

Генетические подходы к изучению функций серотонинергических нейронов у животных

У.С. Дрозд^{1,2}✉, Е.В. Шабурова^{1,2}, Н.Н. Дыгало^{1,2}

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: drozdsu@gmail.com

Серотонинергическая система, которая принимает участие в регуляции большинства функций ЦНС, является одной из важнейших нейротрансмиттерных систем. Патогенез многих психических и нейродегенеративных заболеваний включает нарушения в функционировании этой системы. Понимание механизмов ее работы поможет не только разработать новые терапевтические подходы к лечению, но и установить, как эта нейротрансмиттерная система взаимодействует с другими отделами мозга, регулируя их деятельность. Ввиду сложности и гетерогенности анатомо-функционального устройства серотонинергической системы, в настоящее время лучшими инструментами для ее изучения являются методы, основанные на манипулировании отдельными типами нейронов и не затрагивающие нейроны других нейротрансмиттерных систем. Такое избирательное управление клетками возможно за счет генетической детерминированности их функций. Белки, обуславливающие уникальность клеточного типа, экспрессируются в нем под регуляцией клеточно-специфичных промоторов. С использованием промоторов, специфичных для генов серотониновой системы, возможно управление экспрессией гена интереса в серотонинергических нейронах. В обзоре рассмотрены подходы с применением таких промоторов. Генетические модели, созданные при помощи описанных подходов, используются для установления роли серотонинергической системы в модулировании поведения и обработке сенсорной информации. В частности, генетические нокауты по серотониновым генам *sert*, *pet1* и *tph2* помогли выяснить вклад этих генов в формирование и функционирование головного мозга. Кроме того, описываются индуцибельные модели, которые позволили управлять экспрессией генов на различных стадиях онтогенеза. И наконец, приведены примеры достижений в применении этих генетических подходов в оптогенетике и хемогенетике, которые предоставили новый ресурс для изучения функций, разрядной активности и сигнальной трансдукции серотонинергических нейронов. При создании моделей патологических состояний и разработке фармакологических средств их коррекции на основе рассмотренных генетических подходов необходимо учитывать, что каждый из них имеет свои достоинства и ограничения, и выбирать наиболее подходящий из них.

Ключевые слова: серотонинергические нейроны; генетические модели; вирусная трансдукция; оптогенетика; хемогенетика.

Для цитирования: Дрозд У.С., Шабурова Е.В., Дыгало Н.Н. Генетические подходы к изучению функций серотонинергических нейронов у животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):448-455. DOI 10.18699/VJ19.513

Genetic approaches to the investigation of serotonergic neuron functions in animals

U.S. Drozd^{1,2}✉, E.V. Shaburova^{1,2}, N.N. Dygalo^{1,2}

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: drozdsu@gmail.com

The serotonergic system is one of the most important neurotransmitter systems that take part in the regulation of vital CNS functions. The understanding of its mechanisms will help scientists create new therapeutic approaches to the treatment of mental and neurodegenerative diseases and find out how this neurotransmitter system interacts with other parts of the brain and regulates their activity. Since the serotonergic system anatomy and functionality are heterogeneous and complex, the best tools for studying them are based on manipulation of individual types of neurons without affecting neurons of other neurotransmitter systems. The selective cell control is possible due to the genetic determinism of their functions. Proteins that determine the uniqueness of the cell type are expressed under the regulation of cell-specific promoters. By using promoters that are specific for genes of the serotonin system, one can control the expression of a gene of interest in serotonergic neurons. Here we review approaches based on such promoters. The genetic models to be discussed in the article have already shed the light on the role of the serotonergic system in modulating behavior and processing sensory information. In particular, genetic knockouts of serotonin genes *sert*, *pet1*, and *tph2* promoted the determination of their contribution to the develop-

ment and functioning of the brain. In addition, the review describes inducible models that allow gene expression to be controlled at various developmental stages. Finally, the application of these genetic approaches in optogenetics and chemogenetics provided a new resource for studying the functions, discharge activity, and signal transduction of serotonergic neurons. Nevertheless, the advantages and limitations of the discussed genetic approaches should be taken into consideration in the course of creating models of pathological conditions and developing pharmacological treatments for their correction.

Key words: serotonergic neurons; genetic models; viral transduction; optogenetics; chemogenetics.

For citation: Drozd U.S., Shaburova E.V., Dygalo N.N. Genetic approaches to the investigation of serotonergic neuron functions in animals. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4): 448-455. DOI 10.18699/VJ19.513 (in Russian)

Введение

Серотониновая нейротрансмиттерная система головного мозга вовлечена в регуляцию многих физиологических функций, таких как болевая чувствительность, цикл сон/бодрствование (Whitney et al., 2016), пищевого и репродуктивного поведения, когнитивных функций и настроения (Wong-Lin et al., 2017), модулирует функции обонятельной системы (Carlson et al., 2016). Роль серотонина в патогенезе различных психиатрических заболеваний подчеркнута также во множество клинических и доклинических исследований (Vadodaria et al., 2018).

Синтез серотонина в центральной нервной системе (ЦНС) осуществляют серотонинергические нейроны, находящиеся в ядрах шва ствола мозга, вентро-медиальной части продолговатого мозга и ретикулярном ядре моста (Baker et al., 1991). Проекция этих нейронов широко распространяется по головному и спинному мозгу. Задача изучения их функций усложняется относительно небольшим количеством серотониновых нейронов вместе с рассеянным распределением их аксонов. Кроме того, хотя серотониновые нейроны анатомически кластеризованы, их группы не гомогенны по электрофизиологическим свойствам и обычно состоят из нескольких субпопуляций, которые активно изучаются (Ren et al., 2018). Таким образом, электрофизиологические исследования, проводимые путем внедрения электрода в ядра шва, не дают адекватного понимания функций отдельных клеточных популяций (Calizo et al., 2011). Исследования, которые проводятся при помощи фармакологических подходов, хотя и внесли значимый вклад в понимание серотониновой нейротрансмиссии, тоже имеют свои ограничения: наличие периферических эффектов, невозможность контролировать отдельные типы нейронов и, в некоторых случаях, неясные механизмы действия (Choi et al., 2004). Поэтому в настоящее время внимание исследователей сосредоточено на генетических инструментах, которые позволяют манипулировать отдельными типами нейронов, не затрагивая нейроны других нейротрансмиттерных систем.

