

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 می شوند. دستکاریهای ژنتیکی، فارماکولوژیکی و یا تخریب و آسیب به یک ناحیه مغزی برای بررسی پاسخ شبکه عصبی در زمان انجام یک رفتار بکار گرفته می شوند. این روشها فاقد دقت زمانی در سیگنالینگ و کدگذاری عصبی هستند. با استفاده از اپتوژنتیک محققین می توانند 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 قرار داده اند را مرور خواهیم کرد.

واژه های 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 شده اند 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 مثلاً گابارژیک را تحریک کرد و در اثر تحریک، فعالیت طیفی از سلولها تغییر می یابد. 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 شدیداً 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

* نویسنده مسئول مکاتبات: gholamipour@gmail.com

وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir

پست الکترونیکی: ijpp@phypha.ir

پست الکترونیکی:

وبگاه مجله:

پست الکترونیکی:

اپتوژنتیک برای شناختن کارکرد یک شبکه خاص در مغز ابزار بسیار مفیدی است [۵].

انواع اپسین ها

اپسین های میکروبی (اپسین های نوع ۱)

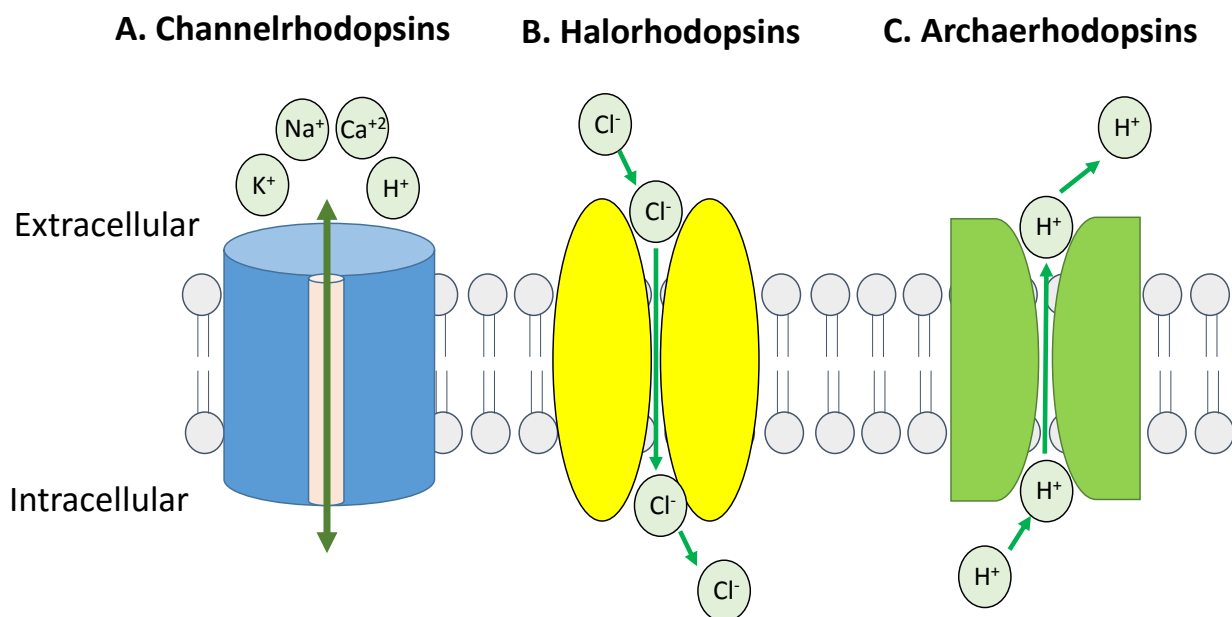
این اپسین ها پروتئینهای هفت بار عبوری از غشاء هستند که با نور فعال می شوند و بطور وسیعی در آرکیا (باکتریهای باستانی)، باکتریها، جلبکها و قارچها یافت می شود که باعث اعمال فتوسنتزی یا درک نور می شود. این اپسین ها به رودوپسینهای انتقال دهنده و حسی تقسیم بندی می شوند. رودوپسینهای انتقال دهنده شامل پمپهای کلری (هالوردپسین) و پمپهای پروتونی (مانند باکتریوردپسین، آرکیاردپسین، پروتوردپسین و غیره) میباشند (شکل ۱). رودوپسینهای حسی شامل رودوپسینهای 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 برعهده دارند [۶]. بیشتر رودوپسینهای حسی از طریق به کارگیری مولکولهای سیگنالینگ داخل سلولی بدون انتقال مستقیم یونی عمل می کنند. البته رودوپسینهای کانالی به عنوان یک کانال کاتیونی وابسته به نور در شدت نور زیاد و بعنوان



شکل ۱- کلامیدوموناس رینهاردتی.

