

DOMINIK KANIGOWSKI, JOANNA URBAN-CIEĆKO

Pracownia Neurobiologii
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: d.kanigowski@nencki.edu.pl
j.ciecko@nencki.edu.pl

OPTOGENETYKA I INNE METODY KONTROLI AKTYWNOŚCI KOMÓREK NERWOWYCH*

WSTĘP

Ludzie badają układ nerwowy już od 5 tysięcy lat, o czym świadczy zachowany staroegipski manuskrypt spisany przez lekarzy tamtych czasów (BRESTEAD 1930). Pierwszy raz pojawia się w nim słowo „mózg”. Natomiast pierwszą znaną historii osobą, która stwierdziła, że mózg tworzy świadomość i jest miejscem doznań był Alkmion, pitagorejczyk żyjący w połowie V w. p.n.e. Ten starożytny grecki neuroanatom wygłosił również uwagę mówiącą, że nerw wzrokowy jest ścieżką niosącą światło do mózgu (PANEGYRES i PANEGYRES 2016). Stwierdzenie to jest niemal zgodne z prawdą, pomijając fakt, że nerw wzrokowy nie przewodzi *per se* kwantów światła, a jedynie informację o nich, w postaci wyładowań elektrycznych w wypustkach komórek, z których się składa. Czego jednak nie zrobiła sama natura, dokonał człowiek. Obecnie wyposażeni jesteśmy w technologię, która umożliwia nam dostarczenie światła do mózgu i sterowanie aktywnością jego wybranych komórek. Technologia ta to optogenetyka – połączenie metod optycznych i genetycznych, przy pomocy których jesteśmy w stanie kontrolować aktywność wybranych neuronów *in vitro*, np. w hodowli komórkowej, jak i *in vivo*, w żywym zwierzęciu, np. w swobodnie poruszającej się myszy laboratoryjnej (BOYDEN i współaut. 2005). Możliwość precyzyjnego sterowania aktywnością specyficznych grup komórek, które tworzą określone obwody neuronalne, jest niezbędna do dokładnego

zbadania działania ludzkiego mózgu i zrozumienia zależności przyczynowo-skutkowej pomiędzy bodźcem płynącym z otoczenia a odpowiedzią w postaci zachowania zwierzęcia czy człowieka. Powyższe podejście umożliwia również badanie funkcji mózgu „wyższego rzędu” takich jak: emocje, percepcja, uwaga, zdolności poznawcze, racjonalne myślenie czy język. Optogenetyka daje szansę na zbadanie tych funkcji zarówno w zdrowym, jak i w chorym mózgu, w którym aktywność komórek nerwowych jest zaburzona, np. w schizofrenii, depresji, zaburzeniach ze spektrum autyzmu, zaburzeniach obsesyjno-kompulsyjnych czy zaburzeniach stresu pourazowego (HUANG i współaut. 2013, SPARTA i współaut. 2013). To sprawia, że optogenetyka jest nieocenionym narzędziem współczesnej neurobiologii, a w przyszłości być może i medycyny.

Droga do odkrycia optogenetyki nie była jednak łatwa, a sama metoda nie powstała w oderwaniu od innych technik manipulacji aktywnością komórek nerwowych. Dlatego pierwszy rozdział poświęcamy krótkiemu opisowi optogenetyki, po czym przechodzimy do chronologicznego opisu najważniejszych metod, które poprzedzają powstanie współczesnej formy metod optogenetycznych. W następnych rozdziałach prezentujemy historię powstania optogenetyki zachowując, przy opisie opsyn, kolejność w jakiej były one odkrywane i konstruowane. Końcowy rozdział dedykujemy najnowszym metodom manipulacji aktywnością neuronów, takich jak LITEs czy techniki oparte na nanocząstecz-

Słowa kluczowe: chemogenetyka, nanocząsteczki, opsyny, optogenetyka

*Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Narodowego Centrum Nauki – grant nr UMO-2015/18/E/NZ4/00721.

kach. Metody te, czerpiąc z podstaw optogenetyki, wprowadzają jednocześnie nowatorskie rozwiązania i szkicują perspektywy dalszego ich wykorzystania w rozwoju neurobiologii.

OPTOGENETYKA

Optogenetyka opiera się na opanowaniu trzech podstawowych metod badawczych: (1) produkcji opsyn, starej ewolucyjnie rodziny genów pochodzących od archebakterii i alg. Każdy z tych genów koduje białko, które po wzbudzeniu światłem o odpowiedniej długości fali generuje transbłonowy ruch jonów lub protonów; (2) bogatej puli procedur manipulacji genetycznej, pozwalających na wystarzająco silną ekspresję opsyn w wybranej, specyficznej grupie komórek mózgu; (3) narzędziach pozwalających dostarczyć światło o właściwej długości fali i manipulować siłą i czasem trwania jego pulsów (DEISSEROTH 2011).

Za odkrywcę opsyn uznaje się Franza Bolla, który w 1876 r. zaobserwował, że pręciki siatkówki żaby zmieniają kolor po wystawieniu zwierząt na światło różnej barwy (BOLLA 1877). Prawie sto lat później odkryto mechanizm działania opsyn u mikroorganizmów. W 1971 r. opisano bakteriorodopsynę pochodzącą od *Halobacterium halobium* – halofilnej archebakterii zasiedlającej środowiska o wysokim stężeniu soli (OESTERHELT i STOECKENIUS 1971). Odkryto wtedy, że bakteriorodopsyna pod wpływem światła działa jak pompa jonowa. Dalsze odkrycia białek z tej rodziny przypadają na 1977 r., kiedy odkryto halorodopsynę (MATSUNO-YAGI i MUKOHATA 1977), i 2002 r., kiedy opisano opsynę ChR1 (ang. channelrhodopsin-1) (NAGEL i współaut. 2002). Od chwili odkrycia pierwszej bakteryjnej opsyny, do chwili opublikowania przez Karla Deisserotha i jego zespół z Uniwersytetu Stanforda pracy opisującej pierwszą optogenetyczną manipulację aktywności komórek nerwowych musiało minąć ponad 30 lat (BOYDEN i współaut. 2005). Trzeba jednak zaznaczyć, że sam pomysł manipulacji aktywnością neuronów za pomocą światła nie był nowy; już w 1979 r. Francis Crick spekulował na ten temat na łamach *Scientific American* (DEISSEROTH 2010). Dla pełnego obrazu sytuacji należy również wspomnieć o całym wachlarzu wcześniejszych metod jakie powstawały przez ostatnie półwiecze dla celów manipulacji aktywnością komórek nerwowych. Metody te są bardzo różne, zarówno pod względem zasad działania, jak i ich dokładności w czasowo-przestrzennej regulacji aktywności neuronów. Różnią się również pod względem specyficzności, czyli możliwości wybiórczego

oddziaływania na określony typ komórek, np. tylko na komórki pobudzające (glutaminergiczne) lub hamujące (GABAergiczne).

PIERWSZE METODY MANIPULACJI AKTYWNOŚCIĄ KOMÓREK NERWOWYCH

Do najstarszych prób manipulacji aktywnością komórek nerwowych należą metody blokujące naturalne przewodnictwo w nerwie przez jego polaryzację za pomocą elektrod (VASTOLA 1961). Inne metody z lat 60. opierały się na zablokowaniu aktywności komórek przez chłodzenie tkanki mózgowej przy użyciu metalowych drutów lub płytek podłączonych do aparatury chłodzącej (HULL 1968). Równocześnie stosowano farmakologię: wykorzystywane były blokery kanałów sodowych (np. tetrodotoksyna), różnego typu agoniści (np. muscimol) i antagoniści (np. pikrotoksyna) receptorów hamujących GABA-A (NARAHASHI i współaut. 1964, HORI i współaut. 1979). Powyższe związki są nadal szeroko wykorzystywane w badaniach elektrofizjologicznych nad układem nerwowym. Nie umożliwiają one jednak specyficznej blokady tylko jednej, wybranej klasy komórek. Nieco później, na przełomie lat 80. i 90. eksperymentowano z różnymi chemicznie syntetyzowanymi, „uwięzionymi” (ang. caged) neurotransmiterami, takimi jak: acetylocholina, kwas γ -aminomasłowy (GABA), glicyna czy glutaminian. W metodzie tej do natywnych neuroprzekaźników, za pomocą wiązań estrowych lub amidowych, przyłączano niewielkie węglowodory cykliczne. Taki komponent był biologicznie nieaktywny i fotolabilny. Po oświetleniu światłem lasera związki te rozpadały się uwalniając „uwięziony”, biologicznie czynny neuroprzekaźnik (WILCOX i współaut. 1990). Były to pierwsze formy stymulacji aktywności komórek nerwowych za pomocą światła. Początkowo metoda ta stosowana była do śledzenia funkcjonalnych połączeń pomiędzy neuronami w mózgach ssaków. Wykorzystując metodę „uwięzionego” glutaminianu wraz z metodami elektrofizjologicznymi zmapowano rozwój funkcjonalnych połączeń w korze wzrokowej rozwijających się młodych fretok (DALVA i KATZ 1994). Technologia „uwięzionych” neuroprzekaźników intensywnie ewoluowała i dzisiaj jest również szeroko wykorzystywana w badaniach neurobiologicznych nad plastycznością mózgu. „Uwięzione” neuroprzekaźniki, z wykorzystaniem mikroskopii dwufotonowej, umożliwiają obecnie stymulację pojedynczych kolców dendrytycznych w synapsach i badanie szlaków sygnałowych biorących udział w plastyczności tych struktur (CHANG i współaut. 2019). Niestety stymulacja za pomocą

„uwięzionych” neuroprzekazników również nie pozwala na specyficzną manipulację aktywności wybranej populacji neuronów.

Taką specyficzną kontrolę umożliwiają dopiero narzędzia biologii molekularnej, polegające na zaplanowanej ekspresji różnego typu genów w wybranych typach komórek. Metody te używają genów zmutowanych, pochodzących od innych organizmów lub zaprojektowanych od podstaw. Za przykład może posłużyć kierowana ekspresja z wykorzystaniem systemu GAL4/UAS u muchówki, wywilżny karłowatej (*Drosophila mela-*

nogaster). Z wykorzystaniem tego systemu stworzono wywilżny, u których za pośrednictwem zmian temperatury można było sterować aktywnością wybranych grup komórek. Było to osiągalne przez wprowadzenie do komórek zmutowanego allelu *sh^{ts1}*. Gen ten koduje białko odpowiedzialne za endocytozę, a przez to recyrkulację pęcherzyków synaptycznych. Dodatkowo, jego ekspresja regulowana jest przez temperaturę (Tabela 1) (KITAMOTO 2001). Pozwoliło to na sterowanie aktywnością neuronów i zachowaniem wywilżn w minutowej skali czasu, a więc wy-

Tabela 1. Wybrane metody manipulacji aktywnością komórek nerwowych.

Nazwa	Białko, pochodzenie	Stymulacja	Efekt	Bibliografia
Allel <i>sh^{ts1}</i> (mutacja genu natywnego)	dynamina (GTPaza) <i>Drosophila melanogaster</i>	>30°C	blokada endocytozy, blok synaptyczny	KITAMOTO 2001
Lekki łańcuch tetanospazmny – w postaci transgenu kodującego to białko	enzym proteolityczny, <i>Clostridium tetani</i>	konstytutywna ekspresja lub doksycyklina	przecina WAMP2/synaptobrewine 2, zahamowanie egzocytozy, blok synaptyczny	SWEENEY i współaut. 1995 YAMAMOTO i współaut. 2003
AlstR	receptor GPCR regulujący syntezę hormonu juvenilnego, <i>D. melanogaster</i>	peptyd allatostatyna	aktywacja kanałów GIRK, hiperpolaryzacja błony	LECHNER i współaut. 2002
chARGe	trzy białka budujące fotoreceptor: arestyna-2, rodopsyna, podjednostka α białka G, <i>D. melanogaster</i>	światło o długości fali 400-600 nm	uruchomienie kaskady sygnałowej przez białko G, aktywacja kanałów kationowych, depolaryzacja błony	ZEMELMAN i współaut. 2002
TRPV1	receptor/kanał kationowy, <i>Rattus norvegicus</i>	kapsaicyna	aktywacja kanału, depolaryzacja błony	ZEMELMAN i współaut. 2003
SPARK	zmodyfikowany kanał potasowy z kowalencyjnie przyłączanym fotoczułym związkiem chemicznym, <i>D. melanogaster</i>	światło o długości fali ~380 nm – aktywacja; 460-500 nm – inaktywacja	zmiana konformacji związku chemicznego, otwarcie kanału, depolaryzacja błony	BANGHART i współaut. 2004
MIST	zmodyfikowane białko odpowiedzialne za egzocytozę, <i>Rattus norvegicus</i>	podanie związków chemicznych	dimeryzacja białek, zahamowania egzocytozy, blok synaptyczny	KARPOVA i współaut. 2005
DREADD: hM4Di hM3Dq	Zmodyfikowany muskarynowy receptor GPCR acetylocholinowy, <i>Homo sapiens</i>	N-tlenek klozapiny	aktywacja szlaku sygnałowego za pośrednictwem białka G, hiperpolaryzacja lub depolaryzacja błony	ARMBRUSTER i współaut. 2007 ALEXANDER i współaut. 2009
ChR1	kanał przepuszczalny dla jonów wodorowych, <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	światło o długości fali ~500 nm	aktywacja kanału, depolaryzacja błony	NAGEL i współaut. 2002

