 630 нм; левая панель) и амплитуд сигнала Ca^{2+} клеток НЕК 293Т, экспрессирующих сOrn5, в ответ на световую стимуляцию с различными длинами волн (2 с; 100 мкВт/мм²; правая панель). Планки погрешностей показывают S.E.M.

[0124] b, Величина ответа при различной продолжительности световой стимуляции (1, 5, 10, 20 или 50 мс; 16 мкВт/мм²; 470 нм). Планки погрешностей показывают S.E.M.

[0125] c, Временные изменения сOrn5-опосредованных сигналов Ca^{2+} при различной интенсивности света (0, 4,8, 8, 16 или 32 мкВт/мм²; 10 мс; 470 нм; для стимуляции 10 мс 16 мкВт/мм², 10% пиковой активации = $1,36 \pm 0,55$ с; 90% пиковой активации = $2,37 \pm 0,87$ с; время затухания $\tau = 18,66 \pm 4,98$ с, среднее \pm S.E.M.; n = 10 клеток).

[0126] d, Изображения распространения индуцированного светом сигнала Ca^{2+} (63 мс; 17 мкВт; стрелка указывает на область стимуляции) в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих сOrn5. Масштабная линейка, 10 мкм.

[0127] e, Псевдоцветные изображения, показывающие процесс распространения сигнала Ca^{2+} во времени d (кадр $N/(N-1) > 1$). Интервал кадров составлял 500 мс, и каждый кадр подсчитывали один раз.

[0128] f, Изображения распространения индуцированного светом сигнала Ca^{2+} в одном первичном астроците, экспрессирующем сOrn5, стимулированном в субклеточной области (размер стимуляции 4×4 мкм² и интервал кадров 300 мс). Масштабная линейка, 10 мкм.

[0129] g, Изображения распространения индуцированного светом сигнала Ca^{2+} в первичных астроцитах, экспрессирующих сOrn5. Масштабная линейка, 10 мкм.

[0130] h, Псевдоцветные изображения, демонстрирующие процесс распространения сигнала Ca^{2+} во времени g (кадр $N/(N-1) > 1$). Интервал кадров составлял 500 мс, и каждый кадр подсчитывали один раз.

[0131] На фиг. 4 показано, что сOrn5 опосредует более быстрый и чувствительный ответ на свет, чем орто-a1AR, hM3Dq или orn4.

[0132] a, Временные изменения сигнала Ca^{2+} со световыми импульсами (16 мкВт/мм²; 470 нм; 1, 5, 10, 20 или 50 мс).

[0133] b, Величина ответа при различных интенсивностях света (0, 4,8, 8, 16 или 32 мкВт/мм²) при 10 мс, 470 нм.

[0134] c, Псевдоцветные изображения исходных и пиковых сигналов Ca^{2+} ($\Delta F/F_0$) в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих орто-a1AR. Буферная среда содержит 10 мкМ

полностью транс-ретиная. Масштабная линейка, 30 мкм.

[0135] d, Влияние 60 с световой стимуляции на Ca^{2+} в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих opto-a1AR ($n = 15$ клеток; верхняя панель), и отсутствие эффекта 15 с световой стимуляции на сигналы Ca^{2+} (нижняя панель).

[0136] e, Псевдоцветные изображения исходных и пиковых сигналов Ca^{2+} ($\Delta F/F_0$) в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих OPN4 человека. Буферная среда содержит 10 мкМ полностью транс-ретиная. Масштабная линейка, 30 мкм.

[0137] f, Влияние 25 с световой стимуляции на Ca^{2+} в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих OPN4, с 10 мкМ ATR ($n = 12$ клеток; красная линия) и отсутствие эффекта без ATR в отношении сигналов Ca^{2+} (черная панель).

[0138] g, Влияние световой стимуляции на сигналы Ca^{2+} в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих cOrn5. Верхние панели показывают псевдоцветные изображения исходного и пикового ответа. На нижней панели показана тепловая карта сигналов Ca^{2+} , вызванных cOrn5-опосредованной оптогенетической стимуляцией в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих cOrn5, в 5 последовательных тестированиях. Масштабная линейка, 20 мкм.

[0139] h, Влияние хемогенетической стимуляции на сигналы Ca^{2+} в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих hM3Dq.

[0140] i, Временные изменения сигналов Ca^{2+} , вызванных cOrn5-опосредованной оптогенетической стимуляцией (10 с) и hM3Dq-опосредованной хемогенетической стимуляцией с кратковременным применением CNO (100 нМ; 10 с), соответственно.

[0141] На фиг. 5 показано, что cOrn5 эффективно опосредует активацию астроцитов.

[0142] a, cOrn5 экспрессировали в культивируемых первичных астроцитах с использованием AAV-cOrn5-T2A-EGFP (зеленый). Идентичность астроцитов подтверждали иммуноокрашиванием GFAP (красный). Масштабная линейка, 20 мкм.

[0143] b, Псевдоцветные изображения исходных и пиковых сигналов Ca^{2+} после световой стимуляции астроцитов, экспрессирующих cOrn5. Масштабная линейка, 20 мкм.

[0144] c, График сигналов Ca^{2+} и представление тепловой карты сигналов Ca^{2+} в ходе испытаний ($n = 25$ клеток).

[0145] Пример 3 cOrn5-оптогенетическая активация астроцитов индуцирует массивное высвобождение АТР и активацию нейронов *in vivo*

[0146] Тестировали производительность оптогенетики, опосредованной cOrn5, *in vivo*. Астроциты представляют собой важную популяцию невозбудимых клеток в центральной нервной системе, в отношении которых оптогенетические инструменты на

сегодняшний день достигли лишь ограниченного успеха⁴². АТФ известен как мессенджер для межклеточной коммуникации; однако влияние внутриклеточного Ca^{2+} на высвобождение АТФ в реальном времени не было визуализировано. Сверхчувствительный сенсор АТФ на основе активации GPCR GRAB_{АТФ} использовался для мониторинга изменений внеклеточных уровней АТФ. В частности, сOrn5 и сенсор GRAB_{АТФ} экспрессировался в сенсорной коре S1 мыши после инфузии векторов AAV, содержащих промотор GfaABC1D (фиг. 6а), который обычно используется для управления экспрессией генов в астроцитах.

[0147] Осуществляли двухфотонную визуализацию сигналов GRAB_{АТФ} от мышей, демонстрирующих нормальные поведенческие реакции и находящихся в состоянии бодрствования с фиксированной головой (фиг. 6а). Первоначально ожидалось, что в дополнение к свету 920 нм от импульсного лазера для двухфотонной визуализации потребуются импульсы синего света для стимуляции сигналов АТФ. Поразительно, что сам по себе свет 920 нм, подаваемый для осуществления визуализации, вызывал массивные вспышки АТФ у мышей, экспрессирующих сOrn5 и GRAB_{АТФ}, но не у мышей, которые экспрессировали сенсор АТФ, но не экспрессировали сOrn5. Индивидуальные вспышки АТФ обычно имели диаметр от 20 до 100 мкм и длились приблизительно 1 мин. Частота вспышки постепенно увеличивалась после приблизительно 1 мин начального покоя и достигала пика на уровне приблизительно 50 вспышек в минуту в области визуализации (640×640 мкм²) за приблизительно 5 мин (фиг. 6b, с и фиг. 7а). Кроме того, высокочастотные вспышки АТФ также происходили в повторных испытаниях (фиг. 7b). У мышей, экспрессирующих только GRAB_{АТФ}, наблюдались спорадические АТФ-события (приблизительно 0,3 вспышки в минуту в области визуализации); через восемь часов после провоспалительной обработки путем внутрибрюшинных инъекций липополисахарида (LPS) количество событий АТФ-вспышки увеличивалось почти в 6 раз относительно основного состояния (приблизительно 2 вспышки в минуту), но демонстрировало довольно стабильную частоту, что подтверждает, что воспаление индуцирует высвобождение АТФ в мозге. Учитывая, что наблюдаемая частота вспышек АТФ у мышей, экспрессирующих сOrn5, была приблизительно в 25 раз больше, чем при провоспалительной обработке мышей, не экспрессирующих сOrn5 (фиг. 6d, фиг. 7с), было продемонстрировано, что сOrn5-опосредованная световая активация астроцитов индуцирует непрерывное массивное высвобождение АТФ *in vivo*.

[0148] Астроциты высвобождали АТФ и другие глиотрансмиттеры, которые также действуют на нейронные рецепторы для модуляции активности нейронов. Выполняли двухфотонную визуализацию нейрональных сигналов Ca^{2+} с сOrn5-опосредованной

активацией астроцитов от мышей, демонстрирующих нормальные поведенческие реакции и находящихся в состоянии бодрствования с фиксированной головой (фиг. 6e). Клетки, экспрессирующие cOrp5 (n=406), совместно локализовались с GFAP-окрашенными клетками (n=397), но не GCaMP7b-экспрессирующими нейронами (фиг. 6f). Примеры необработанных данных и сгруппированные данные продемонстрировали, что, при сравнении 15-20 минут и 0-5 минут, активация астроцитов, опосредованная cOrp5, значительно повышала активность нейронов (фиг. 6g, h и фиг. 7d). cOrp5 строго экспрессировался в астроцитах, что было продемонстрировано совместной локализацией клеток, экспрессирующих cOrp5, и сигналов окрашивания GFAP, которые отличаются от сигналов GCaMP7b нейронов. Авторами изобретения было продемонстрировано, что cOrp5-опосредованная световая активация астроцитов повышает активность окружающих нейронов *in vivo*. Более того, данные авторов изобретения свидетельствуют о том, что длинноволновый (920 нм) свет от импульсного лазера для двухфотонной визуализации способен активировать cOrp5, что указывает на возможность двухфотонной оптогенетики для cOrp5.

[0149] На фиг. 6 показано, что cOrp5-опосредованная активация астроцитов индуцирует массивные вспышки ATP и активацию нейронов *in vivo*.

[0150] а, Схематическая диаграмма экспериментальной установки для двухфотонной визуализации (920 нм) *in vivo* высвобождения ATP после cOrp5-опосредованной активации астроцитов. На изображениях показана экспрессия cOrp5 (красный) в астроцитах и экспрессия сенсора GRAB_{ATP} (зеленый) в астроцитах в коре S1 мыши. Масштабная линейка, 100 мкм.

[0151] b, Число событий вспышек астроцитарного ATP в течение времени (0-10 мин) у контрольной мыши (без экспрессии cOrp5), мыши, обработанной LPS (без экспрессии cOrp5), и мыши, экспрессирующей cOrp5 (справа).

[0152] с, Совокупные события вспышки ATP у контрольной мыши (без экспрессии cOrp5), мыши, обработанной LPS (без экспрессии cOrp5), и мыши, экспрессирующей cOrp5. В левом столбце показаны исходные изображения GRAB_{ATP} на основном уровне (до подачи света), в среднем столбце показаны сигналы GRAB_{ATP} через 5 мин, а в правом столбце показаны события вспышки ATP с псевдоцветной кодировкой, накопленные в течение 0-20 мин.

[0153] d, Растровый график событий вспышки астроцитарного ATP в течение времени для данных, показанных в с.

[0154] е, Схематическая диаграмма экспериментальной установки для двухфотонной визуализации (920 нм) *in vivo* для визуализации кальция в нейронах после

cOrn5-опосредованной активации астроцитов. На изображениях показана экспрессия cOrn5 (красный) в астроцитах и экспрессия GCaMP7b (зеленый) в астроцитах в коре S1 мыши. Масштабная линейка, 100 мкм.

[0155] f, Клетки, экспрессирующие cOrn5 (красный), совместно локализовались с 647 нм контрастно окрашенными GFAP клетками (фиолетовый), клетки, экспрессирующие GCaMP7b (зеленый), представляют собой нейроны. 406 красных клеток с 397 фиолетовыми клетками, масштабная линейка, 100 мкм.

[0156] g, Временные профили десяти отдельных нейронов, экспрессирующих GCaMP7b, за 0~5 мин и 15~20 мин в сочетании с cOrn5-опосредованной активацией астроцитов.

[0157] h, Анализ кальциевых событий в нейронах, экспрессирующих GCaMP7b, за 0~5 мин и 15~20 мин в сочетании с cOrn5-опосредованной активацией астроцитов. N = 193 нейронов, ****P менее 0,0001, непарный t-критерий.

[0158] На фиг. 7 показано, что cOrn5 опосредует стойкое, надежное высвобождение АТР в астроцитах и активацию окружающих нейронов.

