

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

DOI: 10.1134/S0869813918120026

**ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ ДЛЯ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОГО  
ПРОТЕЗИРОВАНИЯ СЕТЧАТКИ**

© А. Ю. Ротов, Д. А. Николаева, Л. А. Астахова, М. Л. Фирсов

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: rotovau@gmail.com

Для наследственных дегенеративных заболеваний сетчатки к настоящему времени не разработаны подходы, которые позволяли бы полностью восстановить утраченное зрение после завершения активной фазы дегенерации. Оптогенетическое протезирование сетчатки является перспективной терапевтической методикой, позволяющей вернуть светочувствительность после гибели фоторецепторов. В ее основе лежит идея о превращении выживших нейронов сетчатки в псевдофоторецепторы путем экспрессии в них светочувствительных белков и восстановлении зрительной функции благодаря адаптации центральной нервной системы к новому пути передачи сигнала.

Наиболее эффективным способом доставки генов светочувствительных белков в клетки дегенерировавшей сетчатки является применение векторов на основе аденоассоциированного вируса. Однако существующие на данный момент векторы не позволяют полностью решить задачу восстановления зрения, и их совершенствование продолжается. Доставка генетического материала в конкретные типы нейронов сетчатки теоретически возможна путем использования селективных промоторов, активирующих транскрипцию гена только в определенных клетках. Но на практике уже разработанные промоторы не всегда обеспечивают селективную трансдукцию генов. Несмотря на существование большого числа различных светочувствительных белков, в том числе искусственно синтезированных с улучшенными свойствами, среди них нет того, который мог бы в одиночку обеспечивать восстановление зрения с высокой чувствительностью и сложной системой сигнальных ON-OFF-путей. Сам процесс доставки вирусных частиц в сетчатку также не оптимизирован в достаточной степени, и такие проблемы, как малая емкость аденоассоциированного вируса и трудности при его проникновении через естественные барьеры глаза, серьезно снижают эффективность векторов.

Для успешной разработки вирусного вектора, пригодного для оптогенетического протезирования, требуется более детальное знание процессов, протекающих при дегенерации сетчатки, в особенности на молекулярном уровне.

*Ключевые слова:* дегенерация сетчатки, оптогенетическое протезирование, вирусные векторы, аденоассоциированный вирус.

*Список сокращений:* МД — макулярная дистрофия; ПР — пигментный ретинит; AAV — adeno-associated virus, аденоассоциированный вирус; ITR — inverted terminal repeats, инвертированные концевые повторы; AAP — assembly-activating protein, белок, активирующий сборку; mGluR6 — metabotropic glutamate receptor type 6, метаботропный рецеп-

тор глутамата 6 типа; SNCG — gamma-synuclein gene, ген гамма-синуклеина; mBP — mouse blue pigment, синий пигмент (колбочек) мыши; hRO — human red opsin, красный опсин человека; mCAR — mouse cone arrestin, колбочковый аррестин мыши; NEFL — neurofilament light chain, легкая цепь нейрофиламента; ChR — channelrhodopsin, каналородопсин; NpHR — halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*, галородопсин из *Natronomonas pharaonis*; GPCR — G-protein-coupled receptors, G-белок связывающие рецепторы.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 12. С. 1391—1408. 2018

VIRAL VECTORS FOR RETINAL OPTOGENETIC PROSTHETICS. A. Yu. Rotov, D. A. Nikolaeva, L. A. Astakhova, M. L. Firsov. I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of RAS, Saint-Petersburg, Russia, e-mail: rotovau@gmail.com.

For hereditary degenerative diseases of the retina, there are no approaches developed to date that would allow the complete restoration of vision loss after the completion of the active phase of degeneration process. Optogenetic prosthetics of the retina is a promising therapeutic technique, which allows returning the photosensitivity after the death of photoreceptors. It is based on the idea of transforming the surviving retinal neurons expressing photosensitive proteins into pseudo-photoreceptors, and restoring visual function due to central nervous system adaptation to a new signal transduction pathway.

The most effective way to deliver genes of photosensitive proteins into the cells of the degenerated retina is to use vectors based on an adeno-associated virus. However, the currently existing vectors do not completely solve the problem of vision restoration, faced with a number of difficulties, and their improvement still continues. Delivery of genetic material to specific types of retinal neurons theoretically can be performed by use of selective promoters that activate gene transcription only in certain cells. But in practice, already developed promoters do not always provide selective gene transduction. Despite the existence of a large number of different photosensitive proteins, including artificially synthesized ones with improved properties, there is no one among them that could by itself provide restored vision with high sensitivity and complex system of signal ON-OFF pathways. The process of viral particles delivery to the retina is also not sufficiently optimized, and problems such as the low capacity of the adeno-associated virus and difficulties in its penetrating through natural barriers of the eye seriously reduce the efficiency of vectors.

Successful development of a viral vector suitable for optogenetic prosthetics requires more detailed knowledge of the processes that occur during retinal degeneration, especially at the molecular level.

*Key words:* retinal degeneration, optogenetic prosthetics, viral vectors, adeno-associated virus.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 12. P. 1391—1408. 2018

Среди разнообразных причин, вызывающих частичную или полную потерю зрения, особое место занимают наследственные дегенеративные заболевания сетчатки, такие как возрастная и ювенильная макулярная дистрофия (МД), врожденный амавроз Лебера, пигментный ретинит (ПР) и др. Эти заболевания обусловлены мутациями в генах белков, обеспечивающих разнообразные клеточные функции. Фармакологическая коррекция таких патологических состояний позволяет лишь затормозить, но не остановить процесс дегенерации. Развитие генетических технологий позволило создать терапевтические подходы для лечения этих заболеваний, основанные на векторной доставке экзогенного генетического материала в клетки пораженной сетчатки. Такую терапию сетчатки можно проводить во время или даже до начала проявления дегенеративных явлений для замены генов, имеющих дефекты, на нормальные, и при протезировании сетчатки, когда активная фаза дегенеративных явлений закончилась гибелью палочек и колбочек, и необходимо моделирование *de novo* способности к световосприятию в одном из выживших типов нейронов сетчатки.

Векторы могут иметь вирусную и иную природу. Невирусные векторы включают разнообразные микроскопические частицы, способные нести на се-

бе генетический материал и проникать внутрь клетки. Возможны также и другие методы доставки генетического материала в сетчатку — к ним относятся, например, прямая инъекция ДНК и РНК и электропорация [1–4]. В качестве синтетических векторов в настоящее время наиболее широко используются частицы на основе полилизина/полиэтиленгликоля, полисахаридов, липидные наночастицы (для обзора см. [5–7]). К главным преимуществам синтетических векторов относятся их относительная дешевизна и простота в применении, большая емкость и безопасность использования из-за низкой иммунореактивности. Основным же недостатком является невысокая эффективность трансдукции генетического материала в клетки, поскольку переносимый вектором материал после попадания в клетку по большей части остается в цитоплазме, не попадая в ядро, что приводит к уменьшению срока его действия.

Использование вирусных векторов позволяет преодолеть эти ограничения. Вирусы — организмы, эволюционно приспособленные для доставки генетического материала внутрь клеток. Большим преимуществом вирусного способа является высокая эффективность доставки генетического материала в ядро клетки, где он реализуется эндогенными механизмами трансляции. К настоящему времени известны примеры успешной доставки генетического материала при помощи аденовирусов [8] и лентивирусов [9], однако они показали недостаточно высокую эффективность трансдукции, возможно, из-за значительного размера вирусных частиц и соответственно плохой проходимости через различные барьеры внутри глаза. Также лентивирусы случайным образом интегрируют свой геном в геном клетки-хозяина, что делает их применение потенциально опасным по причине возможного онкогенеза. Ввиду этих обстоятельств ленти- и аденовирусы представляются малоперспективными для использования в клинических целях, хотя они продолжают использоваться для фундаментальных исследований.

Наилучшие результаты по эффективности трансдукции различных типов клеток в сетчатке получены при использовании аденоассоциированных вирусов (*adeno-associated virus*, AAV), которые и являются в настоящее время основным видом векторов, используемых с целью генной терапии или генетического протезирования сетчатки и пигментного эпителия. Рекомбинантный AAV не интегрирует переносимые гены в хромосомы клетки-хозяина, а также обладает низкой иммуногенностью, низкой токсичностью и непатогенностью в сетчатке. Накопленный за последнее десятилетие опыт экспериментального использования AAV у людей позволяет сделать обнадеживающий вывод об отсутствии у него серьезных проблем с безопасностью.