ChR2 ChR2 ^{H134R} ChR2 ^{E123T} /ChETA	kanał kationowy, <i>C. reinhardtii</i>	światło o długości fali 450-490 nm (470-510 nm dla ChETA)	aktywacja kanału, depolaryzacja błony	NAGEL i współaut. 2003 BOYDEN i współaut. 2005 NAGEL i współaut. 2005 GUNAYDIN i współaut. 2010
RO4	rodopsyna, receptor GPCR działający za pośrednictwem G _{i/o} , <i>R. norvegicus</i>	światło o długości fali ~475nm	postsynaptyczna aktywacja kanałów GIRK, hiperpolaryzacja błony, presynaptyczne hamowanie kanałów wapniowych, hamowanie wydzielania neuroprzekaźnika	LI i współaut. 2005
Halo/NpHR eNpHR/eNpHR2.0 eNpHR3.0	pompa chlorowa, <i>Natronomas pharaonis</i>	światło o długości fali 560-590 nm	transport anionów chloru do wnętrza komórki, hiperpolaryzacja błony	HAN i BOYDEN 2007 ZHANG i współaut. 2007 GRADINARU i współaut. 2008 CHOW i współaut. 2010 GRADINARU i współaut. 2010
VChR	kanał kationowy, <i>Volvox carteri</i>	światło o długości fali 450-490 nm	aktywacja kanału, depolaryzacja błony	ERNST i współaut. 2008
VChR1	kanał kationowy, <i>V. carteri</i>	światło o długości fali ~535 nm	aktywacja kanału, depolaryzacja błony	ZHANG i współaut. 2008
Arch/ ArchT	pompa protonowa, <i>Halorubrum sodomense</i> , <i>Halorubrum</i> sp. szczep TP009	światło o długości fali 525-600 nm	transport protonów na zewnątrz komórki, hiperpolaryzacja błony	CHOW i współaut. 2010 HAN i współaut. 2011
Mac/LR/Ops	pompa protonowa, <i>Leptosphaeria maculans</i>	światło o długości fali 510-570 nm	transport protonów na zewnątrz komórki, hiperpolaryzacja błony	CHOW i współaut. 2010
optoXR	hybrydy białkowe złożone z rodopsyny <i>Bos taurus</i> i receptora adrenergicznego α_1 <i>H. sapiens</i> lub receptora adrenergicznym β_2 <i>Mesocricetus auratus</i>	światło o długości fali ~470-500 nm	aktywacja kaskady sygnałowej: receptor α_1 za pośrednictwem G _q , depolaryzacja błony; receptor β_2 za pośrednictwem G _s , hiperpolaryzacja błony	AIRAN i współaut. 2009
C1V1	hybryda białkowa ChR1 <i>C. reinhardtii</i> i VChR1 <i>V. carteri</i>	światło o długości fali ~1040 nm	aktywacja kanału, depolaryzacja błony	PRAKASH i współaut. 2012 RICKGAUER i współaut. 2014

LITEs	hybrydy białkowe złożone z motywu TALE <i>Xanthomonas sp.</i> , dwóch białek CRY2 i CIB1 <i>Arabidopsis thaliana</i> oraz białek efektorowych: syntetycznego VP64 na bazie jednego z białek Herpes simplex virus i drugiego SID4X na bazie jednego z białek <i>A. thaliana</i>	światło o długości fali 350-475 nm	zmiana konformacji CRY2, przyłączenie CIB1 do CRY2; VP64 – aktywacja transkrypcji, SID4X – pośrednictwo w deacetylacji histonów, represja transkrypcji	KONERMANN i współaut. 2013
TRPV1 i nanocząstki Fe ₃ O ₄ Ø 22 nm	receptor/kanał kationowy, <i>R. norvegicus</i>	pole magnetyczne, oddanie ciepła przez cząstki w wyniku magnetycznej histerezy, >43°C	aktywacja kanału, depolaryzacja błony	CHEN i współaut. 2015
nanocząstki złota Ø 20 nm skoniugowane z II-rzędowymi przeciwciałami	–	światło o długości fali ~523 nm	wypromieniowanie energii przez nanocząsteczki w postaci ciepła, zmiana pojemności elektrycznej błony generuje prąd pojemnościowy, depolaryzacja błony	CARVALHO-DE-SOUZA i współaut. 2015
nanocząstki NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Tm ³⁺ , NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺ i opsyny ChR2, Arch	kanał kationowy, <i>C. reinhardtii</i> , pompa protonowa, <i>H. sodomense</i>	światło o długości fali ~980 nm	pochłonięcie przez nanocząstkę niskoenergetycznych fotonów i wypromieniowanie fotonu o wyższej energii, aktywacja ChR2 i depolaryzacja błony lub aktywacja Arch i hiperpolaryzacja błony	CHEN i współaut. 2018

wołanie u nich temperaturowo-zależnego paraliżu lub ich oślepienia. Z wykorzystaniem systemu GAL4/US udało się również zahamować przekazywanie synaptyczne w wybranych komórkach tych muchówek przez ekspresję genu kodującego lekki łańcuch białka tetanospazminy, groźnej toksyny pochodzącej od laseczki tężca (*Clostridium tetani*) (SWEENEY i współaut. 1995). Lekki łańcuch tetanospazminy jest odpowiedzialny za cięcie białka VAMP2/synaptobrewina 2, które związane jest z membraną pęcherzyków synaptycznych. VAMP2 odpowiedzialne jest za proces dokowania pęcherzyka synaptycznego do błony presynaptycznej i jego fuzję z błoną. Jest to więc jedno z białek biorących udział w procesie egzocytozy pęcherzyka synaptycznego i uwolnienia neuroprzekaznika do szczeliny synaptycznej.

Przy wykorzystaniu metod indukowanej ekspresji udało się później stworzyć linię myszy eksprymujących lekki łańcuch tetanospazminy w zależności od obecności antybiotyku doksycykliny (YAMAMOTO i współaut. 2003). Podając myszom ten antybiotyk

w pożywieniu i wodzie udało się indukować ekspresję lekkiego łańcucha tetanospazminy w komórkach ziarnistych mózdzku. W ten sposób można było hamować uwalnianie glutaminianu przez komórki ziarniste, co prowadziło do znacznego pogorszenia wyników w testach na koordynację ruchową gryzoni traktowanych doksycykliną. Efekt ten był odwracalny po zaprzestaniu podawania antybiotyku.

NOWE METODY MANIPULACJI AKTYWNOŚCIĄ KOMÓREK NERWOWYCH

W wyniku metodycznych poszukiwań pojawiło się wiele technik mających na celu kontrolowanie aktywności neuronów. Stosunkowo nowym podejściem jest wykorzystanie chemogenetyki. Metoda ta polega na genetycznej manipulacji pozwalającej na ekspresję w docelowych komórkach genów kodujących specjalnie zaprojektowane, transbłonowe białka receptorowe, reagujące na wybrane niewielkie związki chemiczne

ne. Białka te w obecności swoich ligandów zmieniają własną konformację i w różnorodny sposób wpływają na aktywność komórek, w których są eksprymowane. Jednym z pierwszych tego typu podejść było użycie do regulacji aktywności ssaczych neuronów receptora AlstR pochodzącego z *D. melanogaster*. AlstR należy do receptorów sprzężonych z białkiem G (ang. G protein-coupled receptor, GPCR), natywnie odpowiada za regulację syntezy hormonu juvenilnego owadów i jest aktywowany przez niewielki peptyd, allatostatynę. Receptor ten, w neuronach ssaków, po podaniu egzogennej allatostatyny, aktywuje sprzężone z białkiem G wewnątrzprotoniczne kanały potasowe (ang. G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels, GIRKs), które po otwarciu powodują hiperpolaryzację komórki i zmniejszają w ten sposób prawdopodobieństwo wystąpienia potencjałów czynnościowych (LECHNER i współaut. 2002).

Kolejnym krokiem na długiej drodze rozwoju metod i technologii kontroli aktywności komórek nerwowych było wykorzystanie światła, w połączeniu z narzędziami transformacji genetycznej. Nie były to *stricte* metody optogenetyczne w dzisiejszym rozumieniu. Wykorzystywały one światło do bezpośredniej aktywacji genetycznie i chemicznie modyfikowanych białek lub pośrednio, przez „uwięzione” ligandy. Można jednak z pewnością powiedzieć, że były to pewne prekursorowe metody optogenetyczne. Znacznie bardziej skomplikowane i trudniejsze w realizacji, a także mniej efektywne niż właściwa optogenetyka. Mimo swoich niedoskonałości pokazały jednak, że przy pomocy światła można selektywnie sterować aktywnością wybranej populacji neuronów. Do pierwszych tego typu metod należy metoda chARGE, wykorzystująca geny kodujące fotoreceptor wywilżny karłowatej: *arrestynę-2*, *rodopsynę* i podjednostkę α białka G. Eksprymowaną opsynę należało dodatkowo rekonstruować, dodając do układu całkowity-*trans*-retinal (chromofor), który kowalencyjnie łączy się z tym białkiem i nadaje mu pełną funkcjonalność w absorpcji światła. Eksprymując trzy powyższe geny w szczurzych neuronach hipokampalnych w obecności retinalu można było, z mniejszą lub większą skutecznością, wzbudzać potencjały czynnościowe za pomocą światła (ZEMELMAN i współaut. 2002). Wszystkie powyżej opisane metody transformacji genetycznej i kontroli aktywności komórkowej nie pozwalały jednak na skuteczną, efektywną i czasowo-specyficzną kontrolę potencjałów czynnościowych w komórkach nerwowych.

Dopiero w 2003 r., przy wykorzystaniu receptora waniloidowego (ang. vanilloid re-

ceptor, TRPV1) wraz z technologią „uwięzionych” ligandów, rzeczywiście możliwe stało się stosunkowo precyzyjne sterowanie aktywnością komórek nerwowych. Receptor waniloidowy jest nieselektywnym kanałem kationowym, który normalnie występuje w neuronach nocycyptywnych (receptorach bólowych) obwodowego układu nerwowego. W obecności swojego ligandu, kapsaicyny, receptor ten powoduje depolaryzację błony komórkowej. Eksprymując ten receptor w szczurzych neuronach hipokampalnych i jednocześnie stosując „uwięzioną” kapsaicynę, potwierdzono skuteczność tego rozwiązania (ZEMELMAN i współaut. 2003). Metoda ta (receptor-„uwięziony” ligand) posłużyła m.in. do manipulacji zachowaniem wywilżny i mapowania jej obwodów neuronowych. Badając proste obwody neuronalne odpowiedzialne za stereotypowe zachowania ruchowe tego owada i kontrolując pewne grupy neuronów w jego tułowiu, zaprezentowano lot bezgłowego korpusu muchówki (LIMA i MIESENBOCK 2005).

Następnym, interesującym i kreatywnym podejściem był system SPARK (ang. synthetic photoisomerizable azobenzene-regulated K^+ channels) wykorzystujący do kontroli komórek genetycznie zmodyfikowany kanał potasowy wraz z przyłączonym do niego kowalencyjnie specyficznym związkiem chemicznym (BANGHART i współaut. 2004). Związek ten, pod wpływem fal światła różnej długości, zmieniał swoją konformację i długość cząsteczki. W swojej dłuższej konfiguracji *trans* był zdolny zatykać zewnątrzkomórkową stronę kanału, blokując przepływ jonów potasu. Natomiast po wzbudzeniu światłem ultrafioletowym, cząsteczka zmniejszała swoją długość o ok. 7 angstromów, nie sięgała wylotu kanału i nie blokowała przepływu jonów potasu (BANGHART i współaut. 2004).

Kolejne lata przyniosły powstanie i szybki rozwój metod optogenetycznych do postaci, jaką dzisiaj znamy – wykorzystujących opsyny archebakterii i alg. Jednocześnie z rozwojem tych metod, postępował rozwój chemogenetycznej kontroli komórek nerwowych. W 2005 r. opublikowano metodę MIST (ang. molecules for inactivation of synaptic transmission), pozwalającą zablokować cykl obiegu pęcherzyków synaptycznych i zatrzymać uwalnianie neuroprzekaźników do szczeliny synaptycznej. Metoda ta bazuje na genetycznie zmodyfikowanych białkach synaptycznych, które w obecności właściwych cząsteczek chemicznych dimeryzują (łączą się w pary), w wyniku czego nie mogą dalej pełnić swojej funkcji (KARPOVA i współaut. 2005).

W 2007 r. opisano kolejny system, DRE-ADD (ang. designer receptors exclusively activated by designer drugs), umożliwiają-

cy kontrolę aktywności neuronów za pomocą genetycznie zmodyfikowanych białek GPCR ludzkich receptorów muskarynowych dla acetylocholiny. Receptory te mogą być aktywowane przez specjalnie zaprojektowany, nowy związek chemiczny N-tlenek klozapiny (ang. clozapine-N-oxide, CNO), będąc jednocześnie niewrażliwymi na swój naturalny ligand, acetylocholiny, ani na jej syntetyczną pochodną, karbachol (ARMBRUSTER i współaut. 2007). Jednym z białek wykorzystanym przy konstrukcji nowych receptorów był ludzki muskarynowy receptor acetylocholiny hM4, który działa za pośrednictwem białek G_{γ} na kanały potasowe GIRK, biorące udział w hiperpolaryzacji błony komórki. Dwie punktowe mutacje w wybranych miejscach łańcucha aminokwasowego receptora hM4 pozwoliły na skonstruowanie receptora hM4Di niewrażliwego na acetylocholiny, a reagującego na CNO. Ekspresyjując hM4Di w warunkach *in vitro* w szczyrkach neuronach hipokampalnych i wprowadzając CNO do roztworu można było hiperpolaryzować te komórki o ok. 7 mV. Powyższy stopień hiperpolaryzacji był wystarczający do zablokowania spontanicznych wyładowań tych komórek. Ponadto, receptor hM4Di nie wykazywał aktywności przy braku CNO, a jego ekspresja w komórkach nie zmieniła podstawowych własności elektrofizjologicznych błony neuronalnej (ARMBRUSTER i współaut. 2007).

Genetycznie zmodyfikowane ludzkie receptory muskarynowe dla acetylocholiny wykorzystuje się również do aktywacji komórek nerwowych. Receptor hM3, działający za pośrednictwem białek G_q , posłużył do stworzenia zmutowanego receptora hM3Dq, który, podobnie jak hM4Di, nie reagował na acetylocholiny, a był wrażliwy na CNO (ARMBRUSTER i współaut. 2007). Zmutowane białko posłużyło np. do stworzenia transgenicznej linii myszy, ekspresyjującej hM3Dq w neuronach pobudzających kory, hipokampa i prążkowie (ALEXANDER i współaut. 2009). Dodanie CNO podczas rejestracji elektrofizjologicznych w skrawkach mózgowych pochodzących od myszy ekspresyjujących hM3Dq prowadziło do depolaryzacji neuronów piramidalnych hipokampa o ok. 8 mV, a także zwiększało częstotliwość spontanicznych potencjałów czynnościowych tych komórek. Podanie dootrzewnowe CNO powodowało u myszy zwiększoną lokomocję i wzrost zachowań stereotypowych, utrzymujące się przez 9 godzin po zastrzyku. Rejestracje elektrofizjologiczne za pomocą elektrod wprowadzanych do mózgowi tych myszy pokazały natomiast, że już 5-10 minut po dootrzewnowym podaniu CNO, zwiększa się aktywność neuronów hipokampa (ALEXANDER i współaut. 2009).

