



### 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

치의학석사 학위논문

Optogenetics 의 현재와 미래, 그리고  
치의학에서의 적용 가능성에 대한  
고찰

2015년 2월

서울대학교 치의학대학원

치학과

이 병 민



Optogenetics의 현재와 미래, 그리고 치의학에서  
의 적용 가능성에 대한 고찰

이 논문을 치의학 석사학위논문으로 제출함

2014년 11월

서울대학교 대학원

치 의 학 과

이 병 민

이 병 민의 석사학위논문을 인준함

2015년 1월

위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

부 위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)



# 국문초록

## 연구목적

Optogenetics란 특정과장, 혹은 다과장의 빛을 사용해 Opsin과 같은 광반응성 단백질(chromophore-containing photochemical actuator)을 활성화시켜 해당 단백질이 발현된 세포를 단일세포레벨에서, 혹은 신경회로 레벨에서 높은 정확도로 제어할 수 있는 신경생물학의 실험 방법론 중 하나이다. Optogenetics는 신경생물학의 기초 연구 및 뇌의 활동과 행동, 그리고 질병의 진단과 치료까지 다양한 분야에서 기존의 방법과는 전혀 다른 새로운 접근방식을 열어주었다. 이 논문에서는 optogenetics에 대한 이론적 배경과 최신 optogenetics에서 사용되는 다양한 optogene과 optogene의 전달방법에 대해, 그리고 적용 사례에 대해 현재까지 발표된 논문을 바탕으로 정리하고 치의학에 적용될 수 있는 가능성에 대해 논하고자 한다.

## 연구대상 및 방법

1980년부터 2014년까지 발간된 연구와 리뷰 논문을 Pubmed에서 optogenetics, opsin, optogene, neural network, neural circuit, brain, rhodopsin 등의 관련 키워드를 사용하여 검색, 수집하였다.

## 결론

Optogenetics에 사용되는 photochemical actuator 들은 주로 Type I, II opsin 혹은 그 기능을 인공적으로 개선시킨 변형체로 이들을 coding 하는 유전자는 바이러스를 사용한 transfection으로 신경세포로 전달된다. 바이러스의 표면단백질을 이용한 targeting, retrograde, anterograde 등의 targeting 방법을 조합하여 원하는 형태, 기능, 특징을 가진 신경세포만을 선택적으로 자극할 수 있다. Optogenetics을 다양하게 활용하여 뇌와 신경연결망의 기능을 밝히고 이를 정신, 신경질환의 진단과 치료에 사용할 수 있다. 그러나 바이러스 벡터를

사용한 transfection 방식의 위험성, 사용되는 optogene 이 신경세포에 미치는 영향 등의 요소들이 불확실하여 추가적인 연구가 요구된다. 치의학에서 optogenetics 가 가지는 가능성은 주로 비정형적, 난치성인 안면신경통들의 원인을 규명하고 그 통증을 직접적으로 경감하는 방향으로 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

**Keywords** ; Optogenetics, optogene, Rhodopsin type 1, type 2, opsin, neural mapping, brain, neural network, gene delivery, neuralgia, depression

1. Student Number : 2011-22466





## 목 차

I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	7
III. 연구결과 .....	8
IV. 고 찰 .....	31
VI. 참고문헌 .....	37

## I. 서론

### 1. Optogenetics 의 이론적 배경

Optogenetics 란 특정파장, 혹은 다파장의 빛을 사용해 Opsin 과 같은 광반응성 단백질 (chromophore-containing photochemical actuator) 을 활성화시켜 해당 단백질이 발현된 세포를 단일세포 레벨에서, 혹은 신경회로 레벨에서 높은 정확도로 제어할 수 있는 신경생물학의 실험 방법론 중 하나이다. Photochemical actuator 는 그 종류와 작용 메커니즘에 따라 타겟 세포를 전기적으로 활성화시키기도 하고 반대로 전기적으로 silencing 시키기도 하기 때문에 신경생물학에서 그 활용도가 매우 높다[1]. 이 photochemical actuator 는 유전자로 코딩되어 있고 이 유전자로 transfection 된 세포에서 특정하게 발현되어 해당 기능을 수행하기 때문에 opto-genetic 이란 용어가 사용되게 되었다. Optogenetics에서 사용되는 photochemical actuator 는 7-transmembrane 단백질인 박테리아 opsin이 주를 이루는데 이들은 빛을 감지하거나 광합성과 같은 반응을 매개하며 빛의 에너지를 흡수, 사용하여 세포 내/외의 이온을 수송하고 passive 이온 채널의 개폐를 조절하기도 한다. 박테리아의 opsin을 사용, 빛 에너지를 생물구성성분으로 흡수, 산란, 반사시키는 방법은 오래전부터 사용되어 왔다. 1971년 Fork et al. 은 형광단백질이 표지된 뉴런을 targeting 하여 그 활성을 증가시키는 실험을 수행한 바 있고[2]

1994년 Schmucker et al. 은 반대로 형광 단백질과 레이저를 사용하여 표적이 되는 단백질을 파괴함으로써 해당 단백질을 보유한 세포의 기능을 멈추게 하는 실험 방법을 사용한 바 있다[3]. 이후 다양한 형태의 photochemical actuator 들이 설계, 발견되었고 빛을 전달하는 방법 및 빛의 성질 등도 다양화 되었다. 이러한 photochemical actuator 들은 작동을 위해서 빛을 흡수하는 chromophore를 구성하는 비타민 A 의 산물중 하나인 all-trans-retinal 이 필수적으로 요구되긴 하지만 in vitro 상에서나 in vivo 상에서의 신경세포에는 이 all-trans-retinal의 양이 충분하고 in vivo 실험의 경우 음식물로 쉽게 섭취가 가능하다. Photochemical actuator를 작동시키기 위해 필요한 빛의 intensity는 약 0.1에서 10mW/mm<sup>2</sup> 정도이며[4] 이는 in vivo 상에서도 충분히 체내로 전달될 수 있는 정도의 intensity이면서 평균적인 실험 공간에서 감지되는 빛보다는 한참 높은 수치이기 때문에 실험에 적용하기에 적합하다. 또한 Optogenetics에서 사용되는 photochemical actuator 들은 주로 bacteria와 같은 procaryote에서 기원한 단백질이지만 고등생물의 신경세포와 같은 eukaryotic cell 에서도 성공적으로 발현된다. 이후 procaryote에서 기원한 photochemical actuator 뿐 아니라 초파리의 photoreceptor를 활용하여 in vitro 상의 신경세포에 이온전류를 생성시키거나[4] 빛에 의해 구조가 변하는 단백질 도메인을 이온채널에 결합하여 이온채널을 활성화 시킬 수 있는 ligand에 접합시켜 빛을 사용한 이온채널의 활성/비활성을 구현해 내기도 하였다[5]. 이러한 편리성과 유용성으로 인해

Optogenetics 는 생물학 분야에서 유전학, 생화학, 생리학, 세포생물, 분자생물 등의 여러 분야에서 폭넓게 사용되기 시작했다.

## 2. Photochemical actuator 의 생물리학적 메커니즘

그렇다면 외부에서 가해지는 빛, 혹은 광자 에너지는 어떤 원리로 이러한 단백질들의 구조적인 변화와 화학적인 변성을 일으킬 수 있으며 더 나아가 세포와 조직의 변화까지도 유도할 수 있는가? 광학적으로 발생하는 힘은 거시적인 단위로 볼 때 그 영향이 매우 미미하다. Maxwell 은 태양으로부터 지구로 내리쬐는 photon이 지구에 가하는 압력을 radiation pressure 라고 정의하였는데 이 radiation pressure 은 평균적으로  $10E-5$  Pa 정도로 대기압의 백억분의 1 정도의 수준이다[6]. 그러나 이러한 photon 의 밀도가 증가하면 그 영향력은 증가한다. 우주에서는 radiation pressure 가 행성의 궤도를 바꾸기도 하며 실험실에서 생성되는 고밀도의 레이저빔을 사용하면 수 마이크로미터 크기의 라텍스 구슬을 움직일 수 있을 정도로 그 힘이 증가하게 된다[7]. 이 radiation pressure가 생성되는 힘의 비율은 수 milli-Watt의 intensity에서 약 1 pico-Newton의 힘을 생산할 수 있는 정도이다. 그러나 이 힘이 분자적인 레벨에서 가해지게 된다면 그 영향은 화학적 결합을 끊어버릴 정도이며 거시적으로 세포 및 조직, 그리고 생물체 단위에서 받게 되는 영향은 매우 크다. 예를 들어 자외선의 경우  $150\sim 400J/mol$  의 에너지를 가지는데 이 정도의 에너지는 single bond 의 결합에너지나 double

bond 의 pi orbital 의 에너지와 맞먹기 때문에 single bond를 끊을 수 있고(Photolysis, Photo-dissociation) 이렇게 끊어진 물질은 excitation state가 된다(Photoisomerization). 광자로부터 흡수된 에너지는 해당 물질의 에너지 level을 높은 오비탈로 끌어올릴 수 있으며 이 때문에 낮은 오비탈에 존재하는 전자를 제거하거나 추가적인 전자를 받아들일 수 있는 상태가 된다 (Photo-oxidation, Photo-reduction)[6].

