

Optogenetik bringer neurale mekanismer frem i lyset og kan blive en ny terapiform

Tobias Melton Axelsen, Charlotte Amalie Emdal Navntoft, Søren Hofman Christiansen, Jakob Kisbye Dreyer, Jakob Balslev Sørensen, Ulrik Gether & David Paul Drucker Woldbye

STATUSARTIKEL

Institut for Neurovidenskab og Farmakologi, Panum Institutet, Københavns Universitet

Ugeskr Læger
2015;177:V06150501

Optogenetik er et nyt teknologisk værktøj [1, 2], der gør det muligt at kontrollere bestemte celletyper i specifikke hjerneregioner *in vivo* (**Figur 1**). Metoden har revolutioneret hjerneforskningen inden for de seneste år og afdækket central ny viden inden for centralnervesystemets funktion og patofysiologi. Optogenetik virker ved hjælp af lysfølsomme ionkanaler eller ionpumper, kaldet opsiner, der udtrykkes i de neuroner, man vil manipulere. Når opsinerne aktiveres, hæves eller sænkes neuronernes membranpotentiale, og dermed hhv. aktiveres eller hæmmes deres firing [4]. Opsiner blev oprindeligt isoleret fra alger, der bruger disse lysfølsomme proteiner til at orientere sig mod sollyset. Psykiateren *Karl Deisseroth* og hans kollegaers åbenhed over for at dele deres optogenetiske teknologi (f.eks. let adgang til opsinvektorer via deres hjemmeside) med andre forskere har ikke blot bidraget til at udbrede teknologien, men er også et fremragende eksempel i forskerverdenen på, at det betaler sig at dele sine opdagelser med andre forskere [5]. Det har således resulteret i mange artikler i *Nature*, *Science* og andre prestigefyldte tidsskrifter. Foreløbig har optogenetikken først og fremmest medvirket til at øge vores forståelse for neurale mekanismer i centralnervesystemet, men det er sandsynligt, at teknologien også vil kunne anvendes som fremtidig terapi.

Gener kodende for opsiner introduceres i en ønsket celletype ved brug af en virusvektor (f.eks. adenoassocieret virus), og aktiveringen foregår ved laserlys leve-

ret via indopererede fiberkabler (**Figur 1**). Efter stereotaktisk vektorinjektion i en hjerneregion ses typisk en reaktion på lysstimuli efter tre uger. En afgørende fordel ved opsiner frem for elektrisk stimulering af en hjerneregion er, at man vha. genetik kan opnå ekspresion i bestemte neuronale subpopulationer og dermed studere disse celletypers specifikke indflydelse på hjerneprocesser eller sygdomme. For at målrette ekspresionen til specifikke celletyper har to forskellige systemer været brugt. Dels har man anvendt *transgene* gnavere, hvor ekspresionen af opsiner præcist kan kontrolleres i specifikke celletyper via det såkaldte Cre-Lox-system (**Figur 2**). Alternativt har man designet vektorer således, at opsinet kontrolleres af en specifik promotor for celletyper, som man ønsker kontrol over. Eksempelvis kan man ved at sætte opsinet under kontrol af promotoren for dopaminsynteseenzymet tyrosinhydroxylase opnå specifik ekspresion af opsinet i dopaminerge celler og dermed helt specifikt kontrollere disse neuroner via lysstimulation.

Opsiner kommer i flere afskygninger. Hyppigst anvendes de excitatoriske Na⁺-kanaler (f.eks. ChR2), der aktiveres ved stimulation med blåt lys (aktiveringspektrum med optimum ved 470 nm) samt inhibitoriske chloridionpumper (f.eks. eNpHR 3.0 og ArchT 3.0), der aktiveres optimalt med gult laserlys (hhv. 589 og 566 nm). Der arbejdes fortsat på at udvikle nye forbedrede opsiner, f.eks. at give kanalen en hurtigere responstid, hvilket øger den tidsmæssige kontrol over

