IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

۲ (٤)، ۲۷۰- ۲٦۲ زمستان ۱۳۹۷

مقاله مروری

اپتوژنتیک: کنترل سلولهای زنده با استفاده از نور

حمید غلامی پور بدیع

گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران

دریافت: ۱۳ خرداد ۹۶ پذیرش: ۲۲ مهر ۹۶

چکیده

یکی از چالشهای بزرگ در علوم اعصاب دانستن این است که چطور رفتارهای خاص مانند غذا خوردن، خشم، شناخت و حرکت از فعالیت و برهمکنش سلولهای منفرد در شبکه های عصبی ناشی می‌شوند. دستکاریهای ژنتیکی، فارماکولوژیکی و یا تخریب و آسیب به یک ناحیه مغزی برای بررسی پاسخ شبکه عصبی در زمان انجام یک رفتار بکار گرفته می‌شوند. این روشها فاقد دقت زمانی در سیگنالینک و کدگذاری عصبی هستند. با استفاده از اپتوژنتیک محققین می‌توانند فعالیت نوع خاصی از سلولها و مسیرهای عصبی را با دقت و سرعت بالا کنترل کنند که فقط با استفاده از نور قابل انجام است. این تکنیک انقلابی را در حوزه علوم اعصاب ایجاد کرده است و یک راه جدید را فراهم آورده است تا نقش هر یک از مدارهای عصبی مورد بررسی قرار گیرد. در این اینجا ما شرح حالی از این فناوری را خواهیم گفت و بطور مختصر در رابطه با اپسینهای مورد استفاده در اپتوژنتیک و مطالعاتی که در محیط درون تن شبکه های عصبی مختلف را مورد بررسی قرارداده اند را مرور خواهیم کرد.

واژه‌های کلیدی: اپتوژنتیک، کانال ردوپسین، شبکه عصبی، هالوردوپسین، نور

مقدمه

اپتوژنتیک فناوری زیستی است که با استفاده از نور میتوان فعالیت سلولها بویژه نورونهایی را که بطور ژنتیکی طوری دستکاری شده‌اند تا بتوانند یک کانال یونی حساس به نور را بیان کنند کنترل کرد. برای اولین بار Francis Crick برای توجیه تئوری عمومی ذهن به این نتیجه رسید که باید به روشی دست یافت تا بوسیله آن بتوان نورونهای موجود از یک نوع را غیرفعال کرد بدون آنکه فعالیت سایر نورونها تغییر کنند [۱]. دستکاری و یا تحریک الکتریکی خارج سلولی نمی تواند ابزار مناسبی باشد چون علیرغم دقت زمانی بالا، با آن نمی توان فقط یک نوع نورون خاص مثلا گاباارژیک را تحریک کرد و در اثر تحریک، فعالیت طیفی از سلولها تغییر می‌یابد. به روش فارماکولوژیک و ژنتیکی می توان فعالیت یک نوع سلول خاص را تغییر داد بدون آنکه باقی انواع دیگر سلولها دستخوش تغییر شوند، اما این روشها قادر نیستند در یک مقطع زمانی مشخص سیگنالینگ و فعالیت سلولی را کنترل کنند به عبارتی فاقد دقت زمانی بالایی هستند. بنابراین نیاز به یک تکنولوژی جدید که بتواند دقت زمانی بالایی داشته باشد و فقط یک نوع سلول را بتوان با آن کنترل کرد شدیدا احساس می شد. تا اینکه تکنیک اپتوژنتیک برای این منظور ابداع گردید. اپتوژنتیک روش مناسبی برای مشاهده تغییرات الکتروفیزیولوژی، کارکردی و رفتاری بعد از تحریک نوری است. واژه اپتوژنتیک توسط Diesseroth در سال ۲۰۰۶ بکار گرفته شد [۲]. تا سال ۲۰۰۷ این تکنیک بیشتر در محیط برون تن مورد استفاده بود اما بعد

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: gholamipour@gmail.com
وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir
پست الکترونیکی: ijpp@phypha.ir

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

از آن با اختراع واسطهای فیبرهای اپتیکی-عصبی تاثیر اپسینهای باکتریایی در رفتار حیوانات سالم و در حال حرکت قابل انجام شد. از آن زمان به بعد کاربرد اپتوژنتیک به سرعت برای برر سی مدارهای عصبی، بیماریهای مغزی و سیستمهای غیر عصبی مانند سلولهای بنیادی، بافت قلبی و عضله اسکلتی توسعه یافت. به خاطر اهمیت این تکنیک در بسیاری از تحقیقات پزشکی-زیستی این فناوری به عنوان "روش منتخب سال" در سال ۲۰۱۰ توسط Nature Methods معرفی شد.

