

ПЕРСПЕКТИВЫ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОТЕЗИРОВАНИЯ ДЕГЕНЕРАТИВНОЙ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА

Обзор

© 2019 М.А. Островский^{1,2*}, М.П. Кирпичников^{3,4}

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия; электронная почта: ostrovsky3535@mail.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра молекулярной физиологии, 199991 Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия; электронная почта: kirpichnikov@inbox.ru

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоинженерии, 199991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.09.2018

После доработки 22.12.2018

Принята к публикации 24.12.2018

Обзор посвящен перспективам протезирования дегенеративной (слепой) сетчатки глаза и использованию родопсинов как «инструментов» такого протезирования. Коротко излагается принцип оптогенетических методов. Рассмотрены ретинальсодержащие белки, деполяризующие и гиперполяризующие плазматическую мембрану нервной клетки, и, соответственно, возбуждающие и тормозящие ее физиологическую активность. Подробно обсужден вопрос о том, какие именно клетки дегенеративной сетчатки и какими родопсинами могут быть протезированы. Рассмотрены вирусы и промоторы, необходимые и подходящие для доставки гена родопсина в определенные клетки дегенеративной сетчатки. В заключении сформулированы основные положения и задачи, связанные с оптогенетическим протезированием дегенеративной сетчатки с помощью родопсинов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оптогенетика, ретинальсодержащие белки, каналы родопсины, меланопсин, зрительный родопсин, дегенеративная сетчатка, ганглиозные клетки.

DOI: 10.1134/S0320972519050038

ОПТОГЕНЕТИКА И РОДОПСИНЫ КАК ЕЕ ОСНОВНЫЕ «ИНСТРУМЕНТЫ»

Оптогенетика или точнее оптогенетические методы — новое, междисциплинарное, бурно развивающееся направление в биологии, объединяющее физиологию, генную инженерию и оптику. Речь идет о методике, позволяющей светом регулировать физиологическую активность клетки. Регуляция осуществляется с помощью активируемого светом белка, который и является «инструментом» оптогенетики. Ген такого белка доставляется в клетки определенного типа, например, мозга или сетчатки глаза. В этих клетках экспрессированный белок (речь идет о мембранном белке) встраивается в плазматичес-

кую мембрану. В зависимости от того, катионы или анионы этот белок переносит через мембрану при действии света, мембрана деполяризуется или гиперполяризуется. Деполяризация мембраны приводит к физиологическому возбуждению клетки, ее гиперполяризация — к торможению. Если классическими инструментами физиологии для возбуждения или торможения клетки были и остаются электрический ток или химическое вещество (фармакология), то оптогенетика предложила свет в качестве такого прецизионного инструмента. Следует подчеркнуть, что возбуждаются или тормозятся только клетки, содержащие светочувствительный белок. Соседние клетки, не содержащие такого белка, отвечать на свет не будут. При воздействии же электрического тока или химического вещества возбуждается или тормозится большая популя-

* Адресат для корреспонденции.

ции клеток мозга, сетчатки или иного органа. С этой точки зрения традиционные нейрофизиологические исследования сетчатки глаза можно рассматривать как своего рода оптогенетические. Действительно, только фоторецепторные клетки сетчатки — палочки и колбочки — содержат светочувствительный окрашенный белок — зрительный пигмент родопсин. Свет, поглощенный молекулой родопсина, естественно действует только на эти клетки, инициируя возникновение в них фоторецепторного сигнала. Сигнал от фоторецепторных клеток передается через синапсы следующим нервным клеткам; затем он сложнейшим образом обрабатывается и поступает в мозг. Иными словами, соседние нервные клетки сетчатки на свет не реагируют. Оптогенетика же создает искусственную ситуацию, когда в несветочувствительную нервную клетку сетчатки «встраивают» светочувствительный белок, и тогда она приобретает способность отвечать на свет возбуждением или торможением, становится как бы «фоторецепторной». В этом и состоит принцип оптогенетического метода регуляции физиологической активности клетки. С помощью этого метода получены принципиально новые данные о нейронных сетях, механизмах обучения, памяти, двигательной активности, работе сердца и ряда других функций [1]. У исследователей появилась возможность управлять работой клетки с исключительной пространственной точностью и высоким временным разрешением.

Что касается медицинских приложений, то несомненные успехи использования оптогенетики в фундаментальных исследованиях пока не привели к клинической практике, хотя приложения напрашиваются для целого ряда неврологических и психических заболеваний. К ним можно отнести болезнь Паркинсона, эпилепсию, наркотическую зависимость, болевые синдромы, даже шизофрению, однако ни в одном случае дело не дошло до клинических испытаний. Одна из причин состоит в сложности неинвазивной доставки светового пучка к нейронам мозга. Сетчатка является, пожалуй, единственным примером нервной ткани, к которой оптическая система глаза естественным образом доставляет свет. Поэтому, согласно всеобщему признанию, офтальмология — единственное реальное и наиболее близкое приложение оптогенетических методов в медицине. Конкретно, речь идет об оптогенетическом протезировании дегенеративной сетчатки на поздних стадиях ее дегенерации.

Ретиналь-содержащие белки как «инструменты» оптогенетики. В отличие от генной терапии, задачей которой являются замещение или исправ-

ление поврежденного гена, задача оптогенетики — доставка в клетку гена светочувствительного белка, который становится «инструментом» управления ею. История возникновения этих «инструментов» и, таким образом, самой оптогенетики весьма поучительна с точки зрения изначальной непредсказуемости практического применения результатов сугубо фундаментальных исследований.

В 1876 г. Франц Кристиан Болль описал светочувствительное «зрительное вещество» в сетчатке глаза лягушки, названное затем «зрительным пурпуром», а позже — «родопсином». Почти веком позже (1971) Уолтер Стоккениус и Дитер Остерхельд открыли бактериальный родопсин в археобактериях [2]. Несколько лет спустя (1978) О.А. Синещев в лаборатории Ф.Ф. Литвина обнаружил, что светозависимую деполяризацию мембраны одноклеточной зеленой водоросли вызывает родопсин, который таким образом управляет ее фототаксисом [3, 4]. Прошло еще несколько лет (2003), и П. Хегеманн и Г. Нагель экспрессировали ген родопсина этой одноклеточной водоросли и показали, что он работает как активируемый светом катионный канал [5], и назвали его «канальный родопсин-2» («Channelrhodopsin-2»). Вскоре (2005) Е. Бойден и К. Диссерот сделали следующий решающий шаг: они экспрессировали ген канального родопсина в нервной клетке мозга млекопитающего и показали, что в ответ на вспышку синего света в нейроне возникает потенциал действия — импульсная активность [6]. Все эти работы привели, в конечном счете, к возникновению нового направления, новой методики — оптогенетики.

Актуальнейшей задачей стал поиск эффективных светочувствительных «инструментов» для решения конкретных физиологических задач. В настоящее время основными «инструментами» оптогенетики являются светочувствительные мембранные ретинальсодержащие белки — родопсины [7–12].

Родопсины животного происхождения (G-белок-связывающие рецепторы), активные попытки применения которых предпринимаются (см. ниже), и микробные родопсины, которые сейчас широко применяются в оптогенетике, — это разные белки с разными функциями [13]. Но все родопсины являются мембранными белками, топография которых в мембране в виде семи трансмембранных α -спиральных «тяжей» принципиально одинакова, хромофор которых — ретиналь — также одинаков, но только в разных родопсинах находится в различных изомерных конфигурациях. Одна и та же фотохимическая реакция, фотоизомеризация ретиналя, «запускает» конформационные перестройки белковой

(опсиновой) части этих молекул, активируя тем самым их функцию — инициацию ферментативного каскада усиления в механизме фототрансдукции в случае фоторецепции (зрения), пассивный или активный перенос ионов в случае фототаксиса одноклеточных водорослей и бактерий или прокариотического фотосинтеза.

Следует отметить, что, помимо оптогенетики, активно развивается и оптофармакология. Если в случае оптогенетики речь идет об экспрессии в клетке экзогенного микробияльного или животного родопсина с эндогенным хромофором — фотоизомеризующимся ретиналем, то в случае оптофармакологии к эндогенному, естественному ионному каналу или рецептору «пришивается» экзогенный хромофор-фотопереклюатель. При действии света он тоже фотоизомеризуется, что приводит к изменению конформационного состояния канала или рецептора. И оптогенетический, и оптофармакологический подходы используются в экспериментальных исследованиях по протезированию дегенеративной сетчатки.

Возбуждающие и тормозящие каналные родопсины. Для оптогенетики, как метода управления физиологической активностью клетки, в первую очередь нервной клетки, принципиально важно иметь в руках два типа «инструментов», один из которых деполяризует ее плазматическую мембрану, т.е. возбуждает клетку, и второй, который ее гиперполяризует, в результате чего импульсная активность клетки уменьшается или полностью подавляется.

