

Optogenetik – eine Chance für fortgeschrittene retinale Dystrophien

Optogenetics: A Therapeutic Option for Advanced Retinal Dystrophies



Autoren

A. Swiersy, S. D. Klapper, V. Busskamp

Institut

DFG-Forschungszentrum für Regenerative Therapien Dresden (CRTD),
Technische Universität Dresden

Schlüsselwörter

Genetik, Retina, Optogenetik, Channelrhodopsin, retinale Dystrophien

Key words

genetics, retina, optogenetics, channelrhodopsin, retinal dystrophies

eingereicht 9.11.2016

akzeptiert 11.1.2017

Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0043-101820>

Online-publiziert 2.3.2017 | Klin Monatsbl Augenheilkd 2017; 234:
335–342 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York |
ISSN 0023-2165

Korrespondenzadresse

Dr. Volker Busskamp
DFG-Forschungszentrum für Regenerative Therapien Dresden (CRTD),
Technische Universität Dresden
Fetscherstr. 105, 01307 Dresden
Tel.: +49/(0)351/458-820 15, Fax: +49/(0)351/458-820 19
volker.busskamp@crt-dresden.de

ZUSAMMENFASSUNG

Die Optogenetik nutzt genetisch modifizierte lichtaktive Proteine, um Zellen durch Licht nicht invasiv zu manipulieren. Der Prototyp dieser Proteine ist Channelrhodopsin2 (ChR2), ein unselektiver Kationkanal. Dieser kann elektrisch erregbare Zellen durch Lichtimpulse depolarisieren. Die Kombination von Channelrhodopsin und Halorhodopsin (eNpHR), eine hyperpolarisierende lichtgetriebene Cl⁻-Pumpe, ermöglicht eine komplexe Modulation neuronaler Aktivität sowohl in vitro als auch in vivo. Sehr schnell stellte sich heraus, dass die Opto-

genetik für die Behandlung von Sehbehinderungen, die mit der Degeneration der Photorezeptoren einhergehen, gute Chancen zur Therapie bietet. Dabei werden funktionslose Photorezeptoren durch die ektopische Expression der hyperpolarisierenden Pumpe eNpHR reaktiviert. Aber auch andere Zellen der Retina können durch die induzierte Expression von ChR2 die Aufgabe des Lichtempfangs übernehmen und damit zu künstlichen Photorezeptoren werden. Mit diesem Übersichtsartikel möchten wir eine kurze Einführung zur Retina und deren Rolle sowohl in der physiologischen als auch in der pathologischen Lichtwahrnehmung geben. Weiterhin werden optogenetische Strategien zur Wiederherstellung der Lichtwahrnehmungen aufgezeigt und strukturelle sowie funktionelle Eigenschaften der auf Rhodopsin basierenden optogenetischen Werkzeuge diskutiert. Letztendlich wird die Anwendbarkeit für die Wiederherstellung des Sehvermögens durch die Optogenetik bewertet.

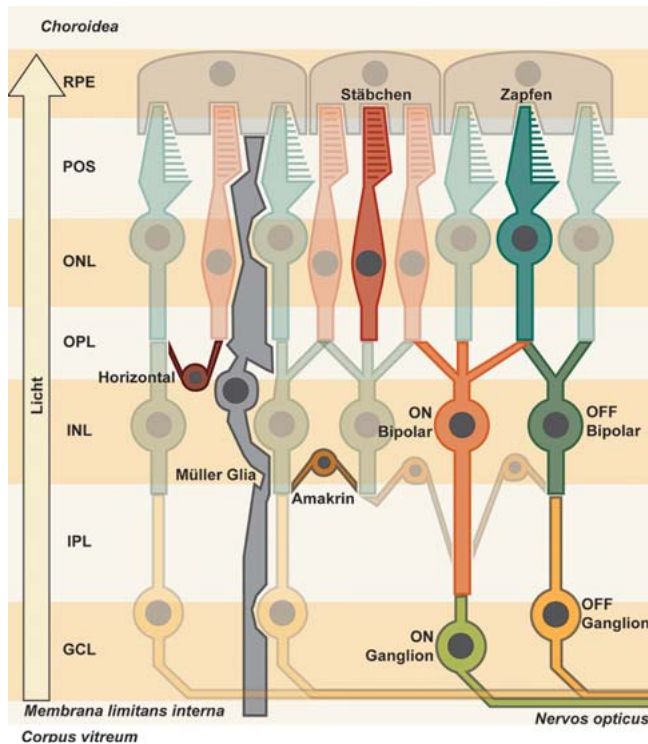
ABSTRACT

Optogenetics refers to the genetic modification of cells to express light-sensitive proteins, which mediate ion flow or secondary signaling cascades upon light exposure. Channelrhodopsin, the most famous example, is an unselective cation channel, which opens when exposed to blue light, thus mediating the depolarisation of the expressing cell. Along with other light-sensitive proteins such as the chloride pump eNpHR, which mediates light-activated hyperpolarisation, the optogenetic toolset offers a wide range of non-invasive single cell manipulations. Due to the direct modulation of the membrane potential, the in-vivo and in-vitro application of optogenetics in neuronal cells seemed to be of outstanding interest. Soon it became evident that these tools are well-suited to treat retinas of patients suffering from photoreceptor degeneration, independently of the underlying mutation. The ectopic expression of channelrhodopsin or eNpHR may cause inactive photoreceptors or other, intact cells of the retina to become sensitive to light. Thus, the most basic function of the retina, the perception of light, can be restored. This review gives a short overview of the retinal structure as well as its physiological and pathological function as the primary light-perceiving tissue. We will focus on different optogenetic strategies to restore visual function in previously blind retinas.

Anatomie der Retina

Die Retina besteht aus 5 neuronalen Zelltypen, die in 3 zellulären Schichten angeordnet sind (► **Abb. 1**) [1, 2]. Nach außen wird die Retina vom retinalen Pigmentepithel (RPE) auf der einen Seite und vom Corpus vitreum auf der anderen Seite eingefasst. Das Epithel

dient als Lichtfilter und gleichzeitig als Barriere zwischen den Blutgefäßen der Choroidea und den Photorezeptoren. In der Retina wechseln sich zellkernreiche und -arme Schichten ab. Die zellkernarmen Schichten sind durch synaptische Verbindungen der Nervenzellen gekennzeichnet. Die äußere, dem Licht am weitesten entfernte Schicht der Retina, die zellkernreiche Körnerschicht, besteht aus den Zellkörpern der eigentlichen Lichtsensoren, den



► **Abb. 1** Anatomie der Retina: Das Licht passiert nach dem Einfall in den Bulbus oculi zunächst die Ganglienzellschicht (GCL), die von der Membrana limitans interna begrenzt ist. Es folgen die innere plexiforme Schicht (IPL), die innere Körnerschicht (INL), die äußere plexiforme Schicht (OPL) und die äußere Körnerschicht (ONL). Die lichtsensitiven äußeren Segmente der Photorezeptoren (POS) befinden sich auf der dem Licht abgewandten Seite der Retina und werden durch das retinale Pigmentepithel (RPE) von der Choroidea abgegrenzt. Die Lichtdetektion, die neuronale Verarbeitung und Weiterleitung finden dabei entgegengesetzt zum Lichteinfall, von außen nach innen, statt. Diese bereits prozessierten Reize werden dann entlang der Ganglienzellaxone durch den N. opticus zu höheren Hirnregionen gesandt.