از آن با اختراع واسطه های 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 بررسی 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 می شود و بدین وسیله سلول تحریک می شود و از طرف دیگر با ورود یون آنیونی مانند کلر غشاء هیپرپولاریزه شده و باعث مهار سلول می گردد. تغییر در پتانسیل غشاء یک سلول خاص منجر به مهار یا تحریک انتقال اطلاعات در یک شبکه نوری می شود. اولین پروتئین حساس به نور مورد استفاده، پروتئین کلأمیدوموناسی 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 نمی شود. احتمالاً به خاطر اینکه نورونهای دیگری با عملکرد متفاوت هم تحریک می شوند. 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



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

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 می‌کند [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 کانالوردوپسین-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) کانالوردوپسین-۲ قرار دارد که حاوی یک کانال است که بصورت وابسته به نور کاتیونهای یک و دو ظرفیتی مانند Na^+ ، K^+ و H^+ و Ca^{2+} را از خود عبور می‌دهد [۹]. برخلاف پمپهای یونی وابسته به نور (هالوردوپسین یا آرکیاردوپسین) ChR2 یک کانال یونی است که بصورت غیر

کانال کلسیمی در شدت نور پائین عمل فتوتاکسی را واسطه گری می‌کنند. خصوصیت بسیار منحصر به فرد این پروتئینها که اکنون شامل هالوردوپسین 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) می‌نامند. اندازه جریان، خصوصیت کینتیکی و طول موجی که باعث ایجاد جریان می‌شود ارتباط مستقیمی با ریخت چرخه نوری، اختصاصیت یونی و ثابت زمانی فعال شدن/غیرفعال شدن دارد. معمولاً بیشینه جریان به محض تابش نور ایجاد می‌شود 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

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. مثلاً نشان داده شده است که Halo3.0/ eNpHR³ پتانسیل معکوس گیرنده GABA را در نورونهای هیپوکامپ به میزان زیادی تغییر می دهد که به نوبه خود منجر به تغییر انتقال سیناپسی مهارى شده و در نهایت برخلاف انتظار باعث افزایش تحریک پذیری نورونهای بیان کننده Halo می شود [۱۴].

بیان یک افسین در یک نوع سلول خاص

مزیت اصلی فناوری اپتوژنتیک توانایی کنترل سلولهایی از یک جنس است مثلاً دارای یک مارکر خاص هستند یا الگوی فعالیت خاصی دارند یا به نواحی خاصی از مغز اکسون می فرستند. با بیان افسینها در جمعیت سلولی دلخواه از طریق دستکاری ژنتیکی این اختصاصیت بدست می آید. 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 می شود تنظیم می گردد [۱۵]. مثلاً جهت بیان ChR2 در یک جمعیت سلولی خاص، ژن ChR2 را به یک پروموتور خاص که اختصاصاً در این سلولهای هدف فعال است متصل می کنند. 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

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 می گردد 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 نقطه ای در این پروتئین منجر به ساخت ChR2(H134R) و ChR2(T159C) شد و چندین کایمر از ChR1 و ChR2 (ChIEF, ChRGR) باعث افزایش دامنه جریان یونی با کنترل دقیقتر و کارتر 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 می شود. ChR2 (D156A) و ChR2 (C128A/S) پاسخ آهسته تری را به نور نشان می دهند و باعث دپولاریزاسیون طولانی مدت سلول می شوند [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 می شود که باعث محدودیت استفاده از آن در محیط درون تن شد. تگ کردن Halo/ NpHR با توالیهای که در غشاء سلول قرار می گیرند مانند کانال پتاسیمی موفقیت آمیز بوده و همچنین واریانتهای دیگر این پروتئین مانند Halo2.0/ eNpHR³، Halo3.0/ eNpHR³ جریان یونی بهتری را در نورونهای پستانداران ایجاد می کند [۱۳]. چون هالوردپسینها یک حالت غیری هدایت پذیری در چرخه نوری خود دارند بعد از قرار گیری طولانی مدت در معرض نور سرعت برگشت پذیری آهسته ای دارند اما نور آبی می تواند برگشت پذیری Halo را از دقیقه ها به میلی ثانیه ها کاهش

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 استروئتاکی بداخل ناحیه تکمتوم شکمی (VTA) موشهای ترانس ژنیک (tyrosine hydroxylase-internal Th-IRES-Cre ribosomal entry site-Cre) تزریق کردند که منجر به بیان کانال در نورونهای دوپامینرژیک 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 پستی 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 GPCR ها 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 سودوتاوپ 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 سودوتاوپ 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 سودوتاوپ 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،

