



钙信号相关光遗传学工具开发及其在神经生物学中的应用

王刘清¹, 何涟², Yubin Zhou³, 王友军^{1,4*}

1. 北京师范大学生命科学院抗性基因资源与分子发育北京市重点实验室, 北京 100875;

2. 南方科技大学医学院药理学系, 深圳 518055;

3. Center for Translational Cancer Research, Institute of Biosciences and Technology, Texas A&M University, Houston, TX, USA;

4. 北京师范大学生命科学院, 细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875

* 联系人, E-mail: wyoujun@bnu.edu.cn

收稿日期: 2022-05-01; 接受日期: 2022-05-18; 网络版发表日期: 2022-08-15

国家自然科学基金(批准号: 91954205)资助

摘要 神经元通过动作电位及突触传递来使动物对内外刺激做出快速而准确的反应. 钙信号通过介导或调控上述生理过程, 成为神经元活动的标志. 凭借高度的时空特异性, 光遗传学成为探究神经元钙信号的一种理想手段. 近年来, 基于一系列光敏蛋白所开发出的光控钙信号工具, 在不断完善和改进下, 被成功地应用于神经生物学研究中. 利用这些工具在多种模式动物中进行了低损伤性的光遗传学操作, 实现了从神经元钙信号到动物记忆及行为的光操纵, 体现了这类工具巨大的潜在应用价值. 本文总结了钙信号相关光遗传学工具的最新研究进展, 介绍了不同光控钙信号工具的设计原理及其在神经生物学中的应用, 并对后续发展进行了展望.

关键词 神经元, 钙信号, 光遗传学, 遗传编码的钙信号操纵工具

钙信号介导、调控着神经元的众多生理功能, 如兴奋性的产生、神经递质的释放、轴突的生长以及突触可塑性等, 因而为神经元维持正常生理功能所必需^[1]. 钙信号的异常会导致神经元功能失常, 与阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)等多种神经性疾病的发生、发展密切相关^[2~5]. 光遗传学作为一种强大的技术手段^[6,7], 其应用革命性地推动了对神经元钙信号的探究, 增强了对相关功能及机制的理解, 从而获得了越来越多的关注. 广义上的光遗传学是指通过遗传学方法在细胞内

表达光敏蛋白, 再利用光来指示或操纵细胞生命活动的技术^[8]. 通过使用细胞特异性的启动子或亚细胞器定位的靶向序列等, 可以人为地控制感光元件的细胞或亚细胞定位、再结合光照的时间、强度与范围, 共同赋予了光遗传学高度的时空特异性, 使其成为一种非常理想的技术手段^[9].

广义的光遗传学钙工具包括遗传编码的钙指示剂(genetically encoded calcium indicator, GECI). 与化学性钙指示剂相比, GECI能在胞内长期稳定存在, 并能灵敏地指示细胞钙信号或细胞活动, 特别适用于在体

引用格式: 王刘清, 何涟, Yubin Zhou, 等. 钙信号相关光遗传学工具开发及其在神经生物学中的应用. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 1173–1183
Wang L Q, He L, Zhou Y B, et al. Genetically encoded calcium channel modulators: design and applications in neurobiology (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 1173–1183, doi: [10.1360/SSV-2022-0172](https://doi.org/10.1360/SSV-2022-0172)

实验, 因此被广泛地应用于神经生物学研究中^[10-12], 详见Li等人^[13]的综述. 狭义的光遗传学钙工具是指遗传编码的钙信号操纵工具(genetically-encoded calcium channel modulators, GECM). 本文主要聚焦于GECM, 总结讨论了其设计原理及在神经生物学中的典型应用.

1 GECM的设计原理

光遗传学之所以能够利用光来操纵细胞的生命活动, 是由于使用了多种已发现的光敏蛋白, 如能够感受紫外光的受体UVR8、感受蓝光的视蛋白(opsin)、光-氧-电结构域(light-oxygen-voltage, LOV)、隐花色素(cryptochromes, CRY)、核黄素蓝光受体、光敏黄蛋白、荧光蛋白Dronpa、感受绿光的钴胺素以及感受红光/远红光的光敏色素、胆绿素等^[14]. 在吸收光能后, 光敏蛋白发生构象变化, 这些变化或是继续传递至效应元件, 或是改变蛋白与蛋白之间的相互作用, 形成同源或异源二聚体等, 从而引发下游反应. 其中opsin, LOV和CRY为GECM设计中最常用的三种感光元件. 通过蛋白质工程的手段, 将上述感光元件引入到介导或调控钙信号的蛋白质中, 从而开发设计出一系列GECM工具^[15,16](图1).

1.1 基于opsin设计的GECM工具

视蛋白是一种广泛存在于微生物及动物细胞中的膜蛋白. 视蛋白分子含有共价连接的感光分子视黄醛, 后者在接受光照后会发生构象变化进而激活视蛋白. 视蛋白可分为两类: 存在于微生物中单组分的I型视蛋白, 如细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)^[17]、盐视紫红质(halorhodopsin, HR)^[18]和通道视紫红质(channelrhodopsin, ChR)^[19,20]等. I型视蛋白本身即为离子通道, 可在光照下直接介导跨膜离子流动. 存在于动物体中的为多组分II型视蛋白, 为质膜上的G蛋白偶联受体(G-protein-coupled-receptor, GPCR), 其胞内环(loop)上具有不同的G蛋白结合位点, 被激活后会活化下游的磷酸二酯酶, 催化环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的水解, 从而使受cGMP调控的离子通道关闭^[21].

基于两种不同类型的opsin, GECM工具的改造也主要采用两种不同的方法(图1A). 对于I型视蛋白,

由于本身即为可被光调控的离子通道, 因此无需过多改造, 已可作为GECM工具使用. 如在绿藻中发现的ChR2可在光照下直接引发包括钙离子在内的阳离子内流, 造成神经元膜电位的改变^[20]. 相比于其他ChR工具, ChR2能产生更大的光电流, 因此被广泛地应用于神经生物学领域^[22-24]. 但作为GECM工具, ChR2的非选择性会造成很多非钙依赖性的反应. 后续研究尝试在ChR2中引入突变, 试图提高其钙选择性, 但改善效果有限^[25]. 此外, ChR2产生的信号响应非常迅速, 更适用于调控快速的神经活动, 而不便直接用于调控细胞钙信号转导、基因转录以及神经突触可塑性等较为缓慢的过程, 因此亟待开发钙特异性更高、适用性更广的GECM工具.

