

Metody optogenetyczne w służbie neuronauki i medycyny

Optogenetic methods in the service of neuroscience and medicine

Katarzyna Gralec^{1,2}, Natalia Kuś^{1,3}, Wojciech Solecki^{1,3*}

¹ Zakład Neurofarmakologii Molekularnej, Instytut Farmakologii PAN, Kraków, Polska;

² Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków Polska;

³ Zakład Neurobiologii i Neuropsychologii, Instytut Psychologii Stosowanej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków. Polska.

STRESZCZENIE: Optogenetyka jest młodą techniką badawczą, która znajduje obecnie szerokie zastosowanie w neuronaukach. Dzięki innowacyjnemu podejściu możliwe jest ukazanie związków pomiędzy aktywnością określonych układów neuronalnych a zachowaniem. Omawiana metoda badawcza wykorzystuje najnowsze osiągnięcia inżynierii genetycznej i technik optycznych. Polega na wprowadzeniu do komórki nerwowej egzogennych kanałów jonowych, które następnie ulegają wbudowaniu w błonę neuronu i reagują otwarciem na bodziec świetlny. Efektem tego jest przepływ jonów, a w konsekwencji aktywacja bądź inhibicja neuronu. Największą zaletą optogenetyki jest fakt, że można ją stosować *in vivo*, dzięki czemu uzyskano możliwość kontroli w czasie rzeczywistym aktywności zdefiniowanych populacji komórek nerwowych u zwierząt swobodnie poruszających się i wykonujących złożone testy behawioralne. Celem niniejszej pracy było (i) przybliżenie schematów eksperymentalnych wykorzystujących narzędzia optogenetyczne oraz (ii) przegląd prac badawczych z zakresu uzależnień, depresji, lęku oraz choroby Parkinsona, w których posłużono się optogenetyką. Wyboru prac dokonano na podstawie wyników wyszukiwania w bazie Pubmed haseł takich jak optogenetics, channelrhodopsin i halorhodopsin. Syntetyczne zestawienie wyników badań analizowanych prac wskazuje na rolę optogenetyki w odkrywaniu relacji przyczynowo skutkowych pomiędzy badanym zjawiskiem (np. efekt nagradzający) a (i) aktywnością (np. fazowa ale nie toniczna) poszczególnych populacji neuronów (np. neuronów dopaminergicznych w polu brzusznej nakrywki), (ii) ich specyficznych projekcji (np. do bocznej części skorupy jądra półleżącego), oraz (iii) włókien wstępujących tworzących z danymi neuronami funkcjonalne synapsy (np. z bocznogrzebietowej nakrywki). Podsumowując, wyniki badań z zastosowaniem optogenetyki wykazały rolę specyficznych systemów neuronalnych oraz dynamikę ich aktywności w modulowaniu zachowania charakterystycznego zarówno dla normy jak i zaburzeń psychiatrycznych.

SŁOWA KLUCZE: kanałorodopsyna • halorodopsyna • uzależnienia • depresja • choroba Parkinsona

ABSTRACT: Optogenetics is a novel approach in neuroscience studies that enables to demonstrate a relation between an activity of particular neuronal circuits and a behavior. The discussed method is based on recent findings in genetic engineering and optical techniques allowing the introduction of light-sensitive membrane ion channels into neurons. A pulse of light opens the channel resulting in an ion flow, change of membrane potential and consequently, activation or inhibition of certain neuron. The main advantage of optogenetics is its application *in vivo*, which allows to control the activity of individual neurons in real-time, even in freely-moving animals during complex behavioral tasks. Our goal was to describe experimental protocols using optogenetic tools along with their advantages and review experimental studies which use optogenetics to examine neuronal bases of addiction, depression, anxiety and Parkinson's disease. The selection of papers was made by Pubmed search by keywords: optogenetics, channelrhodopsin and halorhodopsin. The synthesis of results allowed to

point to the role of optogenetics in demonstrating causative relation between particular behavioral phenomena (e.g. reward) and (i) activity (e.g. phasic but not tonic) of defined neural population (e.g. dopaminergic neurons of the lateral ventral tegmental area), (ii) their projections (e.g. fibers projecting to the lateral shell of nucleus accumbens), and (iii) inputs (e.g. from the laterodorsal tegmentum). In summary, the results of optogenetic studies have revealed the role of specific neural systems and the dynamic of their activity in the modulation of the behavior that can be seen both in normal conditions and in psychiatric disorders.

KEY WORDS: channelrhodopsin • halorhodopsin • addiction • depression • Parkinson's disease

WSTĘP

W ciągu ostatnich kilku lat optogenetyka stała się jedną z najbardziej obiecujących metod badawczych, łącząc osiągnięcia optyki, genetyki i bioinżynierii. Pozwala ona kontrolować aktywność neuronów (i innych komórek pobudliwych) za pomocą sztucznie wprowadzanych na ich błonę komórkową białek światłoczułych – opsyn. Dzięki niej możliwe stało się pobudzanie oraz hamowanie zdefiniowanych przez badacza neuronów; jednocześnie technika optogenetyczna charakteryzuje się nieporównanie większą precyzją tego rodzaju manipulacji niż dotychczas stosowane metody, wykorzystujące farmakologię czy stymulację elektryczną. Co ważne, oddziaływanie na komórki nie pociąga za sobą niepożądanych reakcji komórek im sąsiadujących. Udaje się również uniknąć powstawania niefizjologicznych zmian w badanych neuronach czy sieciach neuronalnych, co stanowi kolejną przewagę optogenetyki nad metodami klasycznymi.

Obecnie optogenetyka znajduje zastosowanie przede wszystkim w neuronauce, w eksperymentach polegających na precyzyjnej stymulacji głębokich struktur mózgu u zwierząt transgenicznym. Możliwość wybiórczej aktywacji konkretnej grupy neuronów w ramach badania swobodnie poruszających się zwierząt, stwarza realną szansę pełniejszego zrozumienia fizjologii oraz funkcji wielu układów czynnościowych mózgu (np. układu motywacji, układu nagrody). Niniejszy artykuł wskazuje także na inne zastosowania optogenetyki, która coraz częściej bywa wykorzystywana w badaniu przyczyn i ewentualnych sposobów leczenia zaburzeń o podłożu organicznym, takich jak schizofrenia, choroba Parkinsona i epilepsja [8], a także w badaniu transmisji informacji bólowej [7] (patrz: omówienie artykułu na stronie XX). Coraz częściej mówi się także o wykorzystaniu tej metody w leczeniu bólu czy regulowaniu czynności serca [3], również u ludzi. Wydaje się, że metoda ta otwiera przed nauką zupełnie nowe możliwości, które prowadzić mogą do pełniejszego zrozumienia fizjologii organizmów żywych.

