

اپتوژنتیک: مفاهیم و کاربردها

سید مهدی میر محمدی^۱
غلامرضا اسماعیلی جاوید^۲

خلاصه

مقدمه: اپتوژنتیک فناوری جدیدی است که با کمک آن می‌توان به‌صورت دقیق، سریع و هدفمند حوادث سیستم‌های بیولوژیکی را به‌عنوان یک مجموعه پیچیده مورد بررسی قرار داد. مفاهیم اولیه اپتوژنتیک به اواخر دهه هفتاد میلادی برمی‌گردد زمانی که به‌دلیل چالش‌های موجود در رشته عصب‌شناسی نیاز بود تا یک سلول خاص بدون تأثیرگذاری بر روی سلول‌های دیگر تحت کنترل قرار گیرد و پیشنهاد شد که از نور می‌توان به‌عنوان ابزار مناسبی برای این منظور استفاده کرد. با کشف آپسین و آنالوگ‌های مشابه آن به‌عنوان مولکول‌های فعال به نور تحولی مهم در این زمینه روی داد. با کشف آپسین‌های میکروبی (باکتریایی یا قارچی) غشایی از جمله هالورودوپسین به‌عنوان نوعی کانال یونی وابسته به نور و انتقال‌زن بیان‌کننده این نوع پروتئین به سلول‌های پستانداران، امکان کنترل آپتیکی سلول‌های پستانداران بخصوص سلول‌های عصبی ایجاد شد. همچنین به‌دلیل وجود رتینوئید به‌مقادیر فراوان در بافت‌هایی چون شبکیه مشخص شد که بافت‌های عصبی مرکزی دارای میزان کافی از ژن‌های میکروبی آپسینی برای القاء اپتوژنتیک و کنترل آپتیکی سلولی هستند.

بحث و نتیجه‌گیری: اپتوژنتیک به‌معنای برانگیختگی نوری یا بازدارندگی نوری سلول‌های هدف نیست بلکه با این روش امکان کنترل انجام فعالیت‌های خاص وجود دارد. علامت ویژه اپتوژنتیک، ایجاد کانال‌ها یا آنزیم‌های فعال‌شونده با نور است که امکان دستکاری‌های دقیق زمانی را بر روی وقایع بیوشیمیایی و الکتریکی با رزولوشن در حد سلول فراهم می‌سازد. اپتوژنتیک به‌معنای ایجاد راهبردهای هدفمند ژنتیکی همچون پروموتورهای اختصاصی سلولی یا ویروسی است. این تکنولوژی امکان انتقال پروب‌های حساس به‌نور برای جمعیت‌های خاص سلولی در بافت زنده و سخت‌افزار شامل فیبر نوری و منابع نوری را فراهم می‌سازد. با این روش بررسی اختصاصی سلول‌ها حتی در عمق بافت به‌منظور کنترل عملکرد سلول امکان پذیر می‌شود.

این مقاله مروری ضمن معرفی مفاهیم اولیه اپتوژنتیک، به بررسی دقیق روش‌های اجرای آن و مکانیسم فعالیت‌های کانال یا آنزیم‌های دخیل و درنهایت اهمیت کاربردهای بالینی آن می‌پردازد.

واژه‌های کلیدی: باریکه لیزر، لیزر CO₂، اپیدرم، برهمکنش حرارتی، آسیب حرارتی، پوست

۱. مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی
واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲. استادیار پژوهش، گروه پژوهشی ترمیم نوری
مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد
علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