另一类基于II型视蛋白改造的设计思路是: 保留视蛋白中感光的胞外及跨膜区, 将其胞内激活G蛋白的反应区域替换为其他能引发钙信号的GPCR所对应的区域. Airan等人^[26]首次使用这一概念, 将视蛋白中用于激活磷酸二酯酶的胞内loop区, 分别替换为来自于 α_1 型肾上腺素能受体(adrenergic receptor, AR)中结合 G_q 型G蛋白的胞内区; 或来自 β_2 型肾上腺素能受体(β_2 AR)中结合 G_s 型G蛋白的胞内loop区, 进而得到了名为optoXR的新型光控GPCR嵌合体: opto- α_1 AR与opto- β_2 AR. opto- α_1 AR可在(504±6) nm光照下激活磷脂酶C(phospholipase C, PLC), 后者催化磷脂4,5-二磷酸脂酰肌醇(phosphatidylinositol biphosphate, PIP2)水解为二酰甘油酯(diacylglycerol, DAG)和三磷酸肌醇(inositol triphosphate, IP₃), 进而激活内质网上的IP₃受体, 产生钙释放, 引发胞内钙信号. opto- β_2 AR则是在光照下激活腺苷酸环化酶, 生成环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP). 当在细胞中同时表达opto- β_2 AR与cAMP门控的钙通道时, 也能通过光照产生胞内钙信号. 类似的, van Wyk等人^[27]保留了视网膜光色素黑视蛋白(melanopsin)的感光结构域, 并将其胞内loop区替换为C类GPCR家族中的代谢性谷氨酸受体6(metabotropic glutamate receptor, mGluR6)所对应区域, 设计构建得到“opto-mGluR6”. Opto-mGluR6不需要高强度的光激活, 在日光照射下便可激活, 通过 G_q -PLC-IP₃通路产生钙信号. 这类基于II型视蛋白设计的GECM的优点是能通过级联效应放大信号, 但由于各级下游信号在胞内的扩散, 该工具的空间分辨率稍差. 另外, 复杂的下游级联反应同时也会产生如DAG等其

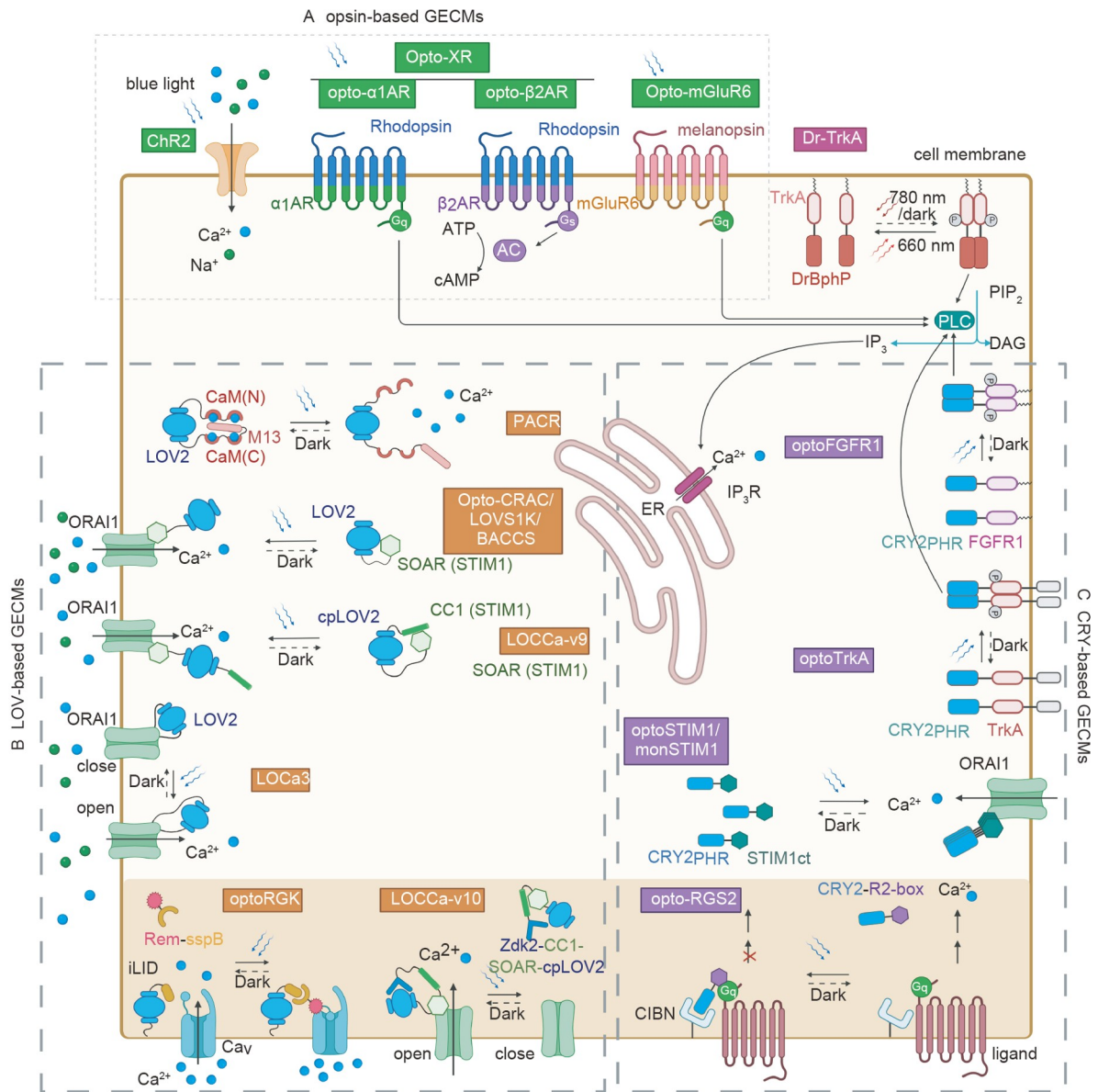


图 1 现有的主要光遗传钙操纵工具. A: 基于视蛋白(opsin)的光遗传钙操纵工具; B: 基于LOV2的光遗传钙操纵工具; C: 基于CRY的光遗传钙操纵工具

Figure 1 Schematic diagram of currently available genetically encoded calcium channel modulators (GECMs). A: GECMs based on opsin; B: GECMs constructed from LOV2; C: GECMs based on CRY

他的第二信使, 会导致一些非钙信号相关的副反应, 因而特异性较差.