[0159] a, Пример обнаруженных событий всплеск астроцитарного АТР у мыши, экспрессирующей cOrn5, с различными цветами, указывающими на отдельные всплески.

[0160] b, События всплески АТР (0-20 мин) у мыши, экспрессирующей cOrn5, в повторном испытании через 1 час.

[0161] c, Количественное определение количества событий всплеск АТР в группах контроля, LPS и cOrn5. Для сравнения контроль-LPS **P равно 0,0066; сравнения LPS-cOrn5, **P равно 0,0031; сравнение контроль-cOrn5, ***P равно 0,0002, непарные t-тесты.

[0162] d, Анализ декодированной частоты спайков для нейронов, экспрессирующих GCaMP7b, за 0~5 мин и 15~20 мин в сочетании с cOrn5-опосредованной активацией астроцитов. N = 193 нейронов, ****P менее 0,0001, непарный t-критерий.

[0163] Пример 4 cOrn5-оптогенетика активировать нейроны и модулирует поведение животных

[0164] Исследовалось применение оптогенетики, опосредованной cOrn5, в нейронах. Сначала изучали, может ли cOrn5 опосредовать светоиндуцированные сигналы Ca²⁺. С помощью AAV и пан-нейронального промотора SYN, cOrn5 и генетически закодированный сенсор Ca²⁺ jRGECO1a экспрессировались в кортикальных нейронах мыши (фиг. 8a). В подготовленных образцах срезов головного мозга применение импульсов синего света (10 с; 100 мкВт/мм²; 473 нм) надежно вызывало скачки

концентрации Ca^{2+} в нейронах (фиг. 8b, c). Таким образом, сOrn5 также обеспечивает индуцированную светом активацию в нейронах.

[0165] Далее исследовалось влияние светоиндуцированной активации сOrn5 на электрофизиологические свойства нейронов в подготовленных образцах моторной коры, гиппокампа и дорсального стриатума (фиг. 8d). Наблюдалось два типа паттернов активации. В большинстве зарегистрированных нейронов импульсы синего света индуцировали небольшой деполяризующий ток (приблизительно 20 пА) в режиме фиксации напряжения и индуцировали замедленную, но значительную генерацию потенциалов действия в режиме фиксации тока (фиг. 8e, слева, $n = 12$ нейронов). На более высоких частотах световых импульсов сOrn5 вызывал больше спайков с более короткой задержкой (от приблизительно 5 с до приблизительно 3 с) после первоначального светового импульса, в то время как входящий ток существенно не изменялся (фиг. 9a). В другом подмножестве нейронов короткие световые импульсы быстро вызывали сильные входящие токи (от 100 до 1000 пА) и вызывали взрывную генерацию потенциалов действия (фиг. 8e, справа, $n = 6$ нейронов). Нейроны неоднократно стимулировались 10 мс/импульс при 10 Гц и демонстрировали неослабленный режим с точки зрения степени генерации при повторяющихся испытаниях световой стимуляции (фиг. 9b). Следует отметить, что в отличие от вызванного ChR2-оптогенетикой⁵³, потенциал действия, вызванный фотостимуляцией сOrn5, не привязан по времени к световым импульсам.

[0166] Наконец, оценивали пригодность оптогенетики, опосредованной сOrn5, для модуляции поведения животных. Латеральный гипоталамус (LH) представляет собой мозговой центр с известными функциями по обработке информации, связанной с вознаграждением, и по поведению при кормлении^{54,55}. сOrn5 экспрессировался в ГАМКергических нейронах LH мышей VGAT-Cre и имплантированных оптических волокнах для доставки световых импульсов в LH свободно ведущих себя мышей (фиг. 8g). В соответствии с предыдущими выводами о том, что активация ГАМК-нейронов LH стимулирует поведение при кормлении⁵⁶, световая стимуляция (20 Гц; 5 мс/импульс; 473 нм; 0,75 мВт выход из кончика волокна) вызывала значительное увеличение потребления пищи у мышей, экспрессирующих сOrn5, но не у контрольных мышей, экспрессирующих EGFP (фиг. 8h). Задача, связанная с поиском корма, использовалась для тестирования эффекта сOrn5-опосредованной оптогенетической активации ГАМК-нейронов в неопределенной зоне (*zona incerta*, ZI) (фиг. 8i), области, которая, как известно, стимулирует компульсивное пищевое поведение⁵⁷. Мыши, экспрессирующие сOrn5, по сравнению с мышами, экспрессирующими EGFP, демонстрировали значительное

увеличение времени поиска гранул корма с высоким содержанием жира при повторной световой стимуляции (фиг. 8j). Регистрацию электрофизиологических сигналов на нейронах LH и ZI, экспрессирующих cOrp5, выполняли для характеристики профилей ответа. Места инъекции и размещение оптических волокон подтверждали с помощью цельных срезов головного мозга (фиг. 10a-c). Примечательно, что мыши сохраняли поведение (поведение при кормлении или поведение по поиску корма с высоким содержанием жиров), когда свет был включен, и немедленно прекращали поведение, когда свет был выключен. Таким образом, cOrp5 является эффективным для быстрой, точной и обратимой модуляции поведенческих состояний животных.

[0167] На фиг. 8 показано, что оптогенетика, опосредованная cOrp5, изменяет поведение мыши в зависимости от нейронной цепи.

[0168] a, Схематическая диаграмма показывает экспериментальную установку для оптогенетической стимуляции и визуализации Ca^{2+} .

[0169] b, Псевдоцветные изображения показывают сигналы Ca^{2+} до и после стимуляции светом (10 с; 100 мВт/мм²; 473 нм). Масштабная линейка, 10 мкм.

[0170] c, Графики показывают профили сигнала Ca^{2+} для 6 отдельных нейронов из b.

[0171] d, Схематическая диаграмма изображает оптогенетическую стимуляцию и регистрацию цельноклеточной локальной фиксации потенциала (patch-clamp) нейронов, экспрессирующих cOrp5, в коре, стриатуме и гиппокампе.

[0172] e, Представители двух нейронов, один из которых демонстрировал сильную, замедленную генерацию потенциалов действия, но небольшие устойчивые входящие токи в ответ на световые импульсы (1 Гц, 5 с, 10 мс/импульс); другой демонстрировал быструю деполяризацию мембранного потенциала и большие входящие токи.

[0173] f, Степень генерации нейронов увеличилась после импульсной стимуляции светом 473 нм (1 Гц, 5 с) (***) P равно 0,0005, n = 18, непарный t-критерий).

[0174] g, Схематическая диаграмма экспериментальной установки для оптогенетики и анализа потребления пищи. cOrp5-EGFP экспрессировался в ГАМКергических нейронах в латеральном гипоталамусе (LH) мышей VGAT-Cre. EGFP экспрессировался в качестве контроля.

[0175] h, Сводная информация о светоиндуцированной (20 Гц; 5 мс/импульс; 473 нм; 0,75 мВт на выходе из кончика волокна), cOrp5-опосредованной активации пищевого поведения. ***P равно 0,0003; n.s., незначительное; n = 6 мышей; непарный t-критерий. Планки погрешностей показывают S.E.M.

[0176] i, Схематическая диаграмма экспериментальной установки для поведения

по поиску корма. Использовали пищевые гранулы с высоким содержанием жира. сOrn5-EGFP экспрессировался в ГАМКергических нейронах в неопределенной зоне (ZI) мышей VGAT-Cre. EGFP экспрессировался в качестве контроля.

[0177] j, Сводная информация о поведении по поиску корма, опосредованном сOrn5. Процент времени поиска рассчитывали после получения световой стимуляции до тех пор, пока мышь не находила спрятанный корм. ****P менее 0,0001; n = 6 мышей; непарный t-критерий. Планки погрешностей показывают S.E.M.

[0178] На фиг. 9 показано, что оптогенетика, опосредованная сOrn5, надежно активизирует нейроны.

[0179] a, Один репрезентативный нейрон в ответ на световые импульсы (5 с; 10 мс/импульс) при 1, 10 и 20 Гц.

[0180] b, Необработанные данные показывают, что сOrn5 опосредовал надежную и воспроизводимую фотоактивацию нейрона.

[0181] c, Сводная информация степеней генерации при повторяющихся испытаниях световой стимуляции.

[0182] На фиг. 10 показаны места инъекции и размещение оптических волокон.

[0183] a, Изображения демонстрируют экспрессию контроля EGFP и бицистронную экспрессию сOrn5 в LH (белые пунктирные линии). Места поражения и синие пунктирные линии указывают на размещение оптических волокон. Масштабная линейка, 500 мкм.

[0184] b, Места инъекции и размещение оптического волокна в ZI. Масштабная линейка, 500 мкм.

[0185] c, Регистрация электрофизиологических сигналов на нейронах LH и ZI, экспрессирующих сOrn5, характеризовала сOrn5-опосредованную световую активацию.

[0186] Пример 5

[0187] Описание экспериментов: следующая таблица 9 представляет собой частичный список ортологов сOrn5 позвоночных животных, протестированных в настоящем изобретении. Целые гены всех зарегистрированных ортологов опсина 5 позвоночных животных (подтип позвоночных, включая круглголовых рыб, хрящевых рыб, костных рыб, амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих) синтезировали и экспрессировали в клетках НЕК 293Т. Кальциевую визуализацию с или без стимуляции синим светом 470 нм выполняли для тестирования чувствительности ортологов опсина 5 в ответ на свет. Временные изменения индуцированного светом сигнала кальция демонстрировали активированную степень сигнального пути G_q и чувствительность этих ортологов.

[0188] Таблица 9:

Запись	Имя записи	Актив ность	Названия белков	Названия генов	Организм	Длина
E0R7P4	E0R7P4_XEN LA		Opn5 (опсин)	opn5.L opn5 XELAEV_1 8028134mg	Xenopus laevis (Африканская когтистая лягушка)	341
A0A455S GG5	A0A455SGG5_ 9EUPU		Опсин-5A	opn5a	Ambigolimax valentianus	425
A0A4Z2F X25	A0A4Z2FX25_ 9TELE		Опсин-5	OPN5_5 EYF80_044 932	Liparis tanakaе (рыба- улитка Танаки)	178
A0A4Z2F H27	A0A4Z2FH27_ 9TELE		Опсин-5	OPN5_4 EYF80_049 299	Liparis tanakaе (рыба- улитка Танаки)	399
A0A4Z2I DU8	A0A4Z2IDU8_ 9TELE		Опсин-5	OPN5_3 EYF80_013 671	Liparis tanakaе (рыба- улитка Танаки)	396
A0A4Z2 H0H0	A0A4Z2H0H0_ 9TELE		Опсин-5	OPN5_2 EYF80_030 918	Liparis tanakaе (рыба- улитка Танаки)	153
A0A218 USZ0	A0A218USZ0_ 9PASE		Опсин-5	OPN5_1 RLOC_0000 8660	Lonchura striata domestica (Бенгальский вьюрок)	348
A0A4Z2F VH4	A0A4Z2FVH4_ 9TELE		Опсин-5	Opn5_0 EYF80_044 930	Liparis tanakaе (рыба- улитка Танаки)	338
A0A4Z2 HA58	A0A4Z2HA58_ 9TELE		Опсин-5	OPN5_0 EYF80_027 087	Liparis tanakaе (рыба- улитка Танаки)	311
A0A218 UGP1	A0A218UGP1_ 9PASE		Опсин-5	OPN5_0 RLOC_0000 5796	Lonchura striata domestica (Бенгальский вьюрок)	417
G1L3V2	G1L3V2_AIL ME		Опсин 5	OPN5	Ailuropoda melanoleuca (Гигантская панда)	381

A0A6P4X9I3	A0A6P4X9I3_PANPR		Опсин-5	OPN5	Panthera pardus (леопард) (Felis pardus)	353
A0A1S2ZDX4	A0A1S2ZDX4_ERIEU		Опсин-5	OPN5	Erinaceus europaeus (западноевропейский еж)	353
A0A2I4C032	A0A2I4C032_9TELE		Опсин-5	opn5	Austrofundulus limnaeus	353
U3JFW4	U3JFW4_FICAL		Опсин 5	OPN5	Ficedula albicollis (мухоловка-белошейка) (Muscicapa albicollis)	357
A0A2Y9NPU7	A0A2Y9NPU7_DELLE		Опсин-5	OPN5	Delphinapterus leucas (Белуха)	362
A0A1U7U6G6	A0A1U7U6G6_CARSF		Опсин-5	OPN5	Carlito syrichta (филиппинский долгопят) (Tarsius syrichta)	354
A0A6I9I544	A0A6I9I544_VICPA		Опсин-5	OPN5	Vicugna pacos (альпака) (Lama pacos)	353
M3YLS7	M3YLS7_MUSPF		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ RECEP_F1_2	OPN5	Mustela putorius furo (европейский домашний хорек) (Mustela furo)	377
A0A5F9CCV1	A0A5F9CCV1_RABIT		Опсин 5	OPN5	Oryctolagus cuniculus (Кролик)	366
A0A671EF51	A0A671EF51_RHIFE		Опсин 5	OPN5	Rhinolophus ferrumequinum (Большая подковоносая летучая мышь)	380
A0A6P6I1D4	A0A6P6I1D4_PUMCO		Опсин-5	OPN5	Puma concolor (Горный лев)	353
G3RKG7	G3RKG7_GOR		Опсин 5	OPN5	Gorilla gorilla gorilla	382

