

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491493** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.10.25

(22) Дата подачи заявки
2022.12.20

(51) Int. Cl. *C07K 14/72* (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(54) **ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЗРЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО GQ-СВЯЗАННОГО НЕЙРОПСИНА (ОПСИН 5)**

(31) PCT/CN2021/139750

(32) 2021.12.20

(33) CN

(86) PCT/CN2022/140490

(87) WO 2023/116729 2023.06.29

(71) Заявитель:
**ГЕНАНС БАЙОТЕКНОЛОДЖИ КО.,
ЛТД (CN)**

(72) Изобретатель:

**Юй Тао, Дай Жуйчэн, Вэн Даньвэй,
Лю Миньминь (CN)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к выделенному светочувствительному опсину для быстрого, обратимого и точного восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации Gq-сигнализации.

A1

202491493

202491493

A1

ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЗРЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО GQ-СВЯЗАННОГО НЕЙРОПСИНА (ОПСИН 5)

[001] Введение

[002] Рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), модулируют многие внутриклеточные сигнальные пути и представляют собой некоторые из наиболее интенсивно изученных мишеней для лекарственных средств (Hauser et al., 2017). При связывании лиганда GPCR претерпевает конформационное изменение, которое передается гетеротримерным G-белкам, которые представляют собой мультисубъединичные комплексы, содержащие G_α и тесно связанные $G_{\beta\gamma}$ субъединицы. Белки G_q , подсемейство гетеротримерных субъединиц G_α , связываются с классом GPCR для опосредования клеточных ответов на нейротрансмиттеры, сенсорные стимулы и гормоны по всему организму. Их первичные мишени нисходящего сигнального пути включают ферменты фосфолипазы С бета (PLC- β), которые катализируют гидролиз фосфолипидного фосфатидилинозитол бисфосфата (PIP_2) в инозитолтрисфосфат (IP_3) и диацилглицерин (DAG). IP_3 запускает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ в цитоплазму, и Ca^{2+} вместе с DAG активируют протеинкиназу С (PKC). Для изучения сигнальных механизмов и физиологических функций G_q -связанных GPCR и внутриклеточного высвобождения Ca^{2+} было разработано несколько инструментов, включая хемогенетику и фотоактивируемые малые молекулы.

[003] Оптогенетика использует светочувствительные белки для достижения оптически контролируемого нарушения клеточной активности с генетической специфичностью и высокой пространственно-временной точностью. С момента ранних открытий оптогенетических инструментов с использованием светочувствительных ионных каналов и транспортеров были разработаны различные технологии, которые в настоящее время содействуют осуществлению оптических вмешательств во внутриклеточные вторичные мессенджеры, взаимодействия и деградацию белков и транскрипцию генов. Opto-a1AR, оригинально разработанная химера родопсин-GPCR, связанная с G_q , может индуцировать внутриклеточное повышение Ca^{2+} в ответ на длительную фотостимуляцию (60 с) (Airan et al., 2009). Однако этот инструмент не был широко использован, возможно, из-за его ограничений, связанных со светочувствительностью и кинетикой ответа (Tichy et al., 2019). Большинство животных обнаруживают свет с помощью фоторецепторов на основе GPCR, которые содержат как белковый фрагмент (опсин), так и производное витамина А (ретиноаль), которое функционирует и как лиганд, и как хромофор. На сегодняшний день выявлено несколько тысяч опсинов. Два недавних исследования, в

которых сообщалось об опсинах на основе G_i от комаров и миног для ингибирования пресинаптических окончаний в нейронах, изящно продемонстрировали, что некоторые естественные фоторецепторы пригодны для использования в качестве эффективных оптогенетических инструментов. Что касается G_q -сигнализации, меланопсин (Opn4) в подгруппе ганглиозных клеток сетчатки млекопитающих представляет собой G_q -связанный опсин, который опосредует визуальные функции, не формирующие изображения. Однако клетки HEK293 или Neuro-2a, гетерологично экспрессирующие Opn4, демонстрировали слабые световые ответы и требовали наличия дополнительного ретиналя в среде для культивирования. Сообщалось, что Opn5 (нейропсин) и его ортологи у многих позвоночных животных являются чувствительным к ультрафиолету (УФ) опсином, который связывается с белками G_i .

[004] Срочно необходимы идеальные оптогенетические инструменты для восстановления зрительной функции у слепых пациентов.

[005] КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[006] Настоящее изобретение относится к выделенному светочувствительному опсину для восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации G_q -сигнализации. Выделенный светочувствительный опсин можно применять для лечения субъекта, страдающего от повреждения внешнего слоя сетчатки, потери или дегенерации фоторецепторов, дегенеративного заболевания сетчатки, потери чувствительности к свету или потери восприятия света, потери зрения или слепоты.

[007] В первую очередь, настоящее изобретение относится к выделенному светочувствительному опсину для восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации G_q -сигнализации.

[008] В некоторых вариантах осуществления свет имеет длину волны в диапазоне от 360 до 520 нм, предпочтительно от 450 до 500 нм, более предпочтительно от 460 до 480 нм, в частности, 470 нм.

[009] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин представляет собой выделенный опсин организма, его гомологи, его ортологи, его паралоги, их фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки посредством активации G_q -сигнализации.

[010] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен опсину дикого типа указанного организма, его гомологам, его ортологам, его парологам, их фрагментам или вариантам и имеет активность в отношении

восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации G_q -сигнализации.

[011] В некоторых вариантах осуществления организм представляет собой животное.

[012] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин представляет собой выделенный опсин 5(Orn5) животного, его гомологи, его ортологи, его паралоги, их фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки посредством активации G_q -сигнализации.

[013] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5(Orn5) по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен опсину 5 (Orn5) дикого типа указанного животного, его гомологам, его ортологам, его паралогам, их фрагментам или вариантам и имеет активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации G_q -сигнализации.

[014] В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой позвоночное животное.

[015] В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой птицу, рептилию или рыбу, амфибию или млекопитающее.

[016] В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой птицу, включая, но не ограничиваясь, курицу, утку, гуся, страуса, эму, нанду, киви, казуара, индейку, перепела, курицу, сокола, орла, ястреба, голубя, длиннохвостого попугая, какаду, ара, попугая, птицу, птицу из отряда воробьинообразных (такую как, певчая птица), сойку, черного дрозда, вьюрка, певуна и воробья.

[017] В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой рептилию, включая, но не ограничиваясь, ящерицу, змею, аллигатора, черепаху, крокодила и сухопутную черепаху.

[018] В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой рыбу, включая, но не ограничиваясь, сома, угрей, акул и рыбу-меч.

[019] В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой амфибию, включая, но не ограничиваясь, жабу, лягушку, тритона и саламандру.

[020] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Orn5) представляет собой выделенный опсин 5 (Orn5) дикого типа курицы или его фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации G_q -сигнализации.

[021] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Opn5) по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен опсину 5 (Opn5) дикого типа курицы и имеет активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки посредством активации G_q -сигнализации.

[022] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Opn5) представляет собой выделенный опсин 5 (Opn5) дикого типа черепахи или его фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации G_q -сигнализации.

[023] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Opn5) по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен опсину 5 (Opn5) дикого типа черепахи и имеет активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки посредством активации G_q -сигнализации.

[024] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Opn5) имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:1 (сOpn5), или ее фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации G_q -сигнализации.

[025] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Opn5) по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:1 (сOpn5), и имеет активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки посредством активации G_q -сигнализации.

[026] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Opn5) имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:2 (сOpn5), или ее фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации G_q -сигнализации.

[027] В некоторых вариантах осуществления выделенный опсин 5 (Opn5) по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности, показанной в

SEQ ID NO:2 (tOrn5), и имеет активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки посредством активации G_q-сигнализации.

[028] Выделенный опсин 5 (Orn5) может быть использован в качестве удобного оптогенетического инструмента, который точно активирует внутриклеточную G_q-сигнализацию в клетке сетчатки.

[029] Клетка сетчатки может представлять собой фоторецепторную клетку, палочковую клетку сетчатки, колбочковую клетку сетчатки, ганглиозную клетку сетчатки, биполярную клетку, ганглиозную клетку, горизонтальную клетку, многополярный нейрон, клетку Мюллера, амакриновую клетку или метилнитрозомочевину.

[030] Во втором аспекте, настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей выделенный опсин первого аспекта.

[031] В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота кодирует опсин дикого типа указанного организма, его гомологи, его ортологи, его паралоги, их фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки посредством активации G_q-сигнализации.

[032] В третьем аспекте, настоящее изобретение относится к химерному гену, содержащему последовательность выделенной нуклеиновой кислоты из второго аспекта, функционально связанную с подходящими регуляторными последовательностями.

[033] Химерный ген дополнительно содержит ген, кодирующий маркер, например, флуоресцентный белок.

[034] В четвертом аспекте, настоящее изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту из второго аспекта или химерный ген из третьего аспекта.

[035] Вектор представляет собой эукариотический вектор, прокариотический вектор экспрессии, вирусный вектор или дрожжевой вектор.

[036] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор вируса простого герпеса, вектор вируса осповакцины или аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор, ретровирусный вектор или вектор насекомых.

[037] Предпочтительно, вектор представляет собой рекомбинантный AAV1 (аденоассоциированный вирус), AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVS, AAVO или AAV10.

[038] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии.

[039] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор для генной терапии.

[040] В пятом аспекте, настоящее изобретение относится к выделенной клетке или клеточной культуре, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту из второго аспекта, химерный ген из третьего аспекта или вектор из четвертого аспекта.

[041] Например, экспрессия сOrn5 в клетках НЕК 293Т (НЕК - человеческая эмбриональная клетка почек) в значительной мере опосредует G_q -зависимое повышение уровня Ca^{2+} , вызванное синим светом, из внутриклеточных запасов.

[042] Например, оптогенетическая активация сOrn5-экспрессирующих астроцитов индуцирует массовое высвобождение АТФ (аденозинтрифосфат) в мозге мыши.

[043] В шестом аспекте, настоящее изобретение относится к применению выделенного опсина из первого аспекта, выделенной нуклеиновой кислоты из второго аспекта, химерного гена из третьего аспекта, вектора из четвертого аспекта или выделенной клетки или клеточной культуры из пятого аспекта для лечения или предотвращения заболевания или патологического состояния, опосредованного или связанного с потерей чувствительности к свету клетки сетчатки.

[044] сOrn5 можно применять к клеткам сетчатки, и клетки сетчатки могут быть активированы светом. Свет имеет длину волны в диапазоне от 360 до 520 нм, предпочтительно от 450 до 500 нм, более предпочтительно от 460 до 480 нм, в частности, 470 нм.

[045] Например, вектор AAV, экспрессирующий сOrn5-t2a-EGFP, вводится субретинально или интравитреально, а сOrn5 и EGFP (улучшенный зелёный флуоресцентный белок) экспрессируются в ганглиозных клетках сетчатки.

[046] В седьмом аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения заболевания или состояния, опосредованного или связанного с потерей чувствительностью к свету клетки сетчатки, у субъекта, включающему введение выделенного опсина из первого аспекта, выделенной нуклеиновой кислоты из второго аспекта, химерного гена из третьего аспекта, вектора из четвертого аспекта или выделенной клетки или клеточной культуры из пятого аспекта.

