مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۱۵/هفته اول بهمن ماه ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۵

اپتوژنتیک: تکنیک سال ۲۰۱۰، استراتژی، کاربردها و جهت‌گیری کلینیکی آن

دکتر معراج پورحسین[۱]، هادی میرزاپور[۲]

مقاله مروری

چکیده

فهم چگونگی عمل نورون‌های مختلف در مغز همواره به عنوان یک اولویت در مطالعات علوم اعصاب چه در سطح پایه و چه در سطح کلینیکی مطرح بوده است. توانایی استفاده از نور جهت مهار یا فعال‌سازی انواع خاصی از نورون‌ها در شبکه‌ی عصبی که توسط اپتوژنتیک فراهم می‌شود، توانمندی‌های محققین علوم اعصاب را در فهم چگونگی مشارکت نورون‌ها در عملکرد مغز، چه در شرایط سلامت و چه در شرایط بیماری، افزایش می‌دهد. اپتوژنتیک تکنیکی است که به ما این اجازه را می‌دهد که به صورت دقیق و سریع سیستم‌های تعریف‌شده‌ی بیولوژیکی را کنترل نماییم. چنین مطالعاتی می‌تواند در محدوده‌ی یک سلول تا یک موجود کامل متحرک صورت گیرد. پیشرفت‌های اپتوژنتیکی با مهیا نمودن کنترل‌های نوری سریع و دقیق زمینه‌های جدیدی را در این گونه مطالعات و به ویژه در شبکه‌های عصبی به صورت In vivo و In vitro ایجاد نموده است. این مطالعات به طور معمول بر پایه‌ی استفاده از فیبرهای نوری مرتبط با امواج لیزر یا دیودهای نوری کاشته‌شده در بدن حیوان که به صورت بی‌سیم با یک منبع انرژی مرتبط می‌باشد، استوار است. در این مطالعات حیوان هوشیار است و قابلیت پاسخ‌دهی آگاهانه به تحریکات را دارد. به تازگی یک سیستم بی‌سیم جهت استفاده در مطالعات طولانی مدت در حیوانات متحرک طراحی و استفاده شده است.

واژگان کلیدی: علوم اعصاب، اپتوژنیک، کانال یونی حساس به نور

ارجاع: پورحسین معراج، میرزاپور هادی. **اپتوژنتیک: تکنیک سال ۲۰۱۰، استراتژی، کاربردها و جهت‌گیری کلینیکی آن.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۱۵): ۲۰۸۳-۲۰۷۲

مقدمه

پس از سال‌ها تدریس دروس مختلف در گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در تابستان سال ۱۳۹۰، تدریس بخشی از درسی تحت عنوان تکنیک‌های جدید در ژنتیک برای دانشجویان تحصیلات تکمیلی رشته‌ی ژنتیک پزشکی را به عهده اینجانب (دکتر معراج پورحسین) گذاشت. به دنبال این موضوع و بررسی‌های مورد نظر با موضوع Optogenetics آشنا شدم که عنوان روش سال ۲۰۱۰ را به خود اختصاص داده بود.

تلاش‌های مکرر به منظور آشنایی عملی و امکان ارتباط با دانشگاه‌های فعال در این زمینه با هدف پایه‌ریزی مقدمات راه‌اندازی این تکنیک در کشور و همکاری‌های مورد علاقه، منجر به برگزاری چندین جلسه با محققین تنها مرکز دانشگاهی انگلیسی زبان فعال در این زمینه در کشور کانادا گردید. پس از آن اولین اقدام عملی از آذر ماه سال ۱۳۹۰ با ارائه‌ی این موضوع درسی به دانشجویان آغاز گردید و خوشبختانه مورد استقبال نیز قرار گرفت و اکثر دانشجویان با علاقه پیگیر و مشوق من در ادامه‌ی راه

۱- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر معراج پورحسین
Email: pourhossein@med.mui.ac.ir

گردیدند. هم اکنون به موازات تلاش برای جلب همکاری استادان گروه‌های آموزشی مرتبط با این تکنیک، طرح‌هایی نیز در حال آماده شدن می‌باشد. هدف از این مقاله نیز معرفی زمینه‌های کاری این تکنیک به محققین و دانشجویان علاقمند در جهت آشنا نمودن آنان با توانمندی‌های وسیع این تکنیک بود. این تکنیک با بهره‌گیری از علایق و تجارب محققین زمینه‌های مختلف نظیر بیولوژی مولکولی، بیوتکنولوژی، ژنتیک، نورولوژی، فیزیولوژی، فیزیک و میکروبیولوژی یک تکنیک بی‌نظیر برای ایجاد همکاری بین گروهی می‌باشد.

با توجه به اعلام آمادگی و علاقه‌ی پیشتازان این رشته در گسترش ابزارهای مورد نیاز به صورت رایگان و حتی قبل از انتشار عمومی و همچنین اعلام آمادگی برای تسهیل آموزش افراد علاقمند در ارتباط با چگونگی استفاده از این ابزارها و مواد و سخت‌افزارها و امکان راه‌اندازی یک آزمایشگاه کامل با هزینه‌ای در حد چند هزار دلار و پشتیبانی سازمان‌های غیر انتفاعی همکاری‌کننده، امید است که این مقاله قدم مؤثری در جهت جلب همکاری‌ها باشد (۱).