Деполяризующие родопсины. Какие на сегодняшний день существуют и используются деполяризующие «инструменты»? Основной «инструмент» — это катионный каналный родопсин, а именно каналный родопсин-2 (channelrhodopsin-2, ChR2) из зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Будучи экспрессирован в нервной клетке, каналный родопсин-2 при действии синего света (470 нм) достаточно быстро (в пределах 50 мс) деполяризует ее [1, 14]. К существенным недостаткам каналного родопсина-2 относятся его неселективность и относительно низкая светочувствительность, которые создают большие трудности для протезирования сетчатки. Тем не менее этот белок был первым оптогенетическим «инструментом», экспрессированным в нейронах дегенеративной сетчатки слепой мыши (трансгенной мыши с пигментным ретинитом) и восстановившим ее ответы на свет [15].

Благодаря достижениям современной биоинженерии семейство каналных родопсинов расширяется, и их характеристики улучшаются: повышается их чувствительность и улучшается кинетика открывания и закрывания канала;

конструируются каналы со спектрами поглощения в широком спектральном диапазоне. В будущем это могло бы привести к протезированию цветового зрения. Так, например, была получена конструкция, спектр поглощения которой был существенно расширен. Она состояла из химеры каналного родопсина-1 хламидомонады *Chlamydomonas* и каналного родопсина-1 *Volvox*, поглощающего в области 526–545 нм, и каналного родопсина-2 хламидомонады, поглощающего в области 461–492 нм [16]. Вскоре был создан активируемый красным светом вариант каналного родопсина (red-activatable ChR (ReaChR), который возбуждается оранжево-красным светом ($\lambda \sim 590$ –630 нм). Причем, этот родопсин намного лучше встраивался в плазматическую мембрану нервной клетки и генерировал существенно большие фототоки с намного более быстрой кинетикой [17].

Работы такого рода продолжают появляться. В одной из них ReaChR был экспрессирован в слепой сетчатке мыши, обезьяны (макаки) и человека и восстановил их ответы на свет [18]. Совсем недавно удалось сконструировать новый, сверхбыстрый, активируемый красным светом вариант родопсина Chrimson [19]. С помощью этого варианта Chrimson оказалось возможным стимулировать нейроны коры мозга и слуховой нерв с частотой в несколько сотен Гц. Такой родопсин, как показали авторы, способен восстанавливать слух глухой мыши, и он, несомненно, перспективен для оптогенетического протезирования слепой сетчатки. В другой работе был получен модифицированный каналный родопсин-1 из *Volvox* (mVChR1) с очень широким спектром поглощения (450–600 нм), который был успешно экспрессирован в сетчатке слепой крысы [20]. Таким образом, семейство каналных родопсинов продолжает расширяться, и их характеристики существенно улучшаются [11].

Итак, катион-переносящий каналный родопсин-2 и его биоинженерные модификации остаются в большинстве оптогенетических исследований, в т.ч. и по протезированию дегенеративной сетчатки, наиболее приемлемым «инструментом» деполяризации клетки, т.е. ее физиологического возбуждения.

Гиперполяризующие родопсины. Гораздо сложнее обстоит дело с гиперполяризующими «инструментами», призванными обеспечить эффективное торможение физиологической активности нервной клетки. До последнего времени были известны следующие «инструменты», которые использовались в оптогенетических работах. Во-первых, самый распространенный из них и широко применяемый до настоящего времени —

это галородопсин. Он представляет собой хлор-переносящий насос, поглощающий в желтой области спектра. Поскольку это насос, то он переносит всего один ион хлора на один поглощенный квант света. Это означает, что требуется слишком много света, чтобы достичь приемлемой гиперполяризации. Если при исследовании мозга эта особенность не является важным лимитирующим фактором, то для сетчатки использование галородопсина создает реальную опасность фотоповреждения. Во-вторых, это светоактивируемые протонные насосы, классическим примером которых может служить бактериородопсин, который был использован и для протезирования сетчатки [21]. Однако протонные насосы большого распространения в оптогенетике не получили, в основном потому, что, подобно галородопсину, обладают малой эффективностью. Наконец, в-третьих, с помощью биоинженерии на основе природных катионных канальных родопсинов были сконструированы искусственные анионные [22]. Примером таких сконструированных анион (хлор)-переносящих каналов может служить *slow ChloC*, полученный группой Хегеманна на основе канального родопсина-2 [23] и использованный авторами и нашей группой для высокоэффективного подавления импульсной активности нейронов [24]. В работах такого рода в результате биоинженерной трансформации катионного канального родопсина-2 был получен светоактивируемый анионный канал, т.н. *slow ChloC*, способный с высокой эффективностью подавлять импульсную активность нейронов.

Проводящие анионы канальные родопсины были получены не только искусственно из катионных канальных родопсинов, но и обнаружены в природе. Речь идет о сравнительно недавно открытом новом классе естественных, анион-переносящих канальных родопсинов (ACR) из криптофитовых одноклеточных водорослей *Guillardia theta* [25–27]. Эти каналы являются наиболее эффективными оптогенетическими ингибиторами из всех известных на сегодняшний день.

Сравнивая характеристики модифицированного катионного канального родопсина и естественного анион-переносящего канального родопсина, мы показали, что светоактивируемый канал последнего обладает выраженными преимуществами как по кинетике инактивации, так и по интенсивности торможения импульсной активности нервной клетки [28]. Это преимущество связано с отсутствием у естественного анион-переносящего канального родопсина остаточной протонной проводимости, характерной для искусственного анионного канала. Более того, как мы недавно показали [29], естественный анион-

переносящий канальный родопсин способен, помимо светоиндуцированного торможения импульсной активности нервной клетки, генерировать при определенных условиях также ее импульсную активность, преимущественно в аксональных окончаниях. Длительная световая стимуляция приводит к торможению импульсации, в то время как короткая световая стимуляция, напротив, вызывает генерацию импульсной активности. Это означает, что естественный анион-переносящий канальный родопсин может быть использован в том же самом эксперименте в зависимости от условий световой стимуляции и как эффективный ингибитор физиологической активности клетки, и как ее активатор [29]. Подобный результат был получен недавно в работе Messier et al. [30], в которой модифицированный природный хлорный канал (*GtACR2*) гиперполяризовал сому кортикального нейрона мышцы, но деполяризовал его пресинаптические окончания.

Таким образом, можно заключить, что в арсенале оптогенетики появился новый, эффективный, обладающий высокой световой чувствительностью и быстрой кинетикой «инструмент» торможения физиологической активности клетки. Анионные канальные родопсины, как новое семейство регулируемых светом канальных родопсинов, позволяют при существенно меньших, чем в случае галородопсина, интенсивностях света гиперполяризовать клеточную мембрану и вызывать торможение, в случае ганглиозной клетки – торможение ее импульсной активности. Для протезирования дегенеративной сетчатки это имеет принципиальное значение, поскольку открывает реальные возможности для формирования ON-OFF- и OFF-ON-рецептивного поля ее ганглиозных клеток.

ДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА – ОСТРАЯ СОЦИАЛЬНАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ПРОБЛЕМА

Согласно одному из последних и подробных эпидемиологических исследований [31], по состоянию на 2015 г., полной слепотой было поражено 36 млн человек, умеренная или сильная потеря зрения была у 217 млн и 188 млн имели незначительную потерю зрения. За последние 25 лет число слепых людей выросло на 17,6%, с 30,6 млн в 1990 г. до 36,0 млн в 2015 г., и по предсказанию авторов исследования, цифра эта в ближайшие десятилетия будет существенно расти.

Одной из причин полной, сильной или частичной потери зрения являются наследствен-

ные дегенеративные заболевания сетчатки, проявляющиеся в различных формах. Конечным результатом развития всех этих форм может стать слепота, вызванная дегенерацией (гибелью) зрительных клеток [32]. Наследственные дегенеративные заболевания сетчатки генетически весьма гетерогенны: в настоящее время идентифицировано >260 генов, ответственных за их возникновение и развитие [33]. Наиболее распространенная и социально-значимая форма — это возрастная макулярная дегенерация. Хотя в общем случае возрастная макулярная дегенерация не является генетическим заболеванием, тем не менее, у пожилых людей она служит основной причиной частичной или полной потери зрения. Поскольку старение человечества — очевидный демографический факт, эта проблема приобретает все большую остроту. Основные усилия современной офтальмологии направлены на замедление развития дегенеративных заболеваний сетчатки. Достаточно эффективных способов их профилактики не существует. Что касается лечения, то впечатляющего успеха достигла в последнее время генная терапия одной из форм заболевания, вызванного мутацией гена *RPE65*. Этот ген ответственен за синтез белка (ретинолизомеразы), критического для регенерации зрительного пигмента родопсина в ходе темновой адаптации. Генная терапия этого заболевания была недавно одобрена в США (US Food and Drug Administration, FDA) и стала первым разрешением клинического применения генной терапии вообще [33].