Stäbchen- und Zapfenphotorezeptoren. Dem schließt sich die zellkernarme äußere plexiforme Schicht (englisch: OPL – outer plexiform layer) an. Sie stellt die Verbindung zwischen Photorezeptoren und den nachgeschalteten neuronalen Zellen der Retina her. In der sich anschließenden zellkernreichen inneren Körnerschicht befinden sich die Zellkörper der exzitatorischen Bipolarzellen und der inhibitorischen Horizontal- und Amakrinzellen. Die sich anschließende zellkernarme innere plexiforme Schicht (englisch: IPL – inner plexiform layer) besteht aus einem dichten Netzwerk, das von den Axonen der Bipolarzellen und den Dendriten der Amakrin- und Ganglienzellen gebildet wird. Die IPL ist wiederum in 2 Schichten gegliedert. Diese Strukturen resultieren aus der Verschaltung der verschiedenen Bipolarzellen. Die OFF-Bipolarzellen bilden Synapsen in der 1. Schicht der IPL, wohingegen die ON-Bipolarzellen Verschaltungen in der 2. Schicht bilden. Die Bipolarzellen unterscheiden sich in der Reaktion auf die lichtabhängige Verringerung der von Photorezeptoren freigesetzten Glutamatmenge. In OFF-Bipolarzellen führt die reduzierte Glutamatausschüttung nach einem Lichtreiz aufgrund der Schließung der ionotro-

pen Rezeptoren zu einer Hyperpolarisation und damit zu einer inhibierenden Wirkung auf efferente Neurone (Ganglienzellen). Die ON-Bipolarzellen verhalten sich genau gegenteilig. Sie depolarisieren bei reduzierter Glutamatausschüttung aufgrund ihrer metabotropen Rezeptorkomposition und aktivieren demzufolge nachgeschaltete Ganglienzellen. Diese Signale werden zusätzlich durch synaptische Interaktionen mit Amakrinzellen moduliert und schließlich weitergeleitet. Die Axone der Ganglienzellen bündeln sich zum N. opticus, der zunächst marklos ist. Dieser transportiert die Signale schließlich an die visuellen Zentren im Gehirn. Jeder visuelle Eindruck wird als elektrisches Signal in mehreren parallelen Kanälen durch die Retina geleitet, modifiziert und über die verschiedenen Ganglienzellen in höhere Gehirnregionen gesandt. Bei der Maus sind mindestens 30 verschiedene Kanäle bekannt [3, 4]. Die Retina ist damit nicht nur der lichtempfangende Teil des Gehirns, sondern ein äußerst komplexer, biologischer Computer.

Anordnung und Funktion von Photorezeptoren

Stäbchen und Zapfen sind nicht einheitlich über die Retina verteilt: Die Makula mit der zentralen Fovea, der Stelle des schärfsten Sehens, weist die höchste Dichte an Zapfen auf [5]. Die Photorezeptoren sind durch ihre markante Form einfach voneinander zu unterscheiden. Sie besitzen ein membranreiches äußeres Segment (englisch: OS – outer segment), in dem die Phototransduktion stattfindet. Dieses ist durch ein Verbindungscilium mit dem stoffwechselaktiven, mitochondrienreichen inneren Segment verbunden. An dieses schließt sich der eigentliche Zellkörper mit dem Zellkern an. Alle Photorezeptoren formen am Axonterminal eine sog. Ribbon-Synapse, eine geschichtete Struktur, an die die synaptischen Vesikel gekoppelt sind.

Das Sehpigment Rhodopsin im OS der Stäbchen ist auf die Detektion von geringen Lichtintensitäten spezialisiert, wohingegen das Opsin der Zapfen für das Sehen unter Tageslichtbedingungen verantwortlich ist. Menschen sind i. d. R. Trichromaten. Sie haben 3 Arten von Zapfen, die unterschiedliche spektrale Maxima haben und damit das Farbsehen ermöglichen [6]. Der Sehprozess beginnt in den OS der Photorezeptoren, wo Licht, in der Form von Photonen, in elektrische Signale umgewandelt wird. Dabei wird 11-cis-Retinal, das an das Glykoprotein Opsin gebunden ist, zu all-trans-Retinal isomerisiert. Das dadurch aktivierte Opsin bindet an Transducin, eine GTPase, was zur Spaltung des Transducins führt. Die α -Untereinheit des Transducins aktiviert daraufhin die Phosphodiesterase (PDE). Dadurch wird cGMP in GMP umgewandelt. Die sinkende intrazelluläre cGMP-Konzentration führt zum Schließen von cGMP-gesteuerten Na^+ -/ Ca^{2+} -Kanälen in der Zellmembran der Photorezeptoren. Das stoppt den Einstrom von Na^+ aber auch von Ca^{2+} (Dunkelstrom). In der Folge sinken die intrazellulären Ca^{2+} - und Na^+ -Konzentrationen. Die Zelle hyperpolarisiert daraufhin, wodurch am synaptischen Ende der Photorezeptoren die Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat verringert wird. Dadurch werden an den postsynaptischen Membranen der efferenten Nervenzellen Ionenkanäle geschlossen bzw. geöffnet. Die Folge ist die Generierung von Aktionspotentialen in bestimmten Ganglienzellen und das nun erzeugte elektrische Signal wird

moduliert an das Gehirn weitergeleitet. Am Ende dieses Phototransduktionszyklus löst sich all-trans-Retinal vom Opsin und wird im RPE zu 11-cis-Retinal recycelt.

Degenerative Erkrankungen der Retina

Degenerative Erkrankungen, die die Retina betreffen, sind meist durch das Absterben von Photorezeptoren charakterisiert [7]. Die Retinitis pigmentosa (RP) und die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) gehören zu den Vertretern degenerativer retinaler Dystrophien. Die AMD tritt meist im höheren Lebensalter auf und ist durch ein Absterben der Zapfen vorwiegend im Bereich der Makula gekennzeichnet. Die primäre Ursache des Absterbens der Photorezeptoren liegt allerdings nicht in Mutationen von in Zapfen aktiven Genen, sondern an pathologischen Akkumulationen von Stoffwechselprodukten in dem versorgenden RPE, in der Bruch-Membran und in der Aderhaut. Durch den Funktionsverlust der Zapfen kommt es zunächst zu einem Nachlassen der Sehschärfe im zentralen Gesichtsfeld, das sich bis zur Blindheit ausweiten kann [8].