OPSYNY

Powstanie optogenetyki możliwe było dzięki odkryciu światłoczułego białka o nazwie kanałorodopsyna (ChR),

a dokładniej dwóch jego podtypów (kanałorodopsyna-1 i kanałorodopsyna-2; ang. ChR1 i ChR2). Białka te występują u alg z rodzaju *Chlamydomonas*; służą im do fototaksji w głębinach toni morskiej. ChR1 ma budowę protonowego kanału błonowego i reaguje otwarciem na światło o długości fali 470 nm (światło niebieskie). ChR2 wykazuje podobne właściwości, przy czym o zasadniczej różnicy stanowi rodzaj przewodzonych przez to białko jonów – jest ono nieselektywnym kanałem kationowym. Zainspirowani właściwościami ChR2, badacze K. Disseroth i E.S. Boyden stworzyli narzędzie, którego założenia można zasadniczo sprowadzić do jednego zdania – jeżeli po wprowadzeniu kanałorodopsyny-2 do neuronu pobudzimy ją z pomocą niebieskiej wiązki światła laserowego, nastąpi swobodny przepływ kationów w obrębie błony komórki i miejscowa depolaryzacja; natomiast synchronizacja czasowa i przestrzenna podobnych zdarzeń spowoduje powstanie potencjału czynnościowego [2].

Wkrótce po rozpoczęciu eksperymentów polegających na stymulacji różnych struktur neuronalnych z użyciem ChR2, podjęto poszukiwania podobnych opsyn, które mogłyby posiadać nieco odmienne właściwości. Starania te zaowocowały wprowadzeniem halorodopsyny (NpHR), pompy chlorkowej pochodzącej z *Natronomonas pharaonis* (organizm z klasy Halobakterii), która aktywując się pod wpływem światła żółtego (580nm) wywołuje znaczącą hiperpolaryzację błony komórkowej, uniemożliwiając powstanie potencjału czynnościowego. Właściwości ChR2 i NpHR powodują, że białka te mogą znajdować się na jednej komórce, co umożliwia naprzemienne pobudzanie i hamowanie tego samego neuronu przy zastosowaniu światła niebieskiego lub żółtego [44].

WEKTORY WIRUSOWE, EKSPRESJA OPSYN I METODY STYMULACJI

Techniczną podstawą metody jest wprowadzenie sekwencji nukleotydowej kodującej opsynę na wybranym nośniku (wektorze) do tkanek w interesującym nas obszarze, gdzie pod kontrolą tkankowo-specyficznych promotorów dochodzi do jej ekspresji. Wektorami dla białek światłoczułych mogą być rekombinowane wiru-

sy AAV (*Recombinant Adeno-Associated Virus*, rAAV). Ich wprowadzenie do organizmu nie powinno powodować reakcji immunologicznych (z wyłączeniem odpowiedzi na samą iniekcję wirusa), gdyż ekspresji nie ulegają białka wirusowe, czyli potencjalne antygeny. Niestety, istnieją pewne doniesienia o immunogenności niektórych wektorów AAV o określonym serotypie lub niosących określony konstrukt [24]. Niewątpliwymi zaletami rAAV są wysoka i długotrwała ekspresja niesionych przez nie genów, umiejętność transdukcji niedzielących się komórek, a także prawdopodobna integracja z genomem gospodarza. Wadę natomiast stanowi ich niewielka pojemność (4,5 kpz), która ogranicza wielkość promotora, niezbędnego do ekspresji transkryptu [23].

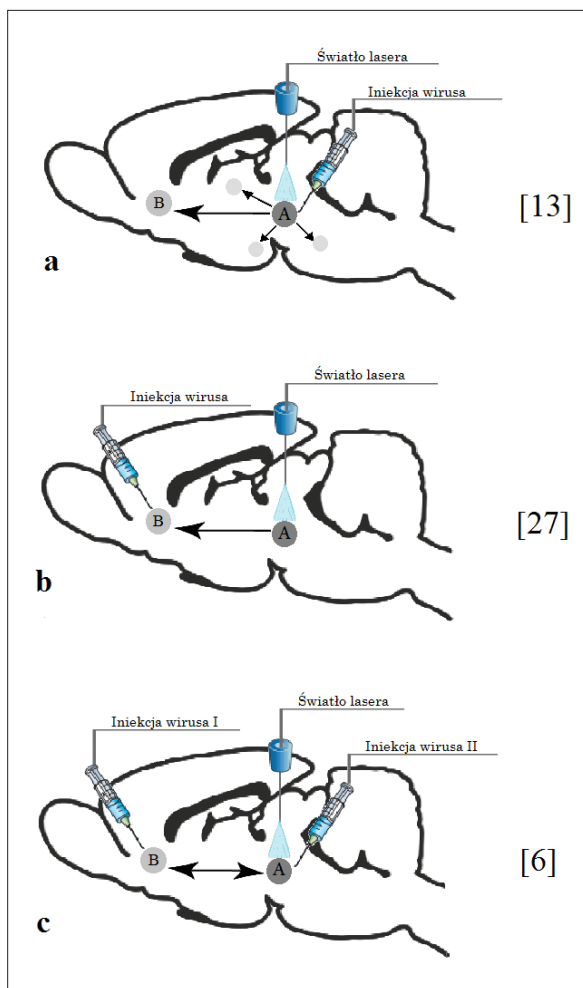
Mimo obiecujących wyników wydaje się, że metoda ta w najbliższym czasie nie znajdzie bezpośredniego zastosowania w medycynie i jej wykorzystanie ograniczone będzie do sytuacji eksperymentalnych. Wynika to z faktu, że w optogenetyce szczególnie ważna jest precyzyjna, ograniczona do konkretnych populacji komórek, ekspresja opsyn. W tym celu zaś niezbędne jest poprawne dopasowanie promotora, który zostanie umieszczony w wektorze przed opsyną, tak by został on aktywowany za pomocą czynników tkankowo-specyficznych gospodarza. Należałoby zatem eksperymentalnie znaleźć dla każdej tkanki odpowiedni dla niej wirusowy promotor, co w praktyce może okazać się trudne, jeśli nie niewykonalne. Co więcej, taki promotor powinien charakteryzować się również wysoką wydajnością, a jednocześnie być nieskomplikowany w budowie, przy czym ten drugi warunek narzucony jest wspomnianą ograniczoną pojemnością wektora rAAV. W praktyce badań eksperymentalnych stosuje się więc zwierzęta transgeniczne, które są zmodyfikowane tak, by uniwersalny wektor rAAV z opsyną uległ ekspresji tam, gdzie umożliwi mu to genotyp danego organizmu. Przykładową modyfikacją organizmu transgenicznego może być wbudowanie sekwencji enzymu rekombinazy Cre w taki sposób, by enzym ulegał ekspresji pod kontrolą promotora specyficznego dla komórki np. dopaminergicznej (rekombinaza Cre umieszczona jest pod promotorem genu kodującego transporter dopaminy; DAT^{Cre+}). Rekombinaza uaktywnia sekwencję niesioną przez rAAV, co umożliwia jej późniejsze czytanie i ekspresję. Jest to niewątpliwie łatwiejsza strategia niż każdorazowe dopasowywanie promotora do pożądanej tkanki. Przydatne mogą być też inne wektory wirusowe z grupy lentiwirusów, gdyż są nieco bardziej pojemne niż rAAV (~5 kpz.). Jedno z pierwszych udanych ich zastosowań w optogenetyce, gdzie obiektem badawczym były niemodyfikowane genetycznie zwierzęta, miało miejsce w 2009 roku [12]. Skonstruowano wówczas wektor na bazie lentiwirusa, składający się z opsyny i promotora α -CaMKII, który to czynnik jest markerem neuronów glutaminianergicznych. Otrzymany wektor podano do kory czołowej makaka; w odpowiedzi uzy-

skano znakomitą ekspresję światłoczułych kanałów w pożądanych regionach OUN. Dzięki temu możliwe było, w trakcie wybranych testów behawioralnych, sterowanie aktywacją neuronów glutaminianergicznych kory czołowej.

