

光遗传技术在视网膜相关疾病的应用及研究进展

林潇 综述 张明亮 张晓敏 审校

天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼视光学院 天津医科大学眼科研究所 天津市视网膜功能与疾病重点实验室 300384

通信作者: 张晓敏, Email: xzhang08@tmu.edu.cn

【摘要】 光遗传学是一种将光能和基因学结合的技术,采用光介导的蛋白-蛋白相互作用控制活细胞内信号转导通道的开启与关闭,或信号通路元件的激活与失活。近年来新兴的光遗传工具为在时空方面控制生命体细胞信号转导打开了一扇新的大门。人眼本身就是一个光信号-生物电的光电转换系统,将光遗传技术应用于视网膜相关疾病的治疗具有很大的优势,一些新型的光遗传工具层出不穷。本文将重点探讨光遗传控制细胞的主要方式及采用光遗传技术治疗视网膜相关疾病的研究进展与展望。

【关键词】 光遗传; 视蛋白; 视网膜疾病

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.02.012

Application and research progress of optogenetic technology in retinal diseases

Lin Xiao, Zhang Mingliang, Zhang Xiaomin

Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Eye Institute and School of Optometry, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Zhang Xiaomin, Email: xzhang08@tmu.edu.cn

【Abstract】 Optogenetics is a technique combining optics and the power of light with genetics; it uses light-mediated protein-protein interactions to control the open/closed state of channels or the activation/inactivation states of signaling components within live cells. Recently developed optogenetic tools offer exciting opportunities by enabling signaling regulation with superior temporal and spatial resolution. The eye is a light-bioelectric conversion system. Compared with diseases of other organs, there are great advantages to apply optogenetics to the treatment of ophthalmic conditions, as new optical genetic tools are rapidly emerging. This article will focus on the main methods of optogenetic control of cells and the current status and outlook of its application in retinal diseases.

【Key words】 Optogenetics; Opsins; Retinal diseases

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.02.012

光遗传学是将光能和基因工程学结合的技术,其通过光介导的蛋白-蛋白相互作用,进而控制活细胞内通道的开启与关闭或信号通路元件的激活与失活^[1]。近来新兴的光遗传工具具有优越的时空分辨率、易转运、快速的可逆性、极少的错误靶向以及可剖析复杂信号传导网等优势,为在时空方面控制生命体细胞信号转导打开了一扇新的大门^[2]。将光遗传学应用于活体可实时控制细胞内的信号转导。眼是一个光信号-生物电的光电转换系统,且眼自身是一个透光系统,因此将光遗传技术应用于眼科疾病的治疗具有无需侵入性手术植入电极、实时观测等优点。目前用光遗传技术控制细胞主要有 2 种方式:一种是用光控制基因性引入的视蛋白,另一种是用光控制细胞内蛋白与蛋白相互作用进而调节信号通路。

1 基于基因编码视蛋白的光控制

视蛋白是一个由视基因编码、与视网膜感光细胞结合、7 次

跨膜、有光敏感特性的蛋白质家族^[3]。视蛋白的功能类似光反应离子泵或感觉感受器,存在于包括真核细胞和细菌在内的所有有机体内^[4]。视蛋白基因主要分为微生物型视蛋白和动物型视蛋白 2 个家族。微生物型视蛋白即 I 型,在原核细胞、绿藻及真菌中被发现,以全反式构型利用视网膜编码蛋白质;动物型视蛋白即 II 型,仅存在于更高级的真核细胞中并且主要用于视觉,编码 G 蛋白偶联受体^[5]。

1.1 微生物型视蛋白

光遗传中常使用的微生物型视蛋白包括光敏感通道蛋白(channelrhodopsin, ChR)和光驱动泵,如嗜盐菌视紫红质(halorhodopsin, HaloR)和古紫质(archaerhodopsin, Arch)^[6]。1971 年, Oesterhelt 等^[7]发现了菌视紫红质,一种从盐生盐杆菌的紫色膜提取的视紫红质样蛋白,可以在光照下泵质子。微生物型视蛋白捕捉光能后,可激活其跨膜离子泵功能,也可以打开离子通道,使得离子流被动跨膜。