Als RP wird eine Gruppe von erblichen Erkrankungen bezeichnet, die durch dominante oder rezessive Mutationen in Genen mit essenzieller Funktion in Stäbchen oder im RPE gekennzeichnet sind. Der Verlauf der Erkrankung variiert von Patient zu Patient und ist abhängig von der Art der Mutation. Bis heute sind mehr als 50 Gene bekannt, in denen Mutationen eine RP auslösen können (<https://sph.uth.edu/retnet/home.htm>). Zunächst führt die Erkrankung zum Absterben von Stäbchen. Patienten bemerken das zunächst als Nachtblindheit [9]. Im Verlauf der Erkrankung werden jedoch auch die im Tageslicht aktiven Zapfen dezimiert. Die Zapfen verlieren dabei zuerst ihre äußeren Segmente, werden damit lichtunempfindlich und degenerieren bis zu einem gewissen Grad. Erst spät im Krankheitsverlauf sterben die Zapfen im Bereich der Makula und der Fovea ab, was zu einem vollständigen Verlust des Sehens führt.

Es gibt eine Vielzahl von Behandlungsmöglichkeiten, um diese degenerativen Erkrankungen zu therapieren, wobei die meisten jedoch noch im vorklinischen Stadium in Tiermodellen sind. Die meisten Therapien erfordern eine sehr frühe Intervention. Oft ist weit vor dem eigentlichen Absterben der Photorezeptoren ein Beginn der Behandlung erforderlich. Eine Möglichkeit der Behandlung ist die Gensupplementierungstherapie, die allerdings bei der Behandlung von degenerativen retinalen Dystrophien noch in den Kinderschuhen steckt. Bei dieser Form der Therapie wird ein funktionsfähiges Gen exogen exprimiert und kann damit die Funktion des defekten Gens ersetzen. Für eine erfolgreiche Gentherapie müssen jedoch einige Bedingungen gegeben sein. Es ist dabei entscheidend, ob man dominant oder rezessiv vererbte Erkrankungen behandeln will. Bei rezessiven Formen reicht es meistens aus, die defekte Kopie eines Gens zu ersetzen. Bei autosomal-dominanten Formen gestaltet sich dies schwieriger. Neben der Gensupplementierung ist es außerdem nötig, die endogene mutierte Kopie zu inaktivieren. Weiterhin darf das zu korrigierende Gen eine gewisse Größe nicht überschreiten. Von adenoassoziierten Viren (AAV) abstammende Vektoren, die aktuell zum okularen Gentransfer genutzt werden, haben eine Verpackungskapazität

von ca. 4,7 Kilobasen (kb) [10]. AAV sind relativ klein, 20 nm im Durchmesser, und ihr einzelsträngiges DNA-Genom ist in ikosaedrische Kapside verpackt. Es gibt verschiedene Kapside, auch Serotypen genannt. Zurzeit werden verschiedene Serotypen auf die Erkennung unterschiedlicher zellulärer Oberflächenrezeptoren, und demzufolge unterschiedliche Zellen, getestet [11, 12].

Trotz des Immunprivilegs des Auges müssen mögliche humorale aber auch zelluläre Immunreaktionen bei der AAV-Administration berücksichtigt werden [13]. Während bei der subretinalen Administration von auf AAV basierenden Gen-Shuttles die Gefahr der Bildung von neutralisierenden Antikörpern (nAK) sehr gering ist, können nAK spezifisch für das Vektorvehikel, wie auch für die entsprechenden Transgene, nachgewiesen werden, wenn via intravitrealer Route transduziert wurde [14, 15]. Das erschwert eine mögliche Readministration in dasselbe Auge mit dem gleichen bzw. einer ähnlichen AAV-Serotypvariante. In Affen konnte außerdem gezeigt werden, dass nAK die Expression des Transgens reduzieren bzw. verhindern [16]. Deshalb werden bis heute in klinischen Versuchen nur Subjekte eingeschlossen die kein immunologisches Gedächtnis für AAV aufweisen [17–21]. Außerdem gibt es noch keine verlässlichen Daten über die AAV-Neutralisation und Transduktionseffizienz in Patienten mit fortgeschrittener Degeneration der Retina.

Es gibt bereits große Fortschritte auf dem Gebiet der Behandlung der autosomal-rezessiven Form der Leber'schen kongenitalen Amaurose (LCA) vom Typ 2. Dabei wird das defekte RPE65-Gen, verantwortlich für die Synthese von 11-cis-Retinal, in den Zellen des RPE durch eine korrekte Version supplementiert [22, 23]. Eine wichtige Voraussetzung für die Gentherapie der LCA vom Typ 2 ist das Vorhandensein von Photorezeptoren. Das ist i. d. R. gegeben, da die Beeinträchtigung des Sehens bei LCA primär auf eine Einschränkung der Funktion der Photorezeptoren durch das fehlende 11-cis-Retinal im Opsin und nicht auf Zelltod zurückzuführen ist [24, 25].

Eine weitere Möglichkeit, um degenerative retinale Dystrophien zu behandeln, sind Strategien, die sich auf eine Verlangsamung des Krankheitsverlaufs durch den Einsatz von neuroprotektiven Faktoren konzentrieren [26–28]. Neben diesen wird auch an Methoden gearbeitet, um degenerierte Photorezeptoren durch Transplantationen entweder von Vorläuferzellen oder bereits differenzierten Photorezeptoren zu ersetzen [29, 30].

Elektronische photosensible Implantate, die in die Retina integriert werden, bieten eine weitere Behandlungsstrategie für die Therapie von retinalen Dystrophien. Die elektrische Stimulation der Retina führt zu speziellen Lichtwahrnehmungen, den Phosphenen. Multiarray-Elektroden, die sekundäre und tertiäre Neurone in der Retina anregen, wurden bereits erfolgreich getestet [31]. Die erzeugten Phosphene konnten im Gehirn zu niedrig aufgelösten pixeligen Bildern verrechnet werden. Dadurch waren die Patienten in der Lage, Lichtquellen und einfache Objektformen zu erkennen [32, 33].