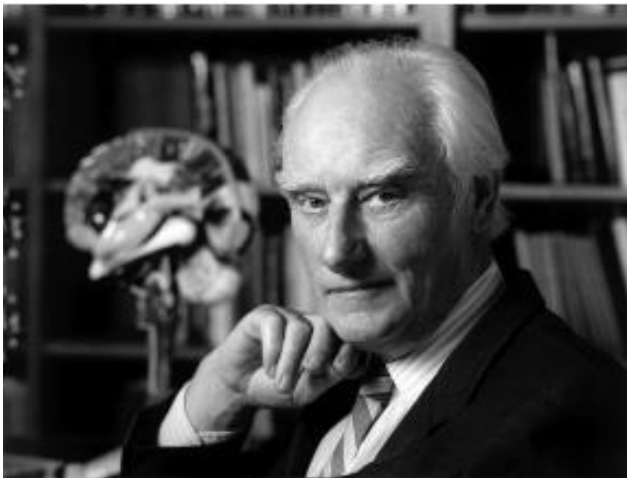
مقدمه

با پیشرفت‌هایی که در حوزه سلامت و علوم پزشکی صورت گرفته است هر چند خبری از شیوع گسترده بیماری‌های عفونی و مرگ‌ومیر ناشی از این بیماری‌ها نیست و امید به زندگی به‌طور چشمگیری افزایش یافته است، ولی در مقابل بیماری‌های تحلیل‌برنده ناشی از روند پیری و مزمن افزایش قابل ملاحظه‌ای یافته است. در حال حاضر بیشترین علت مرگ‌ومیر در کشورهای توسعه‌یافته مربوط به حوادث عروقی قلبی و مغزی است هرچند که سوانح و تصادفات نیز از علل شایع مرگ‌ومیر در جهان به‌شمار می‌رود [۱]. از میان بافت‌هایی که در معرض آسیب هستند، همواره درمان و بازتوانبخشی بافت‌های آسیب‌دیده عصبی به‌دلیل پیچیدگی‌های سیستم عصبی مرکزی و عدم ترمیم‌پذیری مناسب آن در آسیب بافت‌های عصبی، از چالش‌های اساسی قرن بیستم و یکم است. مغز با وزن تقریبی ۱۳۰۰ گرم از بیلیون‌ها سلول عصبی و شبکه‌ای بسیار پیچیده تشکیل شده است. محققان بسیاری سعی بر مطالعه عملکرد بافت مغز داشته‌اند ولی به‌دلیل همین پیچیدگی‌های سلول‌ها و شبکه‌های عصبی همواره مشکلات متعددی در روند دقیق شناخت شبکه‌های عصبی و عملکرد آن‌ها و در نهایت نقش هر یک از شبکه‌های عصبی در رفتار و هویت انسانی وجود داشته است. از روش‌های متداولی که به‌منظور مطالعه in-vivo شبکه‌های عصبی و عملکرد آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است، می‌توان به روش‌های تحریک الکتریکی، روش‌های مغناطیسی و دارویی اشاره کرد.

در سال ۱۹۷۱ فرانسیس کریگ^۱ کاشف ساختار مولکول DNA اعلام کرد که روش‌های موجود تا آن زمان قادر به مطالعه دقیق ساختارهای شبکه‌ای مغز و نقش آن‌ها در رفتار و عملکرد موجود نیستند و این روش‌ها نیازمند ایجاد فناوری‌های جدیدی برای این منظور می‌باشد (شکل ۱) [۲]. وی در این مقاله به‌صورت تلویحی به نقش نور و استفاده از این پدیده فیزیکی تاکید کرد. در سال ۱۹۷۳، در مطالعه جداگانه‌ای خصوصیات یک پروتئین غشایی در باکتری‌ها در باکتری هالوباکتریوم^۲ انتشار یافت [۳]. در سال‌های بعد مشخص شد که این گروه از پروتئین‌های غشای میکروبی به‌نام آپسین^۳ به‌دلیل وجود ساختار رتینا در درون خود و تأثیرپذیری این مولکول در مقابل نور، ساختار مولکول پروتئینی آن‌ها تغییر شکل می‌دهد و در نهایت منجر به عبور برخی از یون‌ها از کانال شکل گرفته در این نوع پروتئین‌های غشایی می‌شود [۴].

تا سال ۲۰۰۵، آپسین‌های مختلفی در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها کشف و حساسیت نوری آن‌ها شناسایی شد. به‌طوری‌که در این سال برای اولین بار با وارد کردن ژن بیان‌کننده آپسین‌های میکروبی به درون سلول‌های عصبی و بیان آن در این سلول‌ها، انقلاب بزرگی در عرصه علوم اعصاب رخ داد [۵]. از این سال به بعد مطالعات بسیاری برای شناسایی نقش و عملکرد شبکه‌های

عصبی با وارد کردن ژن انواع مختلف پروتئین‌های غشای آپسین میکروبی به سلول‌ها و شبکه‌های عصبی انجام شده است (شکل ۲). از این رو براساس انتخاب نشریه nature، اپتوژنتیک به‌عنوان روش منتخب سال ۲۰۱۰ معرفی گردید [۶].



شکل ۱: فرانسیس کریک در سال ۱۹۷۱ اعلام کرد برای مطالعه شبکه‌های پیچیده عصبی نیازمند فن‌آوری جدید است و فن‌آوری‌های موجود هیچگاه قادر به شناسایی دقیق نقش و عملکرد این شبکه‌های عصبی نخواهد شد.

تعریف

اپتوژنتیک ترکیبی از علم ژنتیک و روش‌های نوری می‌باشد تا به کمک آن عملکردهای مشخص در سلول‌های تخصصی بافت‌های زنده ایجاد یا حذف شوند [۴]. به عبارت دیگر اپتوژنتیک ترکیبی از دانش‌های اپتیک، ژنتیک و مهندسی زیستی است که به کمک آن می‌توان فعالیت سلول‌ها را از طریق پروتئین‌های حساس به نور، مهار یا تحریک کرد. در این روش، تحریک یا مهار فعالیت سلول‌ها به کمک بیان پروتئین‌های غشایی حساس به نور به روش‌های مهندسی ژنتیک و زیستی بسته به خصوصیات هر یک از پروتئین‌های مورد نظر با پلاریزاسیون یا هیپرپلاریزاسیون انجام می‌شود. از آنجاکه بیان این پروتئین‌ها در سلول‌های تخصص یافته بافت‌های زنده از جمله سلول‌های عصبی انجام می‌شود، بیشترین مطالعات انجام گرفته در زمینه اپتوژنتیک در سیستم عصبی مرکزی و سلول‌های قلبی بوده است [۷ و ۸].