ChR 是绿藻来源、可被蓝光激活的非特异性阳离子通道^[8]。ChR1 和 ChR2 均发现于莱茵衣藻。这 2 种蛋白表现出快速的动力学,可使基因靶向细胞在光照下发生细胞靶向去极化。目前被广泛研究的是 ChR2,其最适光反应波长是 470 nm^[9-11]。Bi 等^[12]在 2006 年第 1 次将此光遗传工具用于治疗视网膜退行性病变的研究。

HaloR 是一类古细菌来源的光驱动内向氯离子通道^[13]。当其表达在靶向细胞内并且受黄光刺激时,可将氯离子从细胞外泵到细胞内,通过超极化介导靶细胞连续性抑制^[14]。最先被用于神经元的 HaloR 来源于一种名为法老(嗜)盐碱单孢菌的古细菌,其最适光反应波长为 580 nm^[7,15]。

Arch,例如 Arch-3,是从红皮嗜盐菌而来的光驱动外向质子泵,其表达于神经元并受黄光或绿光刺激时,将正电荷泵到细胞外,使细胞超极化。Arch T 是一个光敏感性更强的分子,最近被应用于抑制大脑区域。Arch 和 Arch T 兴奋光波波长最大值约为 566 nm^[16-17]。

人类视觉具有宽光谱(400~700 nm)和高时间分辨率的光敏度。ChR2 的最适光反应波长为 470 nm,然而这种较短波长的光对眼有损伤,为了恢复视力,研究人员需进一步发现优于 ChR2 的新型光遗传工具。目前研究人员通过修饰将离子通道红移到更安全的波长范围内。Zhang 等^[18]发现了来自团藻的 VChR1,与 ChR2 相比,该通道的最适光反应波长为 589 nm。虽然该红移通道有应用价值,但由于质膜整合效率低下,该通道不能很好地表达。红移嵌合通道 ReaChR 和 mVChR1 已被证明对啮齿类动物有恢复视力的作用,且 ReaChR 对灵长类动物有恢复视力的效果^[19]。mVChR1 是整个人类视觉光谱中唯一对光有反应的离子通道,使其成为一种很有前途的基因治疗候选靶点。为了进一步提高光谱敏感性,同一组使用 mVChR1 和 ChR2 来恢复致盲小鼠的视力,结果使用多个视蛋白在整个光谱中产生的光反应比单独使用一个视蛋白更强^[20]。ChrimsonR 是另一种强有力的恢复视力光遗传基因治疗的候选靶点^[21],目前正在进行临床试验。

Govorunova 等^[22-23]先后发现了 GtACRs 和 PsuACR_973 这 2 种不同来源的阴离子通道型视紫红质,前者光敏感度较 Arch 增加了 1 000 倍,后者激活-失活时间较 GtACR2 缩短了 95%,而光电流幅度增加了近 40%。

1.2 动物型视蛋白

动物型视蛋白,例如视紫红质和视黑素,属于天然的光驱动 G 蛋白偶联受体的大家族,并且它们是光遗传应用的重要工具^[24-25]。与微生物型视蛋白相比,动物型视蛋白的光敏感性更高,因为光信号可被 G 蛋白偶联信号级联放大^[14]。之前的研究显示,脊椎动物的视紫红质或脊椎动物的视锥视蛋白可以作为光遗传工具使用,在较低的光水平去控制神经的兴奋性^[26-27]。

第 1 个适用于视力恢复的动物性视蛋白是视黑素^[28],其被称为本质上的光敏神经节细胞。当通过玻璃体内注射到神经节细胞层或视网膜下的视网膜细胞时,经视黑素处理的视网膜对光的敏感性明显优于其他视蛋白^[28]。视黑素的极性适合

光遗传学,但其信号传递速度极缓慢,不能满足人类高精度的视觉需求。van Wyk 等^[25]设计的 OPTO-mGluR6 是对光敏感的构建体,在中等强度日光照射下表达于视网膜退行性病变的双极细胞中,从而产生视力。