분자생화학적인 레벨에서는 광학에너지에 의해 위와 같은 원리에 따라 단백질을 구성하고 있는 특정 peptide 들에 이러한 변화가 일어나게 되고 이는 곧 해당 단백질의 구조적인 변화, 그리고 기능의 변화를 초래하게 된다. 그러나 모든 단백질들이 빛에너지에 의해 큰 변화를 보이는 것은 아니며 빛 에너지를 chromophore 라는 원통형의 구조로 모아 구조적인 변화를 일으키는 photochemical actuator 라는 그룹의 단백질이 존재한다. 이 단백질 그룹은 크게 두 가지로 나뉘는데 첫 번째는 빛 에너지를 다른 형태의 에너지로 바꾸는 단백질 그룹이며 두 번째는 빛에너지를 이용하여 다른 형태의 정보를 전달하는 단백질 그룹이다. 첫 번째 단백질 그룹의 예로는 광합성과 light-driven 이온 펌프 등이 있고 두 번째 단백질의 예로는 시세포 등에 분포하는 photoreceptor 등을 들 수 있겠다[6,8]. 이 두 가지의 기능은 절대적으로 나뉘어 분포하는 것이 아니라 어느 정도 중첩되어 다양한 생물학적인 기능을 수행한다. 광자가 이러한 광화학적 효과를 가지기 위해서는 target으로 하는 분자에 흡수되어야 하는데 이 흡수율을 결정하는 것은 target 분자의 크기 (광자와

접촉하는 부분의 넓이) 와 단위시간 동안 해당 부위로 조사되는 광자의 양 (photon flux density)이다[6]. 흡수된 광자는 다른 형태의 에너지로 전환되거나 일을 하기 위해 excitation 상태가 되어야 하는데 이 excitation 된 분자가 분해되며 수행하는 일의 효율을 primary quantum yield 라고 한다. 즉 photochemical actuator 의 효율은 외부적으로는 photon flux density 에 의해 영향을 받고 내부적으로는 광자의 흡수량과 primary quantum yield 에 의해 결정된다[6]. 따라서 효율적인 photochemical actuator 는 넓은 광자흡수면적과 화학적으로 높은 primary quantum yield를 가져야 한다.

그러나 아무리 높은 효율의 photochemical actuator를 가지고 있다고 해도 한정된 광자량 만으로는 충분한 구조변화나 정보전달을 하는 데에는 부족하다. 이를 위해서는 초기의 광반응을 바탕으로 2차적인 증폭이 이루어 져야 하는데, 이러한 2차 증폭의 가장 대표적인 예는 시각세포의 photoreceptor인 Rhodopsin 이다[8]. Bialek et al. 은 그의 연구에서 척추동물과 무척추 동물에서 Rhodopsin 분자 하나에 하나의 photon 만 흡수되어도 신경전류를 생산할 수 있다는 것을 발견하였다[8]. 이는 Rhodopsin 이 1차 광자흡수에 이어 연쇄적인 이차반응 폭포(secondary reaction cascade)를 가지기 때문에 많은 이온채널들의 활성화/비활성화가 동시에 일어날 수 있고 이로 인해 적은 양의 photon 에도 높은 양의 전류가 발생할 수 있는 것이다[6,8]. 그리고 이 전류의 크기는 흡수된 photon의 양에 비례하게 된다. 또 다른 2차 증폭의 예는 파리의 photoreceptor에서 찾아볼 수 있다. 파리의 photoreceptor 의 경우 광자를 에너지로 변환하는

양보다 전달되어야 하는 정보량을 전달하는데 소비해야 하는 에너지 (ATP hydrolysis) 의 양이 1000배 이상 더 많다[9,10]. 즉 photoreceptor 는 photon 그 자체를 유일한 에너지 출처로 삼는 것이 아니라 photon은 스위치로만 활용하고 스위치의 꺼짐과 켜짐에 따라 세포내의 대사에너지를 사용하여 기능을 수행하게 된다. 정리하면 photochemical actuator 들은 빛의 강도에 따라 (photon flux density) 에 따라 세포내의 반응들의 효율을 조절할 수는 있으나 photochemical actuator 가 독립적으로 photon의 에너지만을 사용하여 반응을 매개하지는 못한다는 것이다. 그러나 예외인 시스템도 존재하는데 light driven 이온 펌프의 경우 흡수된 photon 그 자체만을 에너지로 사용하여 작동되며 흡수된 photon 의 양에 정확히 비례하여 전달되는 이온의 양이 정해진다[6]. 이 이온 펌프는 한 번의 단백질 구조 변형에 하나의 이온만을 전달하기 때문에 세포의 대사 에너지가 추가적으로 필요하지 않고 따라서 2차적인 증폭반응이 필요하지 않다.

## II. 재료 및 방법

### **Focused Question:**

이 논문에서 가장 집중적으로 논의하는 것은 Optogenetics 란 무엇이며 신경생물학에서 어떤 형태로 적용되고 있는지, 그리고 향후 어떤 방향으로 활용될 수 있는지를 분석하는 것이다.

### **Eligibility Criteria**

출간된 많은 논문들 중 다음과 같은 기준들을 사용해 선택적으로 분석하였다. 먼저 분석된 논문들은 모두 영어로 작성된 논문들이며 1) Original articles 2) experimental studies 3) clinical studies 4) Review논문에 수록된 reference 목록상의 논문들을 분석하였다. 출간되지 않은 데이터들이나 보고는 제외하였다.



### III. 연구결과

#### 1. Optogenetics 의 기술적인 분석: Optogenetics에서 사용되는 단백질의 종류와 특징

##### 1.1. 자연적으로 존재하는 photochemical actuator

자연적으로 존재하는 photochemical actuator 는 크게 Rhodopsin, phototropin, BLUF protein(blue-light sensor utilizing flavin adenine dinucleotide), cryptochrome, phytochrome, 그리고 photoactive yellow protein 6가지로 나누어 볼 수 있다[6].

Rhodopsin 은 세포막에 발현된 integral membrane protein 으로 빛의 양에 따라 그 활성이 조절되어 이온의 흐름을 만들어낸다. Rhodopsin은 여러 종류의 subtype을 가지고 있지만 모든 종류의 rhodopsin 은 retinal chromophore 나 hydroxylated retinal derivative를 사용하여 빛을 흡수한다. 이 부분이 빛을 흡수하면 isomerization, 즉 구조적인 변화가 일어나게 되고 이 구조변화가 retinal binding cavity 와 연결된 opsin으로 전달된다. Opsin 의 유전자 시퀀스를 분석해 보면 두 개의 family 로 나뉘지는데 하나는 간단한 형태의 이온을 세포 내외로 이동시키는 type 1 이고 또 하나는 GPCR(G Protein Coupled Receptor)형태인 type 2 이다. Type I opsin 은 식물이나 박테리아, 조류, 균류 등의 세포막 혹은

세포 내부에서 발현되는 단백질이다. Optogene으로서 뉴런에서 발현되었을 때는 세포막으로 이동되어 발현되며 세포막을 7번 통과하는 구조로 존재한다[1]. Type I opsin 의 내부에는 비타민 A 유도체인 all-trans-retinal 이 들어있어 빛을 흡수하면 구조적인 변화를 일으켜 13-cis retinal 로 변한다. 이 때 이온들이 opsin을 통과, 세포 내외로 이동할 수 있게 된다. Type I 과는 달리 거의 모든 type II rhodopsin 은 11-cis retinal을 chromophore 속에 담고 있다. 이 11-cis retinal 은 빛을 흡수하면 all-trans-retinal 로 변한다. Type I opsin 은 다시 그 특징에 따라 1) Channelrhodopsin 2) Halorhodopsin 3) Light driven outward proton pump 3가지로 나눌 수 있다[1].

### 1.1.1. Type 1 Rhodopsins

**Channelrhodopsin:** Channelrhodopsin 은 빛에 의해 활성화되어 cation을 세포 내부로 이동시키는 채널단백질이다. 뉴런에서 발현되면 세포막에 발현되며 빛이 조사되면  $\text{Na}^+$ , proton,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  와 같은 cation들을 세포 내부로 이동시켜 depolarization을 유도한다. 처음 뉴런에 사용되기 시작한 channelrhodopsin 은 Channelrhodopsin-2(ChR2) 로 Chlamydomonas reinhardtii 라는 녹색 조류에서 추출된 단백질이다[11]. ChR2 가 뉴런에서 발현되면 청색광의 pulse에 매우 빠르게 반응하며 뉴런을 탈분극(depolarization) 시켜 수십 Hz 의 action potential을 만들어 낼 수

있다. 광자극이 사라지면 빠른 속도로 구조가 불활성화되고 뉴런의 potential 도 정상으로 돌아오는데 실제로는 자극이 사라진 뒤에도 어느 정도의 cation permeability 가 남아있어 소량의 cation들이 세포내로 들어오게 된다. 이 현상을 passive leak conductance 라고 하며 구조적으로나 화학적으로도 이 현상의 원인을 정확히 규명하지 못한 상태이다[12]. in vivo 상에서도 우수한 ChR2 의 뉴런 자극 능력에 영향을 받아 다양한 종류의 channelrhodopsin 들이 연구되기 시작했다. Calcium permeability-enhanced channelrhodopsin (CatCh) 는 ChR2 보다 전류의 amplitude 는 더 높고 전도 속도는 더 느리다[13]. 인공적인 mutagenesis 등을 통해 개조된 ChR2 들은 다음 장에서 더 다루도록 하겠다.

**Halorhodopsin:** Halorhodopsin 은 빛에 의해 활성화 되어 세포 내로 chloride 이온을 펌프하는 채널 단백질로 고농도의 염분 속에서 발견된 고세균에서 추출되었다[1]. 뉴런 상에서 발현되어 빛이 조사되면 chloride 이온을 세포 내부로 펌프하여 neuron의 과분극 (hyperpolarization)을 유도한다[14]. 가장 처음 optogenetics 용도로 쓰인 halorhodopsin 은 *Natronomonas pharaonis* 라는 고세균에서 추출된 것으로 황색광에 반응하여 뉴런을 hyperpolarization, 즉 억제하는 효과를 보였다[15,16]. Halorhodopsin 도 optogenetics에서 많이 사용되고 있지만 ChR2 보다 신경세포에서의 발현율이 낮고 발현시 trafficking 단계가 추가적으로 필요하다[17]. 또한 광조사 시간이 길어지면 조사가 멈춘 후

불활성화 구조로 회귀하여 정상 신경전류를 회복하는데 수 십분이 걸리는 특성을 나타낸다[18].