FAKTABOKS

- ▶ I optogenetik anvendes genteknologi til induktion af ekspresion af lysfølsomme membranproteiner, såkaldte opsiner.
- ▶ Optogenetik er en skånsom metode i forhold til elektrisk stimulation, da specifikke cellepopulationer kan stimuleres eller inhiberes selektivt.
- ▶ De lysfølsomme opsiner findes i mange forskellige varianter, alle sammen med forskellig kinetik, aktiveringsspektrum og effekt. Herunder Na⁺- eller anionstrømme over membranen eller aktivering af cellulære *pathways*. Excitation: Na⁺-kanal (channelrhodopsiner: ChR1, ChR2); inhibition: Cl⁻-pumpe (halorhodopsiner: NpHR, eNpHR3.0; Jaws), H⁺-pumpe (archaerhodopsiner: Arch, ArchT).
- ▶ Effektiv brug af optogenetisk metode kræver en identifikation af en celledspecifik promotor for den celletype, der ønskes stimuleret. Denne promotor skal være stærk nok til at udtrykke opsinet i så stor mængde, at der opnås effektiv kontrol over membranpotentialet.
- ▶ Muligheden for at styre specifikke cellepopulationer ved hjælp af lys gør det muligt at undersøge enkelte systemers rolle både ved fysiologiske og patofysiologiske tilstande.
- ▶ Optogenetisk kontrol af specifikke cellepopulationer kan på længere sigt sandsynligvis anvendes terapeutisk.

cellen. Der er også udviklet opsiner, der direkte kobler til aktivering af G-proteinsignalerings-*pathways* [6]. Sidste skud på stammen er et inhibitorisk opsin kaldet Jaws [7]. Det adskiller sig fra gængse opsiner ved at aktiveres af rødt lys (optimum ved 600 nm) samtidig med, at det har et meget stærkt respons selv på små lysstimuli. Da rødt lys bedre penetrerer kraniet end gult og blått lys, betyder det, at celler kan inhiberes vha. en ekstern lyskilde. Således vil det ved brug af opsiner med lignende funktion som Jaws være muligt at undgå implantering af lyskabler, da man i stedet kan lyse direkte gennem knogle og andet væv udefra.

VIGTIGE RESULTATER OPNÅET VIA OPTOGENETIK

Psykiatriske sygdomme

Optogenetik har leveret betydelige bidrag inden for udforskning af psykiatriske tilstande, inklusive stofafhængighed/belønning, depression og angst. F.eks. anvendtes selektiv optogenetisk stimulation af dopaminneuroner i area tegmentalis ventralis (VTA) til at påvise, at fasisk, men ikke tonisk, aktivering er nødvendig for at inducere belønning [8]. Andre optogenetikforsøg har kortlagt yderligere neurale mekanismer bag stofafhængighed [9]. F.eks. blev det vist, at kolinerge interneuroner i striatum spiller en central rolle ved stofsøgende adfærd. Således kunne optogenetisk inhibition af disse kolinerge interneuroner effektivt reducere kokainbelønningsadfærd i gnavere [10]. Ligeledes er det blevet opdaget, at *gamma-amino butyric acid* (GABA)-neuroner i VTA har essentiel betydning for belønningsadfærd og dopaminfrigivelse i nucleus accumbens (NAc) [11]. I et andet elegant optogenetisk studie påvistes, at excitatorisk input til NAc fra den basolaterale amygdala (BLA) er vigtig for belønningsadfærd, idet rotter ville selvstimulere med optisk stimulation fra lyskabler i BLA efter transfektion med det excitatoriske Chr2-opsin [12].