2 基于基因编码的光激动蛋白的胞内信号通路的光控制

在基于遗传编码的光激动蛋白胞内信号传导途径的光学控制中,胞内信号传导组分的活性与光诱导的光激动蛋白的构象变化相关^[29-30]。光激动蛋白是胞内信号转导的光遗传控制的核心成分,光敏感蛋白的变构在光遗传系统中是可逆的,并且可以用来控制各种信号通路,常见的主要包括光敏色素(phytochromes,PHY)、隐花色素(cryptochromes,CRY)、光氧电压(light-oxygen-voltage,LOV)结构域及 Dronpa 蛋白。其中,前 3 种蛋白属于光敏植物蛋白^[31-33],Dronpa 蛋白是从珊瑚中分离出的荧光蛋白^[34]。

PHYB 是一种被红光(波长 650 nm)激活而在红外光(波长 750 nm)下失活的蛋白质^[31]。Apo-PHYB 无发色团,当其在细胞中表达时,只有在自催化结合到 PCB(一种存在于光合生物体中的发色团)时才对光敏感。当暴露于红光之下,与 PCB 结合的 PHYB 构象发生改变并在数秒内结合光敏色素互作因子蛋白。当其处于红外光中,这种结合在数秒内会解离^[25]。

CRY2 是一种来自拟南芥的对蓝光(波长 405~488 nm)敏感的蛋白质。当其暴露于蓝光中将发生 2 种变化:一种为光敏 CRY2 蛋白同质寡聚化^[32],另一种为 CRY2 结合到其配体 CIB1(cryptochrome interacting basic helix-loop-helix 1)上^[35],这 2 种变化均在数秒内发生^[36]。然而,在黑暗中,之前被蓝光激活的 CRY2 约 5 min 就可恢复到初始状态。

LOV 结构域较小,由 125 个氨基酸构成,对蓝光(波长 440~473 nm)敏感,可结合黄素单核苷酸(flavin mononucleotide,FMN)的 PAS(PER-ARNT-SIM)核心(哺乳动物细胞无处不在的内源辅因子)^[37]。用作光遗传工具的 LOV 结构域可来源于不同的有机体,那么用光诱导其构象变化来调节细胞信号传导的方式也有所不同。其中一种方式是直接将 LOV 结构域融合到效应蛋白上,并且依赖 LOV 结构域中的光诱导构象变化的特点来减轻自抑制^[38]。蓝光通过诱导 LOV 结构域上保守的半胱氨酸残基的 FMN 和磺胺脒硫共价加合来激活该结构域,在黑暗中半胱氨酸-黄素键的水解使得 LOV 结构域返回基态^[39-40]。

Dronpa 蛋白是一种可被光活化的荧光蛋白,被光活化后不仅改变了 Dronpa 的荧光,也改变了其 4 级结构^[41-42]。在黑暗状态中,Dronpa 作为单体存在;当 Dronpa 被波长 390 nm 的光激活时,其两端的结构域彼此结合,形成四聚体,通过阻碍或改变活化构象来抑制目的蛋白的功能。在青色光(波长 500 nm)刺激下,四聚体解离成单体^[34]。Dronpa 蛋白无小分子辅因子,其使用色氨酸进行光感应,该聚合/解离反应是可逆的^[41]。

在不同光的作用下,上述光激动蛋白通过聚合与解离实现对 MAPK、PI3K、Ras/Raf/ERK、PLC 等胞内信号通路的调控^[33,43-46]。目前,还未发现有将此种方式应用于眼部疾病治疗

的研究。

3 光遗传学在视网膜相关疾病的应用研究

大多数患有视网膜退行性疾病的患者,如视网膜色素变性和黄斑变性,通常首先失去光感受器,存活的视网膜组织对光不敏感。然而,在光敏性消失之后,存活的细胞可保留原有功能并且保持与大脑长久的连接^[47]。自 Nagel 等^[9-10]报道 ChRs 后,Bi 等^[12]针对光遗传技术是否可用于恢复视力通过光控制基因性引入的视蛋白进行了全面、系统的研究,其后在治疗视网膜色素变性等视网膜退行性病相关疾病中做了一系列相关研究。目前光遗传技术的研究大多针对视网膜色素变性疾病, Jacobson 等^[48]提出将目标疾病扩大到一些诊断为 Leber 先天性黑矇等早发性疾病。此外, Stahl 等^[49]使用光遗传学技术在胆碱能神经元中特异表达 ChR2,并以此来研究小鼠的眼球运动动力学。