**Light-driven outward proton pump:** Light-driven outward proton pump 는 여러 가지 종류가 있지만 optogenetics 에서 가장 많이 쓰이는 것은 Halobacterium sodomense에서 추출된 archaerhodopsin-3(Arch) 이다[1]. Light-driven outward proton pump는 뉴런에서 잘 발현되고 광자극이 끝난 뒤에 회복되는 속도도 빠르다. 뉴런에서 발현되었을 때는 황색이나 녹색파장의 빛을 사용하여 자극하고 빛을 흡수한 Light-driven outward proton pump는 세포내의 cation 들을 세포 밖으로 펌프해 내어 hyperpolarization을 유도한다[1]. Arch는 효율이 halorhodopsin 보다 hyperpolarization 효율이 월등한데 깨어있는 상태의 쥐의 cortex 내부의 뉴런을 100% silencing 시킬 수 있다[14]. 최근에는 ArchT 라는 기존 Arch 보다 3.5배 높은 광감도를 가지는 Light-driven outward proton pump가 개발되어 더욱 넓은 뇌 영역을 silencing 시킬 수 있게 되었다[15]. 이를 이용하여 뇌용적이 큰 영장류 등의 고등동물에도 효과적으로 optogenetics를 사용한 실험을 수행할 수 있다. 또한 Light-driven outward proton pump의 경우 광원의 자극파장도 다양하다. Mac 이란 Light-driven outward proton pump 는 청색광에 의해 자극되어 target 뉴런을 silencing 시킨다[14]. 황색광에 의해 자극되는 Halo 등과 병행하여 사용하면 여러 종류의 뉴런을 광원파장만 변경시켜 차등조절할 수 있

다[14].

### 1.1.2. Type 2 Rhodopsins

Type 2 rhodopsin 은 고등한 무척추동물 또는 척추동물의 안구에 분포하는 photoreceptor 이다. 무척추동물의 rhodopsin 은 척추동물의 rhodopsin 과 구조적 측면과 작동 메커니즘측면에서 다소 다르다. 척추동물의 rhodopsin 의 메커니즘은 잘 알려져 있는데 반해 무척추동물 rhodopsin 의 작동 메커니즘은 아직 연구가 부족한 상태이다[19]. 척추동물의 rhodopsin에서는 빛이 없을 때 Schiff base 의 proton donation 이 일어나 인접한 glutamate 의 곁가지 사이에 salt bridge가 유지된 상태이다가 빛이 조사되면 De-protonation 이 일어나 salt bridge 가 붕괴되면 구조적인 변형이 발생하여 가려져 있던 Guanine nucleotide exchange factor (GEF) 가 heterotrimeric G protein 으로 노출되게 된다[19-20]. type 2 rhodopsin 의 종류를 결정짓는 것은 바로 이 G protein 의 종류이며 G protein 의 종류에 따라 광조사량에 따른 신경신호 전도도가 달라진다. 광활성화 된 type 2 rhodopsin 은 transducin을 거쳐 cGMP phosphodiesterase를 활성화 시키고 세포 내의 cGMP 의 농도를 저하시킨다. cGMP 의 농도가 일정 수준 이하로 내려가게 되면 cGMP-gated sodium channel이 닫히고, 세포는 hyperpolarization 된다[21]. Type 2 rhodopsin 은 GPCR을 가지고 있기 때문에 dopaminergic, serotonergic, 그리고 adrenergic pathway 에 반응하고 glutamate나 GABA 와 같은

neurotransmitter 에도 반응한다[6]. 이 GPCR을 빛에 의해 활성화 되는 photochemical actuator 로 만든 것이 OptoXR 이다[22]. 이 OptoXR 은 뉴런에서 높은 효율로 발현되고 자유롭게 움직이는 쥐에게 500nm 파장의 레이저를 조사하여 alpha-1 과 beta-2 adrenergic receptor 와 함께 활성화 시킬 수 있다[22].

## 1.2. 합성 photochemical actuator

자연적으로 세포에는 많은 생화학 반응이 일어나고 있고 이를 매개할 효소들의 종류는 매우 다양하다. 이 중 metabolite 나 신호분자, 이온의 농도에 따라 물질을 펌프하거나 전달하는 효소들은 합성 photochemical actuator 로 재탄생 할 가능성이 있는 후보 단백질들이다. 다양한 효소들의 반응기들을 재조합하거나 posttranslational modification을 통해 자연적으로 존재하는 photochemical actuator 의 발현 효율과 기능을 증강시킬 수 있다. 자연적으로 존재하는 ChR2 는 매우 낮은 전도도를 가지기 때문에 모든 종류의 뉴런에서 action potential을 발생시킬 수 있는 것은 아니다[23]. Grandinaru et al. 은 ChR2 의 134 위치의 arginine 기를 histidine 으로 바꾸어 준 ChR2-H134R을 개발하여 steady state 상에서의 전도도를 증가시킨 바 있다[24]. Type 1 계열의 rhodopsin 이 포유류 세포에서 발현율이 저하되는 문제를 해결하기 위해서 halorhodopsin 에 endoplasmic reticulum export motif를 추가한 시도도 있었으며[25] ChR1 과 ChR2 의 hybrid(ChIEF)를 사

용하여 포유동물 세포에서의 발현 성공률과 spiking 성질을 개선시킨 사례도 있다[26]. 또한 ChR 은 지속적으로 광자극을 주면 점점 탈감작 (desensitization) 이 일어나 추가적인 광자극에 동일한 반응성을 유지할 수 없게 되는 단점이 있었다[23]. 위에서 언급된 ChIEF 는 이러한 단점을 어느 정도 개선한 형태의 ChR 이며 ChR 의 E123 잔기를 threonine 이나 alanine 으로 바꾸어 desensitization을 줄이고 자극에 대한 반응속도를 증가시킨 ChETA 도 개발되었다[27]. 특히 ChETA 의 경우 광자극이 사라졌을 때 채널이 닫히는 속도가 ChR2 원형보다 빨라 200Hz 의 고빈도 자극에도 plateau potential 의 감소나 extra spike가 관찰되지 않았다[27]. ChETA 와는 달리 Step Function Opsin(SFO) 는 광자극이 끝난 뒤에도 retinal isomer 구조를 유지하도록 설계된 photochemical actuator 로 자극이 끝나고 수십초 가량 활성화 상태를 유지할 수 있다[28]. 또한 SFO 는 두가지 파장의 광자극에 활성화/비활성화될 수 있는데 10ms pulse 의 청색광에서는 활성화 되었다가 황색광에서는 비활성화 되도록 설계되어 있다. 황색광에 의해 비활성화가 되는 속도는 광자극이 제거되었을 때 자연적으로 비활성화 되는 속도보다 빠르다. 광자극 제거시 비활성화에 소요되는 시간은 SFO 의 세대가 올라갈수록 증가되어 왔다[23]. 2세대 SFO 인 ChR2(D156A)에서 3세대 SFO 인 D156과 C128 변종을 결합한 SSFO 의 경우 비활성화에 소요되는 시간은 30분에 달한다[29]. 비활성화에 소요되는 시간이 길어질수록 two-photon stimulation 테크닉의 활용도가 높아지는데 활성구조를 유지하는 긴 시간동안 two-photon spot 이 타겟 세포나

조직을 스캔할 수 있기 때문이다. VChR1 과 C1V1 이라는 ChR2 의 변종은 저파장의 적색광에서 활성화되도록 설계되었다[30]. 적색광을 사용하면 고파장의 청색광과는 달리 조직투과율이 우수하여 비침습적인 방법으로 두뇌 깊숙한 곳에 빛을 전달할 수 있다. 또한 자극 파장대가 다른 종류의 ChR2 들과 확연히 다르기 때문에 다른 종류의 photochemical actuator를 사용하여 동시에 여러개의 뉴런을 targeting 한 뒤 파장대가 다른 레이저를 조사하여 다표적 실험을 수행할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

## 2. Optogene 의 전달과 targeting

### 2.1. 바이러스를 사용한 Optogene 의 전달과 targeting

바이러스는 optogenetics에서 photochemical actuator 코딩 유전자를 원하는 세포에 전달하는 물질로 유용하게 쓰이고 있다. 바이러스의 크기는 20~200nm 정도로 신경세포에 비해 매우 작고 혈관이나 조직을 통해 직접적으로 원하는 부위에 주입이 가능하며 transfection rate 는 거의 100%에 달한다. 바이러스는 host cell 에 specific 하게 결합할 수 있는 특수한 단백질을 가지고 있는데 이 단백질의 종류에 의해 cell-specific 하게 transfection 이 가능하다. 즉 바이러스를 이용한 targeting 방법은 세포에서 기능과 모양에 따라 다르게 발현되는 signature 단백질을 바이러스를 이용하여 targeting 하는 것이다[31]. 예를 들어 fast-spiking을 하는 뉴런만



이 발현하는 parvalbumin 이라는 단백질을 target 으로 하여 fast-spiking 뉴런만을 transfection 시킬 수 있다[32]. 가장 transfection 에 많이 쓰이는 바이러스는 Adeno-Associated Virus (AAV) 인데 자연적으로 존재하는 AAV 가 가지고 있는 표면단백질의 종류는 약 100가지에 달하고 유전자 합성과 mutagenesis를 사용하면 수백만가지 종류의 표면단백질을 가질 수 있어 Cre 같은 특수한 단백질을 발현하도록 설계된 숙주를 사용하지 않더라도 바이러스 그 자체의 다양한 표면 단백질로 인해 cell-type specificity 가 매우 높은 편이다[31]. 이러한 표면단백질들은 한 종류의 바이러스에서만 발현되는 것이 아니며 다른 종류의 바이러스에도 발현시켜 기능을 교환하거나 증강할 수 있다. 예를들어 vesicular stomatitis virus G 의 표면단백질은 transfection efficiency를 높여주는 효과가 있는데 이 단백질을 lentivirus에서도 발현시킬 수 있다[31].