Каковы основные стратегии возвращения зрения слепой сетчатке? Во-первых, речь может идти о замене утраченных зрительных клеток новыми. Работы в этом направлении активнейшим образом ведутся во многих лабораториях мира. Следует, однако, иметь в виду, что при использовании для этого стволовых клеток, дифференцирующихся затем в фоторецепторные, существует риск канцерогенеза [34]. Во-вторых, речь может идти о протезировании «слепой» сетчатки, а именно об электронном и биологическом, оптогенетическом протезировании. Сетчатка «слепая» потому, что в результате дегенеративного заболевания погибают ее светочувствительные зрительные клетки — палочки и колбочки. Однако важно при этом подчеркнуть, что нервные клетки сетчатки, как правило, остаются неповрежденными. Это означает, что если бы тем или иным способом их удалось возбудить, то они послали бы в мозг по своим отросткам (аксонам или нервным волокнам) нервные импульсы, в последовательности которых закодирована зрительная информация. В таком случае зрительное восприятие в определенной

степени могло бы восстановиться. Такова общая идея протезирования слепой сетчатки.

В случае электронного протезирования множество электродов возбуждают множество нервных клеток. Однако одним из недостатков электронного протезирования является то, что имплантация фотосенсоров в сетчатку сопровождается весьма непростой хирургической манипуляцией. В случае оптогенетического протезирования в сохранившиеся нервные клетки дегенеративной сетчатки доставляются гены, экспрессирующие светочувствительные белки. Под действием видимого света на эти белки в клетках возникают нервные импульсы. В этом состоит принцип оптогенетического протезирования: нервные клетки становятся «псевдо-фоторецепторными» клетками.

Несмотря на успехи электронного протезирования, приходит понимание того, что оптогенетическое протезирование является более перспективным и надежным подходом [33, 34]. Сравнительно недавно оно получило признание офтальмологического сообщества как составная часть общей стратегии генной терапии дегенеративных заболеваний сетчатки глаза [35]. Первые шаги на пути к клинике уже сделаны. В США и во Франции разрешены и начаты клинические испытания оптогенетического протезирования при одной из наиболее тяжелых форм дегенеративного заболевания — пигментном ретините, а именно на поздней его стадии, когда зрительные клетки погибли. Во французских испытаниях в дополнение к протезированию нервных клеток предусматривается также использование специальных очков. Дело в том, что микробиальные родопсины способны обеспечить работу протезированной ими нервной клетки в диапазоне всего лишь примерно двух логарифмических единиц, что намного меньше, чем восемь логарифмических единиц, в которых нормально функционирует дневное зрение — фотопическая система человека. В настоящее время никакая биологическая система не способна достичь такого динамического диапазона. Выходом из положения может быть применение специально сконструированных усиливающих систем, оформленных в виде очков, которые позволили бы расширить динамический диапазон «оптогенетического зрения» [36].

КАКИЕ КЛЕТКИ ДЕГЕНЕРАТИВНОЙ СЕТЧАТКИ И КАКИМИ РОДОПСИНАМИ МОГУТ БЫТЬ ПРОТЕЗИРОВАНЫ?

При выборе стратегии оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки важно учитывать физиологические особенности ее

клеточных элементов. Особенно существенно принимать во внимание те патологические нарушения, которые в этих клетках происходят при той или иной форме или различных стадиях заболевания. Важно понимать при этом, что в определенных клеточных элементах сетчатки нарушения могут и не происходить. В первую очередь к ним относятся ее ганглиозные клетки (см. ниже). Следует также отдавать себе отчет в том, что успешное оптогенетическое протезирование, выполненное на экспериментальных моделях, еще не означает, что оно в неизменном виде может быть перенесено в офтальмологическую клинику.

Рассмотрим физиологические особенности клеточных элементов сетчатки и те изменения, которые в них происходят на различных стадиях дегенеративного процесса. Например, для пигментного ретинита и возрастной макулярной дегенерации можно выделить такие стадии: сначала нарушения, затем дегенерация фоторецепторных клеток, наконец, нарушения в нейральной части сетчатки, в ее нервных слоях [37–39]. При этом, что особенно важно при разработке стратегии оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки, «выходные» нейроны сетчатки — ганглиозные клетки остаются, как правило, неповрежденными [40, 41].

Фоторецепторные клетки. В ответ на поглощение света они гиперполяризуются. Возникающий в их наружном сегменте медленный гиперполяризационный потенциал распространяется до внутреннего сегмента и, наконец, до пресинаптического окончания. Быстрый нервный импульс в фоторецепторных клетках не возникает.

При пигментном ретините, дегенеративном заболевании, на модели которого проводятся основные оптогенетические исследования, прежде всего, гибнут фоторецепторные клетки, причем палочки погибают раньше колбочек [42]. Анатомические исследования дегенеративных сетчаток у мышей [43, 44] и прижизненные исследования сетчаток пациентов с пигментным ретинитом с помощью оптической когерентной томографии [45] показали, что на поздних стадиях дегенеративного процесса тела колбочек остаются неповрежденными. Иными словами, жизнеспособность остатков колбочек может сохраняться достаточно долго, хотя, в конечном счете, они гибнут тоже. При некоторых других формах дегенерации ситуация может быть обратной: колбочки повреждаются раньше палочек. Практически одновременно с потерей фоторецепторных клеток происходит миграция и потеря клеток ретинального пигментного эпителия.

Исходя из того, что при некоторых формах дегенеративных заболеваний колбочки остаются на довольно длительное время жизнеспособными, одна из стратегий оптогенетического протезирования состоит в протезировании «остатков» колбочек. При этом «имплантировать» в плазматическую мембрану колбочек следует «медленные» светочувствительные гиперполяризующие ионные каналы или насосы, поскольку, как уже было сказано, в колбочках генерируется медленный гиперполяризационный потенциал.

В качестве такого гиперполяризующего насоса был успешно использован бактериальный хлорпереносающий галородопсин [46]. Недавно появилась работа, в которой с помощью нового, специфичного для колбочек промотора удалось успешно протезировать фовеальные колбочки сетчаток обезьяны и человека, т.е. колбочки, расположенные в так называемой центральной ямке сетчатки — области, обладающей высоким качеством цветовосприятия и максимальной остротой зрения [47].

Протезирование «остатков» колбочек сохраняет все последующие этапы обработки информации в сетчатке, включая латеральное торможение и дирекциональную селективность. При таком протезировании восстанавливаются электроретинограмма и вызванный потенциал зрительной коры мозга, а также регистрируется поведение, свидетельствующее о восстановлении зрительных функций. Однако следует иметь в виду, что световая чувствительность галородопсина как хлорного насоса, гиперполяризующего мембрану «остатка» колбочки, крайне низка, а потому опасность фотоповреждения сетчатки становится совершенно реальной. Поэтому было бы гораздо эффективнее использовать в качестве гиперполяризующего «инструмента» протезирования «остатков» колбочек естественные анионные (хлорные) каналы криптофитовых водорослей, вероятно, после их определенной биоинженерной модификации.

Протезирование колбочек восстановило бы физиологическую активность самого первого, фоторецепторного звена в нервной сети сетчатки. Следствием этого стало бы восстановление механизма естественной обработки зрительной информации всеми нижележащими нервными слоями сетчатки, т.е. всей ее нервной сетью. В таком случае качество восстановленного зрительного восприятия могло бы быть наилучшим. К сожалению, столь заманчивая стратегия протезирования колбочек представляется не слишком реальной, поскольку неизвестно, как долго сохраняется в дегенеративной сетчатке жизнеспособность колбочек и их синаптические связи со следующими биполярными и ганглиозными нервными клетками.

Биполярные и горизонтальные клетки. За фоторецепторными клетками следуют синаптически связанные с ними нейроны второго порядка — биполярные и горизонтальные клетки. Биполярные клетки, в свою очередь, распадаются на два основных физиологических типа — ON- и OFF-биполяры. ON-биполяры в ответ на свет деполяризуются, OFF-биполяры — гиперполяризуются. В биполярных клетках, как и в фоторецепторах, генерируется только медленная электрическая активность. Нервные импульсы в них также не возникают. Эти особенности электрических ответов биполярных клеток следует иметь в виду при планировании их оптогенетического протезирования.

Самые ранние признаки повреждения в нейральных слоях сетчатки наблюдаются в тех биполярных клетках, которые синаптически связаны с палочками, но не с колбочками [48]. Среди целого ряда молекулярных и цитологических нарушений биполярных клеток, происходящих в ходе дегенерации сетчатки, следует указать на возможность изменения их полярности, т.е. на превращение ON-биполяров в OFF-биполяры [49], что создает дополнительные трудности. Важное методическое ограничение при протезировании биполярных клеток состоит в том, что специфический промотор найден пока что только для ON-, но не для OFF-биполяров [50].