[047] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения заболевание или патологическое состояние, опосредованное или связанное с потерей чувствительности к свету клеток сетчатки посредством активации G_q -сигнализации, включает, но не ограничивается, заболевания или патологические состояния, при которых восстановление чувствительности к свету клеток сетчатки происходит за счет активации сигнализации G_q дает благоприятный эффект.

[048] В некоторых вариантах осуществления заболевания или патологическое состояние, опосредованное или связанное с потерей чувствительности к свету клетки

сетчатки посредством активации G_q -сигнализации, включает, но не ограничивается ими, заболевания или патологические состояния, при которых активация клеток сетчатки, таких как фоторецепторная клетка, палочковая клетка сетчатки, колбочковая клетка сетчатки, ганглиозная клетка сетчатки, биполярная клетка, ганглиозная клетка, горизонтальная клетка, мультиполярный нейрон, клетка Мюллера, амакриновая клетка или метилнитрозомочевина дает благоприятный эффект.

[049] В некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние включает, но не ограничивается ими, повреждение внешнего слоя сетчатки, потерю или дегенерацию фоторецепторов, дегенеративное заболевание сетчатки, потерю чувствительности к свету или потерю восприятия света, потерю зрения из-за дефицита восприятия или чувствительности к свету или слепоту.

[050] В некоторых вариантах осуществления $Opn5$ в настоящем изобретении может быть использован для восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки, если ганглиозные клетки сетчатки не полностью мертвы.

[051] В некоторых вариантах осуществления $Opn5$ в настоящем изобретении может быть использован для лечения или предотвращения заболеваний, связанных с дегенерацией и/или гибелью ганглиозных клеток сетчатки (RGC).

[052] В некоторых вариантах осуществления изобретения $Opn5$ в настоящем изобретении может быть использован для лечения или предотвращения пигментного ретинита (RP), макулодистрофии, возрастной макулодистрофии (AMD), аутосомно-доминантной атрофии зрительного нерва (ADOA) и/или глаукомы.

[053] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает применение света, имеющего длину волны в диапазоне от 360 до 520 нм, предпочтительно от 450 до 500 нм, более предпочтительно от 460 до 480 нм.

[054] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает применение двухфотонной активации с использованием длинноволнового (920 нм или более) света.

[055] Выделенный опсин в настоящем изобретении чувствителен к свету, имеющему длину волны в диапазоне от 360 до 550 нм, предпочтительно от 450 до 500, более предпочтительно от 460 до 480 нм. В частности, синий свет с длиной волны 470 нм вызывает самые сильные колебания Ca^{2+} в клетках, что означает, что выделенный опсин в настоящем изобретении является сверхчувствительным к свету, имеющему длину волны 470 нм.

[056] Изобретение охватывает все комбинации конкретных вариантов осуществления, приведенных в настоящем документе.

[057] КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[058] На фиг. 1 показано, что *sOrn5* опосредует индуцированную светом мощную активацию G_q -сигнализации в клетках НЕК 293Т.

[059] На фиг. 2 показано, что *sOrn5* связан с G_q -сигнализацией, но не с G_i .

[060] На фиг. 3 показано, что *sOrn5* чувствительно опосредует оптический контроль G_q -сигнализации с высоким временным и пространственным разрешением.

[061] На фиг. 4 показано, что *sOrn5* опосредует более быстрый и чувствительный ответ на свет, чем *opto-a1AR*, *hM3Dq* или *orn4*.

[062] На фиг. 5 показано, что *sOrn5* эффективно опосредует активацию астроцитов.

[063] На фиг. 6 показано, что здоровая сетчатка содержит несколько клеточных слоев.

[064] На фиг. 7 показано, что нормальные мыши до обработки MNU (метилитрозомочевина) имеют быструю реакцию зрачков на свет, а у инбредных мышей C3H/HeNCrl отсутствует реакция зрачков на свет.

[065] На фиг. 8 показан EGFP во всей сетчатке через 4 недели после инъекции AAV.

[066] На фиг. 9 показано, что мыши, обработанные MNU, и мыши C3H/HeNCrl восстанавливают реакцию зрачков на свет.

[067] На фиг. 10 показан тест на реакцию зрачка на свет.

[068] На фиг. 11 показан результат иммунофлуоресценции.

[069] На фиг. 12 показан результат электрофизиологического теста.

[070] На фиг. 13 показан результат электрофизиологического теста.

[071] На фиг. 14 схематически показан тест на избегание в открытом поле.

[072] На фиг. 15 показаны результаты теста на избегание в открытом поле.

[073] На фиг. 16 показано восстановление светочувствительности глаза мышей *rd1/rd1*, обработанных AAV-*sOPN5*, через 7 недель (A) и 9 месяцев (B), соответственно.

[074] Описание конкретных вариантов осуществления изобретения

[075] В настоящем изобретении тестировали способность опсина, в частности ортологов *Orn5* нескольких видов, и обнаруживали, что многие опсины чувствительно и сильно опосредуют светоиндуцированную активацию G_q -сигнализации и/или активацию клеток. Выделенный светочувствительный опсин можно применять для лечения субъекта, страдающего от повреждения внешнего слоя сетчатки, потери или дегенерации фоторецепторов, дегенеративного заболевания сетчатки, потери чувствительности к свету или потери восприятия света, потери зрения или слепоты.

[076] Предпочтительно ортологи *Orn5* представляют собой ортолог курицы (*sOrn5* для простоты) или ортолог черепахи (*tOrn5* для простоты).

[077] Подробные характеристики Orn5, в частности, cOrn5, показывают, что он обладает сверхчувствительностью к синему свету, имеющему длину волны 450-500 нм, более предпочтительно, 460-480 нм (уровень мкВт/мм², приблизительно на 3 порядка более чувствителен, чем существующие инструменты на основе G_q-связанного опсина: орто-a1AR и орn4), высоким временным (в ответ на световые импульсы 10 мс, приблизительно на 3 порядка быстрее, чем орто-a1AR или орn4) и пространственным (субклеточным уровнем) разрешением, и не требует добавления хромофоров. В частности, эндогенного ретиналя достаточно, и добавление ретиналя не требуется.

[078] cOrn5 опосредует оптогенетическую активацию G_q-сигнализации и/или активацию клеток.

[079] В частности, в настоящем изобретении ортологи Orn5 курицы, черепах, людей и мышей (которые на 80-90% идентичны белковой последовательности друг с другом) тестировали, чтобы определить, обладают ли они способностью опосредовать активацию G_q-сигнализации, индуцированную синим светом, в клетках НЕК 293Т. Для контроля относительного ответа Ca²⁺ использовали синий свет для стимуляции и красный внутриклеточный кальциевый индикатор CalbryteTM 630 AM. Установлено, что ортологи Orn5 курицы (cOrn5) и черепахи (tOrn5) опосредовали немедленное и сильное светоиндуцированное увеличение сигнала Ca²⁺ (приблизительно 3 ΔF/F), тогда как световой эффект не наблюдается от клеток, экспрессирующих ортологи Orn5 человека или мыши. Как показано на примере ортолога курицы, cOrn5 совместно локализован с мембранным маркером EGFP-CAAX, что указывает на то, что он эффективно транспортируется к плазматической мембране. В культуральную среду не нужно добавлять экзогенный ретиналь, что позволяет предположить, что эндогенного ретиналя достаточно для обеспечения функциональности cOrn5. Сигналы Ca²⁺ устойчивы к удалению внеклеточного Ca²⁺, что указывает на высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных хранилищ. Преинкубация ингибитора белков G_q, например, YM-254890, высокоселективного ингибитора белков G_q, обратимо устраняла индуцированные светом колебания Ca²⁺ в обеих cOrn5-экспрессирующих клетках. В cOrn5-, но не в клетках, экспрессирующих OPN5 человека, обнаруживается светоиндуцированное увеличение уровня инозитолфосфата (IP₁), продукта быстрого распада IP₃; кроме того, степень этого увеличения уменьшается при обработке YM-254890. В клетках, экспрессирующих cOrn5, например, клетках НЕК 293Т, синий свет также запускает фосфорилирование белка MARCKS (связанный с миристиновой кислотой, богатый аланином субстрат протеинкиназы C), хорошо известной мишени PKC (протеинкиназа C), в зависимости от активности PKC. Напротив, освещение синим светом эффективно снижает уровни cAMP (циклический аденозинмонофосфат) в клетках,

экспрессирующих Orp5 человека и мыши, с ретиналем, но не оказывает такого эффекта в клетках, экспрессирующих cOrp5, без ретиналя. В совокупности эти данные подтверждают, что освещение синим светом обеспечивает связывание cOrp5 с сигнальным путем G_q в клетках HEK 293T.

[080] Оптогенетика, опосредованная cOrp5, является чувствительной и точной.

[081] В частности, активирующиеся светом свойства cOrp5 охарактеризованы в настоящем изобретении. cOrp5 может быть гетерологично экспрессирован в клетках, например, в клетках HEK 293T. Хотя Orp5 ранее рассматривался как чувствительный к ультрафиолету (УФ) фоторецептор, картирование с набором длин волн в диапазоне от 365 до 630 нм при фиксированной интенсивности света (100 мкВт/мм^2) показывает, что синий свет с длиной волны 470 нм вызывает самые сильные колебания Ca^{2+} , при этом свет UVA (365 и 395 нм) является менее эффективным, а видимый свет с большей длиной волны (561 нм или более) полностью неэффективным. Тестировали влияние различной продолжительности света на клетки HEK 293T, экспрессирующие cOrp5, и стимулирование короткими световыми импульсами (1, 5, 10, 20, 50 мс; 16 мкВт/мм^2 ; 470 нм) показывает, что ответ Ca^{2+} достигает режима насыщения при продолжительности света более 10 мс. Более длительные значения продолжительности света дополнительно не увеличивают амплитуду сигнала Ca^{2+} при этой интенсивности света (16 мкВт/мм^2 ; 470 нм). Подача 470 нм света с различной интенсивностью показывает, что синий свет приблизительно $4,8$ и 16 мкВт/мм^2 дает приблизительно половину максимального и полный максимальный ответы, соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что светочувствительность cOrp5 на 2-3 порядка выше, чем зарегистрированные значения обычно используемого оптогенетического инструмента Channelrhodopsin-2 (ChR2, канальный родопсин 2). Вместе результаты в настоящем изобретении показывают, что cOrp5 может функционировать как однокомпонентный оптогенетический инструмент без дополнительного ретиналя и что cOrp5 является сверхчувствительным к синему свету с точки зрения его полной активации, требующей низкой интенсивности света (16 мкВт/мм^2) и короткой продолжительности (10 мс).