세포막에 발현된 단백질이 아닌 세포 내에서 발현되는 site-specific recombinase 와 같은 효소단백질의 발현 차이를 이용하여 서도 cell-specific transfection을 가능케 할 수 있다. 이러한 recombinase 에는 Cre 나 Flp 등이 있는데 유전자 조작을 통해 host animal 의 특정 세포가 Cre 나 Flp 중 하나만 발현하게 하거나 Cre/Flp 모두 발현하도록 하여 전달하는 유전자가 해당 조건에 맞게 발현될 수 있도록 설계하는 것이다[33]. 그러나 이 방법을 사용하기 위해서는 먼저 Cre/Flp를 발현하는 동물모델을 만들어야 하는데 특정신경세포나 신경회로에서만 이 유전자를 발현하도록 설계하는 것이 매우 어렵고 결과 또한 정확히 예측할 수 없다[31]. 만약 wild

type 의 동물모델에서 어떤 신경세포나 신경회로를 특정할 수 있는 단백질이 발현되고 이를 targeting 할 수 있다면 가장 이상적인 것이다. 현재까지 이 목적에 가장 부합하는 바이러스는 AAV 라고 볼 수 있는데 여타 바이러스와는 달리 wild type에서 발현되지 않는 특수한 recombinase 없이도 다양한 종류의 세포에서 유전자를 발현시킬 수 있다. 또한 AAV는 알려진 세포독성이나 부작용이 없고 실험에 쓰이는 바이러스 중 transfection후 가장 오랜 기간 동안 유전자를 발현하기에 적합한 바이러스이다[34]. 실제로 지금까지의 연구 중 가장 오랫동안 신경세포에서 photochemical actuator를 안정적으로 발현한 사례는 Busskamp et al. 의 연구이다[34]. Retinal degradation 질병 모델 쥐에 mCAR promotor를 사용한 AAV로 transfection 시킨 결과 최장 8달 까지 안정적인 유전자 발현이 관찰되었다. hRO 와 mCAR promotor에서 유전자 발현기간이 다른 것으로 보아 transfection을 통한 안정적인 유전자 발현은 promotor 의 종류에 큰 영향을 받는 것으로 보인다[34]. 높은 안정성을 보임에도 불구하고 AAV를 사용하여 특징적인 하나의 세포에서 하나의 유전자를 높은 레벨로 발현하는 것은 어렵는데, 이러한 문제를 해결하기 위해 현재는 세포의 종류에 따른 세포내에서 발현되는 recombinase의 종류를 분석하고 AAV로 전달되는 유전자의 promoter를 무작위로 조합 후 세포 특이적인 promoter 가 존재하는지 데이터베이스를 구축하고 있다[35,36].

바이러스를 이용한 targeting 방법 중 또 하나는 여러 바이러스들의 조합을 사용하여 실제 optogene을 가진 바이러스만 목적지에

도달할 수 있도록 유도하는 방법이다. 예를 들어 유전자 조작된 rabies virus 는 optogene을 가진 AAV나 HSV 등이 특정한 신경회로에서 synapse를 통과하여 다음 뉴런으로 건너갈 수 있도록 도와준다[37]. 이는 곧 cell-specific targeting 뿐 아니라 circuit-specific targeting이 가능하다는 점을 시사한다. 어떤 특정한 세포에서 Cre를 발현하는 mouse를 제작한 뒤 Cre-dependent helper virus를 주입하면 이 helper virus 는 Cre를 발현하는 세포만 transfection 시키게 된다. 이후 Cre-recombination을 통해 helper virus 는 두 개의 단백질을 발현하게 되는데 하나는 다음 세포 감염을 도와주는 TVA 라는 단백질과 단일 시냅스 상의 retrograde spread에 필요한 rabies glycoprotein B19G 이다. 그 다음 mutagenesis로 제작된 EnvA pseudotyped rabies virus를 사용하게 되는데 이 바이러스는 TVA가 발현되는 신경세포만 감염시킬 수 있다. 즉 결과적으로 Cre를 발현하는 cell 만 감염시킨 EnvA pseudotyped rabies virus 는 세포 내에서 증식하며 해당 뉴런 세포막에 발현된 B19G를 coat 에 입고 방출되게 되는데 B19G를 가진 EnvA는 TVA를 발현하지 않는, 즉 Cre를 발현하지 않는 인접한 뉴런(presynaptic neuron)을 감염시킬 수 있다. 그러나 이 EnvA 는 B19G를 생산할 수 있는 능력이 없기 때문에 추가적인 감염은 멈추게 되고 정확히 시냅스 상으로 연결된 presynaptic neuron만을 감염시키게 된다[36-38]. Rabies virus 뿐 아니라 Cre-dependent 유전자 카세트를 지닌 AAV를 helper virus 도 이러한 방법에 사용이 가능하며[38] 2차 transfection에 사용되는 바이러스에 photochemical actuator

gene을 삽입하게 된다면 in vivo 상에서 실시간으로 특정 신경회로를 제어할 수 있을 것이다. 이 과정을 지속적으로 반복하면 특정한 뉴런(우리가 target 으로 하는 뉴런)과 시냅스로 연결된 다른 종류의 뉴런의 종류와 기능, 그리고 전달되는 정보 등을 밝혀낼 수 있으며 이론적으로는 이를 이용해 전체적인 신경 회로망의 구조까지도 밝혀낼 수 있을 것이다.

위에서 언급한 바와 같이 단순히 바이러스와 숙주에서 발견되는 다양한 recombinase 만을 이용한 targeting 은 가장 효율적이고 또 범용적으로 쓰이는 방법이다. 그러나 세포에서 특이적인 signature 유전자나 signature 단백질을 정확하게 targeting 하는 것은 불가능 한 경우가 많다. 어떤 신경세포들은 그 자체로는 다른 신경세포들과 차별화된 분자생물학적인 signature 가 없지만 ‘특징적인 연결성 (signature connectivity)’을 가지고 있다[31]. 이러한 종류의 signature은 다른 신경세포보다 차별화될 정도로 길게 발달된 axonal projection[39]일 수도 있고, 주위 신경세포들과의 방향성이 존재하는 시냅스 연결(directional selectivity)일 수도 있다[40]. 길게 확장되어 있는 뉴런을 이용하는 방식의 가장 큰 장점은 정확한 광자극이 가능하다는 점에 있다. 아무리 정확한 해부학적 위치에 바이러스를 주입하였다 하더라도 target 세포에 인접하는 세포들 또한 감염될 가능성은 늘 존재한다. 즉 target 세포 뿐 아니라 주변세포들도 optogene을 가지게 되고 target 세포에 광자극을 주면 주변 세포들도 그에 대한 반응을 하게 된다. 그러나 CSMN 과 같은 중추신경과 연결된 긴 axonal projection을 가진 뉴런들의 axonal terminal

부분을 감염시키면 이 감염이 axon을 따라 진행되어 감염부위와 멀리 떨어진 soma 까지 감염시키게 된다. 즉 최초 감염부위와 멀리 떨어진 곳, soma 부위에 광자극을 주게 되면 이러한 비특이적인 transfection 으로 인한 영향을 최소화 할 수 있다[31]. Rabies 와 herpes virus를 사용한 anterograde labeling 방법이 여기에 적용될 수 있다. CSMN 과 같은 긴 projection을 가지는 뉴런의 axon terminal 에 Rabies virus를 주입하면 중추신경과 시냅스를 형성하는 부위에서 연결된 뉴런을 감염시킬 수 있고 이 부위에 광 자극을 주어 활성화/비활성화 되는 부위를 기록, 중추신경계에서의 뉴런 mapping을 비 특이적인 감염으로 인한 배경노이즈 없이 구현할 수 있다[31]. Higley et al. 은 이 테크닉을 이용하여 cortex에서 striatum 까지의 dopamin-2 receptor 만 발현하는 뉴런의 위치를 mapping후 선택적으로 활성화 하여 D2 receptor 가 glutamergic한 시냅스 전달에 어떤 역할을 하는지 밝혀낸 바 있다[41]. Drd2-GFP 쥐와 Emx1 에 의해 조절되어 발현되는 Cre 쥐를 교배 한 뒤 DIO-ChR2-mCherry를 교배된 쥐의 cortex 에 주입하였다. Cortex 부위에서 감염된 axon projection 은 발현된 mCherry 로 인해 붉은 색을 띠고 endogenous 하게 발현되고 있던 GFP 때문에 striatum내에 존재하는 dopamine receptor를 가지고 있는 뉴런의 cell body에서 초록색을 띠게 된다. 감염된 붉은색 뉴런에서 trans-synaptic 하게 다음 뉴런(GFP를 발현하는)을 감염시키게 되면 striatum 내에 존재하는 dopamine 2 receptor를 가진 뉴런도 ChR2를 발현하게 되고 여기에 청색광을 조사하여 해당 뉴런만 활성

화 시킬 수 있었다[41].

이 뿐만 아니라 시냅스간의 Retrograde 나 Anterograde labeling 방식을 응용하면 target 뉴런과 직접 연결되지 않은, 바이러스 감염 뉴런과 target 뉴런 사이에 하나의 뉴런이 더 존재하는 경우에도 뉴런들의 연결성을 확인할 수 있다[42]. 그러나 이 실험에서 사용된 vesicular stomatitis virus 은 target gene을 장시간 발현시킬 경우 세포독성이 급격하게 증가한다는 단점이 있다[42]. Lentivirus 나 AAV 는 이를 가능케 하는 바이러스 종류 중 가장 세포독성이 낮지만 vesicular stomatitis, rabies 나 herpes virus 보다 현저하게 낮은 retrograde labeling 효율을 가진다[31]. Coat 단백질의 조작을 통해 이러한 문제를 해결할 수 있을 것으로 보이며 이와 관련한 연구들이 진행되고 있다.

## 2.2. 바이러스를 사용하지 않은 Optogene 의 전달과 targeting

바이러스를 사용하지 않고 발생학적으로 Optogene을 neocortical layer 등의 특정 부위에서만 발현되도록 targeting 하기 위해서는 주로 utero electroporation(IUE) 방식을 사용한다. IUE 는 쥐의 배아를 자궁 내에서 electrophoration을 하여 바이러스 없이 DNA를 삽입할 수 있다. 전달할 수 있는 DNA 길이의 제한이 있는 바이러스와는 달리 IUE 는 naked DNA를 전달하기 때문에 긴 promoter도 배아상의 뉴런에 전달이 가능하다. IUE를 사용하는

것의 가장 큰 장점은 optogene 이 쥐가 발생하는 순간부터 발현되기 시작하기 때문에 발생과정상의 뉴런을 연구할 수 있으며 어린 쥐의 조직 샘플을 제작 가능하다는 것이다. IUE 의 단점은 발현되는 optogene 의 수준이 바이러스를 이용한 transfection 보다 낮다는 점이며 이것은 전달효율이 낮아 전달되는 유전자의 수가 적기 때문인 것으로 보인다[31].