Вместе с тем ON-биполяры были успешно протезированы в последние годы у разных экспериментальных животных и с помощью различных оптогенетических «инструментов». В первой работе по протезированию биполярных клеток у трансгенной мыши с пигментным ретином был использован катионный каналный родопсин-2, ON-биполярный промотор и электропорация для доставки гена [51]. Результатом протезирования было восстановление вызванного потенциала коры мозга и зрительного поведения. Естественно, электропорация мало пригодна для клинического применения, и практически во всех последующих работах используется вирусная доставка гена, а именно аденоассоциированный вектор, причем разных серотипов вируса для различных экспериментальных животных.

Важно отметить, что были предприняты большие усилия по улучшению аденоассоциированных векторов. Так, был создан вектор с улучшенным тропизмом к клеткам сетчатки [52]. Были, например, созданы векторы, эффективно доставлявшие катионный каналный родопсин-2 к ON-биполярным клеткам слепой трансгенной мыши [53, 54]. Важно подчеркнуть, что протезирование ON-биполярных клеток с помощью каналного родопсина-2 восстанавлива-

ло оба компонента зрительного ответа — ON- и OFF-компоненты, т.е. ON/OFF-путь в сетчатке и зрительной коре.

Следует отметить, что у млекопитающих сетчатка содержит несколько ON- и OFF-типов колбочковых биполярных клеток и только один ON-тип палочковых биполярных клеток. Но поскольку сигнал от палочковых биполярных клеток через амакриновые клетки попадает в колбочковые ON- и OFF-пути, то активация при оптогенетическом протезировании только ON-биполярных клеток восстанавливает ответы в обоих путях (ON- и OFF-путях) обработки информации. Это означает, что благодаря пластичности обработки информации и в сетчатке, и в центральных отделах зрительной системы протезирование только ON-биполярных клеток оказывается вполне достаточным для восстановления важнейших функций зрительной системы. В случаях оптогенетического протезирования ON-биполярных клеток как с помощью каналного родопсина-2 [54], так и с помощью меланопсина [55, 56] и зрительного родопсина [57–60], т.е. естественных G-белок-связывающих рецепторов, восстанавливались электрические ответы сетчатки и зрительной коры, а также зрительное поведение протезированных мышей. Речь идет о трансгенных мышях *rd1* как принятой модели пигментного ретинита. Сведений о работах по оптогенетическому протезированию ON-биполярных клеток у низших приматов (макак) пока не имеется.

Что касается естественных G-белок-связывающих рецепторов как «инструментов» оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки, то им, скорее всего, принадлежит будущее. Действительно, несомненным достоинством животных родопсинов (родопсинов 2-го типа) по сравнению с микробными родопсинами (родопсинами 1-го типа) является, во-первых, их принадлежность к классу G-белок-связывающих рецепторов, способных, по крайней мере, на два порядка повысить световую чувствительность протезированной ими клетки, и, во-вторых, конечно, низкая иммуногенность. Однако одной из трудностей их возможного использования как оптогенетического «инструмента» является проблема «обесцвечения/регенерации». Поскольку в результате фотолиза полностью-*транс*-ретиналь высвобождается из хромофорного центра белковой (опсиновой) части молекулы, то в нормальной сетчатке функционирует сложная система регенерации родопсина (так называемый «зрительный цикл»), которая обеспечивает синтез и доставку нового 11-*цис*-ретиналя к хромофорному центру опсина и зависит от реакций, происходящих в клетках ре-

ринального пигментного эпителия. Правда, для регенерации зрительного пигмента в колбочках имеется добавочный путь регенерации, в котором задействованы глиальные мюллеровские клетки [61]. Повторим, животному зрительному родопсину, скорее всего, принадлежит оптогенетическое будущее. Что же касается микробального родопсина, то клинические испытания канального родопсина-2 уже разрешены и ведутся [62].

Низкая световая чувствительность и узкий динамический диапазон ответа при использовании даже улучшенных с помощью современных методов биоинженерии катионных и анионных канальных родопсинов одноклеточных водорослей остаются, тем не менее, проблемой для их клинического применения. Экспрессия же в клетке, биполярной и/или ганглиозной, светочувствительного G-белок-связывающего рецептора, такого как меланопсин или родопсин позвоночных, позволяет повысить чувствительность и расширить динамический диапазон на два-три порядка, благодаря ферментативному механизму усиления.

Экспрессия G-белок-связывающего рецептора была осуществлена в нейронах сетчатки, и успешные результаты такой экспрессии были получены как *in vitro* на ретинальных эксплантах, так и *in vivo* при регистрации электрических ответов (вызванных потенциалов) зрительной коры, а также, что особенно важно, при исследовании поведения оптогенетически протезированных трансгенных мышей [60]. Так, например, ген меланопсина человека был успешно экспрессирован в биполярных, а также в горизонтальных и мюллеровских (но не в ганглиозных) клетках трансгенной слепой мыши, что привело к длительному восстановлению не только электрических ответов сетчатки и зрительной коры, но и к восстановлению зрачкового рефлекса, зрительного поведения (избегания света) и даже к возможности различения простейшего изображения [56]. К недостаткам меланопсина следует отнести его медленную реакцию на свет. Что касается зрительного родопсина, то в двух практически одновременно появившихся работах было четко показано, что у протезированных мышей восстанавливаются зрительные функции при физиологических освещенностях [57, 59]. При этом реакция на свет на всех уровнях зрительной системы была в случае зрительного родопсина существенно быстрее, чем при протезировании меланопсином.

Таким образом, протезирование биполярных клеток вполне реально и более надежно, чем протезирование «остатков» колбочек. В случае успеха можно было бы сохранить в сетчатке зна-

чительный объем естественной обработки зрительной информации и достичь вполне приемлемого восстановления зрительных функций. Тем не менее, несмотря на всю привлекательность и реальность протезирования биполярных клеток, они все же не столь надежны для оптогенетического протезирования по сравнению со следующими за ними ганглиозными клетками сетчатки.

Ганглиозные клетки. За синаптически связанными с фоторецепторами биполярными и горизонтальными клетками следуют синаптически связанные с ними нейроны третьего порядка — амакриновые и ганглиозные клетки. Синаптический слой (внутренний синаптический слой) между нейронами второго и третьего порядков очень широкий. Весьма разнородные и многочисленные группы амакриновых клеток осуществляют сложнейшую обработку зрительной информации по горизонтали. Их роль в обработке зрительной информации чрезвычайно велика. Ганглиозные клетки являются «выходными нейронами», генерирующими импульсную активность. Они получают зрительную информацию, сложнейшим образом обработанную на всех предыдущих уровнях сетчатки. В виде нервных импульсов эта информация поступает по аксонам ганглиозных клеток в мозг. При планировании «имплантации» в плазматическую мембрану этих клеток светочувствительных ионных каналов речь должна идти о так называемых «быстрых» ионных каналах.

В организме млекопитающих содержится около миллиона ганглиозных клеток и, соответственно, аксонов, образующих зрительный нерв (у человека — ~1,2 млн). Некоторая часть ганглиозных клеток сама обладает светочувствительностью, поскольку включает светочувствительный ретиналь-содержащий пигмент меланопсин. Эти клетки посылают свои аксоны в незрительные (гипоталамические) области мозга. Они отвечают за синхронизацию циркадного ритма, регулирование размера зрачка и выделение мелатонина из эпифиза. О попытках использовать меланопсин для оптогенетического протезирования биполярных клеток — см. выше.

Следует еще раз подчеркнуть, что ганглиозная клетка сетчатки — это классическая нервная клетка, в которой возникает потенциал действия, т.е. импульсная активность. Именно эти клетки, как представляется на сегодняшний день, являются основными кандидатами на протезирование дегенеративной сетчатки. Для оптогенетического протезирования принципиально важно, что ганглиозные клетки наиболее устойчивы при развитии дегенеративного процесса. Они остаются неповрежденными даже на поздних

стадиях заболевания (см. выше). Более того, они сохраняют не только свои нормальные физиологические свойства, но и свое местоположение в сетчатке по отношению к внутренней пограничной мембране [41].

Следует отметить, что ганглиозные клетки расположены в сетчатке глаза здорового человека отлично от расположения фоторецепторов в фовеа (центральной ямке). Они смещены от нее, и их максимальная плотность наблюдается в венчике вокруг фовеа. Такое несоответствие должно быть принято во внимание при формировании изображения на слое протезированных ганглиозных клеток. Даже при идеальной модификации всех ганглиозных клеток произойдет рассогласование оптического изображения на сетчатке и его описания в мозгу, которое в норме центрировано относительно фовеа. Поэтому исключительно важными становятся работы по созданию систем кодирования изображения (светового сигнала) с тем, чтобы протезированные ганглиозные клетки получали информацию в «привычном» для них виде [63]. Возможны два пути создания достаточно яркого и управляемого изображения на сетчатке. Первый – это построение голографической картинке [64], и второй путь – построение изображения в виде матрицы светящихся точек [65]. Начинать работы, по всей видимости, следует со второго пути, как более доступного и осуществимого.