کنترل نوری واکنش‌ها با استفاده از اپسین‌های میکروبی

اپتوژنتیک علمی است که از ترکیب ژنتیک و روش‌های اپتیک جهت ایجاد یا از بین بردن یک عملکرد خاص در سلول‌های یک بافت زنده بهره می‌گیرد. در سال ۱۹۷۹ Francis Crick عنوان نمود که عمده‌ترین چالش پیش روی علوم اعصاب، نیاز به کنترل یک نوع سلول در بین دیگر انواع سلول‌های مغز می‌باشد بدون این که تأثیری بر آن‌ها بگذارد. از آن جایی که الکترودها نمی‌توانند برای هدف‌گیری دقیق سلول‌های خاص مورد استفاده قرار گیرند و داروها نیز خیلی کند عمل می‌کنند. وی بعدها پیشنهاد نمود که ممکن است نور بتواند به عنوان یک ابزار کنترل‌کننده عمل نماید؛ اما در آن زمان محققین علوم اعصاب هیچ استراتژی مشخصی را برای ایجاد سلول‌های خاصی که بتوانند به نور پاسخ دهند، نداشتند (۱). بیش از ۴۰ سال از شناسایی بعضی میکروارگانیسم‌های تولیدکننده‌ی پروتئین‌هایی که در پاسخ به نور مرئی به عنوان دریچه‌هایی جهت تبادلات یون‌ها از طریق غشای پلاسمایی عمل می‌کنند، می‌گذرد.

Oesterhelt و Stoeckenius کشف کردند که Bacteriorhodopsin به عنوان یک پمپ یونی عمل می‌کند و می‌تواند به سرعت توسط فوتون‌های نور مرئی فعال شود (۲). مطالعات بعدی منجر به شناسایی Halorhodopsin و پس از آن Channelrhodopsin گردید (۴-۳).

تلاش‌های اولیه برای تحت کنترل در آوردن فعالیت‌های نورونی با استفاده از نور در یک سیستم چند جزیی (Multi component) صورت پذیرفت. این سیستم‌ها شامل آبشاری از فعالیت پروتئین‌ها یا مواد شیمیایی بودند. اگر چه مدت‌ها بود که وجود پروتئین‌های غشایی در باکتری‌ها که به نور واکنش می‌دهند به اثبات رسیده بود، ولی حدود ۳۰ سال طول کشید تا دانشمندان به ارزش اپسین‌های باکتریایی به عنوان یک سیستم Single component در پاسخ به نور پی ببرند.

در سال ۲۰۰۵ به اثبات رسید که ورود یک اپسین باکتریایی به نورون بدون هیچ جزء اضافی دیگری

قادر به القای واکنش نورون‌ها به تابش نور می‌شود (۳). به دنبال آن چندین گزارش دیگر در سال‌های بعد منتشر شد و ثابت شد که Channelrhodopsinها، Bacteriorhodopsinها و Halorhodopsinها همگی توانایی روشن و خاموش کردن نورون‌ها را در پاسخ به انواع متفاوتی از نورها به صورت سریع و امن دارند (شکل ۱). همچنین بافت‌های مهره‌داران کوفاکتورهای ضروری جهت کنترل نوری اپسین‌های میکروبی را دارا می‌باشند و به همین دلیل محققین نشان دادند که می‌توان از بافت مغز پستانداران حتی به صورت دستکاری نشده در پستاندارانی که آزادانه حرکت می‌کنند برای مطالعات کنترل اپتوژنیک استفاده کرد (۷-۵).

امکان کنترل دقیق و مقطعی سیستم‌های دستکاری نشده، به ویژه در پستانداران که دارای رفتارهای پیچیده هستند اهمیت خاصی در علوم اعصاب همانند شاخه‌های دیگر زیست‌شناسی دارد؛ هر چند که ایجاد یا از بین بردن یک عملکرد خاص به صورت موردی و موقتی در یک نوع خاص از سلول‌های مغزی و یا انعکاس آن از یک ناحیه‌ی مغز به نواحی دیگر تاکنون عملی نشده است (۱). در سال‌های اخیر تکنیک‌های اپتوژنیک قابل کنترل در موش‌هایی که آزادانه حرکت می‌کردند، نمود پیدا کرده است. در این موارد، خاصیت تک جزیی (Single-component) سیستم اپسین میکروبی، امکان هدف‌گیری عمومی را فراهم نمود (۸). استراتژی نوردهی به آکسون‌هایی که دور از سلول‌های دریافت‌کننده‌ی اپسین قرار دارند امکان کنترل سلول‌های فوق را بدون نیاز به هر گونه اطلاعات ژنتیکی از آن موجود فراهم نمود. چنین اطلاعاتی برای کنترل‌های اپتوژنتیکی متنوع در موجوداتی نظیر رات‌ها و پریماتت‌ها دارای اهمیت هستند (۱۰-۹).

ابزارهای اپتوژنتیکی برای تحریک یا توقف پاسخ‌های عصبی و بیوشیمیایی

روش‌های مهندسی مولکولی امکان کنترل اپتوژنتیکی وقایع بیوشیمیایی شناخته شده را نیز فراهم نموده است. به عنوان نمونه محققین توانستند با استفاده از کایمرای (Chimaera) رودوپسین، GPCR (G protein-coupled receptor rhodopsin) یا (OptoXRs) در مهره‌داران کنترل بیوشیمیایی مسیرهای گیرنده‌ی GPCR را از طریق سیستم‌های نوری به عهده بگیرند (۱۱). به دنبال آن امکان کنترل نوری GTPaseها که منجر به ایجاد تغییراتی در شکل و حرکات سلولی می‌شوند، در محیط کشت سلولی و با بهره‌گیری از استراتژی‌های جدید فراهم شد (۱۳-۱۲).