Wiederherstellung des Sehens durch optogenetische Strategien

In dieser Übersichtsarbeit soll verstärkt auf eine Alternative, die Optogenetik, als Methode zur Wiederherstellung der Sehfähigkeit bei fortschreitenden degenerativen retinalen Dystrophien eingegangen werden. Die Optogenetik bietet die Möglichkeit, erhaltene, aber lichtunempfindliche Zellen der Retina genetisch so zu modifizieren, dass sie mikrobielle Proteine exprimieren, die durch Licht erregt werden können. Dadurch werden die entsprechenden Zellen zu künstlichen Photorezeptoren. Man bezeichnet mikrobielle lichtgetriebene Ionenpumpen wie Bacteriorhodopsin, Protorhodopsin und Halorhodopsin [34] oder mikrobielle lichtabhängige Ionenkanäle, wie Channelrhodopsin [35], die ohne G-Protein-Signalkaskaden auskommen, als Optogene. Nach der bahnbrechenden Publikation zur Optogenetik 2005 [36], in der Channelrhodopsin-2 erstmals erfolgreich in Nervenzellen getestet wurde, wurden rasch aufeinander folgend verschiedene Strategien zur Wiederherstellung des Sehens propagiert (► **Tab. 1**). Eine davon verfolgte das Ziel, zelltypenspezifisch – also so viele Zellen der Retina wie möglich, hauptsächlich Ganglien- und Amakrinzellen – optogenetisch zu manipulieren [37]. In einem 2. Ansatz wurden zelltypspezifisch nur ON-Bipolarzellen transduziert, um spezifisch die ON-Signalverarbeitung in der Retina zu erhalten [38]. Des Weiteren wurden in einem Ansatz verbleibende Zapfen, welche bereits die OS verloren hatten und somit funktionslos waren, reaktiviert [39]. Folgend wurden die Lichtsignale durch OFF- und ON-Kanäle verarbeitet und weitergeleitet. Im Folgenden werden die verschiedenen Ansätze im Detail vorgestellt.

Expression von Optogenen in Ganglienzellen

Ganglienzellen senden prozessierte Signale der Retina über ihre Axone zu höheren Gehirnregionen. Bei retinalen Dystrophien bleiben Ganglienzellen weitestgehend erhalten [40, 41]. Dadurch sind sie auch in späten Stadien der Erkrankungen geeignete Ziele für optogenetische Therapien. Um Gene zu exprimieren, bedarf es Promotersequenzen auf DNA-Ebene, welche die Transkription initiieren. Promotersequenzen unterscheiden sich in ihrer Aktivität. Es gibt ubiquitär, also in allen Zellen und zellspezifisch aktive Promotoren. Für Ganglienzellen wurden bisher keine spezifischen Promotorelemente beschrieben, die durch AAV-Genstransfer übertragbar wären. Daher werden ubiquitäre Promotoren verwendet, die zur Genexpression in OFF- und ON-Zellen führen.

Bereits 2006 wurde im Pan Labor gezeigt, dass ein Fusionsprotein bestehend aus ChR2 und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) nach AAV-Genstransfer in inneren Zellen der Retina – vorwiegend Ganglienzellen – von blinden Mäusen exprimiert werden kann. Das Optogen wurde dabei durch einen ubiquitären Promotor exprimiert [37]. Robuste ON-Antworten in ON- und OFF-Ganglienzellen wurden erzielt und damit auch zu höheren Gehirnregionen gesandt. Selbst bei 18 Monate alten Mäusen (rd-Modell) mit fortgeschrittener Degeneration konnte eine ChR2-Expression

und Aktivität gezeigt werden. Inzwischen werden sensitivere ChR2-Varianten in Mausganglienzellen getestet [42].

ChR2 wurde ebenfalls erfolgreich in Ganglienzellen von blinden Ratten exprimiert. Die Ganglienzellen zeigten nach Lichtstimulation Erregungsmuster, und die Ratten erzielten in visuellen Verhaltenstests bessere Resultate als die unbehandelten Kontrolltiere [43]. Jüngere Tiere zeigten generell eine höhere Expression des ChR2 nach AAV-Transduktion als ältere Tiere [44]. Eine modifizierte Variante des Channelrhodopsins-1 von *Volvox* wurde ebenfalls erfolgreich in Ganglienzellen von blinden Ratten exprimiert [45]. Die Langzeitexpression von ChR2 in Ratten führte nur zu milden Immunreaktionen gegen das virale Kapsidprotein.

Allerdings wurde ChR2 auch im Herz, der Lunge und dem Darm nachgewiesen [46]. Dies zeigt, dass AAVs das Auge verlassen und in andere Organe einwandern können und dort zu ungewollter Expression des ChR2 führen.

Ein weiterer wichtiger Schritt hin zur klinischen Anwendung von ChR2 als lichtdetektierendem Photorezeptorersatz ist der effiziente Transfer und eine optimale Expression in nicht humanen Primaten. Außerdem muss sichergestellt werden, dass die optogenetischen Werkzeuge im Menschen keine immunologischen Reaktionen hervorrufen. Erste Ergebnisse zeigen, dass ChR2 in Ganglienzellen von Seidenaffen (engl.: Marmosets) erfolgreich exprimiert werden kann. Es konnte eine hohe ChR2-Expression festgestellt werden. Allerdings zeigten nur Zellen in der Peripherie (perifoveal ringförmig) und nicht im Zentrum der Fovea signifikante ChR2-Expression. Die Funktion von ChR2 wurde nach entsprechender Lichtstimulation durch elektrophysiologische Tests nachgewiesen. In dieser Studie wurden allerdings nur wenige Tiere getestet, und Aussagen zu immunologischen Reaktionen auf das Fremdprotein wurden nicht getroffen [47].

Weiterentwickelte ChR-Derivate, z. B. die durch rotes Licht aktivierbaren *Volvox*-Channelrhodopsin-1 (mVChR1) [45] und ReaChR [48], aber auch endogene Photopigmente wie Melanopsin [49], wurden bereits in Tieren getestet. ReaChR führt zu lichtabhängigen Antworten sowohl in Ganglienzellen von blinden Mäusen (rd1) wie auch im Kortex der Tiere. Weiterhin konnten sowohl in Makaken wie auch in menschlichen Retinaexplantaten Aktionspotenzialantworten in Ganglienzellen auf Stimuli mit orangefarbigem Licht (600 nm) gezeigt werden [50]. Durch die Verschiebung der aktivierenden Lichtstimuli hin zu längerwelligen Bereichen (von 470 zu 560 nm) vermindert sich die Gefahr der Phototoxizität deutlich [48, 50, 51]. Jedoch muss bedacht werden, dass das Optogen ReaChR sehr langsam ist und nur Aktionspotenziale mit geringer Frequenz bewirkt. Dieser Nachteil kann durch andere ChR-Derivate wie ChRimson umgangen werden [52].

