

OPTOGENETİK

Dr. Mahir E. Ocak [TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi

Canlı dokulardaki hücrelerin -özellikle nöronların- etkinliklerinin ışıkla kontrol edildiği biyolojik yöntemler, optogenetik adı altında sınıflandırılıyor. Geçtiğimiz on yılda, nöronların etkinleştirilmesine ya da pasifleştirilmesine imkân veren bu yöntemlerin kullanıldığı araştırmalar sonucunda sinirbilimde çok önemli gelişmeler yaşandı.

Giriş

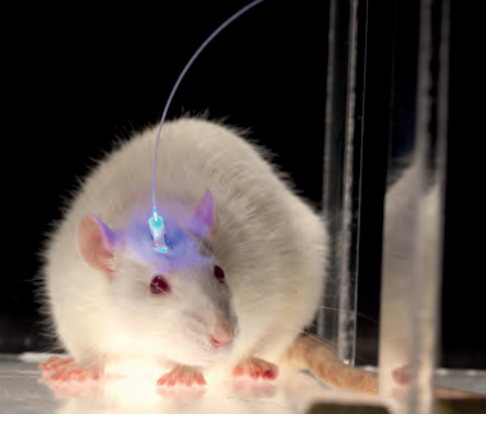
Sinirbilim, beyin etkinlikleriyle bilişsel süreçler arasındaki ilişkiyi açıklamaya çalışır. Bu amaca ulaşılması için yapılması gereken şey, beyin farklı bölgelerinin hangi süreçlerle alakalı olduğunun belirlenmesi ve bu bölgelere müdahalede bulunulduğunda bilişsel süreçlerin nasıl etkilendiğinin incelenmesidir. Ancak beyin farklı morfolojilere ve bileşimlere sahip çeşitli türde nöronlardan (sinir hücrelerinden) oluşan çok karmaşık bir organdır.

Öyle ki yıllardır yapılan araştırmalara rağmen gün geçtikçe yeni nöron türleri bulunuyor ve bilinen nöron türlerinin yeni işlevleri keşfediliyor.

Beyindeki farklı tür nöronların bilişsel süreçleri yerine getirmek için nasıl bir araya geldiğinin anlaşılabilmesi ve her bir nöronun sinir ağlarındaki rolünün ayrı ayrı belirlenebilmesi için ideal olarak nöronların etkinliklerinin kontrol edilebilmesi istenir.

Örneğin bir grup nöron etkinleştirilerek neden oldukları davranışlar, parçası oldukları mekanizmalar ya da yol açabilecekleri sağlık sorunları belirlenebilir. Benzer biçimde bir grup nöron pasifleştirilerek hangi beyin fonksiyonları için gerekli oldukları ve işlevlerini tam anlamıyla yerine getiremediklerinde hangi sağlık sorunlarının ortaya çıktığı anlaşılabilir. Optogenetik olarak adlandırılan, nöron etkinliklerinin ışıkla kontrol edildiği biyolojik yöntem de tam olarak bu işe yarıyor.





Optogenetiğin Tarihi

Richard Fork, 1971 yılında lazer ışığı kullanarak bir deniz yumuşakçasunun sinir hücrelerini etkinleştirmeyi başarmıştı, ancak bunu yaparken belirli bir grup sinir hücresini hedef almamıştı. Beyindeki çeşitli türde hücrelerin bir grubunu seçici bir biçimde ışık kullanarak kontrol etme fikri ilk olarak Francis Crick tarafından 1999 yılında dile getirildi. İlk başarılı çalışmaya birkaç yıl sonra Boris Zemelman ve Gero Miesenböck tarafından gerçekleştirildi. Araştırmacılar drozofila olarak adlandırılan bir tür meyve sineğinin ışık reseptörlerini kullanarak memeli hayvanlara ait bir sinir hücresi kültüründeki sinir etkinliklerini kontrol etmeyi başardı. Işık kullanarak hayvan davranışlarını etkilemeyi başaran ilk kişilerse Susana Lima ve Gero Miesenböck oldu. Araştırmacılar 2005 yılının Nisan ayında *Cell*'de yayımladıkları makalede bir grup nöronun ışıkla uyurulması sonucunda meyve sineklerinde belirgin

davranış değişiklikleri ortaya çıktığını gösterdi. İlerleyen zamanlarda optogenetik yöntemler kullanılarak pek çok araştırma yapıldı. Bu araştırmalar arasında farelerin hafızalarına müdahale edilmesi ile susama ve avlanmayla ilgili mekanizmaların incelenmesi sayılabilir.