### 3. Optogenetics 의 장점과 신경생물학에서의 적용사례

기존의 신경생물학 연구는 주로 신경세포나 신경회로에 전기적인 자극을 주거나 약물을 사용한 활성화/비활성화, 그리고 회로일부를 절제하거나 다시 재접합 하는 등의 방법을 활용하여 신경세포 내의 분자생물학적 메커니즘, 다양한 신경세포들의 기능, 더 나아가 신경회로가 개체의 행동과 어떤 관련성이 있는지를 탐구해 왔다. 그러나 기존의 방법들에게는 좀 더 근본적인 한계가 존재하는데 그것은 cell-specific 하거나 circuit-specific 한 제어가 매우 어렵다는 것이며 또한 in vivo 의 경우 살아있는 동물모델에서 어떤 특정 신경세포나 회로가 어떻게 상호작용하고 그러한 상호작용이 시간에 따라 어떻게 변화하는지를 관찰하는 것이 불가능하다는 것이다[43]. 그러나 Optogenetics를 활용한 실험방법들은 기존의 실험방법들이 가진 취약점들을 어느정도 보완해 나가고 있다. 특히 정확한 특정 세포종류나 회로만을 자극하거나 시각화 할 수 있다는 측면에서 그 적용성이 높다고 할 수 있겠다.

Optogenetics 이 기존의 신경생물학 연구방법론에 비해 월등한 점은 세포 종류에 대해 특이적으로 적용이 가능하다는 점이다. 신경조직은 여러 가지의 형태적으로나 유전적, 그리고 기능적으로 다른 세포 종류들로 구성되어 있으며 이러한 복잡성 때문에 분리작업을 거치지 않고는 특정한 종류의 신경세포의 기능만을 연구하는 것은 불가능에 가까웠다[43]. 때문에 Optogenetics 가 도입되기 전에는 해부학적인 특성이나 조직학적 특성에만 의존하여 비교적 넓은 범위에 전기 자극 등을 가해 신호를 기록하는 방식이 사용되었었는데 이 방식은 정확히 어떤 종류의 세포가 자극되는지를 알 수 없었다. 일례로 Neocortex 는 inhibitory 뉴런과 excitatory pyramidal 뉴런이 복잡하게 섞여있는 기관이고 종속된 뉴런의 종류는 매우 다양하기 때문에 cortex 의 기능장애로 인한 질병들이 많음에도 연구가 진척되기 어려웠다[43]. 특히 Neocortex 에 존재하는 fast-spiking inhibitory interneuron 만을 정확히 targeting 하여 회로의 메커니즘을 밝히는 것은 많은 신경정신질환치료에 큰 도움을 줄 것이라 생각되어 왔다 [44]. 여기에 Optogenetics를 사용하기 위해서는 먼저 해당 뉴런만이 가진 분자적인 특징이 존재해야 한다. 상기에서 언급한 바와 같이 fast-spiking inhibitory interneuron 에는 parvalbumin 이라는 Ca<sup>2+</sup> binding 단백질이 특징적으로 발현되는데 이것을 target 으로 삼아 photochemical actuator 유전자를 전달한 다음 빛을 사용하여 활성화 시켰을 때 gamma band에서의 연결성이 증가함을 관찰하였다[32]. 이러한 세포 종류에 특이적인 optogenetics 의 특징은



in vitro 뿐 아니라 살아있는 동물모델에서도 적용될 수 있다. Kravitz et al. 은 살아있는 Cre를 발현하는 transgenic rat에서 ChR2를 사용, striatal projection neuron 의 다양한 subtype 들의 종류를 밝히고 분류해 낸 바 있다[45]. 이 실험에서는 retina 와 brain stem을 자극하였는데 자극하는 부위에 따라, 또 사용하는 레이저의 파장에 따라서도 자극되는 세포의 종류가 달라진다는 점을 발견하였다[45]. 뉴런의 분자적인 targeting 외에도 광원의 파장이나 강도, 자극의 frequency 등을 세분화 하여 더욱 정확한 뉴런 종류 특이적인 실험이 가능할 것이다.

Optogenetics 의 두 번째 장점은 바로 자극 시간을 정확히 설정할 수 있고 자극의 제거 또한 쉽고 정확하다는 것이다. 실제의 신경자극과 신호전달은 거의 밀리초 단위로 발생하며 따라서 뉴런의 전기적 신호를 측정하고 자극하는 단위 시간 또한 밀리초 수준의 정확도를 지녀야 한다[43]. 기존의 전기생리학에서 쓰이던 장비들도 이 정도의 정확도를 가지고 있지만 여러 종류의 세포가 혼합된 넓은 영역의 뉴런들을 자극하여 신호를 측정하기 때문에 부정확한 신호해석이 문제가 되었다. 무엇보다 가장 큰 단점은 살아있는 동물에서의 자극/반응 측정을 정확히 하는 것이 힘들다는 것이며 약물을 이용한 자극 또한 그 반응속도가 느려 순간적인 신경회로의 활성/불활성에 따른 행동변화를 관찰할 수가 없다는 것이다. 역으로 어떤 외부적인 자극(보상신호: reward cue) 가 가해질 때에도 행동과 함께 정확하게 뉴런의 활성이 측정되어야 하는데 기존의 방법에서는 역시 어려운 점이다. 측정 또한 뉴런의 종류에 따른 최적 자극량의 차이, 그리고

자극신호 속도와 빈도에 따라 그 반응이 다른 점 등의 복잡한 메커니즘들을 기존 전기생리학 장비에서 구현하는 것이 어려웠다. 예를 들어 ventral tegmental area(VTA) 의 dopaminergic neuron 은 두가지의 다른 firing 패턴, 즉 3~8Hz 저주파의 tonic activity와 10~20Hz 고주파의 phasic burst firing 패턴을 보이는데, In-vivo 상에서 정확히 VTA 의 dopaminergic 뉴런에게만 이 firing 패턴을 모사하여 전달하는 것은 기존의 전기생리학적 테크닉으로는 불가능하나 optogenetics는 이를 가능하게 해준다[46,47]. Tasi et al.은 Tyrosine hydroxylase(TH) 와 internal ribosomal entry site-Cre 유전자를 가진 transgenic mouse 의 VTA 에 EF1- $\alpha$  promoter를 가진 AAV로 ChR2-EYFP를 전달하여 VTA 의 dopaminergic 뉴런에만 발현되도록 하였다[48]. 이 실험에서 TH-immunopositive 한 세포와 EYFP가 발현된 세포의 90%가 일치하였는데 이는 targeting 정확도와 효율이 매우 높다는 것을 보여준다. in vitro 상에서 기존의 전기생리학적 방식으로 자극하여 측정된 신호와 광원의 점멸로 자극하여 측정된 신호도 거의 비슷함을 알 수 있었으며 ChR2 가 세포 자체의 생리학적 변화를 일으키지 않는다는 것도 확인하였다. 이후 의식이 있는 쥐에게 특정 패턴의 광자극을 주어 dopaminergic 뉴런을 자극하여 이것이 행동으로 어떻게 표현되는지를 보았는데 burst-like 패턴에서는 보상을 찾는 행동을 보이고 tonic 패턴에서는 그러한 행동이 보이지 않음을 관찰하였다[48]. Stuber et al 의 연구에서는 basolateral amygdala(BLA)에서 시작된 신경회로가 nucleus accumbens 의 신경회로와 어떤 상호작용을 하여 보상성

행동을 보이는지를 optogenetics를 사용하여 보여주었다[49]. 먼저 Camk2 $\alpha$  promoter를 가진 AAV를 사용하여 ChR2-EYFP를 BLA 부분에 주입하여 glutamergic 뉴런만을 감염시킨 후 광자극을 주었을 때 NAc에서 excitatory 신호가 발생한 것을 탐지하였다. 광자극을 cell body 와 axon 종말부 두 군데서 줄 수 있다는 점을 활용하여, BLA-NA 신경섬유를 자극하는 것은 쥐의 보상성 행동증가를 유도하지 않으나 BLA cell body에 자극이 가해졌을 때 쥐의 보상성 행동증가가 유도된다는 것을 밝혀내었다[49]. 또한 여러 종류의 신경 blocker를 주입한 쥐에게 광자극을 주면서 행동변화를 관찰한 결과 dopamine D1 type receptor (D1R) antagonist 주입 시 광자극에도 불구하고 행동변화가 관찰되지 않았다[49]. 이와 같이 optogenetics 의 활용은 동물행동을 신경회로와 연계하여 실시간으로 관찰하여야 할 때 자극이 필요한 좁은 시간대에 거의 즉각적으로 회로-특이적인 자극을 줄 수 있어 매우 유용하다.

세 번째 optogenetics 의 장점은 pathway 특이적인 자극이 가능하다는 점이다. 기존의 전기생리학적 접근법은 구심성-특이적인 신경신호 전달과 원심성-특이적인 신경신호 전달을 구분하여 자극하는 것이 힘들었고 다른 형태의 신경전달 pathway를 나누어 자극하는 것 또한 정확하지 않았다[43]. 동일한 뇌의 부분에서도 조절 방식이나 pathway 의 차이에 따라 같은 형태의 자극이라도 전혀 다른 결과물을 보일 수 있어 이 차이를 연구할 수 있어야 뇌의 기능을 정확하게 이해할 수 있다. 예를 들어 Amygdala 는 공포와 같은 부정적인 감정을 처리하는 장소이기도 하지만 동시에 외부환경에서 오는

중요한 자극(긍정적일수도, 부정적일수도 있는)들에 대해 취할 행동반응을 취합하고 분석하는 기관이기도 하다. 상기에서 언급한 Stuber et al. 의 연구 역시 BLA 와 NAc 사이에 연결된 다양한 뉴런들 중 glutamateric 뉴런만을 특정적으로 자극시킨 사례이다[49]. Optogenetics를 사용하여 특정한 pathway 만을 자극하는 것이 매우 정확하다는 것을 보여주는 연구는 Tye et al. 의 BLA 와 central amygdala(CeA)간의 신경회로를 부위별로 자극하여 amygdala 가 ‘불안감’ 이라는 감정을 어떻게 조절하는지를 밝힌 연구이다[50]. 이 연구는 위에서 언급한 길게 확장된 신경세포를 활용한 targeting 의 사례이기도 하다. CeA 에 위치한 BLA로부터 뻗어나온 신경종말에 ChR2를 사용하여 (CaMKII $\alpha$  promoter, AAV) BLA-CeA 회로와 BLA를 감염시킨 후 광자극을 BLA-CeA 부분과 BLA 부분만 차등적으로 준 결과 BLA-CeA 부분을 광자극했을 때만 쥐의 불안감이 줄어드는 양상을 보였다[50]. 또한 저자는 eNpHR3.0 이라는 optogene 을 추가적으로 사용하였는데 이것은 amber light에서 이 optogene 이 발현된 뉴런을 억제한다. eNpHR3.0를 BLA-CeA 의 glutamateric neuron 에만 전달하여 BLA-CeA 그리고 BLA에서 광자극을 주어 불안감 감소 효과가 반전되는지를 확인하였다[50]. 이와 같이 특정 pathway 에 위치한 신경 회로만을 다양한 optogene 과 자극 파장, targeting 전략을 사용해 활성화/비활성화 시킬 수 있다는 것은 optogenetics의 큰 장점이라 할 수 있겠다.