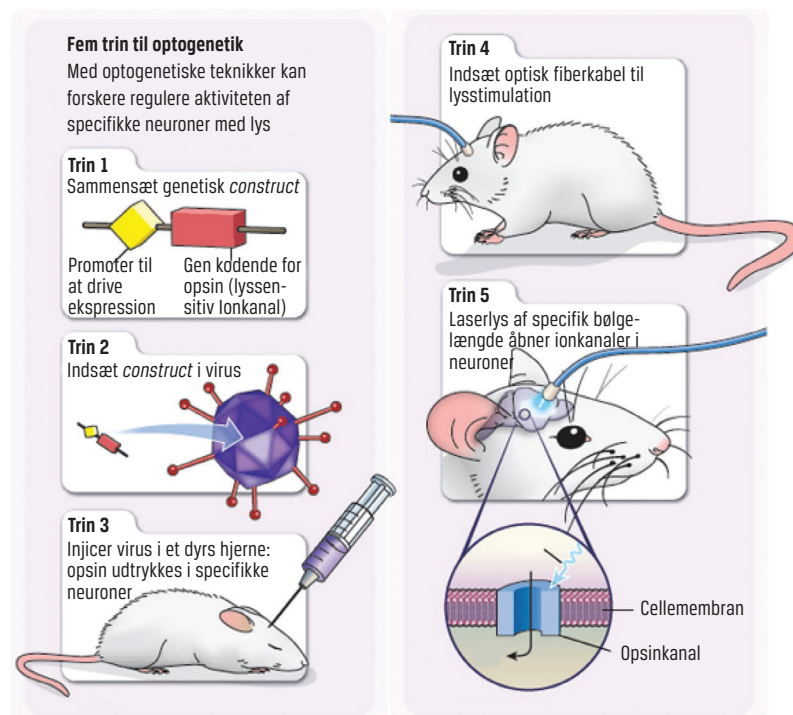
Inden for depressionsforskning har det længe været uklart, i hvor høj grad dopamin er involveret i depression. I et banebrydende optogenetisk forsøg hos mus påvistes det, at man ved fasisk aktivering af dopaminerge VTA-neuroner, der projicerer til NAc, kunne opheve depressiv adfærd, mens optogenetisk inhibition af VTA kunne inducere depressiv adfærd [13, 14]. Dopamins mekanismer er videre udforsket i et nyligt publiceret studie, hvor det blev vist, at *medium spiny*-neuroner i striatum, der udtrykker dopamin D1- og ikke D2-receptorer, medierer den antidepressive effekt [15].

Optogenetik har også været anvendt til afdækning af helt nye mekanismer ved angsttilstande. Således blev det påvist ved optisk stimulation, at serotoninerge 5-HT_{2c}-receptorer på GABA-interneuroner i nucleus raphe dorsalis spiller en central rolle ved angstadfærd, og dette kunne muligvis anvendes ved fremtidig be-

handling af angst [6]. I et andet studium påviste forskerne, at persisterende obsessiv-kompulsiv tilstand (OCD)-lignende adfærd kunne induceres ved gentagen optogenetisk stimulation af glutamaterge celler i den orbitofrontale cortex, der projicerer til ventromediale striatum [16]. Dette peger på, at abnorm aktivitet

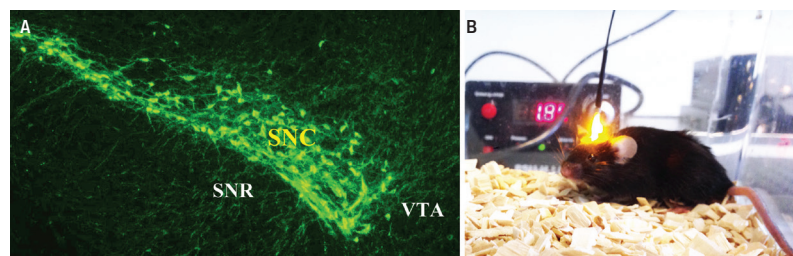
FIGUR 1

Grundlæggende princip bag optogenetik: Først udtrykkes lysfølsomme ionkanaler (på billedet en excitatorisk Na⁺-kanal) via en viral vektor i selektive neuronpopulationer, derefter reguleres deres aktivitet ved laserlysstimulation via implanterede fiberkabler. Modifieret efter [3] tilladelse fra MacMillan Publishers Ltd.