Промоторы генов, используемые для экспрессии трансгенов в серотонинергических нейронах

Экспрессия гена интереса в клетках определенного типа обеспечивается тканеспецифичными промоторами. Для экспрессии целевых генов в серотонинергических нейронах используют промоторы генов *tph2*, *pet-1* и *sert* (Hainer et al., 2016). Достоинством гена *tph2*, нейрональной триптофангидроксилазы, ключевого фермента биосинтеза серотонина, является то, что он имеет высокий уровень

экспрессии только в серотонинергических нейронах головного мозга, в отличие от гена *tph1*, почти не экспрессирующегося в ЦНС (за исключением пинеалоцитов эпифиза, в которых серотонин присутствует в качестве промежуточного продукта при синтезе мелатонина) (Patel et al., 2004). В промоторе *tph2* присутствует NRSE – сайленсер, не дающий запустить транскрипцию данного гена не в нейрональных клетках (Patel et al., 2007), а также сайты связывания транскрипционного фактора Pet-1 (Liu et al., 2010), направляющего развитие серотонинергических нейронов в онтогенезе и имеющего важную роль в поддержании серотонинергического фенотипа во взрослых нейронах (Liu et al., 2010; Fernandez et al., 2017). В связи с тем, что Pet-1 сам является маркером серотонинергических нейронов, промотор его гена (точнее, его энхансерная область (Scott et al., 2005)) считается для них тканеспецифичным (Deneris, 2011). Помимо прочих, Pet-1 контролирует экспрессию *sert* (или *slc6a4*) – гена серотонинового транспортера, чей промотор используется для изучения серотонинергических нейронов (Hainer et al., 2016). Однако, в отличие от Pet-1 и Tph2, Sert экспрессируется не только в серотониновых нейронах, но и в астроцитарной глии (Blakely, 2001), и может синтезироваться в нейронах префронтальной коры, таламуса и сетчатки в ходе развития нервной системы (Gaspar et al., 2003).

Кроме вышеуказанных генов, активное участие в функционировании серотонинергического нейрона принимают гены декарбоксилазы ароматических аминокислот (*aadc*, или *ddc*), везикулярного переносчика моноаминов (*slc18a2*, или *vmat2*), моноаминоксидаз А и В (*maoa* и *maob*), 5-НТ1a/b-авторецепторов (*htr1a* и *htr1b*), а также гены, кодирующие ферменты для синтеза и восстановления тетрагидробиоптерина (BH4) (Müller, Jacobs, 2010). Однако эндогенные промоторы этих генов либо слабы, либо недостаточно специфичны, чтобы с их помощью осуществлять направленное управление фенотипом серотониновых нейронов (Deneris, Wyler, 2012).

Трансгенные линии животных для исследования серотонинергической нейротрансмиссии

Использование трансгенных животных – распространенный метод для исследования серотонинергической системы. Эти линии животных применяются для выяснения роли конкретных генов в развитии и функционировании как организма в целом, так и отдельных клеток. Широко применяются генетические модели, такие как нокауты (knock-out), нокины (knock-in), а также животные, полученные с использованием ВАС (bacterial artificial chromosome). ВАС – это ДНК-конструкт, длина которого может

превышать 350 тыс. пар оснований (Shizuwa et al., 1992), что позволяет встраивать большие фрагменты ДНК: генов или их промоторных областей (Zhuang et al., 2005). При этом трансгенез проводится путем введения ВАС в про-нуклеус зиготы (Richardson-Jones et al., 2010). Получение генетических нокаутов и нокинов происходит в два этапа. Сначала в эмбриональные стволовые клетки методом гомологичной репарации прицельно вносится вставка (для получения нокаутов вставка вносится вместо выбранного гена), после чего модифицированные клетки вводят в бластоцисту. Взрослых химерных животных скрещивают с животными дикого типа, после чего отбирают их гетерозиготных потомков (Zhuang et al., 2005). Этих потомков также скрещивают между собой, и из получившегося третьего поколения отбирают животных, гомозиготных по наличию вставки (Richardson-Jones et al., 2011).

Для исследования серотонинергической системы на основе вышеприведенных подходов получены разные линии трансгенных животных, большая часть из которых основана на явлении Cre-LoxP рекомбинации (или Flp-FRT рекомбинации). Рекомбиназы Cre и Flp узнают последовательности LoxP и FRT соответственно и катализируют рекомбинацию фланкированного фрагмента ДНК, что приводит либо к его удалению, либо к инверсии. Фланкированный участок ДНК может быть стоп-кассетой перед геном или же самим геном, таким образом, его удаление либо включает, либо выключает экспрессию (Muñoz-Jiménez et al., 2017). На основе этого явления было получено несколько линий трансгенных животных для таргетирования серотониновой системы, где под специфичным промотором (*sert*, *pet-1* или *th2*) экспрессируется Cre-рекомбиназа (Hainer et al., 2016). При помощи таких животных можно получать модели условных нокаутов (Liu et al., 2010) и условной индукции генов серотониновой системы (Piszczek et al., 2013), таким образом изучая вклад конкретных генов в ее работу (характеристики и получение этих и других генетических моделей описаны в таблице). К примеру, при помощи такого подхода были получены доказательства необходимости Pet-1 не только для запуска серотониновой программы в нейронах, но и для поддержания серотонинергического фенотипа в дальнейшем (Liu et al., 2010).

Кроме того, при помощи комбинации рекомбиназ Cre и Flp можно изучать отдельные подтипы нейронов серотониновой системы, а также ее развитие в онтогенезе, анализируя потомков разных ромбомеров (Kim et al., 2009). Имеются и другие способы получения трансгенных животных, без использования рекомбиназ. Например, при помощи технологии CRISPR/Cas9 были получены первые трансгенные свиньи, являющиеся генетическими нокаутами по *th2* (Li et al., 2017).