Wszystkie powyżej wymienione metody chemogenetyczne, pomimo wielu swoich zalet, nie pozwalają jednak na sterowanie aktywnością neuronów z precyzją milisekundową, jaką można osiągnąć stosując techniki optogenetyczne. Również w metodach chemogenetycznych, odpowiedzi neuronów są niejednorodne w obrębie grupy stymulowanych komórek, jak i w kolejnych powtórzeniach podawania liganda. Metody chemogenetyczne są jednak łatwiejsze i nie wymagają użycia drogich, zaawansowanych technologicznie narzędzi do kontroli pulsów światła. Tam, gdzie nie jest wymagana milisekundowa precyzja w kontroli aktywności neuronów, mogą stanowić optymalne rozwiązanie.

OPSYNY

Wracając do optogenetyki: w 2002 r. Georg Nagel z Instytutu Maxa Plancka wraz ze współpracownikami (NAGEL i współaut. 2002) opublikował doniesienie, w którym przedstawił sekwencję DNA z jednokomórkowej algi *Chlamydomonas reinhardtii*. Sekwencja ta bardzo przypomina DNA kodujące opsyne bakteryjne. Ekspresyjując ten fragment DNA w oocytach płatany szponiastej (*Xenopus laevis*) udowodniono, że rzeczywiście koduje on funkcjonalną opsynę, kanał, który po wzbudzeniu światłem zielonym staje się przepuszczalny dla jonów wodorowych. Opsynę tę opisano skrótem ChR1, a autorzy raportu już wtedy sugerowali możliwość jej wykorzystania w sterowanej światłem manipulacji gradientem elektrycznym w poprzek błony komórkowej. W kolejnym roku zespół Nagela opublikował pracę (NAGEL i współaut. 2003), w której zaprezentowano działanie drugiej opsyne, ChR2 (ang. channelrhodopsin-2), w oocytach płatany szponiastej oraz ludzkich i chomiczych liniach komórkowych. Opsyna ta okazała się być kanałem o bardzo szybkiej kinetyce działania. Kanałem, który po wzbudzeniu światłem niebieskim (450-490 nm), generował stosunkowo duży prąd kationowy i dzięki temu mógł depolaryzować komórki, zwiększając w ten sposób szansę na wywołanie potencjału czynnościowego. Niecałe dwa lata później odkrywcy opsyne ChR2, we współpracy z zespołem Karla Daisseroth'a, opublikowali pierwszą udaną transformację szczyrków neuronów hipokampalnych w hodowli komórkowej za pomocą wektorów lentiwirusowych kodujących nowo opisaną opsynę. Stało się wtedy jasne, że ekspresja tylko tej jednej opsyne jest w zupełności wystarczająca do wywołania potencjałów czynnościowych w stymulowanych światłem komórkach nerwowych. Procedura ta nie wymaga również podawania całkowitego-*trans*-retinalu, ponieważ jak się

okazało, występuje on naturalnie w cytoplazmie komórek układu nerwowego (BOYDEN i współaut. 2005). Ponadto, ekspresja opsyny ChR2 była stabilna przez kilka tygodni po transformacji i nie zmieniała podstawowych parametrów elektrofizjologicznych błony komórkowej. Wskazywało to na brak cytotoxiczności tego białka i świadczyło o tym, że jest ono aktywne jedynie po wzbudzeniu światłem. Kilka miesięcy później została opublikowana praca opisująca wykorzystanie opsyny ChR2 wraz ze szczurzą rodopsyną 4 (ang. rhodopsin 4, RO4) (LI i współaut. 2005). Białko RO4 należy do rodziny rodopsyn kręgowców, które są receptorami GPCR, działającymi postsynaptycznie za pośrednictwem białek $G_{i/o}$ na kanały GIRK hiperpolaryzujące błonę komórki oraz presynaptycznie na kanały wapniowe, blokując napływ jonów wapnia do komórki presynaptycznej. Zmniejszone stężenie jonów wapnia jest czynnikiem hamującym egzocytozę neuroprzekazników. Aktywność RO4 w dwojaki sposób prowadzi więc do hamowania aktywności komórki nerwowej. W pracy tej, przy użyciu technik optogenetycznych udało się po raz pierwszy dokonać dwukierunkowej manipulacji aktywnością komórek nerwowych (aktywacja/hamowanie). Oprócz tego, eksprymując opsynę ChR2 za pomocą elektroporacji w rdzeniu nerwowym kurzych embrionów, udało się w nim zwiększyć częstotliwość spontanicznych, rytmicznych wyładowań. Zwiększenie częstotliwości tych, naturalnie występujących wyładowań w rdzeniu kręgowym kurzego embrionu, prowadziło z kolei do zwiększenia częstotliwości ruchów osiowych samego embrionu *in ovo*. Doświadczenie to było pierwszym przykładem optogenetycznej manipulacji zachowaniem żywego organizmu. W badaniach tych ujawniono jednocześnie, że światło niebieskie wystarczająco skutecznie penetruje owodnię i tkankę samego embrionu, aby uaktywnić opsynę ChR2, co było dobrym prognostykiem dla dalszego wykorzystania tej opsyny w badaniach *in vivo*.

Następnie Nagel we współpracy z naukowcami z Frankfurtu opublikował pracę dowodzącą, że przy wykorzystaniu technik optogenetycznych można manipulować również zachowaniem prostego organizmu modelowego, jakim jest jednodomilimetrowej długości nicien *Caenorhabditis elegans* (NAGEL i współaut. 2005). Eksprymując ulepszoną wersję ChR2 (z mutacją punktową w miejscu 134 aminokwasu – ChR2^{H134R}) w komórkach mięśniowych *C. elegans* można było za pomocą światła wywoływać skurcze mięśni, które prowadziły do kurczenia się tego nicienia i składania przez niego jaj. Nowa ChR2^{H134R} wykazywała większą stabilność w przewodzeniu prądów jonowych w stosun-

ku do pierwotnej, niezmutowanej formy tego białka. Ekspresja opsyny ChR2^{H134R} w mechanoreceptorach tego zwierzęcia pozwalała wywoływać odruch cofania jego głowy, reakcję naturalnie występującą w chwili napotkania przeszkody mechanicznej. Manipulacje zachowaniem nicienia były możliwe jedynie przy diecie wzbogaconej w całkowity-*trans-retinal*.

Kolejne lata przyniosły niebywale szybki rozwój metod optogenetycznych. Wiele grup badawczych z całego świata zaczęło wykorzystywać optogenetykę w badaniach nad układem nerwowym, ponieważ umożliwia ona aktywację lub hamowanie aktywności elektrycznej komórek nerwowych z milisekundową precyzją. Szybki wzrost zainteresowania optogenetyką doprowadził również do szeroko zakrojonych poszukiwań w świecie bakterii, alg i grzybów nowych białek, które miałyby podobną funkcję jak opsyna ChR2. Świat nauki wiedział, że dla dalszego rozwoju optogenetyki niezbędne jest znalezienie lub stworzenie za pomocą narzędzi inżynierii genetycznej nowych receptorów światła. Światłoczułych kanałów, charakteryzujących się różnorodną selektywnością względem jonów, reaktywnością na różne długości fali światła, szybszą kinetyką aktywacji, krótszym czasem inaktywacji, czy większą przewodnością. Początkowo eksperymentowano z poznaną już w 1977 r. halorodopsyną (ang. halorhodopsin, Halo/NpHR), będącą pompą transportującą do wnętrza komórki aniony chloru po wzbudzeniu żółtym światłem (560-590 nm). Białko to pochodzi od archebakterii *Natronomas pharaonis* zasiedlającej środowiska o wysokim stężeniu jonów chlorkowych i umożliwia jej utrzymanie właściwego ciśnienia osmotycznego i zmniejszenie wydatków energetycznych przez pompowanie anionów chloru do wnętrza komórki przeciw gradientowi potencjału elektrycznego błony (HAN i BOYDEN 2007, ZHANG i współaut. 2007). Eksprymując halorodopsynę w szczurzych neuronach hipokampa można było zmniejszać aktywność tych komórek przez hiperpolaryzację ich błony za pomocą żółtego światła. Halorodopsyna okazała się mieć równie szybką kinetykę i czułość jak opsyna ChR2 – 1 ms puls żółtego światła prowadził do hiperpolaryzacji błony komórkowej o kilka miliwoltów i zmniejszał prawdopodobieństwo wywołania potencjału czynnościowego. Jednoczesna ekspresja ChR2 i NpHR pozwoliła po raz pierwszy na dwukierunkową manipulację aktywnością komórek nerwowych z prawdziwie milisekundową kinetyką, znacznie szybciej niż szczurza rodopsyna 4 działająca metabotropowo za pośrednictwem białka G. Halorodopsyna okazała się pięć razy szybsza w aktywacji hi-

perpolaryzującego prądu, 90 razy szybsza w jego deaktywacji po zakończeniu stymulacji światłem i generowała ponad 3,5 razy większą hiperpolaryzację niż szczyrca rodopsyna 4. Komórki posiadające w swojej błonie ChR2 i NpHR można było bez przeszkód na przemian depolaryzować i hiperpolaryzować z częstotliwością 2,5 Hz, przeplatając stymulację niebieskim i żółtym światłem. Dodatkowo, NpHR w komórkach ssaków, tak jak ChR2, nie wymagała wprowadzania do układu dodatkowego kofaktora – całkowitego-*trans*-retinalu (HAN i BOYDEN 2007). Z kolei NpHR eksprymowana wspólnie z ChR2 w mysich neuronach korowych skutecznie blokowała depolaryzację wywołwaną niebieskim światłem. Natomiast eksprymowana w komórkach mięśniowych i cholinergicznym neuronach ruchowych *C. elegans*, po zastygulowaniu żółtym światłem hamowała ruch tego nicienia. Przy jednoczesnej ekspresji ChR2 i NpHR w mięśniach lub neuronach ruchowych, NpHR hamowała kurczenie się zwierzęcia wywołwane stymulacją niebieskim światłem ChR2. Eksperyment ten pokazał, że prąd hamujący generowany przez NpHR skutecznie znosi aktywność ChR2 zarówno w komórkach z hodowli *in vitro*, jak i w żywym zwierzęciu. Jednak NpHR, tak samo jak ChR2, była w pełni funkcjonalna tylko w nicieniach utrzymywanych w środowisku z dodatkiem całkowitego-*trans*-retinalu (ZHANG i współaut. 2007).

Mimo dużej skuteczności NpHR, zarówno w eksperymentach *in vitro* jak i *in vivo*, pewne techniczne ograniczenia nadal pozostały. Niedługo okazało się, że NpHR tworzy agregaty w siateczce śródplazmatycznej, które potencjalnie mogą być cytotoksyczne i dodatkowo są skutkiem ograniczonej ekspresji tego białka w błonie komórki. W tym celu przetestowano kilkanaście sekwencji sygnałowych z N- i C-końców różnych białek wydzielanych przez siateczkę śródplazmatyczną i transportowanych do błony komórki. Dodając aminokwasy sekwencji sygnałowej C-końca białka Kv1.4, będącego kanałem błonowym, i N-końca podjednostki β receptora nikotynowego acetylocholinylu do pierwotnego białka halorodopsyny, można było całkowicie wyeliminować agregację tej opsyiny w siateczce śródplazmatycznej (GRADINARU i współaut. 2008). Ta ulepszona forma NpHR dostała dwie równoprawne nazwy: eNpHR i eNpHR2.0 (ang. enhanced NpHR). Nowa opsyina, w stosunku do swojej wyjściowej formy, była w stanie generować niemal dwukrotnie większy prąd transbłonowy w neuronach hipokampalnych hodowli komórkowej. Dodatkowo, podstawowy opór elektryczny błony nie różnił się pomiędzy komórkami z NpHR i eNpHR2.0. Podobnie jednak jak wie-

le naturalnych form hamowania komórek nerwowych, również hamowanie optogenetyczne może zostać przełamane przez bardzo silną aktywność pobudzającą. Aby rozwiązać ten problem i stworzyć opsyinę o jeszcze silniejszej możliwości blokowania aktywności komórek nerwowych podejmowano próby z wykorzystaniem różnych sekwencji sygnałowych z N- i C-końca dwóch wewnątrzprzewodniczących kanałów potasowych (ang. inwardly-rectifying potassium channels, IRKs): Kir2.1 i Kir2.4. Dodając sekwencję sygnałową odpowiedzialną za kierowanie nowopowstałego białka do błony cytoplazmatycznej z C-końca białka Kir2.1 do eNpHR można było ulepszyć ekspresję tej opsyiny w błonie komórkowej, zwłaszcza w neurytach. Ta ulepszona forma halorodopsyny, nazwana eNpHR3.0, generowała 20 razy większy prąd hiperpolaryzujący w porównaniu ze swoją wyjściową, natywną formą NpHR (GRADINARU i współaut. 2010). Prąd generowany przez eNpHR3.0 może zmienić potencjał błonowy nawet o 100 mV. Dzięki tak dużej przewodności tej pompy osiągalne stało się wykorzystanie słabszego, czerwonego spektrum jej aktywacji (630-680 nm). Pozwoliło to na bardziej selektywną aktywację i hamowanie komórek zawierających jednocześnie aktywującą i hamującą opsyinę, odpowiednio ChR2 i eNpHR3.0.