#### 4. Optogenetics 의 한계

모든 형태의 유전자 transfection을 사용한 실험에서의 가장 큰 숙제들 중 하나는 전달된 유전자가 host cell 의 endogenous gene expression처럼 오랜 기간 동안 지속적으로 발현하게 하는 것이다. 신경생물학에 있어 시냅스나 신경회로의 생성과 소멸을 관찰하는 것은 매우 중요하며 이러한 현상이 일어나는 데는 긴 시간을 필요로 한다. 즉 optogene의 발현이 이 현상들이 일어날 때 까지 지속적으로 유지되는 것이 중요하다. 또한 긴 시간 지속되는 유전자들의 발현이 세포에 독성을 띠거나 세포의 성질을 변형시키지 않아야 한다. 유전자 변형주를 사용하거나 AAV를 사용한 유전자 전달, 그리고 electroporation, sonoporation 등의 방법들은 최소한의 세포독성과 최대한의 유전자 발현 안정성을 위해 다양한 조합으로 사용되고 있다[51]. 그러나 이러한 방법들에도 불구하고 유전자의 안정적인 발현은 수일~수개월을 넘기기 힘들다. AAV 나 in utero electroporated plasmid를 사용한 transfection 사례에서도 평균적으로 안정적인 유전자발현기간은 수 일에서 수 주로 알려져 있으며 무엇보다 발현량이 지속적으로 유지되는지는 아직 증명되지 않았다 [31]. 또한 이러한 장기간의 외부 유전자의 발현은 숙주 신경세포의 axon 부분에서 변형을 초래한다는 보고도 존재한다[52]. Miyashita et al.은 현재 optogenetics에서 많이 쓰이고 있는 channelrhodopsin-2(ChR2)를 in-utero DNA electroporation를 사용하여 rat 의 L2/3 의 pyramidal cell 에 전달하여 세포에 주는

영향을 조직학적으로 관찰하였다. 결과 40일 이상 ChR2를 발현하는 pyramidal cell 들은 원통형의 구조에 의해 proximal apical dendrite 가 감싸여 있었으며 둥근 구조물이 신경세포 cell body 에 달라붙어 있었다. 또한 L2/3 pyramidal cell 의 시냅스가 비정상적으로 다른 시냅스와 연결됨을 발견하였다. 이러한 변성은 단순히 GFP gene이 발현되었거나 혹은 ChR2 가 발현되지 않은 axon 에서 는 발견되지 않았으며 CAG promotor를 사용하여 viral transfection 시킨 경우에는 80일간의 발현기간에도 변성이 관찰되지 않았다. 그러나  $\alpha$ CaMKII promotor를 사용한 경우 변성되는 확률이 증가했고 IUE 방식의 transfection 보다 viral transfection 방식이 변성확률을 낮춰준다고 하였다. ChR2 에 의한 pyramidal cell 의 axon 의 변성은 ChR2 의 활성화와는 무관하며 blue light 로 spiking을 주었을 때와 주지 않았을 때에 발생하는 형태학적 변성은 동일하였다[52]. 그러나 Huber et al. 의 연구결과에 따르면 위와 같은 CAG promotoer를 사용한 ChR2 의 IUE transfection 은 세포에 변성을 일으키지 않았다고 보고하고 있다[53]. Huber et al. 의 실험은 rat 대신 mouse를 사용하였는데 이러한 종의 차이가 pyramidal cell 의 변성에 대한 취약성과 관련이 있을 것이라 추정된다. 무엇보다 중요한 것은 장기간의 ChR2 의 발현이 axon 의 형태학적 변성을 일으키는 메커니즘에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다는 것이다. 한가지 가설은 ChR2 는 calcium permeation을 증가시키는데 in vivo 상에서 발현된 ChR2 는 광자극이 주어지지 않더라도 endogenous neuronal spiking 에 의해 순간적으로 활성화 되

어 Calcium flux를 증가시킬 수 있으며 이러한 비정상적인  $Ca^{2+}$  flux 로 인해 세포의 변성이 초래된다는 것이다[52,54].  $Ca^{2+}$  의 높은 flux 는 axon guidance 와 synapse targeting을 방해하며[55] 형태학적인 synaptic plasticity를 유발한다는 보고가 있다[56]. 이외에도 optogene 이 뉴런의 변화를 초래한 사례는 많다. Tye et al. 의 연구에서는 eNpHR3.0 이 발현된 세포의 somata에서 c-fos 유전자의 발현량이 대조군 보다 증가함을 보고하였다[50]. 관찰의 목적을 위해 전달된 optogene이 세포 자체에 영향을 미칠 수 있다는 가능성은 optogenetics를 실험도구로 활용함에 있어 중대한 결함이 있음을 시사한다. 현재 전달된 유전자나 photochemical actuator 의 발현이 신경세포의 종류나 부위, 위치한 회로 등에 따라 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구가 많지 않다. optogenetics를 사용한 실험 결과의 정확도를 확보하기 위해서는 이러한 점에 대한 연구가 선행되어야 할 것으로 보인다.

## IV. 고 찰

### 1. Optogenetics 의 미래: 질병의 분석

논의된 optogenetics 의 활용도를 응용하여 뇌와 신경에 관련된 질환들을 동물 모델에서 연구할 수 있다. 최신연구동향을 분석하면 optogenetics를 이용한 뇌 질환 연구의 테마는 정신분열과 우울증등의 정신 및 심리질환의 메커니즘과 관련된 신경세포의 종류 및 신경회로를 탐구하는데 optogenetics 가 유용하게 활용될 것이다.

정신분열은 그 증세가 다양하고 일관되지 않아 질병의 분석이 매우 어려웠고 질병모델을 만들기도 힘들었다. 정신분열의 진단은 정상 범주에서 벗어난 일관되지 않은 행동과 환청, 환각 등의 증상으로 진단된다[57,58]. 아직 정신분열의 질병모델은 최적화가 이루어지지 않았지만 excitation 과 inhibition 의 균형이 무너지고 cortical neural network 의 oscillation이 변성된 점을 관찰할 수 있다[59]. 또한 정신분열 환자에게서는 neocortical parvalbumin neuron 에 미세한 형태학적 변화가 발견되었다[60,61]. parvalbumin 뉴런이 neocortex에서 감마리듬과 정보취합능력을 담당한다는 가설이 있고 이 parvalbumin 뉴런을 optogenetics 로 targeting 한 연구는 Sohal et al. 등에서 이미 시도된 바 있으므로[32] 이를 응용하면 정신분열의 발생기전과 관련 신경회로를 밝혀내는 데 도움이 될 것이다.

우울증의 경우 비교적 연구가 많이 진행되고는 있지만 우울증



이나 다른 기분장애의 pathophysiology 에 대한 연구성과는 미비하다[36]. 하나의 pathway 가 아닌 다양한 신경회로가 우울증에 관여하고 있다는 것이 중론이다. 이 뿐 아니라 우울증은 serotonin 이나 noradrenaline, 그리고 도파민 등의 신경전달물질의 양과도 상관관계가 있다. 최근 우울증에 대한 연구에서 가장 큰 성과는 subgenual cingulate gyrus 부근에 고주파의 전기자극을 주면 우울증 증세가 많이 완화된다는 것이다[62,63]. 그러나 증상의 개선만으로는 우울증의 병인론적 메커니즘을 알아 낼 수 없다는 것이 문제이다. 고주파의 전기자극이 직접적으로 이 부분을 지나는 axon 이나 cell body를 자극하여 증상이 호전되는 것인지 아니면 간접적으로 국소적인 cortex 상의 뉴런 전기 활성도를 바꾸어 주는 것인지 확인이 불가능하다. Optogenetics를 사용하여 우울증에 관련된 신경회로들을 높은 정확도로 분리시켜 firing pattern 이나 유전적 특징 등을 자세하게 연구할 수 있을 것이다. 신경전달물질의 release 와 uptake, 그리고 반응도 등은 OptoXR 과 같은 G protein 관련 optogene을 사용하여 연구할 수 있을 것이며 여기서 얻어진 우울증에 관련된 정보로 우울증에 관여하는 신경세포와 신경회로를 타겟으로 하는 약을 개발하여 전신적인 부작용을 좀 더 줄일 수 있을 것이다. 또한 optogenetics 는 그 자체로도 이러한 질병의 증세를 경감시켜줄 수 있는 가능성이 있는데 이미 우울증 치료에 적용되고 있는 Deep Brain Stimulator 와 같은 신경세포 자극법과 그 작용 메커니즘이 유사하기 때문이다[62].

