مدل سازی و بررسی پاسخ پروتئین های رودوپسین به تابش نور لیزر با قابلیت کاربرد در کنترل اپتوژنتیکی فوق سریع

زهرا نورائی پور[۱]، محمد اسماعیل زیبائی[۱*]، لیلا درگاهی[۲] و حمید لطیفی[۱]
[۱]پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، اوین-بلوار دانشجو ،تهران
[۲] مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

چکیده. اپتوژنتیک تلفیقی از مهندسی ژنتیک و سیستمهای انتقال نور می باشد که می تواند برای فعال سازی و یا مهار یک جمعیت نورونی با دقت فضائی و زمانی بالا بکار رود. چانلروداپسین ها یک گروه از پروتئینهای حساس به نور می باشند که می توانند با دقت میلی ثانیه نورون را تحریک نمایند. چندین خصوصیت این پروتئین، دقت کنترل اپتوژنتیکی را محدود می نماید. بطور مثال خیلی از سلولها عصبی نمی توانند در بازه فرکانسی ۴۰ هرتز فعالیت نمایند. به همین منظور در این مقاله با انتخاب دو گونه از آپسین ها ChRwt و ChETA و با استفاده از مدل ۴ حالته چرخه ی فوتونی و مدل هاجکین-هاکسلی، دینامیک جریان عبوری از این مولکول ها و پاسخ نورون هیپوکمپ میانی تحت پروتکل های تابشی مختلف بررسی شده است. نتایج نشان دادند که عملکرد ChETA و ChRwt در فرکانس های کم تقریبا مشابه است؛ به گونه ای که برای هر پالس یک پتانسیل فعالیت مشاهده می شود. اما به دلیل محدودیت های ChRwt در فرکانس های تابشی بالا Hz (۴۰-۲۰۰)، شامل ایجاد اسپایک های اضافی و حذف اسپایک ها درپروتکل های تابشی طولانی، دیگر آپسین ها مانند ChETA، با دینامیک سریع تر با ایجاد یک اسپایک در هر پالس و پاسخ های پایدار در نورون ها باعث بهبود راندمان آزمایشات اپتوژنتیک میشوند.

کلید واژه-اپتوژنتیک، آپسین، اسپایک، مدل چرخه ی فوتونی، مدل هاجکین و هاکسلی ، فوق سریع

Modeling and study of Rhodopsin proteins responses to laser light irradiance in ultrafast optogenetic control

Zahra Noraepour[1], Mohammad Ismail Zibaii[1], Leila Dargahi[2], Hamid Latifi[1]
[1]Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[2]Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract. Optogenetics is a combination of genetics and light delivery systems that can be used for exciting or silencing subpopulations of neurons, with a high spatiotemporal precision. Channelrhodopsins-2 (ChR2) are a class of light sensitive proteins that can drive spiking with millisecond precision to regulate neural activity.
There are several properties for this protein that have limited the precision of optogenetic control. For example, many cells can not follow ChR2-driven spiking above the gamma (~40 Hz) range in sustained trains. In this paper we simulated photocurrent kinetics of new variants of ChR2 such as ChRwt and ChETA based on Hudgkin-Huxley model in hippocampal pyramidal cell model with various optostimulation protocols. Obtained results show that functionality both of ChRwt and ChETA is the same and with each optical pulse stimulation there is a neural firing spike. But because of limitation in mechanism of ChRwt at high light-pulse frequencies (50-200 Hz), there is extra spikes as well as pike failure in prolonged illumination. Other fast opsins such as ChETA would enhance the efficacy of optogenetics experiments by evoking one action potential per light pulse, in addition to establishing stable spikes in prolonged illuminations.

Keywords: Optogenetic, Opsin, Spike, Photocycle model, Hodgkin and Huxley model, Ultrafast

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-04]

۱- مقدمه

درتکنیک اپتوژنتیک با بیان پروتئین های حساس به نور مانند ChR2، و با استفاده از تکنیک های مهندسی ژنتیک و اپتیک به عنوان ابزاری موثر در بررسی مدارهای عصبی با دقت فضایی و زمانی بالا از طریق برانگیخته و یا مهار نوع خاصی از سلول ها برای مطالعه عملکرد مغز استفاده می شود[۱]. شکل (۱) یک نمونه از موش صحرائی تحت کنترل با تکنیک اپتوژنتیک در آزمایشگاه اپتوژنتیک را نشان می دهد.