FIGUR 2

Billeder af optogenetik fra forfatternes egne forsøg, der har til formål at afdække specifikke dopamin-neuron-populationers betydning ved *attention deficit hyperactivity disorder* (ADHD) og parkinsonisme. A. Et eksempel på selektivt udtryk af det inhibitoriske opsin eNpHR3 (grønne celler) i dopaminerge musceller i substantia nigra pars compacta (SNC), der ikke breder sig til area tegmentalis ventralis (VTA) eller substantia nigra pars reticulata (SNR). B. Et billede af mus med kronisk implanteret lysleder kabel under stimulation med gul laser.



i kortiko-striatale baner kan være en mekanisme for udvikling af OCD.

Neurologiske sygdomme

Optogenetik har også vist sig frugtbar inden for udforskningen af neurologiske sygdomme. F.eks. anvendes optogenetik til specifikt at aktivere hypokretinerge neuroner i hypothalamus, hvorved forskerne blev i stand til at kontrollere opvågning fra både *non-rapid eye movements* (REM)- og REM-søvn efter en kort latentstid. Dette fund har haft stor betydning for forståelse af hypocretins rolle, ikke alene i forhold til narkolepsi, men også i forhold til fedme og termoregulation [17].

Indenfor Parkinsons sygdom er optogenetik blevet anvendt til at undersøge betydningen af enkelte neurale komponenter i de basale ganglier for manifestation af parkinsonistiske symptomer og til at afdække virkningsmekanismer for *deep brain stimulation* (DBS) i den subtalammiske nucleus (STN) [18]. F.eks. kunne optisk højfrekvent aktivering af afferenter til STN reversibelt ophæve motoriske symptomer hos alvorligt parkinsonistiske mus [19]. Dette tyder på, at afferenter og ikke lokale STN-neuroner er essentielle for DBS-effekten i STN, og desuden peges der i forsøgene på, at optogenetisk stimulation kunne blive et mere selektivt virkende alternativ til elektrisk DBS. I overensstemmelse hermed kunne optogenetisk inhibition selektivt af glutamaterge projektionsneuroner i STN også reducere parkinsonistiske symptomer [20]. Optogenetisk stimulation af motorisk cortex-projektioner til STN reducerede også effektivt parkinsonistiske symptomer, hvilket peger på motorisk cortex som et vigtigt ophav for effekten af DBS samt peger på et muligt mål for fremtidig optogenetisk kontrol af parkinsonistiske symptomer [19]. Optogenetik synes således at kunne give et vigtigt indblik i parkinsonistisk symptomatologi og giver håb om, at metoden kan anvendes i fremtidig behandling af sygdommen.

Epilepsi har også været mål for optogenetiske studier. Specifik optogenetisk inhibition af excitatoriske neuroner eller aktivering af inhibitoriske neuroner i et epileptisk fokus kunne udvikles til en fremtidig behandling af epilepsi. Således blokerede danske og svenske forskere epileptiform aktivitet via optogenetisk hæmning af excitatoriske glutamaterge hippocampale neuroner i en in vitro-musemodel for farmakoresistent temporallapsepilepsi [21]. Det antiepileptiske potentiale af optogenetisk inhibition af glutamaterge neuroner er også vist in vivo i en neokortikal epilepsimodel [22]. Et yderligere studium har vist en endnu mere smart anvendelse af optogenetik ved epilepsi, hvor der kombineres med realtidsovervågning af præepileptisk elektroencefalogram (EEG)-aktivitet i epileptiske foci [23]. Når epileptiforme *spikes* detekteres i starten af et

anfald, aktiveres den optogenetiske stimulation automatisk, hvorved anfald i bedste fald stoppes i opløbet. Ved at anvende dette i en musemodel for temporallapsepilepsi påvist, at optogenetisk inhibition af de glutamaterge neuroner kunne stoppe 57% af alle EEG-anfald inden for det første sekund [23].

OPTOGENETIK I RETINA

En nærliggende tanke, når der er tale om proteiner, der omsætter lys til en elektrisk strøm, ville være at anvende dem i forbindelse med retinale dystrofier, hvor fotoreceptorerne er defekte [24]. Potentialet for opsiner til at kunne genskabe fotosensibilitet har været vist i et studium, hvor gangliacellerne i retina blev transfekteret med det aktiverende opsin ChR2, hvorved det blev muligt at fremkalde aktivitet i synsbarken ved stimulation af musenes øjne med lys på opsinernes bølgelængde [25]. Det konstateredes dog, at der krævedes højere lysintensiteter for at aktivere opsinerne end oftest ses ved standardlysforhold.