Целью данного обзора является всестороннее рассмотрение основных компонентов вектора на основе AAV, предназначенного специально для оптогенетического протезирования, подходов к его доставке в сетчатку и анализ текущих проблем, стоящих на пути введения этих методик в клиническую практику. Оптогенетическое протезирование сетчатки является в настоящее время темой многих экспериментальных работ, число которых ежегодно увеличивается. Для понимания общих вопросов и проблем в этой области мы рекомендуем обратиться к недавним обзорным статьям, в которых рассматриваются последние достижения в исследованиях на животных [10–11], обозначаются перспективы в сравнении с другими подходами к восстановлению зрения [12–14], а также описываются альтернативные разработки, предполагающие использование малых светочувствительных молекул без вмешательства в геном клеток сетчатки [15–17].

## ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ

Геном AAV дикого типа представляет собой одноцепочечную ДНК длиной около 4.7 тысяч нуклеотидов, которая упакована в икосаэдрическую белковую оболочку — капсид. Этот геном содержит три гена: *rep*, *cap* и *aap*, которые отвечают за синтез белков, необходимых для сборки капсида, репликации вирусной ДНК и ее упаковки в белковую оболочку. Кодированные последовательности фланкированы инвертированными концевыми повторами (Inverted Terminal Repeats, ITR), которые необходимы для репликации и упаковки генома. Ген *rep* кодирует некоторые белки, необходимые для репликации и упаковки вирусного генома, тогда как экспрессия *cap* приводит к синтезу вирусных белков, образующих наружную оболочку капсида [18]. Ген *aap* кодирует белок AAP (assembly-activating protein) в альтернативной рамке считывания, перекрывающей ген капсидных белков. Считается, что этот ядерный белок обеспечивает сборку капсида [19]. Попав в клетку, AAV не может реплицироваться сам по себе, поскольку его геном не кодирует полный набор белков, необходимых для его репликации. Для успешной репликации должна произойти его коинфекция со вспомогательным вирусом, который будет производить недостающие белки. В природе естественным вспомогательным вирусом для AAV является аденовирус, но коинфекция с вирусом герпеса и бакуловирусом также может обеспечивать его репликацию в клеточной культуре [18, 20, 21].

При создании векторов на основе AAV из вирусного генома удаляются все гены, необходимые для репликации и сборки вирусных частиц. В клеточные культуры, производящие вирус, эти гены вводятся в виде плазмид, а сам вирус сохраняет только ITR, без которых не произошла бы упаковка генома в капсид. Между ITR встраивается ген (трансен) и необходимые для его транскрипции элементы — промотор и терминатор (полиадениновая последовательность), которые требуется доставить в клетки [22]. Попав в ядро клетки, такой вектор синтезирует комплементарную исходной нить ДНК, после чего образует кольцевую структуру — эписому (в отличие от вируса дикого типа, который встраивается в хромосому клетки-хозяина), которая обеспечивает экспрессию трансгена через внутриклеточные механизмы транскрипции и трансляции.

Идея оптогенетического протезирования сетчатки состоит в том, что экспрессия светочувствительных белков в нейронах сетчатки, в которой произошла необратимая дегенерация фоторецепторов, предположительно позволит превратить их в псевдофоторецепторы, а пластичность центральной нервной системы позволит адаптироваться к восприятию картины, передаваемой без участия палочек и колбочек. К вирусному вектору для оптогенетического протезирования дегенерировавшей сетчатки предъявляется два основных требования. Во-первых, он должен обеспечивать селективную экспрессию экзогенного белка в клетках, участвующих в передаче зрительной информации в мозг выживших фоторецепторах (как правило, колбочках), биполярных и ганглиозных клетках, причем желательно, чтобы экспрессия происходила в одном конкретном типе клеток, во избежание перекрывания сигналов, идущих от разных источников. Во-вторых, светочувствительный белок должен соответствовать задаче терапии, например обеспечивать восстановление зрения с максимально возможной чувствительностью или давать противоположную реакцию на свет в различных клетках, создавая новые ON- и OFF-пути

передачи сигнала в сетчатке. Первое требование может быть выполнено с помощью селективного промотора для гена интереса (а также способа доставки вируса в сетчатку), второе — правильным выбором гена, кодирующего светочувствительный белок из пула существующих оптогенетических инструментов.

## 1. ПРОМОТОР

Для того чтобы конструктор, содержащий целевой трансген, экспрессировался в клетке-мишени, требуется, чтобы он был распознан механизмами транскрипции в данной клетке. Для этой цели служит промотор гена. Именно промотор во многом определяет интенсивность экспрессии, а также то, в каких типах клеток будет экспрессироваться трансген, поскольку с ним связываются специфичные транскрипционные факторы и комплекс белков, реализующих сам процесс транскрипции.

В области генной терапии и оптогенетического протезирования дегенерированной сетчатки разные научные группы ставили своей целью добиться селективной экспрессии трансгенов в фоторецепторных клетках (уцелевших при дегенерации колбочках), в биполярных или в ганглиозных клетках. Соответственно разрабатывались промоторы, в той или иной степени обеспечивающих селективную экспрессию в перечисленных типах клеток. Для достижения этой цели исследователи фокусировали свое внимание на промоторах генов, экспрессирующихся главным образом в клетках интереса. Так, например, чтобы ограничить экспрессию вектора биполярными клетками сетчатки, было предложено использовать промотор гена специфического метаболитного рецептора глутамата (mGluR6 — ген *Grm6*), экспрессирующегося исключительно в ON-биполярных клетках. Для селективной экспрессии в ганглиозных клетках использовались промоторы на основе генов гамма-синуклина (SNCG, [23]), синапсина (hSyn, [24]) или тяжелой цепи нейрофиламентов (Nefh, [25]), которые демонстрируют в пределах сетчатки селективную экспрессию в ганглиозных клетках. Аналогичным способом были подобраны промоторы и для селективной экспрессии трансгенов в сохраняющихся на ранних стадиях дегенерации сетчатки колбочках. Так, известны успешные попытки использования для этой цели промоторов опсина синечувствительных колбочек мыши (mBP, [26]) и красночувствительных колбочек человека (hRO), а также колбочко-специфичного аррестина мыши (mCAR, [27]).

Однако применять промоторы избранных генов в их исходном виде для доставки конструкторов при помощи AAV затруднительно: естественные промоторы слишком длинны, а емкость AAV как вектора ограничивается приблизительно 4.7 тысячами нуклеотидов, и в этот объем должен помимо промотора уложиться ген светочувствительного белка. Для уменьшения длины промоторов при сохранении их функциональной активности разные группы исследователей стали выделять из естественных промоторов наиболее значимые для регуляции экспрессии фрагменты суммарной длиной не более 1—2 тысяч нуклеотидов.

Так, было показано, что для селективной экспрессии в ON-биполярных клетках достаточно наличия 200-нуклеотидной энхансерной последовательности из гена *Grm6*, и минимальный неселективный промотор SV40, слитый с одной или четырьмя копиями такого энхансера, обеспечивает эффективную трансдукцию канального родопсина в ON-биполярных клетках сетчатки мышей [28, 29]. В работе Q. Lu и соавт. [30] был проведен поиск дополнительных

цис-регуляторных элементов в гене *Grmb*, и несколько последовательностей из 3-го и 4-го интрона данного гена были совмещены с фрагментом его же промотора для экспрессии векторов на основе AAV. Вектор с таким улучшенным промотором продемонстрировал высокую эффективность и селективность экспрессии в ON-биполярных клетках мышей и игрунковых обезьян. Также по меньшей мере один успешный минипромотор для направленной экспрессии в биполярных клетках был получен в рамках проекта Pleiades Promoter Project [31], в котором новые минипромоторы разрабатывали методами биоинформатики в три стадии: идентификация генов, специфически экспрессируемых в особых типах клеток нервной системы, компьютерное прогнозирование регуляторных областей в генах человека, ответственных за специфическую экспрессию, и проверка компактных минипромоторов в экспериментах на мышах. Сконструированный таким способом минипромотор Ple155 запускает надежную и направленную экспрессию трансгена в ON-биполярных клетках сетчатки мышей, нокаутных по гену никталопина (*Nyx*) после инъекции вируса [32]. В рамках того же проекта E. Simpson и соавт. [33] разработали минипромотор Ple345 (промотор легкой цепи нейрофиламента, *NEFL*) для селективной экспрессии конструктов в ганглиозных клетках сетчатки, и его эффективность была доказана на мышах и на макаках-резусах.