	GO				(западная равнинная горилла)	
G1NYV5	G1NYV5_MY OLU		Опсин 5	OPN5	Myotis lucifugus (Маленькая коричневая летучая мышь)	353
A0A6J2L 9P4	A0A6J2L9P4_ 9CHIR		Опсин-5	OPN5	Phyllostomus discolor (бледная копыносовая летучая мышь)	353
A0A2K6 AXI4	A0A2K6AXI4_ MACNE		Опсин 5	OPN5	Macaca nemestrina (Свинохвостая макака)	354
A0A6J3J M90	A0A6J3JM90_ SAPAP		Опсин-5	OPN5	Sapajus apella (коричнево-шапочный капуцин) (Cebus apella)	354
A0A452T E17	A0A452TE17_ URSMA		Опсин 5	OPN5	Ursus maritimus (Белый медведь) (Thalarctos maritimus)	361
A0A384C 5D1	A0A384C5D1_ URSMA		Опсин-5	OPN5	Ursus maritimus (Белый медведь) (Thalarctos maritimus)	353
A0A2K5 U4B7	A0A2K5U4B7 _MACFA		Опсин 5	OPN5	Macaca fascicularis (Крабоядная макака) (Synomolgus monkey)	354
A0A2I3 MZV4	A0A2I3MZV4 _PAPAN		Опсин-5	OPN5	Papio anubis (оливковый бабуин)	354
A0A2K5 U4B3	A0A2K5U4B3 _MACFA		Опсин 5	OPN5	Macaca fascicularis (Крабоядная макака) (Synomolgus monkey)	382
Q6U736	OPN5_HUMAN	рассм отрен ный	Опсин-5 (рецептор 136, связанный с G-белком) (рецептор PGR12,	OPN5 GPR136 PGR12 TMEM13	Homo sapiens (человек)	354

			связанный с G-белком) (нейропсин) (трансмембран ный белок 13)			
F6UZF2	F6UZF2_XEN TR		Опсин 5	orn5	Xenopus tropicalis (Западная когтистая лягушка) (Silurana tropicalis)	345
A0A4W3 IAF8	A0A4W3IAF8 _CALMI		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ RECEP_F1_2	orn5	Callorhinchus milii (слоновая акула)	340
A0A6P7 NHM6	A0A6P7NHM6 _9TELE		Опсин-5	orn5	Parambassis ranga (индийская стекловидная рыба)	355
H3B1A3	H3B1A3_LAT CH		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ RECEP_F1_2	OPN5	Latimeria chalumnae (латимерия)	290
A0A4W3 I3H5	A0A4W3I3H5_ CALMI		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ RECEP_F1_2	orn5	Callorhinchus milii (слоновая акула)	333
A0A1S3 MCD5	A0A1S3MCD5 _SALSA		Опсин-5	orn5	Salmo salar (атлантический лосось)	328
A0A4W4 FPG5	A0A4W4FPG5 _ELEEL		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ RECEP_F1_2	orn5	Electrophorus electricus (Электрический угорь) (Gymnotus electricus)	333

			RECEP_F1_2			
A0A6P7L VJ1	A0A6P7LVJ1_ BETSP		опсин-5 изоформа X2	opn5	Betta splendens (сиамская бойцовая рыба)	308
A0A6P7L VE3	A0A6P7LVE3_ BETSP		опсин-5 изоформа X1	opn5	Betta splendens (сиамская бойцовая рыба)	365
A0A674I KC9	A0A674IKC9_ TERCA		Опсин 5	OPN5	Terrapene carolina triunguis (Трёхпалая коробчатая черепаха)	372
A0A674I MF3	A0A674IMF3_ TERCA		Опсин 5	OPN5	Terrapene carolina triunguis (Трёхпалая коробчатая черепаха)	347
F1NEY2	F1NEY2_CHI CK		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ RECEP_F1_2	OPN5	Gallus gallus (курица)	357
E6P6L8	E6P6L8_DAN RE		Опсин 5	opn5	Danio rerio (рыба- зебра) (Brachydanio rerio)	352
A0A671T VX9	A0A671TVX9 _SPA AU		Опсин 5	opn5	Sparus aurata (морской лещ дорада)	357
A0A7M4 FP40	A0A7M4FP40_ CROPO		Опсин 5	OPN5	Crocodylus porosus (Морской крокодил) (Estuarine crocodile)	357
A0A671T VX4	A0A671TVX4 _SPA AU		Опсин 5	opn5	Sparus aurata (морской лещ дорада)	353
A0A6I9Y 3G3	A0A6I9Y3G3_ 9SAUR		Опсин-5	OPN5	Thamnophis sirtalis	277
G1KNV3	G1KNV3_AN OCA		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ RECEP_F1_2	OPN5	Anolis carolinensis (Зеленый анол) (American chameleon)	347

			РЕСЕР_Ф1_2			
A0A493T549	A0A493T549_ ANAPP		Опсин 5	OPN5	Anas platyrhynchos platyrhynchos (Северная кряква)	337
A0A6I9HEL4	A0A6I9HEL4_ GEOFO		опсин-5 изоформа X2	OPN5	Geospiza fortis (средний земляной вьюрок)	354
A0A218UPZ6	A0A218UPZ6_ 9PASE		Опсин-5	OPN5 RLOC_0000 8263	Lonchura striata domestica (Бенгальский вьюрок)	304
D8KW68	D8KW68_ZON AL		Опсин 5	OPN5	Zonotrichia albicollis (белогорлый воробей)	354
A0A663EIX5	A0A663EIX5_ AQUCH		Опсин 5	OPN5	Aquila chrysaetos chrysaetos	343
G1NNA7	G1NNA7_ME LGA		Опсин 5	OPN5	Meleagris gallopavo (дикая индейка)	358
A0A663EK31	A0A663EK31_ AQUCH		Опсин 5	OPN5	Aquila chrysaetos chrysaetos	370
A0A6J0Z1K0	A0A6J0Z1K0_ ODOVR		Опсин-5	OPN5	Odocoileus virginianus texanus	353
A0A6P3J431	A0A6P3J431_ BISBI		Опсин-5	OPN5	Bison bison bison	353
A0A2K5R3Y3	A0A2K5R3Y3 _CEBIM		Опсин 5	OPN5	Cebus imitator (панамский белолицый капуцин) (Cebus capucinus imitator)	382
A0A671EF86	A0A671EF86_ RHIFE		Опсин 5	OPN5 mRhiFer1_0 12304	Rhinolophus ferrumequinum (Большая подковоносовая летучая мышь)	354
A0A6I9ZSG3	A0A6I9ZSG3_ ACIJB		Опсин-5	OPN5	Acinonyx jubatus (Гепард)	353
A0A2K6R8Q2	A0A2K6R8Q2		белок,	OPN5	Rhinopithecus roxellana	354

R8Q2	_RHIRO		содержащий домен G_PROTEIN_ RECEP_F1_2		(Золотистая курносая обезьяна) (Pygathrix roxellana)	
A0A4W2 GZA3	A0A4W2GZA3 _BOBOX		Опсин 5	OPN5	Bos indicus x Bos taurus (гибридный крупный рогатый скот)	355
U3J4Q3	U3J4Q3_ANA PP		Опсин 5	OPN5	Anas platyrhynchos platyrhynchos (Северная кряква)	380
A0A6J2V 8J5	A0A6J2V8J5_ CHACN		Опсин-5	opn5	Chanos chanos (Молочная рыба) (Mugil chanos)	355
A0A493T 6P1	A0A493T6P1_ ANAPP		Опсин 5	OPN5	Anas platyrhynchos platyrhynchos (Северная кряква)	400
A0A6J2J 0L1	A0A6J2J0L1_9 PASS		Опсин-5	OPN5	Pipra filicauda (проволочно-хвостый манакин)	354
A0A6P9 CE92	A0A6P9CE92_ PANGU		Опсин-5	OPN5	Pantherophis guttatus (кукурузный полоз) (Elaphe guttata)	357
A0A6J1V 4P8	A0A6J1V4P8_ 9SAUR		Опсин-5	OPN5	Notechis scutatus (материковая тигровая змея)	357
A0A288 HLV3	A0A288HLV3 _ANSCY		Опсин-5	OPN5	Anser cygnoid (лебединый гусь)	355
A0A151P ID4	A0A151PID4_ ALLMI		Опсин-5	OPN5 Y1Q_00202 12	Alligator mississippiensis (Американский аллигатор)	369
Q5RIV6	Q5RIV6_DAN RE		Опсин 5 (нейропсин костистой)	opn5	Danio rerio (рыба- зебра) (Brachydanio rerio)	352

			рыбы)			
D6RDV4	D6RDV4_HUMAN		Опсин-5	OPN5	Homo sapiens (человек)	382
J3KPQ2	J3KPQ2_HUMAN		Опсин-5	OPN5 hCG_16424 75	Homo sapiens (человек)	353
F6XNY7	F6XNY7_ORNAN		Опсин 5	OPN5	Ornithorhynchus anatinus (утконос)	327
A0A2K6FXK2	A0A2K6FXK2_PROCO		Опсин 5	OPN5	Propithecus coquereli (Сифака Кокереля) (Propithecus verreauxi coquereli)	354
E2RPZ0	E2RPZ0_CANLF		Опсин 5	OPN5	Canis lupus familiaris (Собака) (Canis familiaris)	380
A0A2K6V732	A0A2K6V732_SAIBB		Опсин 5	OPN5	Saimiri boliviensis boliviensis (Боливийская беличья обезьяна)	381
A0A4X2K722	A0A4X2K722_VOMUR		Опсин 5	OPN5	Vombatus ursinus (обыкновенный вомбат)	353
A0A6P5KYE6	A0A6P5KYE6_PHACI		Опсин-5	OPN5	Phascolarctos cinereus (Коала)	355
A0A2K6FXJ4	A0A2K6FXJ4_PROCO		Опсин 5	OPN5	Propithecus coquereli (Сифака Кокереля) (Propithecus verreauxi coquereli)	380
A0A4X2JZA4	A0A4X2JZA4_VOMUR		Опсин 5	OPN5	Vombatus ursinus (обыкновенный вомбат)	353
G1SX53	G1SX53_RABIT		Опсин 5	OPN5	Oryctolagus cuniculus (Кролик)	353
A0A2U3WI94	A0A2U3WI94		Опсин-5	OPN5	Odobenus rosmarus	353