Ekspresja zmodyfikowanych opsyn na błonie neuronu nie powoduje zmian w fizjologii komórki. Białka te wydają się również nie wywoływać objawów toksyczności [12]. ChR2 wykazuje niezwykle szybką reakcję na błysk świetlny – już w 50 μ s po zadziałaniu bodźca następuje depolaryzacja komórki pobudliwej. Standardową metodą służącą wywołaniu tego efektu jest oświetlanie neuronu techniką pulsacyjną, w czasie którego rejestruje się regularne wyładowania o wysokiej amplitudzie. Zaletą jest szybki powrót komórki do stanu spolaryzowania; co więcej, czas inaktywacji nawet po 1-godzinnej stymulacji wydaje się być stosunkowo krótki [2]. Dzięki temu możliwa jest kontrola wyładowań w czasie rzeczywistym, co z kolei ma fundamentalne znaczenie w badaniu przebiegu pojedynczych potencjałów czynnościowych czy przewodnictwa synaptycznego.

W badaniach z obszaru nauki o układzie nerwowym znanych jest kilka sposobów dostarczenia wirusa do pożądanej subpopulacji komórek. W badaniach z użyciem zwierząt transgenicznych wykazujących tkankowo-specyficzną ekspresję rekombinazy Cre wykorzystuje się dwa modele: anterogradny i retrogradny. Na Rycinie 1 przedstawiono potencjalne zastosowanie optogenetyki do zbadania funkcji neuronów projektujących ze struktury A do B. W modelu anterogradnym, wirus wstrzykiwany jest do A i ulega ekspresji w całym neuronie projektującym z A, także w jego zakończeniach aksonalnych. W tym przypadku światło lasera może być nakierowane na strukturę A (jest to metoda mniej dokładna, gdyż aktywacji/hamowaniu mogą również ulec inne struktury otrzymujące projekcje z A; Ryc.1.a), bądź na zakończenia aksonalne, dochodzące do struktury B (bardziej specyficzne, [13]). W pierwszym przypadku badane są funkcje aktywności zdefiniowanych populacji neuronów struktury A. W drugim natomiast, możliwe jest poznanie funkcji projekcji określonych neuronów ze struktury A do struktury B. Strategia retrogradna wykorzystuje wektory wirusowe, które pokonują drogę od zakończenia aksonalnego do ciała komórki. W takim układzie wirus wstrzykiwany jest do struktury B, wędruje przez akson do struktury A i tam ulega ekspresji. Laser można nakierować wtedy na strukturę A, bez obawy, że pobudzeniu/hamowaniu ulegną inne neurony tego samego rodzaju (Ryc 1.b) [27].

Inne podejście zastosowali niedawno Chaudhury i współpracownicy [6] wykorzystując myszy niemodyfikowane genetycznie. W celu zbadania grupy neuronów projektujących z A do B, wstrzyknęli do B zmodyfikowany wirus opryszczki (*pseudorabies virus*, PRV), posiada-



Ryc.1. Warianty zastosowania optogenetyki do badania funkcji układów neuronalnych. (a) Wektor wirusowy anterogradny podany do struktury A zwierzęcia transgenicznego, światło laserowe do struktury A lub B; (b) wektor wirusowy retrogradny podany do struktury B zwierzęcia transgenicznego, światło laserowe do struktury A; (c) Wektory wirusowe podane do struktury A i B (anterogradny do A i retrogradny do B) zwierzęcia niezmodyfikowanego genetycznie, światło laserowe do struktury A.

jący sekwencję rekombinazy Cre; wirus ten ma zdolności retrogradnego transportu, zatem przemieścił się do A. Do struktury A natomiast, wstrzyknięty został drugi wirus – RAAV niosący sekwencję ChR2. Opsyna została zaktywowana przez rekombinazę Cre i uległa ekspresji w neuronach projektujących z A do B. (Ryc.1.c). Metoda ta nie charakteryzuje się już taką selektywnością jak wcześniej wymienione – pobudzeniu ulegają wszystkie grupy neuronów projektujące z A do B, a nie pojedyncza ich populacja (np. neurony dopaminergiczne), jednakże podając światło do struktury A osiągniemy możliwość aktywacji neuronów, które projektują wyłącznie do struktury B.

RZUCAJĄC ŚWIATŁO NA UZALEŻNIENIA

W ostatnich latach optogenetykę zaczęto wykorzystywać w obszarze badań nad powstawaniem uzależnień.

Są to zaburzenia, w których substancje uzależniające indukują trwałe zmiany w funkcjonowaniu różnych układów neuronalnych, w tym układu nagrody. Choć dzięki zastosowaniu takich technik badawczych jak leże, stymulacja elektryczna i ingerencja farmakologiczna udało się do tej pory wskazać główne układy neuronalne związane z uzależnieniem, to jednak wciąż brakuje badań ukazujących zależności przyczynowo-skutkowe pomiędzy poszczególnymi połączeniami neuronalnymi, populacjami komórkowymi a konkretnymi zachowaniami u uzależnionych osobników. Dzięki metodom optogenetycznym badacze są w stanie aktywować różne układy neuronalne i obserwować takie zachowania, jak poszukiwanie nagrody, poszukiwanie narkotyków czy zespół odstawienia [34].

Jeden z pierwszych eksperymentów optogenetycznych w tym obszarze miał na celu zbadanie połączeń pomiędzy polem brzuszным nakrywki (*ventral tegmental area*, VTA) a jądrem półleżącym przegrody (*nucleus accumbens septi*, NAc). Struktury te stanowią bowiem dwa najważniejsze elementy układu nagrody. VTA jest jądrem heterogennym, składającym się z neuronów dopaminergicznych (~65%), GABA-ergicznych (~30%) i glutaminia-nergicznych (~5%), które wysyłają swoje projekcje min. do ciała migdałowatego, kory przedczołowej i NAc [35]. Aksony wychodzące z VTA i docierające do NAc również nie są jednolite pod względem wydzielanego neurotransmitera – występują tu głównie neurony dopaminergiczne (DA) oraz GABA-ergiczne [20]. Z wcześniejszych badań wiadomo, że elektryczna stymulacja VTA powoduje uwolnienie dopaminy w NAc, co związane jest z poszukiwaniem nagrody czy poszukiwaniem narkotyku [9, 25, 28, 30]. Na podstawie tych badań naukowcy nie byli jednak w stanie rozstrzygnąć, czy aktywacja jedynie neuronów DA będzie wystarczająca do wystąpienia podobnego efektu. Dzięki wprowadzeniu ChR2 wyłącznie na powierzchnię neuronów dopaminergicznych VTA hipotezę tę udało się potwierdzić – stymulacja świetlna neuronów DA projektujących do NAc dawała efekt nagradzający [37].