Таким образом, протезирование ганглиозных клеток представляется наиболее приемлемой стратегией на поздних стадиях дегенерации сетчатки. К настоящему времени накопилось довольно большое число работ, в которых у разных животных и с помощью разных оптогенетических «инструментов» были успешно протезированы именно ганглиозные клетки [66–71]. Среди них следует обратить внимание на работу, в которой модифицированный канальный родопсин-2, поглощающий свет в красной области спектра, был экспрессирован в ганглиозных клетках сетчатки не только мыши, но и макаки, а также кадаверной сетчатке человека [18]. Особого внимания заслуживают работы, в которых была предпринята попытка протезирования ON-OFF- и OFF-ON-рецептивных полей ганглиозных клеток [67, 71]. Недавно было осуществлено оптогенетическое протезирование ганглиозных клеток сетчатки обезьяны (макаки) при низких, т.е. безопасных для сетчатки интенсивностях света, а также с применением адено-ассоциированного вируса (AAV2). В одном случае это было сделано с помощью катионного канального родопсина (CatCh), который представляет собой L132C-мутант ChR2 *Chlamydomonas reinhardtii*, и нового промотора [72], в другом

случае – с помощью иным образом модифицированного канального родопсина (L132C/T159C), обладающего на два порядка большей чувствительностью к свету [73].

Несомненно, значительным недостатком протезирования ганглиозных клеток является потеря обработки информации в вышележащих слоях сетчатки. Однако прямая электрическая стимуляция ганглиозных клеток слепой сетчатки эпиретинальными имплантатами показывает, что пациенты способны при этом выполнять целый ряд довольно сложных зрительных задач, например, распознавать объекты (предметы и даже буквы) и, более того, движения объектов [74–78]. Опыт электронного протезирования дегенеративной сетчатки свидетельствует о высочайшей пластичности высших зрительных центров мозга, способных до некоторой степени компенсировать потерю обработки информации в дегенеративной сетчатке. Иными словами, зрительную информацию, закодированную в импульсной активности ганглиозных клеток, мозг способен воспринять. Вместе с тем становится очевидным, что для создания приемлемого зрительного восприятия потребуются разработка специальных устройств, позволяющих формировать более адекватную для мозга зрительную информацию, которую модифицированные ганглиозные клетки будут посылать в зрительные и незрительные области мозга. Под «специальными устройствами» понимается создание таких способов обработки информации, которые позволили бы кодировать яркость и контраст изображения, воссоздавать механизм адаптации к соответствующему уровню освещенности, восстанавливать пространственное зрение и многие другие физиологические свойства зрительной системы. Следует обратить внимание в этой связи на разрешенные в 2017 г. в Европейском Союзе клинические испытания (NCT03326336 Clinicaltrials.gov) комбинации модифицированного канального родопсина («ChrimsonR») и специально созданных для этого очков-интерфейса («Visual Interface Stimulating Glasses») для пациентов с пигментным ретинитом.

Что касается пластичности мозга, то стремительно развивающаяся область электронного и оптогенетического протезирования зрения требует все более глубокого понимания нейро- и психофизиологических механизмов формирования, поддержания и понижения с возрастом корковой пластичности мозга человека. Необходимо понимание, в какой период жизни человека и до какой степени зрительный центр и мозг в целом в состоянии адаптироваться к потере информации, поступающей от протезированной сетчатки. Более того, следует понять, ка-

кую роль в восстановлении приемлемых зрительных функций могут играть обучение и фармакологические воздействия. Как показывает опыт, оба эти фактора — обучение и фармакология — могут существенно повысить пластические способности мозга. Кроме того, создание виртуальной реальности с помощью интеллектуального интерфейса, судя по всему, станет необходимым условием для успешного протезирования зрения. Как отмечается в прекрасном обзоре на эту тему, совершенно очевидна взаимная польза от усилий в области протезирования зрения и успехов в области фундаментальных исследований физиологии мозга и психологии [79]. По мнению авторов обзора, следующее десятилетие принесет понимание особенностей возрастных изменений пластичности мозга человека. А поскольку протезирование зрения касается, главным образом, людей пожилого и старческого возраста, то практическая значимость такого понимания не вызывает сомнения.

СПОСОБЫ ДОСТАВКИ ГЕНА В ОПТОГЕНЕТИКЕ: ВИРУСЫ И ПРОМОТОРЫ

Исключительно важна в оптогенетике проблема доставки гена светочувствительного белка — канала или насоса — в нужную клетку мозга или сетчатки. Создание векторов и специфических промоторов для селективной доставки генов этих белков в различные типы клеток сетчатки — насущная задача для оптогенетического протезирования. В настоящее время известны следующие способы доставки генов: с помощью вирусов, методом электропорации, с помощью сфокусированного ультразвука и методом лазерной фотопорации. Однако в настоящее время широко применяется для мозга и сетчатки именно вирусный носитель.

Вирусы. Требования к вирусному носителю, особенно имея в виду будущие клинические испытания, следующие: очень низкая мутагенность, очень низкая иммуногенность, нейротропизм, низкий потенциал рекомбинации. Возможны следующие носители — вирусные векторы: аденоассоциированный вирус, аденовирус, лентивирус, вирус простого герпеса. Аденоассоциированный вирус (AVV) является наиболее приемлемым, что обусловлено следующими обстоятельствами:

1) он уже используется как вирусный вектор для генной терапии ряда заболеваний;

2) он способен инфицировать делящиеся и неделящиеся клетки и эффективно встраиваться в геном хозяина;

3) он вызывает слабый иммунный ответ, поскольку не является патогенным для человека;

4) он не способен реплицироваться, для размножения ему требуется вспомогательный вирус, как правило, аденовирус;

5) описано несколько серотипов аденоассоциированного вируса — AAV1—AAV9; они отличаются тем, что связываются с разными клеточными рецепторами (для сетчатки глаза мыши и обезьяны (макаки) используют вирусы разных серотипов);

6) показана безопасность и эффективность векторов на основе аденоассоциированного вируса при генной терапии дегенеративного заболевания сетчатки (врожденный амавроз Лебера), что для оптогенетического протезирования сетчатки принципиально важно.

В появившемся недавно обзоре [80] подробно рассмотрены векторы и способы доставки генов, в первую очередь, в сетчатку приматов, что принципиально важно для доклинических испытаний оптогенетического протезирования дегенеративной (слепой) сетчатки человека. Авторы при этом приходят к выводу, что именно аденоассоциированный вирус является наиболее приемлемым вектором для доставки генов в нейроны сетчатки. В этой связи следует упомянуть работы последнего времени, в которых описываются аденоассоциированные вирусы, эффективные для переноса гена в нейральную часть сетчатки не только мышей и обезьян, но и в экспланты сетчатки человека [81, 82]. Так, например, в работе Hickey et al. [81] для оптогенетического протезирования ганглиозных клеток у обезьян была успешно применена конструкция, состоящая из разрешенного к клинической практике аденоассоциированного вируса 2-го серотипа и модифицированного канального родопсина (L132C/T159C), обладающего на два порядка большей чувствительностью к свету, по сравнению с немодифицированным аналогом.

Промоторы. Помимо вируса для успешного оптогенетического протезирования биполярных или ганглиозных клеток сетчатки, причем разных их типов, принципиально важно иметь эффективный и специфичный промотор. Работы в этом направлении активно ведутся. Как выяснилось, например, для ганглиозных клеток сетчатки глаза трансгенной мыши (с пигментным ретинитом) эффективность промотора человеческого гамма-синуклеинового гена выше, чем цитомегаловируса [70]. По нашим данным, промотор CaMKII, специфичный для глутаматергических нейронов, в сочетании с аденоассоциированным вирусом эффективно доставляет гены катионного и анионного канальных ро-

допсина в ганглиозные клетки сетчатки трансгенной мыши [27]. Располагая возможностью доставки с помощью аденоассоциированного вируса и соответствующих промоторов генов катионного и анионного каналов родопсинов в большую популяцию ганглиозных клеток дегенеративной сетчатки, становится реальным создание эффективных ON-OFF- и OFF-ON-рецептивных полей этих клеток. Что касается протезирования биполярных клеток сетчатки, то появляются работы, авторы которых обращают внимание на трудности и ограничения специфической доставки гена в эти клетки. Так, например, той же группой, которая успешно использовала химеру Opto-mGluR6 для протезирования ON-биполярных клеток мыши [54], недавно опубликована работа, авторы которой утверждают, что известный для этих клеток промотор (4xGRM6-SV40) не является специфичным для них, и все исследованные в этой работе варианты аденоассоциированных векторов эффективно таргетируют ON-биполярные клетки здоровой, а не дегенеративной сетчатки мыши rd1 [83]. В заключение авторы приходят к выводу, что для успешного оптогенетического протезирования ON-биполярных клеток дегенеративной сетчатки требуются дальнейшие поиски действительно специфичных промоторов и аденоассоциированных векторов.

Таким образом, оптогенетическое протезирование слепой сетчатки с помощью родопсинов – первое, наиболее реальное и близкое по времени внедрение методов оптогенетики в клиническую практику. В этой связи можно сформулировать основные положения и задачи, вытекающие из рассмотренного в настоящем обзоре состояния проблемы.