## 2. Optogenetics 의 미래: 질병의 치료

Optogenetics 는 지금까지 실험도구로서 사용되어 왔지만 외부에서 투입되는 빛을 사용하여 특정 신경회로를 활성화/비활성화시키며 세포 내부의 signalling pathway 도 변화시킬 수 있기 때문에 그 자체로 치료방법으로 활용될 가능성이 높다. 인간과 유사한 영장류 cortex 에 ChR2를 발현시킨 결과 수주동안 부작용 없이 일정한 레벨의 ChR2를 발현하는 것으로 보아 안전성 또한 높은 것으로 판단된다[64]. 작동메커니즘 차원에서 optogenetics는 DBS(Deep Brain Stimulator) 와 같은 치료법을 대체할 수 있을 것으로 생각된다. 파킨슨병의 경우 caudate-putamen 으로의 dopamine 공급이 감소하여 생기는 병인데 현재 DBS와 STN을 사용하여 substantia nigra를 지속적으로 자극하여 dorsal striatum 내의 도파민 농도를 일시적으로 증가시키는 치료가 행해지고 있다[65,66]. DBS는 특정 영역에 있는 세포와 신경섬유들을 모두 자극시키는 장치로 특정 세포나 회로만을 자극할 수 없어 관련된 부작용이 많다. Optogenetics 의 높은 target specificity를 활용하면 이러한 문제를 보완할 수 있을 것으로 생각된다. 실제로 한 연구에서는 optogenetic 제어를 통해 rat 의 substantia nigra 내의 dopamine 뉴런을 자극시켜 도파민 분비를 일시적으로 증가시키는데 성공했다[67]. 만약 임상적인 효과가 검증된다면 치료용 DBS electrode 대신에 소형화된 광원을 신체 내에 이식할 수 있을 것이다. 또한 cortical interneuron 에 optogenetics를 사용한 연구에서는 집중력에 중요한 gamma

oscillation 의 증가가 관찰되어 ADHD 와 같은 질병의 치료에 도움이 될 것으로 생각된다[32]. 최근의 한 연구에 따르면 optogenetics 를 이용한 광자극으로 특정 뉴런에서 신경전달물질을 분비하도록 자극하는 것이 가능했으며 약물복용을 사용하는 통상적인 방법과는 달리 전신적인 부작용이나 혈압의 변화, 그리고 뉴런내의 pH 변화 등도 관찰되지 않았다고 한다[68]. 결국 Optogenetics를 사용함에 있어 가장 큰 장애물은 그 자체의 효과보다도 optogene 의 전달방법이 될 것이다. Optogenetics 뿐 아니라 치료용유전자 전달에 있어 AAV를 사용하는 것은 전통적으로 시도되어 왔다. 최근의 임상시험에서는 AAV 가 부작용을 거의 일으키지 않는다고 보고하고 있으나[69] 면역반응이 나타날 가능성은 여전히 존재하기 때문에 뇌와 같은 중요한 장기에서의 사용은 아직 많은 연구를 필요로 한다. 때문에 비바이러스성 유전자 벡터가 많이 개발되고 있으며 이 중 가장 많이 연구되고 있는 재료들은 나노파티클과 liposome, 그리고 Chitosan 이나 PLGA, PEI 와 같은 고분자들이다[70-72]. 그러나 아직 FDA 승인을 받은 유전자 전달체는 liposome 밖에 없으며 이 liposome 의 유전자 전달효율은 바이러스를 사용한 유전자 전달효율의 30%에도 미치지 못한다[70,72]. DBS나 STN 뿐 아니라 현재 초음파를 사용한 두뇌심층부의 뉴런활성도 증가나 Transcranial Magnetic Simulation 등의 신경 자극 기술들이 이미 임상에서 시도되고 있으며 신경세포와 신경회로의 활성을 조절한다는 면에서 optogene 전달의 안전성 문제만 해결된다면 optogenetics 는 위의 기술들을 대체할만한 장점이 충분하다고 생각된다.

### 3. Optogenetics 의 미래: 치의학에서의 Optogenetics

구강악안면 영역에서의 optogenetics 의 활용은 현재까지 거의 전무하다. PUBMED 검색과 Google Scholar 검색에서 다양한 관련키워드를 사용하였음에도 치의학과 관련된 optogenetics 활용 연구는 한 건도 없었다. 다만 치의학에서의 해결되지 않은 신경 및 통증과 관련된 많은 질환들을 optogenetics를 사용해 그 기전을 규명할 수 있을 것이라 생각한다. IAN 과 같은 신경이 손상되면 그로 인해 cortical plasticity 가 일어날 수 있다는 보고가 있으며 pulpal axon 의 배치 패턴이 변화된다는 연구결과도 있다[73]. 비슷한 연구로 Nan Li et al. 은 peripheral nerve 의 손상으로 인한 중추신경계의 plasticity를 optogenetics 로 관찰하였다[74]. Peripheral nerve 의 손상 후 Inhibitory interneuron 활성도가 증가하였고 이 때문에 cortical 활성도가 감소한 것으로 나타났는데 이와는 반대 개념이지만 악안면 신경 손상으로 인한 지속적인 신경통 또한 이 중추신경의 plasticity 와 관련이 있다[75]. 유사한 접근법을 사용하여 3차신경통이나 atypical odontalgia 와 같은 악안면 영역의 idiopathic pain의 기전을 신경회로 수준에서 연구할 수 있을 것이며 더 나아가 악안면 동통을 optogenetics 를 사용하여 직접적으로 경감할 수 있을 것이다. Trigeminal neuralgia 의 증상을 완화하기 위한 한 치료법 중 방사선을 조사하여 trigeminal nerve를 불활성화시키는 방법이 있는데, 타액선 파괴 등의 부작용이 크고 재발 확률이 높아 실제 임상에서는 거의 쓰이지 않고 있다[76,77]. 이 대신에 이

식 가능한 광원장치를 사용하여 trigeminal nerve만을 inhibition 시키는 시도도 가능할 것이라고 생각한다. 또한, 굳이 광원장치의 이식을 하지 않더라도 구강악안면 부위는 광원의 전달이 쉽고, 비교적 덜 침습적인 방법으로 해부학적인 구조물을 확인하기가 용이하여 기술적인 측면에서 optogenetics 가 적용되기에 유리한 조건이라고 생각된다.

## V. 참고문헌

1. Bernstein, J. G., & Boyden, E. S. (2011). Optogenetic tools for analyzing the neural circuits of behavior. *Trends in cognitive sciences*, 15(12), 592-600.
2. Fork, R. L. (1971). Laser stimulation of nerve cells in *Aplysia*. *Science*, 171(3974), 907-908.
3. Schmucker, D., Su, A. L., Beermann, A., Jäckle, H., & Jay, D. G. (1994). Chromophore-assisted laser inactivation of patched protein switches cell fate in the larval visual system of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(7), 2664-2668.
4. Zemelman, B. V., Lee, G. A., Ng, M., & Miesenböck, G. (2002). Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron*, 33(1), 15-22.
5. Banghart, M., Borges, K., Isacoff, E., Trauner, D., & Kramer, R. H. (2004). Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nature neuroscience*, 7(12), 1381-1386.
6. Miesenböck, G. (2011). Optogenetic control of cells and circuits. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 731.
7. Ashkin, A. (1970). Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical review letters*, 24(4), 156.
8. Bialek, W. (1987). Physical limits to sensation and perception. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 16(1), 455-478.
9. Van Steveninck, R. D. R., & Laughlin, S. B. (1996). The rate of information transfer at graded-potential synapses.

- Nature, 379(6566), 642-645.
10. Laughlin, S. B., van Steveninck, R. R. D. R., & Anderson, J. C. (1998). The metabolic cost of neural information. *Nature neuroscience*, 1(1), 36-41.
  11. 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), 1263-1268.
  12. Lin, J. Y. (2011). A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Experimental physiology*, 96(1), 19-25.
  13. Kleinlogel, S., Feldbauer, K., Dempski, R. E., Fotis, H., Wood, P. G., Bamann, C., & Bamberg, E. (2011). Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca<sup>2+</sup>-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nature neuroscience*, 14(4), 513-518.
  14. Chow, B. Y., Han, X., Dobry, A. S., Qian, X., Chuong, A. S., Li, M., ... & Boyden, E. S. (2010). High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature*, 463(7277), 98-102.
  15. Han, X., & Boyden, E. S. (2007). Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PloS one*, 2(3), e299.
  16. 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), 633-639.
  17. Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y. F., Collins, A., Yu, M., Jan,

- Y. N., & Jan, L. Y. (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science*, 291(5502), 316-319.
18. Bamberg, E., Tittor, J., & Oesterhelt, D. (1993). Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 639-643.
  19. Hardie, R. C., & Raghu, P. (2001). Visual transduction in *Drosophila*. *Nature*, 413(6852), 186-193.
  20. Salom, D., Lodowski, D. T., Stenkamp, R. E., Le Trong, I., Golczak, M., Jastrzebska, B., & Palczewski, K. (2006). Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16123-16128.
  21. Baylor, D. (1996). How photons start vision. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(2), 560-565.
  22. Airan, R. D., Thompson, K. R., Fenno, L. E., Bernstein, H., & Deisseroth, K. (2009). Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature*, 458(7241), 1025-1029.
  23. Fenno, L., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2011). The development and application of optogenetics. *Annual review of neuroscience*, 34, 389-412.
  24. Gradinaru, V., Thompson, K. R., Zhang, F., Mogri, M., Kay, K., Schneider, M. B., & Deisseroth, K. (2007). Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo. *The Journal of neuroscience*, 27(52), 14231-14238.
  25. Gradinaru, V., Thompson, K. R., & Deisseroth, K. (2008).