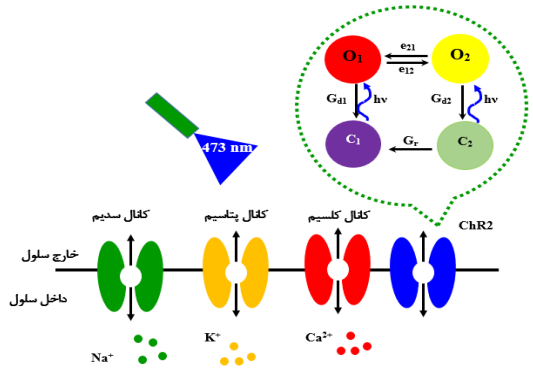


شکل ۱: تصویر یک نمونه از موش صحرائی تحت کنترل با تکنیک اپتوژنتیک در آزمایشگاه را برای تحریک نوری (الف): دو طرفه و (ب): یکطرفه را نشان می دهد.

تا کنون یک گستره ی وسیعی از گونه های جهش یافته از چانلرودوپسین ها مانند ChRwt و ChETA به منظور دستیابی به سطح بیان بالاتر، تحریک و مهار سریع تر نورون ها و رفع اسپایک های اضافی ناشی از کاهش آهسته جریان عبوری پس از خاموش شدن پالس نور مخصوصا در دستورالعمل های تابشی با پالس های کوتاه (2ms)، تولید شدند[۲]. بنابراین ارائه مدل های محاسباتی به منظور بررسی تاثیر القای رسانندگی توسط این آپسین ها در نورون ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در این مقاله با استفاده از مدل چهار حالته ابتدا دینامیک دو گونه از مولکول های رودوپسین شامل ChRwt, و ChETA مورد بررسی قرار گرفته است. سپس با استفاده از مدل هاجکین و هاکسلی و مدل چهار حالته چرخه ی فوتونی پاسخ یک نورون هیپوکمپ میانی که مولکول رودوپسین بر روی جسم سلولی است را تحت اثر دستورالعمل های تابشی متفاوت شبیه سازی شده است.

۲- مدل سازی مولکول های ChR2

در مدل چهار حالته مطابق شکل (۲)، دینامیک مولکولهای ChR2 در فرآیند تابش، دارای چهار حالت C_1، C_2، O_1 و O_2 است و توسط رابطه (۱) تعریف میشوند. مولکول های ChR2 درابتدا در حالت بسته C_1 قرار دارند، سپس با تابش نور به حالت باز O_1 و با ادامه تابش به حالت باز O_2 دارای رسانندگی کمتر از O_1، و یا به C_1 گذار می کنند. پس از آن یا دوباره به O_1 و یا C_2 می روند و با خاموش شدن نور، به صورت آهسته به حالت C_1 باز می گردند. اگر $c_1+c_2+o_1+o_2=1$ در هر زمان باشد [۳,۱].



شکل ۲-شماتیک چرخه ی مولکولی رودوپسین ها تحت اثر تابش نور

$$\frac{dO_1}{dt} = SP_1(C_1) - (G_{d1} + e_{12})O_1 + e_{21}O_2$$
$$\frac{dO_2}{dt} = SP_2C_2 + e_{12}O_1 - (G_{d2} + e_{21})O_2 \quad (۱)$$
$$\frac{dC_2}{dt} = G_{d2}o_2 - (SP_2 + G_r)c_2$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{(S_0(\theta(t)) - S)}{\tau_{chr2}}$$
$$S_0(\theta(t)) = 0.5(1 + \tanh(120(\theta(t) - 0.1))) \quad (۲)$$