شکل ۱. اساس کار اپتوژنتیک در علوم اعصاب، مثال‌هایی از تحریک (نور آبی) و یا مهار (نور زرد) (۱)

مطالعات بعدی درهایی را برای امکان بهره‌گیری از اپتوژنتیک در همه‌ی سلول‌ها و بافت‌ها باز نمود. مستقل از امکان یا عدم امکان قابلیت تهییج الکتریکی و تکنیک‌های دیگر که پیش از این برای سیستم‌های غیر عصبی نظیر گلیال (Glial)، ماهیچه‌ها، سلول‌های بنیادین قلبی و جنینی استفاده شده‌اند، استفاده از نور می‌تواند اهمیت خاصی در امکان ایجاد یک اتفاق خاص در یک جمعیت خاص و در زمان‌های خاص مرتبط با وقایع محیطی داشته باشد. بدیهی است که در مورد سلول‌ها و بافت‌های متفاوت سرعت عمل متفاوتی مورد نیاز می‌باشد. به عنوان مثال، با توجه به این که قلب در بعضی موارد در یک قالب زمانی آرام‌تر عمل می‌نماید، اپتوژنتیک قلب ممکن است همیشه سرعتی در مقیاس میلی‌ثانیه را که در سیستم‌های عصب مرکزی به کار می‌رود، نیاز نداشته باشد. امروزه ابزارهای اپتوژنتیک می‌توانند متناسب با بافت هدف با در نظر گرفتن عوامل اثرگذار بر عملکرد نظیر عوامل الکتریکی، بیوشیمیایی، سرعت و دیگر خصوصیات آن‌ها انتخاب شوند (۱).

محققین اپتوژنتیک در تحقیقات اولیه متوجه شدند که دقت کنترل اپتوژنتیکی از طریق بیان ژن اپسین متوازن نیست و سیستم دارای اختلالاتی می‌باشد که گاهی به صورت فعالیت بیش از حد انتظار یا فقدان آن بروز می‌یابد (۱۴). متعادل‌سازی اپسین‌های میکروبی مشخص نمود که این عدم توازن به دلیل ایجاد موتاسیون‌های متفاوت در بسیاری از آزمایشگاه‌ها می‌باشد که در طول زمان پس از کشف رودوپسین‌های باکتریایی اتفاق افتاده است و به دنبال آن امروزه اپسین‌های تغییر یافته‌ی دارای موتاسیون‌های مختلف برای اهداف کنترلی متفاوت ایجاد می‌شوند (۱۵). همچنین با استفاده از کایمراهای ایجادشده از ترکیبی از اپسین‌های مختلف همراه با ایجاد موتاسیون‌های خاص، اپسین‌های با بیان قوی و یا توانمندی‌های بهینه‌سازی شده، ایجاد گردیده‌اند (۱۶).

با گذشت زمان ابزارها و روش‌های مولکولی با سرعت فزاینده‌ای اهمیت اپتوژنتیک را در جنبه‌های متفاوت و فراتر از جهش‌زایی در ژن‌های شناخته شده به اثبات خواهد رساند. استفاده از ابزارهای اپتوژنتیک به منظور هدف قرار دادن اجزای سلولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و امروزه تلاش‌های فراوانی در جهت کنترل نوری قلمروهای (Domain) تحت سلولی یا داخل سلولی نظیر غشاها صورت می‌گیرد. تلاش برای یافتن ابزارهای نوری که تعاملات پروتئین- پروتئین را تنظیم نمایند، می‌تواند راه‌گشای کنترل اپتوژنتیکی برای کینازها و فاکتورهای رونویسی باشد (۱).

با پیشرفت روزافزون مطالعات ژنومیک، ابزارهای قابل استفاده در اپتوژنتیک نیز در حال افزایش می‌باشند. همچنین به دنبال کشف یک Channelrhodopsin با شیفت قرمز (Red-shifted channel) برای کنترل ترکیبی وقایع، محدوده‌ی عمل آن فراتر از طیف نوری قابل رؤیت گردید (۱۷). اغلب اپسین‌های میکروبی در نورون‌های پستانداران به خوبی بیان نمی‌شوند (۱۹-۱۸).

امروزه مشخص گردید دلیل اصلی آن، مشکلات مربوط به تبادلات غشایی می‌باشد. به دنبال آن تلاش‌ها برای یافتن و افزودن موتیف‌های مناسب در جایگاه‌های خاص ژن‌های اپسین میکروبی برای رفع مشکل فوق آغاز گردید (۱۹).

نحوه‌ی رساندن ابزارهای پتوژنتیکی به داخل سیستم‌های نورونی

کنترل سریع و اختصاصی نوری علاوه بر مزیت‌های قبلی یک دورنمای جدید برای سیستم‌های فیزیولوژی ایجاد نموده است که به دلیل امکان‌پذیر نمودن هم‌زمان بررسی‌های ورودی- خروجی در بافت‌های قابل تهییج از اهمیت خاصی برخوردار است. چنین امکانی در بررسی‌های الکتریکی به صورت هم‌زمان به طور کامل عملی نیست و همین توانمندی اپتوژنتیک امکان مهندسی معکوس را با بهره‌گیری از مقررات و یافته‌های محاسباتی امکان‌پذیر می‌نماید (۱).

برای پیشرفت در این زمینه نیازمند ابزارها و سیستم‌های جدیدی هستیم. به عنوان مثال با کاربرد فیبرهای نوری و LEDها، اپتوژنتیک قادر شد که به صورت عمقی در مغز جانورانی که آزادانه حرکت می‌کنند کنترل مورد نظر را اعمال کند و امکان پاسخ‌گیری سریع و هم‌زمان مورد انتظار را فراهم نماید (۲۰).