Jednocześnie poszukiwano innych opsyn, podobnych do ChR2, ale z innym widmem absorpcji. Na początku 2008 r. opisano pierwszą opsyinę pochodzącą od *Volvox carteri*, algi tworzącej półmilimetrowej średnicy sferyczne kolonie składające się z kilku tysięcy komórek. Ta nowa opsyina, nazwana *Volvox channelrhodopsin* (VChR), wykazywała funkcjonalne podobieństwo do wcześniej opisanych dwóch rodopsyn *C. reinhardtii*, z większym podobieństwem do ChR2 (ERNST i współaut. 2008). VChR jest podobna do ChR2 zarówno pod względem widma absorpcji, jak i dynamiki kinetycznej, przez co nie była obiecującym kandydatem do dalszych testów. W tym samym jednak roku udało się zidentyfikować inną opsyinę pochodzącą od *V. carteri*, *Volvox channelrhodopsin 1* (VChR1). VChR1 była bardziej podobna do ChR1, a chociaż jej maksymalna absorpcja przypadała również w świetle zielonym, całe widmo pochłaniania było przesunięte bardziej w stronę czerwieni (ZHANG i współaut. 2008). Co ciekawe, za przesunięcie absorpcji widma VChR1 w stosunku do ChR1 i ChR2 odpowiedzialne są trzy substytucje aminokwasowe względem ich łańcuchów, w rejonie wiążącym pierścień węglowy retinalu i jedna substytucja względem łańcucha peptydowego ChR2 w rejonie oddziaływującym z atomem azotu ugrupowania iminowego, w miejscu

kowalencyjnego wiązania retinalu z opsyną. To powoduje zmianę rozkładu ładunku w cząsteczce retinalu i zwiększenie jej polarności, czego następstwem jest absorpcja fotonów o mniejszej energii w widmie zielono-żółtym (~535 nm). VChR1 nie różni się pod względem selektywności w stosunku do ChR2 (głównie przepuszcza Na⁺, ale też H⁺, K⁺ i Ca²⁺), nie zmienia podstawowych właściwości elektrofizjologicznych błony, wykazuje podobną lokalizację przestrzenną w komórce i również nie wymaga dodatkowej suplementacji całkowitym-*trans*-retinalem w neuronach ssaków (ZHANG i współaut. 2008). VChR1 posiada jednak dużo wolniejszą kinetykę dezaktywacji w stosunku do ChR2; czas ten przy badanej długości światła 531 nm dla obydwu białek wynosi odpowiednio 133 i 12 ms. Dobierając fale odpowiedniej długości (406 nm dla ChR2 i 589 nm dla VChR1) i intensywność światła można było w warunkach *in vitro* selektywnie wywoływać potencjały czynnościowe w komórkach z VChR1, nie stymulując w tym samym czasie komórek z ChR2, ponieważ światło o długości fali 589 nm nie aktywuje ChR2. Niestety stymulacja ChR2 światłem o długości fali 406 nm również w niewielkim stopniu wzbudzała potencjały czynnościowe w komórkach z VChR1, ze względu na częściową absorpcję światła niebieskiego przez VChR1.

Oprócz szeroko zakrojonych poszukiwań nowych opsyn, starano się również ulepszyć już te poznane. Przykładem tego drugiego podejścia może być udoskonalona forma ChR2 z substytucją jednego aminokwasu: ChR2^{E123T}, w skrócie ChETA (GUNAYDIN i współaut. 2010). Ta ulepszona opsyna wykazuje znacznie szybszą kinetykę dezaktywacji wynoszącą 5.2 ms w stosunku do 9.8 ms dla wyjściowej formy ChR2. Dzięki tej zmianie realna stała się optogenetyczna stymulacja komórek nerwowych z częstotliwością sięgającą nawet 200 Hz, znacznie przekraczająca dotychczasową barierę 40 Hz dla natywnej formy tego białka. ChETA umożliwiła efektywniejszą stymulację neuronów o bardzo wysokiej, naturalnej częstotliwości, np. szybko wyładowujących się interneuronów (ang. fast-spiking). Również przy niższych częstotliwościach stymulacji, ChETA okazała się być bardziej niezawodna niż ChR2. Nie powodowała artefaktów stymulacji w postaci dodatkowych, niezamierzonych potencjałów czynnościowych, czy przedłużonej repolaryzacji po ciągu wyładowań czynnościowych.

Równocześnie nie ustawały poszukiwania naturalnych opsyn o zdolnościach hamujących aktywność neuronów. Poszukiwania w świecie bakterii, archebakterii, grzybów i roślin doprowadziły do wyselekcjonowania

kilku potencjalnych kandydatów, wśród których dwie pompy protonowe okazały się być bardzo przydatnymi, nowymi narzędziami optogenetyki. Opsynami tymi były: archaerhodopsin-3 (Arch) z archebakterii *Haloerubrum sodomense*, o maksymalnej absorpcji światła zielono-żółtego (525-600 nm) i białko Mac/LR/Ops z grzyba *Leptosphaeria maculans*, o maksymalnej absorpcji również w widmie zielono-żółtym (510-570 nm) (CHOW i współaut. 2010). Arch okazała się być pompą o pierwszorzędnej kinetyce aktywacji i czasie regeneracji. W neuronalnych hodowlach komórkowych opsyna ta generowała prąd o natężeniu 900pA i hiperpolarizowała błonę neuronów aż o 76mV. Ponadto wykazywała dobrą ekspresję zarówno w błonie ciała komórki, jak i neurytów, nie zmieniając przy tym jej podstawowych parametrów elektrycznych. Aktywacja Arch nie powodowała większych zmian pH cytoplazmy, od tych obserwowanych w trakcie naturalnej aktywności komórek nerwowych. Ponadto, elektrofizjologiczne pomiary w warunkach *in vitro* neuronów eksprymujących Arch lub eNpHR wykazały, że pierwsza z nich znacznie silniej hamuje aktywność komórkową. Arch eksprymowana za pomocą wektorów lentiwirusowych w korze mózgowej myszy hamowała 90% całkowitej aktywności neuronów w badanym obszarze mózgu. Dodatkowo, nawet jednodominutowa, nieprzerwana stymulacja Arch nie powodowała zmian w podstawowym poziomie aktywności sieci nerwowej po zakończeniu stymulacji. Z kolei eksperymenty *in vitro* z wykorzystaniem pompy protonowej Mac i pompy chlorowej Halo pozwoliły na dobranie długości fal światła stymulujących selektywnie każdą z tych opsyn, odpowiednio 470 nm i 630 nm. Od tego momentu teoretycznie możliwe stało się jednoczesne, selektywne hamowanie dwóch odrębnych populacji neuronów w mózgu (CHOW i współaut. 2010).

Bardzo dobra kinetyka jaką charakteryzowała się Arch skłoniła naukowców do przeprowadzenia szczegółowych poszukiwań opsyn w rodzaju *Haloerubrum*. W tym celu przetestowano kilka opsyn podobnych sekwencją pompie Arch. Testowane opsyny należały do różnych gatunków i szczepów rodzaju *Haloerubrum* pochodzących z Tybetu, Australii i innych rejonów świata (HAN i współaut. 2011). Jedna z testowanych opsyn wykazywała niespotykaną wcześniej wrażliwość na stymulację światłem. Przy naświetlaniu światłem o długości fali ok. 575 nm i niewielkiej mocy (7,8 mW/mm²) generowała ona znacznie większy transbłonowy prąd hiperpolaryzujący neurony niż jakakolwiek wcześniej poznana opsyna. Ta nowo odkryta pompa protonowa pochodziła ze szczepu

TP009 *Halorubrum* sp. i została nazwana ArchT. Różni się ona w sekwencji aminokwasowej od Arch w kilku miejscach, ale posiada identyczne spektrum absorpcji światła, kinetykę działania i generuje podobny maksymalny prąd transbłonowy (900 pA). ArchT jest jednak ponad trzy razy bardziej czuła na światło niż Arch. Czułość ta manifestuje się głównie w zakresie stymulacji świetlnej o mocy 1-10 mW/mm². Matematyczne modele szacują, że dzięki tak zwiększonej czułości ArchT, możliwe jest hamowanie, za pomocą pojedynczego światłowodu, ponad dwukrotnie większej objętości tkanki mózgowej w stosunku do Arch. Aby to potwierdzić, podano lentiwirusy kodujące ArchT do kory makaków królewskich (*Macaca mulatta*). Wyniki badań pokazały, że ArchT wykazuje dobrą ekspresję w neuronach korowych, a same komórki w preparatach histologicznych nie przejawiają patologii. Badania elektrofizjologiczne pokazały dodatkowo, że ArchT skutecznie hamuje komórki kory w żywym, świadomym zwierzęciu. W trakcie eksperymentu zarejestrowano 74 pojedyncze komórki; u 45-ciu z nich świetlna stymulacja ArchT prowadziła do obniżenia ich częstotliwości wyładowań o 80-100%. Pozytywny wynik powyższych doświadczeń sygnalizuje potencjalne możliwości w wykorzystaniu optogenetyki w badaniach klinicznych i zastąpienia tą metodą np. terapii z użyciem głębokiej stymulacji mózgu (ang. deep brain stimulation, DBS), stosowanej najczęściej w leczeniu parkinsonizmu, ale czasem także w ostrych i opornych na leczenie farmakologiczne zaburzeniach obsesyjno-kompulsyjnych i depresjach (HAN i współaut. 2011).

Oprócz opsyn pochodzących od prostych organizmów, jak algi czy archebakterie, starano się również wykorzystać opsyny młodsze ewolucyjnie, np. pochodzące od ssaków rodopsyny będące receptorami GPCR, jak wcześniej wspomniana szczurza rodopsyna 4. Precyzyjna stymulacja światłem opsyn, będących receptorami działającymi za pośrednictwem różnych białek G i oddziałujących na rozmaitego typu szlaki sygnałowe, wydawała się kuszącym konceptem. Tak zrodziła się technika optoXR. Polega ona na podstawieniu wewnątrzkomórkowych fragmentów 7-transbłonowych pętli rodopsyny wraz z jej C-końcem analogicznymi sekwencjami aminokwasowymi pochodzącymi z receptorów GPCR nie będących opsynami (AIRAN i współaut. 2009). W ten sposób udało się stworzyć hybrydy białkowe, w których część receptorową jednego peptydu (rodopsyny) łączono z częścią efektorową peptydów wiążących różne białka G. Tak skonstruowano dwie hybrydy bydlecej rodopsyny (normalnie działającej za pośrednictwem

białka G_q): pierwszą z ludzkim receptorem adrenergicznym α_1 sprzężonym z białkiem G_q i drugą, z chomiczym receptorem adrenergicznym β_2 sprzężonym z białkiem G_s. Stymulacja zielonym światłem tych receptorów w hodowli komórkowej ludzkich embrionalnych komórek nerek (ang. human embryonic kidney cells, HEK cells), prowadziła do wzrostu stężenia w tych komórkach (odpowiednich względem białka G) wtórnych przekazników sygnałowych lub produktów ich rozpadu: Ca²⁺, cAMP czy IP₁ (monofosforan inozytolu). Również po wystawieniu na 10-cio minutową stymulację świetlną skrawków mózgowych pochodzących od myszy, którym do mózgow podano wektory lentiwirusowe kodujące receptory optoXR, zaobserwowano w tkance wzrost przekazywności szlak sygnałowy cAMP i Ca²⁺ – ufosforylowanej formy czynnika transkrypcyjnego CREB. Ponadto, eksprymując te receptory w jądrze półleżącym myszy, można było za pomocą światłowodu wprowadzonego do mózgu regulować aktywność neuronów tej struktury. Jądro półleżące jest częścią układu nagrody w mózgu, motywującym zachowanie zwierząt. Podając do tej struktury wektor kodujący receptor optoXR złożony z ludzkiego receptora adrenergicznego α_1 udało się zrealizować optogenetyczne warunkowanie preferencji miejsca u myszy (AIRAN i współaut. 2009). Było to możliwe przez optyczną stymulację komórek jądra półleżącego zawsze wtedy, gdy zwierzę znajdowało się w wybranej części klatki.

NIE TYLKO OPSYNY

Wraz z rozwojem molekularnym optogenetyki, rozwijały się również jej techniczne aspekty dotyczące metod dostarczania światła do/z mózgu (kontroli impulsów światła, jednoczesnej stymulacji oraz podglądu aktywności w okolicy sondy) i pomiaru aktywności elektrycznej komórek. Jednocześnie pracowano nad stworzeniem nowych metod filtrowania, obróbki i matematycznej analizy otrzymanego sygnału. W 2007 r., niecałe dwa lata od chwili udanej próby stymulacji komórek nerwowych za pomocą ChR2, zespół Karla Daisseroth'a opublikował pierwsze techniczne rozwiązanie dostarczenia światła do mózgu żywego ssaka, pierwszy „optyczny interfejs neuronalny” (ang. optical neural interface, ONI) (ARAVANIS i współaut. 2007). Autorzy poddali szczura kraniotomii – wywiercili milimetrowej średnicy otwór w jego czaszce i wprowadzili przezeń metalową kaniulę do pierwszorzędowej kory ruchowej wibrys. Kaniula ta najpierw posłużyła do podania wektora lentiwirusowego kodującego ChR2 (pod promotorem kinazy II α zależnej

od Ca^{2+} , umożliwiającej ekspresję tylko w pobudzających neuronach kory), a następnie do wprowadzenia światłowodu o średnicy ok. 200 μm . Światłowód był podłączony do lasera generującego światło o długości fali 473 nm. Dwa tygodnie po operacji unieruchamiano i podłączano zwierzę do aparatury eksperymentalnej. Stymulując komórki kory ruchowej 20 sekundowymi pulsami niebieskiego światła Aravanisowi i jego współpracownikom udało się wywoływać ruchy wąsów. Powyższy eksperyment z powodzeniem został powtórzony również na myszach. Od tego momentu stała się możliwa optogenetyczna manipulacja aktywnością neuronów w żywych, przytomnych ssakach. Eksperyment ten udowodnił również, że światło dostarczone do mózgu nie tylko aktywuje neurony z ChR2, ale także transsynaptycznie rekrutuje dalsze neurony ścieżki ruchowej, w tym przypadku, nerw wzgórzowy, a dalej nerw czaszkowy, który unerwia mięśnie odpowiedzialne za ruch wibrys.

W kolejnym eksperymencie z wykorzystaniem ONI udało się manipulować aktywnością komórek oreksynowych (hipokretynowych) w mysim podwzgórzu (ADAMANTIDIS i współaut. 2007). Komórki wytwarzające neuropeptyd oreksynę biorą udział w regulacji stanu pobudzenia, a utrata ich funkcji związana jest z narkolepsją. Aby kontrolować wybiórczo aktywność komórek oreksynowych podano myszom do podwzgórza wektor lentivirusowy kodujący ChR2 pod promotorem genu oreksyny. Pobudzając komórki oreksynowe za pomocą pulsów światła o częstotliwości 5-30 Hz lub światłem ciągłym, można było zmniejszać czas wybudzania się myszy z fazy snu wolnofalowego lub z fazy snu REM (ang. rapid eye movement) w trakcie pojedynczego cyklu snu trwającego normalnie u myszy ok. 2-3 minut. Podczas tego eksperymentu, gryzonie nie były unieruchamiane i mogły się w miarę swobodnie poruszać po klatce – miały przytwierdzone do głowy światłowód i kable odprowadzające sygnał z elektrod EEG (elektroencefalografia) i EMG (elektromiografia). Eksperyment ten był pierwszym, w którym optogenetycznie kontrolowano zachowanie swobodnie poruszających się ssaków. Doświadczenie to udowodniło również zależność pomiędzy częstotliwością aktywności komórek nerwowych a zachowaniem zwierzęcia, gdyż stymulacja komórek oreksynowych o częstotliwości 1 Hz nie skracała czasu wybudzania się myszy.