تابعs به منظور محاسبه دینامیک زمانی تغییرات در ساختار پروتیئن ChR2 در هنگام تابش نور در نظر گرفته شده است. پارامترهای مربوط به رابطه (۱)، $\alpha=(p_1,p_2,G_{d1},G_{d2},e_{12},e_{21},g_1,T_{chr2})$ برای دو نوع مولکول ChR2 با توجه به مراجع [۴-۵] انتخاب شده اند. پروتکل تابش نور لیزر توسط رابطه(۳)، تابع هویساید تعریف می شود[۳]. جریان عبوری از مولکولهای رودوپسین طبق رابطه (۴) برابر است با[۳,۲]:

$$\theta(t) = \sum_i \Theta(t - t_{on})\Theta(t - t_{off}) \quad (۳)$$

$$I_{ChR} = A g_{xr} v(g_{o1}O_1 + g_{o2}O_2) \quad (۴)$$

نورون هیپوکمپ شامل کانال سدیمی، پتاسیمی و کلسیمی برای بررسی رفتار نورون تحت تابش با فرکانس

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-04]

های متفاوت، در نظر گرفته شده است. C_k غشای خازن و برابر با $0.01\ pF/\mu m^2$ می باشد. جریان الکتریکی (I_{DC}) به منظور کنترل تحریک پذیری نورون اعمال می شود[۲]. احتمال باز و بسته بودن هر یک از کانال های یونی، توسط متغییرهای m، h، s، r و n؛ و مطابق روابط (۶-۵) محاسبه می شوند[۳]:

$$c_k \frac{dv_k}{dt} = -I_{ionic,k} + I_{DC} - I_{chr2} \qquad (5)$$

$$\begin{aligned} I_{ion} &= g_{Na} m_k^2 h_k (v_k - v_{Na}) \\ &+ g_{ca} s_k^2 r_k (v_k - v_{ca}) \\ &+ g_{k-Dr} n_k^2 (v_k - v_K) + g_l v_k \end{aligned} \qquad (۶)$$

$$\frac{d\eta_k}{dt} = \alpha_k (1 - \eta_k) - \beta_k \eta_k$$

۳- نتایج

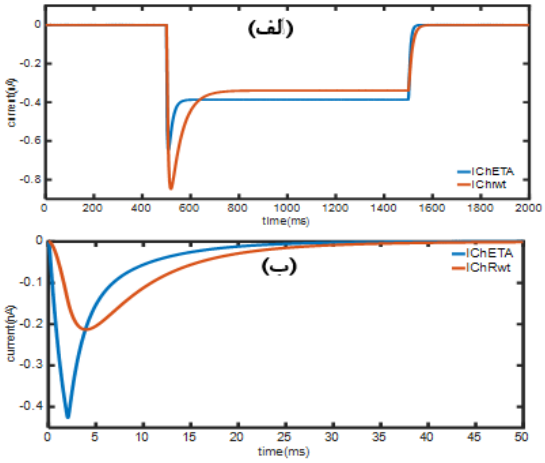
شکل ۳(الف-ب) جریان عبوری از پروتئین های ChR2wt و ChETA در تابش های ۱s و۲ms، شدت ۵۰ mw/mm^2 در طول موج ۴۷۰ nmرا نشان میدهد. جدول۱مجموعه پارامترهای α را برای دو گونه از مولکول های ChR2 نشان می دهد. در تابش ۱s نور لیزر دینامیک القای رسانندگی در مولکول های رودوپسین از سه فاز اصلی تشکیل شده است. با شروع تابش ابتدا جریان در زمان T_{rise} به مقدار ماکزیمم، سپس در بازه ی زمانی T_{in} به مقدار پایا و در زمان T_{off} پس از خاموش شدن نور لیزر صفر میشود. جریان ماکزیمم عبوری از آپسین ها به پارامتر های مختلفی از جمله رسانندگی یک کانال، سطح بیان آپسین ها(تعداد در واحد سطح) و سطح نورون

جدول ۱-پارامترهای مدل ۴حالته برای دو نوع مولکول های رودوپسین

پارامتر	Wild-type	ChETA
G_{d1}	0.084	0.1779
G_{d2}	0.1254	0.2362
e_{12}	0.0297	0.0696
e_{21}	0.0184	0.0268
G_r	0.004	0.004
G_{Chr2}	0.75	0.233
T_{Chr2}	1.3	1.3
ε_1	0.8535	4.6125
ε_2	0.025	2.1969

تحت تابش و شدت نور لیزر بستگی دارد. با مقایسه جریان های عبوری از دو مولکول رودوپسین مشاهده میشود هنگامی که سطح بیان یکسان باشد، مولکول های ChETA به دلیل دارا بودن دینامیک سریع تر، مدت زمان کمتری در حالت باز O_1 میمانند در نتیجه در پالس های طولانی دارای جریان ماکزیمم کمتری نسبت به ChRwt هستند.