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 بدخل سلولها انتقال داد اما کارایی ترانسداکت پایینی 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 بدخل هسته پستی رافه مشخص شد که پایانه های این نورونها به نواحی مختلفی از جمله هسته مرکزی آمیگدال می رسند و ارتباط تک سیناپسی برقرار می کنند. تابش نور به هسته مرکزی آمیگدال منجر به ثبت جریان گلوتاماترژیک در سلولهای این هسته گردید. به این ترتیب با تلفیق این دو روش مشخص شد که سلولهای دوپامینرژیک در بخش پستی هسته رافه گلوتامات را نیز بیان و در فضای سیناپسی رها می کنند که در بروز رفتار ناشی از انزوای اجتماعی سهمیم 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 گابارژیک استفاده کردیم که روش چندان دقیقی نمی تواند 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 می کند. مثلاً با این روش گزارش شده است که بخش قاعده ای-جانبی آمیگدال هسته آکومبنس را تحریک می کند و منجر به رفتار جستجوگرانه برای پاداش می شود [۲۵] یا فعالیت سلولهای گابارژیک آمیگدال نورونهای هیپوتالاموس جانبی را مهار می کند که منجر به افزایش غذا خوردن می شود [۲۶]. این مثالها به خوبی قدرت اپتوژنتیک و الکتروفیزیولوژی برای تعیین مدارهای دخیل در ایجاد یک رفتار خاص را نشان می دهند. کارایی کنترل اپتوژنتیک فعالیت عصبی بستگی به میزان نور رسیده به نورون، میزان مولکول اسپین موجود در غشاء پلاسمایی و حساسیت به نور اسپینها بستگی دارد. دقت کار همچنین با خصوصیات فیزیولوژیک نورون و شبکه عصبی پیرامون آن تحت تاثیر قرار می گیرد. برای مثال نورونی که ورودی مهاری زیادی دریافت می کند به سختی فعال می شود و سلولهایی را که غشاء پلاسمایی نشی دارند به سختی میتوان دیپولاریزه یا هیپرپلاریزه شوند.

استفاده از اپتوژنتیک در یک مدار بسته

با ترکیب الکتروفیزیولوژی و اپتوژنتیک میتوان یک سیستم با مدار بسته ساخت که با شروع یک رخداد سلولی بطور خودکار تحریک نوری انجام شود. مثلاً در مطالعه Paz و همکارانش فعالیت نورونی در تالاموس و قشر بصورت برخط ثبت می شد 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 می شود [۲۷]. این در حالی است که خاموش کردن اختصاصی نورونهای تالاموکورتیکال با الکتروود 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 می دهد. 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

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 می دهند. نشان داده شده است که تحریک الکتریکی مناسب در قطعه های نخاعی مربوطه می تواند باعث بازگرداندن تنفس، کارکرد اندامهای فوقانی و تحتانی و همچنین عملکرد مثانه و روده شود [۳۱]. جهت کنترل کارا تر و دقیق تر، اپتوژنتیک می تواند به عنوان یک رویکرد درمانی موثر در این بیماران مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه گیری

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 بینایی و ارتباط آناتومیک نواحی مختلف مغز موجب شده است. با بهینه کردن اپسینها در سرعت پاسخ 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

زمان به خاطر آوری، کارایی رفتاری بهبود می یابد [۲۸]. این نتایج نوید یک واسطه (interface) الکتروفیزیولوژی و اپتوژنتیک برای بهبود فرایندهای ذهنی یا درمان بیماریهای عصبی در آینده را می دهد.

اهمیت بالینی اپتوژنتیک

استفاده از اپتوژنتیک فقط به مطالعات آزمایشگاهی محدود نمی شود بلکه کاربردهای درمانی هم می تواند داشته باشد. از کاربردهای احتمالی بالینی میتوان به پتانسیل استفاده از آن در سیستم بینایی اشاره کرد یعنی جایکه Chr2 در سلولهای رده نخست یعنی سلولهای استوانه بطور طبیعی بیان می شود. زمانی که 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 می تواند برای درمان افسردگی مازور 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 نمی دهند. افزایش فعالیت نورونهای درگیر در تنظیم رفتار عاطفی می تواند کمک کننده باشد، همانطور که در دو مدل موشی افزایش فعالیت نورونهای

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-

- 584.
- [7] Bamberg E, Tittor J, Oesterheld 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 HA, 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, Maseck 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, Mehranfarid 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.

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