1.2 基于LOV设计的GECM工具

为了解决上述opsin类GECM工具存在的问题, 研究者将目光转移到其他感光元件和钙反应蛋白. Huala等人^[28]发现燕麦的蓝光受体(phototropin)中有一段结

构域, 其序列与原核及真核生物中感受光、氧、电的蛋白具有同源性, 因此称为光-氧-电(light-oxygen-voltage, LOV)结构域. LOV含有一个PAS(period/ARNT/single-minded, PAS)核心区域, 可以与黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)结合^[29]. 根据N端PAS结构域的不同, LOV可分为LOV1和LOV2, 其中LOV2是调控燕麦phototropin产生感光性的主要原因^[30], 因而

被广泛用于GECM的构建中。黑暗状态下, PAS区域的 β -折叠与C端的J α -螺旋互作, 形成稳定的锚定结构; 在蓝光的照射下, FMN与PAS中半胱氨酸的巯基共价结合, 引发PAS区域 β -折叠内部扭曲, 构象改变传递至C端的J α -螺旋区, 使其螺旋展开与PAS分离。光照结束后, LOV又逐步恢复至基态。通过在J α -螺旋C端连接不同的效应蛋白, 设计开发了许多GECM^[31](图1B)。

Fukuda等人^[32]将LOV2感光元件插入至钙调素(calmodulin, CaM)与其靶肽M13组成的融合蛋白中, 得到了一个光激活的钙离子释放器(photoactivatable Ca^{2+} releaser, PACR)。PACR能够在黑暗状态下螯合钙离子, 在蓝光照射下, 释放出钙离子, 从而达到调控钙信号的目的。另外, 研究者还设计了多种亚细胞器定位的PACR, 突破了以往光控钙工具只定位于质膜的局限。与ChR2及optoXR相比, PACR具有很好的钙特异性, 不会引发其他非钙反应, 但其问题在于钙调素在静息状态下对钙离子的螯合会破坏细胞的钙稳态。另外, 相比于内质网钙库中及胞外毫摩尔级别的钙浓度, 一个钙调素分子只结合4个钙离子, 能提供的钙离子数量有限, 因而PACR能引发的钙信号较小, 在HeLa细胞中只能产生峰值在10~90 nmol L^{-1} 之间的钙信号。

为解决这一问题, 研究者转向目前已知的钙选择性最高的钙释放激活钙(calcium release activated calcium, CRAC)通道。经典的CRAC通道由Orai1和基质相互作用分子1(stromal interaction molecule, STIM1)组成。其中Orai1是位于质膜上的通道亚基, STIM1是定位于内质网膜上的钙感受器蛋白。CRAC通道介导钙库操纵性钙内流(store operated calcium entry, SOCE), 当内质网腔内钙离子浓度降低时, STIM1的胞浆片段会发生构象变化, 释放出STIM1上激活Orai1的最小片段(STIM1 Orai activating region, SOAR)^[33]。激活的STIM1在内质网-质膜连接区富集, 发生寡聚化, 形成斑块(puncta)并与Orai1互作, 使得通道蛋白Orai1产生协同变构效应, 打开其中的孔道, 介导钙离子内流。利用CRAC通道构建GECM工具的一种思路是对STIM1进行光控改造: 保留STIM1中用于激活Orai1产生钙信号的胞浆片段(cytosolic terminus, ct), 但将STIM1的N末端钙响应区及跨膜区替换为LOV2感光元件, 从而将STIM1由内质网钙水平操纵的分子改为光控激活的分子。Pham等人^[34]将截短的STIM1ct(STIM1₂₃₃₋₄₅₀)连接在LOV2的C端, 构建出光控激活的STIM1分子,

LOVS1K。在黑暗状态下, LOVS1K中的LOV2与Ja互作, 产生的空间位阻抑制了STIM1₂₃₃₋₄₅₀对Orai1的结合; 而当其受到蓝光激活后, STIM1₂₃₃₋₄₅₀被释放出来, 结合并激活Orai1, 引发钙内流。该工具的缺点是被蓝光激活的程度不高, 只有30%左右的LOVS1K光照后能与Orai1结合。另外, 可逆性稍差, 表达LOVS1K的细胞被重复光照40 min后, 整个胞浆钙水平会从静息的100 nmol L^{-1} 上升至500 nmol L^{-1} 左右。2015年, He等人^[35]与Ishii等人^[36]各自进行了进一步的优化, 分别设计出Opto-CRAC和蓝光激活的钙通道开关(blue light-activated Ca^{2+} channel switch, BACCS)两种GECM工具。通过对不同长度的STIM1ct进行一系列筛选, Opto-CRAC采用了STIM1₃₃₆₋₄₈₆区域, 而BACCS则选择了STIM1₃₄₇₋₄₄₈区域。相比于LOVS1K, Opto-CRAC与BACCS两个工具都减少了STIM1的CC1区域来提高工具的钙反应大小。CC1区域可能与LOV2竞争结合SOAR, 导致LOVS1K激活Orai1的能力较弱。Ishii等人^[36]在BACCS的基础上还进一步设计了3种不同的形式: BACCS的二聚体形式(hBACCS2)、BACCS2与Orai1的融合蛋白以及果蝇源的BACCS2(dmBACCS2)。其中dmBACCS2只能激活果蝇源的Orai1, 当dmBACCS2与dmOrai同时表达时, 能产生较大的光控钙信反应。同样的原理, 小鼠(*Mus musculus*)或者人源的Opto-CRAC组件也可以连在哺乳动物Orai1通道C-端来达到光控钙离子内流的效果。

Ja C端连接的效应分子会降低LOV2的PAS结构域在黑暗状态下的锚定Ja能力, 导致基于LOV2的GECM有较明显的暗激活现象。为此, 许多研究在LOV2上引入了突变, 对其进行了改造, 从而加强了LOV2在黑暗状态下构象的稳定性, 并进一步提高其光控异构化能力^[37]。这类GECM的另一局限是效应分子只能连接在Ja的C端, 因此He等人^[38]设计了一种环化重排的cpLOV2(circularly permuted LOV2), 增加了LOV2的结合表面, 使效应分子可同时连接在cpLOV2的N/C两端, 增加了设计GECM的灵活性。在此基础上, 他们设计了一种名为LOCCa-v9的光激活工具。其设计策略是将cpLOV2插入至STIM1ct中的CC1与SOAR区之间, 使SOAR区在黑暗状态下被CC1区锚定。蓝光照后, 随着cpLOV2的构象变化, SOAR区被释放从而激活Orai1。这些工具都具备了前所未有的钙选择性, 但缺点是需要细胞有内源或外源表达的Orai1。另外,

光激活的STIM1有可能会干扰内源STIM1的功能,也可能通过STIM1其他靶点而产生副反应. 这些缺点均限制了这些工具的潜在应用范围.