Expression von Optogenen in inneren Zellen der Retina

Es gibt mehrere Gründe, vorzugsweise innere Zellen der Retina, wie Amakrinzellen oder Bipolarzellen, mit optogenetischen Werkzeugen auszustatten: Zum einen erhält man wichtige Signalverarbeitungsschritte durch die Interaktion von hemmenden Horizontal- und Amakrinzellen. Zum anderen kann man die Expression

► **Tab. 1** Optogenetische Strategien: Übersicht über eingesetzte Optogene und Zielzellen in verschiedenen Tiermodellen retinaler Dystrophien.

Optogen	Art	Photo-rezeptoren	Bipolar-zellen	Amakrin-zellen	Ganglien-zellen	Referenz	Jahr	PMID
ChR2	Mus musculus			x	x	Bi et al. [37]	2006	16600853
ChR2	Mus musculus		x			Lagali et al. [38]	2008	18432197
Melanopsin	Mus musculus				x	Lin et al. [48]	2008	18836071
ChR2	Rattus norvegicus				x	Tomita et al.	2009	19893752
ChR2	Rattus norvegicus				x	Tomita et al.	2009	20036655
ChR2	Rattus norvegicus				x	Tomita et al. [43]	2010	20036655
ChR2	Callithrix jacchus				x	Ivanova et al. [47]	2010	20484599
eNpHR	Mus musculus, Homo sapiens (post mortem)	x				Busskamp et al. [39]	2010	20576849
ChR2	Mus musculus				x	Thyagarajan et al.	2010	20592196
ChR2 and NpHR	Oryctolagus cuniculus				x	Greenberg et al.	2011	21338881
ChR2	Mus musculus		x			Doroudchi et al. [57]	2011	21505421
ChR2	Rattus norvegicus				x	Isago et al. [44]	2012	21792608
VChR1	Rattus norvegicus				x	Tomita et al. [45]	2014	24821344
ChR2 derivatives	Mus musculus				x	Pan et al. [42]	2014	24901492
ChR2	Mus musculus		x			Macé et al. [58]	2015	25095892
ChR2 derivatives	Mus musculus		x			Cronin et al. [56]	2014	25092770
Jaws, Halo57, ArchT, Mac	Mus musculus	x				Chuong et al. [71]	2014	24997763
humanes Rhodopsin	Mus musculus		x			Cehajic-Kapetanovic et al. [61]	2015	26234216
humanes Rhodopsin	Mus musculus		x			Gaub et al. [62]	2015	26137852
Opto-mGluR6	Mus musculus		x			van Wyk et al. [60]	2015	25950461
ReaChR	Mus musculus, Macaca fascicularis, Homo sapiens (retinal explants)				x	Sengupta et al. [50]	2016	27679671

von ChR2 wirklich auf die innere immunkompetente Retina beschränken.

Es hat sich gezeigt, dass die Injektion von AAV-ChR2-Partikeln mit ubiquitären Promotorelementen in den Bulbus oculi, nach intravitrealer Applikation, zu einer hohen Expression von ChR2 in Ganglienzellen, aber zu einer nur äußerst schwachen Expression in inneren Zellen der Retina, wie den Amakrin- und Bipolarzellen, führt. Damit verhält sich die Ganglienzellschicht wie ein Schwamm und verhindert, dass genügend Viruspartikel die inneren Retinazellen infizieren. Durch eine andere Injektionstechnik können die viralen Partikel unter die Retina gelangen, also zwischen Photorezeptoren und RPE-Zellen. Rekombinante Viruskapside, die nicht mit Oberflächenrezeptoren der Ganglienzellen interagieren, werden auch bereits eingesetzt [53].

Es konnte gezeigt werden, dass das Einfügen einer kurzen Sequenz der mGLUR6-Promotorregion ausreicht, um die ChR2-Expression auf ON-Bipolarzellen von blinden rd-Mäusen zu beschränken [38]. Die spezifische Reaktivierung des ON-Signalwegs in Abwesenheit von aktiven Photorezeptoren führte zur Aktivierung von ON-Ganglienzellen und zu Signalen in höheren kortikalen Regionen. Die so behandelten Mäuse erzielten signifikant bessere Resultate in visuellen Verhaltenstests als nicht behandelte

Mäuse. Es konnte gezeigt werden, dass die Signalverarbeitung innerhalb der Retina, wie laterale Inhibition, erhalten bleibt. Diese ersten Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Wiederherstellung der Lichtwahrnehmung über die inneren Schichten der Retina möglich ist. Allerdings konnte die zellspezifische Expression von ChR2 in den ON-Bipolarzellen nur durch In-vivo-Elektroporation erreicht werden [54]. Dieses Verfahren eignet sich allerdings nicht zur klinischen Anwendung am Menschen. Zu dieser Zeit gab es noch keine AAV-Kapside, die effizient und spezifisch Bipolarzellen transduzieren konnten. Erst intensive Studien mit modifizierten AAV-Kapsiden führten zu einer neuen Generation von AAVs, die effizient Maus-ON-Bipolarzellen transduzieren können [55]. Die effiziente Expression von ChR2 nach intravitrealer Applikation konnte erreicht werden und wurde durch die Verwendung von mGLUR6-Tandempromotorelementen noch verstärkt [56–58]. Außerdem wurden verbesserte Varianten des ChR2 durch AAV-Transduktion von ON-Bipolarzellen getestet [59].

Um die Sensitivität zu erhöhen und gleichzeitig die möglichen immunologischen Reaktionen auf die mikrobiellen Opsine zu verringern, wurden bereits Vertebratenopsine in ON-Bipolarzellen getestet. Dabei zeigte eine modifizierte Variante des Melanopsins, ein Fusionsprotein bestehend aus Melanopsin und der intrazellulä-

ren Domäne des mGluR6, das sog. Opto-mGluR6, eine deutlich höhere Sensitivität als das Wildtypprotein ChR2 [60]. Auch humanes Rhodopsin, das Photopigment der Stäbchen, wurde mithilfe von AAV-Transduktion ektopisch und spezifisch in Maus-ON-Bipolarzellen exprimiert. Die behandelten Netzhäute der RP-Mausmodelle zeigten ähnliche Aktivität wie Netzhäute mit ektopischer ChR2-Expression, allerdings schon bei einer 200-fach niedrigeren Lichtintensität. ChR2 ist nur über einen Bereich von 2 log-Einheiten Lichtintensität aktiv, wohingegen Rhodopsin über 5 log-Einheiten reagiert. Diese Mäuse zeigten Reaktionen auf Beleuchtungsstärken wie sie in ihrer natürlichen Umgebung vorkommen ($\approx 50\text{--}100\text{ lx}$). Diese behandelten Mäuse schnitten ebenfalls besser in Verhaltenstests ab. Es konnten alle Arten von Ganglienzellantworten, wie ON, OFF, langanhaltend und transient, beobachtet und damit wiederhergestellt werden [61, 62].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Einführung von optogenetischen Werkzeugen in innere Zellen der Retina, wie ON-Bipolarzellen, zu einer Wiederherstellung zumindest des ON-Signalwegs führt. Es ist nur eine Frage der Zeit, bis spezifische Promotorregionen für OFF-Bipolarzellen zur Verfügung stehen und damit beide wichtigen Signalwege, der ON- und der OFF-Signalweg, rekonstruiert werden können.