3.1 针对视网膜内层神经元的修复

由视网膜退行性病变所致的视觉感受器细胞的死亡通常导致视网膜对光反应的完全丧失。为了将缺少视锥、视杆细胞的视网膜赋予光敏性,并且探索将内层视网膜神经元转化为光敏感性细胞, Bi 等^[12]通过由腺相关病毒载体介导的 Chop2-GFP 转运实现了在啮齿动物的视网膜内层神经元长期表达 ChR2。此外,他们证明在小鼠退变的光感受器中尚存的内层视神经元表达 ChR2,能够修复视网膜编码光信号的能力,并且能将光信号传递给视皮质^[12]。

通过在视网膜内层神经元表达 ChR2, Bi 等^[12]已证明视锥和视杆光感受器死亡后视网膜 ON 反应的修复。Zhang 等^[50]发现在视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 表达 HaloR,其对光的反应伴随着快速的超极化和对尖峰活动的抑制,能够有效修复视网膜退行性病变小鼠内层神经元的 OFF 反应;此外,他们发现在 RGCs 中共同表达 ChR2/HaloR 能够产生 ON/OFF 及 ON-OFF 反应,这取决于光刺激的波长。该研究结果表明,在视锥视杆感受器死亡后,通过视网膜上多种微生物型视蛋白,如 ChR2 和 HaloR 的表达去修复 ON 和 OFF 光反应是一种可行的方法。

Ivanova 等^[51]将携带普通启动子的重组腺相关病毒 2 (recombinant adeno-associated virus 2, rAAV2) 注射到猕猴的玻璃体腔后 3 个月发现,在猕猴视网膜的内层神经元可以观察到 rAAV2 介导的 ChR2 表达。在对视网膜退行性病变给予 ChR2 的基因治疗中,猕猴是一种有价值的非人灵长类动物模型。

虽然在仍存的视网膜内层神经元上表达 ChR2 对于感光器退变后的视觉修复是一种潜在的方法,但这些神经元表达的视蛋白 ChR2 对光的敏感性较低。Pan 等^[52]创建出 ChR2 的突变体 L132C/T159C 和 L132C/T159S,与野生型 ChR2 相比,这 2 种突变体对光的敏感性增加,从而使采用光遗传的方法恢复视力更加可行。

视黑素经玻璃体腔注射到神经节细胞层或视网膜下的视网膜细胞后,小鼠能够表现出一些基本的光反应行为,并表现出更多的瞳孔光反应^[28]。在视网膜退行性病变的双极细胞中

表达 opto-mGluR6,双极细胞和神经节细胞中也产生了明显的光反应^[25]。

3.2 靶向 RGCs 的亚细胞结构

恢复感光器退变后视力的一个潜在方法就是在 RGCs 上表达光遗传工具,而靶向亚细胞结构更加精准。Wu 等^[53]通过用蛋白靶向模体而靶向亚细胞结构,在 RGCs 树突状视野的中央区和周边区分别表达去极化和超极化的光遗传工具,如 ChR2 和嗜盐菌视蛋白,表明蛋白靶向模体也是一个有价值的治疗工具。