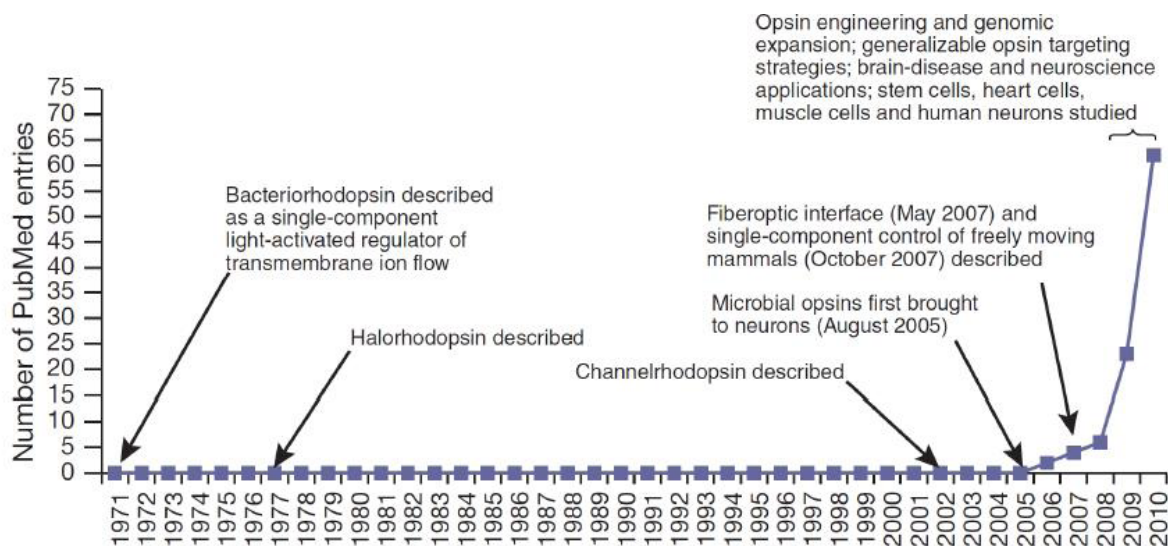
به‌منظور معرفی دقیق فناوری اپتوژنتیک می‌توان آن را در سه بخش مختلف مورد مطالعه قرار دارد. در بخش اول پروتئین‌های فعال شده توسط نور^۴ مورد بررسی قرار می‌گیرند. در بخش دوم به‌طور خلاصه روش انتقال ژن پروتئین‌های یادشده به سلول‌های یوکاریوت یا سلول‌های تخصصی نهایی معرفی و در نهایت در بخش سوم روش‌های انتقال نور مرور خواهد شد.

light-activated proteins. ۴

۱. Francis Crick

۲. bacteriorhodopsin

۳. bacteriorhodopsin



شکل ۲: تعداد مقالات منتشر شده در پایگاه اطلاع رسانی مجلات پزشکی Pub Med به صورت سالانه. همانگونه که مشاهده می شود در سال های پس از ۲۰۰۵ افزایش چشمگیری داشته است.

غشایی موجب بروز تغییرات ساختاری در پروتئین های غشاء می گردد و انتقال یون ها از ورای غشاء تسهیل می شود.

پروتئین های فعال شده توسط نور

این گروه از پروتئین ها به دلیل قرار گرفتن مولکول رتینا و ایزومراسیون نوری آن به دنبال تابش برخی از طول موج های مشخص، دچار تغییرات ساختاری می شوند و در نهایت امکان عبور یون ها را می دهند (شکل ۴). از مهم ترین و شناخته شده ترین پروتئین های این گروه می توان به آپسین ها اشاره کرد. آپسین ها پروتئین های غشایی با وزن مولکولی ۵۰-۳۰