为了解决上述问题, He等人^[39]创造性地将LOV2感光元件直接引入到Orai1通道蛋白上. 经过多轮筛选和优化后, 通过在Orai1-H171D-P245T持续激活突变体的胞内loop区域插入LOV2, 构建了首个单元件的光控钙内流工具: LOCa3. 黑暗状态下, LOV2将其中的Orai1-H171D-P245T钳制于无活性状态; 蓝光照射引发LOV2构象改变, 经协同变构效应打开通道, 引发钙内流. LOCa3的激活无需STIM1的参与, 也不依赖于细胞内源或外源表达的Orai1, 从而避免了上述光控STIM1工具的缺点. 同时, LOCa3还具有暗激活小、可逆性强、钙选择性高等优点. 综上, LOCa3有着非常好的潜在应用价值.

除了上述几种光激活的钙信号工具, 基于LOV2还设计出几种光抑制型GECM工具如opto-RGK及LOC-Ca-v10等^[38,40]. 大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的SsrA肽段与LOV2的Ja含有相同的序列, 并能够与SspB蛋白结合. Lungu等人^[41]将SsrA融合表达在LOV2的C端, 设计构建出LOV-ssrA, 使其在蓝光照射下与SspB蛋白结合. Guntas等人^[42]在此基础上引入突变, 调节LOV-ssrA与sspB的亲合性, 设计得到iLID(improved light-induced dimer). 基于iLID, Ma等人^[40]设计出一种光抑制型GECM: opto-RGK. Opto-RGK的原理是将iLID与SspB分别表达: iLID被定位于质膜, SspB与电压门控钙通道的抑制蛋白Rem融合表达, 黑暗时均匀分布于胞浆. 蓝光照射后, iLID暴露出ssrA区域, 通过与SspB的结合将Rem蛋白募集在钙通道附近, 从而抑制通道的开放. 另外, He等人^[38]将STIM1胞浆区插入在Zdk2(LOV2黑暗状态下的一种结合蛋白)与cpLOV2之间, 开发了一种名为LOCCa-v10光抑制钙工具. 黑暗时, Zdk2与cpLOV2结合, 暴露出SOAR区域, 可激活Orai1. 蓝光照射后, Zdk2与cpLOV2的结合被破坏, SOAR重新被CC1锚定, 从而抑制其激活Orai1的能力, 达到光抑制钙信号的效果.

1.3 基于CRY设计的GECM工具

隐花色素CRY也是一种常用的感光蛋白, 普遍存在于真核生物中. CRY由两大功能基团构成: 辅酶基团黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenosine dinucleotide,

FAD)和由N端PHR(photolyase-homologous region)与C端CCE(cryptochrome C-terminal extension)结构域组成的脱辅基基团^[43]. 黑暗状态下, PHR与CCE结合, 处于未激活状态. FAD接收到蓝光刺激后将信号传递给脱辅基蛋白, PHR结构域与CCE结构域发生解离, 并通过PHR之间的互作介导CRY发生同源二聚化或寡聚化, 从而使CRY变为激活状态. 蓝光激活的CRY可结合SPA1和CIB1等多种下游蛋白. 基于CRY的GECM的设计思路主要分为两种: 一是将CRY引入到通过二聚化激活的钙信号相关蛋白中, 利用蓝光诱导的CRY同聚化过程, 构建出钙激活工具; 二是将钙通道调控蛋白分为功能被破坏的两个片段, 并分别连接CRY及其互作蛋白, 利用光诱导的二聚化来恢复该蛋白的正常功能^[44](图1C).

根据同聚化思路, 受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)是一类具有潜力的改造目标. RTK是质膜上一类单次跨膜的受体蛋白, 由胞外配体结合区、跨膜区以及含酪氨酸蛋白激酶活性的胞内结构域构成. RTK的激活依赖配体介导的二聚化, 二聚化后酪氨酸蛋白激酶结构域发生磷酸化, 从而引发下游包括PLC-IP₃-Ca²⁺在内的多种信号反应. Chang等人^[45]将CRY2_{PHR}结构域连接在RTK成员原肌球蛋白相关激酶(tropomyosin-related kinase, Trk)的C端, 构建得到opto-TrkA/B/C三种光开关元件, 使其不再依赖神经营养因子的激活, 可在蓝光照射下发生二聚化, 进而激活下游PLC-IP₃通路, 产生钙信号. 类似的, Kim等人^[46]选择了RTK中的成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)进行设计改造. 他们删除了FGFR的胞外配体结合域, 使之丧失了由配体激活产生二聚化的能力; 并在其胞浆区域的C端连上CRY2_{PHR}结构域以及信号肽序列, 赋予其光控二聚化的能力, 从而构建出了optoFGFR1. optoFGFR1可被蓝光照射下发生二聚化, 进而激活下游信号. 这类RTK型GECM工具与上述提及的II型视蛋白型光控工具类似, 均为通过级联反应激活下游钙信号, 因此也存在同样的空间分辨率差、钙信号特异性差等问题.

由于CRAC通道激活同样需要STIM1分子发生寡聚化, 因而多个研究团队将光控寡聚化的开关引入STIM1分子, 构建了一类光控激活的STIM1. Kyung等人^[47]在CRY2_{PHR}结构域C端融合全长的STIM1ct(STIM1ct, 或STIM1₂₃₈₋₆₈₅), 得到“optoSTIM1”. optoS-

TIM1可在蓝光诱导下发生寡聚化,使STIM1ct激活,进而结合并激活Orai1. optoSTIM1可介导较大光控钙信号($F_{\max}/F_0=8.2$),但有光开关速度较慢的缺点($t_{1/2, \text{on}}=(38.4\pm 2.1)$ s, $t_{1/2, \text{off}}=(320\pm 37.2)$ s)^[16]. 在optoSTIM1的基础上,有研究在CYR2_{PHR}中引入E490G等突变,显著增大了光控钙反应^[48]. Kim等人^[49]在CRY2中引入了破坏其结合表面的E281A突变,并于CRY2的C端添加9个氨基酸(ARDPPDLN, 简称为A9),增强其聚集能力,设计得到了monSTIM1. 相比于optoSTIM1, monSTIM1暗激活现象显著减弱,而光反应大小增加5倍,特别是光敏性增加了55倍,显著提高了该工具的使用性. 最近Ma等人^[44]尝试了更多光控元件与STIM1ct片段的组合,构建了多种新型GECM. 其中利用被锚定在内质网膜胞浆侧的CRY2,可以模拟生理条件下形成的STIM1 puncta状态,并能产生类似的钙信号微区.