WI94	ODORO				divergens (тихоокеанский морж)	
A0A2K6V724	A0A2K6V724_SAIBB		Опсин 5	OPN5	Saimiri boliviensis boliviensis (Боливийская беличья обезьяна)	354
A0A3Q7XKC9	A0A3Q7XKC9_URSAR		Опсин-5	OPN5	Ursus arctos horribilis	353
A0A452RBH1	A0A452RBH1_URSAM		Опсин 5	OPN5	Ursus americanus (Американский черный медведь) (Euarctos americanus)	353
G1QVY1	G1QVY1_NO_MLE		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ RECEP_F1_2	OPN5	Nomascus leucogenys (Северный белощекий гиббон) (Hylobates leucogenys)	382
G1QVX6	G1QVX6_NO_MLE		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ RECEP_F1_2	OPN5	Nomascus leucogenys (Северный белощекий гиббон) (Hylobates leucogenys)	354
G3SJY5	G3SJY5_GORGO		Опсин 5	OPN5	Gorilla gorilla gorilla (западная равнинная горилла)	354
A0A7N9CSX2	A0A7N9CSX2_MACFA		Опсин 5	OPN5	Macaca fascicularis (Крабоядная макака) (Synomolgus monkey)	353
A0A384B2Q9	A0A384B2Q9_BALAS		Опсин-5	OPN5	Balaenoptera acutorostrata scammoni (Северный тихоокеанский малый полосатик) (Balaenoptera	353

					davidsoni)	
A0A2K6L978	A0A2K6L978_RHIBE		белок, содержащий домен G_PROTEIN_RECEP_F1_2	OPN5	Rhinopithecus bieti (Черная курносая обезьяна) (Pygathrix bieti)	333
A0A2K6AXE7	A0A2K6AXE7_MACNE		Опсин 5	OPN5	Macaca nemestrina (Свинохвостая макака)	382
A0A2J8P0S9	A0A2J8P0S9_PANTR		Опсин 5	OPN5	Pan troglodytes (шимпанзе)	354
W5PR22	W5PR22_SHEEP		белок, содержащий домен G_PROTEIN_RECEP_F1_2	OPN5	Ovis aries (Овцы)	377
F7DJ88	F7DJ88_CALJA		белок, содержащий домен G_PROTEIN_RECEP_F1_2	OPN5	Callithrix jacchus (Белоухая мармозетка)	382
A0A2K5R3Z8	A0A2K5R3Z8_CEBIM		Опсин 5	OPN5	Cebus imitator (панамский белолицый капуцин) (Cebus capucinus imitator)	354
F6PHB6	F6PHB6_CALJA		белок, содержащий домен G_PROTEIN_RECEP_F1_2	OPN5	Callithrix jacchus (Белоухая мармозетка)	354
M3WMC9	M3WMC9_FELCA		Опсин 5	OPN5	Felis catus (Кошка) (Felis silvestris catus)	353
A0A2K5L5D5	A0A2K5L5D5_CERAT		Опсин 5	OPN5	Cercocebus atys (воротничковый мангабей) (Cercocebus	382

					torquatus atys)	
E1BNN4	E1BNN4_BOV IN		Опсин 5	OPN5	Bos taurus (крупный рогатый скот)	353
F6RFW7	F6RFW7_MA CMU		Опсин 5	OPN5	Macaca mulatta (Макака-резус)	354
A0A2J8R KP9	A0A2J8RKP9_ PONAB		Неохарактериз ованный белок	OPN5	Pongo abelii (суматранский орангутан) (Pongo pygmaeus abelii)	354
A0A3Q7 RXX8	A0A3Q7RXX8 _VULVU		Опсин-5	OPN5	Vulpes vulpes (рыжая лисица)	353
A0A2K5 L5D9	A0A2K5L5D9 _CERAT		Опсин 5	OPN5	Cercocebus atys (воротничковый мангабей) (Cercocebus torquatus atys)	354
H0WJY2	H0WJY2_OTO GA		Опсин 5	OPN5	Otolemur garnettii (Малоухий галаго) (Garnett's greater bushbaby)	352
A0A6P3E NQ6	A0A6P3ENQ6 _SHEEP		Опсин-5	OPN5	Ovis aries (Овцы)	353
G3UA68	G3UA68_LOX AF		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ RECEP_F1_2	OPN5	Loxodonta africana (Африканский слон)	377
A0A6P5 DVT1	A0A6P5DVT1 _BOSIN		Опсин-5	OPN5	Bos indicus (Зебу)	360
A0A0D9 RJS4	A0A0D9RJS4_ CHLSB		Опсин 5	OPN5	Chlorocebus sabaesus (Зеленая мартышка) (Cercopithecus sabaesus)	352
I3LTK7	I3LTK7_PIG		Опсин 5	OPN5	Sus scrofa (Свинья)	378
A0A2K5 Z564	A0A2K5Z564_ MANLE		Опсин 5	OPN5	Mandrillus leucophaeus (Дрил) (Papio	382

					leucophaeus)	
A0A5G2R7I1	A0A5G2R7I1_PIG		Опсин 5	OPN5	Sus scrofa (Свинья)	353
A0A6I9JGH7	A0A6I9JGH7_CHRAS		Опсин-5	OPN5	Chrysochloris asiatica (Кейпский золотой крот)	353
A0A2K5Z517	A0A2K5Z517_MANLE		Опсин 5	OPN5	Mandrillus leucophaeus (Дрил) (Papio leucophaeus)	354
A0A452FM79	A0A452FM79_CAPRI		Опсин 5	OPN5	Capra hircus (Коза)	353
F6SJH5	F6SJH5_HORSE		Опсин 5	OPN5	Equus caballus (Лошадь)	382
A0A2R9BTW5	A0A2R9BTW5_PANPA		Опсин 5	OPN5	Pan paniscus (карликовый шимпанзе) (Bonobo)	353
A0A2Y9FNI2	A0A2Y9FNI2_PHYMC		Опсин-5	OPN5	Physeter macrocephalus (Кашалот) (Physeter catodon)	353
A0A340WR35	A0A340WR35_LIPVE		Опсин-5	OPN5	Lipotes vexillifer (дельфин реки Янцзы)	353
A0A6J2DJL3	A0A6J2DJL3_ZALCA		Опсин-5	OPN5	Zalophus californianus (калифорнийский тюлень)	353
A0A4X1UZM3	A0A4X1UZM3_PIG		белок, содержащий домен G_PROTEIN_RECEP_F1_2	OPN5	Sus scrofa (Свинья)	378
A0A673TX31	A0A673TX31_SURSU		Опсин 5	OPN5	Suricata suricatta (сурикат)	381
A0A341D5X7	A0A341D5X7_NEOAA		Опсин-5	OPN5	Neophocaena asiaorientalis asiaorientalis	353

					(бесперая морская свинья реки Янцзы) (<i>Neophocaena phocaenoides</i> subsp. <i>asiaeorientalis</i>)	
A0A667F WA1	A0A667FWA1 _LYNCA		Опсин 5	OPN5	<i>Lynx canadensis</i> (Канадская рысь)	376
A0A5B7 H9S7	A0A5B7H9S7_ PORTR		Опсин-5	Opn5 E2C01_063 173	<i>Portunus trituberculatus</i> (Краб-плавунец) (<i>Neptunus trituberculatus</i>)	74
A0A337S C50	A0A337SC50_ FELCA		Опсин 5	OPN5	<i>Felis catus</i> (Кошка) (<i>Felis silvestris catus</i>)	376
H2RD19	H2RD19_PAN TR		Опсин 5	OPN5	<i>Pan troglodytes</i> (шимпанзе)	382
A0A2U3 X849	A0A2U3X849_ LEPWE		Опсин-5	OPN5	<i>Leptonychotes weddellii</i> (тюлень Уэдделла) (<i>Otaria weddellii</i>)	365
G3THK6	G3THK6_LOX AF		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ RECEP_F1_2	OPN5	<i>Loxodonta africana</i> (Африканский слон)	360
A0A2U3 V1E1	A0A2U3V1E1 _TURTR		Опсин-5	OPN5	<i>Tursiops truncatus</i> (атлантический бутылконосый дельфин) (<i>Delphinus truncatus</i>)	353
A0A096 NIY4	A0A096NIY4_ PAPAN		Опсин-5	OPN5	<i>Pario anubis</i> (оливковый бабуин)	382
A0A6P3P SZ2	A0A6P3PSZ2_ PTEVA		Опсин-5	OPN5	<i>Pteropus vampyrus</i> (большая летучая лисица)	353
A0A2K5	A0A2K5EFR2		Опсин 5	OPN5	<i>Aotus nancymaae</i>	382

EFR2	_AOTNA				(ночная обезьяна Ма)	
A0A3Q7 QKC2	A0A3Q7QKC2 _CALUR		Опсин-5	OPN5	Callorhinus ursinus (Северный морской котик)	353
F7DVJ0	F7DVJ0_MON DO		Опсин 5	OPN5	Monodelphis domestica (Серый короткохвостый опоссум)	346
A0A2K5 EFU2	A0A2K5EFU2 _AOTNA		Опсин 5	OPN5	Aotus nancуmaae (ночная обезьяна Ма)	354
A0A5F8 H1F1	A0A5F8H1F1_ MONDO		Опсин 5	OPN5	Monodelphis domestica (Серый короткохвостый опоссум)	347
A0A2Y9 H826	A0A2Y9H826_ NEOSC		Опсин-5	OPN5	Neomonachus schauinslandi (Гавайский тюлень-монах) (Monachus schauinslandi)	353
G3W284	G3W284_SAR HA		Опсин 5	OPN5	Sarcophilus harrisii (тасманийский дьявол) (Sarcophilus lanarius)	355
A0A3Q0 CTY5	A0A3Q0CTY5 _MESAU		Опсин-5	Opn5	Mesocricetus auratus (Золотистый хомяк)	254
A0A6P5 NS60	A0A6P5NS60_ MUSCR		Опсин-5	Opn5	Mus caroli (мышь Рюкю) (Ricefield mouse)	377
H0V671	H0V671_CAV PO		Опсин 5	OPN5	Cavia porcellus (морская свинка)	333
I3M1B1	I3M1B1_ICTT R		Опсин 5	OPN5	Ictidomys tridecemlineatus (Тринадцатиполосая земляная белка) (Spermophilus	353

					tridecemlineatus)	
Q7TQN6	Q7TQN6_RAT		Рецептор 136, связанный с G-белком (опсин 5)	Opn5 Gpr136	Rattus norvegicus (Крыса)	534
A0A287CZD4	A0A287CZD4_ICTTR		Опсин 5	OPN5	Ictidomys tridecemlineatus (Тринадцатиполосая земляная белка) (Spermophilus tridecemlineatus)	378
A0A1W6KZ83	A0A1W6KZ83_9RODE		Нейропсин	OPN5	Cricetulus barabensis (полосатый карликовый хомяк)	377
A0A6I9MCW1	A0A6I9MCW1_PERMB		Опсин-5	Opn5	Peromyscus maniculatus bairdii (степной олений хомячок)	377
A0A6P3EVC3	A0A6P3EVC3_OCTDE		Опсин-5	Opn5	Octodon degus (Дегу) (Sciurus degus)	353
A0A1S3FD42	A0A1S3FD42_DIPOR		Белок низкого качества: опсин-5	Opn5	Dipodomys ordii (кенгуровый прыгун Орда)	603
A0A6A4VE33	A0A6A4VE33_AMPAM		Опсин-5	OPN5 FJT64_0104 58	Amphibalanus amphitrite (полосатый морской желудь) (Balanus amphitrite)	358
A0A4P2TKU6	A0A4P2TKU6_PAROL		Нейропсин	OPN5	Paralichthys olivaceus (ложный палтус) (Hippoglossus olivaceus)	354
A0A670IDE8	A0A670IDE8_PODMU		белок, содержащий домен G_PROTEIN_	OPN5	Podarcis muralis (стенная ящерица) (Lacerta muralis)	358

			РЕСЕР_F1_2			
A0A1U7S163	A0A1U7S163_ ALLSI		Опсин-5	OPN5	Alligator sinensis (Китайский аллигатор)	350
A0A670Y2N7	A0A670Y2N7_ PSETE		Опсин 5	OPN5	Pseudonaja textilis (Восточная коричневая змея)	385
K7FFW2	K7FFW2_PEL SI		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ РЕСЕР_F1_2	OPN5	Pelodiscus sinensis (китайская мягкотелая черепаха) (Trionyx sinensis)	369
D9N3D0	D9N3D0_COT JA		Опсин 5	OPN5	Coturnix japonica (Японский перепел) (Coturnix coturnix japonica)	378
Q6VZZ7	OPN5_MOUS E	рассм отрен ный	Опсин-5 (рецептор 136, связанный с G-белком) (рецептор PGR12, связанный с G-белком) (нейропсин)	Opn5 Gpr136 Pgr12	Mus musculus (Мышь)	377
D8KWH6	D8KWH6_ZO NAL		Опсин 5	OPN5	Zonotrichia albicollis (белогорлый воробей)	354
A0A674PK4	A0A674PPK4_ TAKRU		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ РЕСЕР_F1_2	opn5	Takifugu rubripes (Японская рыба фугу) (Fugu rubripes)	363
A0A674HDZ6	A0A674HDZ6_ _TAEGU		белок, содержащий домен	OPN5	Taeniopygia guttata (зебра-вьюрок) (Poephila guttata)	354

			G_PROTEIN_ RECEP_F1_2			
H2V568	H2V568_TAK RU		белок, содержащий домен G_PROTEIN_ RECEP_F1_2	орп5	Takifugu rubripes (Японская рыба фугу) (Fugu rubripes)	394
A0A6J0H 1N3	A0A6J0H1N3_ 9PASS		Опсин-5	OPN5	Lepidothrix coronata (синий коронованный манакин)	351
A0A672 UEH1	A0A672UEH1 _STRHB		Опсин 5	OPN5	Strigops habroptila (Какапо)	377
A0A672 UBX7	A0A672UBX7 _STRHB		Опсин 5	OPN5	Strigops habroptila (Какапо)	349
A0A6J0U 919	A0A6J0U919_ 9SAUR		Опсин-5	OPN5	Pogona vitticeps (Центральная бородатая агама)	348
A0A6J8E 395	A0A6J8E395_ MYTCO		OPN5	MCOR_463 47	Mytilus coruscus (Морская мидия)	317
A0A6J7Z Z06	A0A6J7ZZ06_ MYTCO		OPN5	MCOR_143 9	Mytilus coruscus (Морская мидия)	235
A0A2J8R KQ7	A0A2J8RKQ7_ PONAB		OPN5 изоформа 1	CR201_G00 50220	Pongo abelii (суматранский орангутан) (Pongo pygmaeus abelii)	382
A0A2J8P 0V4	A0A2J8P0V4_ PANTR		OPN5 изоформа 4	CK820_G00 07353	Pan troglodytes (шимпанзе)	353
A0A212 D584	A0A212D584_ CEREH		OPN5	Celaphus_00 014381	Cervus elaphus hippelaphus (Европейский красный олень)	263

[0189] Ссылки

1 Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schioth, H. B. & Gloriam, D. E. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. Nat Rev Drug Discov

16, 829-842, doi:10.1038/nrd.2017.178 (2017).