Несмотря на то что к настоящему времени предложен уже целый ряд промоторов, обеспечивающих селективную экспрессию в биполярных и ганглиозных клетках сетчатки, одновременно приходит и осознание новых проблем на пути их применения в дегенерированной сетчатке. На ранних стадиях процесса дегенерации страдают фоторецепторные клетки, а внутренние нейронные слои выживают. Тем не менее в этих слоях идет необратимая перестройка, влекущая за собой изменение профиля экспрессии различных белков. Вследствие этого, промоторы, которые были подобраны для здоровой сетчатки, могут не работать в сетчатке дегенерированной. Также под одним и тем же промотором различные светочувствительные белки могут экспрессироваться по-разному. Так, например, бактериальный канальный родопсин селективно экспрессируется под промотором 4xGRM6-SV40 в ON-биполярных клетках дегенерированной сетчатки [34], однако такого не наблюдается для химерного рецептора на основе меланопсина [35]. Авторы данного исследования столкнулись с тем, что, в отличие от здоровой сетчатки контрольных мышей, в дегенерированной сетчатке нокаутных животных не наблюдалось экспрессии целевых трансгенов в ON-биполярных клетках, вместо которых трансдуцированы оказались преимущественно амакриновые клетки (обеспечивающие латеральные связи во внутренних слоях сетчатки).

## 2. ГЕН СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО БЕЛКА

Светочувствительные белки, применяемые в оптогенетике, представляют собой опсины 1-го и 2-го типа, а также их производные. По своей структуре опсины обоих типов являются трансмембранными белками, содержащими семь трансмембранных спиральных доменов, однако между ними отсутствует гомологическое сходство. Опсины 1-го типа присутствуют у прокариот, водорослей и грибов и являются ионными каналами, или транспортерами, а опсины 2-го типа характерны только для животных и представлены в основном G-белок-связывающими рецепторами (GPCR), обеспечивающими функцию фоторецепции, или синхронизации циркадных ритмов. По типу действия светочувствительные белки могут ингибировать нейрон путем гиперполяри-

зации мембраны или активировать его через деполяризацию. Из всего разнообразия опсинов 1-го типа для целей оптогенетики используются каналородопсины (деполяризуют нейрон), бактериородопсины и галородопсины (гиперполяризуют нейрон).

Каналородопсины являются светоуправляемыми неселективными катионными каналами, впервые обнаруженными у одноклеточной пресноводной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [36, 37]. У *C. reinhardtii* имеется два каналородопсина, первого (ChR1) и второго (ChR2) типа, которые обладают схожими функциональными характеристиками, однако поскольку ChR2 лучше экспрессируется в клетках млекопитающих, именно он был впервые применен в оптогенетике [38], а также послужил основой для создания линейки модифицированных белков с улучшенными функциональными характеристиками. За полтора десятилетия, прошедших с открытия и первого применения каналородопсинов, различными группами было создано более 20 их модификаций из *C. reinhardtii* и других источников (см. обзоры [39, 40]). Так, модифицированный каналородопсин ChETA, полученный из ChR2 заменой глутаминовой кислоты в положении 123 на треонин, обладает в несколько раз большим быстродействием [41], а химерный каналородопсин C1V1, составленный из ChR1 и опсина VChR1, выделенного из водоросли *Volvox carteri* [42], обладает сдвинутым в красную область спектром действия и более высоким, чем у ChR2, током через канал в открытом состоянии. Опсины ChEF и ChIEF являются химерами ChR1 и ChR2 и обладают по сравнению с ними меньшей десенситизацией, лучшей экспрессией и встраиванием в мембрану клеток млекопитающих [43].

Для ингибирования нейрональной активности (и создания OFF-путей передачи сигнала) применяются оптогенетические инструменты, гиперполяризующие клетку и затрудняющие тем самым генерацию потенциала действия. Для этого используются анионные и протонные помпы, закачивающие ионы хлора внутрь клетки и выкачивающие протоны из цитоплазмы во внеклеточное пространство против электрохимического градиента. В качестве хлорной помпы используется галородопсин NpHR из архея *Natronomonas pharaonis* [44, 45]. Дальнейшее применение галородопсина для управления нейронами млекопитающих потребовало создания новых версий с улучшенным мембранным транспортом и более высоким уровнем тока через канал (eNpHR2.0 и eNpHR3.0 [46, 47]). Модифицированный галородопсин Jaws со сдвинутой в красную спектральную область чувствительностью обладает в три раза большей проводимостью, чем природный [48]. Протонные помпы реже используются как оптогенетические инструменты для протезирования сетчатки, поскольку природные бактериородопсины и их аналоги оказались токсичны и плохо интегрировались в клетки млекопитающих. Однако искусственно созданные белки Arch и ArchT (на основе опсинов из архея *Halorubrum sodomense*), Mac (из гриба *Lepidosphaeria maculans*) и eBR (на основе бактериородопсина из *Halobacterium salinarum*) могут оказаться востребованными в дальнейшем [44, 49, 50].

Таким образом, несколько светочувствительных белков — опсинов 1-го типа, — послужили матрицами для создания наборов оптогенетических инструментов, приспособленных для использования в различных экспериментальных протоколах. Кроме того, почти сразу после их появления эти инструменты были использованы для целей протезирования сетчатки с дегенеративными изменениями у нокаутных животных [28, 34, 51]. Несмотря на то что практически во всех случаях был достигнут определенный успех в трансдукции биполярных и ганглиозных клеток светочувствительными белками и появлялась реакция на свет, их чувствительность остается крайне низкой.

Эта проблема естественным образом вытекает из природы светозависимой проводимости канала или помпы, где один квант света открывает или запускает только один канал проводимости. Проводимость одиночного канала имеет естественные ограничения по величине ионного тока, поэтому для существенного увеличения возбуждающего деполяризующего тока в ответ на один квант необходимо, чтобы поглощение одного кванта приводило к открытию сразу многих каналов плазматической мембраны, как это происходит в естественном каскаде фототрансдукции в фоторецепторах позвоночных [52]. Подобную функцию могут осуществлять GPCR, к которым относятся опсины животных. Однако их применение сопряжено с рядом трудностей.

Все опсины содержат хромофорную группу — ретиналь, который изомеризуется после поглощения кванта света. После изомеризации хромофора комплекс хромофор—белок переходит в высокоэнергетическое состояние, далее белок самопроизвольно меняет конформацию и переходит в активное сигнальное состояние. После изомеризации хромофор может либо остаться связанным с белком (опсины 1-го типа и R-опсины, к которым относятся опсины беспозвоночных и меланопсин позвоночных), либо отделиться от белковой части (С-опсины, к которым относятся все зрительные белки позвоночных). Различие в судьбе хромофорной группы после фотоактивации определяет способ регенерации светочувствительного белка для возврата его обратно в темновое состояние. В первом случае обратная изомеризация хромофора происходит самопроизвольно под действием тепловых колебаний молекулы или при поглощении фотона с длиной волны большей, чем требовалось для прямой изомеризации. Регенерация же С-опсина требует наличия специальных ферментных и транспортных систем, имеющих только в фоторецепторных клетках, что может существенно затруднить использование данного белка как оптогенетического инструмента в дегенерировавшей сетчатке. Эту проблему можно преодолеть путем использования для оптогенетического протезирования таких белков, как меланопсин, относящихся к R-опсинам, и в то же время обладающих низкой иммуногенностью, так как они экспрессируются в клетках позвоночных.