DeneYlerin Yapılışı

Optogenetik deneyler için gerekli en önemli şey opsin olarak adlandırılan, ışığa duyarlı proteinlerdir. Bu moleküller üzerlerine ışık düştüğünde belirli iyonların hücre zarlarının bir tarafından diğer tarafına geçmesini sağlar. Dolayısıyla bu molekülleri ışıkla uyurarak canlı dokulardaki elektriksel ve biyokimyasal süreçleri etkilemek mümkündür. Opsinlerle ilgili 1970'lerden beri bilimsel çalışmalar yapılıyor. İlk çalışmalar daha çok bu moleküllerin yapısal özellikleri ve farklı organizmaların bu molekülleri kullanarak nasıl ışıktan enerji kaynağı olarak yararlandıkları hakkındaydı. Örneğin bakteriyorodopsin 1970'lerin başlarında keşfedilmişti. Bu molekül yeşil ışıkla etkileştiğinde protonları hücre dışına pompalar. Halorodopsin olarak adlandırılan bir başka opsin molekülüyse turuncu ışığa karşı duyarlıdır.

1970'lerin sonlarında keşfedilen bu molekül klor iyonlarını hücre içine pompalar. Bu opsinlerin her ikisi de *Halobacterium salinarum* olarak adlandırılan, çok tuzlu ortamlarda yaşayan bir tür tek hücreli canlıda keşfedilmişti. İlk duyuşal rodopsin de 1980'lerde yine aynı organizmada keşfedildi ve canlının ışığa yönelmesini sağlıyordu. Daha sonraları yapılan çalışmalar sonucunda bakterilerde, mantarlarda ve alglerde çok çeşitli iyon aktarıcı rodopsinler ve duyuşal rodopsinler keşfedildi.

Nöronların ışıkla kontrol edilmesi düşüncesinin gerçeğe dönüştürülebilmesi için öncelikli olarak nöronlarda çalışabilecek bakteriyorodopsinlerin ve halorodopsinlerin bulunması gerekiyordu. Eğer böyle moleküller bulunabilirse yüklü iyonları nöronların zarlarının bir tarafından diğer tarafına aktarmak ve böylece nöronlardaki elektriksel süreçleri etkilemek mümkün olabilirdi. Bu taktiğin çalışması için gerekli olan şey, opsinin nöron ortamında işlevini yerine getirebilmesidir çünkü her molekül her ortamda çalışmaz. Örneğin halorodopsinlerin büyük çoğunluğu o molekülleri kullanan tek hücreli organizmanın doğal yaşam alanı olan yüksek tuzlu ortamlarda etkindir.

Ancak 1999 yılında yayımlanan bir makale, bilimsel adı *Natronomonas pharaonis* olan ve canlılarda bulunan bir tür halorodopsinin memeli hayvanların beyinlerindeki klor iyonu seviyelerinde de gayet iyi bir biçimde iyon pompalama işlevini yerine getirebildiğini gösteriyordu. Daha sonraları sinir sistemlerindeki nöronları aktifleştirmek ya da pasifleştirmek için kullanılacak çok sayıda başka opsin molekülleri bulundu. Örneğin ChR1, ChR2, VChR1 ve SFO nöronları aktifleştirmek NpHR, eNpHR2.0, eNpHR3.0 ve Arch ise nöronları pasifleştirmek için kullanılan opsinden bazıları.

Opsinlerin optogenetik deneylerde kullanılabilmesi için tabii ki öncelikli olarak üzerinde deney yapılacak hayvanın beyindeki hedeflenen sinir hücresi gruplarına aktarılmaları gerekiyor. Günümüzde bu amaçla kullanılan çeşitli yöntemler var. İlk olarak genetiği değiştirilmiş virüslerden bahsedilebilir. Virüsler genlerini bulaştığı hücrelere aktarmak için özelleşmiş moleküler mekanizmalara sahiptir. Bu yaklaşımda, istenilen opsinin üretilmesini sağlayacak genler bir virüsün genomuna yerleştirilir

ve virüs deney yapılacak canlının vücuduna aktarılır. Daha sonra virüsün genlerini hedeflenen sinir hücrelerine aktarması ve arzu edilen opsinin bu hücrelerde üretilmesi umulur. Başka bir yaklaşım transgenik canlılar -örneğin fareler- kullanmaktır. Bu yaklaşımda opsinin üretilmesini sağlayacak genler farelerin zigotlarına yani döllenmiş yumurtalarına aktarılır ve gelişen yavruların sinir hücrelerinde opsinlerin üretilmesi beklenir.