Niedługo po powstaniu ONI zaczęto integrować światłowody do stymulacji światłem z elektrodami rejestrującymi aktywność elektryczną manipulowanych komórek. Przydatność tego systemu została ugruntowana w badaniach nad parkinsonizmem. Jedną z

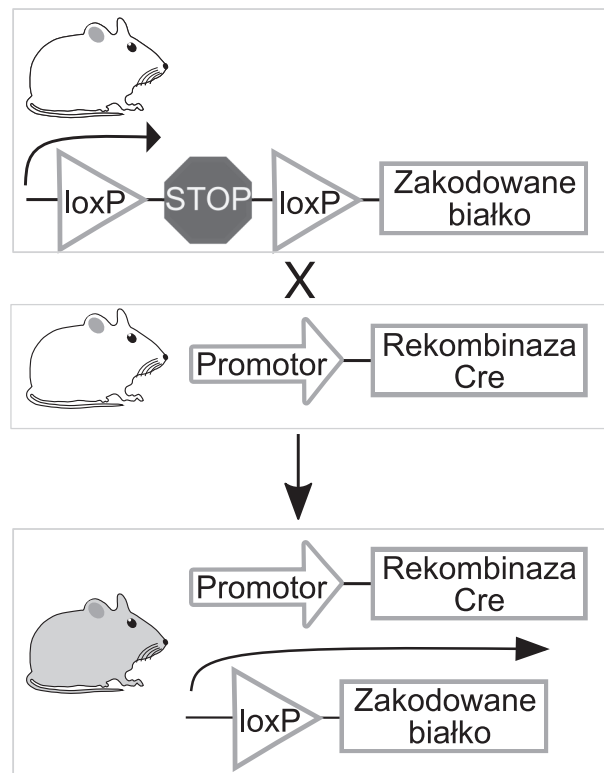
metod leczenia parkinsonizmu jest głęboka stymulacja mózgu, polegająca na elektrycznej stymulacji jądra niskowzgórzowego lub gałki bladej przyśrodkowej za pomocą elektrody wprowadzonej na stałe do mózgu pacjenta (OKUN 2012). Metoda ta jest obecnie szeroko stosowana, przynosząc dziesiątkom tysięcy osób na całym świecie poprawę stanu zdrowia. Jednak nie wszyscy pacjenci dobrze reagują na DBS. Sam mechanizm stojący za pozytywnym skutkiem tej metody leczenia nie jest w pełni poznany. Z tego względu nieustannie prowadzone są prace mające na celu zidentyfikowanie tych obwodów i struktur w mózgu, których aktywność jest zmieniona w chorobie Parkinsona. Optogenetyczna manipulacja, wspólnie z jednoczesną rejestracją elektryczną stymulowanego miejsca, stanowi cenne narzędzie w badaniach na modelach zwierzęcych. Przy wykorzystaniu tego systemu udało się odkryć, że to stymulacja włókien, które unerwiają jądro niskowzgórzowe, a nie stymulacja komórek tej struktury jest prawdopodobnie odpowiedzialna za pozytywny efekt DBS u myszy. Co więcej, optogenetyczna stymulacja o częstotliwości 130 Hz warstwy V pierwszorzędowej kory ruchowej, która wysyła projekcje do jądra niskowzgórzowego, pozwoliła na znaczne zmniejszenie objawów chemicznie wywołanego parkinsonizmu u myszy (GRADINARU i współaut. 2009).

Równocześnie z próbami technicznymi metod dostarczania światła do mózgu, szły starania w kierunku stworzenia transgenicznych linii myszy, które ekspresywałyby różne opsyny w określonej populacji neuronów. Początkowo starania te zaowocowały powstaniem kilku genetycznie zmodyfikowanych linii myszy (*Thy1-ChR2-YFP*), które ekspresywały ChR2 skoniugowaną z białkiem żółtej fluorescencji (ang. yellow fluorescent protein, YFP) pod promotorem *Thy1* (WANG i współaut. 2007). Każda z tych linii miała wyznakowane markerem YFP różne typy komórek, w różnych strukturach mózgu; promotor *Thy1* nie umożliwia ekspresji w ściśle ograniczonej, wybranej populacji neuronów. ChR2 w neuronach tych transgenicznych myszy wykazywała dobrą, silną ekspresję w błonie cytoplazmatycznej i umożliwiała skuteczną stymulację komórek z częstotliwością sięgającą 30 Hz. Rejestrując aktywność elektrofizjologiczną pojedynczych komórek w mysich skrawkach mózgowych i stosując jednocześnie laserową stymulację punktową różnych miejsc tego skrawka udało się zmapować wejścia synaptyczne do komórek piramidalnych i interneuronów w V i VI warstwie mysiej kory. Użyteczność myszy *Thy1-ChR2-YFP* została również wykazana w doświadczeniach *in vivo*. Linia ta posłuży-

ła do badania połączeń nerwowych między opuszkami węchowymi a korą gruszkowatą, odpowiedzialną za przetwarzanie bodźców węchowych w mózgu (ARENKIEL i współaut. 2007). Rejestrując wyładowania jednej z komórek kory gruszkowatej i jednocześnie stymulując światłem powierzchnię opuszki węchowej możliwe było pośrednie zbadanie siły połączeń pomiędzy komórkami mitralnymi znajdującymi się w opuszcze węchowej a komórkami kory gruszkowatej. Stymulacja światłem większej powierzchni opuszki węchowej (czyli większej liczby komórek mitralnych) była niezbędna do wzrostu częstotliwości wyładowań potencjałów czynnościowych w komórce kory gruszkowatej.

Nieco później powstała pierwsza linia myszy eksprymujących hamującą opsynę w neuronach mózgu, *Thy1-NpHR-YFP* (ZHAO i współaut. 2008). Aktywność komórek eksprymujących NpHR można było hamować za pomocą żółtego światła tak, jak aktywność komórek transfekowanych wirusem we wcześniejszych eksperymentach przeprowadzanych na hodowlach komórkowych. Niestety neurony zawierające opsynę u tej linii ujawniały takie same wewnątrz-cytoplazmatyczne agregaty białka NpHR, jak komórki w hodowli czy w mózgu myszy poddanych transfekcji wirusem kodującym tę opsynę.

Aby kontrolować wybrane populacje specyficznych grup komórek posiłkowano się również mysimi liniami Cre (ang. causes recombination) wraz ze specjalnie zaprojektowanymi wektorami adenowirusowymi. Mysie linie Cre bazują na systemie Cre-*loxP* (Ryc. 1) który służy do rekombinacji DNA ssaków i innych zwierząt. System ten ma wiele wariantów. Jeden z najczęstszych, składa się z dwóch niezależnie działających elementów. Pierwszym z nich jest rekombinaza Cre pochodząca od bakteriofaga P1. DNA kodujące ten enzym wraz z wybranym promotorem wprowadza się metodami inżynierii genetycznej do linii komórkowej lub linii zwierzęcej. Drugim elementem systemu jest fragment DNA składający się z promotora, kodonu stop oflankowanego z obydwu stron przez krótkie, liczące 34 pary zasad, motywy *loxP* i na końcu, z właściwego genu. Ten drugi element jest wprowadzany do wektorów wirusowych lub do drugiej linii zwierzęcej. Rekombinaza Cre rozpoznaje motywy *loxP* i wycina oflankowany przez nie fragment DNA (SAUER 1998). W ten sposób krzyżując np. homozygotyczną linię myszy PV-Cre, której wszystkie komórki parwalbuminowe eksprymują rekombinazę Cre, z drugą homozygotyczną linią myszy Ai32, w której genomie znajduje się sekwencja DNA z promotorem, kodonem stop oflankowanym motywami *loxP* i genem kodującym białko



Ryc. 1. Schemat działania systemu Cre-*loxP* u myszy. (Szczegółowy opis w tekście.)

ChR2-EYFP (ang. enhanced YFP), otrzymujemy potomstwo eksprymujące białko ChR2-EYFP we wszystkich komórkach parwalbuminowych. Obecnie dostępne są dziesiątki mysich linii, które eksprymują rekombinazę Cre pod różnymi promotorami oraz wiele linii, które mają wprowadzone do genomu fragmenty DNA, których ekspresja zależna jest od rekombinazy Cre (Mouse Mutant Resource, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. World Wide Web <https://www.jax.org/research-and-faculty/resources/cre-repository/characterized-cre-lines-jax-cre-resource> (2019.11.11).)

W początkowych latach istnienia optogenetyki nie było oczywiście żadnych dostępnych linii myszy posiadających DNA kodujące opsyny, których ekspresja zależna byłaby od obecności białka Cre w komórkach. Takie linie należało dopiero stworzyć. Z uwagi na fakt, że jest to przedsięwzięcie bardzo pracochłonne, drogie i nie zawsze kończące się pełnym sukcesem, początkowo korzystano z wektorów wirusowych zależnych od Cre rekombinazy, których produkcja jest znacznie prostsza i szybsza. Wektory takie bazują również na systemie Cre-*loxP* i kodują geny, których ekspresja ujawnia się tylko w komórkach eksprymujących białko Cre. Dzięki tej technice stworzono pierwsze

wektory adenowirusowe kodujące ChR2, której ekspresja zależna jest od obecności enzymu rekombinazy w komórce. Na przykład, podając takie wirusy do kory myszy eksprymującej rekombinazę Cre pod promotorem parwalbuminy, można było doprowadzić do zlokalizowanej (w rejonie podania wirusa) ekspresji ChR2 tylko w neuronach parwalbuminowych (KUHLMAN i HUANG 2008).

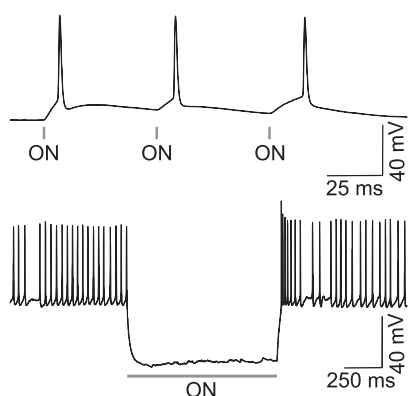
Jednym z pierwszych przykładów zastosowania adenowirusa kodującego ChR2, której ekspresja zależy od obecności rekombinazy Cre, jest doświadczenie badające połączenia pomiędzy dwoma jądrami podwzgórza. Wirus ten został podany myszom dwóch różnych linii: Pomc-Cre i Agrp-Cre (ATASOY i współaut. 2008). Myszy tych linii eksprymują rekombinazę Cre pod promotorami genów Pomc i Agrp, których ekspresja charakterystyczna jest dla dwóch różnych populacji komórek GABAergicznym w jądrze łukowatym podwzgórza. Obydwie populacje komórek wysyłają projekcje do jądra przykomorowego podwzgórza, natomiast pełnią przeciwstawną funkcję. Komórki Pomc są odpowiedzialne za hamowanie pobierania pokarmu, natomiast komórki Agrp stymulują jego pobieranie. Po podaniu myszom wirusa do jądra łukowatego podwzgórza, przygotowano żywe skrawki mózgowo zawierające jądro przykomorowe i przeprowadzono rejestracje elektrofizjologiczne z jego pojedynczych neuronów. W trakcie rejestracji komórek jądra przykomorowego jednocześnie stymulowano punktowo różne fragmenty skrawka laserem, aby aktywować aksony komórek Pomc lub Agrp. Pozwoliło to na opis map wejść synaptycznych pochodzących od komórek Pomc i Agrp do komórek jądra przykomorowego, a także na zbadanie siły tych połączeń.

Wirusy kodujące DNA, którego ekspresja zależna jest od rekombinazy Cre, pozwalają na zlokalizowaną, specyficzną ekspresję opsyn i innych białek w określonych strukturach mózgu. Wirusy tego typu stanowią często niebywale cenne narzędzie w śledzeniu projekcji nerwowych, aktywności komórek i zmian plastycznych zachodzących podczas rozwoju osobniczego i uczenia się. Czasami jednak w badaniach neurobiologicznych pożądana jest ekspresja, która dotyczy pewnej wybranej populacji komórek w całym mózgu, a nie tylko w jednej, niewielkiej jego strukturze. Kiedy nie zależy nam na zlokalizowanej ekspresji danego białka w mózgu, praca na myszach eksprymujących od urodzenia dane białko w określonym typie komórek w całym mózgu może okazać się łatwiejsza i wygodniejsza. Nie jest wtedy wymagane podawanie wirusa i oczekiwanie na efektywną ekspresję danej opsyny (eksperymentalnie stwierdzono, że taki czas

oczekiwania powinien wynosić od dwóch do trzech tygodni). Również operacje i podawanie wirusów bardzo młodym, np. kilkudniowym zwierzętom jest bardzo trudne, wymaga dużego doświadczenia i wiąże się z wysokim ryzykiem śmierci zwierząt. Dlatego, kiedy w danym doświadczeniu nie jest wymagana zlokalizowana ekspresja transgenów w mózgu, wygodniejsza jest praca ze zwierzętami transgenicznymi, które od urodzenia posiadają ekspresję wybranego genu pod wybranym promotorem. W początkach istnienia optogenetyki takie rozwiązanie było bardzo ograniczone. Istniało tylko kilka mysich linii transgenicznych eksprymujących opsyny i ekspresja ta nie zależała od rekombinazy Cre. Ograniczało to w stosunkowo dużym stopniu wykorzystanie tych linii w badaniach nad układem nerwowym. Dopiero rok 2012 przyniósł prawdziwą rewolucję w wykorzystaniu optogenetycznych narzędzi kontroli aktywności komórek nerwowych. Wtedy to powstały linie myszy eksprymujących zależnie od obecności rekombinazy opsyny: ChR2, eNpHR3.0 i Arch (MADISEN i współaut. 2012). Linie te można krzyżować dowolnie z dziesiątkami już dostępnych mysich linii Cre. To umożliwia ekspresję tych trzech opsyn w szerokiej gamie komórek w całym organizmie. Linie myszy transgenicznych zostały udostępnione światowej społeczności naukowej (np. depozytorium The Jackson Laboratory), co zaowocowało niebywałym przyspieszeniem badań neurobiologicznych i rozpowszechniło wykorzystanie samej optogenetyki (por. wzrost liczby prac publikowanych każdego roku poświęconych rozwojowi optogenetyki; DEISSEROTH 2015).