Однако далее возникает проблема соответствия GPCR — G-белок, поскольку, например, меланопсин имеет сродство к белку Gq, в то время как в сетчатке помимо каскада фототрансдукции известен только один сигнальный каскад, запускаемый GPCR и приводящий к изменению проводимости ионных каналов нейрона — каскад ON-биполярных клеток (для обзора см. [53]), функционирующий через белок Go. Возможным и перспективным решением, позволяющим преодолеть это ограничение, может стать создание светочувствительных химерных GPCR. Такие рецепторы должны, как и природные зрительные родопсины, состоять из светочувствительного домена и С-конца, активирующего необходимый G-белок, и таким образом управлять проводимостью каналов в клетках сетчатки. Первые химерные рецепторы, еще не имевшие приложения к протезированию сетчатки, названные optoXR, были созданы группой Карла Дейсерота и представляли собой молекулу родопсина с сохраненными внеклеточными и частично внутримембранными доменами и полостью для хромофора, и цитоплазматической частью, замененной на С-концевые части  $\alpha$ - или  $\beta$ -адренорецепторов. Составленная таким образом химерная молекула была способна поглощать квант света и запускать сигнальные каскады, основанные на Gq- и Gs-белках [54, 55]. Позднее специально для целей протезирования ON-биполярных клеток сетчатки была сконструирована химера из меланопсинового светочувствительного домена и

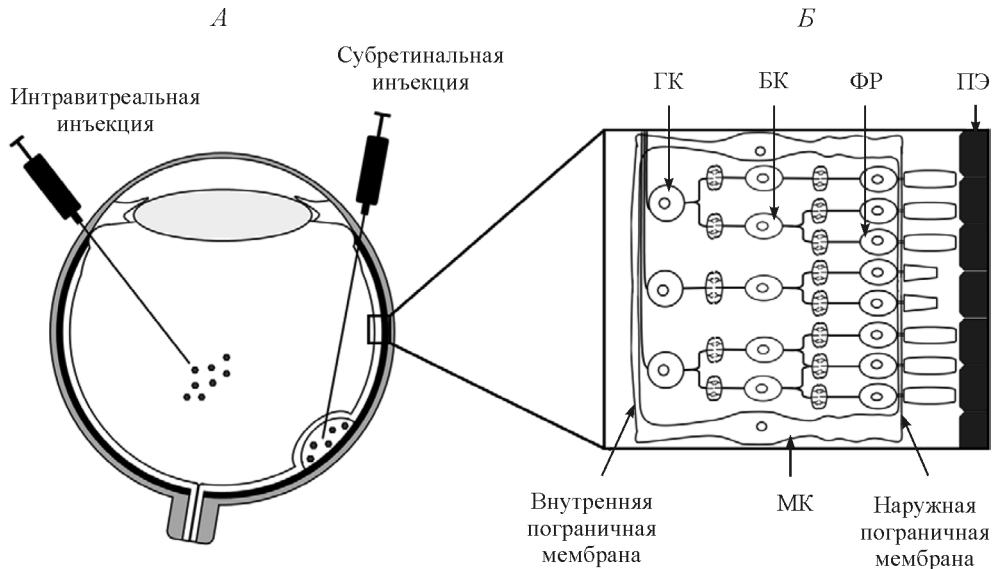


цитоплазматического домена глутаматергического metabotropic рецептора mGluR6, запускающего сигнальный каскад на основе белка Go [56, 57]. Также на клеточных культурах на предмет сродства к различным G-белкам был протестирован ряд химерных рецепторов, в том числе химеры между человеческим палочковым родопсином и mGluR6, а также палочковым родопсином и опсинами, связывающимися с белком Go (опсин-1 ланцетника *Branchiostoma belcheri* и опсин-2 гребешка *Patinopecten yessoentes*) [58].

## ДОСТАВКА ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ AAV ВЕКТОРОВ

Эффективность генной терапии глазных заболеваний во многом определяется выбором способа доставки вирусных конструкторов к сетчатке. Существует два основных варианта доставки вирусных векторов (см. рисунок, А): путем инъекции в стекловидное тело глаза (интравитреально) или путем инъекции в узкую щель между слоем пигментного эпителия и фоторецепторным слоем сетчатки (субретинально) [6, 59]. Выбор способа инъекции зависит, главным образом, от конечной цели протезирования: интравитреальный путь наиболее предпочтителен для доставки трансгенов в клетки внутренних слоев сетчатки (ганглиозные и биполярные клетки), субретинальный путь более подходит для таргетинга клеток внешних слоев (фоторецепторов или клеток пигментного эпителия).

Оба варианта доставки имеют свои преимущества и недостатки. Сама процедура интравитреальной инъекции достаточно проста в выполнении и считается менее инвазивной по сравнению с субретинальной. Несмотря на отно-



Пути введения вирусных векторов в сетчатку.

А — интравитреальная инъекция проводится в стекловидное тело, и вирусные частицы подходят к сетчатке со стороны внутренней пограничной мембраны. Субретинальная инъекция производится в пространство между пигментным эпителием (ПЭ) и наружной пограничной мембраной; Б — зрительная информация в здоровой сетчатке передается от фоторецепторов (ФР) через биполярные клетки (БК) на ганглиозные клетки (ГК), чьи аксоны вместе образуют зрительный нерв, идущий в мозг. Мюллеровские клетки (МК) выполняют функции глии и образуют внутреннюю и наружную пограничные мембраны сетчатки.

сительную безопасность процедуры, интравитреальные инъекции все же несут в себе риск послеоперационных осложнений: описаны единичные случаи эндофтальмита, отслойки сетчатки, повреждения хрусталика, повышения внутриглазного давления [60]. В отличие от инъекций в стекловидное тело глаза, субретинальные инъекции относят к категории сложных по технике выполнения процедур и требуют высокой квалификации офтальмохирургов. Используемая в настоящее время двухэтапная техника субретинальных инъекций [61, 62] позволяет минимизировать возможные риски отслойки сетчатки, но не устранить их полностью. Витреоректомия (частичное удаление стекловидного тела глаза) как часть процедуры субретинальной инъекции повышает риск развития катаракты [63], тогда как субретинальная инъекция сама по себе может вызвать локальное истончение наружного ядерного слоя сетчатки [64]. Кроме того, имеются данные о таких осложнениях, как кровоизлияние в сетчатку и под конъюнктиву [65], перфорирование макулярной области сетчатки [66], острый эндофтальмит [67]. Однако ввиду недостаточного количества информации о послеоперационных осложнениях после проведения субретинальных инъекций, реально оценить безопасность этой процедуры пока достаточно сложно.

В отличие от инъекций в стекловидное тело глаза, субретинальный путь доставки вирусных векторов характеризуется более эффективной вирусной трансдукцией отчасти потому, что введенные векторы оказываются в непосредственной близости от сетчатки. При интравитреальном способе доставки вероятность инфицирования клеток-мишеней ниже, чем при субретинальных инъекциях (при том же титре вируса). Причина этого кроется в анатомических барьерах, препятствующих диффузии вирусных частиц из стекловидного тела к сетчатке (см. ниже). В исследованиях на обезьянах было показано, что при интравитреальной инъекции AAV эффективность трансдукции во всей сетчатке на два порядка ниже по сравнению с инъекцией в субретинальное пространство [68].

Чтобы увеличить эффективность трансдукции при интравитреальном способе доставки вирусов и приблизить ее к уровню субретинальных инъекций, необходимо существенно увеличить количество вирусных частиц в интравитреальной инъекции. Этого можно достигнуть повышением концентрации вирусов в инъекции и/или объема самой инъекции. Однако увеличение титра вируса повышает иммуногенность инъекции и может вызвать серьезные последствия со стороны иммунной системы. Несмотря на то что глаза позвоночных животных относят к так называемым иммунологически привилегированным органам, вирусные векторы могут проникать в кровеносное русло после их введения. Так, в исследованиях на обезьянах AAV-векторы были обнаружены во всех биологических жидкостях, причем при интравитреальном способе введения титр вируса в них был выше, чем в случае субретинальных инъекций [68]. Распространение AAV за пределы оболочек глаза повышает вероятность образования нейтрализующих антител, которые даже при низких концентрациях эффективны в отношении AAV и в некоторых случаях способны подавлять продуктивную вирусную трансдукцию. Развитие гуморального иммунного ответа, как следствие проникновения AAV в кровь и лимфатическую систему, наблюдалось после инъекций и в стекловидное тело [69], и в субретинальное пространство глаза [70]. Кроме того, оказалось, что циркулирующие в организме нейтрализующие анти-AAV антитела после интравитреальных инъекций снижают экспрессию повторно введенных трансгенов [71], тогда как после субретинальных инъекций их влияние на эффективность вирусной трансдукции незначительно [72].

На пути распространения вирусных частиц к клеткам-мишеням в сетчатке имеются свои препятствия в зависимости от способа введения (см. рисунок, Б) [6, 73]. При инъекции в субретинальное пространство вирусам, несущим трансгены в фоторецепторы или клетки более глубоких слоев сетчатки, необходимо преодолеть наружную пограничную мембрану, образованную адгезионными контактами между фоторецепторами и отростками клеток Мюллера. Вирусные частицы, диффундирующие из полости стекловидного тела глаза к сетчатке, должны преодолеть само вещество стекловидного тела и внутреннюю пограничную мембрану, которая образована базальной и плазматической мембраной мюллеровских клеток. Считается, что внутренняя пограничная мембрана является основной преградой для свободной диффузии вирусных частиц из полости стекловидного тела и как следствие для эффективной вирусной трансдукции клеток сетчатки, особенно ее внешних слоев [73]. К настоящему времени предложено несколько относительно безопасных методов обработки внутренней пограничной мембраны, улучшающих ее пропускную способность для рекомбинантных вирусов, а именно лазерная фотокоагуляция [74], хирургическая десквамация (пилинг) [75], лизис неспецифическими протеазами [73, 76].