برای اینکه فعالیت نورونها بطور مصنوعی کنترل شود باید یک پروتئین حساس به نور در غشاء آنها بیان شود تا در پاسخ به نور به یون نفوذپذیر شوند. بطور مثال با ورود کاتیونها غشاء دپولاریزه شده و باعث تخلیه پتانسیل عمل می‌شود و بدین وسیله سلول تحریک می‌شود و از طرف دیگر با ورود یون آنیونی مانند کلر غشاء هیپرپلاریزه شده و باعث مهار سلول می گردد. تغییر در پتانسیل غشاء یک سلول خاص منجر به مهار یا تحریک انتقال اطلاعات در یک شبکه نورنی می شود. اولین پروتئین حساس به نور مورد استفاده، پروتئین کلامیدوموناسی به نام کانالوردپسین-۲ (ChR2) یک کانال کاتیونی است که به یونهای سدیم و کلسیم در پاسخ به نور آبی (طول موج ۴۷۰ نانومتر) نفوذپذیر است [۳]. برخلاف بیشتر کانالهای یونی کاتیونی ChR2 دارای هفت مارپیچ آلفا است که از خصوصیات گیرنده های متصل به پروتئین G (GPCRs) است. برای اولین بار Nagel و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که ChR2 در پاسخ به نور با طول موج مناسب می تواند سلولهای با اندازه مختلف را دپولاریزه کند [۴]. چون تاباندن نور با دقت زمانی و مکانی بالایی قابل کنترل است، این روش اجازه می دهد تا فرایندهای عصبی با دقت بالا حتی در حد تک اسپایک و رخداد سیناپسی دستکاری شوند. یک مثال در اهمیت دقت بالای زمانی و مکانی اپتوژنتیک این یافته است که بخش شکمی جانبی هیپوتالاموس میانی (VMHvl) بطور اختصاصی خشم را کنترل می کند. این در حالی است که با تحریک الکتریکی این ناحیه، خشم ایجاد نمی‌شود. احتمالا به خاطر اینکه نورونهایی دیگری با عملکرد متقاوت هم تحریک می‌شوند. در این مطالعه محققین به کمک اپتوژنتیک فقط سلولهای VMHvl را تحریک کردند که باعث رفتارهای تهاجمی در موش گردید در حالیکه تحریک نواحی مجاور منجر پاسخهای دیگری از قبیل freezing شد. بنابراین تکنیک اپتوژنتیک برای شناختن کارکرد یک شبکه خاص در مغز ابزار بسیار مفیدی است [۵].

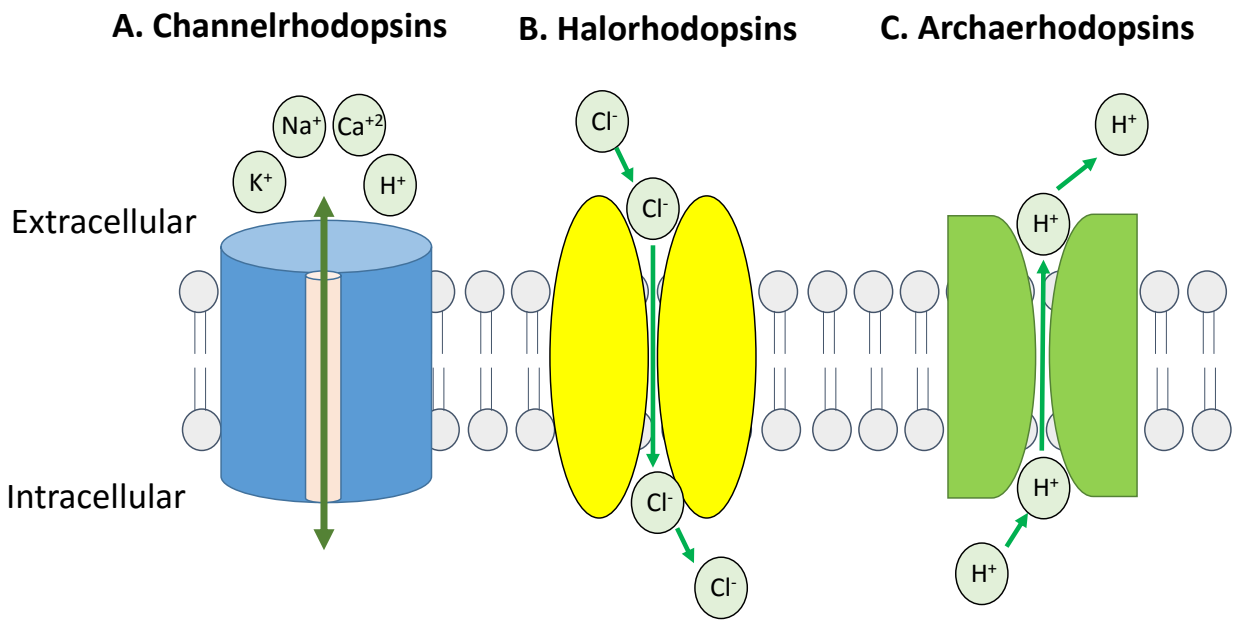
انواع اپسین ها

اپسین های میکروبی (اپسینهای نوع ۱)

این اپسین ها پروتئینهای هفت بار عبوری از غشاء هستند که با نور فعال می‌شوند و بطور وسیعی در آرکیا (باکتریهای باستانی)، باکتریها، جلبکها و قارچها یافت می‌شود که باعث اعمال فتوسنتزی یا درک نور می‌شود. این اپسین ها به رودوپسینهای انتقال دهنده و حسی تقسیم بندی می‌شوند. ردوپسینهای انتقال دهنده شامل پمپهای کلری (هالوردپسین) و پمپهای پروتونی (مانند باکتریوردپسین، آرکیاردپسین، پروتئوردپسین و غیره) میباشند (شکل ۱). ردوپسینهای حسی شامل ردوپسینهای حسی نوع یک و دو (گیرنده های فتوتاکسی در پروکاریوتها)، ردوپسین کانالی (channelrhodopsins، گیرندهای فتوتاکسی در جلبک) و سایرین که انواع اعمال سلولی مانند حرکت به سمت منبع انرژی، دور شدن از محیطهای خطرناک، کنترل غلظت یونهای مختلف در داخل سلول را بعهده دارند [۶]. بیشتر ردوپسینهای حسی از طریق به کارگیری مولکولهای سیگنالینگ داخل سلولی بدون انتقال مستقیم یونی عمل می‌کنند. البته ردوپسینهای کانالی به عنوان یک کانال کاتیونی وابسته به نور در شدت نور زیاد و بعنوان