Dzięki powszechnej dostępności, powyższe linie transgeniczne są obecnie wykorzystywane w setkach laboratoriów na całym świecie, w pracy nad tysiącami różnego typu badań poświęconych układowi nerwowemu. Również w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN wykorzystujemy w swojej codziennej pracy transgeniczne linie myszy, których DNA koduje opsyny zależne od rekombinazy Cre (Ryc. 2).

Stymulację optogenetyczną łączy się nie tylko z technikami elektrofizjologicznymi, ale także z metodami obrazowania fluorescencyjnego. Połączenie stymulacji optogenetycznej z obrazowaniem przy pomocy genetycznie kodowanych sond wapniowych (ang. genetically encoded calcium indicators, GECIs) i mikroskopią dwufotonową przyniosło niespotykane wcześniej możliwości badania aktywności całych populacji komórek w mózgu. GECIs są to specjalnie zaprojektowane białka posiadające część fluorescencyjną i część umożliwiającą wiązanie jonów wapnia. Związanie wapnia powoduje zmiany konforma-



Ryc. 2. Rejestracja aktywności elektrofizjologicznej pojedynczych neuronów korowych w skrawkach mózgowych uzyskanych z myszy eksprymujących opsyny: aktywująca – ChR2 (góra) lub hamująca – Arch (dół). Stymulacja ChR2 światłem niebieskim (szare pionowe prążki, ON, czas trwania stymulacji 0,5 ms) wywołuje potencjały czynnościowe, natomiast stymulacja Arch światłem żółtym (szary poziomy prążek, ON, 1s) hiperpolaryzuje błonę neuronu i zahamowuje spontanicznie pojawiające się potencjały czynnościowe. Rejestracje wykonane w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN.

cyjne wpływające na właściwości fluorescencyjne całego białka, co pozwala rejestrować sygnały wapniowe w postaci światła fluorescencyjnego (GAZDA i współaut. 2017). Jony wapnia są ważnym, wtórnym przekaźnikiem sygnałów komórkowych. W czasie trwania potencjałów czynnościowych, jak i potencjałów synaptycznych jony wapnia dostają się do wnętrza komórki. Steżenie wolnych jonów wapnia w cytoplazmie komórkowej może być więc wykorzystane jako wskaźnik liczby potencjałów czynnościowych, częstotliwości wyładowań czy względnej liczby wejść synaptycznych (YASUDA i współaut. 2004). Połączenie optogenetyki, mikroskopii dwufotonowej i GECIs umożliwiło po raz pierwszy manipulację działaniem pojedynczego neuronu, z jednoczesnym obrazowaniem aktywności kilkudziesięciu komórek nerwowych, w przytomnym zwierzęciu, wykonującym wyuczone zadanie (RICKGAUER i współaut. 2014). W tym celu, transgenicznym myszom eksprymującym wskaźnik wapnia GCaMP3 podano do pola CA1 hipokampa wirus kodujący opsynę C1V1. Opsyna C1V1 jest chimerą opsyny ChR1 i VChR1 specjalnie zaprojektowaną tak, aby mogła być wykorzystywana w mikroskopii dwufotonowej – jej maksymalna absorpcja przypada na światło podczerwone o długości fali ok. 1040 nm (PRAKASH i współaut 2012). Jednak, aby rozdzielić jak najlepiej sygnał stymulacji i odczytu, C1V1 była wzbudzana falą o długości 1064 nm, a sonda wapniowa falą o długości 920 nm (RICKGAUER i współaut. 2014). Podczas ope-

racji podawania wirusa, montowano również specjalne przezroczyste okno w czaszce myszy, aby można było później obrazować komórki hipokampa. Następnie głowę myszy mocowano do aparatury doświadczalnej tak, aby jej łapki dotykały bieżni. Przed jej pyszczkiem znajdował się ekran wyświetlający wirtualny, liniowy labirynt, na którego końcu mysz dostawała nagrodę w postaci kropli wody. W trakcie wykonywania zadania obrazowano aktywność komórek piramidalnych hipokampa, które pełnią funkcje tzw. komórek miejsca (ang. place cells). Komórki te kodują pamięć przestrzenną w mózgu; ich wyładowania ściśle korelują z miejscem w przestrzeni, w którym zwierzę aktualnie przebywa. Kiedy zmapowano już takie „pola recepcyjne” każdej z obrazowanych komórek, zaczęto stymulować jedną z nich (1064 nm), jednocześnie obrazując (920 nm) aktywność wszystkich komórek piramidalnych w polu widzenia. Okazało się, że stymulacja komórki w obszarze labiryntu poprzedzającym miejsce, w którym się ona naturalnie wyładowuje, prowadzi do osłabienia lub nawet braku aktywności tej komórki w jej naturalnym polu recepcyjnym. Dodatkowo, manipulacja ta wpływała w podobny sposób również na niewielką część innych, nie stymulowanych neuronów. Doświadczenie to pokazało, że możliwe jest skuteczne manipulowanie pojedynczą komórką nerwową w przytomnym zwierzęciu wykonującym zadanie behawioralne. Ponadto sugeruje ono, że interakcje pomiędzy komórkami miejsca w lokalnej sieci mogą mieć funkcjonalne znaczenie w kształtowaniu ich pól recepcyjnych. Chociaż połączenie GECIs i optogenetyki daje olbrzymie możliwości w badaniu sieci nerwowych mózgu, to niestety kinetyka tych wskaźników jest za wolna, aby rzetelnie odzwierciedlać pojedyncze potencjały czynnościowe *in vivo*. Wykorzystanie GECIs w doświadczeniach *in vivo* nie umożliwia precyzyjnego badania właściwości pojedynczych potencjałów czynnościowych i rejestracji ciągu wyładowań w szybko wyładowujących się interneuronach parwalbumionowych. Nie jest możliwe także badanie podprogowej i dendrytycznej aktywności elektrycznej w komórkach nerwowych *in vivo*, ze względu na nieczułość sensorów wapniowych na hiperpolaryzację i zakłócający rejestrację napływ jonów wapnia przez synapsy.

Wyższe problemy mogą być częściowo rozwiązane przez użycie genetycznie kodowanych sond napięcia (ang. genetically encoded voltage indicators, GEVIs), które mają szybszą kinetykę i znacznie większą czułość niż sondy wapniowe. GEVIs w warunkach *in vitro* umożliwiają badanie pojedynczych potencjałów czynnościowych i aktywności pod-

progowej komórek nerwowych. Sondy te są genetycznie zaprojektowanymi białkami posiadającymi domenę wrażliwą na zmiany napięcia (ang. voltage-sensitive domain) i część będącą fluoroforem. Badania na wywilznach i myszach *in vivo*, z jednoczesną rejestracją optyczną i elektrofizjologiczną wykazały, że fluorescencyjny sygnał nowych GEVIs perfekcyjnie pokrywa się z sygnałem elektrycznym. W rejestracjach tych, sygnał fluorescencyjny odzwierciedlający pojedyncze potencjały czynnościowe był opóźniony względem elektrycznego tylko o 0,24 ms w korze żywych myszy i o 0,19 ms w całkowitych eksplantatach mózgowych wywilzn (GONG i współaut. 2015). Doświadczenia te ujawniły duży potencjał nowych typów GEVIs, umożliwiających badanie aktywności wielu komórek z precyzją pozwalającą na odczyt pojedynczych potencjałów czynnościowych.

NIE TYLKO OPTOGENETYKA

W przeciągu ostatnich siedmiu lat pojawiły się nowe, bardzo kreatywne i wyrafinowane metody manipulacji aktywnością komórek nerwowych. Niektóre z nich wykorzystują częściowo pewne elementy metod optogenetycznych i podobnie jak one, służą do manipulacji potencjałem błony komórkowej. Inne, adaptują pewne elementy optogenetyki do regulacji czynności komórek na całkowicie odmiennym poziomie fizjologicznej aktywności, związanym z transkrypcją DNA czy modyfikacją chromatyny. Inne wreszcie, są całkowicie nowatorskie i wykorzystują magnetyczne metody stymulacji neuronów. Zgodnie z chronologią ich powstawania, pierwszą opiszemy technikę LITEs (ang. light-inducible transcriptional effectors) (KONERMANN i współaut. 2013).

LITE jest metodą wykorzystującą parę specjalnie zaprojektowanych hybryd białkowych, które są zdolne ze sobą oddziaływać i dimeryzować. Pierwsza hybryda składa się z domeny TALE, rozpoznającej i wiążącej odpowiednio sekwencje DNA, i z części białka CRY2 (ang. cryptochrome circadian regulator 2), czulego na światło niebieskie. Domena TALE może być modyfikowana, aby rozpoznawać fragmenty łańcucha DNA o wybranej sekwencji. Druga hybryda zbudowana jest z białka CIB1 (ang. calcium and integrin binding 1) i z wybranego białka efektorowego, które pośredniczy w modulacji transkrypcji. CRY2 po wzbudzeniu światłem niebieskim zmienia konformację i jest rozpoznawane przez białko CIB1 – tak powstaje heterodimer składający się z dwóch hybryd białkowych (TALE-CRY2:CIB1-efektor). W stanie nieaktywnym hybryda TALE-CRY2 wiąże region promotorowy docelowego genu,

a w tym samym czasie hybryda CIB1-efektor pozostaje niezwiązana i wolna w jądrze komórki. System ten można też odwrócić, powstaje wówczas białko CIB1 połączone z domeną TALE oraz CRY2 z białkiem efektorowym modulującym transkrypcję. Wykorzystując sekwencję TALE rozpoznającą region promotorowy genu *Neurog2* (ang. neurogenin 2) i białko efektorowe VP64 będące syntetycznym silnym aktywatorem transkrypcji, stworzono następujące hybrydy: TALE (*Neurog2*)-CRY2 i CIB1-VP64. Wykorzystując powyższą parę białek udało się za pomocą stymulacji świetlnej podnieść poziom ekspresji genu *Neurog2* w warunkach *in vitro*. Różnice w poziomie ekspresji w stosunku do kontroli były obserwowane już po 30 min od stymulacji. Po 12 godzinach stymulacji różnica w poziomie ekspresji mRNA *Neurog2* była ok. 20 razy wyższa w stosunku do komórek transfekowanych kontrolnym wirusem kodującym GFP (ang. green fluorescent protein) zamiast hybryd białkowych (KONERMANN i współaut. 2013).

W dalszych badaniach w warunkach *in vivo* wykorzystano inne hybrydy z domeną TALE rozpoznającą sekwencję genu *Grm2* (ang. glutamate metabotropic receptor 2): TALE(*Grm2*)-CIB1 i CRY2-VP64. Do mózgu myszy podano dwa wirusy, każdy kodujący jedną z hybryd białkowych, i wprowadzono światłowód w miejsce iniekcji wirusów. Po ośmiu dniach od operacji stymulowano ten obszar mózgu pulsami światła przez 12 godzin. Po tym czasie sprawdzono poziom ekspresji mRNA genu *Grm2*. Ekspresja ta okazała się ponad dwa razy wyższa w stosunku do poziomu notowanego u zwierząt niestymulowanych. W neuronach hodowli komórkowej udało się za pomocą światła zmniejszyć około dwukrotnie poziom ekspresji genu *Grm2* wykorzystując sztuczną domenę represorową SID4X, pośredniczącą w deacetylacji histonów, a przyłączoną do CRY2. Niemalże dwukrotnie został zmniejszony również poziom acetylacji histonu H3K9 przy promotorze genu *Grm2*. Metoda LITEs udowodniła, że za pomocą światła możliwa jest bezpośrednia regulacja aktywności genów i modyfikacja chromatyny (KONERMANN i współaut. 2013).

Druga metoda wykorzystuje magneto-termiczną stymulację komórek (CHEN i współaut. 2015). Stosuje się w niej magnetyczne, sferyczne nanocząsteczki o średnicy 22 nm. Zbudowane są one z tlenku żelaza (II) diżelaza (III) – Fe_3O_4 i powleczone są poli(tlenkiem etylu) dla lepszej stabilności koloidalnej i biokompatybilności. Nanocząsteczki te, po wzbudzeniu silnym polem magnetycznym i namagnesowaniu, oddają ciepło. Drugim elementem układu jest receptor TRPV1 bę-

dający kanałem kationowym reagującym na wzrost temperatury w organizmie – znacznie zwiększa swoją przewodność przy temperaturze powyżej 43°C. Twórcy tej metody, aby sprawdzić jej skuteczność, poddali linie komórkowe HEK transfekcji wektorami lentiwirusowymi kodującymi TRPV1 i sondę wapniową GCaMP6s. Po wzbudzeniu nanocząstek polem magnetycznym obserwowano fluorescencyjny sygnał wapniowy odzwierciedlający aktywność elektryczną komórek. Stymulacja ta udała się również w hodowli komórek hipokampalnych utrzymywanych w medium zawierającym magnetyczne nanocząstki. Neurony te pod wpływem pola magnetycznego synchronicznie odpowiadały serią wyładowań. Powyższe odpowiedzi miały 5-sekundową latencję w stosunku do stymulującego bodźca magnetycznego, co ujawnia, że metoda ta ma znacznie wolniejszą kinetykę w stosunku do optogenetyki. Skuteczność tej metody pokazano również *in vivo*. Najpierw podano myszom wirus kodujący TRPV1 do pola brzusznej nakrywki (ang. ventral tegmental area). Po czterech tygodniach przeprowadzono następną operację, podając magnetyczne nanocząsteczki w miejsce wcześniejszej iniekcji wirusem. Następnie uśpione myszy przez 20 min były wystawione na 10-sekundowe pulsy pola magnetycznego. Okazało się, że po poddaniu zwierząt magnetycznej stymulacji widoczny jest znaczący wzrost liczby aktywnych komórek w polu brzusznej nakrywki. Aktywność neuronów została zbadana metodą immunohistochemiczną, w której wykrywano obecność białka c-Fos, produktu genu wczesnej odpowiedzi (*c-fos*). Uznaje się, że c-Fos jest wyznacznikiem zwiększonej aktywności neuronalnej. Eksperyment ten powtórzono również na myszach, którym nanocząstki podało miesiąc przed magnetyczną stymulacją. W tym przypadku także obserwowano zwiększoną liczbę komórek z białkiem c-Fos, co dowodzi, że podane nanocząstki długo pozostają w organizmie i za ich pomocą możliwa jest chroniczna stymulacja komórek w mózgu. Ponadto, nie zaobserwowano żadnych różnic w gęstości komórek nerwowych czy gęstości gąbki między mózgiem zwierząt poddanych magnetycznej stymulacji i zwierząt nie stymulowanych (CHEN i współaut. 2015). Metoda ta więc wydaje się być bezpieczna.