- eNpHR: a *Natronomonas halorhodopsin* enhanced for optogenetic applications. *Brain cell biology*, 36(1-4), 129-139.
26. Lin, J. Y., Lin, M. Z., Steinbach, P., & Tsien, R. Y. (2009). Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophysical journal*, 96(5), 1803-1814.
  27. Gradinaru, V., Zhang, F., Ramakrishnan, C., Mattis, J., Prakash, R., Diester, I., ... & Deisseroth, K. (2010). Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell*, 141(1), 154-165.
  28. Berndt, A., Yizhar, O., Gunaydin, L. A., Hegemann, P., & Deisseroth, K. (2008). Bi-stable neural state switches. *Nature neuroscience*, 12(2), 229-234.
  29. Mattis, J., Tye, K. M., Ferenczi, E. A., Ramakrishnan, C., O'Shea, D. J., Prakash, R., ... & Deisseroth, K. (2012). Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nature methods*, 9(2), 159-172.
  30. Zhang, F., Prigge, M., Beyrière, F., Tsunoda, S. P., Mattis, J., Yizhar, O., ... & Deisseroth, K. (2008). Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nature neuroscience*, 11(6), 631-633.
  31. Packer, A. M., Roska, B., & Häusser, M. (2013). Targeting neurons and photons for optogenetics. *Nature neuroscience*, 16(7), 805-815.
  32. Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms

- enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459(7247), 698-702.
33. Madisen, L., Mao, T., Koch, H., Zhuo, J. M., Berenyi, A., Fujisawa, S., ... & Zeng, H. (2012). A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nature neuroscience*, 15(5), 793-802.
  34. 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*, 329(5990), 413-417.
  35. Roska, B., Busskamp, V., Sahel, J. A., & Picaud, S. (2012). Retinitis pigmentosa: eye sight restoration by optogenetic therapy. *Biologie aujourd'hui*, 207(2), 109-121.
  36. Tye, K. M., & Deisseroth, K. (2012). Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(4), 251-266.
  37. Wall, N. R., Wickersham, I. R., Cetin, A., De La Parra, M., & Callaway, E. M. (2010). Monosynaptic circuit tracing in vivo through Cre-dependent targeting and complementation of modified rabies virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21848-21853.
  38. Kuhlman, S. J., & Huang, Z. J. (2008). High-resolution labeling and functional manipulation of specific neuron types in mouse brain by Cre-activated viral gene expression. *PloS one*, 3(4), e2005.
  39. Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., & Macklis, J. D. (2005). Neuronal

- subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, 45(2), 207-221.
40. Fried, S. I., Münch, T. A., & Werblin, F. S. (2002). Mechanisms and circuitry underlying directional selectivity in the retina. *Nature*, 420(6914), 411-414.
  41. Higley, M. J., & Sabatini, B. L. (2010). Competitive regulation of synaptic Ca<sup>2+</sup> influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nature neuroscience*, 13(8), 958-966.
  42. Beier, K. T., Saunders, A., Oldenburg, I. A., Miyamichi, K., Akhtar, N., Luo, L., ... & Cepko, C. L. (2011). Anterograde or retrograde transsynaptic labeling of CNS neurons with vesicular stomatitis virus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), 15414-15419.
  43. Stuber, G. D., & Mason, A. O. (2013). Integrating optogenetic and pharmacological approaches to study neural circuit function: current applications and future directions. *Pharmacological reviews*, 65(1), 156-170.
  44. Galarreta, M., & Hestrin, S. (1999). A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature*, 402(6757), 72-75.
  45. Kravitz, A. V., Owen, S. F., & Kreitzer, A. C. (2013). Optogenetic identification of striatal projection neuron subtypes during in vivo recordings. *Brain research*, 1511, 21-32.
  46. Grace, A. A., & Bunney, B. S. (1984). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *The Journal of neuroscience*, 4(11), 2877-2890.

47. Grace, A. A., & Bunney, B. S. (1984). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *The Journal of neuroscience*, 4(11), 2866-2876.
48. 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*, 324(5930), 1080-1084.
49. Stuber, G. D., Sparta, D. R., Stamatakis, A. M., van Leeuwen, W. A., Hardjoprajitno, J. E., Cho, S., ... & Bonci, A. (2011). Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. *Nature*, 475(7356), 377-380.
50. 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), 358-362.
51. Mattis, J., Tye, K. M., Ferenczi, E. A., Ramakrishnan, C., O'Shea, D. J., Prakash, R., ... & Deisseroth, K. (2012). Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nature methods*, 9(2), 159-172.
52. Miyashita, T., Shao, Y. R., Chung, J., Pourzia, O., & Feldman, D. E. (2013). Long-term channelrhodopsin-2 (ChR2) expression can induce abnormal axonal morphology and targeting in cerebral cortex. *Frontiers in neural circuits*, 7.
53. Huber, D., Petreanu, L., Ghitani, N., Ranade, S., Hromádka, T., Mainen, Z., & Svoboda, K. (2007). Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned

- behaviour in freely moving mice. *Nature*, 451(7174), 61-64.
54. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., ... & Bamberg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 13940-13945.
  55. Tojima, T., Hines, J. H., Henley, J. R., & Kamiguchi, H. (2011). Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(4), 191-203.
  56. Patterson, M., & Yasuda, R. (2011). Signalling pathways underlying structural plasticity of dendritic spines. *British journal of pharmacology*, 163(8), 1626-1638.
  57. Endicott, J., & Spitzer, R. L. (1978). A diagnostic interview: the schedule for affective disorders and schizophrenia. *Archives of general psychiatry*, 35(7), 837-844.
  58. Kay, S. R., Flszbein, A., & Opfer, L. A. (1987). The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*, 13(2), 261.
  59. Kehrer, C., Maziashvili, N., Dugladze, T., & Gloveli, T. (2008). Altered excitatory-inhibitory balance in the NMDA-hypofunction model of schizophrenia. *Frontiers in molecular neuroscience*, 1.
  60. Gonzalez-Burgos, G., Hashimoto, T., & Lewis, D. A. (2010). Alterations of cortical GABA neurons and network oscillations in schizophrenia. *Current psychiatry reports*, 12(4), 335-344.

61. Lewis, D. A., & Gonzalez-Burgos, G. (2006). Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nature medicine*, 12(9), 1016-1022.
62. Mayberg, H. S., Lozano, A. M., Voon, V., McNeely, H. E., Seminowicz, D., Hamani, C., ... & Kennedy, S. H. (2005). Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron*, 45(5), 651-660.
63. Mayberg, H. S. (2002, October). Modulating limbic-cortical circuits in depression: targets of antidepressant treatments. In *Seminars in clinical neuropsychiatry* (Vol. 7, No. 4, pp. 255-268).
64. 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), 191-198.
65. Berney, A., Vingerhoets, F., Perrin, A., Guex, P., Villemure, J. G., Burkhard, P. R., ... & Ghika, J. (2002). Effect on mood of subthalamic DBS for Parkinson's disease A consecutive series of 24 patients. *Neurology*, 59(9), 1427-1429.
66. Derost, P. P., Ouchchane, L., Morand, D., Ulla, M., Llorca, P. M., Barget, M., ... & Durif, F. (2007). Is DBS-STN appropriate to treat severe Parkinson disease in an elderly population?. *Neurology*, 68(17), 1345-1355.
67. Bass, C. E., Grinevich, V. P., Vance, Z. B., Sullivan, R. P., Bonin, K. D., & Budygin, E. A. (2010). Optogenetic control of striatal dopamine release in rats. *Journal of neurochemistry*, 114(5), 1344-1352.
68. Kalivas, P. W. (1993). Neurotransmitter regulation of

- dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Research Reviews*, 18(1), 75-113.
69. Bainbridge, J. W., Smith, A. J., Barker, S. S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., ... & Ali, R. R. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine*, 358(21), 2231-2239.
  70. Ganta, S., Devalapally, H., Shahiwala, A., & Amiji, M. (2008). A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 126(3), 187-204.
  71. Panyam, J., & Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced drug delivery reviews*, 55(3), 329-347.
  72. Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J. J., & Jaffrès, P. A. (2009). Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *British journal of pharmacology*, 157(2), 166-178.
  73. Foster, E., & Robinson, P. P. (1994). The effect of nerve injury on the incidence and distribution of branched pulpal axons in the ferret. *Journal of dental research*, 73(12), 1803-1810.
  74. Li, N., Downey, J. E., Bar-Shir, A., Gilad, A. A., Walczak, P., Kim, H., ... & Pelled, G. (2011). Optogenetic-guided cortical plasticity after nerve injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(21), 8838-8843.
  75. Sessle, B. J., Yao, D., Nishiura, H., Yoshino, K., Lee, J. C., Martin, R. E., & Murray, G. M. (2005). Properties and

plasticity of the primate somatosensory and motor cortex related to orofacial sensorimotor function. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 32(1-2), 109-114.

76. Kondziolka, D., Lunsford, L. D., Flickinger, J. C., Young, R. F., Vermeulen, S., Duma, C. M., ... & Lindquist, C. (1996). Stereotactic radiosurgery for trigeminal neuralgia: a multiinstitutional study using the gamma unit. *Journal of neurosurgery*, 84(6), 940-945.
77. Pollock, B. E., Phuong, L. K., Foote, R. L., Stafford, S. L., & Gorman, D. A. (2001). High-dose trigeminal neuralgia radiosurgery associated with increased risk of trigeminal nerve dysfunction. *Neurosurgery*, 49(1), 58-64.



영문초록

# Current advances and future issues in optogenetics: Potential research and therapeutic tool for the field of dentistry

이 병 민  
치의학과  
치의학대학원  
서울대학교

## **Purpose**

Optogenetics is a new approach developed in the field of neuroscience that utilizes lights having specific or various wavelengths to stimulate/inhibit specific neurons or neural circuits containing a certain type of photochemical actuator. In this study the technical backgrounds of optogenetics and current neuroscience studies that have used optogenetic tools were discussed. Based on that, potential applications of optogenetics on the field of dentistry were discussed in this study.

## **Materials and Methods**

Review and research articles from 1980 to 2014 are widely collected from Pubmed and Google Scholar. Optogenetics,

opsin, optogene, neural network, neural circuit, brain, rhodopsin were the major key words for the search. Unpublished data or researches were excluded.

### **Conclusion**

Various types of rhodopsins were mainly used as photochemical actuators used in optogenetics and their coding genes, called optogenes, were delivered to specific neurons or neural circuits via viral vector. Various viral coat proteins and targeting strategies such as anterograde and retrograde were used to transfect and stimulate/inhibit specific neurons or neural circuits. Optogenetic approaches took these advantages to reveal the neurological connections and mechanisms involved in psychiatric and neurologic diseases and to develop effective diagnostic and therapeutic tools for them. However the potential risks of using viral vectors and the effect of optogene expression on neuron were not extensively studied yet. Optogenetic tools can be applied to study and treat atypical facial or odontogenic pains in the field of dentistry.

**Keywords** ; Optogenetics, optogene, Rhodopsin type 1, type 2, opsin, neural mapping, brain, neural network, gene delivery, neuralgia, depression

2. **Student Number** : 2011-22466