[082] Сравнивали производительность cOrp5 с производительностью opto-a1AR, химерной GPCR, сконструированной путем смешивания родопсина с G_q -связанным адренергическим рецептором. Следуя протоколу в предыдущем отчете, было обнаружено, что очень длительное воздействие сильного освещения (60 с; 7 мВт/мм^2) требуется для запуска медленного и небольшого (приблизительно $0,5 \Delta F/F$) увеличения сигнала Ca^{2+} в клетках HEK 293T, экспрессирующих opto-a1AR, и освещение 15 с является неэффективным. Сравнивали производительность cOrp5 с производительностью orp4,

природного опсина, который, как сообщается, является инструментом для активации G_q -сигнализации. Установлено, что длительное воздействие сильного освещения (25 с; 40 мВт/мм²) и дополнительный ретиналь требуются для запуска медленного (приблизительно 1 $\Delta F/F$) увеличения сигнала Ca^{2+} в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих *orn4*. Поэтому, по сравнению с существующими инструментами на основе опсина (*opto-a1AR* и *orn4*), *sOrn5* намного более светочувствителен (приблизительно на 3 порядка более чувствителен), требует гораздо более короткого времени экспозиции (10 мс по сравнению с 60 с), и дает более сильные ответы.

[083] Кроме того, сравнивали производительность *sOrn5* с производительностью популярного G_q -связанного хомогенетического инструмента *hM3Dq*, который активируют путем добавления экзогенного низкомолекулярного лиганда клозапин-N-оксида (CNO). Светоиндуцированная активация клеток НЕК 293Т, экспрессирующих *sOrn5*, имеет аналогичную амплитуду пикового ответа сигнала Ca^{2+} , что и CNO-индуцированная активация клеток НЕК 293Т, экспрессирующих *hM3Dq*. Между тем, клетки НЕК 293Т, экспрессирующие *sOrn5*, имеют более быстрый и во времени более точный ответ, а также более быстрое время восстановления, чем клетки НЕК 293Т, экспрессирующие *hM3Dq*. Эти результаты указывают на то, что *sOrn5*-опосредованная оптогенетика более контролируема с точки зрения временной точности, чем у *hM3Dq*.

[084] *sOrn5* оптогенетика позволяет пространственно точно контролировать клеточную активность. Ограничение кратковременной световой стимуляции (63 мс) в субклеточной области отдельной клетки НЕК 293Т, экспрессирующей *sOrn5*, приводит к немедленной активации одной клетки. Интересно, что в области с высокой степенью слияния клеток сигналы Ca^{2+} распространяются на окружающие клетки, что позволяет предположить межклеточную коммуникацию между клетками НЕК 293Т через еще не идентифицированный механизм. *sOrn5* экспрессируется в первичных культурах астроцитов, полученных из мозга новорожденных мышей, с векторами AAV для бицистронной экспрессии *sOrn5* и маркерного белка EGFP. Используя краситель Calbryte 630 AM для мониторинга уровней Ca^{2+} , было обнаружено, что освещение синим светом астроцитов, экспрессирующих *sOrn5*, вызывает сильные колебания Ca^{2+} (приблизительно 8 $\Delta F/F$). Когда световая стимуляция (63 мс) точно ограничена только субклеточной областью отдельного астроцита, экспрессирующего *sOrn5*, наблюдается распространение сигнала Ca^{2+} внутри отдельной клетки. Подобно тестам в клетках НЕК 293Т, наблюдается волнообразное распространение сигналов Ca^{2+} от стимулированного астроцита, которые постепенно переходили в более дистальные, нестимулированные астроциты. Таким образом, эти эксперименты демонстрируют, что оптогенетика *sOrn5* позволяет точно

контролировать пространство, и предполагают, что может быть полезно изучить динамику астроцитарных сетей, которая была первоначально обнаружена с помощью нейрохимической и механической стимуляции.

[085] В настоящем документе настоящее изобретение демонстрирует применение Orn5 согласно настоящему изобретению в качестве чрезвычайно эффективного оптогенетического инструмента для восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации G_q -сигнализации. Предыдущие исследования охарактеризовали Orn5 млекопитающих как чувствительный к УФ G_i -связанный опсин; авторы изобретения неожиданно обнаружили, что видимый синий свет может индуцировать быстрые колебания Ca^{2+} , накопление IP_1 и активацию РКС в экспрессирующих Orn5, например, экспрессирующих cOrn5 или экспрессирующих tOrn5, клетках млекопитающих.

[086] В таблице 6 перечислены обеспечивающие такую возможность характеристики cOrn5 путем прямого сравнения его амплитуд ответа, светочувствительности, временного разрешения и требования к дополнительным хромофорам с другими оптогенетическими инструментами. Для клеток, экспрессирующих cOrn5, импульсы синего света длительностью всего лишь 10 мс с интенсивностью 16 мВт/мм² вызывают быстрое увеличение сигналов Ca^{2+} с пиковыми амплитудами 3-8 $\Delta F/F$. Напротив, до настоящего изобретения было обнаружено, что активация opto-a1AR или Orn4 млекопитающих, двух предлагаемых оптогенетических инструментов для G_q -сигнализации, требует приблизительно в 3 раза большей интенсивности света (7-40 мВт/мм²) и длительного воздействия света (20-60 с) и вызывает только слабые сигналы Ca^{2+} (0,25-0,5 $\Delta F/F$). Следовательно, opto-a1AR или Orn4 млекопитающего не могут имитировать профили быстрой активации эндогенных рецепторов, связанных с G_q , которые часто запускают сильную G_q -сигнализацию при субсекундном применении их соответствующих лигандов. Напротив, недавние систематические характеристики показывают, что opto-a1AR- и Orn4-опосредованные оптогенетические стимуляции не увеличивают амплитуды сигналов Ca^{2+} и лишь слегка модулируют частоту колебаний Ca^{2+} и синаптических событий даже после длительного освещения (Gerasimov et al., 2021; Mederos et al., 2019).

[087] Orn5 в настоящем изобретении, в частности, оптогенетика на основе cOrn5 или tOrn5 также обладает преимуществом с точки зрения безопасности и удобства. Хотя сообщается, что Orn5 от многих видов реагирует на УФ-излучение (Kojima et al., 2011), cOrn5 оптимально активируется синим светом с длиной волны 470 нм, который проникает лучше, чем УФ, и позволяет избегать УФ-ассоциированной клеточной токсичности. Его сверхчувствительность к свету также минимизирует потенциальный артефакт нагрева.

cOrn5 или tOrn5 сильно и многократно активируется светом без необходимости наличия экзогенного ретиналя, возможно потому, что cOrn5 или tOrn5 является бистабильным опсином, который ковалентно связывается с эндогенным ретиналем и, таким образом, устойчив к фотодеградации (Koyanagi and Terakita, 2014; Tsukamoto and Terakita, 2010). Напротив, эксперименты с Orn4 на млекопитающих требуют наличия дополнительного ретиналя и демонстрируют длительное время ответа и низкую светочувствительность. Orn5 в настоящем изобретении, в частности, cOrn5 или tOrn5, в качестве однокомпонентной системы особенно применим для исследований *in vivo*, поскольку он позволяет избежать сложностей, связанных с доставкой соединения в ткань во время эксперимента.

[088] Оптогенетика Orn5 в настоящем изобретении, в частности, оптогенетика cOrn5 или tOrn5, также имеет некоторые серьезные преимущества по сравнению с инструментами хемогенетики и разарретирования (*uncaging*). Он гораздо более точен во времени и предлагает одноклеточное или даже субклеточное пространственное разрешение. Orn5 в настоящем изобретении, в частности, cOrn5 или tOrn5, также отличается от инструментов "разарретирования" на основе заключенных соединений, таких как заключенный кальций и заключенный IP₃, поскольку эти инструменты требуют предварительной загрузки соединения и только частично имитируют Ca²⁺-связанные пути, связанные с G_q-сигнализацией и/или активацией клеток. Существуют другие инструменты "разарретирования", такие как заключенный глутамат и заключенный АТФ (Ellis-Davies, 2007; Lezmy et al., 2021), которые воздействуют на эндогенные GPCR (G-белок сопряженный рецептор). Однако эти заключенные соединения требуют их введения во внеклеточную среду или внутриклеточную цитоплазму, что ограничивает их применение в животных, демонстрирующих нормальные поведенческие реакции (Adams and Tsien, 1993b).

[089] Orn5 в настоящем изобретении, в частности, cOrn5 или tOrn5, оптогенетика должна быть особенно пригодна для точной активации внутриклеточной G_q-сигнализации и/или активации клеток, которая впоследствии запускает высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных хранилищ и активирует РКС. Orn5 в настоящем изобретении, в частности, cOrn5 или tOrn5, отличается от существующих оптогенетических инструментов на основе каналов, таких как ChR2 или его варианты, которые перемещают катионы через плазматическую мембрану.

[090] На основании высокой светочувствительности Orn5 в настоящем изобретении настоящее изобретение дополнительно демонстрирует, что Orn5 в настоящем изобретении можно применять для восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации G_q-сигнализации, таким образом, можно применять для лечения

или облегчения повреждения внешнего слоя сетчатки, потери или дегенерации фоторецепторов, дегенеративного заболевания сетчатки, потери чувствительности к свету или потери восприятия света, потери зрения из-за дефицита восприятия или чувствительности к свету или слепоты.

[091] В некоторых вариантах осуществления Orp5 в настоящем изобретении может быть использован для восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки, если ганглиозные клетки сетчатки не полностью мертвы.

[092] В некоторых вариантах осуществления Orp5 в настоящем изобретении может быть использован для лечения или предотвращения заболеваний, связанных с дегенерацией и/или гибелью ганглиозных клеток сетчатки (RGC).

[093] В некоторых вариантах осуществления изобретения Orp5 в настоящем изобретении может быть использован для лечения или предотвращения пигментного ретинита (RP), макулодистрофии, возрастной макулодистрофии (AMD), аутосомно-доминантной атрофии зрительного нерва (ADOA) и/или глаукомы.

[094] В настоящем изобретении cOrp5, cOPN5, O5 и orp5m курицы используются взаимозаменяемо.

[095] В настоящем изобретении orp5, OPN5, Опсин и Orp5 используются взаимозаменяемо.

[096] Описания конкретных вариантов осуществления и примеры представлены в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения. Специалисты в данной области техники легко распознают множество несущественных параметров, которые могут быть изменены или модифицированы для получения по существу схожих результатов.