С проблемой низкой эффективности вирусной трансдукции борются и путем модификации самих носителей трансгенов — вирусных частиц. Показано, что AAV-векторы, ассоциированные с экзосомами, значительно превосходят обычные AAV по эффективности вирусной трансдукции: после интравитреальной инъекции они обнаруживались в большинстве биполярных клеток и некоторых фоторецепторах сетчатки мыши [77]. Считают, что AAV, ассоциированные с экзосомами, обладают более высокой проникающей способностью через анатомические барьеры (в том числе и через внутреннюю пограничную мембрану сетчатки) [78] и более устойчивы к действию нейтрализующих анти-AAV антител по сравнению с обычными AAV [79].

Конструирование новых вариантов вирусных капсидов может также способствовать решению проблемы низкой трансдукции клеток-мишеней сетчатки. Существует несколько различных серотипов вируса дикого типа, наиболее изученным из которых является AAV2. Это, а также тот факт, что это единственный тип капсида, способный проникать через внутреннюю пограничную мембрану, хоть и с низкой эффективностью [73], привело к тому, что только он и его модификации используются для доставки трансгенов в сетчатку. Для модификации капсида с целью повышения его проникающей способности применяется так называемый метод направленной эволюции. Суть этого метода состоит в том, что сгенерированная заранее библиотека вирусов с различными последовательностями в гене *cap* помещается в среду, соответствующую ткани, для трансдукции которой разрабатывается вирус (культура клеток или живое животное), где выживают только те вирусы, капсид которых оказался наиболее подходящим для данных условий (для обзора см. [22]). Так, возникшая замена фенилаланина на тирозин (Y-T) в одном или нескольких положениях в капсиде AAV2 позволила повысить эффективность вирусной трансдукции, как полагают, за счет снижения внутриклеточной дегградации вирусов протеасомами [80–84]. Другой вариант капсида AAV — 7m8, в котором имеются замещения аминокислотных остатков — потенциальных сайтов связывания с доменами внутренней пограничной мембраны, отличается еще более эффективной трансдукцией всех слоев сетчатки после интравитреальной инъекции [85]. Показано, что на данный момент капсид 7m8 является наиболее эффективным для трансдукции дегенерировавшей сетчатки мышей, а также сетчатки приматов и человека [86]. Дальнейшее усовер-

шенствование дизайна вирусных векторов позволит сделать интравитреальный способ доставки вирусных векторов безопасным и эффективным для оптогенетического протезирования сетчатки.

## ПРОБЛЕМА ДОСТАВКИ БОЛЬШИХ ТРАНСГЕНОВ

В настоящее время генная (в том числе и оптогенетическая) терапия на основе AAV является перспективным подходом к лечению большинства наследственных заболеваний человека. Однако в ряде случаев ограниченная емкость вирусного генома создает определенные трудности при упаковке трансгена большой длины в экспрессионную кассету одиночного вируса [87]. Установлено, что верхний предел вместимости генома вектора на основе AAV составляет ~5.2 тысячи нуклеотидов, выше которого наблюдается фрагментация вирусного генома внутри клеток-мишеней и значительное снижение эффективности вирусной трансдукции [88, 89].

Однако предполагается, что части фрагментированного вирусного генома, размер которого превышает предельно допустимый, способны уже внутри клетки собираться в полноценную экспрессионную кассету и, таким образом, служить матрицей для синтеза интересующего белка [90]. Это предположение легло в основу разработки нового метода доставки в клетки-мишени трансгена большой длины с помощью пары AAV. Существует несколько вариантов такого подхода (для обзора см. [91]), все они основаны на способности инвертированных концевых повторов (ITR) и/или гомологичных последовательностей геномов гибридизоваться и образовывать конкатамеры. Исследования *in vitro* и *in vivo* [92–95] показали практическую возможность использования двухвекторного подхода и для лечения дегенеративных заболеваний сетчатки, для которых использование одновекторного подхода затруднительно или даже невозможно (например, болезни Штаргарта, синдрома Ашера). В рамках оптогенетического протезирования это позволяет предположить возможность доставки генов сразу нескольких белков в одну клетку, где они могли бы образовывать независимый светууправляемый сигнальный каскад, или различных светочувствительных белков (деполяризирующих и гиперполяризирующих) в разные клетки для восстановления ON- и OFF-сигнальных путей.

Однако возможность применения двухвекторного подхода в клинике пока далека от реализации по ряду причин. Во-первых, невысокая вероятность котрансфекции клетки-мишени парой вирусных векторов и последующие гомологичная рекомбинация и сплайсинг генных продуктов сказываются на эффективности вирусной трансдукции. Во-вторых, низкий уровень гомологичной рекомбинации в постмитотических нейронах значительно снижает эффективность гибридизации векторов с образованием конкатамеров [95]. В-третьих, высокая вариабельность эффективности трансдукции парой AAV в исследованиях на сетчатке *in vivo* (5—100 % по сравнению с эффективностью одновекторного подхода) [92, 94] является одним из лимитирующих факторов для внедрения этого подхода в клиническую практику. Несмотря на это, высказываются надежды, что дальнейшая оптимизация двухвекторного подхода позволит в будущем доставлять большие трансгены в клетки-мишени не только с помощью двух, но и трех вирусов [91].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на наличие богатого арсенала средств для оптогенетического протезирования сетчатки, включающих в себя селективные промоторы, различные светочувствительные белки и инструменты по доставке вирусов в сетчатку, методика восстановления зрения все еще далека от совершенства. Зачастую тщательно подобранные компоненты вектора ведут себя в протезируемой сетчатке непредсказуемым образом: вирусы либо не проникают в нейроны сетчатки, либо доставляемый ими трансген экспрессируется совсем в другом типе клеток, чем ожидалось. Разные светочувствительные белки под одним и тем же промотором демонстрируют разные профили экспрессии, что поднимает вопрос об взаимном влиянии промотора и гена интереса. Также следует отметить, что задача по доставке генов в дегенерирующую сетчатку не эквивалентна доставке в здоровую. Это связано с ремоделированием внутренних клеточных слоев после дегенерации фоторецепторов и потери синаптических контактов с ними. Имеются данные о том, что если вновь дать возможность выжившим клеткам работать в составе системы, передающей зрительную информацию в мозг, то на некоторых стадиях дегенерации ремоделирование можно остановить или даже обратить вспять [96]. Исходя из этого естественно будет предположить, что аналогичного результата можно добиться и при восстановлении сигнальных путей после превращения части сохранившихся нейронов сетчатки в псевдофоторецепторы [97].

Для успешного выбора всех компонентов вектора необходимо заранее иметь представление об изменениях, происходящих в дегенерирующей сетчатке, не только на морфологическом, но и на молекулярном уровне, в том числе изменениях экспрессионного профиля. Новые данные помогут выбрать оптимальные промоторы для экспрессии трансгенов, отсеяв те, что созданы на основе генов, чья экспрессия подавляется в дегенерирующей сетчатке. Таким образом, при разработке новых векторов необходимо опираться на более обширную базу знаний о процессах, имеющих место при дегенерации сетчатки, что требует проведения дополнительных фундаментальных исследований по данному вопросу.

Работа поддержана программой ПРАН 0132-2018-0007.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Lee D. J., Biros D. J., Taylor A. W.* Injection of an alpha-melanocyte stimulating hormone expression plasmid is effective in suppressing experimental autoimmune uveitis. *Int. Immunopharmacol.* 9(9): 1079—1086. 2009.
- [2] *Hirano Y., Sakurai E., Matsubara A., Ogura Y.* Suppression of ICAM-1 in retinal and choroïdal endothelial cells by plasmid small-interfering RNAs in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51(1): 508—515. 2010.
- [3] *Matsuda T., Cepko C. L.* Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(3): 1027—1032. 2007.
- [4] *Mukhtarov M., Markova O., Real E., Jacob Y., Buldakova S. Bregestovski P.* Monitoring of chloride and activity of glycine receptor channels using genetically encoded fluorescent sensors. *Philos. Trans. A Math Phys. Eng. Sci.* 366(1880): 3445—3462. 2008.
- [5] *Adijanto J., Naash M. I.* Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 95 : 353—367. 2015.
- [6] *Planul A., Dalkara D.* Vectors and gene delivery to the retina. *Annu. Rev. Vis. Sci.* 3 : 121—140. 2017.