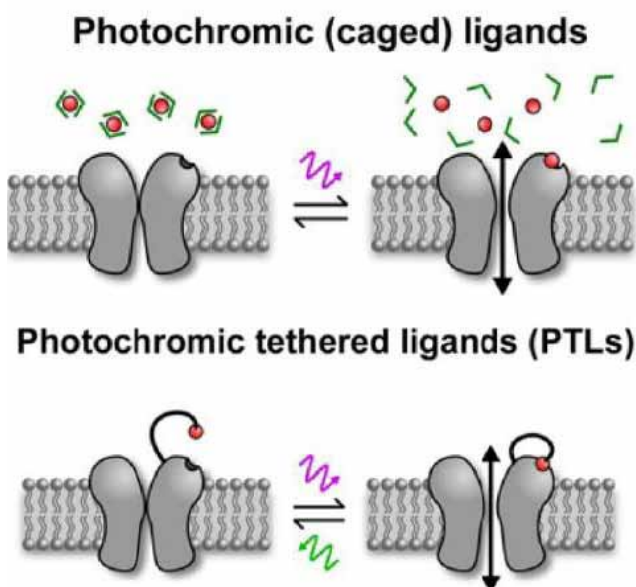
بخش اول: جعبه ابزار اپتوژنتیک

به طور کلی ابزار مورد استفاده در اپتوژنتیک برای تحریک یا مهار سلولی براساس پروتئین های فعال شده توسط نور تعریف می شود. به این معنا که براساس نیاز محققان به نوع تغییر عملکرد سلول ها و همچنین سرعت عمل مورد نیاز، می توان پروتئین های مختلفی را از خانواده آپسین میکروبی مورد استفاده قرار داد [۶]. همچنین براساس عملکرد هر یک از پروتئین ها در سطح غشاء و یا در سیتوپلاسم، این ابزارها به دو گروه دستکاری در پتانسیل غشایی^۵ و تنظیم کننده های سیگنال های داخل سیتوپلاسمی طبقه بندی می شوند.

دستکاری در پتانسیل غشاء

در اپتوژنتیک گروهی از پروتئین های غشایی مورد استفاده قرار می گیرد که به دنبال تابش پرتوی نور با طول موج مشخص موجب تغییر ساختار پروتئین می شود و عبور برخی از یون ها را تسهیل می کند. این پروتئین ها براساس مکانیسم اثر نور در تغییر ساختار به دو گروه مشخص طبقه بندی می شوند. گروه اول پروتئین هایی هستند که به دنبال مدیفیکاسیون های شیمیایی در آن ها تغییر ساختار روی می دهند (شکل ۳) [۶]. از این گروه می توان به لیگاندهای محصور شده^۶، حلال های حساس به نور^۷ و لیگاندهای افسار شده^۸ اشاره کرد.

در این گروه پروتئین های غشایی با واسطه های شیمیایی که به نور حساس هستند و انجام پاره ای از واکنش های شیمیایی آن ها با پروتئین های



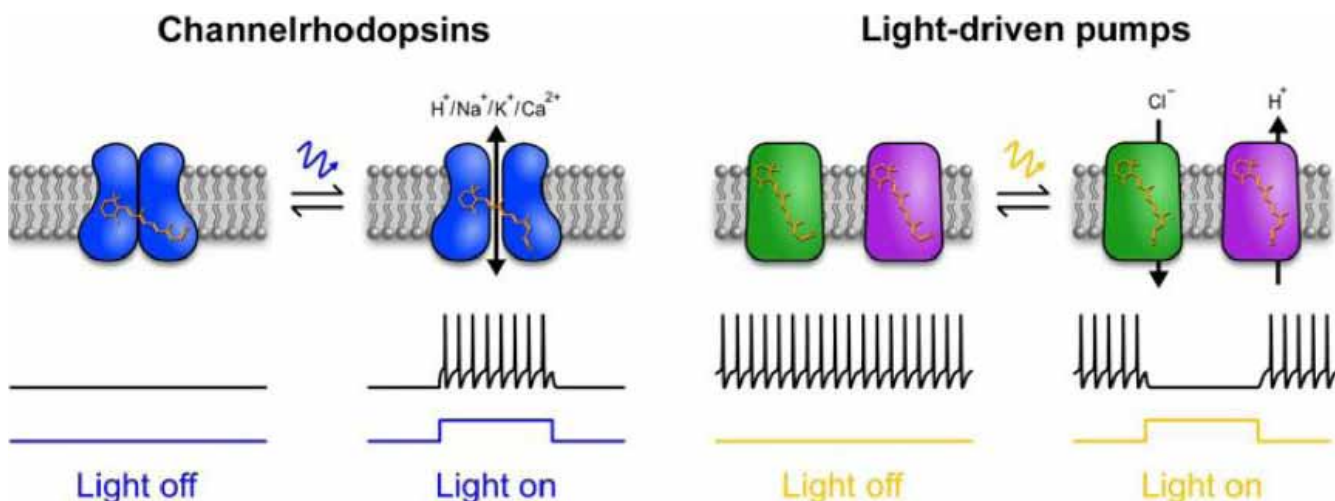
شکل ۳: روش های دستکاری شیمیایی پروتئین های غشایی به دنبال تابش توری با طول موج مشخص در دو روش لیگاندهای محصور شده (بالا) و لیگاندهای افسار شده (پایین)