为进一步探究用光遗传工具靶向亚细胞结构,Zhang 等^[54]对小鼠 RGCs 上的 rAAV 介导的靶向表达携带 NaV 通道模体的 ChR2-GFP 进行了检测,结果表明轴突始段包括 NaV 在内的膜通道群对于 RGCs 产生持续的尖峰反应很重要,也表明光遗传工具携带 NaV 通道模体靶向轴突始段是修复在 RGCs 上产生持续的光反应一种可能的方法。为提高转染效率和实现靶向某种细胞类型,Lu 等^[55]用改良启动子 mGluR6 的 AAV 载体靶向双极细胞,结果显示其在普通猕猴视网膜中央凹及视网膜远周区域有较强的表达。Tochitsky 等^[56]向视网膜退化小鼠玻璃体腔注射一种被称为 DENAQ 的小分子使得 RGCs 在自然白光下即产生电脉冲,但其在玻璃体腔内存留时间短暂。之后 Tochitsky 等^[57]又发现 BENAQ 可将单次注射的作用时间延长至 1 个月。

3.3 光遗传技术应用于眼部的优势和挑战

虽然将光遗传技术应用于眼科疾病的治疗具有无需侵入性手术植入电极、实时观测等优点,但也存在一些挑战:ChRs 等修饰的靶标仍然不敏感,以至于它们需要极端的、非生理的刺激;视黑素的作用机制未明,且其发挥的作用是持续的,阻止了其他信号的传递;AAV 传递给灵长类动物已经被证明是困难的。这些在很大程度上是生物工程方面的挑战,应该通过设计更高灵敏度的光学系统、改进 AAV 的靶向和设计优化的表达系统来迅速解决。与任何新技术一样,光遗传学也有其他挑战,主要是道德和安全性问题,其中,伦理问题主要是人类基因工程和病毒载体的未知毒性。对各种视网膜疾病进行基因治疗的临床前和早期临床试验结果显示视网膜转染相对安全^[58]。有研究表明,ChR2 在啮齿动物中能长期(超过 1 年)表达,且没有严重的不良影响^[59]。

4 光遗传学在视网膜相关疾病应用的展望

在无需侵入性手术情况下,光敏感微生物型视蛋白的表达是修复视网膜退行性病变的潜在方法。光遗传工具可通过病毒载体在多种视网膜亚细胞群表达。光遗传的关键之处在于将光不敏感的神经元细胞转变为人工光感受器。在感光细胞中,将光信号转化成使细胞电生理兴奋状态的改变需十几个蛋白协同工作,但在光遗传学中,只需一个光敏蛋白就可以使细胞兴奋,甚至光敏通道这一种蛋白几乎可以代替整个感光细胞这一精密、复杂的光电转换生物系统作为感光受体,因此光遗传学在眼科中的应用前景光明。从基因上恢复盲眼视力的目标现在已经成为可能。在原有 ChR2 研究的基础上,新发现和