همچنین جریان ChETA با سرعت بیشتری از مقدار ماکزیمم به مقدار پایای خود می رسند به عبارت دیگر با شروع تابش تعداد بیشتری از مولکول ها در مقایسه با ChRwt از حالت O_1 به حالت O_2 گذار می کنند و ChETA در مدت زمان بیشتری در حالت O_2 که دارای رسانندگی کمتری است باقی می مانند. در شکل (۳-ب) در تابش لیزر با پالس کوتاه(۲ms)، آهنگ باز و بسته شدن کانال های ChRwt آهسته است و حتی پس از خاموش شدن نور افزایش جریان ادامه دارد. اما ChETA سریع تر به ماکزیمم جریان، تقریبا در مدت زمان تابش ۲ms و پس از آن با آهنگ سریع تری صفر می شود.

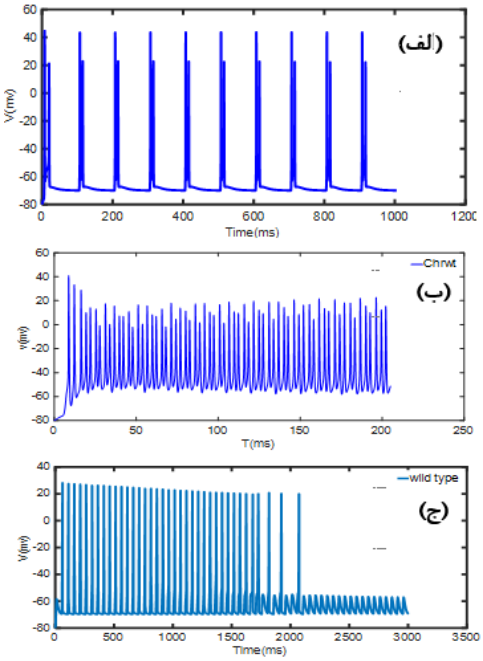


شکل ۳: جریان عبوری از مولکول های Chrwt و ChETA، شدت $50\ mw/mm^2$(الف) ۷۰۰ms (ب) ۲ ms

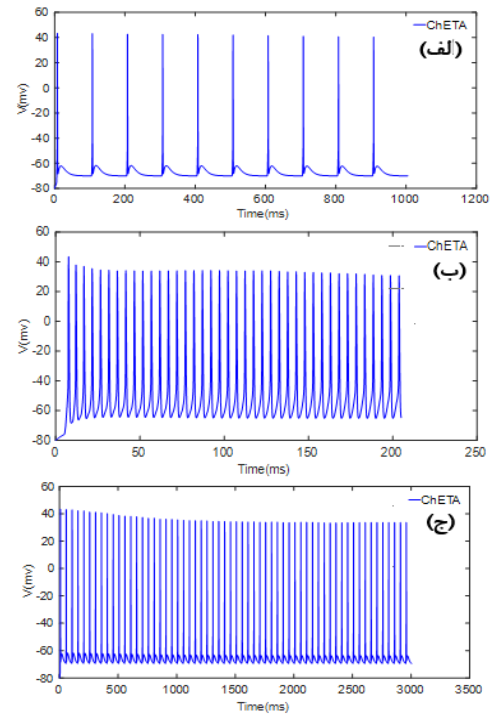
شکل های ۳ و ۴ به ترتیب پاسخ نورون دارای مولکول های ChR2wt و ChETA به تابش نور لیزر با طول پالس ۲ms، شدت $50\ mw/mm^2$ و فرکانس های ۱۰ Hz و ۲۰۰ Hz و با تعداد پالس های مختلف را نشان می دهد. مطابق شکل (۴-الف) نورون های دارای ChRwt دارای اسپایک های اضافه تر در هر پالس هستند. همانطور که در شکل (۴-ب) مشاهده می شود با افزایش فرکانس تابش نور لیزر در محدوده گاما و بالاتر (۵۰-۲۰۰ Hz) نورون دارای پاسخ هایی در این محدوده نخواهد بود.