2 Wettschureck, N. & Offermanns, S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85, 1159-1204, doi:10.1152/physrev.00003.2005 (2005).

3 Exton, J. H. Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, 481-509, doi:10.1146/annurev.pa.36.040196.002405 (1996).

4 Ritter, S. L. & Hall, R. A. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 819-830 (2009).

5 Kadamur, G. & Ross, E. M. Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol* 75, 127-154, doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183750 (2013).

6 Gomez, J. L. et al. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science* 357, 503-507, doi:10.1126/science.aan2475 (2017).

7 Adams, S. R. & Tsien, R. Y. Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annual review of physiology* 55, 755-784 (1993).

8 Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8, 1263-1268, doi:10.1038/nn1525 (2005).

9 Fenno, L., Yizhar, O. & Deisseroth, K. The Development and Application of Optogenetics. *Annual Review of Neuroscience* 34, 389-412, doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113817 (2011).

10 Quadrato, G. et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature* 545, 48-53 (2017).

11 Rost, B. R., Schneider-Warme, F., Schmitz, D. & Hegemann, P. Optogenetic tools for subcellular applications in neuroscience. *Neuron* 96, 572-603 (2017).

12 Tye, K. M. & Deisseroth, K. Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nature Reviews Neuroscience* 13, 251-266 (2012).

13 Zhang, F. et al. The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell* 147, 1446-1457 (2011).

14 Airan, R. D., Thompson, K. R., Fenno, L. E., Bernstein, H. & Deisseroth, K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature* 458, 1025-1029, doi:10.1038/nature07926 (2009).

15 Tichy, A. M., Gerrard, E. J., Sexton, P. M. & Janovjak, H. Light-activated chimeric GPCRs: limitations and opportunities. *Curr Opin Struct Biol* 57, 196-203, doi:10.1016/j.sbi.2019.05.006 (2019).

16 Koyanagi, M. & Terakita, A. Diversity of animal opsin-based pigments and their

optogenetic potential. *Biochim Biophys Acta* 1837, 710-716, doi:10.1016/j.bbabi.2013.09.003 (2014).

17 Yau, K.-W. & Hardie, R. C. Phototransduction motifs and variations. *Cell* 139, 246-264 (2009).

18 Copits, B. A. et al. A photoswitchable GPCR-based opsin for presynaptic inhibition. *Neuron* 109, 1791-1809 e1711, doi:10.1016/j.neuron.2021.04.026 (2021).

19 Mahn, M. et al. Efficient optogenetic silencing of neurotransmitter release with a mosquito rhodopsin. *Neuron* 109, 1621-1635 e1628, doi:10.1016/j.neuron.2021.03.013 (2021).

20 Güler, A. D. et al. Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* 453, 102-105 (2008).

21 Hankins, M. W., Peirson, S. N. & Foster, R. G. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends in neurosciences* 31, 27-36 (2008).

22 Hattar, S., Liao, H.-W., Takao, M., Berson, D. M. & Yau, K.-W. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065-1070 (2002).

23 Xue, T. et al. Melanopsin signalling in mammalian iris and retina. *Nature* 479, 67-73 (2011).

24 Qiu, X. et al. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature* 433, 745-749 (2005).

25 Melyan, Z., Tarttelin, E. E., Bellingham, J., Lucas, R. J. & Hankins, M. W. Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature* 433, 741-745, doi:10.1038/nature03344 (2005).

26 Kojima, D. et al. UV-sensitive photoreceptor protein OPN5 in humans and mice. *PLoS One* 6, e26388, doi:10.1371/journal.pone.0026388 (2011).

27 Yamashita, T. et al. Opn5 is a UV-sensitive bistable pigment that couples with Gi subtype of G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22084-22089, doi:10.1073/pnas.1012498107 (2010).

28 Zhang, K. X. et al. Violet-light suppression of thermogenesis by opsin 5 hypothalamic neurons. *Nature* 585, 420-425, doi:10.1038/s41586-020-2683-0 (2020).

29 Nakane, Y. et al. A mammalian neural tissue opsin (Opsin 5) is a deep brain photoreceptor in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 15264-15268 (2010).

30 Nakane, Y., Shimmura, T., Abe, H. & Yoshimura, T. Intrinsic photosensitivity of a deep brain photoreceptor. *Current Biology* 24, R596-R597 (2014).

31 Rios, M. N., Marchese, N. A. & Guido, M. E. Expression of Non-visual Opsins

Opn3 and Opn5 in the Developing Inner Retinal Cells of Birds. Light-Responses in Muller Glial Cells. *Front Cell Neurosci* 13, 376, doi:10.3389/fncel.2019.00376 (2019).

32 Mederos, S. et al. Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte - neuron networks. *Glia* 67, 915-934 (2019).

33 Taniguchi, M. et al. Structure of YM-254890, a Novel Gq/11 Inhibitor from *Chromobacterium* sp. QS3666. *Tetrahedron* 59, 4533-4538, doi:10.1016/s0040-4020(03)00680-x (2003).

34 Hartwig, J. et al. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356, 618-622 (1992).

35 Zhang, F., Wang, L.-P., Boyden, E. S. & Deisseroth, K. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nature methods* 3, 785-792 (2006).

36 Lin, J. Y. A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Experimental physiology* 96, 19-25 (2011).

37 Gomez, J. L. et al. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science* 357, 503-507 (2017).

38 Krashes, M. J. et al. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *The Journal of clinical investigation* 121, 1424-1428 (2011).

39 Rogan, S. C., Roth, B. L. & Morrow, A. L. Remote Control of Neuronal Signaling. *Pharmacological Reviews* 63, 291-315, doi:10.1124/pr.110.003020 (2011).

40 Charles, A. C., Merrill, J. E., Dirksen, E. R. & Sandersont, M. J. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6, 983-992 (1991).

41 Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S. & Smith, S. J. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247, 470-473 (1990).

42 Zhang, F., Wang, L. P., Boyden, E. S. & Deisseroth, K. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods* 3, 785-792, doi:10.1038/nmeth936 (2006).

43 Davalos, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience* 8, 752-758 (2005).

44 Zhang, J.-m. et al. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40, 971-982 (2003).

45 Zhang, Z. et al. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nature cell biology* 9, 945-953 (2007).

46 Wu, Z. & Li, Y. New frontiers in probing the dynamics of purinergic transmitters in vivo. *Neuroscience research* 152, 35-43 (2020).

- 47 Wu, Z. et al., doi:10.1101/2021.02.24.432680 (2021).
- 48 Lawlor, P. A., Bland, R. J., Mouravlev, A., Young, D. & During, M. J. Efficient gene delivery and selective transduction of glial cells in the mammalian brain by AAV serotypes isolated from nonhuman primates. *Molecular therapy* 17, 1692-1702 (2009).
- 49 Lee, Y., Messing, A., Su, M. & Brenner, M. GFAP promoter elements required for region - specific and astrocyte - specific expression. *Glia* 56, 481-493 (2008).
- 50 Bal-Price, A., Moneer, Z. & Brown, G. C. Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia* 40, 312-323, doi:10.1002/glia.10124 (2002).
- 51 Murakami, K., Nakamura, Y. & Yoneda, Y. Potentiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes. *Neuroscience* 117, 37-42 (2003).
- 52 Lezmy, J. et al. Astrocyte Ca²⁺-evoked ATP release regulates myelinated axon excitability and conduction speed. *Science* 374, eabh2858, doi:10.1126/science.abh2858 (2021).
- 53 Tian, L. et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature methods* 6, 875-881 (2009).
- 54 Jennings, J. H., Rizzi, G., Stamatakis, A. M., Ung, R. L. & Stuber, G. D. The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science* 341, 1517-1521 (2013).
- 55 Stuber, G. D. & Wise, R. A. Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat Neurosci* 19, 198-205, doi:10.1038/nn.4220 (2016).
- 56 Li, Y. et al. Hypothalamic Circuits for Predation and Evasion. *Neuron* 97, 911-924 e915, doi:10.1016/j.neuron.2018.01.005 (2018).
- 57 Zhang, X. & van den Pol, A. N. Rapid binge-like eating and body weight gain driven by zona incerta GABA neuron activation. *Science* 356, 853-859, doi:10.1126/science.aam7100 (2017).
- 58 Tsukamoto, H. & Terakita, A. Diversity and functional properties of bistable pigments. *Photochemical & Photobiological Sciences* 9, 1435-1443 (2010).
- 59 Ellis-Davies, G. C. Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nature methods* 4, 619-628 (2007).
- 60 Adams, S. R. & Tsien, R. Y. Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annu Rev Physiol* 55, 755-784, doi:10.1146/annurev.ph.55.030193.003543 (1993).
- 61 Chen, T.-W. et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295-300 (2013).
- 62 Jing, M. et al. An optimized acetylcholine sensor for monitoring in vivo

cholinergic activity. *Nature methods* 17, 1139-1146 (2020).

63 Sun, F. et al. A genetically encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. *Cell* 174, 481-496. e419 (2018).

64 Wan, J. et al. A genetically encoded sensor for measuring serotonin dynamics. *Nature Neuroscience* 24, 746-752 (2021).

65 Zhao, Y. et al. An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ indicators. *Science* 333, 1888-1891 (2011).

66 Hochbaum, D. R. et al. All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins. *Nat Methods* 11, 825-833, doi:10.1038/nmeth.3000 (2014).

67 Sahel, J.-A. et al. Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nature Medicine*, 1-7 (2021).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный светочувствительный опсин для активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

2. Выделенный опсин по п. 1, представляющий собой выделенный опсин организма, его гомологи, его ортологи, его паралоги, их фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

3. Выделенный опсин по п. 1, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с опсином дикого типа указанного организма, его гомологами, его ортологами, его паралогами, их фрагментами или вариантами и имеющий активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

4. Выделенный опсин по п. 1, представляющий собой выделенный опсин 5 (Orn5) животного, его гомологи, его ортологи, его паралоги, их фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

5. Выделенный опсин по п. 4, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с опсином 5 (Orn5) дикого типа указанного животного, его гомологами, его ортологами, его паралогами, их фрагментами или вариантами и имеющий активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

6. Выделенный опсин по п. 2, где организм представляет собой позвоночное животное.

7. Выделенный опсин по п. 6, где позвоночное животное представляет собой птицу, рептилию или рыбу, амфибию или млекопитающее,

предпочтительно животное представляет собой птицу, включая, но не ограничиваясь, курицу, утку, гуся, страуса, эму, нанду, киви, казуара, индейку, перепела, курицу, сокола, орла, ястреба, голубя, попугайчика, какаду, макао, попугая, птицу из отряда воробьинообразных (такую как, певчая птица), сойку, черного дрозда, вьюрка, певуна и воробья; или

предпочтительно животное представляет собой рептилию, включая, но не ограничиваясь, ящерицу, змею, аллигатора, черепаху, крокодила и сухопутную черепаху; или

предпочтительно животное представляет собой рыбу, включая, но не ограничиваясь,

сома, угрей, акул и рыбу-меч; или

предпочтительно животное представляет собой амфибию, включая, но не ограничиваясь, жабу, лягушку, тритона и саламандру.