发展起来的光遗传学研究取得了新的进展。通过红移离子通道,研究人员用更宽的光谱做出了更安全的替代品。新的 G 蛋白偶联受体正在加快速度,以满足视力所需的时间精度。目前光遗传技术应用于眼科疾病治疗的研究仅限于光控制基因型引入的视蛋白,通过光控制信号通路的方式治疗眼科疾病尚未有相关报道。通过在不同光照下光激动蛋白的聚合与解离,实现对细胞内信号通路实时可控的目的,也可能成为光遗传技术治疗视网膜相关的新方向。目前为止,还未发现该技术应用于除视网膜疾病以外的其他眼部疾病,随着光遗传技术的发展,其未来可能会应用于更多的眼科领域。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Park SI, Brenner DS, Shin G, et al. Soft, stretchable, fully implantable miniaturized optoelectronic systems for wireless optogenetics [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(12): 1280-1286. DOI: 10. 1038/nbt. 3415.
- [2] Zhang K, Cui B. Optogenetic control of intracellular signaling pathways [J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(2): 92-100. DOI: 10. 1016/j. tibtech. 2014. 11. 007.
- [3] Duebel J, Marazova K, Sahel JA. Optogenetics [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2015, 26(3): 226-232. DOI: 10. 1097/ICU. 000000000000140.
- [4] Zhang F, Vierock J, Yizhar O, et al. The microbial opsin family of optogenetic tools [J]. *Cell*, 2011, 147(7): 1446-1457. DOI: 10. 1016/j. cell. 2011. 12. 004.
- [5] Spudich JL, Yang CS, Jung KH, et al. Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 365-392. DOI: 10. 1146/annurev. cellbio. 16. 1. 365.
- [6] Guru A, Post RJ, Ho YY, et al. Making sense of optogenetics [J/OL]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2015, 18(11): pyv079 [2018-10-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4756725/>. DOI: 10. 1093/ijnp/pyv079.
- [7] Oesterhelt D, Stoekenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* [J]. *Nat New Biol*, 1971, 233(39): 149-152. DOI: 10. 1038/newbio233149a0.
- [8] Deisseroth K, Hegemann P. The form and function of channelrhodopsin [J/OL]. *Science*, 2017, 357(6356): eaan5544 [2018-10-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5723383/>. DOI: 10. 1126/science. aan5544.
- [9] Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, et al. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae [J]. *Science*, 2002, 296(5577): 2395-2398. DOI: 10. 1126/science. 1072068.
- [10] Nagel G, Szellas T, Huhn W, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(24): 13940-13945. DOI: 10. 1073/pnas. 1936192100.
- [11] Sineshchekov OA, Jung KH, Spudich JL. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(13): 8689-8694. DOI: 10. 1073/pnas. 122243399.
- [12] Bi A, Cui J, Ma YP, et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration [J]. *Neuron*, 2006, 50(1): 23-33. DOI: 10. 1016/j. neuron. 2006. 02. 026.
- [13] Engelhard C, Chizhov I, Siebert F, et al. Microbial halorhodopsins: light-driven chloride pumps [J]. *Chem Rev*, 2018, 118(21): 10629-10645. DOI: 10. 1021/acs. chemrev. 7b00715.
- [14] Ernst OP, Lodowski DT, Elstner M, et al. Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms [J]. *Chem Rev*, 2014, 114(1): 126-163. DOI: 10. 1021/cr4003769.
- [15] Zhang F, Aravanis AM, Adamantidis A, et al. Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(8): 577-581. DOI: 10. 1038/nrn2192.
- [16] Chow BY, Han X, Dobry AS, et al. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps [J]. *Nature*, 2010, 463(7277): 98-102. DOI: 10. 1038/nature08652.
- [17] Han X, Chow BY, Zhou H, et al. A high-light sensitivity optical neural silencer: development and application to optogenetic control of non-human primate cortex [J/OL]. *Front Syst Neurosci*, 2011, 5: 18 [2018-11-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3082132/>. DOI: 10. 3389/fnsys. 2011. 00018.