OPTOGENETIK UDEN FOR CENTRALNERVESYSTEMET

Optogenetik har også for nylig været anvendt til at påvirke spiralgangliaceller i cochlea på transgene mus, hvorved det blev muligt at kode lyd mere effektivt end ved brug af elektrisk stimulation [26]. Dette peger på muligheden for at udvikle optogenetiske implantater med højere frekvensmæssig opløsning, der bedre vil kunne hjælpe hørehæmmede end nuværende kokleære implantater. Optogenetikken har også fundet sin vej helt uden for nervesystemet og er blevet foreslået som et alternativ til elektriske pacemakere eller som en mulighed for at foretage DC-konvertering hos patienter med atrieflimren [27, 28].

KONKLUSION

Optogenetik er en ny teknologi, som særligt har revolutioneret den neurovidenskabelige forskning i de seneste år. Ud over at give celledetaljeret indblik i virkningsmekanismer, er det håbet, at metoden også vil kunne anvendes til mere cellespecifik klinisk behandling af en række neuropsykiatriske sygdomme. Inden brug hos mennesker kan komme på tale, vil man skulle overkomme forskellige forhindringer. Der skal udvikles vektorer, der er tilstrækkeligt cellespecifikke og samtidig sikrer en tilstrækkelig ekspresion af de ønskede opsiner. Indtil nu har anvendelsen af optogenetik hos mennesker in vivo været udfordret af størrelsen af hjernen, eftersom vævspanetransen kun er ca. 1,5 mm for blåt og gult lys [19]. Man kunne overkomme dette ved at implantere flere lyskabler. Imidlertid kunne det tænkes, jf. det ovennævnte ny opsin Jaws, at kabler kan undgås i fremtiden, hvis lysstimulation kan foregå gennem kraniet [7]. Rent sikkerhedsmæssigt vil anvendelse af optogenetik hos mennesker in vivo kræve en

undersøgelse af potentiel toksicitet ved langtidsekspression af opsiner. I et primatstudie har der efter flere måneders ekspression af opsiner ikke vist sig negative effekter [29]. Det er dog vigtigt, at man undersøger dette grundigere, før en eventuel anvendelse hos mennesker kan komme på tale. På trods af potentielle hindringer på vejen til at anvende optogenetik terapeutisk er det uomtvisteligt, at optogenetik allerede nu har haft en umådelig stor indflydelse på forståelsen af adskillige hjernesygdomme og fremover kommer til at være et uvurderligt værktøj for den neurovidenskabelige forskning.

SUMMARY

Tobias Melton Axelsen, Charlotte Amalie Emdal Navntoft, Søren Hofman Christiansen, Jakob Kisbye Dreyer, Jakob Balslev Sørensen, Ulrik Gether & David Paul Drucker Woldbye:

Optogenetics brings hidden neural mechanisms into the light and could become a future therapy

Ugeskr Læger 2015;177:V06150501

Optogenetics is an emergent technology that combines light-sensitive proteins derived from algae, so-called opsins, with genetics. Viral vectors encoding opsins are injected into selective brain regions whereby specific cell populations can be controlled with high precision light pulses delivered via implanted optical fibres. This review focuses on explaining basic principles of optogenetics and describes important insights into neuropsychiatric mechanisms provided by the technology.

KORRESPONDANCE: David P.D. Woldbye, Laboratorium for Neural Plasticitet, Institut for Neurovidenskab og Farmakologi, Københavns Universitet, Symbion, Fruebjergvej 3, 2100 København Ø. E-mail: woldbye@sund.ku.dk

ANTAGET: 29. juli 2015

PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK: 17. august 2015

INTERESSEKONFLIKTER: Forfatterens ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

TAKSIGELSE: Lizzie Buchen, freelance sciencejournalist, har udarbejdet figur om optogenetik, som forfatterne har modificeret under udformning af Figur 1 i nærværende manuskript.