۵. modulating the membrane potential

۶. caged ligands

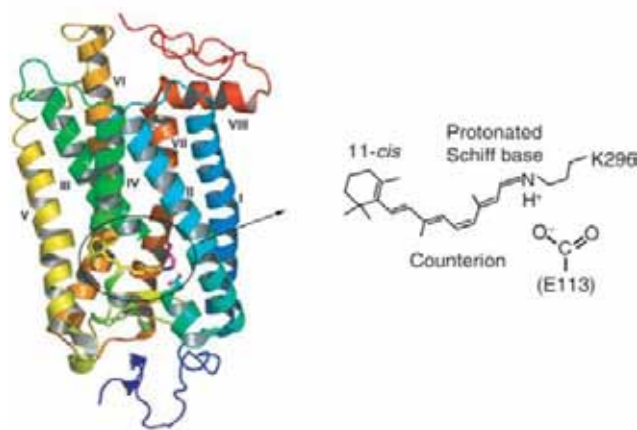
۷. light-sensitive soluble

۸. tethered ligands



شکل ۴: دو گروه از پروتئین‌های غشایی از خانواده آپسین‌های میکروبی. کانال رودوپسین‌ها که بر اثر برهمکنش با نور باعث عبور کاتیون‌ها به داخل سیتوپلاسم و در نتیجه پلاریزاسیون پتانسیل غشای سلول می‌گردد (شکل چپ). در برخی از پروتئین‌های خانواده آپسین‌ها با برهمکنش نور باعث ورود آنیون‌ها و یا خروج پروتون از سیتوپلاسم می‌شود که در نهایت منجر به هیپرپلاریزاسیون و مهار پتانسیل عمل در غشای سلول می‌گردد (شکل راست)

نیز در طول موج ۵۸۹ نانومتر (نور نارنجی) ایزومریزاسیون نوری خود را انجام می‌دهد و در نتیجه باعث تغییر ساختار پروتئین می‌گردد ولی در مقابل، باعث ورود آنیون-های کلر و ایجاد هیپرپلاریزاسیون و در نتیجه مهار پتانسیل عمل در غشای سلول خواهد شد. مکانیسم تغییر ساختار پروتئین‌های آپسین وابسته به ایزومریزاسیون نوری مولکول رتینا در داخل این پروتئین است. مولکول رتینا در آپسین‌های نوع یک یا آپسین‌های میکروبی در حال طبیعی و غیر تحریک شده به صورت ترانس قرار دارند. این حالت ترانس رتینا می‌تواند با دریافت مقدار اندکی انرژی در محدوده امواج نور مرئی به حالت ۱۴ سیس رتینا ایزومر گردد. عدم تبدیل حالت ترانس به حالت سیس به دلیل وجود سدی از انرژی می‌باشد که این امکان در حالت عادی و بدون دادن انرژی خارجی ایجاد نمی‌شود [۱۰].



شکل ۵: ساختار سه بعدی رودوپسین گاو (Protein Data Bank ID: 1U19 [PDB: 1U19]) و مولکول رتینا که ایزومریزاسیون نوری آن باعث تغییر در ساختار سه بعدی رودوپسین می‌گردد.

کیلودالتون هستند که جزء پروتئینی مولکول رودوپسین در مهره‌داران نیز می‌باشند و به عنوان گیرنده نوری عمل می‌کنند [۹]. پروتئین‌های پذیرنده نور مشابه به آپسین‌های مهره‌داران در ساختار سه بعدی مشابه به آپسین‌های میکروبی می‌باشند ولی به لحاظ توالی اسیدهای آمینه متفاوت هستند. آپسین‌های میکروبی به عنوان پمپ‌های یونی وابسته به نور یا حساسگرهای نوری عمل می‌نمایند ولی شواهد کافی برای ارتباط آن‌ها با آپسین‌های جانوری وجود ندارند. از نظر ساختمان فضایی، پروتئین‌های آپسین به دلیل قرارگیری در غشاء از ساختار آلفاهلیکس تشکیل شده‌اند.

در شکل ۵ که ساختار فضایی پروتئین رودوپسین گاوی بر اساس اطلاعات کریستالوگرافی تعیین شده است، مشاهده می‌شود که این پروتئین از هفت زنجیره آلفاهلیکس در داخل غشاء و یک زنجیره آلفا هلیکس به موازات غشای سیتوپلاسمی تشکیل شده است [۹].

