

Bölüm 11

Beyin-Bağışıklık Etkileşimlerinin Disseksiyonunda Kemogenetik ve Optogenetiğin Uygulanması

Çeviri: Dr. Cüneyt TAMAM

Özet

Uzun yıllardan beri beyin-immün etkileşimlerinin karmaşık ve mültifaktöriyel oluşu bunların altında yatan mekanizmaları ortaya koyma becerimizi sınırlamıştır. Burada özellikle zorluk çıkartan bir soru, beyin aktivitesini kontrol için kullanılacak yöntemler yelpazesinin son derece sınırlı olması nedeniyle beyinin bağışıklığı nasıl denetlediğidir. Son on yıl içinde geliştirilmiş olan optogenetik ve kemogenetik (örn., DREADD'lar) türü yeni araçlar sinir biliminde yeni ufuklar açmış ve nöroimmünolojide büyük karşılıklar bulmuştur. Bu araçlar beyindeki, immün sistem üzerine aktive edici/söndürücü etkilere neden olarak tanımlanan nöronların haritalanmasına olanak sağlamaktadır. Burada, beyindeki nöron popülasyonlarının kemogenetik ve optogenetik işlenmesine ve daha sonra immün hücrelerin analizine dayalı olarak beyin-immün etkileşimlerinin analizi için ayrıntılı deneysel bir protokol sunmaktayız. Beyin-immün etkileşimlerinin bu tür ayrıntılı ve sistematik disseksiyonu, mental ve nörolojik hallerin sağlık ve hastalığı nasıl etkilediğine dair bilgilerimizde devrim yaratacak bir potansiyele sahiptir.

Anahtar sözcükler Bağışıklık sistemi, Beyin, Nöroimmünoloji, Sinirbilim, Merkezi sinir sistemi, Bağışıklık, DREADD'lar, Kemogenetik, Optogenetik

1 Giriş

Nöroimmünoloji organizmanın en kritik iki sistemi olan sinir ve bağışıklık sistemleri arasındaki boşluğu doldurur. İlginç olarak bu araştırma alanı büyük ölçüde tek yönlü, bağışıklık sisteminin beyin üzerine olan etkilerine odaklanmış iken beyinin immüniteyi nasıl etkilediğine dair bilgilerimiz hala sınırlı olup esas olarak stresin immün sistem üzerine olan etkilerine odaklanmıştır. Son on yıl içinde sinir biliminde, kesin nöronal ağların disseksiyonu, karakterize edilmesi ve denetimi için yeni araçlar geliştirilmiş olup bu araçlar bunların immün sistem üzerine olan etkilerini idantifiye etmek için kullanılabilir [1–3]. Burada biz bu tür iki araç üzerinde odaklanacağız ve bize beyin aktivitesinin bağışıklık sistemi üzerine ne tür ne-

4 Notlar

1. Viral sunum ve ekspresyonu:
 - (a) Viral zerkin optimum hacmi değişebilir; bunun tipik olarak 0.3'den 1 µL'ye kadarki sınırlar içinde olması gerekli olup optimum sonuçlar için kalibrasyon gerekir.
 - (b) Daha sonraki immün etkilerin değerlendirilmesinden önce daima viral ekspresyon ve işlevin doğrulanması sağlık verilir.
2. Nöronal manipülasyon:
 - (a) CNO hergün i.p. zerk veya içme suyuna ekleyerek kronik olarak verilebilir.
 - (b) CNO'un içme suyu ile alınması zerk stresini ortadan kaldır- sa da içilen suyun zamanı ve hacmindeki farklılıklar nedeni ile hayvanlar arasında büyük bir değişkenliğe neden olabilir. DREADD'ların akut (tek defalık) aktivasyonu için zamanla- ma zorunlu olup bu durumda zerk yeğlenir.
 - (c) DREADD aktivasyonu için CNO'nun daha düşük konsant- rasyonları çoğu kez olası ise de optimum konsantrasyonun doğrulanması gerekir.
 - (d) Kemogenetik/optogenetik uyarılmanın ardından nöronal aktivitenin doğrulanması fotometre kayıtları [27, 28], elekt- riksel kayıtlar [29] veya nöronal aktivasyona eşlik eden be- lirteçlerin (örn., c-Fos) [1] immünohistokimyasal (IHC)/ immünofluoresan boyanması ile sağlanabilir.

Teşekkür

S. Schwarzbau'ma makalenin editörlüğü, T.L. Ben-Shaanan, M. Sc- hiller ve H. Azulay-Debby'ye yardım ve tavsiyeleri için teşekkür et- mek isteriz. Araştırmamız İsrail Bilim, Teknoloji ve Uzay Bakanlığı (MOST; 3-12070), Prince Center for Nörodejeneratif Hastalıklar Prince Merkezi İsrail Bilim Derneği (1862/15), Colleck Araştırma Fonu ve ADELIS Vakfı tarafından desteklenmiştir. A.R., Howard Hughes Tıp Enstitüsü-Wellcome Şirketi araştırmacıdır.