Kwestią równie istotną jak badanie połączeń VTA-NAc, wydaje się być pozyskiwanie wiedzy na temat funkcji innych neuronów wysyłających projekcje do VTA. Projekcje te mogą być zarówno pobudzające, jak i hamujące, a ustalenie ich znaczenia jest kluczowe dla zrozumienia zjawisk związanych z motywacją, takich jak powstawanie wzmocnienia, awersji czy doświadczenia nowości. Procesy te mają źródła w zróżnicowanych subpopulacjach neuronów dopaminergicznych i GABA-ergicznych w VTA [4]. Lammel i współpracownicy posługując się narzędziami optogenetycznymi zbadali funkcjonalną rolę aktywności dwóch wejść do VTA (włókien wstępujących) – z jądra boczno-grzbietowej nakrywki (*laterodorsal tegmentum*, LDTg) i bocznej uzdeczki (*lateral habenula*, LHb) [18]. W serii eksperymentów wykaza-

li, że neurony LDTg wysyłające projekcje do bocznego VTA aktywują taką subpopulację komórek tej struktury (boczna część VTA), która następnie tworzy połączenia z boczną częścią skorupy NAc. Natomiast projekcje wysyłane z LHB docierają najpierw do ogonowej części VTA (*rostromedial tegmental nucleus*; RMTg), a następnie do środkowej kory przedczołowej (*medial prefrontal cortex*, mPFC). Co więcej, fazowa ale nie toniczna aktywacja każdego ze zidentyfikowanych szlaków objawia się jednym z dwóch przeciwstawnych efektów behawioralnych – dla szlaku rozpoczynającego się w LDTg było to powstanie efektu nagradzającego, natomiast dla szlaku z LHB – awersyjnego. Potwierdzono także, że awersja miejsca wywołana aktywacją szlaku LHB – RMTg - mPFC jest konsekwencją wydzielania dopaminy w mPFC, gdyż efekt ten udało się zablokować podając antagonistów receptorów dopaminergicznych bezpośrednio do tej struktury. Podobne obserwacje odnotowano dla szlaku LDTg – VTA – boczna część skorupy NAc; podanie antagonistów receptorów D_1 i D_2 do bocznej części skorupy NAc zablokowało powstanie nagrody, a zatem i za ten efekt odpowiedzialne było wydzielanie dopaminy. Badania te wskazują na związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy aktywnością jąder kontrolujących układ mezokortykolimbiczny a regulacją procesów motywacji, leżących u podłoża uzależnień. Przyjmuje się, że potencjał uzależniający narkotyków jest pochodną ich efektów nagradzających. Poznanie neuronalnych mechanizmów nagrody narkotykowej umożliwi zaproponowanie leczenia skierowanego na obniżenie potencjału uzależniającego narkotyków. Praca Wittena i współpracowników (2010) wskazała na kluczowe znaczenie aktywności intereuronów cholinergicznych w NAc zarówno w mediowaniu aktywności neuronów NAc jak i działaniu nagradzającym kokainy. Badacze wykazali, że optogenetyczne zahamowanie aktywności tych intereuronów, stanowiących około 1% populacji neuronów prążkowania, znosiło nagradzające działanie kokainy [43].

Nagradzające działanie kokainy jest podstawą poszukiwania tej substancji (przykładowo wzmacnia reakcję samopobierania) przez osobniki uzależnione. Dzięki zastosowaniu narzędzi optogenetyki zespół pod kierownictwem Kalivasa wskazał neuronalne podłoże poszukiwania kokainy w abstynencji [31, 32, 33]. W serii trzech eksperymentów wykazano, że aktywność projekcji wychodzących z VTA i docierających do NAc kontroluje poszukiwanie kokainy u szczurów w czasie abstynencji. W kolejnych badaniach wykazano, że aktywność projekcji z kory przedlimbiczej (*prelimbic cortex*, PL) i podstawno-bocznego ciała migdałowatego (*basolateral amygdala*, BLA) do NAc reguluje pobudzenie neuronów NAc, a inhibicja tych szlaków przejawia się zahamowaniem poszukiwania kokainy. W dalszych eksperymentach dowiedziono, że BLA reguluje aktywność NAc i poszukiwanie kokainy również pośrednio, poprzez

projekcje do PL. Wykazano także rolę połączeń między NAc a jądrami podstawnymi – inhibicja projekcji wysyłanych z NAc do grzbietowobocznej części brzusznej gałki bladej (*dorsolateral ventral pallidum*, dlVP), wywoływała zaprzestanie poszukiwania kokainy. Zahamowanie szlaku bezpośredniego do istoty czarnej nie dawało podobnych rezultatów. W serii dorbiazgowych eksperymentów udało się zatem wykazać, jak współpracują ze sobą całe układy struktur odpowiedzialnych za procesy motywacyjne (VTA-NAc), złożone procesy poznawcze (PL-NAc, BLA-NAc, BLA-PL-NAc) i programy motoryczne (NAc-dlVP) w wytworzeniu konkretnego zachowania – poszukiwania kokainy. Badania te stanowią przykład posłużenia się optogenetyką w celu identyfikacji nie tylko pojedynczych projekcji, ale całych obwodów neuronalnych będących podłożem określonej aktywności behawioralnej. Badając zaś obwody, naukowcy zbliżają się do zrozumienia fizjologii stojącej za danym behawio-rem, co przekłada się na potencjalne metody leczenia danego zaburzenia.

OPTOGENETYKA WOBEC DEPRESJI

Depresja kliniczna stała się w ostatnich latach jedną z najbardziej rozpowszechnionych chorób cywilizacyjnych. Według szacunków WHO na całym świecie cierpi na nią nawet 350 mln ludzi [41]. Charakterystyczne dla niej objawy, przede wszystkim obniżony nastrój, anhedonia, ociężałość psychomotoryczna oraz zmniejszona motywacja, skutkują znacznym pogorszeniem funkcjonowania społecznego i zawodowego oraz wysokim ryzykiem samobójstwa. Biorąc pod uwagę szerokie spektrum jej oddziaływania, istotne jest znalezienie skutecznych i szybko działających metod leczenia. Niestety wpływ obecnie stosowanych leków przeciwdepresyjnych na nastrój odnotowywany jest dopiero po kilku tygodniach ich regularnego stosowania. Posiadają one dodatkowo znaczną ilość efektów ubocznych. Co więcej, szacuje się, że od 19% do 34% pacjentów jest lekoopornych [10], a nawet 20% nie wykazuje odpowiedzi na jakiegokolwiek metody leczenia, w tym elektrowstrząsy [19]. Stworzenie nowej generacji leków przeciwdepresyjnych wymaga więc lepszego zrozumienia złożonych mechanizmów leżących u podłoża choroby.