Trzecia metoda wykorzystuje sferyczne nanocząsteczki złota o średnicy 20 nm, które po oświetleniu światłem o długość 523 nm wypromieniowują pochłoniętą energię w postaci ciepła. Szybki wzrost temperatury przy błonie komórki prowadzi do chwilowej zmiany jej pojemności elektrycznej, co generuje prąd pojemnościowy, który depolaryzuje błonę neuronalną, prowadząc do wywołania po-

tencjału czynnościowego (CARVALHO-DE-SOUZA i współaut. 2015). Depolaryzacja błony komórkowej jest jednak możliwa tylko w przypadku, gdy nanocząstki złota znajdują się w jej bezpośredniej bliskości. Autorzy tej techniki najpierw sprawdzili użyteczność wyprodukowanych nanocząstek dodając je do roztworu w czasie rejestracji elektrofizjologicznych z neuronów zwoju rdzenia kręgowego szczura z hodowli komórkowej. Przy stężeniu nanocząstek wynoszącym 50 nM, stymulacja 1 ms pulsami zielonego światła (523 nm) powodowała wyładowania potencjałów czynnościowych w ok. 80% komórek. Niestety wykorzystane nanocząstki nie łączyły się z komórkami i były łatwo wypłukiwane przez świeży roztwór. Z tego powodu wykorzystano nanocząstki złota skoniugowane ze streptawidyną i dwa przeciwciała skoniugowane z biotyną. Streptawidyna jest przeciwciałem wiążącym biotynę. Przeciwciała z biotyną były skierowane przeciwko receptorowi TRPV1 i receptorowi P2X₃. Oba te receptory występują w komórkach zwoju rdzeniowego. Noc przed rejestracją, hodowle komórkowe neuronów zwoju rdzeniowego inkubowano z jednym z przeciwciał. Następnego dnia hodowle były przepłukiwane świeżym buforem, aby wypłukać nie związane z receptorami przeciwciała. Rejestracje elektrofizjologiczne i stymulacja świetlna ujawniły, że po dodaniu do roztworu nanocząstek ze streptawidyną, komórki stają się czułe na światło. Ponadto 20-minutowe płukanie komórek świeżym roztworem nie wypłukiwało nanocząstek i nie zmniejszało ich efektywności. Z uwagi na fakt, że biotynylowane przeciwciała są drogie w użyciu, eksperyment powtórzono ze zwykłymi przeciwciałami i cząsteczkami złota skoniugowanymi z II-rzędowymi przeciwciałami. Efekt był podobny, jak przy próbach ze zmodyfikowanymi przeciwciałami. Możliwa była stymulacja komórek światłem, a nanocząstki złota nie podlegały wypłukaniu (CARVALHO-DE-SOUZA i współaut. 2015). Metoda ta nie wymaga więc żadnej manipulacji genetycznej, a selektywność względem stymulowanych komórek odbywa się na zasadzie doboru specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko białkom błony komórkowej. Metoda ta jest tylko jednokierunkowa i nie umożliwia hamowania aktywności komórek nerwowych. Ponadto, przeciwciała, za pomocą których nanocząstki są przytwierdzane do błon komórkowych, mogą prawdopodobnie podlegać degradacji w żywym układzie, a nanocząsteczki być usuwane z organizmu. Dlatego dłuższe wykorzystanie ich w żywym organizmie może być związane z koniecznością powtórzonych aplikacji.

Czwarta metoda wykorzystuje specjalne sferyczne nanocząstki o średnicy 90 nm.

Ich rdzeń zbudowany jest z nanokryształów NaYF₄ domieszkowanych jonami Yb³⁺/Tm³⁺ lub Yb³⁺/Er³⁺. Po wzbudzeniu falami w zakresie bliskiej podczerwieni (980 nm) emitują odpowiednio światło niebieskie lub zielone. Światło to ma wystarczającą moc, aby wzbudzić opsyny: ChR2 w przypadku nanocząstek z Tm³⁺ i Arch w przypadku nanocząstek z Er³⁺ (CHEN i współaut. 2018). Skuteczność tej metody została sprawdzona w warunkach *in vitro* w rejestracjach elektrofizjologicznych na skrawkach z myszy eksprymujących ChR2, którym podano do mózgu nanocząstki. Pulsy światła podczerwonego wywoływały potencjały czynnościowe w neuronach, ale skuteczność tej stymulacji nie była kompletna, nie każdy puls generował potencjał czynnościowy. Ponadto, kinetyka aktywacji ChR2 przez stymulację nanocząstek światłem podczerwonym była nieco wolniejsza w stosunku do bezpośredniej stymulacji tej opsyny światłem niebieskim. Kolejną fazę eksperymentu przeprowadzono *in vivo* na myszach (CHEN i współaut. 2018). Zwierzętom eksprymującym rekombinazę Cre w komórkach dopaminergicznych podano wektor wirusowy kodujący ChR2, której ekspresja zależna była od Cre rekombinazy. Wirus został podany do pola brzusznej nakrywki, rejonu mózgu leżącego ok. 4,2 mm pod czaszką. Po czterech tygodniach podano w ten sam rejon nanocząsteczki NaYF₄:Yb³⁺/Tm³⁺. Stymulacja światłem podczerwonym przez czaszkę myszy aktywowała nanocząsteczki, które emitowały światło, a następnie to światło wzbudzało ChR2 w błonie neuronów i powodowało ich depolaryzację i wyładowania. Efektywność tej metody wydedukowano na podstawie zwiększonej liczby komórek z białkiem c-Fos, w stosunku do zwierząt niestymulowanych. Dzięki zastosowaniu voltametrii cyklicznej szybkiej zmiany potencjału (ang. fast scan cyclic voltammetry, FSCV) możliwe było również sprawdzenie ilości dopaminy jaką wydzielają komórki pola brzusznej nakrywki u myszy stymulowanej przezczaszkowo światłem podczerwonym. Komórki pola brzusznej nakrywki wysyłają projekcje do brzusznej części prążkowania. Stymulacja dwusekundowymi pulsami światła podczerwonego komórek pola brzusznej nakrywki prowadziła do znacznie zwiększonego poziomu uwalniania dopaminy w brzusznej części prążkowania.

W innych badaniach sprawdzono również efektywność hamowania przez nanocząsteczki NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ (CHEN i współaut. 2018). W tym celu myszom eksprymującym Cre rekombinazę w neuronach pobudzających podano do hipokampa wirus kodujący Arch, której ekspresja zależna była od rekombinazy. Po czterech tygodniach, uśpionym my-

szom podano do hipokampa nanocząstki i dootrzewnowo kwas kainowy. Kwas ten wywołuje niekontrolowaną aktywność komórek nerwowych, którą tutaj obserwowano jako wzrost liczby neuronów z białkiem c-Fos. Po podaniu kwasu kainowego myszy były stymulowane przezczaszkowo światłem podczerwonym. Następnie sprawdzano ekspresję białka c-Fos w komórkach hipokampa. Liczba komórek hipokampa z białkiem c-Fos była mniejsza u myszy stymulowanych światłem podczerwonym niż kontrolnych, nie stymulowanych. Dowodzi to skuteczności hamowania aktywności neuronów przy pomocy opsyny Arch aktywowanej światłem emitowanym przez nanocząsteczki. Stosując te nanocząstki wykazano również ich przydatność w badaniach behawioralnych na myszach. Z wykorzystaniem nanocząstek i przezczaszkowej stymulacji światłem podczerwonym powtórzono eksperyment z optogenetycznym przywoływaniem pamięci (ang. memory recall) u myszy (LIU i współaut. 2012). W oryginalnej pracy wykorzystano specjalny system czasowej kontroli ekspresji genów, który umożliwił ekspresję ChR2 w sprecyzowanej populacji komórek hipokampa, które były aktywne w chwili, gdy mysz była poddawana warunkowaniu awersyjnemu. Po warunkowaniu, stymulacja niebieskim światłem w innym kontekście sytuacyjnym prowadziła do zamierania zwierzęcia w bezruchu, co sugeruje przywołanie wspomnień strachu. W oryginalnym doświadczeniu grupy Liu zastosowano do stymulacji światłowód wprowadzony do mózgu myszy. Twórcy nowych nanocząstek powtórzyli ten sam efekt behawioralny stosując stymulację przezczaszkową światłem podczerwonym (CHEN i współaut. 2018). Dodatkowo udowodniono, że nanocząstki wprowadzone do mózgu myszy pozostają w nim przez okres co najmniej jednego miesiąca i nie wykazują cytotoksyczności. Doświadczenia pokazały, że metoda ta ma ogromny potencjał, stanowiąc idealne uzupełnienie standardowego podejścia optogenetycznego, ponieważ jej zastosowanie nie wymaga chronicznej implantacji światłowodów do wnętrza tkanki mózgowej. Ten ogromny walor nowej metody może przyspieszyć wykorzystanie optogenetyki w medycynie i zastąpić np. elektrody do głębokiej stymulacji mózgu.

PODSUMOWANIE

Nieustający rozwój badań biologicznych odbywa się dzięki rozwojowi nowych narzędzi badawczych pozwalających mierzyć i obserwować procesy fizjologiczne w żywych organizmach w sposób wcześniej nieosiągalny. Postęp w dziedzinie mikroskopii optycznej,

fluorescencyjnej, elektronowej, cytometrii przepływowej, wysokoprzepustowego sekwencjonowania DNA i mnóstwa innych metod specyficznych dla każdej gałęzi biologii i medycyny pozwala przesunąć granicę naszych możliwości w badaniu życia na ziemi. Postęp ten odbywa się również dzięki rozwojowi takich nauk jak bioinformatyka, fizyka, matematyka i statystyka, pozwalających na zautomatyzowaną analizę ogromnych zasobów danych, projektowanie nowych białek, analizę kinetyki ich reakcji czy badanie pokrewieństwa ewolucyjnego. Postęp w badaniach biologicznych odbywa się nie tylko dzięki nowym narzędziom w tych gałęziach nauki, ale także dzięki dokonaniom już odkryciom w dziedzinie biologii i wykorzystaniu narzędzi dostarczonych przez samą naturę. Narzędzi takich jak polimeraza DNA, plazmid Ti do transformacji genetycznej roślin, zjawisko interferencji RNA do wyciszania genów czy np. systemy do precyzyjnej modyfikacji genów na bazie białek TALE lub na bazie CRISPR/Cas. Wszystkie te narzędzia stworzyła natura, a człowiek nauczył się je wykorzystywać do własnych celów. Również opsy i wiele innych białek efektorowych i receptorowych oraz ich ligandy wymienione w niniejszej pracy są tego przykładem. To właśnie odkrycia narzędzi natury i ich adaptacje do celów naukowych prowadziły w ostatnich stu latach do największych przełomów w dziedzinie biologii. Czy optogenetyka jest takim przełomem? Metoda ta niewątpliwie jest kamieniem milowym w neurobiologii. Umożliwia manipulację aktywnością komórek nerwowych z dokładnością, specyficznością i kinetyką nieosiągalną dla żadnego z wcześniejszych systemów regulujących potencjały czynnościowe błony komórkowej. Jest to metoda obecnie szeroko stosowana w badaniach nad układem nerwowym i trudno sobie wyobrazić dzisiejszą neurobiologię w oderwaniu od tej techniki. Optogenetyka umożliwiła badania układu nerwowego, których przeprowadzenie było nie do zrealizowania przed jej powstaniem, takich jak optogenetyczne przywoływanie pamięci czy stymulacja aktywności pojedynczych komórek. Metoda ta była również podstawą i inspiracją innych metod powstałych później: optoXR, LITEs i metod z wykorzystaniem nanocząsteczek. Jednocześnie sama historia rozwoju technik manipulacji aktywnością komórek nerwowych stanowi ceną lekcję. Uczy, że narzędzia natury mogą przyjść nieoczekiwanie z pomocą w rozwiązaniu pewnych technicznych problemów. Również istota samej optogenetyki i poszukiwania nowych opsy powinny nas skłonić do refleksji. To dzięki skromnym archebakteriom, algom i grzybom zamieszkującym bagna, sa-

dzawki czy słone jeziora, mamy dzisiaj takie potężne narzędzie jak optogenetyka. Dowodzi to wagi zachowania ekosystemów i ich bioróżnorodności, która w ostatnich latach stała się poważnie zagrożona przez niekontrolowane, wywołane przez człowieka zmiany klimatyczne.

Streszczenie

Sterowanie czynnością elektryczną wybranych, specyficznych grup komórek nerwowych lub nawet pojedynczej komórki w mózgu pozwala na zrozumienie tego, jak sieci neuronowe przetwarzają i kodują informacje. Możliwość manipulacji aktywnością neuronów jest niezbędna w badaniu obwodów neuronalnych, ich funkcji i roli w zdrowym i chorym mózgu. Obecnie istnieje wiele metod regulacji aktywności komórek nerwowych wykorzystujących różne podejścia i narzędzia. Techniki te różnią się bardzo pod względem specyficzności komórkowej, kinetyki i kierunku zmiany aktywności komórkowej (aktywacja/hamowanie). W niniejszej pracy wymieniamy różne metody kontrolowania aktywności neuronów poczynając od lat 60. ubiegłego wieku, a kończąc na technikach XXI w. Najwięcej miejsca przeznaczamy na opis opsy i rozwoju metod zastosowania optogenetyki. Oddzielny rozdział poświęcamy charakterystyce metod powstałych w ostatnich latach, które wykorzystują nanocząsteczki i optyczną manipulację transkrypcją DNA.