1) Канальные родопсины одноклеточных водорослей – наиболее реальные на сегодняшний день «инструменты» для оптогенетического протезирования сетчатки.

2) Ганглиозные клетки дегенеративной сетчатки наиболее надежны и доступны для оптогенетического протезирования.

3) Насущными задачами являются: оптимизация параметров катионных и анионных канальных родопсинов, их светочувствительности, проводимости, времени жизни, спектров поглощения; повышение уровня экспрессии генов в клетке; поиск специфических промоторов, в т.ч. для субпопуляций ON-OFF- и OFF-ON-ганглиозных клеток.

4) Для адекватной передачи информации от модифицированных родопсином ганглиозных клеток сетчатки в зрительные центры мозга и обработки этой информации в мозгу требуется создание специального («интеллектуального») интерфейса.

5) Аденоассоциированный вектор и сопряженный с ним специфичный промотор – единственный приемлемый на сегодняшний день способ доставки гена родопсина к определенным клеткам сетчатки.

6) Используя спектрально отличающиеся канальные родопсины, представляется возможным восстановление и цветового зрения вслед за монохроматическим.

7) В случае успеха оптогенетического протезирования ганглиозных клеток у пациентов может быть восстановлено светоощущение, а также предметное зрение (они смогут видеть предметы, например, стол и стул).

8) Опыты на животных не позволяют оценить качество восстановленного зрения. Для этого требуются клинические испытания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Deisseroth, K. (2011) Optogenetics, *Nat. Methods*, **8**, 26–29, doi: 10.1038/nmeth.f.324.
- Oesterhelt, D., and Stoerkenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Nat. New Biol.*, **233**, 149–152, doi: 10.1038/newbio233149a0.
- Litvin, F.F., Sineshchekov, O.A., and Sineshchekov, V.A. (1978) Photoreceptor electric potential in the phototaxis of the alga *Haematococcus pluvialis*, *Nature*, **271**, 476–478, doi: 10.1038/271476a0.
- Sineshchekov, O.A., Jung, K.H., and Spudich, J.L. (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8689–8694, doi: 10.1073/pnas.122243399.
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., and Bamberg, E. (2003) *Channelrhodopsin-2*, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13940–13945, doi: 10.1073/pnas.1936192100.
- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nat. Neurosci.*, **8**, 1263–1268, doi: 10.1038/nn1525.
- Островский М.А., Фельдман Т.Б. (2012) Химия и молекулярная физиология зрения: светочувствительный белок родопсин, *Успехи химии*, **81**, 1071–1090.
- Островский М.А. (2012) Молекулярная физиология зрительного пигмента родопсина, *Биологические мембраны*, **29**, 38–50.

9. Grote, M., Engelhard, M., and Hegemann, P. (2014) On ion pumps, sensors and channels – perspectives on microbial rhodopsins: between science and history, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 533–545, doi: 0.1016/j.bbabbio.2013.08.006.
10. Kaneko, A., Inoue, K., Kojima, K., Kandori, Y., and Sudo, Y. (2017) Conversion of microbial rhodopsins: insights into functionally essential elements and rational protein engineering, *Biophys. Rev.*, **9**, 861–876, doi: 10.1007/s12551-017-0335-x.
11. Wiegert, S., Mahn, M., Prigge, M., Printz, Y., and Yizhar, O. (2017) Silencing neurons: tools, applications and experimental constraints, *Neuron*, **95**, 504–529, doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.050.
12. Cohen, E.D. (2018) Retinal prostheses, In *Webvision: the organization of the retina and visual system* (Kolb, H., Fernandez, E., and Nelson, R, eds), Salt Lake City (UT), University of Utah Health Sciences Center.
13. Островский М.А. (2017) Родопсин: эволюция и сравнительная физиология, *Палеонтологический журнал*, **5**, 103–113, doi: 10.7868/S0031031X17050063.
14. Deisseroth, K., and Hegemann, P. (2017) The form and function of channelrhodopsin, *Science*, **357**, 5544, doi: 10.1126/science.aan5544.
15. Bi, A., Cui, J., Ma, Y.P., Olshevskaya, E., Pu, M., Dzhohor, A.M., and Pan, Z.H. (2006) Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration, *Neuron*, **50**, 23–33, doi: 10.1016/j.neuron.2006.02.026.
16. Prigge, M., Schneider, F., Tsunoda, S.P., Shilyansky, C., Wietek, J., Deisseroth, K., and Hegemann, P. (2012) Color-tuned channelrhodopsins for multiwavelength optogenetics, *J. Biol. Chem.*, **287**, 31804–31811, doi: 10.1074/jbc.M112.391185.
17. Lin, J.Y., Knutsen, P.M., Muller, A., Kleinfeld, D., and Tsien, R.Y. (2013) ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation, *Nat. Neurosci.*, **16**, 1499–1508, doi: 10.1038/nn.3502.
18. Sengupta, A., Chaffiol, A., Mace, E., Caplette, R., Desrosiers, M., Lampic, M., Forster, V., Marre, O., Lin, J.Y., Sahel, J.A., Picaud, S., Dalkara, D., and Duebel, J. (2016) Red-shifted channelrhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina, *EMBO Mol. Med.*, **8**, 1248–1264, doi: 10.15252/emmm.201505699.
19. Mager, T., Lopez, D., de la Morena, Senn, V., Schlotte, J., D’Errico, A., Feldbauer, K., Wrobel, C., Jung, S., Bodensiek, K., Rankovic, V., Browne, L., Huet, A., Juttner, J., Wood, P.G., Letzkus, J.J., Moser, T., and Bamberg, E. (2018) High frequency neural spiking and auditory signaling by ultrafast red-shifted optogenetics, *Nat. Commun.*, **9**, 1750, doi: 10.1038/s41467-018-04146-3.
20. Sato, M., Sugano, E., Tabata, K., Sonnohe, K., Watanabe, Y., Ozaki, T., Tamai, M., and Tomita, H. (2017) Visual responses of photoreceptor-degenerated rats expressing two different types of channelrhodopsin genes, *Sci. Rep.*, **7**, 41210, doi: 10.1038/srep41210 1.
21. Greco, J.A., Wagner, N.L., Jensen, R.J., and Birge, R.R. (2017) Stimulation of retinal ganglion cells using an ion-mediated, protein-based retinal implant, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **58**, 4184.
22. Berndt, A., Lee, S.Y., Wietek, J., Ramakrishnan, C., Steinberg, E.E., Rashid, A.J., Kim, H., Park, S., Santoro, A., Frankland, P.W., Lyer, S.M., Pak, S., Ahrlund-Richter, S., Delp, S.L., Malenka, R.C., Josselyn, S.A., Carlen, M., Hegemann, P., and Deisseroth, K. (2016) Structural foundations of optogenetics: determinants of channelrhodopsin ion selectivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 822–829, doi: 10.1073/pnas.1523341113.
23. Wietek, J., Wiegert, J.S., Adeishvili, N., Schneider, F., Watanabe, H., Tsunoda, S.P., Vogt, A., Elstner, M., Oertner, T.G., and Hegemann, P. (2014) Conversion of channelrhodopsin into a light-gated chloride channel, *Science*, **344**, 409–412, doi: 10.1126/science.1249375.
24. Долгих Д.А., Малышев А.Ю., Саложин С.В., Некрасова О.В., Петровская Л.Е., Рошин М.В., Бородинова А.А., Фельдман Т.Б., Балабан П.М., Кирпичников М.П., Островский М.А. (2015) Анионный каналный родопсин, экспрессированный в культуре нейронов и *in vivo* в мозге мыши: светоиндуцированное подавление генерации потенциалов действия, *Доклады Академии наук*, **465**, 737–740, doi: 10.7868/S086956521536030X.
25. Govorunova, E.G., Sineshchekov, O.A., Janz, R., Liu, X., and Spudich, J.L. (2015) Natural light-gated anion channels: a family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics, *Science*, **349**, 647–650, doi: 10.1126/science.aaa7484.
26. Li, H., Sineshchekov, O.A., Wu, G., and Spudich, J.L. (2016) *In vitro* activity of a purified natural anion channelrhodopsin, *J. Biol. Chem.*, **291**, 25319–25325, doi: 10.1074/jbc.C116.760041.
27. Govorunova, E.G., Sineshchekov, O.A., Li, H., and Spudich, J.L. (2017) Microbial rhodopsins: diversity, mechanisms, and optogenetic applications, *Ann. Rev. Biochem.*, **86**, 845–872, doi: 10.1146/annurev-biochem-101910-144233.
28. Долгих Д.А., Малышев А.Ю., Рошин М.В., Смирнова Г.Р., Некрасова О.В., Петровская Л.Е., Фельдман Т.Б., Балабан П.М., Кирпичников М.П., Островский М.А. (2016) Сравнительная характеристика двух анионных каналных родопсинов и перспективы их применения в оптогенетике, *Доклады Академии наук*, **471**, 729–731, doi: 10.7868/S0869565216360238.
29. Malyshev, A.Y., Smirnova, G.R., Dolgikh, D.A., Balaban, P.M., and Ostrovsky, M.A. (2017) Chloride conducting light activated channel GtACR2 can produce both cessation of firing and generation of action potentials in cortical neurons in response to light, *Neurosci. Lett.*, **640**, 76–80, doi: 10.1016/j.neulet.2017.01.026.
30. Messier, J.E., Chen, H., Cai, Z.L., and Xue, M. (2018) Targeting light-gated chloride channels to neuronal somatodendritic domain reduces their excitatory effect in the axon, *Elife*, **9**, e38506, doi: 10.7554/eLife.38506.
31. Bourne, R.R.A., Flaxman, S.R., Braithwaite, T., Cicinelli, M.V., Das, A., Jonas, J.B., Keeffe, J., Kempen, J.H., Leasher, J., Limburg, H., Naidoo, K., Pesudovs, K., Resnikoff, S., Silvester, A., Stevens, G.A., Tahhan, N., Tien, Y., Wong, T.Y., and Taylor H.R. (2017) Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Glob. Health*, **5**, 888–897, doi: 10.1016/S2214-109X(17)30293-0.
32. Duncan, J.L., Pierce, E.A., Laster, A.M., Daiger, S.P., Birch, D.G., Ash, J.D., Iannaccone, A., Flannery, J.G., Sahel, J.A., Zack, D.J., and Zarbin, M.A. (2018) Inherited retinal degenerations: current landscape and knowledge gaps, *Trans. Vis. Sci. Tech.*, **7**, 6, doi: 10.1167/tvst.7.4.6.
33. RetNet: <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>. Accessed July 9, 2018.
34. Baker, C.K. and Flannery, J.G. (2018) Innovative optogenetic strategies for vision restoration, *Front. Cell Neurosci.*, **12**, 316, doi: 10.3389/fncel.2018.00316.
35. Petit, L., Khanna, H., and Punzo, C. (2016) Advances in gene therapy for diseases of the eye, *Hum. Gene Ther.*, **27**, 563–579, doi: 10.1089/hum.2016.040.
36. Yue, L., Weiland, J.D., Roska, B., and Humayun, M.S., (2016) Retinal stimulation strategies to restore vision: fundamentals and systems, *Prog. Retin. Eye Res.*, **53**, 21–47, doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.05.002.