- [7] Oliveira A. V., da Costa A. M. R., Silva G. A. Non-viral strategies for ocular gene delivery. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 77 : 1275—1289. 2017.
- [8] Bennett J., Wilson J., Sun D., Forbes B., Maguire A. Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer into adult murine retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35(5): 2535—2542. 1994.
- [9] Trapani I., Puppo A., Auricchio A. Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. *Prog. Retin. Eye Res.* 43 : 108—128. 2014.
- [10] Klapper S. D., Swiersy A., Bamberg E., Busskamp V. Biophysical properties of optogenetic tools and their application for vision restoration approaches. *Front Syst. Neurosci.* 10 : 74. 2016.
- [11] Simunovic M. P., Shen W., Lin J. Y., Protti D. A., Lisowski L., Gillies M. C. Optogenetic approaches to vision restoration. *Exp. Eye Res.* 178 : 15—26. 2018.
- [12] Pan Z. H., Lu Q., Bi A., Dizhoor A. M., Abrams G. W. Optogenetic approaches to restoring vision. *Annu. Rev. Vis. Sci.* 1 : 185—210. 2015.
- [13] Островский М. А., Курпичников М. П. Оптогенетика и зрение. Сенсор. сист. 29(4): 289—295. 2015. [Ostrovsky M. A., Kirpichnikov M. P. Optogenetics and vision Sensor. Syst. 29(4): 289—295. 2015. (In Russ.)].
- [14] Фирсов М. Л. Перспективы оптогенетического протезирования сетчатки. Журн. высш. нерв. деятельности. 67(5): 53—62. 2017. [Firsov M. L. Prospects of Optogenetic prosthetics of a retina. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat.* 67(5): 53—62. 2017. (In Russ.)].
- [15] Tochitsky I., Kramer R. H. Optopharmacological tools for restoring visual function in degenerative retinal diseases. *Curr. Opin. Neurobiol.* 34 : 74—78. 2015.
- [16] Брежестовский П. Д., Малеева Г. В. Фотофармакология: краткий обзор на примере управления калиевыми каналами. Журн. высш. нерв. деятельности. 67(5): 41—52. 2017. [Bregestovski P., Maleeva G. Photopharmacology: mini review by example of potassium channels modulation by light. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat.* 67(5): 41—52. 2017. (In Russ.)].
- [17] Baker C. K., Flannery J. G. Innovative optogenetic strategies for vision restoration. *Front Cell Neurosci.* 12(316). 2018.
- [18] Samulski R. J., Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. *Annu. Rev. Virol.* 1 : 427—451. 2014.
- [19] Naso M.F., Tomkowicz B., Perry W.L., Strohl W.R. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs.* 31(4): 317—334. 2017.
- [20] Buller R. M., Janik J. E., Sebring E. D., Rose J. A. Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J. Virol.* 40: 241—247. 1981.
- [21] Urabe M., Nakakura T., Xin K. Q., Obara Y., Mizukami H., Kume A., Kotin R. M., Ozawa K. Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J. Virol.* 80: 1874—1885. 2006.
- [22] Kotterman M. A., Schaffer D. V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 15(7): 445—451. 2014.
- [23] Chaffiol A., Caplette R., Jaillard C., Brazhnikova E., Desrosiers M., Dubus E., Duhamel L., Mace E., Marre O., Benoit P., Hantraye P., Bemelmans A. P., Bamberg E., Duebel J., Sahel J. A., Picaud S., Dalkara D. A new promoter allows optogenetic vision restoration with enhanced sensitivity in macaque retina. *Mol. Ther.* 25: 2546—2560. 2017.
- [24] Caporale N., Kolstad K. D., Lee T., Tochitsky I., Dalkara D., Trauner D., Kramer R., Dan Y., Isacoff E. Y., Flannery J. G. LiGluR restores visual responses in rodent models of inherited blindness. *Mol. Ther.* 19(7): 1212—1219. 2011.
- [25] Hanlon K. S., Chadderton N., Palfi A., Fernandez A. B., Humphries P., Kenna P. F., Milington-Ward S., Farrar G. J. A novel retinal ganglion cell promoter for utility in AAV vectors. *Front Neurosci.* 11 : 521. 2017.
- [26] Michalakis S., Muhlfriedel R., Tanimoto N., Krishnamoorthy V., Koch S., Fischer M. D., Becirovic E., Bai L., Huber G., Beck S. C., Fahl E., Buning H., Paquet-Durand F., Zong X., Gollisch T., Biel M., Seeliger M. W. Restoration of cone vision in the CNGA3<sup>-/-</sup> mouse model of congenital complete lack of cone photoreceptor function. *Mol. Ther.* 18(12): 2057—2063. 2010.
- [27] Busskamp V., Duebel J., Balya D., Fradot M., Viney T. J., Siebert S., Groner A. C., Cayaby E., Forster V., Seeliger M., Biel M., Humphries P., Paques M., Mohand-Said S., Trono D., Deisseroth K., Sahel J. A., Picaud S., Roska B. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science.* 329 : 413—417. 2010.
- [28] Doroudchi M. M., Greenberg K. P., Liu J., Silka K. A., Boyden E. S., Lockridge J. A., Arman A. C., Janani R., Boye S. E., Boye S. L., Gordon G. M., Matteo B. C., Sampath A. P., Haus-

- wirth W. W., Horsager A. Virally delivered channelrhodopsin—2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness. *Mol. Ther.* 19(7) : 1220—1229. 2011.
- [29] Cronin T., Vandenbergh L. H., Hantz P., Juttner J., Reimann A., Kacso A. E., Huckfeldt R. M., Busskamp V., Kohler H., Lagali P. S., Roska B., Bennett J. Efficient transduction and optogenetic stimulation of retinal bipolar cells by a synthetic adeno-associated virus capsid and promoter. *EMBO Mol. Med.* 6(9): 1175—1190. 2014.
- [30] Lu Q., Ganjawala T. H., Ivanova E., Cheng J. G., Troilo D., Pan Z.-H. AAV-mediated transduction and targeting of retinal bipolar cells with improved mGluR6 promoters in rodents and primates. *Gene Ther.* 23 : 680—689. 2016.
- [31] Portales-Casamar E., Swanson D. J., Liu L., de Leeuw C. N., Banks K. G., Ho Sui S. J., Fulton D. L., Ali J., Amirabbasi M., Arenillas D. J., Babyak N., Black S. F., Bonaguro R. J., Brauer E., Candido T. R., Castellarin M., Chen J., Chen Y., Cheng J. C., Chopra V., Docking T. R., Dreolini L., D'Souza C. A., Flynn E. K., Glenn R., Hatakka K., Hearty T. G., Imanian B., Jiang S., Khorasan-zadeh S., Komljenovic I., Laprise S., Liao N. Y., Lim J. S., Lithwick S., Liu F., Liu J., Lu M., McConechy M., McLeod A. J., Milisavljevic M., Mis J., O'Connor K., Palma B., Palmquist D. L., Schmouth J. F., Swanson M. I., Tam B., Ticoll A., Turner J. L., Varhol R., Vermeulen J., Watkins R. F., Wilson G., Wong B. K., Wong S. H., Wong T. Y., Yang G. S., Ypsilanti A. R., Jones S. J., Holt R. A., Goldowitz D., Wasserman W. W., Simpson E. M. A regulatory toolbox of MiniPromoters to drive selective expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(38): 16 589—16 594. 2010.
- [32] Scalabrino M. L., Boye S. L., Fransen K. M., Noel J. M., Dyka F. M., Min S. H., Ruan Q., De Leeuw C. N., Simpson E. M., Gregg R. G., McCall M. A., Peachey N. S., Boye S. E. Intravitreal delivery of a novel AAV vector targets ON bipolar cells and restores visual function in a mouse model of complete congenital stationary night blindness. *Hum. Mol. Genet.* 24(21): 6229—6239. 2015.
- [33] Simpson E., Korecki A. J., Fornes O., McGill T. J., Cueva-Vargas J. L., Agostinone J., Farkas R. A., Hickmott J. W., Lam S. L., Mathelier A., Renner L. M., Stoddard J., Zhou M., Di Polo A., Neuringer M., Wasserman W. W. New MiniPromoter Ple345 (NEFL) drives strong and specific expression in retinal ganglion cells of mouse and primate retina. *Hum. Gene Ther.* DOI: 10.1089/hum.2018.118. 2018.
- [34] Macé E., Caplette R., Marre O., Sengupta A., Chaffiol A., Barbe P., Desrosiers M., Bamberg E., Sahel J. A., Picaud S., Duebel J., Dalkara D. Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV restores ON and OFF visual responses in blind mice. *Mol. Ther.* 23(1): 7—16. 2015.
- [35] Van Wyk M., Hulliger E. C., Girod L., Ebnetter A., Kleinlogel S. Present molecular limitations of ON-bipolar cell targeted gene therapy. *Front Neurosci.* 11 : 161. 2017.
- [36] Nagel G., Ollig D., Fuhrmann M., Kateriya S., Musti A. M., Bamberg E., Hegemann P. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science.* 296(5577): 2395—2398. 2002.
- [37] Nagel G., Szellas T., Huhn W., Kateriya S., Adeishvili N., Berthold P., Ollig D., Hegemann P., Bamberg E. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(24): 13 940—13 945. 2003.
- [38] Boyden E. S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8(9): 1263—1268. 2005.
- [39] Fenno L., Yizhar O., Deisseroth K. The development and application of optogenetics. *Annu. Rev. Neurosci.* 34 : 389—412. 2011.
- [40] Guru A., Post R. J., Ho Y. Y., Warden M. R. Making sense of optogenetics. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18(11): pyv079. 2015.
- [41] Gunaydin L. A., Yizhar O., Berndt A., Sohal V. S., Deisseroth K., Hegemann P. Ultrafast optogenetic control. *Nat. Neurosci.* 13(3): 387—392. 2010.
- [42] Zhang F., Prigge M., Beyriere F., Tsunoda S. P., Mattis J., Yizhar O., Hegemann P., Deisseroth K. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat. Neurosci.* 11(6): 631—633. 2008.
- [43] Lin J. Y., Lin M. Z., Steinbach P., Tsien R. Y. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys. J.* 96(5): 1803—1814. 2009.
- [44] Han X., Boyden E. S. Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PLoS One.* 2(3): e299. 2007.