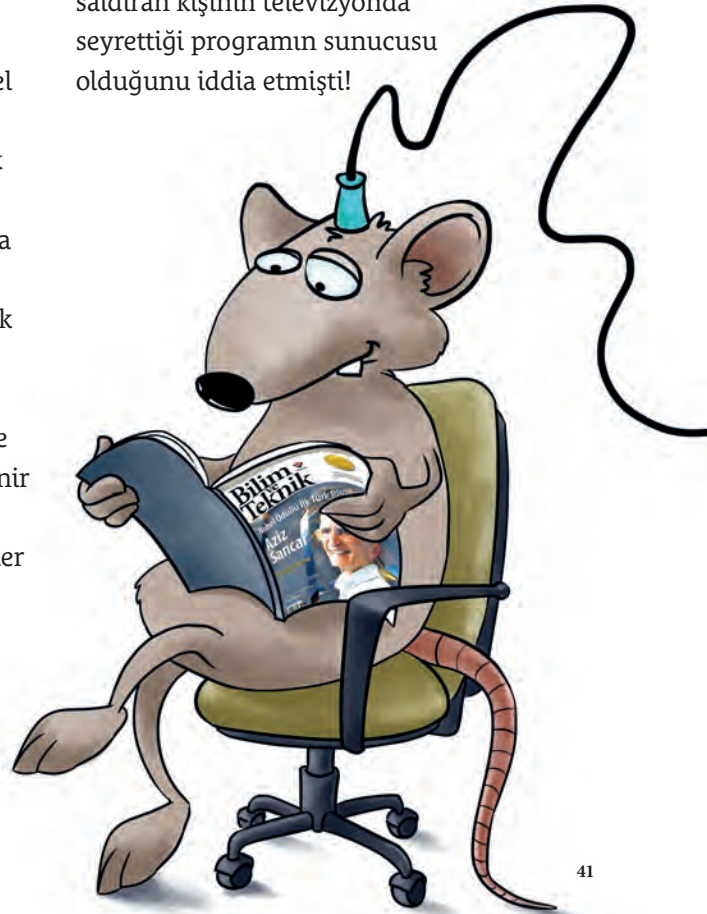
Deneyler için gerekli bir diğer şey, hayvanların beyinlerinin derinlerindeki sinir hücrelerine müdahale etmeyi sağlayan donanımlardır. Bu amaçla genel olarak fiber optik bağlantılı diyot teknolojilerinden yararlanılıyor. Beynin yüzeysel bölgelerini -örneğin beyin zarını- ışıkla uyarmak için ışık ileten kablolar ya da LED'ler doğrudan hayvanın kafasına bağlanıyor. Daha derinlerdeki hücreleri uyarmak içinse optik fiberlerin bu bölgelere kadar uzanması gerekiyor. Ayrıca hayvanın kafasındaki LED'lere kablosuz enerji aktarımıyla sinir hücrelerinin uyarıldığı yöntemler de var. Bu yöntemler hayvanların laboratuvar ortamında daha serbestçe hareket etmelerine imkân verdiği için karmaşık davranışları incelemeye daha uygun.

Uygulamalar

Optogenetik yöntemler kullanılarak fare, sıçan, primatlar, meyve sinekleri ve zebra balığı da dâhil olmak üzere çeşitli hayvanlar üzerinde deneyler yapıldı. Elde edilen sonuçlar sinir sistemlerinin yapısı ve işleyişi hakkında çok önemli bilgiler verdi.

Hafıza

Bazı koşullar altında beyinde tamamen yanlış anıların depolanması mümkündür. Bu durumun çok aşırı örnekleri de vardır. Örneğin evinde televizyon seyrettiği sırada saldırıya uğrayan bir kadın daha sonraları ısrarla kendisine saldıran kişinin televizyonda seyrettiği programın sunucusu olduğunu iddia etmişti!