Expression von Optogenen in Photorezeptoren

Retinale Degenerationserkrankungen sind durch den Verlust von Photorezeptorzellen gekennzeichnet, wobei die Stäbchen relativ schnell degenerieren. Bei der RP verlieren die Zapfen meistens zuerst die OS, verweilen jedoch und deren Zellkörper verschmelzen mit der inneren Körnerschicht (INL) [39, 63]. Untersuchungen zeigten, dass das Absterben der Zapfen nicht ultimativ, sondern von Patient zu Patient variabel ist [64]. Dies erschwert das Entwickeln einer allgemeinen Therapie, ermöglicht aber eine Erweiterung des therapeutischen Fensters und damit den Einsatz von optogenetischen Strategien.

Photorezeptoren können sehr einfach mit AAVs infiziert werden. Dafür werden diese unter die Retina injiziert. Das führt zu einem kurzzeitigen, unproblematischen Ablösen der Retina von dem RPE [65]. Diese Injektionen sind zurzeit Standardmethode in vielen Versuchstieranordnungen, bspw. bei Maus, Ratte, Hund, Katze, Schwein und nicht humanen Primaten [66–69]. Auch in klinischen Tests, bspw. bei der Behandlung von LCA Typ 2, die durch die Mutation von RPE65 bedingt ist, wird unter die Retina appliziert [65]. Es gibt zudem sehr viele geeignete photorezeptorspezifische Promotorelemente für die gerichtete Expression von Optogenen in Zapfen.

Falls man degenerierte Photorezeptoren wieder aktivieren könnte, wäre man in der Lage die beiden Hauptsignalwege, ON und OFF, wiederzubeleben. Erste Experimente an 2 RP-Mausmodellen zeigten, dass die Expression der lichtgesteuerten hyperpolarisierenden Cl^- -Pumpe eNpHR [70] in funktionslosen Zapfen zur Wiederherstellung sowohl des ON- als auch des OFF-Signalwegs führt [39, 70]. Gleichzeitig zeigten die Mäuse richtungsselektive Reaktionen. Das heißt, dass dort auch die inneren neuronalen Netzwerke aktiv gewesen sein mussten. Die Mäuse waren in der La-

ge, die prozessierte Lichtinformation an höhere kortikale Gebiete zu senden. Sie zeigten ein deutlich besseres Ergebnis in visuellen Verhaltenstests als unbehandelte Mäuse. Durch zapfenspezifische Promotorelemente war die Expression nur auf Zapfen beschränkt.

Das ist wichtig, da eNpHR die Zellen bei Lichteinfall hyperpolarisiert, was in Zapfen zu einer Aktivierung führt, in Interneuronen der Retina allerdings zur Inhibierung und somit zum Ausscheiden aus dem visuellen Verarbeitungspfad. Die Expression von eNpHR in Zapfen von Wildtypmäusen führte zur Erweiterung des dichromatischen Sehens. Diese Mäuse reagierten nun sensibler auf längerwelliges Licht. Daraus kann man schließen, dass sowohl die intrinsische Phototransduktionskaskade als auch das ektopisch exprimierte Optogen gleichzeitig aktiv waren. Es wurden keine weiteren Nebenwirkungen durch die ektopische Expression von eNpHR in den Retinae von Mäusen festgestellt. Eine weitere wichtige Untersuchung zeigte, dass die Expression von eNpHR in humanen Post-mortem-Retinaexplantaten die Funktion von Photorezeptoren wiederherstellen kann [39]. Ein großer Vorteil von eNpHR ist sein Absorptionsmaximum bei 580 nm, denn Photonen mit dieser Wellenlänge sind wenig phototoxisch. Zudem ist laut europäischen Richtlinien die Menge an Licht, die zu einer vollständigen Sättigung von eNpHR führt, sicher, und eNpHR ist über 2,3 log-Einheiten aktiv. Des Weiteren wurden bereits sensitivere hyperpolarisierende Optogene erfolgreich in Retinae von Mäusen getestet, sodass potenzielle Phototoxizität so gut wie ausgeschlossen werden kann [71]. Durch die Reaktivierung der funktionsunfähigen Zapfen erhofft man sich eine hohe Auflösung und Sehschärfe. Normalerweise sind die Zapfen im Bereich der Fovea in Schichten angeordnet. Die maximale Auflösung des Bildes wird daher durch die Größe des äußeren Segments bestimmt [72]. Dieser Umstand führt jedoch zu einer Einschränkung des Auflösungsvermögens durch optogenetische Intervention, denn in RP verlieren die Zapfen ihre OS und damit den lichtempfindlichen Teil. Das Optogen eNpHR wird dann in der Membran des ganzen Zellkörpers exprimiert, wodurch die maximal mögliche Auflösung dann jenem Durchmesser entspricht.

Schlussfolgerung

Es gibt verschiedene therapeutische Strategien, die man bei degenerativen retinalen Dystrophien einsetzen kann. Diese hängen u. a. vom Verlauf und dem Schweregrad der Erkrankung ab. Die Optogenetik als mutationsunabhängige Methode für die Wiederherstellung der Sehfähigkeit ist eine vielversprechende Alternative zu anderen gentechnischen therapeutischen Ansätzen. Durch die fehlende signalverstärkende Amplifikation der mikrobiellen Opsine kann jedoch niemals eine so hohe Lichtempfindlichkeit wie bei den intrinsischen Opsinen erreicht werden. Allerdings kann an einer verbesserten Verknüpfung von durch Optogenen ausgelösten Signalen mit den signalverstärkenden zelleigenen G-Proteinkaskaden gearbeitet werden. Auch neue optogenetische Werkzeuge wie hyperpolarisierende Anionenkanäle [73], die in Photorezeptoren, OFF-Bipolar- oder OFF-Ganglienzellen exprimiert werden könnten, sind vielversprechende Entdeckungen. Der wichtigste Schritt, die Translation der Optogenetik hin zur klinischen Anwendung, wurde durch Experten kritisch diskutiert und positiv

beurteilt [74]. Die ersten klinischen Versuche mit Wildtyp-ChR2 wurden bereits Ende 2015 begonnen (NCT02556736). Zurzeit werden die ersten Patienten der Niedrigdosisgruppe im Rahmen der Phase-I/-II-Studie der Firma RetroSense (Allergan) behandelt. Auch Gensight, ein europäisches Biotech-Unternehmen, befindet sich mit seinem Produkt GS030 in der Endphase der präklinischen Tests und wird voraussichtlich Ende 2017 erste klinische Studien in Menschen initiieren können. GS030 besteht aus einer ChR-Variante verpackt in rekombinanten AAV2-Kapsiden und einer biometrischen Brille zur Signalverstärkung (<http://www.gensight-biologics.com>). Damit soll eine optimale Stimulation der transduzierten Zellen der Retina mit Licht erreicht werden.