[097] Примеры

[098] Материалы и методы:

[099] Таблица 1: Праймеры для клонирования

Прямой праймер V5-cOrp5	5'-cgtgaggtaccggatcctctagaatgggcaagcccatccccaacc ccctgctgggcctggacagcaccatgagtgggatggcatcggac-3'
Обратный праймер V5-cOrp5	5'-tcgataagcttgatatcgaattcttagacttccagtgggttccgct-3'
Прямой праймер cOrp5-T2A-eGFP для промотора hSyn	5'-tagagtgcagctcaagcttccaccatgagtgggatggcatcggactgca-3'
Обратный праймер cOrp5-T2A-eGFP для промотора hSyn	5'-aaccgcgggcccctctagagcatatgttactgtacagctcgtccatgccg-3'

Прямой праймер сOpn5-T2A-eGFP для промотора GfaABC1D	5'-acctccgctgctcgcggggtctagaatgagtgggatggcatcggactgca-3'
Обратный праймер сOpn5-T2A-eGFP для промотора GfaABC1D	5'-tatcgataagcttgatcgcaattcttactgtacagctcgccatgccg-3'
Прямой праймер сOpn5-T2A-eGFP для промотора EF1a	5'-tacattatacgaagttatggcgcgcttattactgtacagctcgccatg-3'
Обратный праймер сOpn5-T2A-eGFP для промотора EF1a	5'-atactttatacgaagttatgctagccaccatgagtgggatggcatcggactg-3'
Прямой праймер сOpn5-T2A-mCherry	5'-gcatcacctccgctgctcgcggggtatgagtgggatggcatcggactgca - 3'
Обратный праймер сOpn5-T2A-mCherry	5'-tcaccatggtggcgaccgggggatctggccaggattctcctcgactgca - 3'

[0100] Таблица 2: Рекombинантная ДНК

pcDNA3.1-opto-a1AR-EYFP	Плазмида Addgene #20947
EGFP-CAAX	Дар от Yulong Li
pLJM1-EGFP	Плазмида Addgene #19319
pAAV-GfaABC1D-hM3D(Gq)-mCherry	Плазмида Addgene #50478
pAAV-EF1a-DIO-eGFP-WPRE-pA	н/д
pAAV-hSyn-GOI	н/д
pLJM1-cmv-cOpn5	н/д
pLJM1-cmv-tOpn5	н/д
pLJM1-cmv-hOPN5	н/д
pLJM1-cmv-mOpn5	н/д
pLJM1-cmv-V5-Opn5	н/д
pLJM1-cmv-cOpn5-T2A-eGFP	н/д
PAAV-hSyn-cOpn5-T2A-eGFP-WPR-pA	н/д
PAAV-GfaABC1D-cOpn5-T2A-eGFP-WPR-pA	н/д
pAAV-EF1a-DIO-cOpn5-T2A-eGFP-WPRE-pA	н/д
PAAV-GfaABC1D-cOpn5-T2A-mCherry-WPR-pA	н/д

[0101] Таблица 3: Вирусные штаммы

Lenti-cmv-cOpn5-puro	Китайский институт исследований мозга, Пекин
Lenti-cmv-hOPN5-puro	Китайский институт исследований мозга, Пекин
Lenti-cmv-tOpn5-puro	Китайский институт исследований мозга, Пекин
Lenti-cmv-mOpn5-puro	Китайский институт исследований мозга, Пекин
Lenti-cmv- hM3Dq -puro	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/9-EF1a-DIO-cOpn5-T2A-eGFP	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/9-hSyn-cOpn5-T2A-eGFP	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/9-Ef1a-DIO-cOpn5-T2A-eGFP	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/8-GFaABC1D-cOpn5-T2A-eGFP	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/8-GfaABC1D-cOpn5-T2A-mCherry	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/9-EF1a-EGFP	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2-EF1 α -DIO-GCaMP6m	Китайский институт исследований мозга, Пекин
AAV2/9-GfaABC1D-ATP1.0	WZ Biosciences Inc. Кат. # YL006003-AV9
AAV9-hSyn-NES-jRGECO1a-WPRE	WZ Biosciences Inc. Кат. # BS8-NOAAAV9
AAV2/9-mCaMKIIa-jGCaMP7b-WPRE-pA	Shanghai Taitool Bioscience Co., Ltd Кат. # S0712-9-H20

[0102] Таблица 4: Источники светового возбуждения

Фиг. 1f, 1g, фиг. 2с, 2d, 2е, 2f; фиг. 3b, 3с; фиг. 4a, 4b, 4е, 4f, 4h; фиг. 5a, 5е, 5f, 5g	470 нм установленный на поверхности LED (светодиод)	Thorlabs	M470L3
Фиг. 1b, 1d, 1е; фиг. 2a, 2b фиг. 3d, 3f, 3g;	488 нм от источника света микроскопа	Nikon	A1R MP
Фиг. 3a	365 нм установленный на поверхности LED	LG3535	диапазон длины волны: от 360 до 370 нм

Фиг. 3а	395 нм установленный на поверхности LED	LG3535	диапазон длины волны: от 390 до 400 нм
Фиг. 3а	561 нм лазер	Changchun New Industries Optoelectronics Technology, Китай	MGL-FN-561
Фиг. 3а	590 нм установленный на поверхности LED	CREE XP-E2	диапазон длины волны: от 570 до 615 нм
Фиг. 3а	630 нм установленный на поверхности LED	CREE XP-E2	диапазон длины волны: от 615 до 660 нм
Фиг. 4с, 4d	515 нм лазер	Changchun New Industries Optoelectronics Technology, Китай	MGL-F-515

[0103] Таблица 5: Оборудование для микроскопии

Фиг. 1b, 1d, 1e; фиг. 2a, 2b	Мультифотонные конфокальные микроскопы	Nikon	A1R MP
Фиг. 3a, 3b, 3c; Фиг. 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f	Вращающийся диск	Nikon	ECLIPASE Ti
Фиг. 5a	Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп	Zeiss	LSM 880

[0104] Таблица 6: Статистический анализ:

Фиг.	Параметры	n на группу	Анализ	P-значение
1f	контроль по сравнению со светом	4,4	Тест множественных сравнений Тьюки	P < 0,0001
	свет по сравнению со светом + YM-254890	4,4	Тест множественных сравнений Тьюки	P = 0,0128
1g	контроль по сравнению со светом	4,4	Тест множественных сравнений Тьюки	P = 0,0096

	свет по сравнению со светом + стауроспорин	4,4	Тест множественных сравнений Тьюки	P = 0,0004
2b	Группа cOrp5: свет по сравнению с YM-254890	19,15	Тест множественных сравнений Тьюки	P < 0,0001
	Группа cOrp5: YM-254890 по сравнению с промывкой	15,11	Тест множественных сравнений Тьюки	P < 0,0001
	Группа cOrp5: свет по сравнению с промывкой	19,11	Тест множественных сравнений Тьюки	P = 0,2239
	Группа tOrp5: свет по сравнению с YM-254890	15,17	Тест множественных сравнений Тьюки	P < 0,0001
	Группа tOrp5: YM-254890 по сравнению с промывкой	17,13	Тест множественных сравнений Тьюки	P < 0,0001
	Группа tOrp5: свет по сравнению с промывкой	15,13	Тест множественных сравнений Тьюки	P = 0,9388
2d	контроль по сравнению со светом	4,4	Непарный t-критерий	P = 0,4338
2f-слева	контроль по сравнению со светом	3,3	Тест множественных сравнений Тьюки	P = 0,992
2f-справа	Группа cOrp5: контроль по сравнению со светом	4,4	Тест множественных сравнений Сидака	P = 0,0223
	Группа tOrp5: контроль по сравнению со светом	4,4	Тест множественных сравнений Сидака	P = 0,4174
	Группа hOPN5: контроль по сравнению со светом	4,4	Тест множественных сравнений Сидака	P < 0,0001
	Группа mOrp5: контроль по сравнению со светом	4,4	Тест множественных сравнений Сидака	P < 0,0001

[0105] Пример 1 cOrp5 опосредует оптогенетическую активацию G_q-сигнализации

[0106] Тестировали, обладает ли гетерологичная экспрессия ортологов *Orn5* курицы, черепах, людей и мышей (которые на 80-90% идентичны белковой последовательности) способностью опосредовать активацию G_q -сигнализации, индуцированную синим светом, в клетках НЕК 293Т (фиг. 1а и таблица 7). Для контроля относительного ответа Ca^{2+} используют синий свет для стимуляции и красный внутриклеточный кальциевый индикатор Calbryte™ 630 AM (фиг. 1b). Ортологи *Orn5* курицы (*cOrn5*) и черепахи (*tOrn5*) опосредуют немедленное и сильное светоиндуцированное увеличение сигнала Ca^{2+} (приблизительно $3 \Delta F/F$), тогда как световой эффект не наблюдается от клеток, экспрессирующих ортологи *Orn5* человека или мыши (фиг. 1d и фиг. 2а, b). Как показано на примере ортолога, *cOrn5* курицы совместно локализован с мембранным маркером EGFP-СААХ, что указывает на то, что он эффективно транспортировался к плазматической мембране (фиг. 1с). В культуральную среду не добавляли экзогенный ретиналь, что позволяет предположить, что эндогенный ретиналь является достаточным для обеспечения функциональности *cOrn5*. Сигналы Ca^{2+} устойчивы к удалению внеклеточного Ca^{2+} , что указывает на высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ (фиг. 2с). Преинкубация с YM-254890, высокоселективный ингибитор G_q белков³³, обратимо устраняет индуцированные светом колебания Ca^{2+} в обеих *cOrn5*-экспрессирующих клетках (фиг. 1е). В клетках, экспрессирующих *cOrn5*, но не в клетках, экспрессирующих *OPN5* человека, обнаруживается светоиндуцированное увеличение уровня инозитолфосфата (IP_1), продукта быстрого распада IP_3 ; кроме того, степень этого увеличения уменьшается при обработке YM-254890 (фиг. 1f и фиг. 2d). В клетках НЕК 293Т, экспрессирующих *cOrn5*, синий свет также запускает фосфорилирование белка MARCKS, хорошо известной мишени РКС³⁴, в зависимости от активности РКС (фиг. 1g и фиг. 2е). Напротив, освещение синим светом эффективно снижает уровни cAMP в клетках, экспрессирующих *Orn5* человека и мыши, с ретиналем, но не оказывает такого эффекта в клетках, экспрессирующих *cOrn5*, без ретиналя (фиг. 2f). В совокупности эти данные подтверждают, что освещение синим светом обеспечивает связывание *cOrn5* с сигнальным путем G_q в клетках НЕК 293Т.

[0107] Таблица 7. Опсины и виды

	Альтернативное название	виды	
Orn5 курицы	cOrn5	Gallus gallus	GenBank NM_001130743.1
Orn5 черепахи	tOrn5	Chelonia mydas	GenBank XM_007068312.4
Orn5 человека	hOPN5	Homo sapiens	GenBank AY377391.1
Orn5 мыши	mOrn5	Mus musculus	GenBank NM_181753.4

[0108] На фиг. 1 показано, что сOrn5 опосредует индуцированную светом мощную активацию G_q -сигнализации в клетках НЕК 293Т.

[0109] а) Схематическая диаграмма предполагаемой внутриклеточной сигнализации в ответ на светоиндуцированную активацию сOrn5. PLC: фосфолипаза С; PIP_2 : фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат; IP_3 : инозитол-1,4,5-трисфосфат; IP_1 : инозитолмонофосфат; DAG: диацилглицерин; PKC: протеинкиназа С; YM-254890: селективный ингибитор белка G_q .

[0110] б) Псевдоцветные изображения сигнала Ca^{2+} до и после стимуляции синим светом (10 с; 100 мкВт/мм²; 488 нм) в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих Orn5 трех видов (*Gallus gallus*, *Homo sapiens* и *Mus musculus*). Масштабная линейка, 10 мкм.

[0111] в) Су3-контрастно окрашенный слитый белок V5-сOrn5 (красный) совместно локализовали с меченым мембраной EGFP-CAAX (зеленый) в клетках НЕК 293Т. Контрастно окрашенный DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) (синий) указывает на клеточные ядра. Масштабная линейка, 10 мкм.

[0112] д) Временные циклы вызванных светом сигналов Ca^{2+} для клеток, показанных в сек.

[0113] е) Ингибитор белка G_q YM-254890 (10 нМ) обратимо блокировал сOrn5-опосредованные, светоиндуцированные сигналы Ca^{2+} .