[45] Zhang F., Wang L. P., Brauner M., Liewald J. F., Kay K., Watzke N., Wood P. G., Bamberg E., Nagel G., Gottschalk A., Deisseroth K. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*. 446 (7136): 633—639. 2007.

[46] Gradinaru V., Thompson K. R., Deisseroth K. eNpHR: a *Natronomonas halorhodopsin* enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol.* 36(1—4): 129—139. 2008.

[47] Gradinaru V., Zhang F., Ramakrishnan C., Mattis J., Prakash R., Diester I., Goshen I., Thompson K. R., Deisseroth K. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell*. 141 (1): 154—165. 2010.

[48] Chuong A. S., Miri M. L., Busskamp V., Matthews G. A., Acker L. C., Sorensen A. T., Young A., Klapoetke N. C., Henninger M. A., Kodandaramaiah S. B., Ogawa M., Ramanlal S. B., Bandler R. C., Allen B. D., Forest C. R., Chow B. Y., Han X., Lin Y., Tye K. M., Roska B., Cardin J. A., Boyden E. S. Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. *Nat. Neurosci.* 17(8): 1123—1129. 2014.

[49] Gradinaru V., Zhang F., Ramakrishnan C., Mattis J., Prakash R., Diester I., Goshen I., Thompson K. R., Deisseroth K. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell*. 141(1): 154—165. 2010.

[50] Han X., Chow B. Y., Zhou H., Klapoetke N. C., Chuong A., Rajimehr R., Yang A., Baratta M. V., Winkle J., Desimone R., Boyden E. S. A high-light sensitivity optical neural silencer: development and application to optogenetic control of non-human primate cortex. *Front Syst. Neurosci.* 5(18). 2011.

[51] Bi A., Cui J., Ma Y. P., Olshevskaya E., Pu M., Dizhoor A. M., Pan Z. H. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron*. 50(1): 23—33. 2006.

[52] Pugh E. N. jr., Lamb T. D. Phototransduction in vertebrate rods and cones: molecular mechanisms of amplification, recovery and light adaptation. *Handbook of biological physics 3* : 183—255. Amsterdam. Elsevier Science B. V. 2000.

[53] Martemyanov K. A., Sampath A. P. The transduction cascade in retinal ON-bipolar cells: signal processing and disease. *Annu. Rev. Vis. Sci.* 3 : 25—51. 2017.

[54] Airan R. D., Thompson K. R., Fenno L. E., Bernstein H., Deisseroth K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature*. 458(7241): 1025—1029. 2009.

[55] Oh E., Maejima T., Liu C., Deneris E., Herlitze S. Substitution of 5-HT<sub>1A</sub> receptor signaling by a light-activated G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 285(40): 30 825—30 836. 2010.

[56] Van Wyk M., Pielecka-Fortuna J., Lowel S., Kleinlogel S. Restoring the ON switch in blind retinas: Opto-mGluR6, a next-generation, cell-tailored optogenetic tool. *PLoS. Biol.* 13(5): e1002143. 2015.

[57] Kleinlogel S. Optogenetic user's guide to Opto-GPCRs. *Front Biosci. (Landmark. Ed.)*. 21 : 794—805. 2016.

[58] Ballister E. R., Rodgers J., Martial F., Lucas R.J. A live cell assay of GPCR coupling allows identification of optogenetic tools for controlling G<sub>o</sub> and G<sub>i</sub> signaling. *BMC. Biol.* 16(1): 10. 2018.

[59] Ochakovski G. A., Bartz-Schmidt K. U., Fischer M. D. Retinal gene therapy: Surgical vector delivery in the translation to clinical trials. *Front Neurosci.* 11 : 174. 2017.

[60] Jager R. D., Aiello L. P., Patel S. C., Cunningham E. T. Risks of intravitreal injection: comprehensive review. *Retina*. 24 : 676—698. 2004.

[61] MacLaren R. E., Groppe M., Barnard A. R., Cottrill C. L., Tolmachova T., Seymour L., Clark K. R., During M. J., Cremers F. P., Black G. C., Lotery A. J., Downes S. M., Webster A. R., Seabra M. C. Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet*. 383 : 1129—1137. 2014.

[62] Fischer M. D., Hickey D. G., Singh M. S., MacLaren R. E.. Evaluation of an optimized injection system for retinal gene therapy in human patients. *Hum. Gene Ther. Methods*. 27 : 150—158. 2016.

[63] Bennett J., Wellman J., Marshall K. A., McCague S., Ashtari M., DiStefano-Pappas Elci O. U., Chung D. C., Sun J., Wringht J. F., Cross D. R., Aravand P., Cyckowski L. L., Bennicelli J. L., Mingozzi F., Auricchio A., Pierce E. A., Ruggiero J., Leroy B. P., Simonelli F., High K. A., Maguire A. M. Safety and durability of effect of contralateraleye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial. *Lancet*. 388 : 661—672. 2016.