Несмотря на несомненный вклад описанных выше линий с конститутивным изменением экспрессии генов в исследование серотонинергической системы, их основным минусом является то, что они не позволяют изучать работу этой нейротрансмиттерной системы в чистом виде, поскольку в ходе развития нервной системы в них может возникнуть компенсаторный эффект со стороны других нейротрансмиттерных систем, а также нарушения в работе нейронов в целом (Hainer et al., 2016).

Индукцибельные модели экспрессии

Индукцибельные генетические модели позволяют не только избегать компенсаторных эффектов, но и изучать развитие серотонинергической системы в онтогенезе. Одной из систем для достижения пространственно-временного контроля над экспрессией трансгена является индукцибельная система Cre-ERT2. Рекомбиназа Cre-ERT2 представляет собой химерный белок, состоящий из Cre-рекомбиназы и мутантной формы человеческого рецептора эстрогена, который связывает не эстрадиол, а синтетический лиганд тамоксифен (TMX). При введении TMX химерная рекомбиназа активируется, проходит через ядерную мембрану в ядро и индуцирует рекомбинацию фланкированного участка, что позволяет контролировать экспрессию гена интереса во времени (Kristianto et al., 2017).

Другой способ контроля экспрессии гена интереса, позволяющий обойтись без Cre-рекомбиназ, заключается в использовании таких лиганд-индукцибельных систем, как Tet-ON/Tet-OFF. При введении тетрациклин-подобных соединений тетрациклин-зависимый белок-трансактиватор (rtTA или tTA) меняет свою конформацию и в зависимости от типа системы связывается (Tet-ON) или не связывается (Tet-OFF) с последовательностью tetO, соответственно способствуя или блокируя экспрессию трансгена (Das et al., 2016). Известна также модификация, при которой под контролем специфичного промотора находится ген химерного тетрациклин-зависимого белка-трансактиватора, слитого с доменом KRAB, сильным репрессором; получившийся химерный белок будет сильнее подавлять экспрессию гена интереса, связываясь с операторной последовательностью перед ним (Richardson-Jones et al., 2011). На основе систем Tet-OFF и Tet-ON было получено несколько генетических моделей для изучения серотонинергической системы (Weber et al., 2012; Donaldson et al., 2014; Hilber et al., 2015), к примеру, было показано влияние сниженной экспрессии ауторецепторов 5-HT_{1A} на развитие тревожного поведения (Donaldson et al., 2014). При этом, в отличие от активируемых Cre-рекомбиназ, воздействие тетрациклин-индукцибельной системы обратимо, поскольку ее работа не вносит прямых изменений в последовательность ДНК, что увеличивает количество ее возможных приложений. Минусом данного метода является то, что доксициклин (наиболее часто используемое тетрациклин-подобное соединение), необходимый для обеспечения индукцибельности, сам по себе может влиять на состояние животного (Shishkina et al., 2017). Это может осложнить интерпретацию результатов, получаемых, например, при проведении поведенческих тестов.

Вирусные векторы

Вирусные векторы – еще один многообещающий подход для изучения серотонинергической системы. Вектор стереотаксически доставляется в ядра шва головного мозга во время необходимой стадии развития, поэтому он не влияет на протекание предшествующих стадий. Проводится множество исследований, в которых используют комбинацию вирусных векторов с трансгенными животными, преимущественно с теми, что основаны на Cre/LoxP рекомбинации (Tye, Deisseroth, 2012; Verheij et al., 2018).

Виды генетических моделей, используемые для исследования серотонинергической системы

Генетическая модель	Способ получения	Характеристики	Пример
Трансген (BAC)	Введение генетического конструкта с геном интереса под контролем специфичного промотора в пронуклеус животного	Конструкт присутствует во всех клетках организма и на протяжении всей жизни, может передаваться потомству	Zhao et al., 2011
Вирусное таргетирование	Введение генетического конструкта с геном интереса под контролем специфичного промотора в животное на любой стадии развития	Конструкт стереотаксически доставляется в изучаемую область, не передается потомству, может обеспечить индуцибельную и обратимую специфичную экспрессию гена интереса	Benzekhroufa et al., 2009
Генетические нокауты	Замещение гена интереса другой последовательностью (стоп-кассетой или другим геном)	Ген отсутствует во всех клетках организма на протяжении всей жизни	Mosienko et al., 2012
Условные нокауты	Скрещивание животного с фланкированным LoxP геном интереса и животного с Cre-рекомбиназой под контролем специфичного промотора	Экспрессия гена отсутствует только в Cre-экспрессирующих клетках	Liu et al., 2010
Условная индукция	Скрещивание животного с фланкированной LoxP стоп-кассетой перед геном интереса и животного с Cre-рекомбиназой под контролем специфичного промотора	Экспрессия гена наблюдается только в Cre-экспрессирующих клетках	Piszczek et al., 2013
Индукцибельные нокауты	Скрещивание животного с фланкированным LoxP геном интереса и животного с индуцибельной Cre-ERT2 рекомбиназой под контролем специфичного промотора	При введении тамоксифена ген вырезается только в Cre-экспрессирующих клетках; система обеспечивает временно- и пространственно-специфичное необратимое отсутствие экспрессии гена	Liu et al., 2010
Индукцибельный трансген	Скрещивание животного с последовательностью tetO перед геном интереса и животного с тетрациклин-зависимым белком-трансактиватором (tTA или rtTA) под контролем специфичного промотора	При введении тетрациклин-подобных соединений модуляция экспрессии гена происходит только в клетках, экспрессирующих tTA или rtTA; система обеспечивает модулирование временно- и пространственно-специфичной обратимой экспрессии гена	Hilber et al., 2005
Индукцибельная супрессия	Скрещивание животного с последовательностью tetO перед геном интереса и животного с тетрациклин-зависимым белком-трансактиватором (tTA или rtTA), слитым с супрессором KRAB, под контролем специфичного промотора	При введении тетрациклин-подобных соединений модуляция экспрессии гена происходит только в клетках, экспрессирующих tTA-KRAB или rtTA-KRAB; система обеспечивает модулирование временно- и пространственно-специфичной обратимой экспрессии гена	Richardson-Jones et al., 2011
Генетические нокины	Введение гена или промоторной последовательности перед геном интереса	Предполагается сохранение экспрессии эндогенного гена интереса	Sachs et al., 2013
Межсекционный трансген	Скрещивание животного с фланкированными LoxP и FRT последовательностями (LoxP-STOP-LoxP-FRT-ген 1-STOP2-FRT-ген 2) и животным с Cre-рекомбиназой под контролем одного специфичного промотора и Flp-рекомбиназой под контролем другого	Экспрессия генов зависит от паттерна экспрессии Flp- и Cre-рекомбиназ; позволяет изучать разные подтипы нейронов в нейротрансмиттерных системах	Kim et al., 2009
РНК-интерференция	Введение малых РНК, образующих шпильки (shRNA), для подавления экспрессии гена интереса	Подавляет экспрессию эндогенного гена интереса на короткий срок (несколько дней при однократном введении)	Verheij et al., 2018