37. Jones, B.W., Kondo, M., Terasaki, H., Lin, Y., McCall, M., and Marc, R.E. (2012) Retinal remodeling, *Jpn. J. Ophthalmol.*, **56**, 289–306, doi: 10.1007/s10384-012-0147-2.
38. Curcio, C.A., Medeiros, N.E., and Millican, C.L. (1996) Photoreceptor loss in age-related macular degeneration, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **37**, 1236–1249.
39. Marc, R.E., Jones, B.W., Anderson, J.R., Kinard, K., Marshak, D.W., Wilson, J.H., Wensel, T., and Lucas, R.J. (2007) Neural reprogramming in retinal degeneration, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**, 3364–3371, doi: 10.1167/iov.07-0032.
40. Mazzoni, F., Novelli, E., and Strettoi, E. (2008). Retinal ganglion cells survive and maintain normal dendritic morphology in a mouse model of inherited photoreceptor degeneration, *J. Neurosci.*, **28**, 14282–14292, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4968-08.2008.
41. Medeiros, N.E., and Curcio, C.A. (2001) Preservation of ganglion cell layer neurons in age-related macular degeneration, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**, 795–803.
42. Hartong, D.T., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (2006) Retinitis pigmentosa, *Lancet*, **368**, 1795–1809, doi: 10.1016/S0140-6736(06)69740-7.
43. Strettoi, E., and Pignatelli, V. (2000) Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11020–11025, doi: 10.1073/pnas.190291097.
44. Lin, B., Masland, R.H., and Strettoi, E. (2009) Remodeling of cone photoreceptor cells after rod degeneration in rd mice, *Exp. Eye Res.*, **88**, 589–599, doi: 10.1016/j.exer.2008.11.022.
45. Jacobson, S.G., Sumaroka, A., Luo, X. and Cideciyan, A.V. (2013) Retinal optogenetic therapies: clinical criteria for candidacy, *Clin. Genet.*, **84**, 175–182, doi: 10.1111/cge.12165.
46. Busskamp, V., and Roska, B. (2011) Optogenetic approaches to restoring visual function in retinitis pigmentosa, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **21**, 942–946, doi: 10.1016/j.conb.2011.06.001.
47. Khabou, H., Garita-Hernandez, M., Chaffiol, A., Reichman, S., Jaillard, C., Brazhnikova, E., Bertin, S., Forster, V., Desrosiers, M., Winckler, C., Goureau, O., Picaud, S., Duebel, S., Sahel, J.A., and Dalkara D. (2018) Noninvasive gene delivery to foveal cones for vision restoration, *JCI Insight*, **3**, 96029, doi: 10.1172/jci.insight.96029.
48. Lin, Y., Jones, B.W., Liu, A., Tucker, J.F., Rapp, K., Luo, L., Baehr, W., Bernstein, P.S., Watt, C.B., Yang, J.H., Shaw, M.V., and Marc, R.E. (2012) Retinoid receptors trigger neurogenesis in retinal degenerations, *FASEB J.*, **26**, 81–92, doi: 10.1096/fj.11-192914.
49. Nakajima, Y., Moriyama, M., Hattori, M., Minato, N., and Nakanishi, S. (2009) Isolation of ON bipolar cell genes via hrGFP-coupled cell enrichment using the mGluR6 promoter, *J. Biochem.*, **145**, 811–818, doi: 10.1093/jb/mvp038.
50. Lagali, P.S., Balya, D., Awatramani, G.B., Munch, T.A., Kim, D.S., Busskamp, V., Cepko, C.L., and Roska, B. (2008) Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration, *Nat. Neurosci.*, **11**, 667–675, doi: 10.1038/nn.2117.
51. Dalkara, D., Byrne, L.C., Klimczak, R.R., Visel, M., Yin, L., Merigan, W.H., Flannery J.G., and Schaffer, D.V. (2013) *In vivo*-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous, *Sci. Transl. Med.*, **5**, 189ra76, doi: 10.1126/scitranslmed.3005708.
52. Cronin, T., Vandenbergh, L.H., Hantz, P., Juttner, J., Reimann, A., Kacso, A.E., Huckfeldt, R.M., Busskamp, V., Konler, H., Lagali, P.S., Roska, B., and Bennett, J. (2014) Efficient transduction and optogenetic stimulation of retinal bipolar cells by a synthetic adeno-associated virus capsid and promoter, *EMBO Mol. Med.*, **6**, 1175–1190, doi: 10.15252/emmm.201404077.
53. Mace, E., Caplette, R., Marre, O., Sengupta, A., Chaffoli, A., Barbe, P., Desrosiers, M., Bamberg, E., Sahel, J.A., Picaud, S., Duebel, J and Dalkara, D. (2015) Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV restores ON and OFF visual responses in blind mice, *Mol. Ther.*, **23**, 7–16, doi:10.1038/mt.2014.154.
54. Van Wyk, M., Pielecka-Fortuna, J., Lowel, S., and Kleinlogel, S. (2015) Restoring the ON switch in blind retinas: opto-mGluR6, a next-generation, cell-tailored optogenetic tool, *PLoS Biol.*, **13**, e1002143, doi.org/10.1371/journal.pbio.1002143.
55. Koizumi, A., Tanaka, K.F. and Yamanaka, A. (2013) The manipulation of neural and cellular activities by ectopic expression of melanopsin, *Neurosci. Res.*, **75**, 3–5, doi: 10.1016/j.neures.2012.07.010.
56. De Silva, S. R., Barnard, A.R., Hughes, S., Tam, S.K.E. Martin, C., Singh, M.S., Barnea-Cramer, A.O., McClements, M.E., During, M.J., Peirson, S.N., Hankins, M.W., and MacLaren, R.E. (2017) Long-term restoration of visual function in end-stage retinal degeneration using subretinal human melanopsin gene therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 11211–11216, doi: 10.1073/pnas.1701589114.
57. Cehajic-Kapetanovic, J., Eleftheriou, C., Allen, A.E., Milosavljevic, N., Pienaar, A., Bedford, R., Davis, K.E., Bishop, P.N., and Lucas, R.J. (2015) Restoration of vision with ectopic expression of human rod opsin, *J. Curr. Biol.*, **25**, 2111–2122, doi: 10.1016/j.cub.2015.07.029.
58. Gaub, B.M., Berry, M.H., Holt, A.E., Reiner, A., Kienzler, M.A., Dolgova, N., Nikonov, S., Aguirre, G.D., Beltran, W.A., Flannery, J.G., and Isacoff, E.Y. (2014) Restoration of visual function by expression of a light-gated mammalian ion channel in retinal ganglion cells or ON-bipolar cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 5574–5583, doi: 10.1073/pnas.1414162111.
59. Gaub, B.M., Berry, M.H., Holt, A.E., Isacoff, E.Y., and Flannery, J.G. (2015) Optogenetic vision restoration using rhodopsin for enhanced sensitivity, *Mol. Ther.*, **23**, 1562–1571, doi: 10.1038/mt.2015.121.
60. Gaub, B.M., Berry, M.H., Visel, M., Holt, A.E., Isacoff, E.Y., and Flannery, J.G. (2018) Optogenetic retinal gene therapy with the light gated GPCR vertebrate rhodopsin, *Methods Mol. Biol.*, **1715**, 177–189, doi: 10.1007/978-1-4939-7522-8_12.
61. Wang, J.S., and Kefalov, V.J. (2011) The cone-specific visual cycle, *Prog. Retin. Eye Res.*, **30**, 115–128, doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.11.001.
62. Williams, S. (2017) Optogenetic therapies move closer to clinical use, *Scientist*.
63. Nirenberg, S., and Pandarinath, C. (2012) Retinal prosthetic strategy with the capacity to restore normal vision, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **109**, 15012–15017, doi: 10.1073/pnas.1207035109.
64. Reutsky-Gefen, I., Golan, L., Farah, N., Schejter, A., Tsur, L., Brosh, I., and Shoham, S. (2013) Holographic optogenetic stimulation of patterned neuronal activity for vision restoration, *Nat. Commun.*, **4**, 1509, doi:10.1038/ncomms2500.
65. Шелепин К.Ю., Пронин С.В., Шелепин Ю.Е. (2015) Распознавание фрагментированных изображений и возникновение «инсайта», *Оптический журнал*, **82**, 72–80.
66. Caporale, N., Kolstad, K.D., Lee, T., Tochitsky, I., Dalkara, D., Trauner, D., Kramer, R., Dan, Y., Isacoff, E.Y., and Flannery, J.G. (2011) LiGluR restores visual responses in rodent models of inherited blindness, *Mol. Ther.*, **19**, 1212–1219, doi: 10.1038/mt.2011.103.
67. Greenberg, K.P., Pham, A., and Werblin, F.S. (2011) Differential targeting of optical neuromodulators to gan-