基于CRY与CIB1互作的设计思路, Hannanta-Anan和Chow^[50]设计了一种光诱导的钙信号抑制工具: opto-RGS. 将G蛋白信号的调控因子(regulators of G-protein signaling, RGS) C端的催化区(RGS-box)结构域与CRY_{PHR}结构域连接表达; 将RGS N端具有质膜定位功能的螺旋区与CIBN(CIB1的N端)融合表达. 黑暗中, CRY2-R2-box失去螺旋区的定位引导,分布在胞浆,蓝光激活后,通过CRY_{PHR}与CIBN的互作,使R2-box募集在G α_q 附近,而发挥对G α_q 的抑制作用,进而抑制下游钙信号.

1.4 基于其他感光元件设计的GECM工具

上述基于opsin, LOV, CRY等感光元件的GECM工具,均是蓝光激发,其吸收光谱与蓝色、青色和绿色荧光蛋白重叠,因而限制了GECM在多荧光成像中的应用. 另外,蓝光的穿透性较弱,在小鼠等模型中应用时需要特定的光导设备来激活深层组织中的GECM. 为此, Leopold等人^[51]转向更适用于多色成像且穿透力更强的近红外光,将能响应近红外光的耐辐射奇球菌光敏色素(*Deinococcus radiodurans* bacterial phytochrome, DrBphP)引入对RTK成员TrKA的改造中. DrBphP包括N端的核心感光元件(photosensory core module, PCM)与C端的组氨酸激酶(histidine-kinase, HK)结构域,两者通过一段 α 螺旋连接. 近红外光照射下, DrBphP可发生二聚化,红光照射下, DrBphP可转变为

单体. 通过将Trk的胞外配体结合域及跨膜区替换为DrBphP的光敏PCM结构域,得到了Dr-TrkA. 近红外光照射下, PCM结构域介导Dr-TrkA发生二聚化,激活其C端的组氨酸激酶,引发钙信号. DrTrkA利用穿透力较强的近红外光,拓展了光谱使用范围,增强了其应用性. 虽然DrTrkA具有RTK类型工具普遍存在的钙特异性差及空间分辨率低等问题,但其为开发其他近红外激发的GECM工具提供了思路.

2 GECM工具在神经生物学中的应用

光遗传学钙信号工具在神经生物学中的应用也面临与其他光遗传学工具类似的困难或挑战,即如何以干扰更小的方式实现对特定脑区的光激活. 研究者因而不断开发出新的光控工具及相关技术来实现对神经系统钙活动的光学操纵.

最为简单便利的方法是选择组织光透性较强的小型动物模型,如线虫(*Caenorhabditis*)、斑马鱼(*Danio*)和果蝇(*Drosophila melanogaster*)等. 对这类动物导入光遗传学工具相对比较简便,可直接使用光源照射动物来激活转入的GECM工具. 如Kyung等人^[47]在斑马鱼胚胎中注射OptoSTIM1的mRNA,之后在其神经管与脊髓中观测到了光照引发的胞浆钙信号. 而Fukuda等人^[32]选择了秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)进行实验. 当线虫的头部被触碰,触觉神经元会被激活产生钙信号,从而引发线虫转向. 在触觉神经元中表达PACR的秀丽隐杆线虫中,检测到了蓝光直接照射引发的,与触碰头部后相似的转向行为. 根据研究报告,AD的发生发展与异常的神经元钙稳态密切相关. He等人^[39]利用LOCa3探究果蝇神经元钙稳态改变对AD相关症状的影响,并发现在神经元中表达LOCa3的AD模型果蝇在接受蓝光照射培养后,显著减缓了其爬行能力随年龄增长而衰退的现象. 该工作体现出光控钙工具在治疗神经退行性疾病中的应用潜力.

而对于小鼠这类蓝光难以直接穿透的模式动物,表达在深层脑区的光敏性较弱的光控元件难以被直接光照激活. 研究者一般会在小鼠的头部开口,将光纤植入小鼠脑中,从而将蓝光引入至深层脑区. Airan等人^[26]在小鼠伏隔核神经元中表达opto- $\alpha 1$ AR,发现给予蓝光刺激后,转基因小鼠对具有光刺激的空间具有更高的偏好性. Ishii等人^[36]在小鼠嗅觉神经元中表达

Orai1与hBACCS2,发现蓝光刺激下的转基因小鼠嗅觉神经元能产生类似气味分子引发的感觉反应. Kyung等人^[47]在小鼠参与背景记忆形成的海马体CA1区神经元中表达optoSTIM1后,发现表达optoSTIM1的小鼠在蓝光照射后背景记忆加强.

虽然将光纤植入实验动物脑中是目前较为常见的光遗传学操作手段,但该方法会对实验动物造成创伤,光纤的存在也会对动物行为造成一定的干扰. 这些操作不仅对实验检测造成一定的影响,而且对未临床应用以及多脑区应用都构成了较大的限制. Kim等人^[49]利用具有更高光敏性的monSTIM1摆脱了这些限制. 研究者在小鼠的不同脑区兴奋性神经元或星形胶质细胞中表达monSTIM1后,不再对小鼠进行开颅与去除毛发,而是直接将小鼠处于安装有LED光源的笼子中,并用 1 mW/cm^2 473 nm的蓝光直接照射小鼠30 min. 1 h后在小鼠大脑各区域均检测到了表达有钙依赖性早期相应基因c-Fos的阳性细胞. 研究者还进一步测试了小鼠的行为学实验,并观察到前扣带回区域表达monSTIM1的小鼠在蓝光照射后,社会学习性恐惧反应加强;海马CA1区表达monSTIM1的小鼠在蓝光照射后,其背景记忆加强. 这些结果表明,无需埋置光纤也能用蓝光通过monSTIM1激活深层脑区的光控钙信号.