شکل ۱- کلامیدوموناس رینهاردتی.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]



شکل ۲- حساسگرهای مولکولی اپتوژنتیک. با تابش نور، A) کانالوردوپسینها بطور غیرفعال یونهای Na^+، K^+، H^+ و Ca^{2+} را از خود عبور می‌دهند و باعث دپولاریزاسیون سلولها می‌شوند؛ B) هالوردپسینها بطور فعال Cl^- را بداخل سلول پمپ می‌کنند و سلولها را هیپرپلاریزه می‌کنند؛ C) ارکیاردپسینها بطور فعال H^+ را به بیرون از سلول پمپ می‌کنند و باعث هیپرپلاریزه شدن سلول می‌شوند [۸].

کانال کلسیمی در شدت نور پائین عمل فتوتاکسی را واسطه گری می کنند. خصوصیت بسیار منحصر به فرد این پروتئینها که اکنون شامل هالوردپسین و کانالوردوپسین هم می‌شوند این است که دو کار پاسخ به نور و عبور یک یون را با هم انجام می‌دهند و حاصل یک ژن هستند. این نوع اپسینها در پاسخ به نور دچار تغییر ساختاری می‌شوند و در غیاب نور به حالت پایدار خود که در تاریکی بود برمی‌گردند. این خصوصیت را چرخه نوری (Photocycle) می نامند. اندازه جریان، خصوصیت کینتیکی و طول موجی که باعث ایجاد جریان می شود ارتباط مستقیمی با ریخت چرخه نوری، اختصاصیت یونی و ثابت زمانی فعال شدن/غیرفعال شدن دارد. معمولا بیشینه جریان به محض تابش نور ایجاد می شود بعد از آن حتی با استمرار نور کاسته شده به یک سطح پایدار می‌رسد. علت کاهش جریان غیرحساس (desensitization) شدن است. با قرارگیری مجدد در تاریکی حتی به مدت ۵ ثانیه این حساسیت دوباره به حالت اولیه خود باز می‌گردد [۷]. انتقال یونی وابسته به نور با فوتوایزومریزاسیون کروموفور رتینال (ویتامین A-آلدئید) شروع می‌شود. در تاریکی، رتینال تمام ترانس به یک اسید آمینه لیزین در قطعه هفتم داخل غشایی متصل می‌شود. با جذب نور رتینال تمام ترانس به ایزومر رتینال ۱۳ سیس تبدیل می‌شود و باعث انتقال یون از غشاء می‌گردد [۷].

نوع II ردوپسینها در یوکاریوتهای رده بالاتر یافت می‌شوند که هرچند به لحاظ توالی اسید آمینه ای شباهت کمی با نوع I میکروبی دارد اما به لحاظ ساختار سه بعدی به آن شبیه است. نوع II به جای انتقال مستقیم یونی از طریق بکارگیری کینازهای سلولی عمل می کند [۶].

تحریک و مهار نورونها با استفاده از اپتوژنتیک

کانالوردوپسین

کانالهای یونی وابسته به نور هستند که در جلبکهای سبز یافت می‌شوند. یک نوع از این دسته پروتئینها کانالوردپسین-۲ (ChR2) است که از کلامیدوموناس رینهاردتی گرفته شده (شکل ۲) [۹] و در سال ۲۰۰۵ برای اولین بار توسط Boyden [۱۰] و همکارانش برای کنترل فعالیت نورونی به کار گرفته شد . حساسگر نوری ChR2 در جلبک سبز در بخش انتهایی N (۳۱۵ اسید آمینه) کانالوردپسین-۲ قرار دارد که حاوی یک کانال است که بصورت وابسته به نور کاتیونهای یک و دو ظرفیتی مانند Na^+، K^+، H^+ و Ca^{2+} را از خود عبور می‌دهد [۹]. برخلاف پمپهای یونی وابسته به نور (هالوردپسین یا آرکیارودپسین) ChR2 یک کانال یونی است که بصورت غیر

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

فعال و غیر اختصاصی کاتیونها را از خود عبور می دهد (شکل ۲). بنابراین بیان این کانال در سطح نورونها و تاباندن نور آبی منجر به دپولاریزاسیون سلول می‌گردد اما ChR2 یک کانال کوچک است و برای فعال کردن سلول نیاز است که تعداد کافی پروتئین در سطح سلول بیان شود.

این خصوصیت ChR2 که می تواند بطور سریع در حد میلی ثانیه و قابل برگشت نورونها را فعال کند باعث شد تا واریانتهای دیگری از این پروتئین با جریان یونی بهتر، کینتیک متفاوت و طیف نوری متفاوت ساخته شود. برای مثال موتاسیونهای نقطه‌ای در این پروتئین منجر به ساخت ChR2(H134R) و ChR2(T159C) شد و چندین کایمراز از ChR1 و ChR2 (ChIEF, ChRGR) باعث افزایش دامنه جریان یونی با کنترل دقیقتر و کاراتر گردید. CheTA نوع دیگری از این پروتئین است که کینتیک سریعتر و جریان یونی بزرگتری را ایجاد می کند و باعث کنترل دقیقتر تخلیه نورونی می‌شود. ChR2 (D156A) و ChR2 (C128A/S) پاسخ آهسته تری را به نور نشان می دهند و باعث دپولاریزاسیون طولانی مدت سلول می‌شوند [۱۱].