Massachusetts Teknoloji Enstitüsü'nde çalışan bir grup araştırmacı, optogenetik yöntemlerle farelerin hafızalarında yanlış anıların depolanmasına yol açan bir mekanizma keşfetti ve bu mekanizmayı kullanarak bir farenin beynine yanlış anılar depolamayı başardılar.

Fareler de insanlar gibi yaşadıklarını hafızalarına kaydeder. Örneğin bir fare geçmişte acı hissettiği bir ortama daha sonra tekrar dönerse, yaşadıkları aklına gelir ve korkudan hareketsizleşir. Dr. Steve Ramirez ve arkadaşları *Science*'ta yayımladıkları makalede detaylı bir biçimde açıkladıkları çalışmalarına başlarken beyindeki hipokampus bölgesinin hafıza oluşumundan sorumlu olduğunu ve hipokampusun belirli bir bölgesindeki sinir hücrelerini uyararak bir fareye geçmişte yaşadığı elektrik şoklarını hatırlatabileceklerini biliyorlardı. Amaçlarıysa bu acılı deneyimi farenin aslında hiç acı hissetmediği başka bir ortamla ilişkilendirmektir.

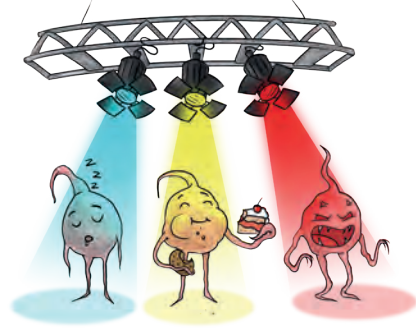
Araştırmacılar ilk olarak bir fareyi daha önce hiç görmediği, siyah zeminli, loş kırmızı ışık ve asetik asit kokusu bulunan bir kafesin içine bırakmış ve ortamı keşfetmesini beklemiş. Ertesi gün fare renklerin, ışıkların ve kokuların tamamen farklı olduğu, ilkinde hiç

benzemeyen, başka bir kafese konmuş ve ayaklarına hafif elektrik şokları uygulanmış. Bu sırada farenin beynine bağlanan optik fiberler üzerinden mavi ışık gönderilerek bir önceki gün fare ilk kafesi keşfederken etkinleşen nöronlar uyarılmış. Böylece farenin yaşadığı acı dolu deneyimi hiç acı hissetmediği ilk kafesle ilişkilendirmesi bekleniyormuş. Daha sonraları yapılan deneyler bu beklentinin gerçekleştiğini gösteriyor. Fare ilk kafesin içine konulduğunda korkudan hareketsizleşiyor, diğer ikisine hiç benzemeyen başka ortamlar bırakıldığında hiçbir korku belirtisi görülüyor. Bu sonuçlar farenin ilk kafesin içine bırakıldığında başka bir ortamda yaşadığı acı dolu anıları hatırladığını, yani bu ortamı yanlış bir biçimde acı dolu anılarla ilişkilendirdiğini gösteriyor.

Susama

Optogenetik yöntemler kullanılan bir başka önemli çalışma Columbia Üniversitesi araştırmacıları tarafından yapıldı. Yuki Oka, Mingyu Ye ve Charles S. Zuker, 2015 yılında *Nature*'da bir makale yayımladılar. Sonuçlar fareleri su içmeye yönlendiren ya da su içmekten kaçınmalarına sebep olan iki ayrı sinir hücresi grubu olduğunu gösteriyordu.

Bir gruptaki nöronlar ışıkla uyarıldığında fareler iştahlı bir biçimde su içmeye başlıyor ve uyarılma devam ettiği sürece vücut ağırlıklarının %8'ine kadar su içebiliyorlar. Işık kapatıldığında su içmeyi bırakıyorlar. Bu nöronlarla ilgili önemli bir nokta, sadece su içmeyle alakalı olmaları. Deneyler, keşfedilen nöronlar uyarılsa bile farelerin su dışındaki sıvıları içmediğini gösteriyor. Diğer gruptaki nöronlarsa tam tersi etkiye sahip. Bu gruptaki hücreler ışıkla uyarıldığında fareler susuzluktan ölmek üzere bile olsalar su içmekten kaçınıyorlar.



Tanımlanan sinir hücresi gruplarının her ikisi de beyin hipotalamus bölgesinin içinde keşfedilmiş. Araştırmacılar, bu nöronların susamayla ilgili, çok daha büyük bir sinir hücresi ağının parçaları olduğunu söylüyor. Keşfedilenlerden ayrı ya da keşfedilenlerle beraber çalışan başka sinir hücresi bölgeleri de olmalı. Çünkü beyinlerinin başka bir bölgesinde hasar olan bazı hastaların susamayla ilgili sorun yaşadığı biliniyor.