虽然利用monSTIM1可实现无损伤性地光控深层脑区的钙信号,但这对光控元件的光敏度有较高的要求. 随着脑区的深入,蓝光穿透性降低,光控效率也显著下降,从皮层74%的阳性率到海马区降低至21.5%. 另外,为了达到蓝光对深层脑区的操控效果,不得不设定足够高的光照强度,这会引发光热反应与氧化应激反应,并容易造成STIM1的激活. 目前,上转换纳米颗粒(upconversion nanoparticles, UCNPs)对于解决这个问题展示出巨大的应用价值^[52]. UCNPs能够吸收能量较低、穿透性强的近红外光转变为波长较短能量更高的可见光发射,如 $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb/Tm@}\beta\text{-NaYF}_4$, $\text{NaYF}_4\text{:Yb/Tm@SiO}_2$ 等UCNPs则可以将980 nm的近红外光转变为470 nm的蓝光发射,非常适用于大多数的光控钙工具. He等人^[35]将孵育过UCNPs并表达有opto-CRAC的HeLa细胞种植于小鼠皮下,近红外光照射种植区域后,可检测到该区域响应钙信号的转录因子入核显著增加. Chen等人^[53]在小鼠的腹侧被盖区的多巴胺神经元中表达ChR2并注射UCNPs,近红外光照后,

小鼠多巴胺神经元的c-FOS表达显著上调,多巴胺释放也显著增加. 当表达有ChR2的小鼠齿状回颗粒细胞被UCNPs激活后,则能引发小鼠产生对过去恐惧记忆的回忆.

3 总结与展望

钙离子是神经元活动中非常关键的信号分子,因此,指征神经元钙信号的GECIs和操控神经元钙信号的光控工具均在神经生物学中得到非常广泛的应用. 同时,利用光遗传学技术操控神经元活动,进而研究单个神经元、神经环路以及各脑区的功能也已经是神经生物学中非常常用的手段. 目前以ChR2为代表的光遗传学工具是通过光控离子流动改变膜电位来快速激活或抑制神经元活动. 然而它们的离子选择性不高,难以对神经元中与基因表达、突触可塑性密切相关的钙离子动态及稳态进行调控,因而适用范围有限. 而利用光遗传钙工具则能够实现胞内钙离子浓度的操纵. 利用这类工具一方面可以具体地探究神经元钙信号相关的功能、机制以及改变细胞钙稳态后细胞各生理变化,如He等人通过改变神经元钙稳态,缓解了果蝇阿尔兹海默病相关症状. 另一方面,光遗传钙工具还可以被用于激活非兴奋细胞,如激活免疫细胞产生免疫反应等,进一步扩大了光遗传学工具的应用范围.

经过逐步发展与改造后,光遗传钙工具在钙选择性、光敏性、可逆性、动态范围以及光反应速度等各个方面都得到了非常大的提高,但仍然存在着如暗激活大及光反应小等问题,有待进一步改善(表1). 此外,目前的光控钙信号工具大多依赖蓝光激活,而高强度的蓝光照射不仅具有光毒性,还会在同时进行钙信号检测时限制对GECI探针的选择. 目前开发了一款直接由近红外光激活的GECM: DrTrkA,可避免由蓝光激发而产生的弊端,但仍然存在空间分辨率差、钙特异性不高等RTK类型工具常见问题,因此未来亟待开发其他近红外光激活的更具时空分辨率与钙信号特异型的光控元件.

目前空间分辨率高的光控钙信号工具主要来源于对质膜定位的ChR2与CRAC通路相关蛋白的改造. 这些光控工具或是缺少钙离子选择性,或是光反应较小,因而限制了其应用. 选择新的设计模板,也许能给目前的难题带来新的解决方法. 质膜上除了Orai,也存在着

表 1 各GECM的性能及应用总结^{a)}

Table 1 Genetically encoded calcium channel modulators (GECM): design and applications in neurobiology

光控工具	感光元件	激发光	激活时间 ($t_{1/2}$, s)	失活时间 ($t_{1/2}$, s)	优点	缺点	神经生物学中的 应用	参考文献
ChR2	opsin	蓝光	0.002	0.01	响应迅速灵敏, 已被广泛使用	离子选择性弱, 钠钾 电流大, 但钙信号小, 不适用于钙特异性 活动的调节	光学操纵小鼠的 过度进食、逃避 行为等	[54,55]
opto-XR		蓝、绿光	N/A	N/A	通过级联反应 放大反应信号	空间分辨率差, 易引发非钙信号 的副反应	调控小鼠空间 偏好性	[26]
opto-mGluR6			N/A	N/A			N/A	[27]
PACR	LOV2		0.006*	41.7	多种细胞器定位 工具可选	影响钙稳态, 且 引发的钙信号小	调控线虫转向	[32]
LOVS1K			N/A	N/A			N/A	[34]
optoCRAC			23.4±4.2	24.9±4.8	钙离子选择性高	有暗激活, 细胞需表 达有Orai,且易引发 副反应	N/A	[35]
BACCS			<30	30-60			光控模拟小鼠 嗅觉的产生.	[36]
LOCa3	cpLOV2		48.69 ± 4.5	56.84 ± 3.8	钙离子选择性高, 暗激活小, 可逆性 强, 单元件使用简单	钙信号稍小, 有 待进一步提高	缓解阿尔兹海默病 模型果蝇的爬行衰 退的现象	[39]
LOCCa-V9			N/A	N/A	钙离子选择性高, 可逆性强	细胞需表达有Orai, 可能会引发副反应	N/A	[38]
LOCCa-V10			N/A	N/A	CRAC通道的 抑制工具	黑暗下持续激活 内源Orai1	N/A	[38]
optoRGK		蓝光						
optoTrkA/B/C	iLID		3.2±1.0	23.0±2.4	L型钙通道 抑制工具	双元件, 在体转 染稍难	N/A	[40]
opto-FGFR1			<30	N/A	通过级联反应 放大反应信号	空间分辨率差, 易引发非钙信号 的副反应	N/A	[45]
opto-STIM1	CRY		64.5±4.8	274.5±23.7	钙离子选择性高	钙信号的光开关 速度慢	斑马鱼神经元钙信 号的光开关, 以及调 控小鼠背景记忆的 形成.	[47]
monSTIM1			24.8±1.0	513.5±25.8	钙选择性高, 暗激 活小, 光敏性强	N/A	调节小鼠社会学习 性反应与背景记忆.	[49]
opto-RGS			19.7±2.0	396±45	钙信号抑制工具	双元件, 在体转染稍 难; 空间分辨率差, 易引发非钙信号的 副反应	N/A	[50]
Dr-TrKA	DrBphP	近红外	~7	~10	NIR 可穿透深层 组织, 无蓝光毒性	空间分辨率差, 易 引发非钙信号的 副反应	N/A	[51]

a) *: 以1/ K_{on} 指示的激活时间

多种钙选择性高的离子通道, 如电压门控的钙通道等. 目前, 针对这类型钙通道的光控改造只涉及光抑制型工具, 缺少光激活型的电压门控的钙通道. 开发改造这类钙通道, 或可突破Orai通道引发的钙信号较小的问题, 有望产生更大的光反应. 除此之外, 细胞中内质网也是极有潜力的改造目标. 内质网是细胞中的钙库,

其游离钙离子浓度可达400~800 $\mu\text{mol/L}$ [56]. 内质网膜上存在着多种钙选择性较高的通道如IP₃受体、兰尼碱受体(ryanodine receptors, RyR)等, 这些通道蛋白都具有成为光控钙释放元件的潜力. 另外, 设计构建内质网光控钙释放工具还能探究细胞器之间的钙信号调控, 如内质网-线粒体之间的钙信号交流, 提供技术

基础.