هالوردپسین

هالوردپسینها دسته ای از پمپهای کلری رو بداخل وابسته به نور هستند که برای هیپرپلاریزاسیون نورونها در سال ۲۰۰۷ به کار گرفته شدند [۱۲]. اولین مولکول از این دسته هالوردپسین برگرفته از ناتروموناس فاراونیس (Halo/ NpHR) یک پمپ کلری وابسته به نور زرد بود که باعث هیپرپلاریزاسیون یا خاموشی سریع و برگشت پذیر فعالیت نورونی گردید. اما Halo به طور ضعیفی در غشاء نورونهای پستانداران بیان می‌شود که باعث محدودیت استفاده از آن در محیط درون تن شد. تگ کردن Halo/ NpHR با توالیهایی که در غشاء سلول قرار می‌گیرند مانند کانال پتاسیمی موفقیت آمیز بوده و همچنین واریانتهای دیگر این پروتئین مانند Halo2.0/ eNpHR، Halo3.0/ eNpHR۳ جریان یونی بهتری را در نورونهای پستانداران ایجاد می‌کند [۱۳]. چون هالوردپسینها یک حالت غیری هدایت‌پذیری در چرخه نوری خود دارند بعد از قرار گیری طولانی مدت در معرض نور سرعت برگشت پذیری آهسته‌ای دارند اما نور آبی می‌تواند برگشت پذیری Halo را از دقیقه ها به میلی ثانیه ها کاهش دهد. انتقال دائم Cl^- بداخل سلولها ممکن است غلظت داخل سلولی و خارج سلولی کلر را برهم بزند و بنابراین پتانسیل معکوس گیرنده های GABA را تغییر دهد. مثلا نشان داده شده است که Halo3.0/ eNpHR۳ پتانسیل معکوس گیرنده GABA را در نورونهای هیپوکامپ به میزان زیادی تغییر می‌دهد که به نوبه خود منجر به تغییر انتقال سیناپسی مهاری شده و در نهایت برخلاف انتظار باعث افزایش تحریک پذیری نورونهای بیان کننده Halo می‌شود [۱۴].

بیان یک اپسین در یک نوع سلول خاص

مزیت اصلی فناوری اپتوژنتیک توانایی کنترل سلولهایی از یک جنس است مثلا دارای یک مارکر خاص هستند یا الگوی فعالیت خاصی دارند یا به نواحی خاصی از مغز اکسون می‌فرستند. با بیان اپسینها در جمعیت سلولی دلخواه از طریق دستکاری ژنتیکی این اختصاصیت بدست می‌آید. بدین ترتیب استفاده از حیوانات ترانسژنیک، انتقال ژن از طریق ویروسی یا غیرویروسی همگی از جمله این دستکاری ژنتیکی به حساب می آیند.

دو روش کلی برای بیان یک ترانس ژن در یک جمعیت سلولی خاص وجود دارد. نخست بیان مستقیم ترانس ژن توسط یک پروموتور که در یک نوع خاص از سلولها فعال است. دوم استفاده از یک سیستم دوگانه است، که در آن ترانس ژن توسط یک ژن درایور (driver) که بیان آن توسط یک پروموتور خاص مانند Cre کنترل می‌شود تنظیم می‌گردد [۱۵]. مثلاجهت بیان ChR2 در یک جمعیت سلولی خاص، ژن ChR2 را به یک پروموتور خاص که اختصاصاً در این سلولهای هدف فعال است متصل می‌کنند. از جمله این پروموتورها Thy1 (در پروجکشن نورونهای لایه ۵ نئوکورتکس)، Vglut2 (نورونهای گلوتاماترژیک)، Omp (olfactory marker protein)، نورونهای حسی بویایی) و Chat (نورونهای کولینرژیک) یا پروموتور القاگر Tet می باشند [۱۶]. از طرف دیگر تاکنون فقط یک گزارش مبنی بر بیان NpHR با استفاده از پروموتور اورکسین در موش ترانسژنیک گزارش شده است [۱۷].

اعمال موفقیت آمیز ابزارهای اپتوژنتیک در محیط درون تن نیازمند بیان زیاد ژن مورد نظر در سلولهای هدف است. برای این منظور، باید توسط وکتورهای ویروسی یا الکتروپوریشن

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

داخل رحمی تعداد کپی زیادی از ترانس ژنها به سلوهای هدف منتقل شود.