8. Выделенный опсин по п. 4, где выделенный опсин 5 (Opn5) представляет собой выделенный опсин 5 (Opn5) дикого типа курицы, или его фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток; или

выделенный опсин 5 (Opn5) имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с опсином 5 (Opn5) дикого типа курицы и имеет активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

9. Выделенный опсин по п. 4, где выделенный опсин 5 (Opn5) представляет собой выделенный опсин 5 (Opn5) дикого типа черепахи, или его фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток; или

выделенный опсин 5 (Opn5) имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с опсином 5 (Opn5) дикого типа черепахи и имеет активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

10. Выделенный опсин по п. 4, где выделенный опсин 5 (Opn5) имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:1 (сOpn5), или ее фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток; или

выделенный опсин 5 (Opn5) имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:1 (сOpn5), и имеет активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

11. Выделенный опсин по п. 4, где выделенный опсин 5 (Opn5) имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:2 (tOpn5), или ее фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток; или

выделенный опсин 5 (Opn5) имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с аминокислотной

последовательностью, показанной в SEQ ID NO:2 (tOpn5), и имеет активность в отношении активации G_q -сигнализации и/или активации клеток.

12. Выделенный опсин по п. 4, где свет имеет длину волны в диапазоне от 360 до 520 нм, предпочтительно от 450 до 500, более предпочтительно от 460 до 480 нм, в частности, 470 нм.

13. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный опсин по любому из пп. 1-12.

14. Химерный ген, содержащий последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п. 13, функциональной связанную с подходящими регуляторными последовательностями.

15. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 13 или химерный ген по п. 14.

16. Вектор по п. 15, представляющий собой эукариотический вектор, прокариотический вектор экспрессии, вирусный вектор или дрожжевой вектор.

17. Вектор по п. 16, представляющий собой вектор вируса простого герпеса, вектор вируса осповакцины или аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор, ретровирусный вектор или вектор насекомых, предпочтительно вектор представляет собой рекомбинантный AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVS, AAVO или AAV10.

18. Вектор по п. 17, представляющий собой вектор экспрессии или вектор для генной терапии.

19. Выделенная клетка или клеточная культура, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п. 13, химерный ген по п. 14 или вектор по любому из пп. 15-18.

20. Применение выделенного опсина по любому из пп.1-12, выделенной нуклеиновой кислоты по п. 13, химерного гена по п. 14, вектора по любому из пп. 15-18 или выделенной клетки или клеточной культуры по п. 19 для лечения заболевания или состояния, опосредованного активацией G_q -сигнализации и/или активацией клеток или сопряженного с ними.

21. Способ лечения заболевания или состояния, опосредованного активацией G_q -сигнализации и/или активацией клеток или сопряженного с ними, у субъекта, включающий введение выделенного опсина по любому из пп. 1-12, выделенной нуклеиновой кислоты по п. 13, химерного гена по п. 14, вектора по любому из пп. 15-18 или выделенной клетки или клеточной культуры по п. 19.

22. Способ по п. 21, где заболевание или состояние, опосредованное активацией G_q -сигнализации и/или активацией клеток или сопряженное с ними, включает, но не

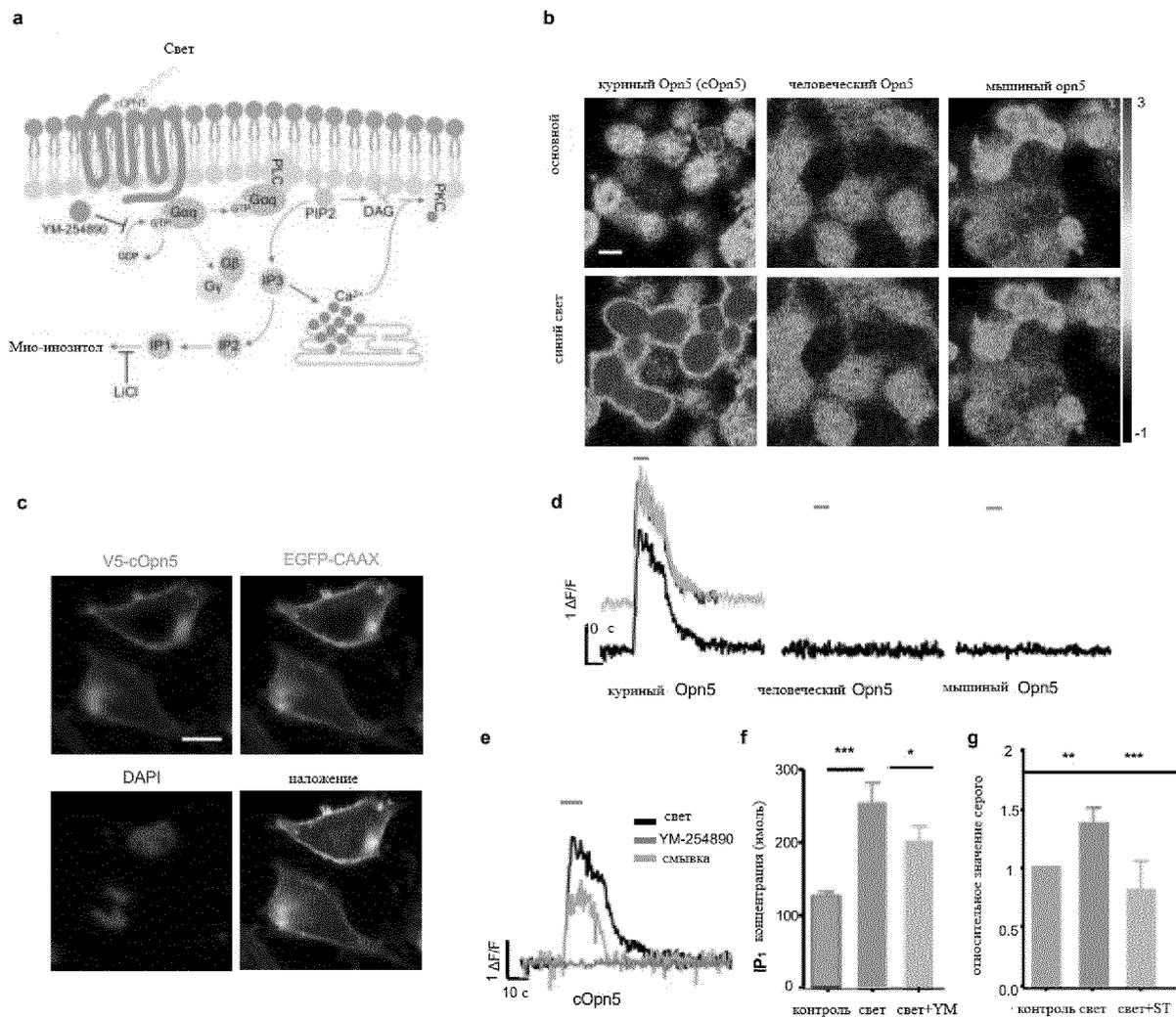
ограничивается, заболевания или состояния, на которые оказывает благоприятное действие активация G_q -сигнализации и/или активация клеток, например, на которые оказывает благоприятное действие активация астроцитов, сильное высвобождение АТФ или повышение активности нейронов.

23. Способ по п. 21, где заболевание или состояние, опосредованное активацией G_q -сигнализации и/или активацией клеток или сопряженное с ними, включает, но не ограничивается, заболевания или состояния, на которые оказывает благоприятное действие активация клеток, таких как островковые клетки, иммунные клетки, нервные клетки, например, центральные нейроны, астроциты, глиальные клетки, мышечные клетки, скелетные клетки, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки, клетки нервной системы, клетки кожи, клетки легких, клетки почек и клетки печени, клетки сердца или сосудистые эндотелиальные клетки.

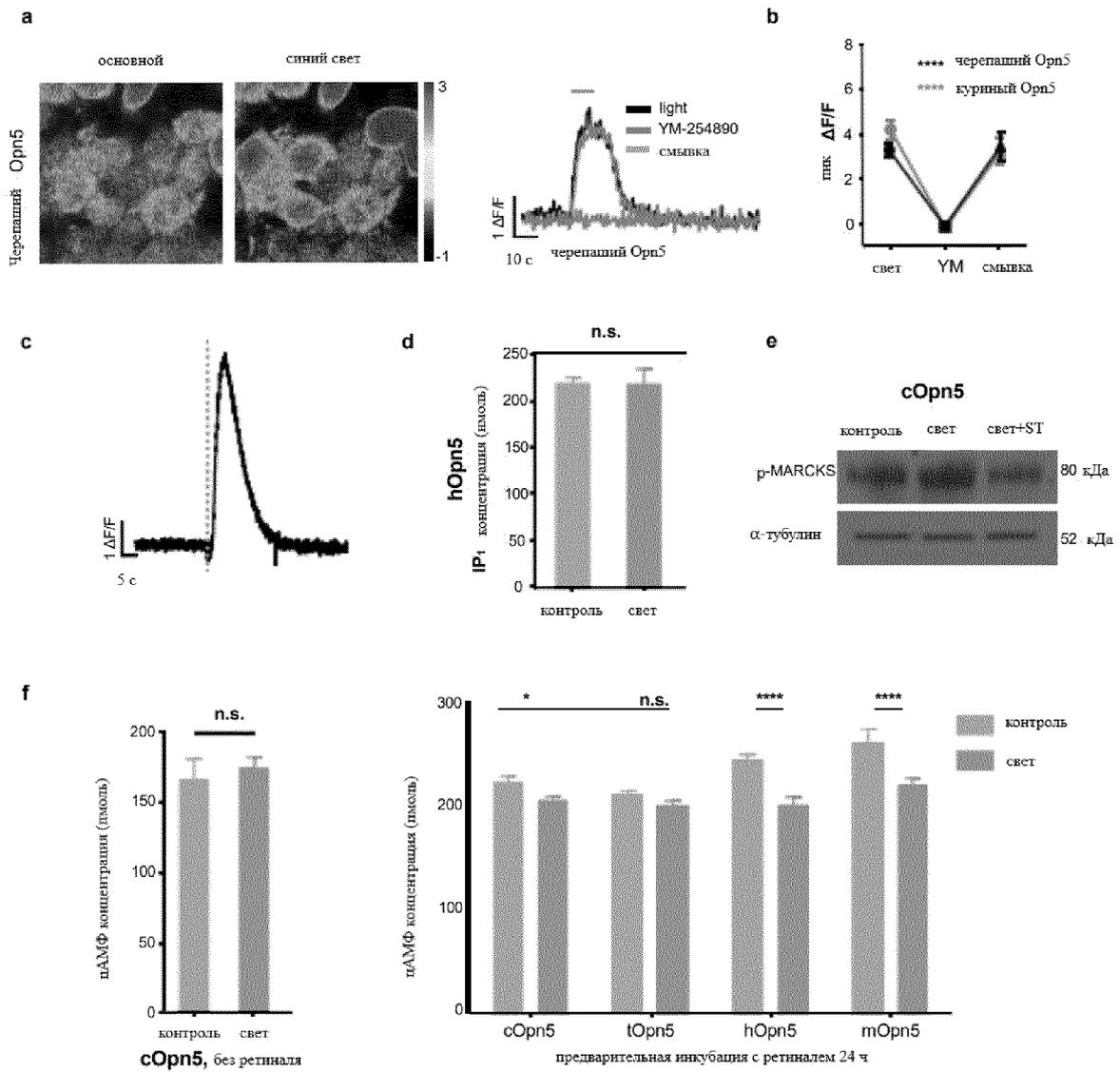
24. Способ по п. 21, где заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное заболевание, порок развития, метаболическое заболевание, психическое заболевание, заболевание респираторной системы или сердечно-сосудистое заболевание.

25. Способ по п. 21, дополнительно включающий применение синего света, имеющего длину волны в диапазоне от 360 до 550 нм, предпочтительно от 450 до 500, более предпочтительно от 460 до 480 нм, в частности, 470 нм.