- gion cell soma and dendrites allows dynamic control of center-surround antagonism, *Neuron*, **69**, 713–720, doi: 10.1016/j.neuron.2011.01.024.
68. Ivanova, E., and Pan, Z.-H. (2009) Evaluation of the adeno-associated virus mediated long-term expression of channelrhodopsin-2 in the mouse retina, *Mol. Vis.*, **15**, 1680–1689.
 69. Tomita, H., Sugano, E., Isago, H., Hiroi, T., Wang, Z., Ohta, E., and Tamai, M. (2010) Channelrhodopsin-2 gene transduced into retinal ganglion cells restores functional vision in genetically blind rats, *Exp. Eye Res.*, **90**, 429–436, doi: 10.1016/j.exer.2009.12.006.
 70. Wu, C., Ivanova, E., Zhang, Y., and Zhuo-Hua, P. (2013) rAAV-mediated subcellular targeting of optogenetic tools in retinal ganglion cells *in vivo*, *PLoS One*, **8**, 66332, doi: 10.1371/journal.pone.0066332.
 71. Zhang, Y., Ivanova, E., Bi, A., and Pan, Z.H. (2009) Ectopic expression of multiple microbial rhodopsins restores ON and OFF light responses in retinas with photoreceptor degeneration, *J. Neurosci.*, **29**, 9186–9196, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0184-09.2009.
 72. 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., and Dalkara, D. (2017) A new promoter allows optogenetic vision restoration with enhanced sensitivity in macaque retina, *Mol. Ther.*, **25**, 2546–2560, doi: 10.1016/j.ymthe.2017.07.011.
 73. Wang, W., Nan, Y., Pan, Z.H., and Pu, M. (2017) Morphological evaluation of retinal ganglion cells expressing the L132C/T159C ChR2 mutant transgene in young adult cynomolgus monkeys, *Sci. China Life Sci.*, **60**, 1157–1167, doi: 10.1007/s11427-017-9055-x.
 74. Zrenner, E., Bartz-Schmidt, K.U., Benav, H., Besch, D., Bruckmann, A., Gabel, V.P., Gekeler, F., Greppmaier, U., Harscher, A., Kibbel, S., Koch, J., Kusnyerik, A., Peters, T., Stingl, K., Sachs, H., Stett, A., Szurman, P., Wilhelm, B., and Wilke, R. (2011) Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words, *Proc. Biol. Sci.*, **278**, 1489–1497, doi: 10.1098/rspb.2010.1747.
 75. Da Cruz, L., Coley, B.F., Dorn, J.D., Merlini, F., Filley, E., Christopher, P., Chen, F.K., Wuyyuru, V., Sahel, J., Stanga, P.E., Humayun, M., Greenberg, R.J., and Dagnelie, G. (2013) The Argus II epiretinal prosthesis system allows letter and word reading and long-term function in patients with profound vision loss, *Br. J. Ophthalmol.*, **97**, 632–636, doi: 10.1136/bjophthalmol-2012-301525.
 76. Chader, G.J., Weiland, J., and Humayun, M.S. (2009) Artificial vision: needs, functioning, and testing of a retinal electronic prosthesis, *Prog. Brain Res.*, **175**, 317–332, doi: 10.1016/S0079-6123(09)17522-2.
 77. Humayun, M.S., Dorn, J.D., da Cruz, L., Dagnelie, G., Sahel, J.A., Stanga, P.E., Cideciyan, A.V., Duncan, J.L., Elliott, D., Filley, E., Ho, A.C., Santos, A., Safran, A.B., Ardit, A., Del Priore, L.V., and Greenberg, R.J. (2012) Interim results from the international trial of Second Sight's visual prosthesis, *Ophthalmology*, **119**, 779–788, doi: 10.1016/j.ophtha.2011.09.028.
 78. Shepherd, R.K., Shivdasani, M.N., Nayagam, D.A., Williams, C.E., and Blamey, P.J. (2013) Visual prostheses for the blind, *Trends Biotechnol.*, **31**, 562–571, doi: 10.1016/j.tibtech.2013.07.001.
 79. Beyeler, M., Rokem, A., Boynton, G.M., and Fine, I. (2017) Learning to see again: biological constraints on cortical plasticity and the implications for sight restoration technologies, *J. Neural Eng.*, **14**, 051003, doi: 10.1088/1741-2552/aa795e.
 80. Planul, A., and Dalkara, D. (2017) Vectors and gene delivery to the retina, *Ann. Rev. Vis. Sci.*, **3**, 121–140, doi: 10.1146/annurev-vision-102016-061413.
 81. 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., and MacLaren R.E. (2017) Tropism of engineered and evolved recombinant AAV serotypes in the *rd1* mouse and *ex vivo* primate retina, *Gene Ther.*, **24**, 787–800, doi: 10.1038/gt.2017.85.
 82. Buck, T.M., Pellissier, L.P., Vos, R.M., van Dijk, E.H.C., Boon, C.J.F., and Wijnholds, J. (2018) AAV serotype testing on cultured human donor retinal explants, *Methods Mol. Biol.*, **1715**, 275–288, doi: 10.1007/978-1-4939-7522-8_20.
 83. Van Wyk, M., Hulliger, E.C., Girod, L., Ebnetter, A., and Kleinlogel, S. (2017) Present molecular limitations of ON-bipolar cell targeted gene therapy, *Front. Neurosci.*, **11**, 161, doi: 10.3389/fnins.2017.00161.

PROSPECTS FOR OPTOGENETIC PROSTHETICS OF DEGENERATIVE RETINA

M. A. Ostrovsky^{1,2*} and M. P. Kirpichnikov^{3,4}

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia;
E-mail: ostrovsky3535@mail.ru

² Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Department of Molecular Physiology, 119991 Moscow, Russia

³ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia;
E-mail: kirpichnikov@inbox.ru

⁴ Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Department of Bioengineering, 119991 Moscow, Russia

Received September 26, 2018

Revised December 22, 2018

Accepted December 24, 2018

The review considers the prospects for using rhodopsin as an optogenetic “tool” for prosthetics of the degenerative (blind) eye retina. The principle of optogenetic techniques is briefly described. Retinal-containing proteins, depolarizing and hyperpolarizing plasma membrane of nerve cells and, accordingly, exciting and inhibiting their physiological activity, are considered. The questions of which cells of the degenerative retina can be prosthetically treated and what rhodopsin can be used for this purpose are discussed in detail. Viruses and promoters necessary and suitable for the rhodopsin gene delivery to certain cells of the degenerative retina are considered. In conclusion, the main provisions and tasks associated with optogenetic prosthetics of the degenerative retina employing rhodopsins are formulated.

Keywords: optogenetics, retinal-containing proteins, channel rhodopsins, melanopsin, visual rhodopsin, degenerative retina, ganglion cells