این استراتژی اغلب با محدود کردن بیان کانال بطور آناتومیکی، با تزریق وکتورهای ویروسی کدکننده ChR2 بداخل نواحی خاص مغزی، یا بطور ژنتیکی با قرار دادن ChR2 تحت کنترل یک پروموتور که در یک نوع سلول خاص فعال است قابل انجام است. هدف‌گیری ژنتیکی به چند روش حاصل می‌شود، برای مثال با ترانسژن کردن یا استفاده از ویروسهای کد کننده کانال که حاوی پروموتورهای مخصوص یک نوع سلول هستند. بعلاوه هر دو روش آناتومیکی و هدف گیری ژنتیکی اغلب توامان مورد استفاده قرار می‌گیرند. در زیر چند مثال آورده شده است. Tsai و همکارانش وکتور AAV کد کننده Chr2-EYFP که با Cre قابل القاء بود را به روش استرئوتاکسی بداخل ناحیه تکمنتوم شکمی (VTA) موشهای ترانس ژنیک (tyrosine hydroxylase-internal Th-IRES-Cre ribosomal entry site-Cre) تزریق کردند که منجر به بیان کانال در نورونهای دوپامنترژیکی VTA گردید. با تحریک اختصاصی این سلولها در حیوانات در حال حرکت متوجه شدند که تحریک فازیک نورونهای دوپامینرژیک در VTA منجر به بروز رفتار شرطی می‌گردد [۱۸]. در یک کار مشابه Cravitz و همکارانش AAV کد کننده Chr2-EYFP با القاگر Cre را بداخل استریاتوم پشتی میانی موش ترانسژنیک بیان کننده Cre در نورونهای با خارهای دندریتی متوسط (medium spiny neurons ،MSNs) تزریق کردند و بدین ترتیب بیان کانال را به MSN های مسیر مستقیم یا غیر مستقیم دخیل در بیماری پارکینسون محدود کردند. با این کار آنها دریافتند که فعال کردن مسیر مستقیم علائم مربوط به بیماری را در مدل موشی پارکینسونی کاهش می‌دهد [۱۹]. این یافته آشکارا نشان داد که مداربندی عقده های قاعده ای نقش مهمی در تنظیم رفتار حرکتی مبتلایان به پارکینسون دارد و دستکاری این مدار به روش اپتوژنتیک ممکن است در درمان بیماری پارکینسون موثر باشد.

همانطور که قبلا اشاره شد، اپسینها ساختار شبیه به GPCRها دارند. بنابراین با دستکاری آنها میتوان یک مسیر پیامرسانی درون سلولی را فعال یا مهار نمود. Gutierrez و همکارانش رودپسین، که یک گیرنده متصل به پروتئین Gi/o است، را در سلولهای پورکینژ مخچه‌ای در موش بیان کردند. تاباندن نور منجر به کاهش تخلیه اسپایکهای ساده می‌شد و تاباندن نور به ناحیه ورمیس مخچه‌ای در موشهای در حال حرکت منجر به تغییر رفتار حرکتی آنها گردید [۲۰]. به این ترتیب راهی جدید جهت مطالعه عملکرد فیزیولوژیک سلولهای خاص در مخچه با استفاده از مسیر وابسته به پروتئین G فراهم گردید.

رایج‌ترین وکتورهای ویروسی مورد استفاده در انتقال ژن لنتی ویروس، ویروس مرتبط با آدنو (AAV) هستند که کارایی ترانسداکت بالایی داشته در حالیکه توکسیتی ندارند یا خیلی کم دارند. البته، دو محدودیت اصلی دارند. نخست، قابلیت بسته بندی (packaging) محدودی دارند. AAV ۴/۷ کیلوباز DNA و لنتی ویروس تا ۸ کیلوباز را می‌توانند بسته‌بندی کنند. ویروس هرپس سیمپلکس (HSV) نیز عملا میتواند حدود ۸ کیلوباز بسته بندی کند. در مورد ایمنی HSV هنوز تردید وجود دارد چون باعث مرگ سلولی می‌شود. همچنین این وکتور بیان پایدار ندارد.

روش دیگر استفاده از وکتورهای سودوتایپ است که قادرند در طول آکسون بصورت رتروگراد حرکت کرده و به جسم سلول برسند و ژن هدف را در ژنوم نورون درج نمایند. بطور مثال با استفاده از لنتی وکتور سودوتایپ شده با گلیکوپروتئین ویروس هاری مشخص شده است که تزریق داخل عضلانی آن باعث حرکت رتروگراد آن به نخاع و با گذر سیناپسی به نورونهای نخاعی می‌رسد و در نتیجه ژن هدف در قطعه نخاعی مربوطه بیان می‌شود. از همین استراتژی در اپتوژنتیک استفاده شده تا مسیرهای عصبی منتهی به یک ناحیه مغز بهتر شناسایی شوند و یا هدف مطالعات تحقیقاتی قرار گیرند. ما در آزمایشگاه خود دریافتیم که تزریق وکتور سودوتایپ حامل اپسین مورد نظر بداخل ناحیه CA1 نه تنها منجر به انتقال ژنوم به سلولهای مقیم در این ناحیه می‌شود بلکه با گذر از فضای سیناپسی و حرکت رتروگراد، خود را به سلولهای ناحیه CA3 و DG می‌رساند و منجر به بیان اپسین مورد نظر در سلولهای این نواحی می‌شود. در این روش تاباندن نور به ناحیه CA3 و DG بدون تاثیر بر اینترنورونهای مقیم در CA1، منحصرا باعث مهار یا فعال شدن سلولهایی در ناحیه CA1 می‌گردد که ورودی تک سیناپسی از این نواحی دریافت می‌کنند. [۲۱].

روشهای غیر ویروسی از قبیل استفاده از لیپیدهای کاتیونی،

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

پلیمرهای کاتیونی، نانوذرات، ریزتیوبهای کربنی، تفنگ ژنی و فسفات کلسیم برای انتقال ژن بکار میروند. مزیت این روشها این است که میتوان قطعه بزرگتری از DNA را بداخل سلولها انتقال داد اما کارایی ترانسداکت پایئنی دارند.