همان گونه که پیش از این نیز عنوان شد تلاش‌های فراوان در جهت توسعه‌ی توانمندی‌های اپتوژنتیکی اپسین‌های میکروبی از سال ۲۰۰۵ به بعد منجر به توسعه‌ی ابداعات مرتبط با ابزارهای ژنومیک، مهندسی مولکولی، هدف‌گیری اپسینی و ابزارهای اپتیکی گردیده است. اهمیت اپتوژنتیک به عنوان یک ابزار تحقیقاتی با سرعت به رشد خود ادامه می‌دهد و امروزه بیش از ۸۰۰ آزمایشگاه در جهان در این زمینه فعالیت می‌کنند (۱). هر چند که هنوز هدف اصلی از اپتوژنتیک در ارتباط با سلامت انسان به واسطه‌ی استفاده‌ی مستقیم از اپسین‌ها در بافت‌های انسان محقق نشده است، اما به عنوان یک ابزار تحقیقاتی برای فهمیدن عملکردهای بافت‌های پیچیده نظیر مطالعات بیماری پارکینسون مورد استفاده قرار گرفته است (۸). با توجه به محدودیت‌های تکنولوژیکی در هدف قرار دادن دقیق سلول‌های چرخه‌ی عصبی آگاهی‌های فعلی ما از نارسایی‌های مغزی در حدی نیست که بتوانیم قضاوت کامل و صحیحی از آن به دلیل سرعت‌های بالای اتفاقات چرخه‌ی سلولی در مغز ارائه نماییم و تکنولوژی‌های قبلی در این چالش‌ها کارامدی ندارند و اپتوژنتیک می‌تواند در این چالش‌ها راه‌گشا باشد؛ ولی هنوز کارهای زیادی باید صورت گیرد. از جمله می‌توان به پیشرفت ژنومی در ابزارهای اپتوژنتیک، ایجاد روش‌های مهندسی مولکولی برای عملکردهای متعادل‌شده و ایجاد استراتژی‌های تکامل‌یافته‌ی نوری و ژنتیکی برای سیستم‌های بیولوژیکی و مدل‌های حیوانی اشاره کرد. چالش‌های پیش روی مطالعات امروز در ارتباط با مطالعه‌ی سیستم‌های متفاوت به صورت دستکاری نشده همانند چالش‌هایی است که نوروآناتومی بیش از یک صد سال پیش با آن‌ها مواجه بوده است. در آن زمان میکروسکوپ اجزای سلولی کوچک را در مغز مشخص نمود، اما به نحوی ارتباطات سلولی در چرخه‌ی عصبی در شرایط دست‌نخورده قابل دسترسی نبود تا این که Cajal و همکاران با استفاده از تکنولوژی گلژی توانستند به صورت سیستماتیک نقشه‌ی ارتباطات چرخه‌های عصبی را در سیستم‌های دست‌نخورده مشخص نمایند. اپتوژنتیک با کنترل مقطعی وقایع با حیطه‌ی محدود که در جمعیت خاصی از سلول‌ها اتفاق می‌افتد نقش خود را ایفا می‌کند. این سلول‌ها از نظر موقعیت و عملکرد بخش تفکیک نشده‌ای از یک سیستم بزرگ‌تر هستند (۱).

تولید حیوانات تراریخت و مدل‌های حیوانی مورد استفاده در مطالعات اپتوژنتیک

اولین موش تراریخت بیان‌کننده‌ی اپسین با استفاده از پروموتر Thy1 با بیان گسترده در لایه‌ی نئوکورتیکال و ساب‌کورتیکال بود (۲۱). این رده‌ی موشی به طور گسترده در مطالعات نقش نورون‌های مهاری و مکانیسم فعالیت عمق مغزی در بیماری پارکینسون مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۲).

با پیشرفت در روش‌های اپتوژنتیک استفاده از ابزارهای اپتوژنتیک به صورت انتخابی نیز با سیستم‌های نوترکیبی شامل Cre recombinase گسترش یافت. از جمله این مطالعات می‌توان به تولید رده‌های موشی D1-Cre و D2-Cre بیان‌کننده‌ی گیرنده‌های دوپامین ۱ و ۲ (D1 and D2) در نورون‌های Striatum جهت آزمایش اثر تحریکی آن‌ها در مسیرهای کلاسیک Direct/indirect pathway اشاره کرد (۲۳). همچنین حیوانات دیگری نظیر حیوانات زیر به عنوان مدل در این نوع مطالعات مورد استفاده قرار گرفته‌اند:

الف) کرم سنورابتیدیس الگانس: Nagel و همکاران نشان دادند که در نماتودهای ترانس‌ژنیک دارای ژن Channelrhodopsin این قابلیت وجود دارد که فعالیت نورون حسی- حرکتی را کنترل کرد (۲۴). همچنین انقباض عضلانی دو سویه با استفاده از ChR2 (Channelrhodopsin-2) و NpHR (Halorhodopsin) در این نماتودها، قدرت اپتوژنتیک ترکیبی را اثبات کرد (۲۶-۲۵).

ب) مگس سرکه: رده‌های مگس بیان‌کننده‌ی ChR2 در پاسخ‌های نورونی مبتنی بر تشویق و تنبیه در سطح نوروترانسمیتر یا گیرنده، مورد استفاده قرار گرفتند (۲۸-۲۷).