Avlanma

ABD'deki ve Brezilya'daki çeşitli üniversitelerde ve araştırma enstitülerinde çalışan bir grup araştırmacı yakın zamanlarda optogenetik yöntemler kullanarak fareleri avlanmaya yönelten mekanizmaları keşfetti. Dr. Wenfei Han ve arkadaşlarının *Cell*'de yayımladıkları makaleye göre farelerin avlanma sırasındaki davranışlarını yönlendiren iki ayrı mekanizma var. Kısaca PAG olarak adlandırılan mekanizma av takibiyle ilgili, PCRt olarak adlandırılan mekanizmaya ısırma. PAG mekanizmasındaki nöronların ışıkla uyarılması farelerin daha hızlı ya da daha yavaş hareket etmesine sebep olurken PCRt mekanizmasındaki nöronların uyarılması avın daha güçlü ya da daha zayıf ısırılmasına neden oluyor. Her iki mekanizma aynı anda uyarıldığında fareler avlanma sırasındaki tüm davranışları sırasıyla yapmaya başlıyor.

Deneyler sırasında fareler içinde çekirge bulunan bir kafese bırakılmış. Avlanmayla ilgili nöronlar pasif durumdayken fareler çekirgelere saldırmıyor. Ancak nöronlar ışıkla uyarılınca her şey tamamen değişiyor. Fareler boyunlarını dikleştiriyor, avının yerini buluyor, onu takip ediyor ve ısırarak öldürüyor.



Araştırmacılar her iki mekanizmanın da uyarılması durumunda farelerin karşılımlarına çıkan hemen hemen her şeye -çekirgeler, odun parçaları, şişe kapakları- saldırmaya ve ısırma başladığını söylüyor. Ancak fareler yine de güç yetirebilecekleri ufak şeylere saldırmaya dikkat ediyor. Örneğin etraftaki diğer farelere saldırmıyorlar. Bu durum keşfedilen sinirlerin beynin başka bölgeleri tarafından kontrol edildiğini gösteriyor.

Sonuç

Nöronların ışıkla uyarılmasına dayalı optogenetik yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar sayesinde yakın zamanlarda sinirbilim alanında çok önemli gelişmeler yaşandı. Yıllardır optogenetik üzerine araştırmalar yapan ve bu alana önemli katkılarda bulunan Edward Boyden, ilk zamanlardaki başarılarını biraz da şans eseri olduğunu,



ancak zamanla çalışmaların daha sistematik bir hale geldiğini belirtiyor. Artık optogenetik çalışmalar için özel olarak tasarlanmış makineler ve algoritmalar var. Gelecekte yapılacak çalışmalar sayesinde beynin yapısının ve işleyişinin giderek daha iyi anlaşılacağını söyleyebiliriz. Bu durum sadece bilgi birikimimizi artırmakla kalmayacak aynı zamanda beyinle ilgili sağlık sorunlarının tedavisinde de yararlı olacaktır. ■

Çizim: Ahmet Beşir Sancar

Kaynaklar

- Boyden, E. S., "A history of optogenetics: the development of tools for controlling brain circuits with light", *Biology Reports*, Cilt 3, Makale No:11, 2011.
- Servick, K., "Total recall for mice", *Science*, <http://www.sciencemag.org/news/2013/07/total-recall-mice>, 2013.
- Ramirez, S. ve ark., "Creating a false memory in the hippocampus", *Science*, Cilt 341, s. 387, 2013.
- Rood, J., "Thirst neurons found", *The Scientist*, <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/41987/title/Thirst-Neurons-Found/>, Makale No:41987, 2015.
- Oka, Y. ve ark., "Thirst driving and suppressing signals encoded by distinct neural populations in the brain", *Nature*, Cilt 520, s. 349, 2015.
- Lallensack, R., "Laser turn mice into lethal hunter", *Science*, <http://www.sciencemag.org/news/2017/01/lasers-turn-mice-lethal-hunters>, 2017.
- Han, W. ve ark., "Integrated control of predatory hunting by the central nucleus of the amygdala", *Cell*, Cilt 168, s. 311, 2017.