Znaczna część leków przeciwdepresyjnych bazuje na hamowaniu wychwytu zwrotnego serotoniny z przestrzeni międzysynaptycznej. W ostatnich latach coraz częściej zwraca się jednak uwagę na rolę neuronów dopaminergicznych układu mezolimbicznego w podatności lub odporności na depresję [21], ze względu na ich zaangażowanie w proces nagrody i motywacji. Trudność w potwierdzeniu zaangażowania tych komórek w mechanizmy leżące u podstaw depresji stanowił brak precyzji czasowo-przestrzennej dotychczasowych metod, uniemożliwiający testowanie hipotezy na modelach zwierzęcych. Dopiero zastosowanie optogenetyki

w połączeniu z metodami behawioralnymi i farmakologicznymi umożliwiło zbadanie roli neuronów dopaminergicznych projektujących z VTA w powstawaniu objawów depresji, lub uzyskiwaniu efektu przeciwdepresyjnego.

Tye i współpracownicy [38] zastosowali metody optogenetyki w celu sprawdzenia czy selektywne zahamowanie aktywności neuronów dopaminergicznych VTA będzie miało wpływ na ekspresję zachowań specyficznych dla depresji u swobodnie poruszających się myszy. Fotostymulacja żółtym światłem kanałów NpHR wprowadzonych na neurony dopaminergiczne VTA wywołała natychmiastowe zmiany w fenotypie zwierząt. Poddane testom behawioralnym podczas stymulacji świetlnej myszy wykazywały zwiększoną liczbę zachowań depresyjnych (bezruch w teście wymuszonego pływania) przy utrzymanej na stałym poziomie aktywności motorycznej oraz zmniejszoną preferencję sacharozy – zachowania świadczące o doświadczaniu anhedonii i zmniejszonej motywacji, charakterystycznych dla depresji.

W kolejnej serii badań wykorzystano poddane długotrwałemu (8-12 tygodni), łagodnemu stresowi myszy, u których wykształciły się zachowania charakterystyczne dla depresji. Neurony dopaminergiczne VTA tych zwierząt wykazywały zmniejszoną aktywność. Fazowa stymulacja niebieskim światłem komórek VTA, w których wystąpiła ekspresja ChR2, wywołała natychmiastową zmianę zachowania: zmniejszoną liczbę zachowań depresyjnych i zwiększoną preferencję sacharozy. Efektów takich nie uzyskano u zwierząt, u których nie zaszła ekspresja ChR2 na neuronach dopaminergicznych. Zwiększonej motywacji oraz zmniejszonej anhedonii nie zaobserwowano również u zwierząt nie poddanych wcześniej długotrwałemu stresowi. Wyniki tych badań pokazały, że fazowa aktywacja neuronów dopaminergicznych VTA ma efekt przeciwdepresyjny a zahamowanie tej aktywności daje efekt prodepresyjny.

Inne badania wykazały wpływ aktywności neuronów dopaminergicznych VTA na podatność lub odporność na nieprawidłowości behawioralne wywołane wpływem ostrego stresu o charakterze społecznym. Stres taki u myszy „podatnych” wywołuje zwiększone fazowe wyładowania neuronów dopaminergicznych VTA (odwrotnie niż w przypadku łagodnego stresu) i powoduje zachowania specyficzne dla depresji (unikanie interakcji społecznych i zmniejszone pobieranie sacharozy). Z kolei u myszy „odpornych”, aktywność neuronalna pozostaje na stałym poziomie, nie występuje też zmiana zachowania [17]. Wykorzystując metodę optogenetyczną sprawdzono, czy jest możliwe wywołanie odporności lub podatności na zachowania specyficzne dla depresji. Stwierdzono, że pod wpływem fazowej (ale nie tonicznej) stymulacji światłem niebieskim neuronów dopami-

nergicznych VTA, na które wprowadzono kanały ChR2, myszy „odporne” natychmiast zaczynały wykazywać zachowania podobne do depresyjnych [6]. Zachowania te utrzymywały się nawet 12 godzin po zakończeniu stymulacji. Podobne rezultaty uzyskano stymulując neurony dopaminergiczne projektujące z VTA do NAc. Co ważne, poprzez stymulację światłem żółtym tych samych neuronów (z ekspresją NpHR) u myszy „podatnych” udało się zupełnie zahamować zachowania depresyjne wywołane ostrym stresem. Wpływało również na projekcję z VTA do środkowej kory przedczołowej, gdzie pod wpływem stresu obserwuje się zmniejszoną aktywność dopaminergiczną. Hamowanie światłem żółtym neuronów tego połączenia skutkowało nasileniem zachowań depresyjnych. Odwrotnego efektu nie udało się uzyskać pobudzając neurony światłem niebieskim [6].

Dzięki wykorzystaniu narzędzi optogenetycznych udało się potwierdzić kluczową rolę układu mezolimbicznego w podatności na depresję oraz możliwość osiągnięcia natychmiastowych efektów antydepresyjnych poprzez odpowiednio ukierunkowaną stymulację [42]. Co ciekawe, podatność na zachowania depresyjne wynikająca z aktywności tych neuronów powoduje, że nawet jednorazowa ekspozycja na ostry stres może wywołać objawy depresyjne. Bardzo ważnym krokiem w zrozumieniu depresji było ponadto ustalenie, że kontekst (rodzaj doświadczanego stresu) ma znaczenie w aktywacji dopaminergicznego układu leżącego u podłoża zachowań depresyjnych [17]. Wyniki tych badań dają podstawę do stworzenia nowych metod leczenia depresji, opartych na regulacji układów neuronalnych, a w szczególności układu dopaminergicznego.

ROZJAŚNIAJĄC LĘK

Przedłużający się kontakt z intensywnymi bodźcami wywołującymi strach lub lęk może skutkować wystąpieniem takich jednostek chorobowych jak zaburzenie lękowe uogólnione (GAD), zespół stresu pourazowego (PTSD), zaburzenie lęku napadowego czy depresja. Dzięki optogenetyce możliwe jest poszerzenie wiedzy o funkcjonalnej anatomii populacji neuronalnych zaangażowanych w powstanie reakcji lękowej.

Podstawowe modele zwierzęce powstawania zaburzeń lękowych opierają się na warunkowaniu reakcji strachu. Traumatyczne doświadczenia pozostawiają trwałe wspomnienia, wywierające wpływ na późniejsze reakcje emocjonalne. Wspomnienia te kodowane są w ciele migdałowatym, szczególnie w jądrze bocznym ciała migdałowatego (BLA), odpowiedzialnym za uczenie asocjacyjne [15]. Potwierdzają to badania w których za pomocą optogenetycznej aktywacji komórek piramidowych BLA powiązanej z sygnałem dźwiękowym wywołano takie samo warunkowanie reakcji strachu jak w przypadku bodźca stresowego [14].