الکتروفیزیولوژی و اپتوژنتیک

ثبت پچ کلمپ روش دقیق و با سرعت بالایی برای کنترل ورودی سیناپسی و خروجی رفتار سلول یعنی تخلیه پتانسیل عمل است اما داده های بدست آمده از این روش قابل تعمیم به ارتباط یک نوع سلول با یک شبکه یا رفتار خاص نیست. تلفیق پچ کلمپ با اپتوژنتیک این محدودیت را برطرف می سازد و به محققین این اجازه را میدهد تا ارتباط عملی راههای عصبی را با نوع سلولها مطالعه کنند. با این روش میتوان اطمینان حاصل کرد که فقط پاسخهای تک سیناپسی در برشهای مغزی ثبت می شوند و رفتار حیوان ناشی از تحریک یا مهار مسیر عصبی منتهی به یک نوع خاص سلولی است که فعالیت آن ثبت می گردد. به عنوان نمونه، باتزریق وکتور AAV حامل ChR2-eYFP بداخل هسته پشتی رافه مشخص شد که پایانه های این نورونها به نواحی مختلفی از جمله هسته مرکزی آمیگدال می‌رسند و ارتباط تک سیناپسی برقرار می کنند. تابش نور به هسته مرکزی آمیگدال منجر به ثبت جریان گلوتاماترژیکی در سلولهای این هسته گردید. به این ترتیب با تلفیق این دو روش مشخص شد که سلولهای دوپامینرژیک در بخش پشتی هسته رافه گلوتامات را نیز بیان و در فضای سیناپسی رها می‌کنند که در بروز رفتار ناشی از انزوای اجتماعی سهیم است [۲۲]. این در حالی است در مطالعه ای که ما انجام دادیم، تحریک الکتریکی مسیر پرفورانت علاوه بر تحریک مسیر مستقیم منتهی به سلولهای گرانولی ناحیه DG، ممکن است باعث فعال شدن مسیر غیر مستقیم (چند سیناپسی) مهاری نیز بشود. جهت بلوک مسیر غیر مستقیم ما از مهار کننده گاباارژیک استفاده کردیم که روش چندان دقیقی نمی‌تواند باشد [۲۳] استفاده از تکنیک اپتوژنتیک میتواند این نقص را برطرف سازد. به این ترتیب با تلفیق این دو روش تاکنون اطلاعات بسیار ارزشمندی در مورد رفتار تغذیه ای، اضطراب، خشم، پاداش و بسیاری از رفتارهای دیگر بدست آمده است [۲۴].

با ثبت الکتروفیزیولوژی درون تن نیز ارتباط بین نوع سلولها و رفتار حیوان دشوار است اما تلفیق این روش با اپتوژنتیک ارتباط بین مدارهای عصبی مختلف با رفتارهای گوناگون را آشکار کرده است. تحریک اپتوژنتیکی یک سلول یا مسیر عصبی خاص در طی ثبت چندواحدی خارج سلولی فعالیت فیزیولوژیک یک مدار عصبی را مشخص می‌کند. مثلا با این روش گزارش شده است که بخش قاعده ای-جانبی آمیگدال هسته آکومبنس را تحریک می‌کند و منجر به رفتار جستجوگرایانه برای پاداش می‌شود [۲۵] یا فعالیت سلولهای گابارژیک آمیگدال نورونهای هیپوتالاموس جانبی را مهار می‌کند که منجر به افزایش غذا خوردن می‌شود [۲۶]. این مثالها به خوبی قدرت اپتوژنتیک و الکتروفیزیولوژی برای تعیین مدارهای دخیل در ایجاد یک رفتار خاص را نشان می‌دهند. کارایی کنترل اپتوژنتیک فعالیت عصبی بستگی به میزان نور رسیده به نورون، میزان مولکول اپسین موجود در غشاء پلاسمایی و حساسیت به نور اپسینها بستگی دارد. دقت کار همچنین با خصوصیات فیزیولوژیک نورون و شبکه عصبی پیرامون آن تحت تاثیر قرار می‌گیرد. برای مثال نورونی که ورودی مهاری زیادی دریافت می‌کند به سختی فعال می‌شود و سلولهایی را که غشاء پلاسمایی نشتی دارند به سختی میتوان دپولاریزه یا هیپرپلاریزه شوند.

استفاده از اپتوژنتیک در یک مدار بسته

با ترکیب الکتروفیزولوژی و اپتوژنتیک میتوان یک سیستم با مدار بسته ساخت که با شروع یک رخداد سلولی بطور خودکار تحریک نوری انجام شود. مثلا در مطالعه Paz و همکارانش فعالیت نورونی در تالاموس و قشر بصورت برخط ثبت می‌شد تا شروع تشنج در یک مدل حیوانی صرعی تشخیص داده شود و بدین ترتیب نشان دادند که مهار کردن نورونهای تالاموکورتیکال بعد از شروع تشنج باعث قطع فعالیت تشنجی می‌شود [۲۷]. این در حالی است که خاموش کردن اختصاصی نورونهای تالاموکورتیکال با الکترود غیر ممکن است. همچنین گزارش شده است که مهار سلولهای پیرامیدال CA1 در زمان انجام یک تست یا در طی یک مرحله خاص از نوسانات امواج تتا هیپوکامپی کارایی رفتاری حیوان را تغییر می‌دهد. به این ترتیب که با تحریک اپتیکی درقله امواج تتا در زمان یادگیری کارایی رفتاری افزایش میابد یا مهار اپتیکی در قعر امواج تتا در

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

زمان به خاطر آوری، کارایی رفتاری بهبود می‌یابد [۲۸]. این نتایج نوید یک واسط (interface) الکتروفیزولوژی و اپتوژنتیک برای بهبود فرایندهای ذهنی یا درمان بیماریهای عصبی در آینده را می‌دهد.