ج) Zebrafish: یکی از مهم‌ترین مزایای این مدل شفافیت بدنی این جاندارن است که در کنار دوره‌ی کوتاه زاد و ولد و سهولت در ورود DNA خارجی به درون بدن، آن‌ها را به یکی از بهترین مدل‌ها در اپتوژنتیک بدل کرده است. پیشرفت‌های اخیر شامل رده‌های با بیان کنترلی eNpHR-eYFP و ChR2-eYFP توسط سیستم Gal4/UAS بوده است. این سیستم امکان هدف‌گیری اختصاصی subtypeهای نورونی با آمیزش توسط ماهی‌های بیان‌کننده‌ی Gal4 را می‌دهد (۲۹).

د) موش: تاکنون پر کاربردترین موجود در مطالعات به چاپ‌رسیده در زمینه‌ی اپتوژنتیک موش بوده است. استفاده از موش در اپتوژنتیک اساس فهم بسیاری از پیچیدگی‌های علوم اعصاب در مهره‌داران بوده است. از سوی دیگر سهولت در استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی موش و تطابق با ابزارهای اپتوژنتیک به دانشمندان در فهم هر چه بیشتر علوم اعصاب کمک نموده است. اولین گزارش شامل استفاده از Channelrhodopsin در ارتباط با نورون‌های Orexin در جهت القای خواب و بیداری بوده است (۷). اپتوژنتیک همچنین در پی مکانیسم‌های بهبود در مدل‌های موشی دارای افسردگی و نیز در مطالعات ترس و اضطراب به کار گرفته شده است (۳۱-۳۰).

ه) پریمات‌ها: در ارتباط با بیماری Retinitis pigmentosa در انسان که با تحلیل سلول‌های حساس به نور در شبکیه صورت می‌گیرد، مطالعه‌ای با انتقال eNpHR2.0 به صورت Exvivo کارایی اپتوژنتیک را در ارزیابی‌های فیزیولوژیکی

نشـان داد (۳۲). بـه عـلاوه، امکـان کـاربرد Chr2 در سلول‌های بنیادی انسانی به اثبات رسید (۳۳).

کاربردهای اپتوژنتیک: حال و آینده

مغز انسان یکی از مهم‌ترین بخش‌های بدن او می‌باشد که به دلیل پیچیدگی فراوان آن همـواره از جنبـه‌هـای مختلف مورد توجه محققین رشته‌های مختلـف نظیـر دانشمندان علوم زیستی، فلسـفه، هنـر و علـوم دینـی بوده است. بـا وجـود صـدها سـال تـلاش فـراوان و بهره‌گیری از تکنیک‌های پیشرفته هنوز سؤالات زیادی در مورد مغز بی‌پاسخ مانده است. مهم‌ترین بخش مغز در ارتبـاط بـا نحـوه‌ی عمـل و ارتباطـات آن و نیـز مهم‌ترین جزء تشکیل دهنده‌ی آن، نورون‌ها و گلیاهـا می‌باشند. این اعضـا شـبکه‌ای را ایجـاد مـی‌کننـد کـه در نهایـت مسـؤول تمـام فنوتیـپ‌هـای میکروسـکوپی و ماکروسکوپی قابل مشاهده برای ما می‌باشند. متأسفانه بـه دلیل پیچیدگی‌های فراوان ابزارهـای مرسـوم قبلـی نظیـر تحریکـات الکتریکـی، مداخلـه‌هـای دارویـی و حتـی مطالعات پیچیده‌ی تصویرگری عصبی (Neuroimaging) قادر به تشریح جزییات مورد نیاز مـا نیسـتند. بـه عنـوان مثال تحریکات الکتریکی به عنوان یـک ابـزار خیلـی سریع و موقتی با وجود داشتن بعضی خواص منحصر بـه فـرد نظیـر تحریـک عمقـی مغـز (DBS یـا Deep brain stimulation)، بـر تمـام اجـزای قابـل تحریک شامل آکسون‌ها، بدنه‌ی سلولی، دندریت‌ها و گلیاها در محل‌هایی که تحریک وارد می‌شـود بـدون قدرت تفکیک سلول‌های مورد نظر ما تأثیر می‌گذارد. همچنین مداخلات دارویی نمی‌توانند با دقـت زمـانی تحریکات الکتریکی، به صورت موقت عمل نمایند. با در نظر گـرفتن مـوارد فـوق Francis Crick برنـده‌ی جـایزه‌ی نوبـل در لیسـتی از تکنیـک‌هـایی کـه آرزو داشت با پیشـرفت در آن‌هـا فهـم بهتـری از نحـوه‌ی پردازش اطلاعات در مغز فراهم شود، بـه دنبـال روش دیگری برای کنترل نورون‌ها بود و بعدها پیشنهاد نمود که چنین ابزاری می‌تواند استفاده از نور باشد (۳۴).