W innych eksperymentach wykazano rolę BLA w powstawaniu lęku. Optogenetyczna stymulacja neuronów glutaminianergicznych BLA wywołała natychmiastowy efekt anksjolityczny. Z kolei hamowanie tych samych komórek wywoływało natychmiastowe reakcje lękowe [39]. W dalszych badaniach szczególną uwagę poświęcono roli projekcji w obrębie ciała migdałowatego (np. z centralnego jądra ciała migdałowatego do BLA). Wykazano, że stymulacja niebieskim światłem neuronów piramidowych projektujących z BLA do centralnego jądra ciała migdałowatego wywoływała natychmiastowy, lecz odwracalny wzrost liczby zachowań lękowych. Hamowanie tych projekcji wywoływało odwrotny efekt. Z kolei praca Kim i współpracowników (2013) wskazała na kluczową rolę aktywności owalnego jądra prążka krążkowego (*bed nucleus of stria terminalis*, BNST) w generowaniu uczucia lęku, a przednio-grzbietowej części BNST w zmniejszaniu lęku [16].

W ramach wielu innych eksperymentów poświęconych neurobiologicznym podstawom lęku, wykazano ogromną złożoność i wieloaspektowość mechanizmów, które, w szerszej perspektywie, mogą być kluczowym elementem powstawania szerokiego spektrum zaburzeń psychicznych, a także wywierać wpływ na odporność oraz stany zdrowia i choroby.

OPTOGENETYCZNE BADANIA SYNCHRONIZACJI AKTYWNOŚCI NEURONALNEJ

Regularna, wysoko zsynchronizowana aktywność neuronów jest obserwowana *in vivo* w wielu strukturach mózgu, takich jak hipokamp, kora wzrokowa czy ciało kolankowate boczne [8]. Iskrzenie napadowe jest uznawane za podstawę rozwoju i funkcjonowania wielu ważnych obwodów neuronalnych. Wskazuje się, że aktywność komórek piramidowych hipokampa oraz kory somatosensorycznej jest podstawą synchronizacji znacznie większej populacji komórek tych obszarów [40], co przekłada się bezpośrednio na funkcjonowanie procesów kognitywnych i pamięci. Poznanie zasad aktywacji i synchronizacji sieci neuronalnych może mieć istotne implikacje kliniczne. Z drugiej strony zaburzona synchronizacja neuronalna jest oznaką wielu neurologicznych zaburzeń takich jak epilepsja, schizofrenia czy choroba Parkinsona.

Metod optogenetycznych z powodzeniem użyto do imitowania naturalnej synchronizacji komórek systemu węchowego [1]. Inne badania [36] wskazały, że z pomocą światła żółtego możliwa jest hiperpolaryzacja komórek hipokampa, prowadząca do zahamowania specyficznej dla zjawisk epileptycznych synchronizacji pobudzenia sieci neuronalnych *in vitro*. Najnowsze badania [8] dowodzą, że łagodna stymulacja optogenetyczna (stymulacja o małej mocy i niskiej częstotli-

wości) jest wystarczająca do wytworzenia globalnych zmian w wyładowaniach neuronów oraz synchronizacji sieci neuronalnych *in vitro*. Udowodniono, że w zmianach tych rolę pośredniczącą pełni złożony mechanizm angażujący receptory AMPA i NMDA. Co ciekawe, wykazano, że nawet słaba, lub powoli wzrastająca stymulacja światłem, wpływa na reorganizację aktywności sieci neuronalnych przynajmniej tak samo efektywnie jak bombardowanie tkanki o wiele silniejszymi sygnałami świetlnymi [8]. Możliwie staje się więc indukowanie zmian w dynamice całych układów neurologicznych za pomocą bardzo niewielkich bodźców świetlnych. Tym samym optogenetyka staje się nie tylko potężnym, ale przede wszystkim łatwo dostępnym narzędziem do badania plastyczności układu nerwowego i wpływania na aktywność całych struktur.

BADANIA Z UŻYCIEM OPTOGENETYKI WYJAŚNIAJĄ TERAPEUTYCZNE DZIAŁANIE GŁĘBOKIEJ STYMULACJI MÓZGU W CHOROBY PARKINSONA

Optogenetyka przyczyniła się również do lepszego zrozumienia efektów terapeutycznych głębokiej stymulacji mózgu (deep brain stimulation, DBS), która w ostatnich latach jest coraz częściej skutecznie wykorzystywana w praktyce klinicznej. Stosuje się ją w leczeniu wielu zaburzeń psychicznych i neurologicznych, takich jak choroba Parkinsona [26], zaburzenia obsesyjno-kompulsywne czy depresje [29]. Pomimo efektywności głębokiej stymulacji jądra niskowzgórzowego w redukcji objawów zaburzeń psychicznych, nie do końca jasne pozostawało w jaki sposób efekt ten jest osiąganym. Wykorzystując zwierzęcy model choroby Parkinsona (jednostronne uszkodzenie neuronów dopaminergicznych na szlaku nigrostriatalnym), badacze zastosowali metodę optogenetyki do stymulacji wybranych grup neuronów, w celu zbadania efektów terapeutycznych stymulacji jądra niskowzgórzowego [11]. Wykorzystując szczury oraz myszy udowodnili, że zarówno stymulacja komórek jądra niskowzgórzowego charakteryzujących się ekspresją ChR2, jak i hamowanie ich aktywności przy wykorzystaniu kanałów NpHR, nie wpływają na ograniczenie objawów choroby Parkinsona. Taki skutek osiągnięto jednak pobudzając lub hamując włókna aferentne tego jądra, jak również komórek pierwszorzędowej kory motorycznej wysyłających projekcje do tej struktury. Dzięki wykorzystaniu optogenetyki wskazano więc, że duża efektywność głębokiej stymulacji mózgu jest prawdopodobnie skutkiem zmian zaistniałych na skutek stymulacji w połączeniach pomiędzy jądrami niskowzgórzowymi a pierwszorzędową korą motoryczną. Wiedza ta zapewnia nie tylko lepsze zrozumienie prowadzonych już terapii, ale pomoże w ulepszeniu innych form leczenia zaburzeń psychicznych i neurologicznych.

Tabela 1. Zastosowanie optogenetyki w badaniach wybranych chorób

Dziedzina	Zastosowanie optogenetyki	Referencje
Uzależnienia	Stymulacja neuronów dopaminergicznych projektujących z VTA do NAc ma działanie nagradzające u myszy.	[37]
	Stymulacja układu LDTg – boczne VTA – boczna część skorupy NAc ma działanie nagradzające a układu LHB – środkowe VTA – mPFC awersyjne u myszy.	[18]
	Zahamowanie układu VTA-NAc, PL-NAc, BLA-NAc, BLA-PL-NAc i NAc-dlVP znosi poszukiwania kokainy w abstynencji u szczurów.	[31], [32], [33]
Depresja	Stymulacja lub zahamowanie aktywności neuronów dopaminergicznych projektujących z VTA do NAc i mPFC hamuje lub nasila zachowania związane z depresją u szczurów.	[38] [17] [6]
Lęk	Wywoływanie lub zahamowanie reakcji lękowej w wyniku stymulacji komórek piramidowych BLA u myszy.	[15]
	Badanie znaczenia projekcji GABA-ergicznych jąder ciała migdałowatego do BNST w powstawaniu reakcji lęku u myszy.	[39]
	Stymulacja owalnego jądra BNST generuje uczucie lęku a przednio-grzbietowej części BNST ma przeciwny efekt.	[16]
Ból	Stworzenie nowego modelu badania neurofizjologicznych podstaw bólu; optogenetyczna aktywacja dróg bólowych u myszy transgenicznych wywołuje reakcje bólowe u myszy.	[7]
Epilepsja	Wywołanie synchronizacji aktywności neuronalnej komórek hipokampa in vitro.	[36]
	Udowodnienie roli receptorów AMPA i NMDA w synchronizacji aktywności rozległych sieci neuronalnych u myszy.	[8]
Choroba Parkinsona	Wykazanie terapeutycznego efektu stymulacji projekcji z kory motorycznej do jądra niskowzgórzowego u szczurów z chorobą Parkinsona.	[11]