При этом векторы должны обеспечивать экспрессию закодированных в них трансгенов только в тех клетках, где синтезируется Cre-рекомбиназа. На сегодняшний день существует более 250 Cre-рекомбиназных линий мышей, доступных в рамках проекта «Экспрессия генов в атласе нервной системы» в сотрудничестве с Интрамуральной программой Национального института психического здоровья (<http://www.gensat.org>) (Gong et al., 2007), а также с

коммерческими репозиториями, такими как Лаборатория Джексона (<http://jaxmice.jax.org>).

Наряду с этим ведутся работы по созданию вирусных векторов, специфично экспрессирующих трансген в серотонинергической системе не только трансгенных животных, но и животных дикого типа или селекционных линий. Так, группой авторов (Benzekhroufa et al., 2009) был создан вектор для серотониновых нейронов, в котором для

усиления уровня экспрессии гена интереса применяли двухступенчатую амплификацию транскрипции (TSTA). В этой системе повышения силы фрагмента промотора *tph2* добиваются включением в него энхансера UAS и химерного цис-регулятора транскрипции GAL4-p65, а также различными вариациями расположения каскет энхансеров UAS на промоторе. При помощи такого подхода была достигнута высокая и специфичная экспрессия трансгена в серотониновых нейронах. На основе данных конструкторов получены как лентивирусные, так и аденоассоциированные вирусные векторы для направленного таргетирования (Benzekroufa et al., 2009). Более того, эти векторы были улучшены за счет оптимизации сайта IRES и добавления последовательности WPRE для повышения уровня экспрессии генов, доставляемых ретровирусными векторами (Nishitani et al., 2019).

Не так давно появилось еще одно интересное направление, позволяющее использовать преимущества вирусной доставки и явление РНК-интерференции. Взаимодействие малых интерферирующих РНК с мРНК целевого гена приводит к разрушению последней, тем самым предотвращая ее трансляцию и угнетая синтез кодируемого ею белка (Rao et al., 2009). Таким образом, миРНК управляет экспрессией гена не на уровне транскрипции, как в уже рассмотренных нами системах, но сразу после нее. Кроме того, эффект после однократного введения миРНК сохраняется на протяжении всего нескольких дней (Albert et al., 2014). Для вирусного таргетирования используют функциональный аналог миРНК – малые РНК, образующие шпильки (shRNA) (Rao et al., 2009). Главной особенностью данной системы является ее таргетность – миРНК будет работать только в тех клетках, где синтезируется мРНК специфического для нее гена. Однако в этом и основная преграда для их использования: выбираемый ген интереса должен быть эндогенным и специфичным для исследуемой структуры. Тем не менее метод нашел свое применение в исследованиях серотонинергической системы (Gautier et al., 2017; Verheij et al., 2018). Так, при изучении эффектов от подавления экспрессии гена *tph2* в бульбоспинальных серотониновых нейронах была показана их роль в модуляции восприятия невропатической и воспалительной боли (Gautier et al., 2017).

В целом доставка ДНК и/или РНК при помощи рекомбинантных вирусных частиц – многообещающий подход, который может найти применение не только в исследовании серотонинергических нейронов, но и в медицине, в частности в генетической терапии. Однако и он имеет недостатки. В частности, возможно возникновение иммунного ответа организма, в результате чего при повторных инъекциях будет страдать эффективность доставки (Lukashev, Zamyatnin, 2016). Кроме того, проблемой является стереотаксический метод доставки вируса. Инвазивное вмешательство в головной мозг его травмирует, что может негативно сказаться на получаемых результатах.

Оптогенетический и хемогенетический подходы

Описанные выше методы достижения клеточно-специфичной экспрессии генов находят свое применение в

оптогенетике и хемогенетике. Оба подхода позволяют избирательно управлять выбранным типом нейронов для изучения их функций, разрядной активности и сигнальной трансдукции. В оптогенетике гены светочувствительных мембранных ионных каналов или насосов экспрессируются в целевом типе нейронов под клеточно-специфичным промотором. При воздействии светом эти белки меняют проницаемость клеточной мембраны для определенных ионов, что делает возможным управление разрядной активностью клетки с высоким временным разрешением (Lammel et al., 2016). Для изучения серотонинергических нейронов с помощью оптогенетики создана линия ВАС трансгенных мышей *Tph2-ChR2(H134R)-EYFP*, в которой транскрипция деполяризующего мембрану каналородопсина-2 осуществляется под контролем промотора *tph2* (Zhao et al., 2011). Этот же промотор использовался для создания мышей, у которых ген *ChR2 (C128S)* находится после тетрациклин-зависимого оператора (*tetO*), тогда как *tTA* находится под контролем промотора *tph2*. При помощи линии мышей с индуцибельной экспрессией каналородопсина в серотониновых нейронах был изучен вклад этих клеток в модуляцию тревожного поведения и ожидания награды (Miyazaki et al., 2014; Ohmura et al., 2014).