فهـم و آگـاهی فعلـی مـا در مـورد عملکردهـای طبیعی و نارسایی‌های مغز بـه دلیـل محـدودیت‌هـای تکنیکی نمی‌تواند جزییات کاملی را از طبیعت دقیق و پیچیده‌ی آن به نمایش بگـذارد و در بهتـرین شـرایط ممکن علایم و نشانه‌ها در هر بیمار منتهی بـه شـروع یک درمان در او خواهد شد. هر چند کـه اپتوژنتیـک خصوصیات مورد نیاز برای بهبود شرایط را دارد، ولی هنـوز نیازمنـد پیشـرفت‌هـای بیشـتر نظیـر توسـعه‌ی اطلاعات ژنومیکی، بهینـه‌سـازی‌هـای عملکـردی در سطح مولکولی و بهبود استراتژی‌های ژنتیکی و نوری برای سیستم‌هـای بیولـوژیکی متفـاوت و مـدل‌هـای حیوانی می‌باشد (۱). همچنین به دلیل امکان اسـتفاده از اپتوژنتیـک بـه عنـوان یـک تکنیـک جدیـد بـرای مـدل‌سـازی نـورونی بـه دلیـل داشـتن خصوصـیات منحصر به فرد فراوان نظیر توانـایی آن در غیـر فعـال نمودن سلول‌های عصبی به صورت مسـتقیم و همـین طور هدف‌گیری اختصاصی یک سلول بدون تأثیر بـر سلول‌های مجاور، اهمیـت خـاص دارد (۳۴). همـان طور که پیش از این ذکر شد، بـه تـازگی از ممانعـت اپتوژنتیکی در پریمات‌ها و بافت‌های زنـده‌ی انسـانی بـه صـورت Ex vivo در مـورد سـلول‌هـای شـبکیه گزارش‌هایی داده شـده اسـت (۳۵، ۳۲). ولـی هنـوز کارهای زیادی باید انجام شود تـا پـس از اطمینـان از بی‌خطر بودن بیان اپسین در انسان، بهبـود روش‌هـای استفاده از حامل‌ها و نور در سلول‌های زنده در بافـت

دست‌نخورده و همچنین امکان نشان دادن این که تأثیرات درمانی از این طریق از روش‌های دیگر قابل حصول نمی‌باشد، اپتوژنتیک به عنوان یک گزینه‌ی قابل اعتماد مطرح شود (۳۴).

به صورت معمول مطالعات طراحی‌شده بر اساس رفتارهای حیوانات در حالت هوشیار با وارد نمودن یک فیبر نوری به داخل مغز صورت می‌گیرد. این فیبر نوری از طریق ارتباط با یک لیزر یا با استفاده از یک دیود نوری (LED) کاشته شده در محل که با یک منبع انرژی ارتباط دارد، عمل می‌نماید. به تازگی یک سیستم بی‌سیم با وزن حدود ۲ گرم طراحی و مورد استفاده قرار گرفته است که برای آزمایشاتی که باید به صورت طولانی مدت انجام شود و طی آن‌ها ادامه‌ی حفظ اتصال فیبرهای نوری برای درازمدت عملی نیست و همچنین مطالعات گروهی جانوران که امکان گره خوردن اتصالات فیبری وجود دارد، اهمیت خاصی دارد (شکل ۲) (۳۴). تکنولوژی بی‌سیم کنترل حرکات موش با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است. این ابزارها ممکن است پایه‌ای برای طراحی ابزارهایی باشند که بتوانند برای اهداف کلینیکی کنترل‌های عصبی با استفاده از نور مورد استفاده قرار گیرند (۳۶).

در مطالعات مورد نظر بر روی رفتارهای حیوانات پیچیده‌ای نظیر پستانداران محدودیت‌های تکنیکی جهت کنترل دقیق پروسه‌های سیگنالی داخل سلولی وجود دارد. Airan و همکاران ابزارهای مبتنی بر ساختارهای ژنتیکی– نوری تحت عنوان OptoXR را طراحی و استفاده نمودند که به صورت انتخابی در پاسخ به نور عمل می‌کردند. پیشرفت‌های مبتنی بر OptoXR این امکان را فراهم می‌کند که فرضیه‌های مرتبط با تأثیرات موردی سیگنال‌های بیوشیمیایی بر رفتارهای حیوانات به صورت موقت و قابل هدف‌گیری تست شوند (۱۱).

گیرنده‌های جفت شده‌ی G پروتئین (GPCRs یا G protein coupled receptors) واسطه‌ای برای انتقال در پاسخ به طیف وسیعی از تحریکات خارج سلولی می‌باشد (۳۷).

به دنبال اتصال مولکول‌های سیگنال‌دهنده نظیر هورمون‌ها و نوروترانسمیترها، GPCRها پروتئین‌های هتروترایمری اتصالی GTP/GD را فعال می‌کنند که

شکل ۲. استفاده از فیبر نوری (با سیم) و روش‌های بی‌سیم در القای تحریکات اپتوژنتیکی (۳۶)

آن‌ها نیز به نوبه‌ی خود باعث فعال شدن یا غیر فعال شدن تأثیرگذارهای ثانویه و در نهایت منجر به پاسخ‌های فیزیولوژیکی می‌شوند. با وجود این که GPCRها سیگنال‌های مختلف خارج سلولی را شناسایی می‌کنند ولی همگی دارای یک نوع توپولوژی ساختاری می‌باشند که شامل ۷ مارپیچ است که غشا را طی می‌کنند و توالی‌های حفاظت‌شده‌ای دارند. این شباهت‌ها پیشنهاد می‌کنند که ممکن است مکانیسم فعال شدن GPCRها یکسان باشد. مطالعات بیوشیمایی متعددی این موضوع را پشتیبانی می‌کنند. اما با وجود این شناسایی نواحی حیاتی برای اتصال آگونیست‌ها و تحریک توسط سیگنال نیاز به مطالعات بیشتری دارد (۳۸).