اهمیت بالینی اپتوژنتیک

استفاده از اپتوژنتیک فقط به مطالعات آزمایشگاهی محدود نمی‌شود بلکه کاربردهای درمانی هم می‌تواند داشته باشد. از کاربردهای احتمالی بالینی میتوان به پتانسیل استفاده از آن در سیستم بینایی اشاره کرد یعنی جاییکه ChR2 در سلولهای رده نخست یعنی سلولهای استوانه بطور طبیعی بیان می‌شود. زمانیکه ChR2 در نورونهای رده دوم یعنی سلولهای دو قطبی روشن (ON bipolar cells) در مدل موشی rd1 که دچار دژنر اسیون شبکه است بیان گردید، تابش نور به این سلولها منجر به فعال شدن سلولهای موجود در گانگلیون شبکیه و قشر بینایی شد [۲۹]. همچنین بیان ChR2 در سلولهای گانگلیونی شبکیه موشهایی که بطور ژنتیکی کور بودند باعث بازگرداندن بینایی گردید [۳۰]. این نتایج این امید را پدید آورده است که شاید با کمک ژن درمانی بتوان نابینایی اکتسابی یا ژنتیکی را درمان کرد. کاربرد دیگر در درمان صرع است که با شناسایی شبکه های عصبی درگیر در شروع و خاتمه تشنج میتوان امیدوار بود که در آینده با مهار یا فعال کردن شبکه خاصی در مغز بتوان صرع را کنترل کرد. اپتوژنتیک همچنین می‌تواند برای درمان افسردگی ماژور به کار گرفته شود. حدود ۳۰ تا ۴۰ درصد بیماران مبتلا به این بیماری مقاوم به درمان هستند و به داورهای ضد افسردگی موجود پاسخ نمی‌دهند. افزایش فعالیت نورونهای درگیر در تنظیم رفتار عاطفی می‌تواند کمک کننده باشد، همانطور که در دو مدل موشی افزایش فعالیت نورونهای ناحیه تگمنتال شکمی به روش اپتوژنتیک نتایج امیدوار کننده ای را نشان داده است. کاربرد احتمالی دیگر این روش در آسیب طناب نخاعی است. در آسیب نخاعی با آنکه مدارهای عصبی پائین تر از ناحیه آسیب در نخاع سالم هستند اما به علت فقدان سیگنال وارده از مغز عضلات مربوطه عملکرد خود را از دست می‌دهند. نشان داده شده است که تحریک الکتریکی مناسب در قطعه‌های نخاعی مربوطه می‌تواند باعث بازگرداندن تنفس، کارکرد اندامهای فوقانی و تحتانی و همچنین عملکرد مثانه و روده شود [۳۱]. جهت کنترل کاراتر و دقیق تر، اپتوژنتیک می‌تواند به عنوان یک رویکرد درمانی موثر در این بیماران مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

تکنیک اپتوژنتیک از زمان پیدایش تا کنون به سرعت توسعه پیدا کرده است و در حوزه های مختلف به کار گرفته شده است. در حوزه علوم اعصاب پیشرفتهای شگرفی را در شناخت کارکرد مدارهای عصبی، نقش نورونهای بینابینی و ارتباط آناتومیک نواحی مختلف مغز موجب شده است. با بهینه کردن اپسینها در سرعت باسخ به نور و ارتقاء انتقال یونی آنها و همچنین توسعه اپسینهایی که سینگنالینگ درون سلولی خاصی را به راه می اندازند در آینده نزدیک شاهد استفاده وسیعتر از اپتوژنتیک برای شناسایی بهتر مکانیسمهای فیزیولوژیک مسئول رفتارهای مختلف و همچنین توسعه این روش در درمان بیماریهای نورولوژیک خواهیم بود.

تعارض در منافع

نویسنده این مقاله تعارض در منافع ندارد.

فهرست منابع

[1] Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K, The development and application of optogenetics. ***Annu Rev Neurosci*** 34 (2011) 389-412.

[2] Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, Miesenbock G, Ting A, Schnitzer MJ, Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. ***J Neurosci*** 26 (2006) 10380-10386.

[3] Kushibiki T, Okawa S, Hirasawa T, Ishihara M, Optogenetics: Novel Tools for Controlling Mammalian Cell Functions with Light. ***Int J Photoenergy*** ID 895039 **(**2014) 10 pages.

[4] Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E, hannelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 100 (2003) 13940-13945.

[5] Lin D, Boyle MP, Dollar P, Lee H, Lein ES, Perona P, Anderson DJ, Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. ***Nature*** 470 **(**2011) 221-226.

[6] Han X, In vivo application of optogenetics for neural circuit analysis. ***ACS Chem Neurosci*** 3 (2012) 577-