PRZYWRACANIE ODPOWIEDZI
SIATKÓWKI NA ŚWIATŁO

Ciekawym przedsięwzięciem jest próba przywrócenia wrażliwości na światło siatkówce oka, w której uszkodzeniu uległy fotoreceptory. Potrzeba taka może zaistnieć w leczeniu genetycznej choroby jaką jest retinopatia barwnikowa, która pozostawia nienaruszone, lecz nieaktywne czopki i pręciki. Niedawno zademonstrowano [5], że transfekcja czopków jednym z rodzajów halorodopsyny (eNpHR3.0) w mysim modelu choroby (myszy rd1/rd1) przynosi pożądane efekty poprzez umożliwienie hiperpolaryzacji czopków, tak jak ma to miejsce w normalnym procesie widzenia. Tym samym autorzy dowodzą, że zdegenerowane komórki, przynajmniej na pewnym etapie choroby, mają szansę okazać się jeszcze funkcjonalne. Ta sama grupa powtórzyła eksperyment *ex vivo* na ludzkiej siatkówce i podobnie, uzyskała przepływ fotoprądów. Ostatnio zaś, inna grupa [22] wykorzystała ekspresję Chr2 w komórkach zwojowych siatkówki mysiej w połączeniu z protezą siatkówki

i uzyskała znacznie lepsze rezultaty niż przy zastosowaniu samych protez.

PODSUMOWANIE.

Jedną z podstawowych i wspólnych różnym zaburzeniom psychiatrycznym cech jest występowanie zaburzonej komunikacji pomiędzy różnymi układami neuronalnymi. Wciąż nie wiadomo, w obrębie których układów dochodzi do dysfunkcji, jak również czy dysfunkcje te są konieczne i/lub wystarczające aby wywołać dane zaburzenie psychiatryczne. Optogenetyka umożliwia ukazanie jak aktywność złożonych systemów biologicznych (np. układów neuronalnych) przekłada się na ekspresję określonego zachowania. Poznanie podłoża neuronalnego różnych zachowań umożliwi lepsze leczenie chorób lub zaburzeń, w których te zachowania są zmienione. Skrótowy przegląd aktualnych zastosowań optogenetyki w badaniach wybranych chorób prezentuje Tabela 1.