- [18] Zhang F, Prigge M, Beyrière F, et al. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri* [J]. *Nat Neurosci*, 2008, 11(6): 631-633. DOI: 10. 1038/nn. 2120.
- [19] Lin JY, Knutsen PM, Muller A, et al. ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation [J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(10): 1499-1508. DOI: 10. 1038/nn. 3502.
- [20] Tomita H, Sugano E, Murayama N, et al. Restoration of the majority of the visual spectrum by using modified *Volvox* channelrhodopsin-1 [J]. *Mol Ther*, 2014, 22(8): 1434-1440. DOI: 10. 1038/mt. 2014. 81.
- [21] Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS, et al. Independent optical excitation of distinct neural populations [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(3): 338-346. DOI: 10. 1038/nmeth. 2836.
- [22] Govorunova EG, Sineshchekov OA, Rodarte EM, et al. The expanding family of natural anion channelrhodopsins reveals large variations in kinetics, conductance, and spectral sensitivity [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43358 [2019-01-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5335703/>. DOI: 10. 1038/srep43358.
- [23] Govorunova EG, Sineshchekov OA, Janz R, et al. NEUROSCIENCE. Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics [J]. *Science*, 2015, 349(6248): 647-650. DOI: 10. 1126/science. aaa7484.
- [24] Gaub BM, Berry MH, Holt AE, et al. Optogenetic vision restoration using rhodopsin for enhanced sensitivity [J]. *Mol Ther*, 2015, 23(10): 1562-1571. DOI: 10. 1038/mt. 2015. 121.
- [25] 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 [J/OL]. *PLoS Biol*, 2015, 13(5): e1002143 [2019-01-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4423780/>. DOI: 10. 1371/journal. pbio. 1002143.
- [26] Masseck OA, Spoida K, Dalkara D, et al. Vertebrate cone opsins enable sustained and highly sensitive rapid control of Gi/o signaling in anxiety circuitry [J]. *Neuron*, 2014, 81(6): 1263-1273. DOI: 10. 1016/j. neuron. 2014. 01. 041.
- [27] Li X, Gutierrez DV, Hanson MG, et al. Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(49): 17816-17821. DOI: 10. 1073/pnas. 0509030102.
- [28] Lin B, Koizumi A, Tanaka N, et al. Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(41): 16009-16014. DOI: 10. 1073/pnas. 0806114105.
- [29] De Silva SR, Barnard AR, Hughes S, et al. Long-term restoration of visual function in end-stage retinal degeneration using subretinal human melanopsin gene therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(42): 11211-11216. DOI: 10. 1073/pnas. 1701589114.
- [30] Tischer D, Weiner OD. Illuminating cell signalling with optogenetic tools [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(8): 551-558. DOI: 10. 1038/nrm3837.
- [31] Tucker CL. Manipulating cellular processes using optical control of protein-protein interactions [J]. *Prog Brain Res*, 2012, 196: 95-117. DOI: 10. 1016/B978-0-444-59426-6. 00006-9.
- [32] Levskaya A, Weiner OD, Lim WA, et al. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction [J]. *Nature*, 2009, 461(7266): 997-1001. DOI: 10. 1038/nature08446.
- [33] Bugaj LJ, Choksi AT, Mesuda CK, et al. Optogenetic protein clustering