Mit den heutigen optogenetischen Werkzeugen ist es möglich, die Sehfähigkeit auf monochromatischer Ebene wiederherzustellen. Dafür sind aber weitere Hilfsmittel nötig, bspw. technische lichtverstärkende Sehhilfen, die das Licht selbst bei natürlichem Raumlicht so verstärken, dass mikrobielle Optogene effizient aktiviert werden [75]. Wichtig dabei ist, dass die Sehhilfe keine weiteren Schäden durch hohe Lichtintensitäten verursacht [51]. Die geringere Lichtempfindlichkeit der mikrobiellen Optogene und damit die Notwendigkeit der Verstärkung des Lichtsignals durch exogene Hilfsmittel kann für erste klinische Tests an Menschen auch ein Vorteil sein. Kommt es zu unerwarteten Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen oder Schwindel nach Lichtreizen, kann rasch die Intensität des einfallenden Lichtes durch das Abnehmen der Sehhilfe vermindert werden. Das größte Ziel jedoch – das Farbsehen durch Optogenetik zu regenerieren – liegt in weiter Ferne. Es ist technisch äußerst anspruchsvoll, denn es werden mehrere spektral verschobene Optogene, die zelltypspezifisch optimal exprimiert werden müssen und immunologisch unbedenklich sind, benötigt. Die Probleme für ein Optogen potenzieren sich somit mit der Anzahl der gewünschten Farbkanäle.

Vielleicht reichen optogenetische Interventionen allein nicht aus, um trotz der reaktivierten Photorezeptoren die Degeneration der Retina zu stoppen. Dies wurde bei Forschungen an LCA vom Typ 2 in einem Hundemodell deutlich [24]. Zusätzliche neuroprotektive Interventionen könnten allerdings helfen, um einen nachhaltigen Therapieeffekt zu erhalten [76].

Interessenkonflikt

Nein.

Literatur

- [1] Masland RH. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 2001; 4: 877–886
- [2] Rodieck RW. *The First Steps in Seeing*. Sunderland, MA: Sinauer Associates; 1998
- [3] Baden T, Berens P, Franke K et al. The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature* 2016; 529: 345–350
- [4] Roska B, Werblin F. Vertical interactions across ten parallel, stacked representations in the mammalian retina. *Nature* 2001; 410: 583–587
- [5] Provis JM, Diaz CM, Dreher B. Ontogeny of the primate fovea: a central issue in retinal development. *Prog Neurobiol* 1998; 54: 549–580
- [6] Wald G. The receptors of human color vision. *Science* 1964; 145: 1007–1016
- [7] Bramall AN, Wright AF, Jacobson SG et al. The genomic, biochemical, and cellular responses of the retina in inherited photoreceptor degenerations and prospects for the treatment of these disorders. *Annu Rev Neurosci* 2010; 33: 441–472
- [8] Al Gwairi O, Thach L, Zheng W et al. Cellular and molecular pathology of age-related macular degeneration: potential role for proteoglycans. *J Ophthalmol* 2016; 2016: 2913612
- [9] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 2006; 368: 1795–1809
- [10] Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; 99: 119–145
- [11] Ojala DS, Amara DP, Schaffer DV. Adeno-associated virus vectors and neurological gene therapy. *Neuroscientist* 2015; 21: 84–98
- [12] Salganik M, Hirsch ML, Samulski RJ. Adeno-associated virus as a mammalian DNA vector. *Microbiol Spectr* 2015; DOI: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0052-2014
- [13] Willett K, Bennett J. Immunology of AAV-mediated gene transfer in the eye. *Front Immunol* 2013; 4: 261
- [14] De Kozak Y, Andrieux K, Villarroya H et al. Intraocular injection of tamoxifen-loaded nanoparticles: a new treatment of experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur J Immunol* 2004; 34: 3702–3712
- [15] Van der Voet JC, Liem A, Otto AJ et al. Intraocular antibody synthesis during experimental uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 316–322
- [16] Kotterman MA, Yin L, Strazzeri JM et al. Antibody neutralization poses a barrier to intravitreal adeno-associated viral vector gene delivery to non-human primates. *Gene Ther* 2015; 22: 116–126
- [17] Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S et al. Treatment of Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 2008; 19: 979–990
- [18] Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R et al. Gene therapy for Leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch Ophthalmol* 2012; 130: 9–24
- [19] Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2240–2248
- [20] McPhee SW, Janson CG, Li C et al. Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease. *J Gene Med* 2006; 8: 577–588
- [21] Nathwani AC, Tuddenham EGD, Rangarajan S et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 2011; 365: 2357–2365
- [22] Testa F, Maguire AM, Rossi S et al. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital amaurosis type 2. *Ophthalmology* 2013; 120: 1283–1291
- [23] Weleber RG, Pennesi ME, Wilson DJ et al. Results at 2 years after gene therapy for RPE65-deficient Leber congenital amaurosis and severe early-childhood-onset retinal dystrophy. *Ophthalmology* 2016; 123: 1606–1620
- [24] Cideciyan AV, Jacobson SG, Beltran WA et al. Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: E517–E525
- [25] Jacobson SG, Cideciyan AV, Roman AJ et al. Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness. *N Engl J Med* 2015; 372: 1920–1926
- [26] Froger N, Moutsimilli L, Cadetti L et al. Taurine: the comeback of a neurotransmitter in the prevention of retinal degenerations. *Prog Retin Eye Res* 2014; 41: 44–63
- [27] Léveillard T, Fridlich R, Clérin E et al. Therapeutic strategy for handling inherited retinal degenerations in a gene-independent manner using rod-derived cone viability factors. *C R Biol* 2014; 337: 207–213
- [28] Trifunović D, Sahaboglu A, Kaur J et al. Neuroprotective strategies for the treatment of inherited photoreceptor degeneration. *Curr Mol Med* 2012; 12: 598–612