Другим, более общим подходом, не требующим создания отдельной линии животных для экспрессии каждого вида опсина в целевых клетках, является использование линий, экспрессирующих Cre-рекомбиназу под контролем промотора *sert* или *pet-1*. Доставка опсинов в нейроны осуществляется при помощи вирусной трансдукции аденоассоциированными вирусами. Вектор содержит ген опсина в инвертированной ориентации, фланкированный DIO (double-floxed inverted orientation) с двух сторон, а также находящийся под сильным нейрональным промотором *hSyn*. Мышам линии *Sert-Cre* вводили вирусные вектора с деполяризующим каналородопсином (*AAV-hSyn-DIO-ChR2*) и гиперполяризующим галородопсином (*AAV-hSyn-DIO-NpHR*). В результате этого эксперимента была установлена роль серотонинергической системы в снижении социального дефицита на мышинной модели аутизма (Walsh et al., 2018). В других исследованиях при использовании такого же подхода к экспрессии *ChR2* в серотонинергических нейронах дорсального ядра шва была выяснена роль этих клеток в подавлении спонтанной разрядной активности в нейронах обонятельной коры (Lottet et al., 2016), в неврологическом ответе на получение ожидаемой награды (Li et al., 2016), а также в подавлении спонтанной локомоторной активности в открытом поле и снижении скорости движений (Correia et al., 2017). Помимо линии *Sert-Cre*, где для достижения специфичной экспрессии каналородопсина в серотониновых нейронах используется промотор *sert*, в оптогенетических исследованиях применяют аналогичную линию *Pet1-Cre* (Challis et al., 2014; Liu et al., 2014; Luo et al., 2017).

Для доставки оптогенетических белков в серотонинергические нейроны животных, предварительно не подвергавшихся генетическим модификациям, были созданы лентивирусные векторы на основе крысиного и мышинного промоторов *tph2*. Это позволило изучить различия в депрессивно-подобном и тревожном поведении указанных

видов животных при стимуляции нейронов дорсального ядра шва (Nishitani et al., 2019).

В хомогенетике используются рецепторы, сконструированные для взаимодействия с химическими лигандами, инертными в организме. На данный момент среди DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) насчитывается ряд рецепторов, сопряженных с G-белками и представляющих собой модифицированные человеческие мускариновые рецепторы. Такие рецепторы больше не реагируют на ацетилхолин, как, впрочем, и на любые другие эндогенные молекулы, но вместо этого связываются с клозапин-N-оксидом (CNO) (Alexander et al., 2009). Так, например, один из наиболее часто используемых DREADD – hM3Dq, связываясь с CNO, вызывает внутриклеточный каскад через Gq белок и активацию фосфолипазы C, что приводит к деполяризации нейронов и увеличению их разрядной активности (Urban, Roth, 2015). Другой представитель хомогенетических рецепторов – hM4Di, наоборот, способствует ингибированию разрядной активности нейронов через Gi белок (Zhu, Roth, 2014).

В настоящее время доступно несколько вариантов достижения экспрессии DREADD в генетически определенных клетках. Существуют линии генно-инженерных мышей, у которых экспрессия hM3Dq происходит под контролем системы Tet-OFF (Alexander et al., 2009; Garner et al., 2012) и посредством Cre-опосредованной рекомбинации (Teissier et al., 2015). Кроме того, растет число промоторов, которые позволяют осуществлять специфическую для типа клеток экспрессию с использованием многих вирусных векторов, включая модифицированные вирусы простого герпеса (HSV) (Ferguson et al., 2011), аденоассоциированные вирусы (Zhu et al., 2014; Scofield et al., 2015) и лентивирусы (Mahler et al., 2014; Vazey, Aston-Jones, 2014).

Хомогенетический подход для изучения функций серотонинергических нейронов и их проекций уже применен в ряд научных работ. При этом так же, как и в оптогенетике, использовались Sert-Cre линии мышей, которым вводили аденоассоциированные вирусы, содержащие последовательность hM4Di или hM3Dq (AAV-hSyn-DIO-hM4Di/hM3Dq) (Urban et al., 2016; Fernandez et al., 2017; Singh et al., 2017). Например, установлено, что серотонинергические проекции из срединного шва необходимы для регуляции памяти о объектах и процессов синаптической пластичности гиппокампа (Fernandez et al., 2017). В другом исследовании, где подобным образом применяли *ret1-Cre* мышей для хомогенетической активации и ингибирования серотонинергических нейронов, показано, что серотонинергические нейроны в медиальном ядре шва играют ключевую роль в регуляции поведения, подобного тревожности и депрессии (Li et al., 2018).

Заключение

Серотонинергические нейроны в ядрах шва создают сложную и обширную сеть проекций аксонов по всему мозгу. Основная задача анализа этих нейрональных схем заключается в том, чтобы понять, как серотонинергические сети связаны с многочисленными функциями этой нейротрансмиттерной системы. В последние годы было разработано несколько новых методик для манипулиро-

вания субпопуляциями серотонинергических нейронов, созданы различные линии животных со специфической для серотонинергических нейронов экспрессией, разработаны стратегии двойной рекомбинации, эффективные инструменты для временного контроля экспрессии генов, DREADDs и оптогенетика. В зависимости от целей эксперимента исследователи выбирают, каким из доступных вариантов регуляции экспрессии генов воспользоваться, поскольку каждый из них имеет свои достоинства и ограничения. Важно отметить, что ни одна из описанных систем не является полностью свободной от неспецифических эффектов. Для наиболее точной и информативной интерпретации результатов в экспериментальные проекты должны быть включены адекватные контроли. Тем не менее освещенные в этом обзоре инструменты и методы, как по отдельности, так и в сочетании, открывают новые возможности для исследования серотонинергической нейротрансмиттерной системы.