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

584.
[7] Bamberg E, Tittor J, Oesterhelt D, Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 90 (1993) 639-643.
[8] Gholami Pourbadie H, Sayyah M, Optogenetics: Control of Brain Using Light. ***Iran Biomed J*** 2017 [ahead of print].
[9] Nagel G, Szellas T, Kateriya S, Adeishvili N, Hegemann P, Bamberg E, Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels. ***Biochem Soc Trans*** 33 (2005) 863-866.
[10] Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K, Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. ***Nat Neurosci*** 8 (2005) 1263-1268.
[11] Guru A, Post RJ, Ho YY, Warden MR, Making Sense of Optogenetics. ***Int J Neuropsychopharmacol***, 18 (2015) 1-8.
[12] Han X, Boyden ES, Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. ***PLoS One*** 2 (2007) e299.
[13] Zhao S, Cunha C, Zhang F, Liu Q, Gloss B, Deisseroth K, Augustine GJ, Feng G, Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity. ***Brain Cell Biol*** 36 (2008) 141-154.
[14] Raimondo JV, Kay L, Ellender TJ, Akerman CJ, Optogenetic silencing strategies differ in their effects on inhibitory synaptic transmission. ***Nat Neurosci*** 15 (2012) 1102-1104.
[15] Madisen L, Mao T, Koch H, Zhuo JM, Berenyi A, Fujisawa S, Hsu YW, Garcia AJ, Gu X, Zanella S, Kidney J, Gu H, Mao Y, Hooks BM, Boyden ES, Buzsaki G, Ramirez JM, Jones AR, Svoboda K, Han X, Turner EE, Zeng H*A*, toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. ***Nat Neurosci*** 15 (2012) 793-802.
[16] Zeng H, Madisen L, Mouse transgenic approaches in optogenetics. ***Prog Brain Res*** 196 (2012) 193-213.
[17] Tsunematsu T, Kilduff TS, Boyden ES, Takahashi S, Tominaga M, Yamanaka A, Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice. ***J Neurosci*** 31 (2011) 10529-10539.
[18] Tsai HC, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bonci A, de Lecea L, Deisseroth K, Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. ***Science*** 324 (2009) 1080-1084.
[19] Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC, Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. ***Nature*** 466 (2010) 622-626.
[20] Gutierrez DV, Mark MD, Masseck O, Maejima T, Kuckelsberg D, Hyde RA, Krause M, Kruse W, Herlitze S, Optogenetic control of motor coordination by Gi/o protein-coupled vertebrate rhodopsin in cerebellar Purkinje cells. ***J Biol Chem***, 286 (2011) 25848-25858.
[21] Reardon TR, Murray AJ, Turi GF, Wirblich C, Croce KR, Schnell MJ, Jessell TM, Losonczy A, Rabies Virus CVS-N2c(DeltaG) Strain Enhances Retrograde Synaptic Transfer and Neuronal Viability. ***Neuron*** 89 (2016) 711-724.
[22] Matthews GA, Nieh EH, Vander Weele CM, Halbert SA, Pradhan RV, Yosafat AS, Glober GF, Izadmehr, EM, Thomas RE, Lacy GD, Wildes CP, Ungless MA, Tye KM, Dorsal Raphe Dopamine Neurons Represent the Experience of Social Isolation. ***Cell*** 164 (2016) 617-631.
[23] Gholami Pourbadie H, Naderi N, Janahmadi M, Mehranfard N, Motamedi F, Calcium channel blockade attenuates abnormal synaptic transmission in the dentate gyrus elicited by entorhinal amyloidopathy. ***Synapse*** 70 (2016) 408-417.
[24] Kim CK, Adhikari A, Deisseroth K, Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience. ***Nat Rev Neurosci*** 18 (2017) 222-235.
[25] Stuber GD, Sparta DR, Stamatakis AM, van Leeuwen WA, Hardjoprajitno JE, Cho S, Tye KM, Kempadoo KA, Zhang F, Deisseroth K, Bonci A, Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. ***Nature*** 4 (2011) 377-380.
[26] Jennings JH, Rizzi G, Stamatakis AM, Ung RL, Stuber GD, The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. ***Science*** 341 (2013) 1517-1521.
[27] Paz JT, Davidson TJ, Frechette ES, Delord B, Parada I, Peng K, Deisseroth K, Huguenard JR, Closed-loop optogenetic control of thalamus as a tool for interrupting seizures after cortical injury. ***Nat Neurosci*** 16 (2013) 64-70.
[28] Siegle JH, Wilson MA, Enhancement of encoding and retrieval functions through theta phase-specific manipulation of hippocampus. ***Elife*** 3 (2014) e03061.
[29] Lagali PS, Balya D, Awatramani GB, Munch TA, Kim DS, Busskamp V, Cepko CL, Roska B, Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. ***Nat Neurosci*** 11 (2008) 667-675.
[30] Tomita H, Sugano E, Isago H, Tamai M, Channelrhodopsins provide a breakthrough insight into strategies for curing blindness. ***J Genet*** 88 (2009) 409-415.
[31] Erofeev A, Zakharova O, Terekhin S, Plotnikova P, Bezprozvanny I, Vlasova O. Future of Optogenetics: Potential Clinical Applications? ***Opera Med Physiol*** 2 (2016) 117-121.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

Review paper

Optogenetics: control of living cells by light

Hamid Gholami Pourbadie

Physiology and Pharmacology department, Pasteur Institute, Tehran, Iran

Received: 1 June 2017 Accepted: 14 October 2017

Abstract

Finding how certain behavior such as food consumption, aggression, cognition and movement arise from the interactions of individual cells in the neural circuits is a major challenge in neuroscience. Genetically, pharmacologically or lesioning manipulations have been used to investigate the response of neural network during a behavioral task. However, these approaches lack temporal precision on the timescale of neural coding and signaling. Using optogenetics researchers can control and manipulate the activity of specific cell types and projections with the speed and precision uniquely applicable by light. Optogenetics has revolutionized the field of neuroscience, and has enabled researchers to investigate the causal roles of specific neural circuit components. Here, in this review we consider the current state of this technology and provide a brief introduction of different opsins used in optogenetics and applying optogenetics *in vivo* to investigate function of different neural networks.

Keywords: Channelrhodopsin, Halorhodopsin, Light, Neural network, Optogenetics

Please cite this article as follows:
Gholami Pourbadie H, Optogenetics: control of living cells by light. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 2 (2018) 262-270.

*Corresponding author e-mail: gholamipour@gmail.com
Available online at: http://ijpp.phypha.ir
E-mail: ijpp@phypha.ir

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]