Kaynaklar

1. Ben-Shaanan TL, Azulay-Debby H, Dubo- vik T et al (2016) Activation of the reward system boosts innate and adaptive im- munity. *Nat Med* 22:940–944. <https://doi.org/10.1038/nm.4133>
2. Abe C, Inoue T, Inglis MA et al (2017) C1 neurons mediate a stress-induced anti-in- flammatory reflex in mice. *Nat Neurosci* 20:700–707. <https://doi.org/10.1038/nn.4526>
3. Pavlov VA, Tracey KJ (2017) Neural reg- ulation of immunity: molecular mecha- nisms and clinical translation. *Nat Neu- rosci* 20:156–166. <https://doi.org/10.1038/nn.4477>
4. Deisseroth K (2011) Optogenetics. *Nat Methods* 8:26–29
5. Roth BL (2016) DREADDs for neurosci- entists. *Neuron* 89:683–694. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.040>
6. Urban DJ, Roth BL (2015) DREADDs (de- signer receptors exclusively activated by de- signer drugs): chemogenetic tools with ther- apeutic utility. *Annu Rev Pharmacol Toxi- col* 55:399–417. <https://doi.org/10.1146/>

- annurev-pharmtox-010814-124803
7. Cardin JA, Carle'n M, Meletis K et al (2010) Targeted optogenetic stimulation and recording of neurons in vivo using cell-type-specific expression of channelrhodopsin-2. *Nat Protoc* 5:247–254. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.228>
 8. Furman M, Zhan Q, McCafferty C et al (2015) Optogenetic stimulation of cholinergic brainstem neurons during focal limbic seizures: effects on cortical physiology. *Epilepsia* 56:e198–e202. <https://doi.org/10.1111/epi.13220>
 9. Zeng H, Madisen L (2012) Mouse transgenic approaches in optogenetics. *Prog Brain Res* 196:193–213. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59426-6.00010-0>
 10. Zhang F, Gradinaru V, Adamantidis AR et al (2010) Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nat Protoc* 5:439–456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.226>
 11. Sidor MM, Davidson TJ, Tye KM et al (2015) In vivo optogenetic stimulation of the rodent central nervous system. *J Vis Exp* 95:51483. <https://doi.org/10.3791/51483>
 12. Dong S, Rogan SC, Roth BL (2010) Directed molecular evolution of DREADDs: a generic approach to creating next-generation RASSLs. *Nat Protoc* 5:561–573. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.239>
 13. Deisseroth K (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat Neurosci* 18:1213–1225. <https://doi.org/10.1038/nn.4091>
 14. Gunaydin LA, Yizhar O, Berndt A et al (2010) Ultrafast optogenetic control. *Nat Neurosci* 13:387–392. <https://doi.org/10.1038/nn.2495>
 15. Prigge M, Schneider F, Tsunoda SP et al (2012) Color-tuned channelrhodopsins for multiwavelength optogenetics. *J Biol Chem* 287:31804–31812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.391185>
 16. Sternson SM, Roth BL (2014) Chemogenetic tools to interrogate brain functions. *Annu Rev Neurosci* 37:387–407. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-014048>
 17. Ferguson SM, Neumaier JF (2012) Grateful DREADDs: engineered receptors reveal how neural circuits regulate behavior. *Neuropsychopharmacology* 37:296–297. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.179>
 18. Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W et al (2017) Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science* 357:503–507. <https://doi.org/10.1126/science.aan2475>
 19. Raper J, Morrison RD, Daniels JS et al (2017) Metabolism and distribution of clozapine-N-oxide: implications for nonhuman primate chemogenetics. *ACS Chem Neurosci* 8:1570–1576. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00079>
 20. Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S et al (2017) Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods. *Mol Cell* 65:631–643. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.023>
 21. Matsumoto M, Matsuzaki F, Oshikawa K et al (2017) A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome. *Nat Methods* 14:251–258. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4116>
 22. Nyman TA, Lorey MB, Cypriak W, Matikainen S (2017) Mass spectrometry-based proteomic exploration of the human immune system: focus on the inflammasome, global protein secretion, and T cells. *Expert Rev Proteomics* 14:395–407. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1319768>
 23. Rieckmann JC, Geiger R, Hornburg D et al (2017) Social network architecture of human immune cells unveiled by quantitative proteomics. *Nat Immunol* 18:583–593. <https://doi.org/10.1038/ni.3693>
 24. Cheung RK, Utz PJ (2011) Screening: CyTOF—the next generation of cell detection. *Nat Rev Rheumatol* 7:502–503
 25. Spitzer MH, Nolan GP (2016) Mass cytometry: single cells, many features. *Cell* 165:780–791
 26. Brodie TM, Tosevski V (2017) Highdimensional single-cell analysis with mass cytometry. *Curr Protoc Immunol* 118:5.11.1–5.11.25. <https://doi.org/10.1002/cpim.31>
 27. Gunaydin LA, Grosenick L, Finkelstein JC et al (2014) Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell* 157:1535–1551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.017>
 28. Akemann W, Mutoh H, Perron A et al (2010) Imaging brain electric signals with genetically targeted voltage-sensitive fluorescent proteins. *Nat Methods* 7:643–649
 29. LeChasseur Y, Dufour S, Lavertu G et al (2011) A microprobe for parallel optical and electrical recordings from single neurons in vivo. *Nat Methods* 8:319–325