- [64] Jacobson S. G., Acland G. M., Aguirre G. D., Aleman T. S., Schwartz S. B., Cideciyan A. V., Zeiss C. J., Komaromy A. M., Kaushal S., Roman A. J., Windsor E. A., Sumaroka A., Pearce-Kelling S. E., Conlon T. J., Chiodo V. A., Boye S. L., Flotte T. R., Maguire A. M., Bennett J., Hauswirth W. W. Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection. *Mol. Ther.* 13 : 1074—1084. 2006.
- [65] Rakoczy E. P., Lai C. M., Magno A. L., Wikstrom M. E., French M. A., Pierce C. M., Schwartz S. D., Blumenkranz M. S., Chalberg T. W., Degli-Esposti M. A., Constable I. J. Gene therapy with recombinant adeno-associated vectors for neovascular age-related macular degeneration: 1 year followup of a phase 1 randomised clinical trial. *Lancet.* 386 : 2395—2403. 2015.
- [66] Campochiaro P. A., Lauer A. K., Sohn E. H., Mir T. A., Naylor S., Anderton M. C., Kelleher M., Harrop R., Ellis S., Mitrophanous K. A. Lentiviral vector gene transfer of endostatin/angiostatin for macular degeneration (GEM) study. *Hum. Gene Ther.* 28 : 99—111. 2017.
- [67] Schwartz S. D., Regillo C. D., Lam B. L., Elliott D., Rosenfeld P. J., Gregori N. Z., Hubschman J. P., Davis J. L., Heilwell G., Spirm M., Maguire J., Gay R., Bateman J., Ostrick R. M., Morris D., Vincent M., Anglade E., Del Priore L. V., Lanza R. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet.* 385 : 509—516. 2015.
- [68] Seitz I. P., Fischer M. D., Michalakakis S., Wilhelm B., Kahle N., Zrenner E., Ueffing M., Bartz-Schmidt K. U., Biel M., Wissinger B., Peters T. rAAV8 biodistribution and shedding after subretinal injection in non-human primates. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57 : 4025—4025. 2016.
- [69] Li Q., Miller R., Han P. Y., Pang J., Dinculescu A., Chiodo V., Hauswirth W. W. Intraocular route of AAV2 vector administration defines humoral immune response and therapeutic potential. *Mol. Vis.* 14 : 1760—1769. 2008.
- [70] Reichel F. F., Peters T., Muehlfriedel R., Biel M., Paquet-Durand F., Ueffing M., Wissinger B., Bartz-Schmidt K. U., Klein R., Michalakakis S., Fischer M. D. Humoral immune response to subretinal AAV8 in non-human primates. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57 : 778—778. 2016.
- [71] Kotterman M. A., Yin L., Strazzeri J. M., Flannery J. G., Merigan W. H., Schaffer D. V. Antibody neutralization poses a barrier to intravitreal adeno-associated viral vector gene delivery to non-human primates. *Gene Ther.* 22 : 116—126. 2015.
- [72] Amado D., Mingozi F., Hui D., Bennicelli J. L., Wei Z., Chen Y., Bote E., Grant R. L., Golden J. A., Narfsstrom K., Syed N. A., Orlin S. E., High K. A., Maguire A. M., Bennett J. Safety and efficacy of subretinal readministration of a viral vector in large animals to treat congenital blindness. *Sci. Transl. Med.* 2(21): 21ra16. 2010.
- [73] Dalkara D., Kolstad K. D., Caporale N., Visel M., Klimczak R. R., Schaffer D. V., Flannery J. G. Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous. *Mol Ther.* 17 : 2096—2102. 2009.
- [74] Lee S. H., Colosi P., Lee H., Ohn Y. H., Kim S. W., Kwak H. W., Park T. K. Laser photocoagulation enhances adeno-associated viral vector transduction of mouse retina. *Hum. Gene Ther. Methods.* 25 : 83—91. 2013.
- [75] Takahashi K., Igarashi T., Miyake K., Kobayashi M., Yaguchi C., Iijima O., Yamazaki Y., Katakai Y., Miyake N., Kameya S., Shimada T., Takahashi H., Okada T. Improved intravitreal AAV-mediated inner retinal gene transduction after surgical internal limiting membrane peeling in cynomolgus monkeys. *Mol. Ther.* 25 : 296—302. 2017.
- [76] Cehajic-Kapetanovic J., Le Goff M. M., Allen A., Lucas R. J., Bishop P. N. Glycosidic enzymes enhance retinal transduction following intravitreal delivery of AAV2. *Mol. Vis.* 17 : 1771—1783. 2011.
- [77] Wassmer S. J., Carvalho L. S., Gyorgy B., Vandenberghe L. H., Maguire C. A. Exosome-associated AAV2 vector mediates robust gene delivery into the murine retina upon intravitreal injection. *Sci. Rep.* 7 : 45329. 2017.
- [78] El Andaloussi S., Lakkhal S., Mager I., Wood M. J. Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 : 391—397. 2013.
- [79] Gyorgy B., Fitzpatrick Z., Crommentuijn M. H., Mu D., Maguire C. A. Naturally enveloped AAV vectors for shielding neutralizing antibodies and robust gene delivery in vivo. *Biomaterials.* 35 : 7598—7609. 2014.
- [80] Petrs-Silva H., Dinculescu A., Li Q., Deng W. T., Pang J. J., Min S. H., Chiodo V., Neeley A. W., Govindasamy L., Bennett A., Agbandje-McKenna M., Zhong L., Li B., Jayandharan G. R., Srivastava A., Lewin A. S., Hauswirth W. W. Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. *Mol. Ther.* 19 : 293—301. 2011.

- [81] *Vandenbergh L. H., Auricchio A.* Novel adeno-associated viral vectors for retinal gene therapy. *Gene Ther.* 19 : 162—168. 2012.
- [82] *Mowat F. M., Gornik K. R., Dinculescu A., Boye S. L., Hauswirth W. W., Petersen-Jones S. M., Bartoe J. T.* Tyrosine capsid-mutant AAV vectors for gene delivery to the canine retina from a subretinal or intravitreal approach. *Gene Ther.* 21 : 96—105. 2014.
- [83] *Kay C. N., Ryals R. C., Aslanidi G. V., Min S. H., Ruan Q., Sun J., Dyka F. M., Kasuga D., Ayala A. E., Van Vliet K., Agbandje-McKenna M., Hauswirth W. W., Boye S. L., Boye S. E.* Targeting photoreceptors via intravitreal delivery using novel, capsid-mutated AAV vectors. *PLoS One.* 8 : e62097. 2013.
- [84] *Boyd R. F., Sledge D. G., Boye S. L., Boye S. E., Hauswirth W. W., Komáromy A. M., Petersen-Jones S. M., Bartoe J. T.* Photoreceptor-targeted gene delivery using intravitreally administered AAV vectors in dogs. *Gene Ther.* 23 : 400. 2016.
- [85] *Dalkara D., Byrne L. C., Klimczak R. R., Visel M., Yin L., Merigan W. H., Flannery J. G., Schaffer D. V.* In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci. Transl. Med.* 5(189): 189ra76. 2013.
- [86] *Hickey D. G., Edwards T. L., Barnard A. R., Singh M. S., de Silva S. R., McClements M. E., Flannery J. G., Hankins M. W., MacLaren R. E.* Tropism of engineered and evolved recombinant AAV serotypes in the rd1 mouse and ex vivo primate retina. *Gene Ther.* 24(12): 787—800. 2017.
- [87] *Palfi A., Chadderton N., McKee A. G., Blanco Fernandez A., Humphries P., Kenna P. F., Farrar G. J.* Efficacy of codelivery of dual AAV2/5 vectors in the murine retina and hippocampus. *Hum. Gene Ther.* 23 : 847—858. 2012.
- [88] *Dong B., Nakai H., Xiao W.* Characterization of genome integrity for oversized recombinant AAV vector. *Mol. Ther.* 18 : 87—92. 2010.
- [89] *Wu Z. J., Yang H. Y., Colosi P.* Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol. Ther.* 18 : 80—86. 2010.
- [90] *Duan D., Yue Y., Engelhardt J. F.* Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: A quantitative comparison. *Mol. Ther.* 4 : 383—391. 2001.
- [91] *Chamberlain K., Riyad J. M., Weber T.* Expressing transgenes that exceed the packaging capacity of adeno-associated virus capsids. *Hum. Gene Ther. Methods.* 27 : 1—12. 2016.
- [92] *Colella P., Trapani I., Cesi G., Sommella A., Manfredi A., Puppo A., Iodice C., Rossi S., Simonelli F., Giunti M., Bacci M. L., Auricchio A.* Efficient gene delivery to the cone-enriched pig retina by dual AAV vectors. *Gene Ther.* 2 : 450—456. 2014.
- [93] *Dyka F. M., Boye S. L., Chiodo V. A., Hauswirth W. W., Boye S. E.* Dual adeno-associated virus vectors result in efficient in vitro and in vivo expression of an oversized gene, MYO7A. *Hum. Gene Ther. Methods.* 25 : 166—177. 2014.
- [94] *Trapani I., Colella P., Sommella A., Iodice C., Cesi G., de Simone S., Marrocco E., Rossi S., Giunti M., Palfi A., Farrar G. J., Polishchuk R., Auricchio A.* Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. *EMBO Mol. Med.* 6 : 194—211. 2014.
- [95] *Trapani I., Toriello E., de Simone S., Colella P., Iodice C., Polishchuk E. V., Sommella A., Colecchi L., Rossi S., Simonelli F., Giunti M., Bacci M. L., Polishchuk R. S., Auricchio A.* Improved dual AAV vectors with reduced expression of truncated proteins are safe and effective in the retina of a mouse model of Stargardt disease. *Hum. Mol. Genet.* 24 : 6811—6825. 2015.
- [96] *Chow A. Y., Bittner A. K., Pardue M. T.* The artificial silicon retina in retinitis pigmentosa patients (an American Ophthalmological Association thesis). *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 108 : 120—154. 2010.
- [97] *Yue L., Weiland J. D., Roska B., Humayun M. S.* Retinal stimulation strategies to restore vision: Fundamentals and systems. *Prog. Retin. Eye Res.* 53 : 21—47. 2016.

Поступила в редакцию 16.11.2018  
 После доработки 19.11.2018  
 Принята к публикации 05.12.2018