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-04]



شکل ۴: پاسخ نورون میانی هیپوکمپ دارای مولکول های ChRwt به تابش نور لیزر (الف)۱۰ پالس، فرکانس ۱۰HZ (ب) ۴۰پالس، فرکانس ۲۰۰ Hz (ج) ۶۰پالس، فرکانس ۲۰HZ



شکل ۵: پاسخ نورون میانی هیپوکمپ دارای مولکول های ChETA به تابش نورلیزر(الف)۱۰پالس،فرکانس ۱۰HZ (ب) ۴۰پالس، فرکانس ۲۰۰ Hz (ج) ۶۰پالس، فرکانس ۲۰HZ

در تابش های طولانی با فرکانس بالا، مطابق شکل (۴-ج) دوره عکس العمل اسپایک ها به دلیل طولانی بودن زمان ریکاوی ChRwt از حالت غیرفعال، افزایش می یابد که منجر به کاهش زمان بین اسپایک ها و کاهش پتانسیل غشا و در نهایت از بین رفتن اسپایک ها می شود. انجام آزمایشات اپتوژنتیک در فرکانس های بالا(۴۰-۲۰۰) توسط ChRwt باعث ایجاد اسپایک های اضافه و ناپایداری پاسخ ها مخصوصا در نورونها با اسپایک های سریع و سطح بیان بالای آپسین ها، به دلیل کامل نشدن فرآیند ریپلاریزیشن پتانسیل فعالیت، میشود. این مکانیسم یا توسط اعمال پالس های کوتاه و با شدت بالا و یا بیان آپسین هایی با دینامیک سریع مانند ChETA رفع میشود تا بتواند دقت زمانی را در پالس های تابشی کوتاه (۲ms) نشان دهد. مطابق شکل (۵) بیان ChETA باعث از بین رفتن اسپایک های اضافی و ایجاد یک پتانسیل فعالیت به ازای هر پالس ۲ms میشود. با توجه به شکل (۵-ج) ChETA قادر به ایجاد اسپایک های پایدار و ثابت در تابش با فرکانس ۲۰۰Hz است.

۴- نتیجه گیری

ChRwt به عنوان یک ابزار القاگر رسانندگی در نورون ها، دارای خواص غیر خطی است که دینامیک و دقت پتانسیل فعالیت ایجاد شده در نورون را تحت تاثیر قرار میدهد. دقت زمانی پاسخ های نورون های دارای ChRwt در سطح بیان بالا(تعداد آپسین ها)، فرکانس های بالای تابش نور لیزر بیشتر از ۲۰Hz از بین می رود. در نتیجه تولید آپسین هایی با دینامیک سریع تر امکان دستیابی به پاسخ های پایدار و دارای دقت زمانی بالا را تا فرکانس های گاما و بالاتر را فراهم می آورند. جریان در ChETA(E123T)، دارای گذار سریع تر از ماکزیمم به حالت پایا است و همچنین نورون ها دارای پاسخ هایی پایا و با دقت زمانی بالا در فرکانس های کمتر از ۲۰۰Hz می باشند.

مراجع

[1] Nikolic, Konstantin, et al. "Photocycles of Channelrhodopsin-2." *Photochemistry and photobiology* vol.85, no.1, pp. 400-411, 2009.

[2] Yizhar, Ofer, et al. "Optogenetics in neural systems." *Neuron* , vol.71, no.1, pp. 9-34, 2011.

[3] S. S. Talathi, P. R. Carney, P. P. Khargonekar, "Control of neural synchrony using channelrhodopsin-2: a computational study", J. Comput. Neuroscie, vol. 31, no. 1, pp. 87-103, 2011.

[4] Berndt, André, et al. "High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels." *Proceedings of the National Academy of Sciences* , vol.108, no.18, pp. 7595-7600, 2011.

[5] Gunaydin, Lisa A., et al. "Ultrafast optogenetic control." *Nature neuroscience* , vol.13, no.3, pp. 387-392, 2010.

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-04]