此外, 利用光遥控细胞钙信号活动, 除了遗传学手段, 使用光化学药物也是一种极具应用价值的方式^[57-59]. 光化学型钙信号工具不再依赖光控工具的转基因表达, 不涉及这一社会伦理障碍. Yang等人^[60]设计的piCRAC、Udasin等人^[61]设计的LOCI, 均是靶向CRAC通道蛋白, 具有光开关功能的化学药物. 它们可在紫外光照射下发生构象变化, 激活或者抑制Orai通道. 当然, 光化学药物虽然有着无需过表达光控工具的便利性, 但同时也具备化学药物普遍存在的问题,

如药物呈递困难、细胞毒性大及因代谢而不能常驻动物体内等. 未来光化学与光遗传学的联用, 也许可弥补各自方法的不足, 得到更加完善便利的光控钙信号体系.

光控钙信号作为光遗传学中的新兴技术, 具有其独特的优势, 也存在着待改进完善之处. 目前相关工具虽已成功地应用在免疫、神经生物学等多个领域, 仍待进一步的推广. 相信在不久的将来, 光遗传学钙信号工具将会获得更多的改进, 实现更多更广泛的应用, 进而推动各领域学科的发展.

参考文献

- Berridge M J. Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 1998, 21: 13–26
- Bezprozvanny I, Mattson M P. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, 2008, 31: 454–463
- Popugaeva E, Pchitskaya E, Bezprozvanny I. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease—a therapeutic opportunity? *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483: 998–1004
- Pchitskaya E, Popugaeva E, Bezprozvanny I. Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases. *Cell Calcium*, 2018, 70: 87–94
- Wang L Q, Dou F, Wang Y J. Neuronal calcium signaling system and “calcium hypothesis” of Alzheimer's disease (in Chinese). *Chin J Biochem Biol*, 2022, 38: 689–698 [王刘清, 窦非, 王友军. 神经元钙信号系统异常与阿尔茨海默病的“钙假说”. *中国生物化学与分子生物学报*, 2022, 38: 689–698]
- Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. The development and application of optogenetics. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34: 389–412
- Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat Neurosci*, 2015, 18: 1213–1225
- Rost B R, Schneider-Warme F, Schmitz D, et al. Optogenetic tools for subcellular applications in neuroscience. *Neuron*, 2017, 96: 572–603
- Yang J J, Chen T, Wu Y, et al. Research progress in genetically encoded indicators of neuronal activity (in Chinese). *Genom Appl Biol*, 2020, 39: 3996–4002 [杨晶晶, 陈天丽, 吴雅兰, 等. 神经元活动基因编码指示剂的研究进展. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39: 3996–4002]
- Lin M Z, Schnitzer M J. Genetically encoded indicators of neuronal activity. *Nat Neurosci*, 2016, 19: 1142–1153
- Grienberger C, Konnerth A. Imaging calcium in neurons. *Neuron*, 2012, 73: 862–885
- Inoue M. Genetically encoded calcium indicators to probe complex brain circuit dynamics in vivo. *Neurosci Res*, 2021, 169: 2–8
- Li J, Wang Y J, Zhang X Y. Research progress on calcium indicators (in Chinese). *Prog Biochem Biophys*, 2021, 48: 788–806 [李佳, 王友军, 张晓嫣. 钙指示剂的发展及其研究现状. *生物化学与生物物理进展*, 2021, 48: 788–806]
- Tan P, He L, Huang Y, et al. Optophysiology: illuminating cell physiology with optogenetics. *Physiol Rev*, 2022, 102: 1263–1325
- Nguyen N T, Ma G, Zhou Y, et al. Optogenetic approaches to control Ca^{2+} -modulated physiological processes. *Curr Opin Physiol*, 2020, 17: 187–196
- Ma G, Wen S, He L, et al. Optogenetic toolkit for precise control of calcium signaling. *Cell Calcium*, 2017, 64: 36–46
- Oesterheld D, Stoeckenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol*, 1971, 233: 149–152
- Lanyi J K. Halorhodopsin: a light-driven chloride ion pump. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 1986, 15: 11–28
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, et al. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science*, 2002, 296: 2395–2398
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 13940–13945
- Costanzi S, Siegel J, Tikhonova I G, et al. Rhodopsin and the others: a historical perspective on structural studies of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des*, 2009, 15: 3994–4002
- Hegemann P, Nagel G. From channelrhodopsins to optogenetics. *EMBO Mol Med*, 2013, 5: 173–176