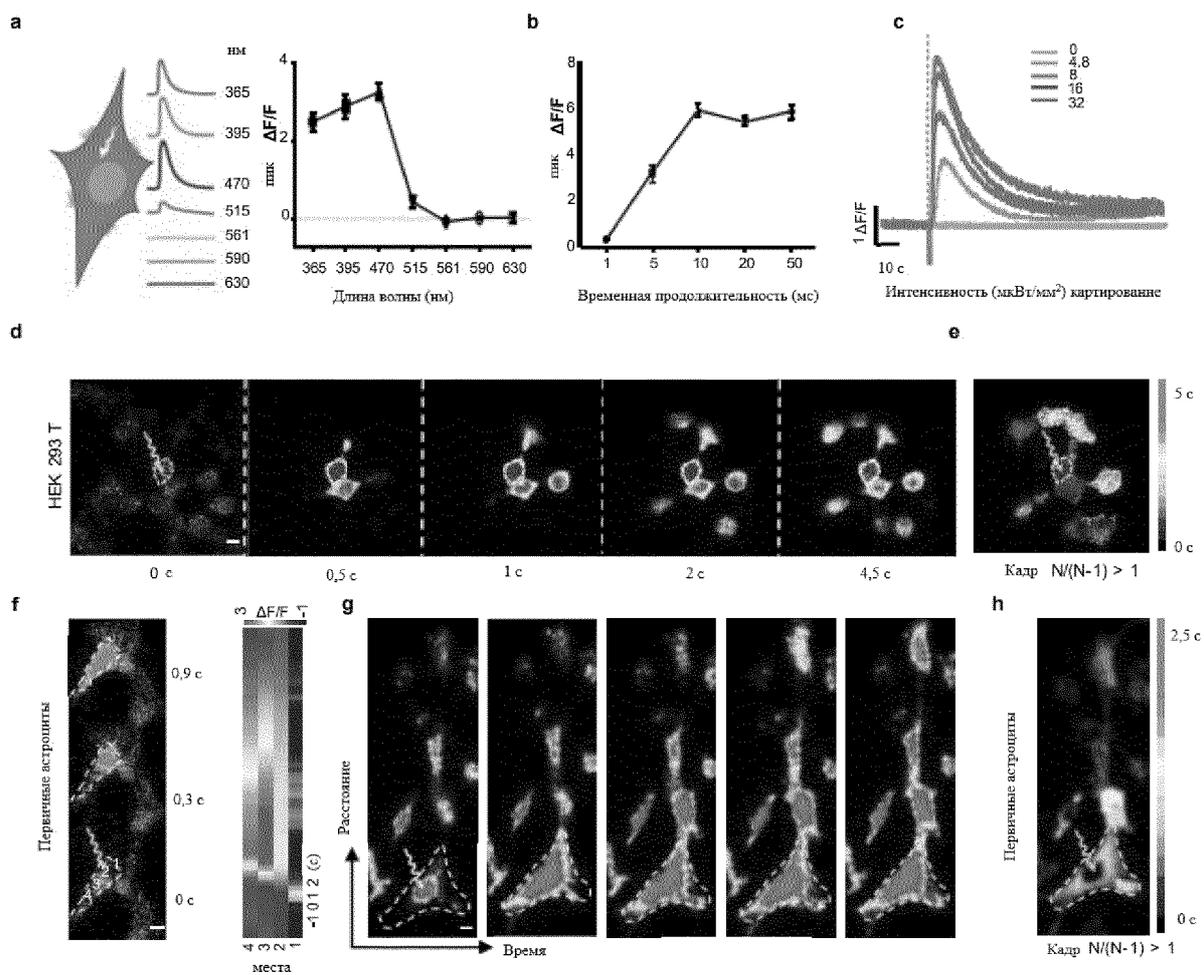
26. Способ по п. 20, дополнительно включающий применение двухфотонной активации с использованием света, имеющего длину волны 920 нм или более.