[0114] ф) YM подавлял накопление IP_1 , вызванное непрерывной световой стимуляцией (3 мин; 100 мкВт/мм²; 470 нм) в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих сOrn5 (слева). ***P < 0,0001, *P = 0,0128; тест множественных сравнений Тьюки.

[0115] г) Фосфорилирование MARCKS в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих сOrn5, в контрольной группе (без световой стимуляции), группе световой стимуляции и группе свет + стауроспорин (ST, ингибитор PKC). Количество p-MARCKS в той же фракции нормализовали относительно количества α -тубулина. **P = 0,0096, ***P = 0,0004; тест множественных сравнений Тьюки.

[0116] На фиг. 2 показано, что сOrn5 связан с G_q -сигнализацией, но не с G_i .

[0117] а) Псевдоцветные изображения сигнала Ca^{2+} до и после стимуляции синим светом (10 с; 100 мкВт/мм²; 488 нм) в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих Orn5 видов черепах (*Chelonia mydas*). Масштабная линейка, 10 мкм (слева); Временные циклы вызванных светом сигналов Ca^{2+} для клеток с ответом (справа).

[0118] б, Групповые данные ингибитора белка G_q YM-254890 (10 нМ), который обратимо блокировал опосредованные сOrn5 и Orn5 черепахи, светоиндуцированные сигналы Ca^{2+} . ****P < 0,0001, однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Планки погрешностей показывают S.E.M.

[0119] с, Временной цикл сигнала Ca^{2+} с фотостимуляцией (10 мс; 16 мкВт/мм²; 470 нм) без внеклеточного Ca^{2+} .

[0120] d, Накопление IP_1 в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих Orp5 человека, с или без световой стимуляции (справа). n.s., без значимого различия; непарный t-тест.

[0121] e, Один представитель фосфорилирования MARCKS в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих сOrp5, в контрольной группе (без световой стимуляции), группе световой стимуляции и группе свет+стауроспорин. Количество p-MARCKS в той же фракции нормализовали относительно количества α -тубулина.

[0122] f, Свет не влияет на уровни сАМР (преинкубация 10 мкМ форсколина) в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих сOrp5, без дополнительного ретиналя в среде (левая панель). На правой панели показано влияние фотостимуляции на концентрации сАМР для клеток НЕК 293Т, экспрессирующих Orp5s от четырех различных видов, после преинкубации 10 мкМ ретиналя.

[0123] Планки погрешностей в d и f показывают S.E.M.

[0124] Пример 2 Оптогенетика, опосредованная сOrp5, является чувствительной и точной

[0125] Проводят характеристику активирующихся светом свойств сOrp5, гетерологично экспрессирующегося в клетках НЕК 293Т. Хотя Orp5 ранее рассматривался как чувствительный к ультрафиолету (УФ) фоторецептор²⁷, картирование с набором длин волн в диапазоне от 365 до 630 нм при фиксированной интенсивности света (100 мкВт/мм²) показывало, что синий свет с длиной волны 470 нм вызывал самые сильные колебания Ca^{2+} , при этом свет UVA (365 и 395 нм) является менее эффективным, а видимый свет с большей длиной волны (561 нм или более) является полностью неэффективным (фиг. 3a). Тестируют влияние различной продолжительности света на клетки НЕК 293Т, экспрессирующие сOrp5. При стимуляции короткими световыми импульсами (1, 5, 10, 20, 50 мс; 16 мкВт/мм²; 470 нм) показано, что ответ Ca^{2+} достигает режима насыщения при продолжительности света более 10 мс (фиг. 3b). Более длительная продолжительность света дополнительно не увеличивает амплитуду сигнала Ca^{2+} при этой интенсивности света (16 мкВт/мм²; 470 нм) (фиг. 4a). Подача 470 нм света с различной интенсивностью показывает, что синий свет приблизительно 4,8 мкВт/мм² и 16 мкВт/мм² дает приблизительно половину максимального и полный максимальный ответы, соответственно (фиг. 3с и фиг. 4b). Таким образом, светочувствительность сOrp5 на 3-4 порядка выше, чем зарегистрированные значения светочувствительных G_q -связанных GPCR, и даже на 2-3 порядка выше, чем у обычно используемого оптогенетического инструмента Channelrhodopsin-2 (ChR2) (Lin, 2011; Zhang et al., 2006) (таблица 8). Вместе эти результаты показывают, что сOrp5 может

функционировать как однокомпонентный оптогенетический инструмент без дополнительного ретиналя и что сOrn5 является сверхчувствительным к синему свету с точки зрения его полной активации, требующей низкой интенсивности света (16 мВт/мм^2) и короткой продолжительности (10 мс).

[0126] Таблица 8: Сравнение сOrn5 с другими оптогенетическими инструментами

	Длина волны $\lambda_{\text{макс}}$ (нм)	Светочувствительность	Продолжительность стимуляции	Потребность в экзогенных химических веществах (ретиналь)	Амплитуда ответа	Модель
Дикий тип ChR2 ^{1,2}	470 нм	от 8 до 12 мВт/мм ²	2,3±1,1 мс	Нет	устойчивое состояние: отношение пикового тока: $0,4 \pm 0,04$; (731 ± 100 пА	Гиппокампальная клеточная культура
ChR2 H134R ³	450 нм	приблизительно 10 мВт/мм ² (470 нм)	0,96 ± 0,12 мс	Нет	4,47 нА	НЕК 293Т
ChETA ⁴	490 нм	приблизительно 10 мВт/мм ²	0,9 ± 0,1 мс	Нет	устойчивое состояние: отношение пикового тока: $0,6 \pm 0,04$; (645 ± 47 пА	Гиппокампальная клеточная культура
ChrimsonR ⁵	590 нм	4,6 мВт/мм ²	0,9 ± 0,1 мс	Нет	приблизительно 300 пА	культивируемые нейроны

мелано псин мышь (Orn4) ⁶	480 нм	1015 фотонов с ⁻¹ см ⁻² (500 нм)	более 60 с	11-цис- ретиальдегид	приблизительно 0,1 (ΔF/F) амплитуда ответа Ca ²⁺	Клетки HEK293-TRPC3
мелано псин мышь (Orn4) и его мутанты ⁷	488 нм	источник белого флуоресцентного света (интенсивность не определена)	60 с	11-цис- ретиаль	приблизительно 0,25 (ΔF/F) амплитуда ответа Ca ²⁺ , наилучший мутант Orn4 ^{9A}	СНО (клетки яичника китайского хомячка) клетки
мелано псин человек а hOrn4 ⁸	473 нм	7 мВт/мм ²	20 с	Неизвестно	приблизительно 2 (ΔF/F) частоты событий Ca ²⁺ , но без существенного изменения амплитуды Ca ²⁺	астроциты in vivo
opto- α1AR ⁹	500 нм	7 мВт/мм ²	60 с	Нет	приблизительно 0,227 (ΔF/F) амплитуда ответа Ca ²⁺	Клетки HEK

opto- $\alpha 1AR^{10}$	473 нм	20 Гц, 45 мс световые импульсы, 5 мВт	5 мин	Нет	увеличение частоты sIPSC (спонтанные ингибиторные постсинаптические токи) более 20%	астроциты in vitro
меланопсин мчеловека	470 нм	40 мВт/мм ²	25 с	ATR (полностью транс-ретиналь)	приблизительно 0,646 ($\Delta F/F$) амплитуда ответа Ca^{2+}	НЕК 293Т
opto- $\alpha 1AR$	510 нм	7 мВт/мм ²	60 с	Нет	приблизительно 0,5 ($\Delta F/F$) амплитуда ответа Ca^{2+}	НЕК 293Т
hM3Dq				CNO	приблизительно 1,6 ($\Delta F/F$) частоты событий Ca^{2+} , но без существенного изменения амплитуды Ca^{2+}	НЕК 293Т

cOrn5	470 нм	16 мкВт/мм ²	10 мс	Нет	приблизительно 3,0 (ΔF/F) амплитуда ответа Ca ²⁺	клетки НЕК- 293Т
	470 нм	0,026 мкВт/мм ²	более 2 с	Нет	приблизительно 1 (ΔF/F) амплитуда ответа Ca ²⁺	клетки НЕК- 293Т

[0127] Сравнивают производительность cOrn5 с производительностью opto-a1AR, химерной GPCR, сконструированной путем смешивания родопсина с G_q-связанным адренергическим рецептором. Следуя протоколу в предыдущем отчете¹⁴, было обнаружено, что очень длительное воздействие сильного освещения (60 с; 7 мВт/мм²) требуется для запуска медленного и небольшого (приблизительно 0,5 ΔF/F) увеличения сигнала Ca²⁺ в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих opto-a1AR, и освещение 15 с является неэффективным (фиг. 4с, d). Также сравнивают производительность cOrn5 с производительностью orn4, природного опсина, который, как сообщалось, является инструментом для активации G_q-сигнализации. Установлено, что длительное воздействие сильного освещения (25 с; 40 мВт/мм²) и дополнительный ретиналь требуется для запуска медленного (приблизительно 1 ΔF/F) увеличения сигнала Ca²⁺ в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих orn4 (фиг. 4е, f). Поэтому, по сравнению с существующими инструментами на основе опсина (opto-a1AR и orn4), cOrn5 намного более светочувствителен (приблизительно на 3 порядка более чувствителен), требует гораздо более короткого времени экспозиции (10 мс по сравнению с 60 с), и дает более сильные ответы.

[0128] Сравнивают производительность cOrn5 с производительностью популярного G_q-связанного хомогенетического инструмента hM3Dq, который активируют путем добавления экзогенного низкомолекулярного лиганда клозапин-N-оксида (CNO)³⁷⁻³⁹. Светоиндуцированная активация клеток НЕК 293Т, экспрессирующих cOrn5, имеет аналогичную амплитуду пикового ответа сигнала Ca²⁺, что и CNO-индуцированная активация клеток НЕК 293Т, экспрессирующих hM3Dq. Между тем, клетки НЕК 293Т, экспрессирующие cOrn5, имеют более быстрый и во времени более точный ответ, а также более быстрое время восстановления, чем клетки НЕК 293Т, экспрессирующие hM3Dq (фиг.

4g-i). Эти результаты указывают на то, что сOrn5-опосредованная оптогенетика более контролируема с точки зрения временной точности, чем у hM3Dq.

[0129] сOrn5 оптогенетика позволяет пространственно точно контролировать клеточную активность. Ограничение кратковременной световой стимуляции (63 мс) субклеточной областью отдельной клетки НЕК 293Т, экспрессирующей сOrn5, приводит к немедленной активации одной клетки. Интересно, что в области с высокой степенью слияния клеток сигналы Ca^{2+} распространялись на окружающие клетки, что позволяет предположить межклеточную коммуникацию между клетками НЕК 293Т через еще не идентифицированный механизм (фиг. 3d, e). Полученные результаты распространяются на первичные клеточные культуры. сOrn5 экспрессируется в первичных культурах астроцитов, полученных из мозга новорожденных мышей, с векторами AAV для бицистронной экспрессии сOrn5 и маркерного белка EGFP (фиг. 5a). Используя краситель Calbryte 630 AM для мониторинга уровней Ca^{2+} , было обнаружено, что освещение синим светом астроцитов, экспрессирующих сOrn5, вызывает сильные колебания Ca^{2+} (приблизительно 8 $\Delta F/F$) (фиг. 5b, c). Если световая стимуляция (63 мс) точно ограничена только субклеточной областью отдельного астроцита, экспрессирующего сOrn5, наблюдается распространение сигнала Ca^{2+} внутри отдельной клетки (фиг. 3f). Подобно тестам в клетках НЕК 293Т, наблюдается волнообразное распространение сигналов Ca^{2+} от стимулированного астроцита, которые постепенно переходили в более удаленные, нестимулированные астроциты (фиг. 3g, h). Таким образом, эти эксперименты демонстрируют, что оптогенетика сOrn5 позволяет точно контролировать пространство, и предполагают, что может быть полезно изучить динамику астроцитарных сетей, которая была первоначально обнаружена с помощью нейрхимической и механической стимуляции 40,41.