- 23 Nagel G, Brauner M, Liewald J F, et al. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol*, 2005, 15: 2279–2284
- 24 Boyden E S, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 2005, 8: 1263–1268
- 25 Kleinlogel S, Feldbauer K, Dempfski R E, et al. Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca^{2+} -permeable channelrhodopsin CatCh. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 513–518
- 26 Airan R D, Thompson K R, Fenno L E, et al. Temporally precise *in vivo* control of intracellular signalling. *Nature*, 2009, 458: 1025–1029
- 27 van Wyk M, Pielecka-Fortuna J, Löwel S, et al. Restoring the ON switch in blind retinas: opto-mGluR6, a next-generation, cell-tailored optogenetic tool. *PLoS Biol*, 2015, 13: e1002143
- 28 Huala E, Oeller P W, Liscum E, et al. *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science*, 1997, 278: 2120–2123
- 29 Christie J M, Salomon M, Nozue K, et al. LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 8779–8783
- 30 Christie J M, Swartz T E, Bogomolni R A, et al. Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J*, 2002, 32: 205–219
- 31 Zimmerman S P, Kuhlman B, Yumerefendi H. Engineering and application of LOV2-based photoswitches. *Methods Enzymol*, 2016, 580: 169–190
- 32 Fukuda N, Matsuda T, Nagai T. Optical control of the Ca^{2+} concentration in a live specimen with a genetically encoded Ca^{2+} -releasing molecular tool. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 1197–1203
- 33 Prakriya M, Lewis R S. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, 2015, 95: 1383–1436
- 34 Pham E, Mills E, Truong K. A synthetic photoactivated protein to generate local or global Ca^{2+} signals. *Chem Biol*, 2011, 18: 880–890
- 35 He L, Zhang Y, Ma G, et al. Near-infrared photoactivatable control of Ca^{2+} signaling and optogenetic immunomodulation. *eLife*, 2015, 4: e10024
- 36 Ishii T, Sato K, Kakumoto T, et al. Light generation of intracellular Ca^{2+} signals by a genetically encoded protein BACCS. *Nat Commun*, 2015, 6: 8021
- 37 Strickland D, Yao X, Gawlak G, et al. Rationally improving LOV domain-based photoswitches. *Nat Methods*, 2010, 7: 623–626
- 38 He L, Tan P, Zhu L, et al. Circularly permuted LOV2 as a modular photoswitch for optogenetic engineering. *Nat Chem Biol*, 2021, 17: 915–923
- 39 He L, Wang L, Zeng H, et al. Engineering of a bona fide light-operated calcium channel. *Nat Commun*, 2021, 12: 164
- 40 Ma G, Liu J, Ke Y, et al. Innenrücktitelbild: optogenetic control of voltage-gated calcium channels. *Angew Chem*, 2018, 130: 7375
- 41 Lungu O I, Hallett R A, Choi E J, et al. Designing photoswitchable peptides using the AsLOV2 domain. *Chem Biol*, 2012, 19: 507–517
- 42 Guntas G, Hallett R A, Zimmerman S P, et al. Engineering an improved light-induced dimer (iLID) for controlling the localization and activity of signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 112–117
- 43 Chaves I, Pokorny R, Byrdin M, et al. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol*, 2011, 62: 335–364
- 44 Ma G, He L, Liu S, et al. Optogenetic engineering to probe the molecular choreography of STIM1-mediated cell signaling. *Nat Commun*, 2020, 11: 1039
- 45 Chang K Y, Woo D, Jung H, et al. Light-inducible receptor tyrosine kinases that regulate neurotrophin signalling. *Nat Commun*, 2014, 5: 4057
- 46 Kim N, Kim J M, Lee M, et al. Spatiotemporal control of fibroblast growth factor receptor signals by blue light. *Chem Biol*, 2014, 21: 903–912
- 47 Kyung T, Lee S, Kim J E, et al. Optogenetic control of endogenous Ca^{2+} channels *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1092–1096
- 48 Bohineust A, Garcia Z, Corre B, et al. Optogenetic manipulation of calcium signals in single T cells *in vivo*. *Nat Commun*, 2020, 11: 1143
- 49 Kim S, Kyung T, Chung J H, et al. Non-invasive optical control of endogenous Ca^{2+} channels in awake mice. *Nat Commun*, 2020, 11: 210
- 50 Hannanta-Anan P, Chow B Y. Optogenetic inhibition of G_{α_q} protein signaling reduces calcium oscillation stochasticity. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 1488–1495
- 51 Leopold A V, Chernov K G, Shemetov A A, et al. Neurotrophin receptor tyrosine kinases regulated with near-infrared light. *Nat Commun*, 2019, 10: 1129
- 52 Zheng W, Huang P, Tu D, et al. Lanthanide-doped upconversion nano-bioprobes: electronic structures, optical properties, and biodetection. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 1379–1415
- 53 Chen S, Weitemier A Z, Zeng X, et al. Near-infrared deep brain stimulation via upconversion nanoparticle-mediated optogenetics. *Science*, 2018,

359: 679–684

- 54 Bolborea M, Pollatzek E, Benford H, et al. Hypothalamic tanycytes generate acute hyperphagia through activation of the arcuate neuronal network. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 14473–14481
- 55 Wrobel C, Dieter A, Huet A, et al. Optogenetic stimulation of cochlear neurons activates the auditory pathway and restores auditory-driven behavior in deaf adult gerbils. *Sci Transl Med*, 2018, 10: 449
- 56 Suzuki J, Kanemaru K, Iino M. Genetically encoded fluorescent indicators for organellar calcium imaging. *Biophys J*, 2016, 111: 1119–1131
- 57 Broichhagen J, Frank J A, Trauner D. A roadmap to success in photopharmacology. *Acc Chem Res*, 2015, 48: 1947–1960
- 58 Hüll K, Morstein J, Trauner D. *In vivo* photopharmacology. *Chem Rev*, 2018, 118: 10710–10747
- 59 Fehrentz T, Schönberger M, Trauner D. Optochemical genetics. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 12156–12182
- 60 Yang X, Ma G, Zheng S, et al. Optical control of CRAC channels using photoswitchable azopyrazoles. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 9460–9470
- 61 Udasin R, Sil A, Zomot E, et al. Photopharmacological modulation of native CRAC channels using azoboronate photoswitches. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2118160119

Genetically encoded calcium channel modulators: design and applications in neurobiology

WANG LiuQing¹, HE Lian², ZHOU YuBin³ & WANG YouJun^{1,4}

¹ Beijing Key Laboratory of Gene Resource and Molecular Development, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

² Department of Pharmacology, School of Medicine, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, China;

³ Center for Translational Cancer Research, Institute of Biosciences and Technology, Texas A&M University, Houston, TX, USA;

⁴ Ministry of Education Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Animals rely on neurons to respond quickly and accurately to various stimuli. Calcium (Ca^{2+}) signal has become a well-established index for neural activities, as it is essential for the generation of action potentials and synaptic transmissions, which are two fundamental functions of neurons. To control neural Ca^{2+} signaling with high spatiotemporal precision, optogenetics has become an ideal approach. Recently, by incorporating photosensory modules into Ca^{2+} -handling machinery, various genetically encoded calcium channel modulators (GECMs) have been engineered and further improved. These tools enable less-invasive optical control of multiple neural activities, ranging from Ca^{2+} signaling to animal memory and behaviors, showing great potential for the dissection and modulation of neuronal function and related diseases. This review summarizes recent progress in GECMs, with a focus on their design strategies and representative applications in neurobiology.

neuron, Ca^{2+} signaling, optogenetics, genetically encoded Ca^{2+} channel modulators

doi: 10.1360/SSV-2022-0172