Podziękowania: *Homing Plus/2013-7/14*

- [1] Blumhagen, F., Zhu, P., Shum, J., Schärer, Y.-P. Z., Yaksi, E., Deisseroth, K., & Friedrich, R. W. (2011). Neuronal filtering of multiplexed odour representations. *Nature*, 479(7374), 493–8. doi:10.1038/nature10633
- [2] Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature neuroscience*, 8(9), 1263–8. doi:10.1038/nn1525
- [3] Boyle, P. M., Williams, J. C., Ambrosi, C. M., Entcheva, E., & Trayanova, N. A. (2013). A comprehensive multiscale framework for simulating optogenetics in the heart. *Nature communications*, 4, 2370. doi:10.1038/ncomms3370
- [4] Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2010). Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*, 68(5), 815–34. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.022
- [5] Busskamp, V., Duebel, J., Balya, D., Fradot, M., Viney, T. J., Siebert, S., ... Roska, B. (2010). Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5990), 413–7. doi:10.1126/science.1190897
- [6] Chaudhury, D., Walsh, J. J., Friedman, A. K., Juárez, B., Ku, S. M., Koo, J. W., ... Han, M.-H. (2013). Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature*, 493(7433), 532–6. doi:10.1038/nature11713
- [7] Daou, I., Tuttle, A. H., Longo, G., Wieskopf, J. S., Bonin, R. P., Ase, A. R., ... Séguéla, P. (2013). Remote optogenetic activation and sensitization of pain pathways in freely moving mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(47), 18631–40. doi:10.1523/JNEUROSCI.2424-13.2013
- [8] El Hady, A., Afshar, G., Bröking, K., Schlüter, O. M., Geisel, T., Stühmer, W., & Wolf, F. (2013). Optogenetic stimulation effectively enhances intrinsically generated network synchrony. *Frontiers in neural circuits*, 7, 167. doi:10.3389/fnirc.2013.00167
- [9] Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2000). Second-order schedules of drug reinforcement in rats and monkeys: measurement of reinforcing efficacy and drug-seeking behaviour. *Psychopharmacology*, 153(1), 17–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11255926>
- [10] Fava, M., & Davidson, K. G. (1996). Definition and epidemiology of treatment-resistant depression. *The Psychiatric clinics of North America*, 19(2), 179–200. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8827185>
- [11] Gradinaru, V., Mogri, M., Thompson, K. R., Henderson, J. M., & Deisseroth, K. (2009). Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5925), 354–9. doi:10.1126/science.1167093
- [12] Han, X., Qian, X., Bernstein, J. G., Zhou, H.-H., Franzesi, G. T., Stern, P., ... Boyden, E. S. (2009). Millisecond-timescale optical control of neural dynamics in the nonhuman primate brain. *Neuron*, 62(2), 191–8. doi:10.1016/j.neuron.2009.03.011
- [13] Hjelmstad, G. O., Xia, Y., Margolis, E. B., & Fields, H. L. (2013). Opioid modulation of ventral pallidal afferents to ventral tegmental area neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(15), 6454–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.0178-13.2013
- [14] Johansen, J. P., Hamanaka, H., Monfils, M. H., Behnia, R., Deisseroth, K., Blair, H. T., & LeDoux, J. E. (2010). Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(28), 12692–7. doi:10.1073/pnas.1002418107
- [15] Johansen, J. P., Wolff, S. B. E., Lüthi, A., & LeDoux, J. E. (2012). Controlling the elements: an optogenetic approach to understanding the neural circuits of fear. *Biological psychiatry*, 71(12), 1053–60. doi:10.1016/j.biopsych.2011.10.023
- [16] Kim, S.-Y., Adhikari, A., Lee, S. Y., Marshal, J. H., Kim, C. K., Mallory, C. S., ... Deisseroth, K. (2013). Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety. *Nature*, 496(7444), 219–23. doi:10.1038/nature12018
- [17] Krishnan, V., Han, M.-H., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., ... Nestler, E. J. (2007). Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, 131(2), 391–404. doi:10.1016/j.cell.2007.09.018
- [18] Lammel, S., Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., ... Malenka, R. C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*, 491(7423), 212–7. doi:10.1038/nature11527
- [19] Lobo, M. K., Nestler, E. J., & Covington, H. E. (2012). Potential utility of optogenetics in the study of depression. *Biological psychiatry*, 71(12), 1068–74. doi:10.1016/j.biopsych.2011.12.026
- [20] Margolis, E. B., Lock, H., Hjelmstad, G. O., & Fields, H. L. (2006). The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *The Journal of physiology*, 577(Pt 3), 907–24. doi:10.1113/jphysiol.2006.117069
- [21] Nestler, E. J., & Carlezon, W. A. (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological psychiatry*, 59(12), 1151–9. doi:10.1016/j.biopsych.2005.09.018
- [22] Nirenberg, S., & Pandarinath, C. (2012). Retinal prosthetic strategy with the capacity to restore normal vision. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(37), 15012–7. doi:10.1073/pnas.1207035109
- [23] Okada, T., Nomoto, T., Shimazaki, K., Lijun, W., Lu, Y., Matsushita, T., ... Ozawa, K. (2002). Adeno-associated virus vectors for gene transfer to the brain. *Methods (San Diego, Calif.)*, 28(2), 237–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12413422>
- [24] Peden, C. S., Burger, C., Muzyczka, N., & Mandel, R. J. (2004). Circulating anti-wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain. *Journal of virology*, 78(12), 6344–59. doi:10.1128/JVI.78.12.6344-6359.2004
- [25] Phillips, P. E. M., Stuber, G. D., Heien, M. L. A. V., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2003). Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature*, 422(6932), 614–8. doi:10.1038/nature01476
- [26] Remple, M. S., Sarpong, Y., & Neimat, J. S. (2008). Frontiers in the surgical treatment of Parkinson's disease. *Expert review of neurotherapeutics*, 8(6), 897–906. doi:10.1586/14737175.8.6.897
- [27] Rothermel, M., Brunert, D., Zabawa, C., Díaz-Quesada, M., & Wachowiak, M. (2013). Transgene expression in target-defined neuron populations mediated by retrograde infection with adeno-associated viral vectors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(38), 15195–206. doi:10.1523/JNEUROSCI.1618-13.2013
- [28] Schultz, W. (1997). A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science*, 275(5306), 1593–1599. doi:10.1126/science.275.5306.1593
- [29] Sedrak, M., Wong, W., Wilson, P., Bruce, D., Bernstein, I., Khandhar, S., ... Sabelman, E. (2013). Deep brain stimulation for the treatment of severe, medically refractory obsessive-compulsive disorder. *The Permanente journal*, 17(4), 47–51. doi:10.7812/TPP/13-005
- [30] Sombers, L. A., Beyene, M., Carelli, R. M., & Wightman, R. M. (2009). Synaptic overflow of dopamine in the nucleus accumbens arises from neuronal activity in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(6), 1735–42. doi:10.1523/JNEUROSCI.5562-08.2009
- [31] Stefanik, M. T., & Kalivas, P. W. (2013). Optogenetic dissection of basolateral amygdala projections during cue-induced reinstatement of cocaine seeking. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 7, 213. doi:10.3389/fnbeh.2013.00213
- [32] Stefanik, M. T., Kupchik, Y. M., Brown, R. M., & Kalivas, P. W. (2013). Optogenetic evidence that pallidal projections, not nigral projections, from the nucleus accumbens core are necessary for reinstating cocaine seeking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(34), 13654–62. doi:10.1523/JNEUROSCI.1570-13.2013
- [33] Stefanik, M. T., Moussawi, K., Kupchik, Y. M., Smith, K. C., Miller, R. L., Huff, M. L., ... LaLumiere, R. T. (2013). Optogenetic inhibition of cocaine seeking in rats. *Addiction biology*, 18(1), 50–3. doi:10.1111/j.1369-1600.2012.00479.x

- [34] Stuber, G. D., Britt, J. P., & Bonci, A. (2012). Optogenetic modulation of neural circuits that underlie reward seeking. *Biological psychiatry*, 71(12), 1061–7. doi:10.1016/j.biopsych.2011.11.010
- [35] Swanson, L. W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Research Bulletin*, 9(1-6), 321–353. doi:10.1016/0361-9230(82)90145-9
- [36] Tønnesen, J., Sørensen, A. T., Deisseroth, K., Lundberg, C., & Kokaia, M. (2009). Optogenetic control of epileptiform activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(29), 12162–7. doi:10.1073/pnas.0901915106
- [37] Tsai, H.-C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G. D., Bonci, A., de Lecea, L., & Deisseroth, K. (2009). Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1080–4. doi:10.1126/science.1168878
- [38] Tye, K. M., Mirzabekov, J. J., Warden, M. R., Ferenczi, E. A., Tsai, H.-C., Finkelstein, J., ... Deisseroth, K. (2013). Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature*, 493(7433), 537–41. doi:10.1038/nature11740
- [39] Tye, K. M., Prakash, R., Kim, S.-Y., Fenno, L. E., Grosenick, L., Zarabi, H., ... Deisseroth, K. (2011). Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, 471(7338), 358–62. doi:10.1038/nature09820
- [40] Van Drongelen, W., Koch, H., Marcuccilli, C., Pena, F., & Ramirez, J.-M. (2003). Synchrony levels during evoked seizure-like bursts in mouse neocortical slices. *Journal of neurophysiology*, 90(3), 1571–80. doi:10.1152/jn.00392.2003
- [41] WHO | Depression. (n.d.). Retrieved from <http://www.who.int/media-centre/factsheets/fs369/en/>
- [42] Willner, P. (1997). The mesolimbic dopamine system as a target for rapid antidepressant action. *International clinical psychopharmacology*, 12 Suppl 3, S7–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9347387>
- [43] Witten, I. B., Lin, S.-C., Brodsky, M., Prakash, R., Diester, I., Anikeeva, P., ... Deisseroth, K. (2010). Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6011), 1677–81. doi:10.1126/science.1193771
- [44] Zhang, F., Wang, L.-P., Brauner, M., Liewald, J. F., Kay, K., Watzke, N., ... Deisseroth, K. (2007). Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 446(7136), 633–9. doi:10.1038/nature05744

Adres do korespondencji/Address for correspondence

Wojciech Solecki, Dr n. med.
 Zakład Neurobiologii i Neuropsychologii, Instytut Psychologii
 Stosowanej
 Wydział Zarządzania i Komunikacji Społecznej
 Uniwersytet Jagielloński
 Ul. Łojasińskiego 4, 30-348 Kraków
 Tel (12) 664 56 29
 Fax (12) 664 58 56
wojciech.solecki@uj.edu.pl

Tables: 1

Figures: 1

References: 44

otrzymano/received: 07-03-2014

otrzymano po recenzji/revised: 19-03-2014

zaakceptowano/accepted: 24-03-2014

Informujemy, że żadna z części poniższej publikacji nie była prezentowana przez autorów na konferencji.