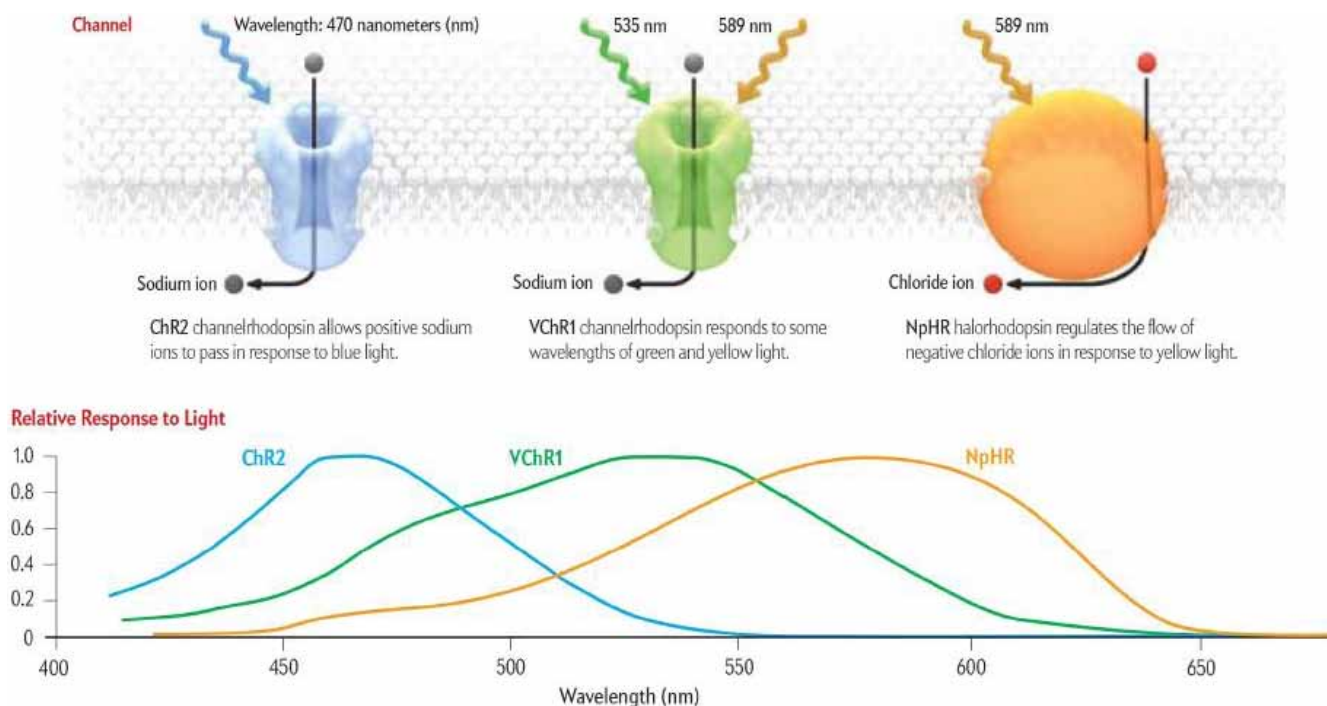
به طور کلی پروتئین‌هایی را که ساختار فضایی مشابه به آپسین دارند در دو گروه آپسین گروه یک یا آپسین‌های میکروبی و آپسین گروه دو یا آپسین‌های مهره‌داران طبقه‌بندی می‌کنند. از معروف‌ترین پروتئین‌های آپسین گروه یک می‌توان به هالورودوپسین^۱، باکتریورودوپسین^۲ و آرچیرودوپسین^۳ اشاره کرد [۱۰]. همان گونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، کانالورودوپسین (ChR2) در طول موج ۴۷۰ نانومتر (نور آبی) ۴ ایزومریزاسیون نوری مولکول رتینا انجام می‌شود و اجازه ورود یون سدیم را به داخل سلول می‌دهد. پروتئین غشای هالورودوپسین

۹. halorhodopsin

۱۰. bacteriorhodopsin

۱۱. ۳-archaerhodopsin

۱۲. channelrhodopsins



شکل ۶: سه گروه از آپسین‌های میکروبی که در طول موج‌های مختلف موجب تغییر در ساختار و در نهایت اجازه ورود یون‌ها را به درون سلول می‌دهد. براساس نوع یون وارد شده به پتانسیل عمل غشای سلول فعال یا مهار می‌گردد.

های میکروبی) در قدم بعد می‌باید با استفاده از فناوری ژنتیک، امکان بیان این پروتئین در سلول صورت گیرد. به‌طور مثال بیشترین مطالعه در سال‌های اخیر با استفاده از فناوری اپتوژنتیک در حوزه مطالعه شبکه‌های عصبی بر روی مدل‌های تجربی (in-vivo) انجام شده است. برای ورود اختصاصی ژن پروتئین مذکور از سه روش استفاده می‌شود. این روش‌ها به ترتیب عبارت از ترانسفکشن، انتقال از طریق وکتورهای ویروسی و در نهایت تولید حیوانات ترانس ژنیک می‌باشد [۶].