Список литературы / References

- Albert P.R., Vahid-Ansari F., Luckhart C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front. Behav. Neurosci.* 2014;8:199. DOI 10.3389/fnbeh.2014.00199.
- Alexander G.M., Rogan S.C., Abbas A.I., Armbruster B.N., Pei Y., Allen J.A., Nonneman R.J., Hartmann J., Moy S.S., Nicolelis M.A., McNamara J.O., Roth B.L. Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron.* 2009;63:27-39. DOI 10.1016/J.NEURON.2009.06.014.
- Baker K.G., Halliday G.M., Halasz P., Hornung J.-P., Geffen L.B., Cotton R.G.H., Törk I. Cytoarchitecture of serotonin-synthesizing neurons in the pontine tegmentum of the human brain. *Synapse.* 1991; 7:301-320. DOI 10.1002/syn.890070407.
- Benzekroufa K., Liu B., Tang F., Teschemacher A.G., Kasparov S. Adenoviral vectors for highly selective gene expression in central serotonergic neurons reveal quantal characteristics of serotonin release in the rat brain. *BMC Biotechnol.* 2009;9:23. DOI 10.1186/1472-6750-9-23.
- Blakely R.D. Physiological genomics of antidepressant targets: keeping the periphery in mind. *J. Neurosci.* 2001;21:8319-8323. DOI 10.1523/JNEUROSCI.21-21-08319.2001.
- Calizo L.H., Akanwa A., Ma X., Pan Y., Lemos J.C., Craige C., Heemstra L.A., Beck S.G. Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology.* 2011;61:524-543. DOI 10.1016/j.neuropharm.2011.04.008.
- Carlson K.S., Whitney M.S., Gadziola M.A., Deneris E.S., Wesson D.W. Preservation of essential odor-guided behaviors and odor-based reversal learning after targeting adult brain serotonin synthesis. *eNeuro.* 2016;3(5):e0257-16.2016. DOI 10.1523/ENEURO.0257-16.2016.
- Challis C., Beck S.G., Berton O. Optogenetic modulation of descending prefrontocortical inputs to the dorsal raphe bidirectionally bias socioaffective choices after social defeat. *Front. Behav. Neurosci.* 2014;8:43. DOI 10.3389/fnbeh.2014.00043.
- Choi S., Jonak E., Fernstrom J.D. Serotonin reuptake inhibitors do not prevent 5,7-dihydroxytryptamine-induced depletion of serotonin in rat brain. *Brain Res.* 2004;1007:19-28. DOI 10.1016/J.BRAINRES.2003.12.044.
- Correia P.A., Lottem E., Banerjee D., Machado A.S., Carey M.R., Mainen Z.F. Transient inhibition and long-term facilitation of locomotion by phasic optogenetic activation of serotonin neurons. *eLife.* 2017;6:e20975. DOI 10.7554/eLife.20975.
- Das A.T., Tenenbaum L., Berkhout B. Tet-On systems for doxycycline-inducible gene expression. *Curr. Gene Ther.* 2016;16:156-167. DOI 10.2174/1566523216666160524144041.