[0130] На фиг. 3 показано, что сOrn5 чувствительно опосредует оптический контроль G_q -сигнализации с высоким временным и пространственным разрешением.

[0131] а, Схематическая диаграмма выбранных длин волн (365, 395, 470, 515, 561, 590 и 630 нм; левая панель) и амплитуд сигнала Ca^{2+} клеток НЕК 293Т, экспрессирующих сOrn5, в ответ на световую стимуляцию с различными длинами волн (2 с; 100 мкВт/мм²; правая панель). Планки погрешностей показывают S.E.M.

[0132] b), Величина ответа при различной продолжительности световой стимуляции (1, 5, 10, 20 или 50 мс; 16 мкВт/мм²; 470 нм). Планки погрешностей показывают S.E.M.

[0133] c) Временной цикл сOrn5-опосредованных сигналов Ca^{2+} при различной интенсивности света (0, 4, 8, 16 или 32 мкВт/мм²; 10 мс; 470 нм; для стимуляции 10 мс 16

мкВт/мм², 10% активация пика = $1,36 \pm 0,55$ с; 90% активация пика = $2,37 \pm 0,87$ с; время затухания $\tau = 18,66 \pm 4,98$ с, среднее \pm S.E.M.; n = 10 клеток).

[0134] d) Изображения распространения сигнала Ca²⁺, индуцированного светом (63 мс; 17 мкВт; стрелка указывает на область стимуляции), в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих сOrn5. Масштабная линейка, 10 мкм.

[0135] e) Псевдоцветные изображения, показывающие процесс распространения сигнала Ca²⁺ во времени d (кадр N/(N-1) более 1). Интервал кадра составлял 500 мс, и каждый кадр подсчитывается один раз.

[0136] f) Изображения распространения сигнала Ca²⁺, индуцированного светом, в одном первичном астроците, экспрессирующем сOrn5, стимулированном в субклеточной области (размер зоны стимуляции 4×4 мкм² и интервал рамки 300 мс). Масштабная линейка, 10 мкм.

[0137] g) Изображения индуцированного светом распространения сигнала Ca²⁺ в первичных астроцитах, экспрессирующих сOrn5. Масштабная линейка, 10 мкм.

[0138] h) Псевдоцветные изображения, демонстрирующие процесс распространения сигнала Ca²⁺ во времени g (кадр N/(N-1) более 1). Интервал кадра составлял 500 мс, и каждый кадр подсчитывается один раз.

[0139] На фиг. 4 показано, что сOrn5 опосредует более быстрый и чувствительный ответ на свет, чем орто-a1AR, hM3Dq или орn4.

[0140] a) Временной цикл сигнала Ca²⁺ со световыми импульсами (16 мкВт/мм²; 470 нм; 1, 5, 10, 20 или 50 мс).

[0141] b) Величина ответа при различных интенсивностях света (0, 4,8, 8, 16 или 32 мкВт/мм²) при 10 мс, 470 нм.

[0142] c) Псевдоцветные изображения исходных и пиковых сигналов Ca²⁺ ($\Delta F/F_0$) в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих орто-a1AR. Буферная среда содержит 10 мкМ полностью транс-ретиналя. Масштабная линейка, 30 мкм.

[0143] d) Влияние 60 с световой стимуляции на Ca²⁺ в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих орто-a1AR (n = 15 клеток; верхняя панель), и отсутствие эффекта 15 с световой стимуляции на сигналы Ca²⁺ (нижняя панель).

[0144] e) Псевдоцветные изображения исходных и пиковых сигналов Ca²⁺ ($\Delta F/F_0$) в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих OPN4 человека. Буферная среда содержит 10 мкМ полностью транс-ретиналь. Масштабная линейка, 30 мкм.

[0145] f) Влияние 25 с световой стимуляции на Ca²⁺ в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих OPN4, в пределах 10 мкМ ATR (n = 12 клеток; красная линия) и отсутствие эффекта без ATR на сигналы Ca²⁺ (черная панель).

[0146] g) Влияние световой стимуляции на сигналы Ca^{2+} в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих сOrn5. Верхние панели показывают псевдоцветные изображения исходного и пикового ответа. На нижней панели показана тепловая карта сигналов Ca^{2+} , вызванных сOrn5-опосредованной оптогенетической стимуляцией в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих сOrn5, в 5 последовательных тестированиях. Масштабная линейка, 20 мкм.

[0147] h) Влияние хемогенетической стимуляции на сигналы Ca^{2+} в клетках НЕК 293Т, экспрессирующих hM3Dq.

[0148] i) Временные циклы сигналов Ca^{2+} , вызванных сOrn5-опосредованной оптогенетической стимуляцией (10 с) и hM3Dq-опосредованной хемогенетической стимуляцией с кратковременным применением CNO (100 нМ; 10 с), соответственно.

[0149] На фиг. 5 показано, что сOrn5 эффективно опосредует активацию астроцитов.

[0150] а) сOrn5 экспрессировали в культивируемых первичных астроцитах с использованием AAV-сOrn5-T2A-EGFP (зеленый). Идентичность астроцитов подтверждали иммуноокрашиванием GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок) (красный). Масштабная линейка, 20 мкм.

[0151] b, Псевдоцветные изображения исходных и пиковых сигналов Ca^{2+} после световой стимуляции астроцитов, экспрессирующих сOrn5. Масштабная линейка, 20 мкм.

[0152] c) График сигналов Ca^{2+} и представление тепловой карты сигналов Ca^{2+} в ходе испытаний ($n = 25$ клеток).

[0153] Пример 3 Оптогенетическое восстановление зрения с использованием светочувствительного G_q -связанного нейропсина (Opsin 5)

[0154] Животная модель

[0155] 1. Здоровая сетчатка содержит несколько клеточных слоев: пигментный эпителий сетчатки, фоторецепторные колбочковые клетки, фоторецепторные палочковые клетки, горизонтальные клетки, биполярные клетки, клетки Мюллера, амакриновые клетки, ганглиозные клетки (фиг. 6). Метилнитрозомочевина (MNU) приводит к повреждению фоторецепторов (палочковых и колбочковых фоторецепторов), а затем вызывает дегенерацию сетчатки у животных. В качестве животной модели использовали дегенерацию сетчатки мышей, индуцированную MNU. Дегенерация сетчатки, вызванная однократной внутрибрюшинной инъекцией MNU в дозе 60 мг/кг массы тела.

[0156] 2. Мыши C3H/HeN^{Cr1} представляют собой модели генетической дегенерации сетчатки. Этот штамм имеет характеристику, которая является гомозиготной для мутации $Pde6b^{rd1}$, вызывающей дегенерацию сетчатки.

[0157] Авторы изобретения используют реакцию зрачков на свет с неподвижными головами мышей, чтобы проверить, может ли животное чувствовать свет, и авторы изобретения используют векторы AAV, экспрессирующие cOrn5 в ганглиозных клетках сетчатки мышей, чтобы спасти эти две мышинные модели. У мышей восстанавливалась реакция зрачков на свет, демонстрируя cOrn5-опосредованный подход по настоящему изобретению к лечению слепоты.

[0158] Эксперименты и результаты:

[0159] 1. Авторы изобретения используют камеру с ИК-блокировкой (IR - инфракрасный) для автоматического получения изображений зрачков мышей с зафиксированной головой. Оптическое волокно регулируют, чтобы свет (светодиодный источник света 470 нм) падал прямо на зрачки мышей с одинаковой интенсивностью света.

[0160] 2. Нормальные мыши до обработки MNU имеют быструю реакцию зрачков на свет (фиг. 7). У инбредных мышей C3H/HeNCrl отсутствовала реакция зрачков на свет (фиг. 7).

[0161] 3. Мыши с дегенерацией сетчатки C3H/HeNCrl или обработанные MNU, потеряли функции реакции зрачков на свет

[0162] 4. Авторы используют вектор AAV, экспрессирующий cOrn5-t2a-EGFP в ганглиозных клетках сетчатки мышей, на изображении показан EGFP во всей сетчатке через 4 недели после инъекции AAV (фиг. 8).

[0163] 5. После экспрессии cOrn5 ганглиозными клетками сетчатки мышей, снова проводят тест на реакцию зрачков на свет. У мышей, обработанных MNU, восстанавливалась реакция зрачков на свет (фиг. 9). Мыши C3H/HeNCrl появляются способность реакции зрачков на свет (фиг. 9).

[0164] 6. На фиг. 10 показан тест на реакцию зрачков на свет: у нормальных мышей (черная сплошная линия) размер зрачка быстро уменьшается в ответ на свет (ось X: время (секунда); ось Y: нормализованный размер зрачка). После обработки MNU мыши потеряли функции в тесте на реакцию зрачков на свет (серая сплошная линия). При использовании векторов AAV, экспрессирующих cOrn5 в ганглиозных клетках сетчатки (RGC) этих мышей, обработанных MNU, через 4 недели мыши частично восстанавливали способность реакции зрачков на свет (средняя сплошная линия).

[0165] Эти результаты демонстрируют подход авторов, согласно которому экспрессия cOrn5 в ганглиозных клетках сетчатки животных может вылечить дегенерацию сетчатки.

[0166] Пример 4

[0167] Описание экспериментов: следующая таблица 9 представляет собой частичный список ортологов сOrn5 из позвоночных животных, протестированных в настоящем изобретении. Целые гены всех зарегистрированных ортологов опсина 5 из позвоночных животных (подтип позвоночных, включая rotundia, хрящевых рыб, костных рыб, амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих) синтезировали и экспрессировали в клетках НЕК 293Т. Кальциевую визуализацию с или без стимуляции синим светом 470 нм выполняют для тестирования чувствительности ортологов опсина 5 в ответ на свет. Временной цикл индуцированного светом сигнала кальция показывает активированную степень сигнального пути G_q и чувствительность этих ортологов.