مرحله ورود ژن به سلول‌های هدف به صورت اختصاصی می‌باشد. به‌طور کلی برای این منظور از دو نوع پروموتور اختصاصی و غیر اختصاصی استفاده می‌شود. در خصوص پروموتورهای اختصاصی می‌توان به سیستم‌های

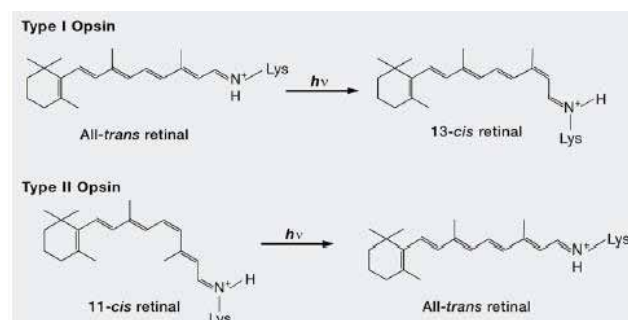
بالین حال پس از دریافت انرژی نور در محدوده مرئی و عبور از سد انرژی ساختار فضایی پروتئین آپسین تغییر می‌کند و در پی آن و عبور یون‌ها و یا فعال شدن یک سری از سیگنال‌های درون سلولی میسر می‌شود. این مسیر در آپسین‌های نوع دو یا آپسین‌های جانوری معکوس می‌باشد به طوری که در حالت پایه (تاریکی) مولکول رتینا به صورت [۱۱] سیس رتینا می‌باشد و با دریافت انرژی در محدوده نور مرئی با عبور از سد انرژی به حالت ترانس رتینا درمی‌آید و در نهایت موجب تغییر در شکل فضایی پروتئین خواهد شد [۱۰].

یکی از مهم‌ترین مسائل در تغییر ساختار فضایی آپسین‌ها و برگشت آن‌ها به حالت پایه (تاریکی)، سرعت این تغییرات ساختاری می‌باشد [۱۲]. محققان با انجام جهش‌های مختلف در اسیدهای آمینه آپسین‌های میکروبی، توانستند سرعت تغییرات ساختاری و فعالیت یا مهار پتانسیل غشاء را کنترل کنند. زمان برگشت پذیری پروتئین و آماده شدن جهت تحریک دوباره براساس نوع توالی اسیدهای آمینه در بازه‌های زمانی میلی ثانیه تا بیش از هزار ثانیه متفاوت است.

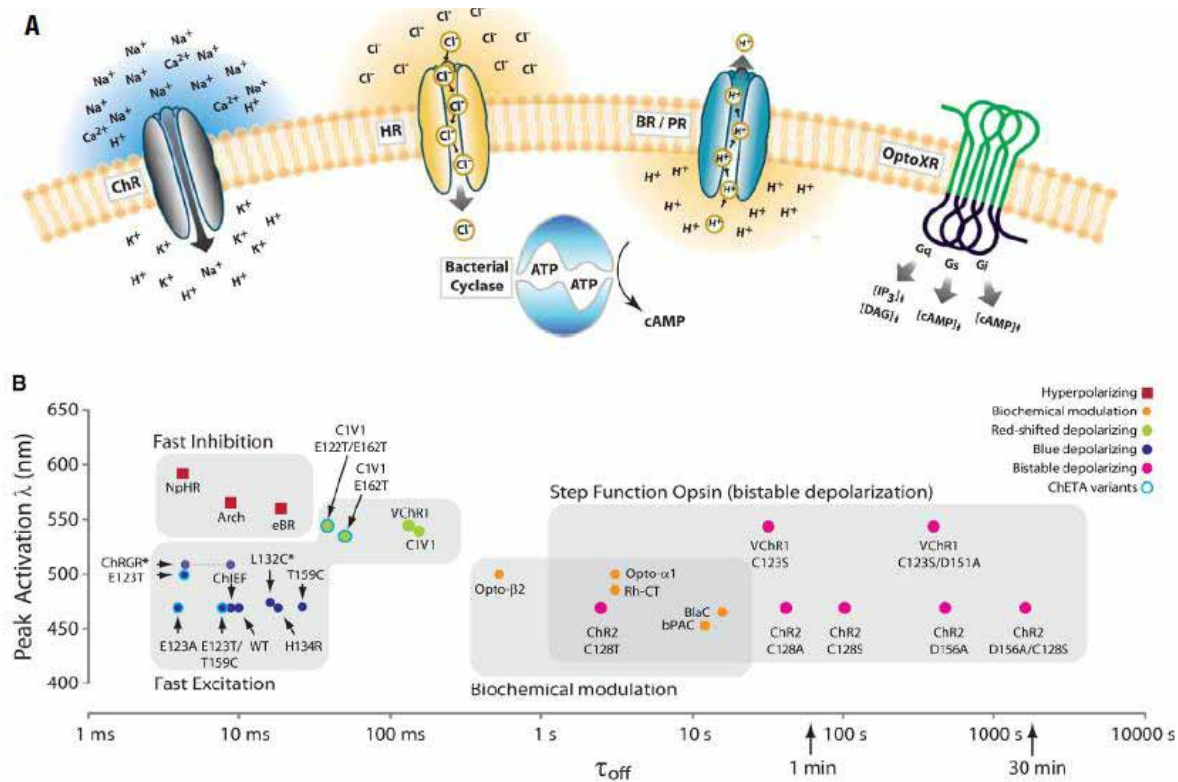
تاکنون پروتئین‌های جهش‌یافته بسیاری از گروه آپسین‌های میکروبی بدین منظور مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و به‌طور خلاصه در شکل ۸ آورده شده است.