LITTERATUR

- Nature_Methods. Method of the Year 2010; Available from: www.nature.com/nmeth/journal/v8/n1/full/nmeth.f.321.html (31. jul 2015).
- Deisseroth K. Optogenetics. *Nature Methods* 2011;8:26-9.
- Buchen L. Illuminating the brain. *Nature* 2010;465:26-8.
- Smedemark-Margulies N, Trapani JG. Tools, methods, and applications for optophysiology in neuroscience. *Front Mol Neurosci* 2013;6:18. http://web.stanford.edu/group/dlab/optogenetics/request_dna.html (31. jul 2015).
- Spoidaa K, Masseck OA, Deneris ES et al. Gq/5-HT2c receptor signals activate a local GABAergic inhibitory feedback circuit to modulate serotonergic firing and anxiety in mice. *PNAS* 2014;111:6479-84.
- Chuong AS, Miri ML, Busskamp V et al. Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. *Nature Neurosci* 2014;8:1123-9.
- Tsai HC, Zhang F, Adamantidis A et al. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* 2009;324:1080-4.
- Britt JP, Bonci A. Optogenetic interrogations of the neural circuits underlying addiction. *Current Opinion Neurobiol* 2013;23:539-45.
- Witten IB, Lin SC, Brodsky M et al. Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science* 2010;330:1677-81.
- van Zessen R, Phillips JL, Budygin EA et al. Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption. *Neuron* 2012;73:1184-94.
- Stuber GD, Sparta DR, Stamatakis AM et al. Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. *Nature* 2011;475:377-80.
- Chaudhury D, Walsh JJ, Friedman AK et al. Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* 2013;493:532-6.
- Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR et al. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature* 2013;493:537-41.
- Francis TC, Chandra R, Friend DM et al. Nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes mediate depression-related outcomes to social defeat stress. *Biol Psychiatry* 2015;77:212-22.
- Ahmari SE, Spellman T, Douglass NL et al. Repeated cortico-striatal stimulation generates persistent OCD-like behavior. *Science* 2013;340:1234-9.
- Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM et al. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 2007;450:420-4.
- Sharma P, Pienaar IS. Pharmacogenetic and optical dissection for mechanistic understanding of Parkinson's disease: potential utilities revealed through behavioural assessment. *Neurosci Biobehav Rev* 2014;47:87-100.
- Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR et al. Optical deconstruction of Parkinsonian neural circuitry. *Science* 2009;324:354-9.
- Yoon HH, Park JH, Kim YH et al. Optogenetic inactivation of the subthalamic nucleus improves forelimb akinesia in a rat model of Parkinson disease. *Neurosurgery* 2014;74:533-40.
- Tønnesen J, Sørensen AT, Deisseroth K et al. Optogenetic control of epileptiform activity. *PNAS* 2009;106:12162-7.
- Wykes RC, Heeroma JH, Mantoan L et al. Optogenetic and potassium channel gene therapy in a rodent model of focal neocortical epilepsy. *Science Transl Med* 2012;4: 161ra152.
- Krook-Magnuson E, Armstrong C, Dijkstra M et al. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nature Commun* 2013;4:1376.
- Barrett JM, Berlinguer-Palmini R, Degenaar P. Optogenetic approaches to retinal prosthesis. *Visual Neurosci* 2014;31:345-54.
- Bi A, Cui J, Ma YP et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 2006;50:22-33.
- Hernandez VH, Gehrt A, Reuter K et al. Optogenetic stimulation of the auditory pathway. *J Clin Invest* 2014;124:1114-29.
- Entcheva E. Fiat lux in understanding cardiac pacing, resynchronization and signaling by way of optogenetics. *Cardiovascular Res* 2014;102:342-3.
- Abilez OJ, Wong J, Prakash R et al. Multiscale computational models for optogenetic control of cardiac function. *Biophys J* 2011;101:1326-34.
- Han X, Qian X, Bernstein JG et al. Millisecond-timescale optical control of neural dynamics in the nonhuman primate brain. *Neuron* 2009;62:191-8.