[0168] Таблица 9:

Запись	Имя записи	Активн ость	Названия белков	Названия генов	Организм	Длина
E0R7P 4	E0R7P 4_XEN LA		Orn5 (опсин)	orn5.L orn5 XELAEV _1802813 4mg	Xenopus laevis (гладкая шпорцевая лягушка)	341
A0A45 5SGG5	A0A45 5SGG5 _9EUP U		Опсин-5A	orn5a	Ambigolimax valentianus	425
A0A4Z 2FX25	A0A4Z 2FX25 _9TEL E		Опсин-5	OPN5_5 EYF80_04 4932	Liparis tanakaе (липарис Танаки)	178
A0A4Z 2FH27	A0A4Z 2FH27 _9TEL E		Опсин-5	OPN5_4 EYF80_04 9299	Liparis tanakaе (липарис Танаки)	399
A0A4Z 2IDU8	A0A4Z 2IDU8 _9TEL E		Опсин-5	OPN5_3 EYF80_01 3671	Liparis tanakaе (липарис Танаки)	396

A0A4Z 2H0H0	A0A4Z 2H0H0 _9TEL E		Опсин-5	OPN5_2 EYF80_03 0918	Liparis tanakaе (липарис Танаки)	153
A0A21 8USZ0	A0A21 8USZ0 _9PAS E		Опсин-5	OPN5_1 RLOC_00 008660	Lonchura striata domestica (японская амадина)	348
A0A4Z 2FVH4	A0A4Z 2FVH4 _9TEL E		Опсин-5	Opn5_0 EYF80_04 4930	Liparis tanakaе (липарис Танаки)	338
A0A4Z 2HA58	A0A4Z 2HA58 _9TEL E		Опсин-5	OPN5_0 EYF80_02 7087	Liparis tanakaе (липарис Танаки)	311
A0A21 8UGP1	A0A21 8UGP1 _9PAS E		Опсин-5	OPN5_0 RLOC_00 005796	Lonchura striata domestica (японская амадина)	417
G1L3V 2	G1L3V 2_AIL ME		Опсин 5	OPN5	Ailuropoda melanoleuca (большая панда)	381
A0A6P 4X9I3	A0A6P 4X9I3_ PANP R		Опсин-5	OPN5	Panthera pardus (леопард) (Felis pardus)	353
A0A1S 2ZDX4	A0A1S 2ZDX4 _ERIE U		Опсин-5	OPN5	Erinaceus europaeus (обыкновенный ёж)	353
A0A2I 4C032	A0A2I 4C032_ 9TELE		Опсин-5	opn5	Austrofundulus limnaeus	353

U3JFW 4	U3JFW 4_FIC AL		Опсин 5	OPN5	Ficedula albicollis (мухоловка- белошейка) (Muscicapa albicollis)	357
A0A2Y 9NPU7	A0A2Y 9NPU7 _DELL E		Опсин-5	OPN5	Delphinapterus leucas (белуха)	362
A0A1U 7U6G6	A0A1U 7U6G6 _CARS F		Опсин-5	OPN5	Carlito syrichta (филиппинский долгопят) (Tarsius syrichta)	354
A0A6I 9I544	A0A6I 9I544_ VICPA		Опсин-5	OPN5	Vicugna pacos (альпака) (Lama pacos)	353
M3YL S7	M3YL S7_MU SPF		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Mustela putorius furo (Фретка) (Mustela furo)	377
A0A5F 9CCV1	A0A5F 9CCV1 _RABI T		Опсин 5	OPN5	Oryctolagus cuniculus (дикий кролик)	366
A0A67 1EF51	A0A67 1EF51_ RHIFE		Опсин 5	OPN5	Rhinolophus ferrumequinum (большой подковонос)	380
A0A6P 6I1D4	A0A6P 6I1D4_ PUMC O		Опсин-5	OPN5	Puma concolor (пума)	353

G3RK G7	G3RK G7_GO RGO		Опсин 5	OPN5	Gorilla gorilla gorilla (западная равнинная горилла)	382
G1NY V5	G1NY V5_M YOLU		Опсин 5	OPN5	Myotis lucifugus (малая бурая ночница)	353
A0A6J 2L9P4	A0A6J 2L9P4_ 9CHIR		Опсин-5	OPN5	Phyllostomus discolor (бледный копыенос)	353
A0A2K 6AXI4	A0A2K 6AXI4_ MAC NE		Опсин 5	OPN5	Macaca nemestrina (свинохвостый макак)	354
A0A6J 3JM90	A0A6J 3JM90_ SAPA P		Опсин-5	OPN5	Sapajus apella (капуцин-фавн) (Cebus apella)	354
A0A45 2TE17	A0A45 2TE17_ URS MA		Опсин 5	OPN5	Ursus maritimus (белый медведь) (Thalarctos maritimus)	361
A0A38 4C5D1	A0A38 4C5D1_ URS MA		Опсин-5	OPN5	Ursus maritimus (белый медведь) (Thalarctos maritimus)	353
A0A2K 5U4B7	A0A2K 5U4B7_ MAC FA		Опсин 5	OPN5	Macaca fascicularis (макак-крабоед) (Cynomolgus monkey)	354
A0A2I 3MZV4	A0A2I 3MZV 4_PAP AN		Опсин-5	OPN5	Papio anubis (павиан анубис)	354

A0A2K 5U4B3	A0A2K 5U4B3 _MAC FA		Опсин 5	OPN5	Macaca fascicularis (макак-крабоед) (Cynomolgus monkey)	382
Q6U73 6	OPN5_ HUMAN	рассмо тренны й	Опсин-5 (рецептор 136, связанный с G- белком) (рецептор PGR12, связанный с G- белком) (нейропсин) (трансмембран ный белок 13)	OPN5 GPR136 PGR12 TMEM13	Homo sapiens (человек)	354
F6UZB 2	F6UZB 2_XEN TR		Опсин 5	orn5	Xenopus tropicalis (когтистая шпорцевая лягушка) (Silurana tropicalis)	345
A0A4 W3IAF 8	A0A4 W3IAF 8_CAL MI		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	orn5	Callorhinchus milii (австралийский каллоринх)	340
A0A6P 7NHM 6	A0A6P 7NHM 6_9TE LE		Опсин-5	orn5	Parambassis ranga (индийский стеклянный окунь)	355
H3B1A 3	H3B1A 3_LAT CH		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Latimeria chalumnae (латимерия)	290

A0A4 W3I3H 5	A0A4 W3I3H 5_CAL MI		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	orn5	Callorhinchus milii (австралийский каллоринх)	333
A0A1S 3MCD 5	A0A1S 3MCD 5_SAL SA		Опсин-5	orn5	Salmo salar (атлантический лосось)	328
A0A4 W4FP G5	A0A4 W4FP G5_EL EEL		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	orn5	Electrophorus electricus (электрический угорь) (Gymnotus electricus)	333
A0A6P 7LVJ1	A0A6P 7LVJ1 _BETS P		Опсин-5 изоформа X2	orn5	Betta splendens (бойцовая рыбка)	308
A0A6P 7LVE3	A0A6P 7LVE3 _BETS P		опсин-5 изоформа X1	orn5	Betta splendens (бойцовая рыбка)	365
A0A67 4IKC9	A0A67 4IKC9 _TERC A		Опсин 5	OPN5	Terrapene carolina triunguis (трехпалая коробчатая черепаха)	372
A0A67 4IMF3	A0A67 4IMF3 _TERC A		Опсин 5	OPN5	Terrapene carolina triunguis (трехпалая коробчатая черепаха)	347
F1NEY 2	F1NEY 2_CHI CK		Белок, содержащий домен	OPN5	Gallus gallus (курица)	357

			G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2			
E6P6L 8	E6P6L 8_DAN RE		Опсин 5	opn5	Danio rerio (данио- рерио) (Brachydanio rerio)	352
A0A67 1TVX9	A0A67 1TVX9 _SPAA U		Опсин 5	opn5	Sparus aurata (золотистый спар)	357
A0A7 M4FP4 0	A0A7 M4FP4 0_CRO PO		Опсин 5	OPN5	Crocodylus porosus (гребнистый крокодил) (Estuarine crocodile)	357
A0A67 1TVX4	A0A67 1TVX4 _SPAA U		Опсин 5	opn5	Sparus aurata (золотистый спар)	353
A0A6I 9Y3G3	A0A6I 9Y3G3 _9SAU R		Опсин-5	OPN5	Thamnophis sirtalis	277
G1KN V3	G1KN V3_AN OCA		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Anolis carolinensis (североамериканск ий красногорлый анолис) (American chameleon)	347
A0A49 3T549	A0A49 3T549_ ANAP P		Опсин 5	OPN5	Anas platyrhynchos platyrhynchos (кряква)	337
A0A6I 9HEL4	A0A6I 9HEL4 _GEOF O		Опсин-5 изоформа X2	OPN5	Geospiza fortis (средний земляной вьюрок)	354

A0A21 8UPZ6	A0A21 8UPZ6 _9PAS E		Опсин-5	OPN5 RLOC_00 008263	Lonchura striata domestica (японская амадина)	304
D8KW 68	D8KW 68_ZO NAL		Опсин 5	OPN5	Zonotrichia albicollis (белошейная зонотрихия)	354
A0A66 3EIX5	A0A66 3EIX5_ AQUC H		Опсин 5	OPN5	Aquila chrysaetos chrysaetos	343
G1NN A7	G1NN A7_M ELGA		Опсин 5	OPN5	Meleagris gallopavo (индейка)	358
A0A66 3EK31	A0A66 3EK31 _AQU CH		Опсин 5	OPN5	Aquila chrysaetos chrysaetos	370
A0A6J 0Z1K0	A0A6J 0Z1K0 _ODO VR		Опсин-5	OPN5	Odocoileus virginianus texanus	353
A0A6P 3J431	A0A6P 3J431_ BISBI		Опсин-5	OPN5	Bison bison bison	353
A0A2K 5R3Y3	A0A2K 5R3Y3 _CEBI M		Опсин 5	OPN5	Cebus imitator (обыкновенный капуцин) (Cebus capucinus imitator)	382
A0A67 1EF86	A0A67 1EF86_ RHIFE		Опсин 5	OPN5 mRhiFer1 _012304	Rhinolophus ferrumequinum (большой подковонос)	354

A0A6I 9ZSG3	A0A6I 9ZSG3 _ACIJ B		Опсин-5	OPN5	Acinonyx jubatus (гепард)	353
A0A2K 6R8Q2	A0A2K 6R8Q2 _RHIR O		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Rhinopithecus roxellana (рокселланов ринопитек) (Pygathrix roxellana)	354
A0A4 W2GZ A3	A0A4 W2GZ A3_BO BOX		Опсин 5	OPN5	Bos indicus x Bos taurus (гибридный крупный рогатый скот)	355
U3J4Q 3	U3J4Q 3_ANA PP		Опсин 5	OPN5	Anas platyrhynchos platyrhynchos (кряква)	380
A0A6J 2V8J5	A0A6J 2V8J5_ CHAC N		Опсин-5	opn5	Chanos chanos (ханос) (Mugil chanos)	355
A0A49 3T6P1	A0A49 3T6P1_ ANAP P		Опсин 5	OPN5	Anas platyrhynchos platyrhynchos (кряква)	400
A0A6J 2J0L1	A0A6J 2J0L1_ 9PASS		Опсин-5	OPN5	Pipra filicauda (нитехвостая пипра)	354
A0A6P 9CE92	A0A6P 9CE92_ PAN GU		Опсин-5	OPN5	Pantherophis guttatus (маисовый полоз) (Elaphe guttata)	357
A0A6J 1V4P8	A0A6J 1V4P8		Опсин-5	OPN5	Notechis scutatus (тигровая змея)	357