Pacemaker قلبی، انقباضات موزون قلبی را کنترل می‌کند و در افرادی که در این زمینه مشکل دارند توسط وسیله‌ای که با باطری کار می‌کند جایگزین می‌شود. به تازگی Arrenberg و همکاران Pacemakerی ساختند که به صورت ژنتیکی کددهی می‌شود و به صورت نوری بر اساس بیان Halorhodopsin و Channelrhodopsin در سلول‌های قلبی Zebrafish آن‌ها را کنترل می‌کند. آن‌ها با استفاده از نورهای مختلف شرایط تاکی‌کاردی، برادی‌کاردی و انسداد دهلیزی- بطنی را شبیه‌سازی نمودند. چنین شرایطی در فعالیت سلول‌ها به طور کامل قابل برگشت بود. مطالعات فوق بر اساس ترکیبی از کاربرد اپتوژنتیک و Light-sheet میکروسکوپی انجام شد. روش مبتنی بر تحریک نوری ضمن امکان‌پذیر نمودن کنترل نوری ضربان قلب، القای شرایط بیمارگونه را نیز به صورت قابل برگشت امکان‌پذیر نمود (۱۱).

استفاده از اپتوژنتیک در بافت‌های قابل تحریک نظیر قلب، اسکلتی و ماهیچه‌های صاف در عمل تا قبل از سال ۲۰۱۰ امکان‌پذیر نبود (۴۰-۳۹). Bruegmann و همکاران با ترکیب بیان ویروسی یک واریته‌ی ChR2 با یک پروموتور CAG در سلول‌های بنیادی موش با تمایز هدف‌دار توانستند سلول‌های کاردیومیوسیت مشتق‌شده را برای نمایش عملکرد نور در شرایط Invitro ایجاد نمایند. آن‌ها توانستند در موش‌های ترانس‌ژنیک ضمن بیان ChR2، با پالس‌های نوری حرکات طبیعی موزون و با پالس‌های طولانی آریتمی‌های متمرکز در آن محل ایجاد کنند (۴۰). برخلاف مغز، بافت قلب دارای سلول‌های کاردیومیوسیت بسته‌بندی شده‌ی متراکمی است که عملکرد توأم الکتریکی و مکانیکی دارد. عملکرد الکترومکانیک قلب برای ایجاد انقباض کارامد نیازمند هماهنگی امواج تحریک‌کننده می‌باشد (۴۱).

نگرش‌های بالینی

به تازگی تحقیقات پایه در علوم اعصاب با بهره‌گرفتن از کلون‌سازی کانال‌های یونی حساس به نور موجود در میکروارگانسیم‌ها تحول زیادی پیدا کرده است.

این عوامل به صورت دقیق و مقطعی نورون‌های بخش‌های متفاوت مغز را با مزایایی همچون صرف انرژی کمتر، کنترل مقطعی و نیز بی‌سیم بودن ابزارهای اپتوژنتیک برای استفاده در بافت قلبی کنترل می‌کنند. محققین بر این باور هستند که اپتوژنتیک نه تنها می‌تواند به عنوان یک ابزار جالب در تحقیقات آریتمی، بلکه به عنوان پایه‌ای برای ساختن نسل جدیدی از Pacemakerهای قلبی مبتنی بر نور کاربرد داشته باشد (۴۱).

References

1. Deisseroth K. Optogenetics. Nat Methods 2011; 8(1): 26-9.
2. Oesterhelt D, Stoeckenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium. Nat New Biol 1971; 233(39): 149-52.
3. Matsuno-Yagi A, Mukohata Y. Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of Halobacterium halobium differing in pigmentation. Biochem Biophys Res Commun 1977; 78(1): 237-43.
4. Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, et al. Channelrhodopsin: 1-a light-gated proton channel in green algae. Science 2002; 296(5577): 2395-8.
5. Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, Miesenbock G, Ting A, Schnitzer MJ. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. J Neurosci 2006; 26(41): 10380-6.
6. Aravanis AM, Wang LP, Zhang F, Meltzer LA, Mogri MZ, Schneider MB, et al. An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. J Neural Eng 2007; 4(3): S143-S156.
7. Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de LL. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. Nature 2007; 450(7168): 420-4.
8. Tsai HC, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bonci A, de LL, et al. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. Science 2009; 324(5930): 1080-4.
9. Petreanu L, Huber D, Sobczyk A, Svoboda K. Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. Nat Neurosci 2007; 10(5): 663-8.
10. Gradinaru V, Thompson KR, Zhang F, Mogri M, Kay K, Schneider MB, et al. Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo. J Neurosci 2007; 27(52): 14231-8.
11. Airan RD, Thompson KR, Fenno LE, Bernstein H, Deisseroth K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. Nature 2009; 458(7241): 1025-9.
12. Levskaya A, Weiner OD, Lim WA, Voigt CA. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. Nature 2009; 461(7266): 997-1001.
13. Wu YI, Frey D, Lungu OI, Jaehrig A, Schlichting I, Kuhlman B, et al. A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. Nature 2009; 461(7260): 104-8.
14. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. Nat Neurosci 2005; 8(9): 1263-8.
15. Gunaydin LA, Yizhar O, Berndt A, Sohal VS, Deisseroth K, Hegemann P. Ultrafast optogenetic control. Nat Neurosci 2010; 13(3): 387-92.
16. Lin JY, Lin MZ, Steinbach P, Tsien RY. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. Biophys J 2009; 96(5): 1803-14.
17. Zhang F, Prigge M, Beyriere F, Tsunoda SP, Mattis J, Yizhar O, et al. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from Volvox carteri. Nat Neurosci 2008; 11(6): 631-3.
18. Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, Mattis J, Prakash R, Diester I, et al. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. Cell 2010; 141(1): 154-65.
19. Zhang F, Wang LP, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N, et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. Nature 2007; 446(7136): 633-9.
20. Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. Science 2009; 324(5925): 354-9.
21. Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine GJ, et al. In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. Neuron 2007; 54(2): 205-18.
22. Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. Nature 2009; 459(7247): 698-702.
23. Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, et al. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. Nature 2010; 466(7306): 622-6.
24. Nagel G, Brauner M, Liewald JF, Adeishvili N, Bamberg E, Gottschalk A. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of Caenorhabditis elegans triggers rapid behavioral responses. Curr Biol 2005; 15(24): 2279-84.
25. Stirman JN, Crane MM, Husson SJ, Wabnig S, Schultheis C, Gottschalk A, et al. Real-time multimodal optical control of neurons and muscles in freely behaving Caenorhabditis