- and signaling activation in mammalian cells [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(3) : 249–252. DOI: 10. 1038/nmeth. 2360.
- [34] Strickland D, Lin Y, Wagner E, et al. TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(4) : 379–384. DOI: 10. 1038/nmeth. 1904.
- [35] Zhou XX, Chung HK, Lam AJ, et al. Optical control of protein activity by fluorescent protein domains [J]. *Science*, 2012, 338(6108) : 810–814. DOI: 10. 1126/science. 1226854.
- [36] Más P, Devlin PF, Panda S, et al. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2 [J]. *Nature*, 2000, 408(6809) : 207–211. DOI: 10. 1038/35041583.
- [37] Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya LA, et al. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(12) : 973–975. DOI: 10. 1038/nmeth. 1524.
- [38] Huala E, Oeller PW, Liscum E, et al. Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain [J]. *Science*, 1997, 278(5346) : 2120–2123. DOI: 10. 1126/science. 278. 5346. 2120.
- [39] Wu YI, Frey D, Lungu OI, et al. A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells [J]. *Nature*, 2009, 461(7260) : 104–108. DOI: 10. 1038/nature08241.
- [40] Harper SM, Neil LC, Gardner KH. Structural basis of a phototropin light switch [J]. *Science*, 2003, 301(5639) : 1541–1544. DOI: 10. 1126/science. 1086810.
- [41] Glantz ST, Carpenter EJ, Melkonian M, et al. Functional and topological diversity of LOV domain photoreceptors [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(11) : E1442–1451 [2018–11–03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4801262/>. DOI: 10. 1073/pnas. 1509428113.
- [42] Lyu S, Fang J, Duan T, et al. Optically controlled reversible protein hydrogels based on photoswitchable fluorescent protein Dronpa [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53(100) : 13375–13378. DOI: 10. 1039/c7cc06991j.
- [43] Lee YR, Park JH, Hahn SH, et al. Development of bimolecular fluorescence complementation using Dronpa for visualization of protein-protein interactions in cells [J]. *Mol Imaging Biol*, 2010, 12(5) : 468–478. DOI: 10. 1007/s11307-010-0312-2.
- [44] Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(5) : 329–341. DOI: 10. 1038/nrm2882.
- [45] Toettcher JE, Gong D, Lim WA, et al. Light-based feedback for controlling intracellular signaling dynamics [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(10) : 837–839. DOI: 10. 1038/nmeth. 1700.
- [46] Kim N, Kim JM, Lee M, et al. Spatiotemporal control of fibroblast growth factor receptor signals by blue light [J]. *Chem Biol*, 2014, 21(7) : 903–912. DOI: 10. 1016/j. chembiol. 2014. 05. 013.
- [47] Baker CK, Flannery JG. Innovative optogenetic strategies for vision restoration [J/OL]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12 : 316 [2018–11–13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6160748/>. DOI: 10. 3389/fncel. 2018. 00316.
- [48] Jacobson SG, Sumaroka A, Luo X, et al. Retinal optogenetic therapies: clinical criteria for candidacy [J]. *Clin Genet*, 2013, 84(2) : 175–182. DOI: 10. 1111/cge. 12165.
- [49] Stahl JS, Thumser ZC, May PJ, et al. Mechanics of mouse ocular motor plant quantified by optogenetic techniques [J]. *J Neurophysiol*, 2015, 114(3) : 1455–1467. DOI: 10. 1152/jn. 00328. 2015.
- [50] Zhang Y, Ivanova E, Bi A, et al. Ectopic expression of multiple microbial rhodopsins restores ON and OFF light responses in retinas with photoreceptor degeneration [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(29) : 9186–9196. DOI: 10. 1523/JNEUROSCI. 0184-09. 2009.
- [51] Ivanova E, Hwang GS, Pan ZH, et al. Evaluation of AAV-mediated expression of Chop2-GFP in the marmoset retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(10) : 5288–5296. DOI: 10. 1167/iovs. 10-5389.
- [52] Pan ZH, Ganjawala TH, Lu Q, et al. Chr2 mutants at L132 and T159 with improved operational light sensitivity for vision restoration [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(6) : e98924 [2018–11–14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4047080/>. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0098924.
- [53] Wu C, Ivanova E, Zhang Y, et al. rAAV-mediated subcellular targeting of optogenetic tools in retinal ganglion cells *in vivo* [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(6) : e66332 [2018–12–06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3683040/>. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0066332.
- [54] Zhang Z, Feng J, Wu C, et al. Targeted expression of channelrhodopsin-2 to the axon initial segment alters the temporal firing properties of retinal ganglion cells [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(11) : e0142052 [2018–12–17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4633179/>. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0142052.
- [55] Lu Q, Ganjawala TH, Ivanova E, et al. AAV-mediated transduction and targeting of retinal bipolar cells with improved mGluR6 promoters in rodents and primates [J]. *Gene Ther*, 2016, 23(8–9) : 680–689. DOI: 10. 1038/gt. 2016. 42.
- [56] Tochitsky I, Polosukhina A, Degtyar VE, et al. Restoring visual function to blind mice with a photoswitch that exploits electrophysiological remodeling of retinal ganglion cells [J]. *Neuron*, 2014, 81(4) : 800–813. DOI: 10. 1016/j. neuron. 2014. 01. 003.
- [57] Tochitsky I, Trautman J, Gallerani N, et al. Restoring visual function to the blind retina with a potent, safe and long-lasting photoswitch [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7 : 45487 [2019–01–22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5335703/>. DOI: 10. 1038/srep45487.
- [58] Boye SE, Boye SL, Lewin AS, et al. A comprehensive review of retinal gene therapy [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(3) : 509–519. DOI: 10. 1038/mt. 2012. 280.
- [59] Ivanova E, Pan ZH. Evaluation of the adeno-associated virus mediated long-term expression of channelrhodopsin-2 in the mouse retina [J]. *Mol Vis*, 2009, 15 : 1680–1689.

(收稿日期: 2019-08-26 修回日期: 2019-12-02)

(本文编辑: 刘艳)

广告目次

摩美得(止血祛瘀明目片) 陕西摩美得气血和制药有限公司……封二

同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……前插页

艾乐舒(氯替泼诺混悬滴眼液) 山东博士伦福瑞达制药有限公司……前插页

海德堡超清 OCTA+X 高视医疗……前插页

沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 广东泰恩康医药股份有限公司……前插页

中华医学会杂志社抗击疫情宣传图 中华医学会杂志社……后插页

迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底