LITERATURA

- ADAMANTIDIS A. R., ZHANG F., ARAVANIS A. M., DEISSEROTH K., DE LECEA L., 2007. *Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons*. *Nature* 450, 420-424.
- AIRAN R. D., THOMPSON K. R., FENNO L. E., BERNSTEIN H., DEISSEROTH K., 2009. *Temporally precise in vivo control of intracellular signaling*. *Nature* 458, 1025-1029.
- ALEXANDER G. M., ROGAN S. C., ABBAS A. I., ARMBRUSTER B. N., PEI Y., ALLEN J. A., NONNEMAN R. J., HARTMANN J., MOY S. S., NICOLELIS M. A., MCNAMARA J. O., ROTH B. L., 2009. *Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors*. *Neuron* 63, 27-39.
- ARAVANIS A. M., WANG L. P., ZHANG F., MELTZER L. A., MOGRI M. Z., SCHNEIDER M. B., DEISSEROTH K., 2007. *An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology*. *J. Neural Eng.* 4, S143-S156.
- ARENKIEL B. R., PECA J., DAVISON I. G., FELICIANO C., DEISSEROTH K., AUGUSTINE G. J., EHLERS M. D., FENG G., 2007. *In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2*. *Neuron* 54, 205-218.
- ARMBRUSTER B. N., LI X., PAUSCH M. H., HERLITZE S., ROTH B. L., 2007. *Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled*

- receptors potentially activated by an inert ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 5163-5168.
- ATASOY D., APONTE Y., SU H. H., STERNSON S. M., 2008. A FLEX switch targets Channelrhodopsin-2 to multiple cell types for imaging and long-range circuit mapping. *J. Neurosci.* 28, 7025-7030.
- BANGHART M., BORGES K., ISACOFF E., TRAUNER D., KRAMER R. H., 2004. Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat. Neurosci.* 7, 1381-1386.
- BOLLA F., 1877. Contributions to the physiology of vision and of the sensation of colour. *Q. J. Microsc. Sci.* 17, 226-232.
- BOYDEN E. S., ZHANG F., BAMBERG E., NAGEL G., DEISSEROTH K., 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263-1268.
- BRESTEAD J. H., 1930. *The Edwin Smith Surgical Papyrus*. The University of Chicago Press, Chicago.
- CARVALHO-DE-SOUZA J. L., TREGGER J. S., DANG B., KENT S. B., PEPPERBERG D. R., BEZANILLA F., 2015. Photosensitivity of neurons enabled by cell-targeted gold nanoparticles. *Neuron* 86, 207-217.
- CHANG J. Y., NAKAHATA Y., HAYANO Y., YASUDA R., 2019. Mechanisms of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activation in single dendritic spines. *Nat. Commun.* 10, 2784.
- CHEN R., ROMERO G., CHRISTIANSEN M. G., MOHR A., ANIKEEVA P., 2015. Wireless magnetothermal deep brain stimulation. *Science* 347, 1477-1480.
- CHEN S., WEITEMIER A. Z., ZENG X., HE L., WANG X., TAO Y., HUANG A. J. Y., HASHIMOTODANI Y., KANO M., IWASAKI H., PARAJULI L. K., OKABE S., TEH D. B. L., ALL A. H., TSUTSUI-KIMURA I., TANAKA K. F., LIU X., MCHUGH T. J., 2018. Near-infrared deep brain stimulation via up-conversion nanoparticle-mediated optogenetics. *Science* 359, 679-684.
- CHOW B. Y., HAN X., DOBRY A. S., QIAN X., CHUONG A. S., LI M., HENNINGER M. A., BELFORT G. M., LIN Y., MONAHAN P. E., BOYDEN E. S., 2010. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature* 463, 98-102.
- DALVA M. B., KATZ L. C., 1994. Rearrangements of synaptic connections in visual cortex revealed by laser photostimulation. *Science* 265, 255-258.
- DEISSEROTH K., 2010. Controlling the brain with light. *Sci. Am.* 303, 48-55.
- DEISSEROTH K., 2011. Optogenetics. *Nat. Methods.* 8, 26-29.
- DEISSEROTH K., 2015. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat. Neurosci.* 18, 1213-1225.
- ERNST O. P., SÁNCHEZ MURCIA P. A., DALDROP P., TSUNODA S. P., KATERIYA S., HEGEMANN P., 2008. Photoactivation of channelrhodopsin. *J. Biol. Chem.* 283, 1637-1643.
- GAZDA K., BAZAŁA M., WĘGIERSKI T., 2017. Mikroskopowe obrazowanie jonów wapnia za pomocą genetycznie kodowanych sond. *Postępy Biochem.* 63, 34-43.
- GONG Y., HUANG C., LI J. Z., GREWE B. F., ZHANG Y., EISMANN S., SCHNITZER M. J., 2015. High-speed recording of neural spikes in awake mice and flies with a fluorescent voltage sensor. *Science* 350, 1361-1366.
- GRADINARU V., THOMPSON K. R., DEISSEROTH K., 2008. eNpHR: a *Naetronomonas halorhodopsin* enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol.* 36, 129-139.
- GRADINARU V., MOGRI M., THOMPSON K. R., HENDERSON J. M., DEISSEROTH K., 2009. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* 324, 354-359.
- GRADINARU V., ZHANG F., RAMAKRISHNAN C., MATTIS J., PRAKASH R., DIESTER I., GOSHEN I., THOMPSON K. R., DEISSEROTH K., 2010. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* 141, 154-165.
- GUNAYDIN L. A., YIZHAR O., BERNDT A., SOHAL V. S., DEISSEROTH K., HEGEMANN P., 2010. Ultrafast optogenetic control. *Nat. Neurosci.* 13, 387-392.
- HAN X., BOYDEN E. S., 2007. Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PLoS One* 2, e299.
- HAN X., CHOW B. Y., ZHOU H., KLAPOETKE N. C., CHUONG A., RAJIMEHR R., YANG A., BARATTA M. V., WINKLE J., DESIMONE R., BOYDEN E. S., 2011. A high-light sensitivity optical neural silencer: development and application to optogenetic control of non-human primate cortex. *Front. Syst. Neurosci.* 5, 18.
- HORI N., IKEDA K., ROBERTS E., 1979. Muscimol, GABA and picrotoxin: effects on membrane conductance of a crustacean neuron. *Brain Res.* 141, 364-370.
- HUANG F., TANG B., JIANG H., 2013. Optogenetic Investigation of Neuropsychiatric Diseases. *Int. J. Neurosci.* 123, 7-16.
- HULL E. M., 1968. Corticofugal influence in the macaque lateral geniculate nucleus. *Vision Res.* 8, 1285-1298.
- KARPOVA A. Y., TERVO D. G., GRAY N. W., SVOBODA K., 2005. Rapid and reversible chemical inactivation of synaptic transmission in genetically targeted neurons. *Neuron* 48, 727-735.
- KITAMOTO T., 2001. Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. *J. Neurobiol.* 47, 81-92.
- KONERMANN S., BRIGHAM M. D., TREVINO A., HSU P. D., HEIDENREICH M., CONG L., PLATT R. J., SCOTT D. A., CHURCH G. M., ZHANG F., 2013. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature* 500, 472-476.
- KUHLMAN S. J., HUANG Z. J., 2008. High-resolution labeling and functional manipulation of specific neuron types in mouse brain by Cre-activated viral gene expression. *PLoS One* 3, e2005.
- LECHNER H. A., LEIN E. S., CALLAWAY E. M., 2002. A genetic method for selective and quickly reversible silencing of mammalian neurons. *J. Neurosci.* 22, 5287-5290.
- LI X., GUTIERREZ D. V., HANSON M. G., HAN J., MARK M. D., CHIEL H., HEGEMANN P., LANDMESSER L. T., HERLITZE S., 2005. Fast non-invasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 17816-17821.
- LIMA S. Q., MIESENBOCK G., 2005. Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons. *Cell* 121, 141-152.
- LIU X., RAMIREZ S., PANG P. T., PURYEAR C. B., GOVINDARAJAN A., DEISSEROTH K., TONEGAWA S., 2012. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature* 484, 381-385.
- MADISEN L., MAO T., KOCH H., ZHUO J. M., BERNENI A., FUJISAWA S., HSU Y. W., GARCIA A. J. 3RD, GU X., ZANELLA S., KIDNEY J., GU H., MAO Y., HOOKS B. M., BOYDEN E. S., BUZSAKI

- G., RAMIREZ J. M., JONES A. R., SVOBODA K., HAN X., TURNER E. E., ZENG H., 2012. A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat. Neurosci.* 15, 793-802.
- MATSUNO-YAGI A., MUKOHATA Y., 1977. Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 237-243.
- NAGEL G., OLLIG D., FUHRMANN M., KATERIYA S., MUSTI A. M., BAMBERG E., HEGEMANN P., 2002. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296, 2395-2398.
- NAGEL G., SZELLAS T., HUHN W., KATERIYA S., ADEISHVILI N., BERTHOLD P., OLLIG D., HEGEMANN P., BAMBERG E., 2003. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13940-13945.
- NAGEL G., BRAUNER M., LIEWALD J. F., ADEISHVILI N., BAMBERG E., GOTTSCHALK A., 2005. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr. Biol.* 15, 2279-2284.
- NARAHASHI T., MOORE J. W., SCOTT W. R., 1964. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J. Gen. Physiol.* 47, 965-974.
- OESTERHELT D., STOECKENIUS W., 1971. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat. New Biol.* 233, 149-152.
- OKUN M. S., 2012. Deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 367, 1529-1538.
- PANEGYRES K. P., PANEGYRES P. K., 2016. The Ancient Greek discovery of the nervous system: Alcmaeon, Praxagoras and Herophilus. *J. Clin. Neurosci.* 29, 21-24.
- PRAKASH R., YIZHAR O., GREWE B., RAMAKRISHNAN C., WANG N., GOSHEN I., PACKER A. M., PETERKA D. S., YUSTE R., SCHNITZER M. J., DEISSEROTH K., 2012. Two-photon optogenetic toolbox for fast inhibition, excitation and bistable modulation. *Nat. Methods.* 9, 1171-1179.
- RICKGAUER J. P., DEISSEROTH K., TANK D. W., 2014. Simultaneous cellular-resolution optical perturbation and imaging of place cell firing fields. *Nat. Neurosci.* 17, 1816-1824.
- SAUER B., 1998. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14, 381-392.
- SPARTA D. R., JENNINGS J. H., UNG R. L., STUBER G. D., 2013. Optogenetic strategies to investigate neural circuitry engaged by stress. *Behav. Brain Res.* 255, 19-25.
- SWEENEY S. T., BROADIE K., KEANE J., NIEMANN H., O'KANE C. J., 1995. Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* 14, 341-351.
- VASTOLA E. F., 1961. Anodal block of conduction in the optic tract. *Am. J. Physiol.* 200, 931-935.
- WANG H., PECA J., MATSUZAKI M., MATSUZAKI K., NOGUCHI J., QIU L., WANG D., ZHANG F., BOYDEN E., DEISSEROTH K., KASAI H., HALL W. C., FENG G., AUGUSTINE G. J., 2007. High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 8143-8148.
- WILCOX M., VIOLA R., JOHNSON K. W., BILLINGTON A. P., CARPENTER B. K., MCCRAY J. A., GUZIKOWSKI A. P., HESS G. P., 1990. Synthesis of photolabile "precursors" of amino acid neurotransmitters. *J. Org. Chem.* 55, 1585-1589.
- YAMAMOTO M., WADA N., KITABATAKE Y., WATANABE D., ANZAI M., YOKOYAMA M., TERANISHI Y., NAKANISHI S., 2003. Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain. *J. Neurosci.* 23, 6759-6767.
- YASUDA R., NIMCHINSKY E. A., SCHEUSS V., POLOGRUTO T. A., OERTNER T. G., SABATINI B. L., SVOBODA K., 2004. Imaging calcium concentration dynamics in small neuronal compartments. *Sci. STKE* 2004, p15.
- ZEMELMAN B. V., LEE G. A., NG M., MIESENBOCK G., 2002. Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron* 33, 15-22.
- ZEMELMAN B. V., NESNAS N., LEE G. A., MIESENBOCK G., 2003. Photochemical gating of heterologous ion channels: remote control over genetically designated populations of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1352-1357.
- ZHANG F., WANG L. P., BRAUNER M., LIEWALD J. F., KAY K., WATZKE N., WOOD P. G., BAMBERG E., NAGEL G., GOTTSCHALK A., DEISSEROTH K., 2007. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446, 633-639.
- ZHANG F., PRIGGE M., BEYRIERE F., TSUNODA S. P., MATTIS J., YIZHAR O., HEGEMANN P., DEISSEROTH K., 2008. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat. Neurosci.* 11, 631-633.
- ZHAO S., CUNHA C., ZHANG F., LIU Q., GLOSS B., DEISSEROTH K., AUGUSTINE G. J., FENG G., 2008. Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity. *Brain Cell Biol.* 36, 141-154.

KOSMOS Vol. 69, 1, 59–80, 2020

DOMINIK KANIGOWSKI, JOANNA URBAN-CIEĆKO

Laboratory of Neurobiology, Nencki Institute of Experimental Biology PAS, 3 Pasteur Str., 02-093 Warszawa, E-mail: d.kanigowski@nencki.edu.pl, j.ciecko@nencki.edu.pl

OPTOGENETICS AND OTHER METHODS OF CONTROLLING THE NERVE CELLS ACTIVITY

Summary

Controlling the electrical activity of selected and specific groups of nerve cells or even a single cell in the brain allows for understanding how neuronal networks process and code information. The ability to manipulate the activity of neurons is essential in studying the function and role of neuronal circuits in a healthy and diseased brain. Currently, there are many methods of nerve cells activity regulation based on various approaches and tools. These techniques differ greatly in cellular specificity, kinetics, and direction of action (activation/inhibition). In this article, we list various methods of nerve cells manipulation – since the 60's of the past century and ending with the latest techniques of the present time. We devote the most space to the description of opsins and the development of methods for the application of optogenetics. A separate chapter is devoted to the characteristics of the methods developed in recent years which use nanoparticles and optical manipulation of DNA transcription.

Key words: chemogenetics, nanoparticles, opsins, optogenetics