- [29] Jayakody SA, Gonzalez-Cordero A, Ali RR et al. Cellular strategies for retinal repair by photoreceptor replacement. *Prog Retin Eye Res* 2015; 46: 31–66
- [30] Lakowski J, Gonzalez-Cordero A, West EL et al. Transplantation of photoreceptor precursors isolated via a cell surface biomarker panel from embryonic stem cell-derived self-forming retina. *Stem Cells* 2015; 33: 2469–2482
- [31] Weiland JD, Liu W, Humayun MS. Retinal prosthesis. *Annu Rev Biomed Eng* 2005; 7: 361–401
- [32] Chader GJ, Weiland J, Humayun MS. Artificial vision: needs, functioning, and testing of a retinal electronic prosthesis. *Prog Brain Res* 2009; 175: 317–332
- [33] Zrenner E, Bartz-Schmidt KU, Benav H et al. Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proc Biol Sci* 2011; 278: 1489–1497
- [34] Oesterheld D. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8: 489–500
- [35] Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M et al. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 2002; 296: 2395–2398
- [36] Boyden ES, Zhang F, Bamberg E et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 2005; 8: 1263–1268
- [37] Bi A, Cui J, Ma Y-P et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 2006; 50: 23–33
- [38] Lagali PS, Balya D, Awatramani GB et al. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci* 2008; 11: 667–675
- [39] Busskamp V, Duebel J, Balya D et al. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science* 2010; 329: 413–417
- [40] Jones BW, Pfeiffer RL, Ferrell WD et al. Retinal remodeling in human retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res* 2016; 150: 149–165
- [41] Marc RE, Jones BW, Watt CB et al. Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22: 607–655
- [42] Pan Z-H, Ganjawala TH, Lu Q et al. Chr2 mutants at L132 and T159 with improved operational light sensitivity for vision restoration. *PLoS One* 2014; 9: e98924
- [43] Tomita H, Sugano E, Isago H et al. Channelrhodopsin-2 gene transduced into retinal ganglion cells restores functional vision in genetically blind rats. *Exp Eye Res* 2010; 90: 429–436
- [44] Isago H, Sugano E, Wang Z et al. Age-dependent differences in recovered visual responses in Royal College of Surgeons rats transduced with the channelrhodopsin-2 gene. *J Mol Neurosci* 2012; 46: 393–400
- [45] Tomita H, Sugano E, Murayama N et al. Restoration of the majority of the visual spectrum by using modified Volvox channelrhodopsin-1. *Mol Ther* 2014; 22: 1434–1440
- [46] Sugano E, Isago H, Wang Z et al. Immune responses to adeno-associated virus type 2 encoding channelrhodopsin-2 in a genetically blind rat model for gene therapy. *Gene Ther* 2011; 18: 266–274
- [47] Ivanova E, Hwang GS, Pan ZH et al. Evaluation of AAV-mediated expression of Chop2-GFP in the marmoset retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 5288–5296
- [48] Lin JY, Knutsen PM, Muller A et al. ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nat Neurosci* 2013; 16: 1499–1508
- [49] Lin B, Koizumi A, Tanaka N et al. Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 16009–16014
- [50] Sengupta A, Chaffiol A, Macé E et al. Red-shifted channelrhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina. *EMBO Mol Med* 2016; 8: 1248–1264
- [51] Degenaar P, Grossman N, Memon MA et al. Optobionic vision – a new genetically enhanced light on retinal prosthesis. *J Neural Eng* 2009; 6: 035007
- [52] Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS et al. Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat Methods* 2014; 11: 338–346
- [53] Kim DS, Matsuda T, Cepko CL. A core paired-type and POU homeodomain-containing transcription factor program drives retinal bipolar cell gene expression. *J Neurosci* 2008; 28: 7748–7764
- [54] Matsuda T, Cepko CL. Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 1027–1032
- [55] Dalkara D, Byrre LC, Klimczak RR et al. In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci Transl Med* 2013; 5: 189ra76
- [56] Cronin T, Vandenberghe LH, Hantz P et al. Efficient transduction and optogenetic stimulation of retinal bipolar cells by a synthetic adeno-associated virus capsid and promoter. *EMBO Mol Med* 2014; 6: 1175–1190
- [57] Doroudchi MM, Greenberg KP, Liu J et al. Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness. *Mol Ther* 2011; 19: 1220–1229
- [58] Macé E, Caplette R, Marre O et al. Targeting channelrhodopsin-2 to ON-bipolar cells with vitreally administered AAV restores ON and OFF visual responses in blind mice. *Mol Ther* 2015; 23: 7–16
- [59] Kleinlogel S, Feldbauer K, Dempski RE et al. Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nat Neurosci* 2011; 14: 513–518
- [60] Van Wyk M, Pielecka-Fortuna J, Löwel S et al. Restoring the ON switch in blind retinas: Opto-mGluR6, a next-generation, cell-tailored optogenetic tool. *PLoS Biol* 2015; 13: e1002143
- [61] Cehajic-Kapetanovic J, Eleftheriou C, Allen AE et al. Restoration of vision with ectopic expression of human rod opsin. *Curr Biol* 2015; 25: 2111–2122
- [62] Gaub BM, Berry MH, Holt AE et al. Optogenetic vision restoration using rhodopsin for enhanced sensitivity. *Mol Ther* 2015; 23: 1562–1571
- [63] Lin B, Masland RH, Strettoi E. Remodeling of cone photoreceptor cells after rod degeneration in rd mice. *Exp Eye Res* 2009; 88: 589–599
- [64] Jacobson SG, Roman AJ, Aleman TS et al. Normal central retinal function and structure preserved in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 1079–1085
- [65] Bainbridge JWB, Smith AJ, Barker SS et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2231–2239
- [66] Bruewer AR, Mowat FM, Bartoe JT et al. Evaluation of lateral spread of transgene expression following subretinal AAV-mediated gene delivery in dogs. *PLoS One* 2013; 8: e60218
- [67] Li Q, Timmers AM, Guy J et al. Cone-specific expression using a human red opsin promoter in recombinant AAV. *Vision Res* 2008; 48: 332–338
- [68] Vandenberghe LH, Bell P, Maguire AM et al. AAV9 targets cone photoreceptors in the nonhuman primate retina. *PLoS One* 2013; 8: e53463
- [69] Ye G-J, Budzynski E, Sonntag P et al. Cone-specific promoters for gene therapy of achromatopsia and other retinal diseases. *Hum Gene Ther* 2016; 27: 72–82
- [70] Gradinaru V, Thompson KR, Deisseroth K. eNpHR: a Natronomonas halorhodopsin enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol* 2008; 36: 129–139
- [71] Chuong AS, Miri ML, Busskamp V et al. Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. *Nat Neurosci* 2014; 17: 1123–1129
- [72] Provis JM, Dubis AM, Maddess T et al. Adaptation of the central retina for high acuity vision: cones, the fovea and the avascular zone. *Prog Retin Eye Res* 2013; 35: 63–81
- [73] Govorunova EG, Sineshchekov OA, Janz R et al. Natural light-gated anion channels: a family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics. *Science* 2015; 349: 647–650