- Deneris E.S. Molecular genetics of mouse serotonin neurons across the lifespan. *Neuroscience*. 2011;197:17-27. DOI 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.08.061.
- Deneris E.S., Wyler S.C. Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health. *Nat. Neurosci.* 2012;15:519-527. DOI 10.1038/nn.3039.
- Donaldson Z.R., Piel D.A., Santos T.L., Richardson-Jones J., Leonardo E.D., Beck S.G., Champagne F.A., Hen R. Developmental effects of serotonin 1A autoreceptors on anxiety and social behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39:291-302. DOI 10.1038/npp.2013.185.
- Ferguson S.M., Eskenazi D., Ishikawa M., Wanat M.J., Phillips P.E.M., Dong Y., Roth B.L., Neumaier J.F. Transient neuronal inhibition reveals opposing roles of indirect and direct pathways in sensitization. *Nat. Neurosci.* 2011;14:22-24. DOI 10.1038/nn.2703.
- Fernandez S.P., Muzerelle A., Scotto-Lomassese S., Barik J., Gruart A., Delgado-García J.M., Gaspar P. Constitutive and acquired serotonin deficiency alters memory and hippocampal synaptic plasticity. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42:512-523. DOI 10.1038/npp.2016.134.
- Garner A.R., Rowland D.C., Hwang S.Y., Baumgaertel K., Roth B.L., Kentros C., Mayford M. Generation of a synthetic memory trace. *Science*. 2012;335:1513-1516. DOI 10.1126/science.1214985.
- Gaspar P., Cases O., Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003;4:1002-1012. DOI 10.1038/nrn1256.
- Gautier A., El Ouaraki H., Bazin N., Salam S., Vojdani G., Bourgoin S., Pezet S., Bernard J.-F., Hamon M. Lentiviral vector-driven inhibition of 5-HT synthesis in B3 bulbo-spinal serotonergic projections – consequences on nociception, inflammatory and neuropathic pain in rats. *Exp. Neurol.* 2017;288:11-24. DOI 10.1016/J.EXPNEUROL.2016.10.016.
- Gong S., Doughty M., Harbaugh C.R., Cummins A., Hatten M.E., Heintz N., Gerfen C.R. Targeting Cre recombinase to specific neuron populations with bacterial artificial chromosome constructs. *J. Neurosci.* 2007;27:9817-9823. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2707-07.2007.
- Hainer C., Mosienko V., Koutsikou S., Crook J.J., Gloss B., Kasparov S., Lumb B.M., Alenina N. Beyond gene inactivation: evolution of tools for analysis of serotonergic circuitry. *ACS Chem. Neurosci.* 2016;6:1116-1129. DOI 10.1021/acschemneuro.5b00045.
- Hilber B., Scholze P., Dorostkar M.M., Sandtner W., Holy M., Boehm S., Singer E.A., Sitte H.H. Serotonin-transporter mediated efflux: a pharmacological analysis of amphetamines and non-amphetamines. *Neuropharmacology*. 2005;49:811-819. DOI 10.1016/J.NEUROPHARM.2005.08.008.
- Kim J.C., Cook M.N., Carey M.R., Shen C., Regehr W.G., Dymecki S.M. Linking genetically defined neurons to behavior through a broadly applicable silencing allele. *Neuron*. 2009;63:305-315. DOI 10.1016/j.neuron.2009.07.010.
- Kristianto J., Johnson M.G., Zastrow R.K., Radcliff A.B., Blank R.D. Spontaneous recombinase activity of Cre-ERT2 *in vivo*. *Transgenic Res.* 2017;26:411-417. DOI 10.1007/s11248-017-0018-1.
- Lammel S., Dölen G., Malenka R.C. Optogenetic Approaches to Neural Circuit Analysis in the Mammalian Brain. In: Lehner T., Miller B.L., State M.W. (Eds.). *Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry*. Acad. Press, 2016;221-231. DOI 10.1016/B978-0-12-800105-9.00014-7.
- Li S., Yao W.-Q., Tao Y.-Z., Ma L., Liu X. Serotonergic neurons in the median raphe nucleus mediate anxiety- and depression-like behavior. *Sheng li xue bao: Acta Physiologica Sinica*. 2018;70:228-236.
- Li Y., Zhong W., Wang D., Feng Q., Liu Z., Zhou J., Jia C., Hu F., Zeng J., Guo Q., Fu L., Luo M. Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals. *Nat. Commun.* 2016;7:10503. DOI 10.1038/ncomms10503.
- Li Z., Yang H.-Y., Wang Y., Zhang M.-L., Liu X.-R., Xiong Q., Zhang L.-N., Jin Y., Mou L.-S., Liu Y., Li R.-F., Rao Y., Dai Y.-F. Generation of tryptophan hydroxylase 2 gene knockout pigs by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *J. Biomed. Res.* 2017;31:445-452. DOI 10.7555/JBR.31.20170026.
- Liu C., Maejima T., Wyler S.C., Casadesus G., Herlitze S., Deneris E.S. Pet-1 is required across different stages of life to regulate serotonergic function. *Nat. Neurosci.* 2010;13:1190-1198. DOI 10.1038/nn.2623.
- Liu Z., Zhou J., Li Y., Hu F., Lu Y., Ma M., Feng Q., Zhang J., Wang D., Zeng J., Bao J., Kim J.-Y., Chen Z.-F., El Mestikawy S., Luo M. Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron*. 2014;81:1360-1374. DOI 10.1016/J.NEURON.2014.02.010.
- Lottem E., Lörincz M.L., Mainen Z.F. Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons rapidly inhibits spontaneous but not odor-evoked activity in olfactory cortex. *J. Neurosci.* 2016;36:7-18. DOI 10.1523/JNEUROSCI.3008-15.2016.
- Lukashev A.N., Zamyatnin A.A. Viral vectors for gene therapy: current state and clinical perspectives. *Biochemistry (Moscow)*. 2016;81:700-708. DOI 10.1134/S0006297916070063.
- Luo J., Feng Q., Wei L., Luo M. Optogenetic activation of dorsal raphe neurons rescues the autistic-like social deficits in Shank3 knockout mice. *Cell Res.* 2017;27:950-953. DOI 10.1038/cr.2017.52.
- Mahler S.V., Vazey E.M., Beckley J.T., Keistler C.R., McGlinchey E.M., Kaufling J., Wilson S.P., Deisseroth K., Woodward J.J., Aston-Jones G. Designer receptors show role for ventral pallidum input to ventral tegmental area in cocaine seeking. *Nat. Neurosci.* 2014;17:577-585. DOI 10.1038/nn.3664.
- Miyazaki K.W., Miyazaki K., Tanaka K.F., Yamanaka A., Takahashi A., Tabuchi S., Doya K. Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons enhances patience for future rewards. *Curr. Biol.* 2014;24:2033-2040. DOI 10.1016/J.CUB.2014.07.041.
- Mosienko V., Bert B., Beis D., Matthes S., Fink H., Bader M., Alenina N. Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Transl. Psychiatry*. 2012;2:e122. DOI 10.1038/tp.2012.44.
- Müller C.P., Jacobs B.L. (Eds.). *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*. Acad. Press, 2010.
- Muñoz-Jiménez C., Ayuso C., Dobrzynska A., Torres-Mendéz A., de la Cruz Ruiz P., Askjaer P. An efficient FLP-based toolkit for spatiotemporal control of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2017;206:1763-1778. DOI 10.1534/genetics.117.201012.
- Nishitani N., Nagayasu K., Asaoka N., Yamashiro M., Andoh C., Nagai Y., Kinoshita H., Kawai H., Shibui N., Liu B., Hewinson J., Shirakawa H., Nakagawa T., Hashimoto H., Kasparov S., Kaneko S. Manipulation of dorsal raphe serotonergic neurons modulates active coping to inescapable stress and anxiety-related behaviors in mice and rats. *Neuropsychopharmacology*. 2019;44:721-732. DOI 10.1038/s41386-018-0254-y.
- Ohmura Y., Tanaka K.F., Tsunematsu T., Yamanaka A., Yoshioka M. Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behaviour in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014;17:1777-1783. DOI 10.1017/S1461145714000637.
- Patel P.D., Bochar D.A., Turner D.L., Meng F., Mueller H.M., Pontrello C.G. Regulation of tryptophan hydroxylase-2 gene expression by a bipartite RE-1 silencer of transcription/neuron restrictive silencing factor (REST/NRSF) binding motif. *J. Biol. Chem.* 2007;282:26717-26724. DOI 10.1074/jbc.M705120200.
- Patel P.D., Pontrello C., Burke S. Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biol. Psychiatry*. 2004;55:428-433. DOI 10.1016/J.BIOPSYCH.2003.09.002.
- Piszczek L., Schlax K., Wyrzykowska A., Piszczek A., Audero E., Thilo Gross C. Serotonin 1A auto-receptors are not sufficient to modulate anxiety in mice. *Eur. J. Neurosci.* 2013;38:2621-2627. DOI 10.1111/ejn.12260.
- Rao D.D., Vorhies J.S., Senzer N., Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009;61:746-759. DOI 10.1016/J.ADDR.2009.04.004.
- Ren J., Friedmann D., Xiong J., Liu C.D., Deloach K.E., Ran C., Pu A., Sun Y., Weissbourd B., Neve R.L., Horowitz M., Luo L. Anatomical