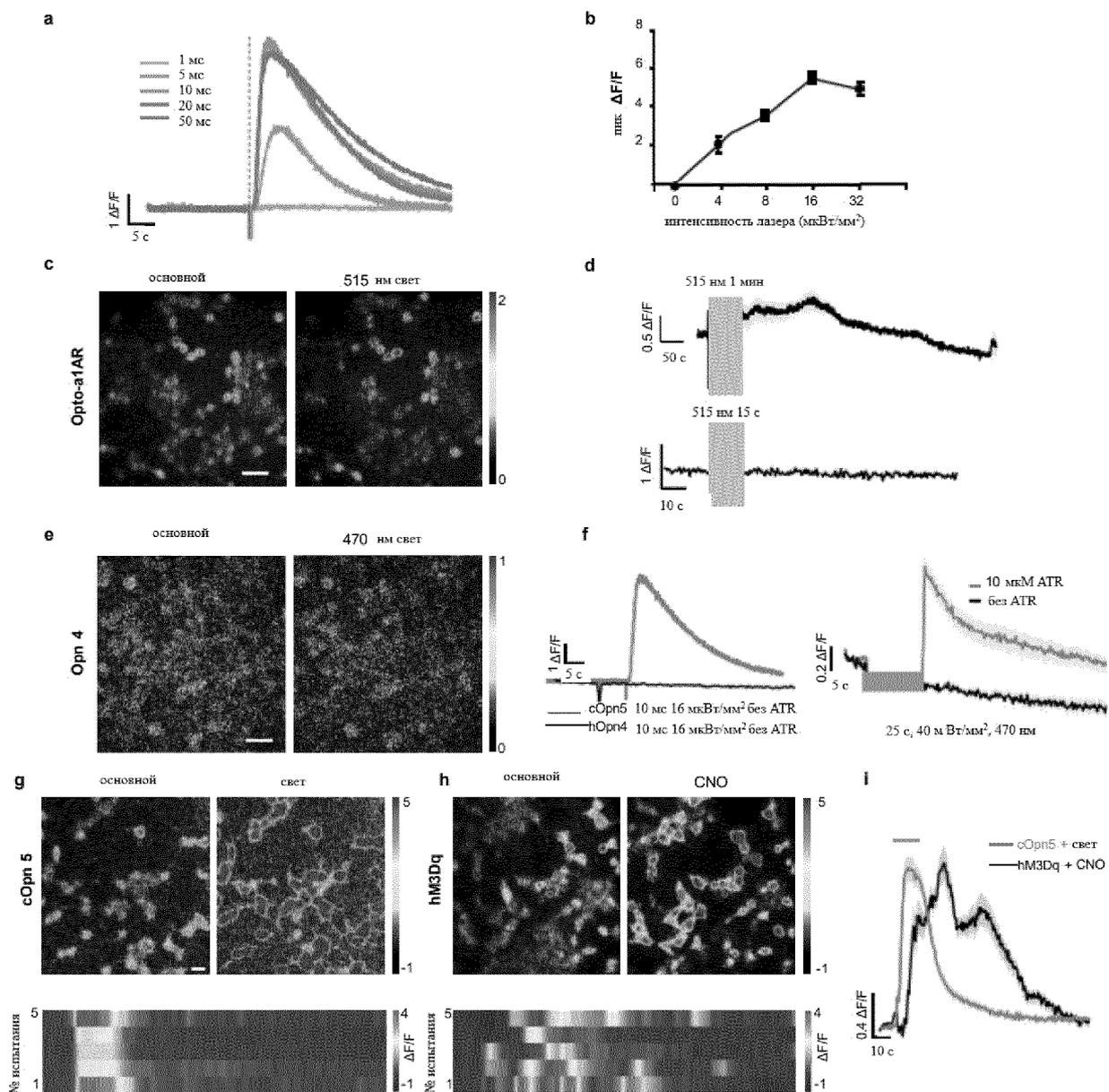
ФИГУРА 1



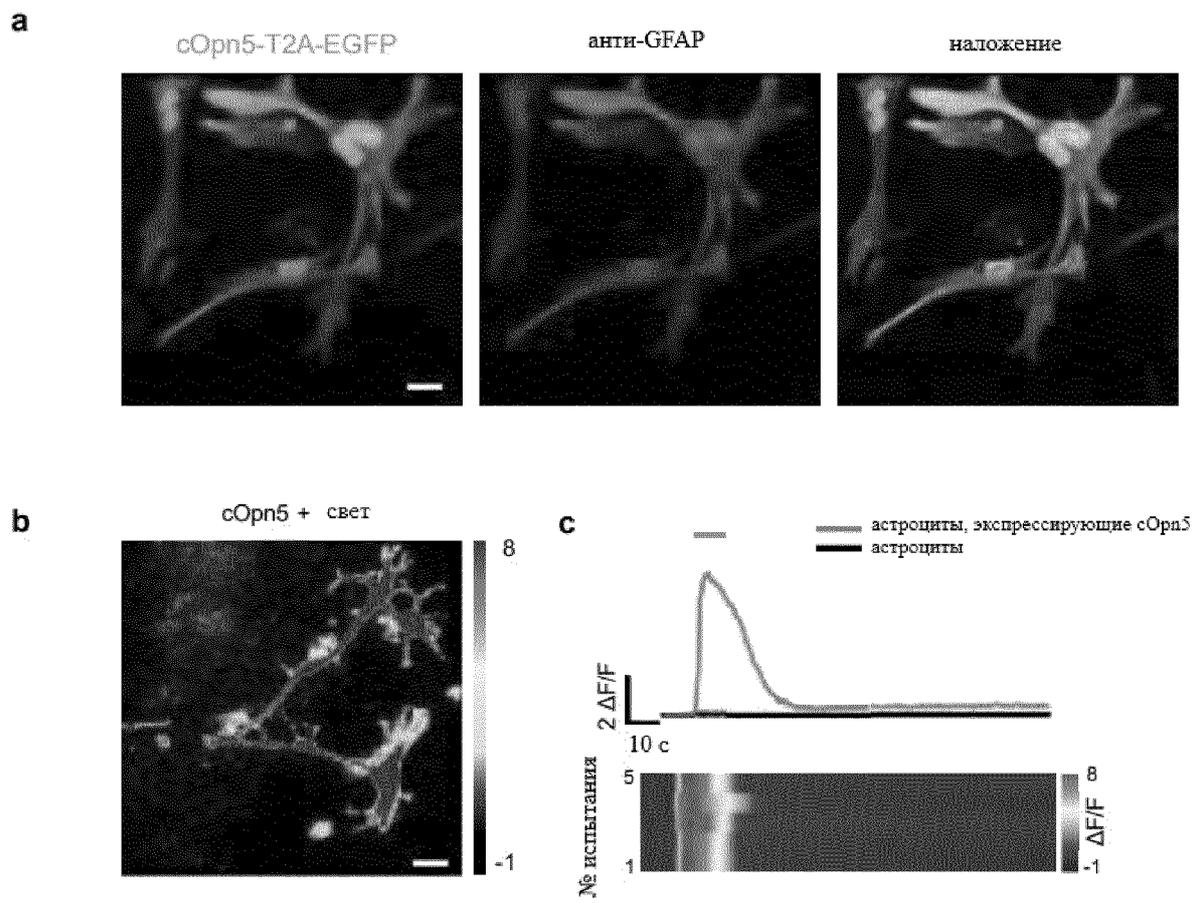
ФИГУРА 2



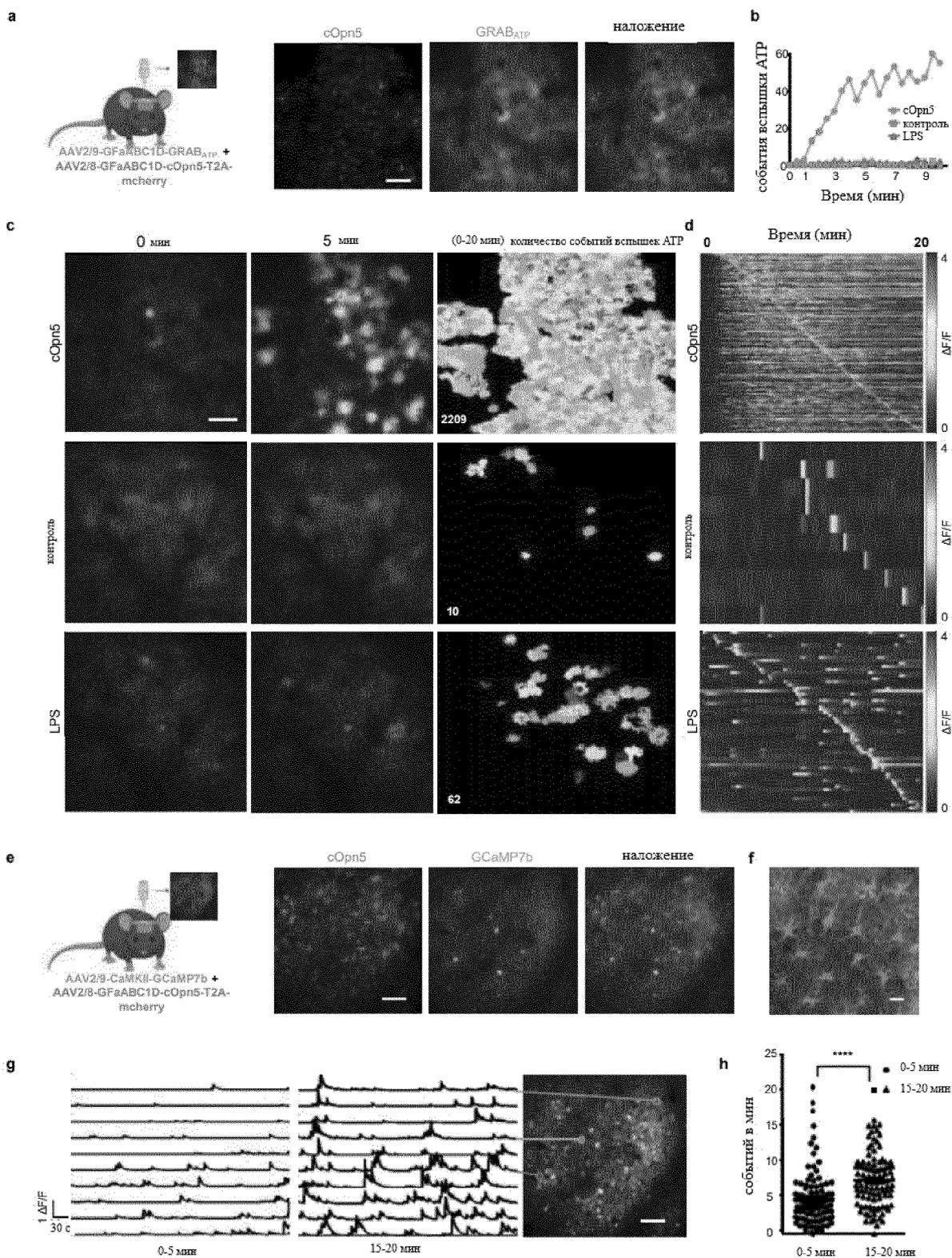
ФИГУРА 3



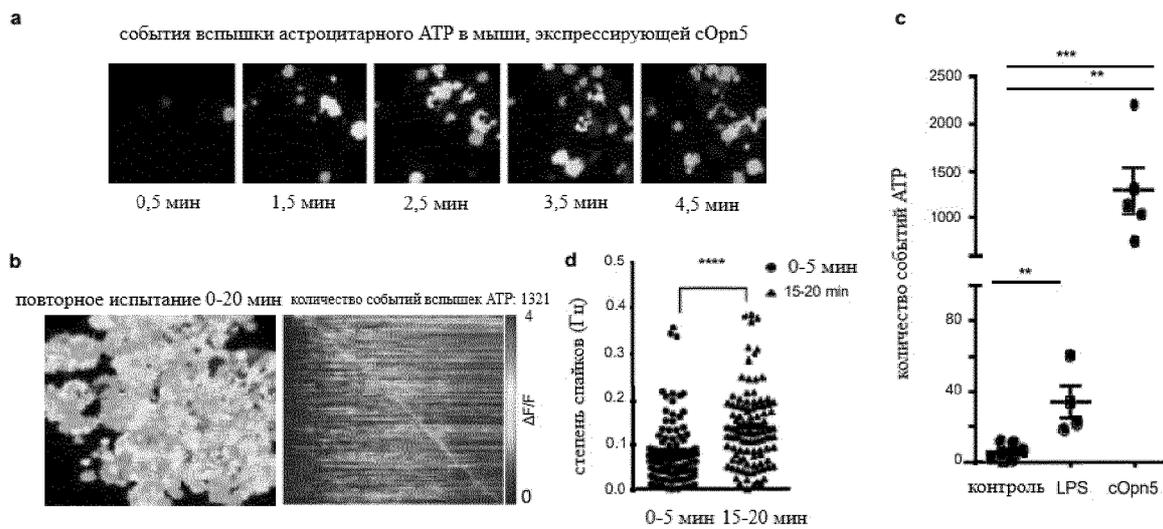
ФИГУРА 4



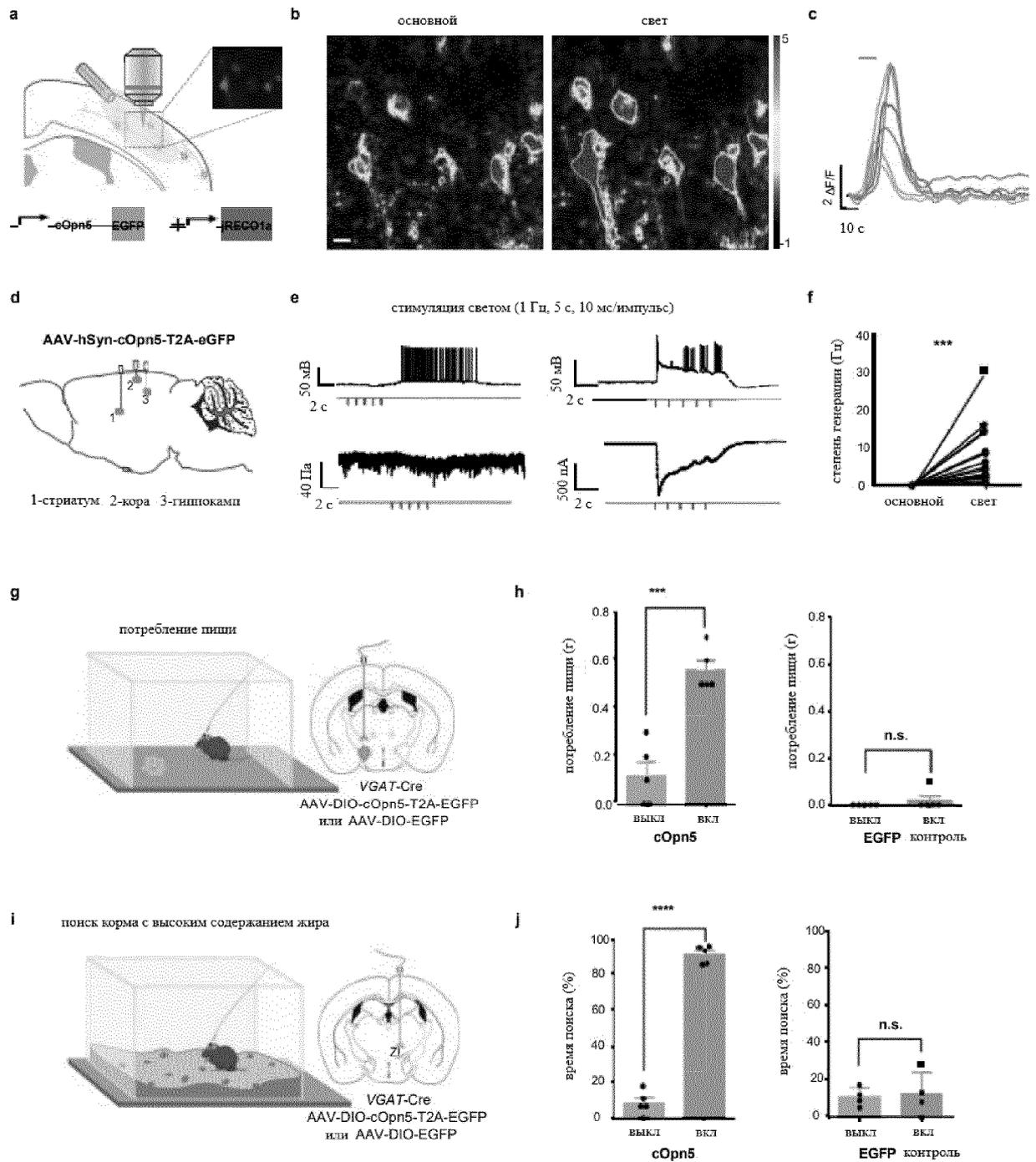
ФИГУРА 5



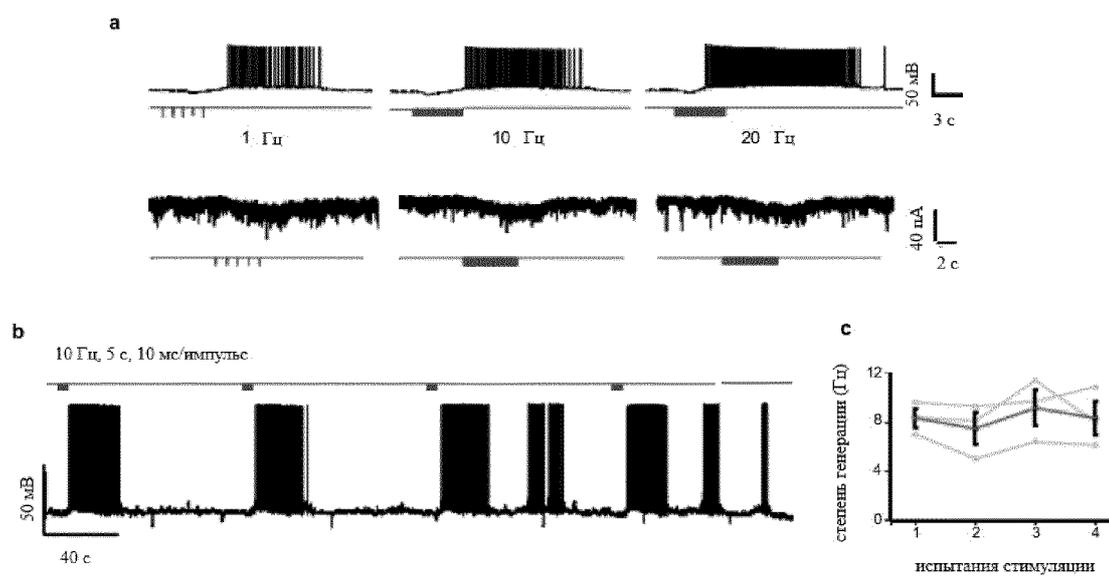
ФИГУРА 6



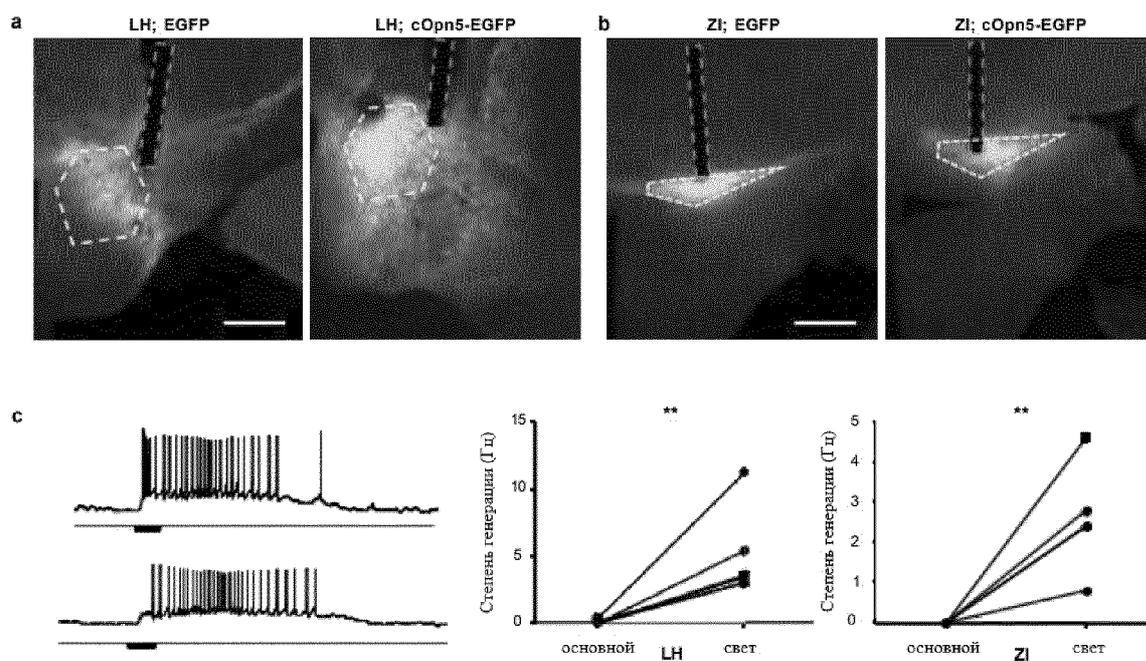
ФИГУРА 7



ФИГУРА 8



ФИГУРА 9



ФИГУРА 10