elegans. Nat Methods 2011; 8(2): 153-8.
26. Leifer AM, Fang-Yen C, Gershow M, Alkema MJ, Samuel AD. Optogenetic manipulation of neural activity in freely moving Caenorhabditis elegans. Nat Methods 2011; 8(2): 147-52.
27. Schroll C, Riemensperger T, Bucher D, Ehmer J, Voller T, Erbguth K, et al. Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in Drosophila larvae. Curr Biol 2006; 16(17): 1741-7.
28. Bellmann D, Richardt A, Freyberger R, Nuwal N, Schwarzel M, Fiala A, et al. Optogenetically Induced Olfactory Stimulation in Drosophila Larvae Reveals the Neuronal Basis of Odor-Aversion behavior. Front Behav Neurosci 2010; 4: 27.
29. Arrenberg AB, Del BF, Baier H. Optical control of zebrafish behavior with halorhodopsin. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(42): 17968-73.
30. Covington HE, III, Lobo MK, Maze I, Vialou V, Hyman JM, Zaman S, et al. Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. J Neurosci 2010; 30(48): 16082-90.
31. Johansen JP, Hamanaka H, Monfils MH, Behnia R, Deisseroth K, Blair HT, et al. Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107(28): 12692-7.
32. Busskamp V, Duebel J, Balya D, Fradot M, Viney TJ, Siegert S, et al. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. Science 2010; 329(5990): 413-7.
33. Weick JP, Johnson MA, Skroch SP, Williams JC, Deisseroth K, Zhang SC. Functional control of transplantable human ESC-derived neurons via optogenetic targeting. Stem Cells 2010; 28(11): 2008-16.
34. Lin SC, Deisseroth K, Henderson JM. Optogenetics: background and concepts for neurosurgery. Neurosurgery 2011; 69(1): 1-3.
35. Diester I, Kaufman MT, Mogri M, Pashaie R, Goo W, Yizhar O, et al. An optogenetic toolbox designed for primates. Nat Neurosci 2011; 14(3): 387-97.
36. Wentz CT, Bernstein JG, Monahan P, Guerra A, Rodriguez A, Boyden ES. A wirelessly powered and controlled device for optical neural control of freely-behaving animals. J Neural Eng 2011; 8(4): 046021.
37. Lefkovitz Z, Cappell MS, Kaplan M, Mitty H, Gerard P. Radiology in the diagnosis and therapy of gastrointestinal bleeding. Gastroenterol Clin North Am 2000; 29(2): 489-512.
38. Kim JM, Hwa J, Garriga P, Reeves PJ, RajBhandary UL, Khorana HG. Light-driven activation of beta 2-adrenergic receptor signaling by a chimeric rhodopsin containing the beta 2-adrenergic receptor cytoplasmic loops. Biochemistry 2005; 44(7): 2284-92.
39. Arrenberg AB, Stainier DY, Baier H, Huisken J. Optogenetic control of cardiac function. Science 2010; 330(6006): 971-4.
40. Bruegmann T, Malan D, Hesse M, Beiert T, Fuegemann CJ, Fleischmann BK, et al. Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. Nat Methods 2010; 7(11): 897-900.
41. Jia Z, Valiunas V, Lu Z, Bien H, Liu H, Wang HZ, et al. Stimulating cardiac muscle by light: cardiac optogenetics by cell delivery. Circ Arrhythm Electrophysiol 2011; 4(5): 753-60.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 28.10.2012
Vol. 30, No. 215, 1st Week, February 2013
Accepted: 25.12.2012

Optogenetics: Method of the Year 2010, Strategy, Application and it's Future Directions Towards Clinical Application

Meraj Pourhossein PhD[1], Hadi Mirzapour MSc[2]

Review Article

Abstract

Understanding the function of different kinds of neurons in the brain has been a priority in basic and clinical neuroscience for ages. Optogenetics provides the ability to use light to inhibit or activate specific neuron types within neural networks. It enhances the ability of neuroscientists to understand how neurons contribute to brain functions both in health and disease. Optogenetics is a technology that allows fast control of precisely defined events in biological systems from cells of a cell culture to very complex systems in freely moving animals. Optogenetic approaches deliver precise and fast optical control and open new landscapes for the study of biological processes within neural networks in vivo and in vitro. Experiments on conscious animals usually insert an optical fiber connected to a remote laser into the brain or employ an implanted light-emitting diode (LED) connected to a remote power source. Recently, a fully wireless system has been designed to allow long-term experiments on moving animals. The present study reviewed available optogenetic approaches.

Keywords: Optogenetics, Neuroscience, Light sensitive ion channel

Citation: Pourhossein M, Mirzapour H. **Optogenetics: Method of the Year 2010, Strategy, Application and it's Future Directions Towards Clinical Application.** J Isfahan Med Sch 2013; 30(215): 2072-83

1- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Meraj Pourhossein PhD, Email: pourhossein@med.mui.ac.ir