- cal, physiological, and functional heterogeneity of the dorsal raphe serotonin system. *bioRxiv*. 2018. DOI 10.1101/257378.
- Richardson-Jones J.W., Craige C.P., Guiard B.P., Stephen A., Metzger K.L., Kung H.F., Gardier A.M., Dranovsky A., David D.J., Beck S.G., Hen R., Leonardo E.D. 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron*. 2010;65:40-52. DOI 10.1016/j.neuron.2009.12.003.
- Richardson-Jones J.W., Craige C.P., Nguyen T.H., Kung H.F., Gardier A.M., Dranovsky A., David D.J., Guiard B.P., Beck S.G., Hen R., Leonardo E.D. Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *J. Neurosci*. 2011;31:6008-6018. DOI 10.1523/JNEUROSCI.5836-10.2011.
- Sachs B.D., Jacobsen J.P.R., Thomas T.L., Siesser W.B., Roberts W.L., Caron M.G. The effects of congenital brain serotonin deficiency on responses to chronic fluoxetine. *Transl. Psychiatry*. 2013;3:e291. DOI 10.1038/tp.2013.65.
- Scofield M.D., Boger H.A., Smith R.J., Li H., Haydon P.G., Kalivas P.W. Gq-DREADD selectively initiates glial glutamate release and inhibits cue-induced cocaine seeking. *Biol. Psychiatry*. 2015;78:441-451. DOI 10.1016/J.BIOPSYCH.2015.02.016.
- Scott M.M., Krueger K.C., Deneris E.S. A differentially autoregulated Pet-1 enhancer region is a critical target of the transcriptional cascade that governs serotonin neuron development. *J. Neurosci*. 2005;25:2628-2636. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4979-04.2005.
- Shishkina G.T., Lanshakov D.A., Bannova A.V., Kalinina T.S., Agarina N.P., Dygalo N.N. Doxycycline used for control of transgene expression has its own effects on behaviors and Bcl-xL in the rat hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol*. First online 2017; Publ. 2018; 38:281-288. DOI 10.1007/s10571-017-0545-6.
- Shizuya H., Birren B., Kim U.J., Mancino V., Slepak T., Tachiiri Y., Simon M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992;89:8794-8797.
- Singh A.K., Zajdel J., Mirrasekhan E., Almoosawi N., Frisch I., Klawonn A.M., Jaarola M., Fritz M., Engblom D. Prostaglandin-mediated inhibition of serotonin signaling controls the affective component of inflammatory pain. *J. Clin. Invest*. 2017;127:1370-1374. DOI 10.1172/JCI90678.
- Teissier A., Chemiakine A., Inbar B., Bagchi S., Ray R.S., Palmiter R.D., Dymecki S.M., Moore H., Ansorge M.S. Activity of raphé serotonergic neurons controls emotional behaviors. *Cell Rep*. 2015;13:1965-1976. DOI 10.1016/J.CELREP.2015.10.061.
- Tye K.M., Deisseroth K. Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nat. Rev. Neurosci*. 2012;13:251-266. DOI 10.1038/nrn3171.
- Urban D.J., Roth B.L. DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): chemogenetic tools with therapeutic utility. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2015;55:399-417. DOI 10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010814-124803.
- Urban D.J., Zhu H., Marcinkiewicz C.A., Michaelides M., Oshibuchi H., Rhea D., Aryal D.K., Farrell M.S., Lowery-Gionta E., Olsen R.H.J., Wetsel W.C., Kash T.L., Hurd Y.L., Tecott L.H., Roth B.L. Elucidation of the behavioral program and neuronal network encoded by dorsal raphe serotonergic neurons. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41:1404-1415. DOI 10.1038/npp.2015.293.
- Vadodaria K.C., Stern S., Marchetto M.C., Gage F.H. Serotonin in psychiatry: *in vitro* disease modeling using patient-derived neurons. *Cell Tissue Res*. 2018;371:161-170. DOI 10.1007/s00441-017-2670-4.
- Vazey E.M., Aston-Jones G. Designer receptor manipulations reveal a role of the locus coeruleus noradrenergic system in isoflurane general anesthesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111:3859-3864. DOI 10.1073/pnas.1310025111.
- Verheij M.M.M., Contet C., Karel P., Latour J., van der Doelen R.H.A., Geenen B., van Hulten J.A., Meyer F., Kozicz T., George O., Koob G.F., Homberg J.R. Median and dorsal raphe serotonergic neurons control moderate versus compulsive cocaine intake. *Biol. Psychiatry*. 2018;83:1024-1035. DOI 10.1016/J.BIOPSYCH.2017.10.031.
- Walsh J.J., Christoffel D.J., Heifets B.D., Ben-Dor G.A., Selimbeyoglu A., Hung L.W., Deisseroth K., Malenka R.C. 5-HT release in nucleus accumbens rescues social deficits in mouse autism model. *Nature*. 2018;560:589-594. DOI 10.1038/s41586-018-0416-4.
- Weber T., Renzland I., Baur M., Mönks S., Herrmann E., Huppert V., Nürnberg F., Schöning K., Bartsch D. Tetracycline inducible gene manipulation in serotonergic neurons. *PLoS One*. 2012;7:e38193. DOI 10.1371/journal.pone.0038193.
- Whitney M.S., Shemery A.M., Yaw A.M., Donovan L.J., Glass J.D., Deneris E.S. Adult brain serotonin deficiency causes hyperactivity, circadian disruption, and elimination of siestas. *J. Neurosci*. 2016;36:9828-9842. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1469-16.2016.
- Wong-Lin K., Wang D.-H., Moustafa A.A., Cohen J.Y., Nakamura K. Toward a multiscale modeling framework for understanding serotonergic function. *J. Psychopharmacol. (Oxford, England)*. 2017;31:1121-1136. DOI 10.1177/0269881117699612.
- Zhao S., Ting J.T., Atallah H.E., Qiu L., Tan J., Gloss B., Augustine G.J., Deisseroth K., Luo M., Graybiel A.M., Feng G. Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nat. Meth*. 2011;8:745-752. DOI 10.1038/nmeth.1668.
- Zhu H., Pleil K.E., Urban D.J., Moy S.S., Kash T.L., Roth B.L. Chemogenetic inactivation of ventral hippocampal glutamatergic neurons disrupts consolidation of contextual fear memory. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39:1880-1892. DOI 10.1038/npp.2014.35.
- Zhu H., Roth B.L. Silencing synapses with DREADDs. *Neuron*. 2014;82:723-725. DOI 10.1016/J.NEURON.2014.05.002.
- Zhuang X., Masson J., Gingrich J.A., Rayport S., Hen R. Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. *J. Neurosci. Meth*. 2005;143:27-32. DOI 10.1016/J.JNEUMETH.2004.09.020.

ORCID ID

U.S. Drozd orcid.org/0000-0002-8539-1463
E.V. Shaburova orcid.org/0000-0001-7795-2534

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-315-00114 мол_а и бюджетного проекта № 0324-2019-0041.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.12.2018. После доработки 25.02.2019. Принята к публикации 01.03.2019.