بخش دوم: نحوه انتقال به سلول یوکاریوت

پس از انتخاب یک ابزار مناسب (پروتئین مناسب از خانواده آپسین



شکل ۷: ایزومریزاسیون نوری مولکول رتینا اساس تغییر ساختار پروتئین‌های آپسین میکروبی (آپسین نوع یک) و آپسین جانوری (آپسین نوع دو) می‌باشد.



شکل ۸: پروتئین‌های مختلف از خانواده اپسین‌های میکروبی که زمان متفاوتی جهت برگشت به حالت پایه (تاریکی) و فعالیت دوباره در مقابل نور دارند.

دریچه وسیعی از کاربرد فناوری اپتوژنتیک با ورود اپسین‌های مختلف، با توجه به سرعت عملکرد آن‌ها، برگشت به حالت پایه و مهار یا تحریک پتانسیل عمل پیش روی درمان بیماری‌های دژنراتیو مغزی و ضایعات تروماتیک باز شد. استفاده از اپتوژنتیک به‌طور کلی در دو بخش شناسایی عملکرد و رفتاری مرتبط به شبکه‌های عصبی و یا درمان ضایعات دژنراتیو مغزی صورت می‌گیرد.

هرچند که عمر فناوری اپتوژنتیک کمتر از ۵ سال می‌باشد ولی شواهد بیانگر آن است که این فناوری گامی بسیار جدی در حل مشکلات مرتبط به مطالعه سیستم‌های عصبی در مدل‌های تجربی و انسانی و درمان ضایعات عصبی تحلیل‌برنده خواهد داشت.

مبتنی بر سیستم Cre اشاره کرد که با استفاده از ریکامبینازهای اختصاصی عمل می‌کنند. روش بعدی استفاده از پروموتورهای غیراختصاصی است. در این حالت وارد کردن وکتور به یک منطقه جغرافیایی (توپولوژی) از بافت، سبب می‌شود تا بیان ژن در سلول‌های آن منطقه صورت گیرد و بدین‌وسیله عملکرد آن منطقه در خصوص فعال شدن یا مهار شدن سلول‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد [۶].

بخش سوم: تابش نور کنترل‌شده

کنترل دقیق فعالیت سلولی از طریق اپتوژنتیک وابسته به کنترل فضایی و زمانی مناسب و دقیق تابش نور می‌باشد [۶ و ۴]. استفاده از منابع نوری با تابش زمینه وسیع می‌تواند موجب کنترل زمانی بسیار دقیق در سرعت‌های بالا با یک منبع نوری ثابت گردد. تمام سلول‌هایی که پروتئین‌های حساس به‌نور در آن‌ها بیان شده است تحت تابش قرار می‌گیرند و تحریک می‌شوند. در کاربردهای in-vivo منبع نوری به یک فیبر نوری اتصال می‌یابد و یا از سیستم‌های LED مینیاتوری استفاده می‌شود.

امروزه، با استفاده از فناوری اپتوژنتیک می‌توان سیستم عصبی مرکزی و شبکه‌های عصبی را تا سطح پریما‌ها مورد بررسی قرار داد [۱۴-۱۲]. یکی از مهم‌ترین کاربردهای اخیر اپتوژنتیک در مدل‌های تجربی مرتبط با بیماری پارکینسون می‌باشد.

References:

1. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease
2. Crick FH. Thinking about the brain. *Sci Am*. 1979; 241(3): 219-32.
3. Oesterhelt D, Stoeckenius W. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973; 70(10): 2853-7.
4. Deisseroth K. Optogenetics. *Nat Methods*. 2011; 8(1): 26-9.
5. Gradinaru V. Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 2007; 27(52): 14231- 8.
6. Pastrana E. Optogenetics: controlling cell function with light. *Nature Methods* 2011; 8: 24-5.
7. Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. The development and application of optogenetics. *Annu Rev Neurosci*. 2011; 34: 389-412.
8. Miller G. Optogenetics. Shining new light on neural circuits. *Science*. 2006; 314(5806): 1674- 6.
9. Terakita A. The opsins. *Genome Biol*. 2005; 6(3): 213.
10. Zhang F. The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell*. 2011; 147(7): 1446-57.
11. Cronin T, Bennett J. Switching on the lights: the use of optogenetics to advance retinal gene therapy. *Mol Ther*. 2011; 19(7): 1190-2.
12. Mahoney TR. Intestinal signaling to GABAergic neurons regulates a rhythmic behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(42): 16350-5.
13. Boyden ES. A history of optogenetics: The development of tools for controlling brain circuits with light. *F1000 Biol Rep*. 2011; 3: 11. 8
14. Yao JP, Hou WS, Yin ZQ. Optogenetics: a novel optical manipulation tool for medical investigation. *Int J Ophthalmol*. 2012; 5(4): 517-22.