	_9SAU R					
A0A28 8HLV3	A0A28 8HLV3 _ANSC Y		Опсин-5	OPN5	Anser cygnoid (сухонос)	355
A0A15 1PID4	A0A15 1PID4_ ALLMI		Опсин-5	OPN5 Y1Q_002 0212	Alligator mississippiensis (миссисипский аллигатор)	369
Q5RIV 6	Q5RIV 6_DAN RE		Опсин 5 (нейропсин костистх рыб)	opn5	Danio rerio (данио- перио) (Brachydanio rerio)	352
D6RD V4	D6RD V4_HU MAN		Опсин-5	OPN5	Homo sapiens (человек)	382
J3KPQ 2	J3KPQ 2_HU MAN		Опсин-5	OPN5 hCG_1642 475	Homo sapiens (человек)	353
F6XNY 7	F6XN Y7_OR NAN		Опсин 5	OPN5	Ornithorhynchus anatinus (утконос)	327
A0A2K 6FXK2	A0A2K 6FXK2 _PROC O		Опсин 5	OPN5	Propithecus coquereli (сифака Кокереля) (Propithecus verreauxi coquereli)	354
E2RPZ 0	E2RPZ 0_CAN LF		Опсин 5	OPN5	Canis lupus familiaris (собака) (Canis familiaris)	380
A0A2K 6V732	A0A2K 6V732 _SAIB B		Опсин 5	OPN5	Saimiri boliviensis boliviensis (болливийский саймири)	381

A0A4X 2K722	A0A4X 2K722 _VOM UR		Опсин 5	OPN5	Vombatus ursinus (короткошерстный вомбат)	353
A0A6P 5KYE6	A0A6P 5KYE6 _PHAC I		Опсин-5	OPN5	Phascolarctos cinereus (коала)	355
A0A2K 6FXJ4	A0A2K 6FXJ4_ PROC O		Опсин 5	OPN5	Propithecus coquereli (сифака Кокереля) (Propithecus verreauxi coquereli)	380
A0A4X 2JZA4	A0A4X 2JZA4 _VOM UR		Опсин 5	OPN5	Vombatus ursinus (короткошерстный вомбат)	353
G1SX5 3	G1SX5 3_RAB IT		Опсин 5	OPN5	Oryctolagus cuniculus (дикий кролик)	353
A0A2U 3WI94	A0A2U 3WI94 _ODO RO		Опсин-5	OPN5	Odobenus rosmarus divergens (тихоокеанский морж)	353
A0A2K 6V724	A0A2K 6V724 _SAIB B		Опсин 5	OPN5	Saimiri boliviensis boliviensis (болливийский саймири)	354
A0A3Q 7XKC9	A0A3Q 7XKC9 _URSA R		Опсин-5	OPN5	Ursus arctos horribilis	353

A0A45 2RBH1	A0A45 2RBH1 _URSA M		Опсин 5	OPN5	Ursus americanus (барибал) (Euarctos americanus)	353
G1QV Y1	G1QV Y1_NO MLE		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Nomascus leucogenys (белощекий хохлатый гиббон) (Hylobates leucogenys)	382
G1QV X6	G1QV X6_NO MLE		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Nomascus leucogenys (белощекий хохлатый гиббон) (Hylobates leucogenys)	354
G3SJY 5	G3SJY 5_GOR GO		Опсин 5	OPN5	Gorilla gorilla gorilla (западная равнинная горилла)	354
A0A7N 9CSX2	A0A7N 9CSX2 _MAC FA		Опсин 5	OPN5	Macaca fascicularis (макак-крабод) (Cynomolgus monkey)	353
A0A38 4B2Q9	A0A38 4B2Q9 _BAL AS		Опсин-5	OPN5	Balaenoptera acutorostrata scammoni (северный тихоокеанский малый полосатик) (Balaenoptera davidsoni)	353
A0A2K 6L978	A0A2K 6L978_ RHIBE		Белок, содержащий домен	OPN5	Rhinopithecus bieti (черный ринопитек) (Pygathrix bieti)	333

			G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2			
A0A2K 6AXE7	A0A2K 6AXE7 _MAC NE		Опсин 5	OPN5	Macaca nemestrina (свинохвостый макак)	382
A0A2J 8P0S9	A0A2J 8P0S9_ PANT R		Опсин 5	OPN5	Pan troglodytes (обыкновенный шимпанзе)	354
W5PR2 2	W5PR2 2_SHE EP		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Ovis aries (домашняя овца)	377
F7DJ88	F7DJ88 _CALJ A		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Callithrix jacchus (обыкновенная игрунка)	382
A0A2K 5R3Z8	A0A2K 5R3Z8 _CEBI M		Опсин 5	OPN5	Cebus imitator (обыкновенный капуцин) (Cebus capucinus imitator)	354
F6PHB 6	F6PHB 6_CAL JA		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Callithrix jacchus (обыкновенная игрунка)	354
M3WM C9	M3W MC9_F ELCA		Опсин 5	OPN5	Felis catus (кошка) (Felis silvestris catus)	353
A0A2K 5L5D5	A0A2K 5L5D5		Опсин 5	OPN5	Cercocebus atys (дымчатый)	382

	_CERA T				мангабей) (<i>Cercocebus torquatus atys</i>)	
E1BNN 4	E1BN N4_BO VIN		Опсин 5	OPN5	<i>Bos taurus</i> (бык)	353
F6RFW 7	F6RF W7_M ACMU		Опсин 5	OPN5	<i>Macaca mulatta</i> (макак-резус)	354
A0A2J 8RKP9	A0A2J 8RKP9 _PON AB		Неохарактериз ованный белок	OPN5	<i>Pongo abelii</i> (суматранский орангутан) (<i>Pongo pygmaeus abelii</i>)	354
A0A3Q 7RXX8	A0A3Q 7RXX8 _VUL VU		Опсин-5	OPN5	<i>Vulpes vulpes</i> (обыкновенная лисица)	353
A0A2K 5L5D9	A0A2K 5L5D9 _CERA T		Опсин 5	OPN5	<i>Cercocebus atys</i> (дымчатый мангабей) (<i>Cercocebus torquatus atys</i>)	354
H0WJ Y2	H0WJ Y2_OT OGA		Опсин 5	OPN5	<i>Otolemur garnettii</i> (галаго Гарнетта) (Garnett's greater bushbaby)	352
A0A6P 3ENQ6	A0A6P 3ENQ6 _SHEE P		Опсин-5	OPN5	<i>Ovis aries</i> (домашняя овца)	353
G3UA6 8	G3UA6 8_LOX AF		Белок, содержащий домен	OPN5	<i>Loxodonta africana</i> (саванный слон)	377

			G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2			
A0A6P 5DVT1	A0A6P 5DVT1 _BOSI N		Опсин-5	OPN5	Bos indicus (зебу)	360
A0A0D 9RJS4	A0A0D 9RJS4_ CHLS B		Опсин 5	OPN5	Chlorocebus sabaеus (зеленая мартышка) (Cercopithecus sabaеus)	352
I3LTK 7	I3LTK 7_PIG		Опсин 5	OPN5	Sus scrofa (кабан)	378
A0A2K 5Z564	A0A2K 5Z564_ MANL E		Опсин 5	OPN5	Mandrillus leucophaeus (дрил) (Papio leucophaeus)	382
A0A5G 2R7I1	A0A5G 2R7I1_ PIG		Опсин 5	OPN5	Sus scrofa (кабан)	353
A0A6I 9JGH7	A0A6I 9JGH7 _CHR AS		Опсин-5	OPN5	Chrysochloris asiatica (капский златокрот)	353
A0A2K 5Z517	A0A2K 5Z517_ MANL E		Опсин 5	OPN5	Mandrillus leucophaeus (дрил) (Papio leucophaeus)	354
A0A45 2FM79	A0A45 2FM79_ CAPH I		Опсин 5	OPN5	Capra hircus (домашняя коза)	353
F6SJH5	F6SJH 5_HOR SE		Опсин 5	OPN5	Equus caballus (домашняя лошадь)	382

A0A2R 9BTW5	A0A2R 9BTW 5_PAN PA		Опсин 5	OPN5	Pan paniscus (бонобо) (Bonobo)	353
A0A2Y 9FNI2	A0A2Y 9FNI2_ PHYM C		Опсин-5	OPN5	Physeter macrocephalus (кашалот) (Physeter catodon)	353
A0A34 0WR35	A0A34 0WR35 _LIPV E		Опсин-5	OPN5	Lipotes vexillifer (китайский речной дельфин)	353
A0A6J 2DJL3	A0A6J 2DJL3 _ZALC A		Опсин-5	OPN5	Zalophus californianus (калифорнийский морской лев)	353
A0A4X 1UZM3	A0A4X 1UZM 3_PIG		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Sus scrofa (кабан)	378
A0A67 3TX31	A0A67 3TX31 _SURS U		Опсин 5	OPN5	Suricata suricatta (сурикат)	381
A0A34 1D5X7	A0A34 1D5X7 _NEO AA		Опсин-5	OPN5	Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis (восточноазиатская морская свинья) (Neophocaena phocaenoides subsp. asiaeorientalis)	353

A0A66 7FWA1	A0A66 7FWA 1_LYN CA		Опсин 5	OPN5	Lynx canadensis (Канадская рысь)	376
A0A5B 7H9S7	A0A5B 7H9S7 _PORT R		Опсин-5	Opn5 E2C01_06 3173	Portunus trituberculatus (краб-плавунец) (Neptunus trituberculatus)	74
A0A33 7SC50	A0A33 7SC50 _FELC A		Опсин 5	OPN5	Felis catus (кошка) (Felis silvestris catus)	376
H2RD1 9	H2RD1 9_PAN TR		Опсин 5	OPN5	Pan troglodytes (обыкновенный шимпанзе)	382
A0A2U 3X849	A0A2U 3X849 _LEP WE		Опсин-5	OPN5	Leptonychotes weddellii (тюлень Уэдделла) (Otaria weddellii)	365
G3TH K6	G3TH K6_LO XAF		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Loxodonta africana (саванный слон)	360
A0A2U 3V1E1	A0A2U 3V1E1 _TUR R		Опсин-5	OPN5	Tursiops truncatus (афалина) (Delphinus truncatus)	353
A0A09 6NIY4	A0A09 6NIY4 _PAPA N		Опсин-5	OPN5	Papio anubis (павиан анубис)	382

A0A6P 3PSZ2	A0A6P 3PSZ2 _PTEV A		Опсин-5	OPN5	Pteropus vampyrus (гигантская летучая лисица)	353
A0A2K 5EFR2	A0A2K 5EFR2 _AOT NA		Опсин 5	OPN5	Aotus nancumaе (западноамазонская мирикина)	382
A0A3Q 7QKC2	A0A3Q 7QKC2 _CAL UR		Опсин-5	OPN5	Callorhinus ursinus (Северный морской котик)	353
F7DVJ 0	F7DVJ 0_MO NDO		Опсин 5	OPN5	Monodelphis domestica (домовый опоссум)	346
A0A2K 5EFU2	A0A2K 5EFU2 _AOT NA		Опсин 5	OPN5	Aotus nancumaе (западноамазонская мирикина)	354
A0A5F 8H1F1	A0A5F 8H1F1 _MON DO		Опсин 5	OPN5	Monodelphis domestica (домовый опоссум)	347
A0A2Y 9H826	A0A2Y 9H826 _NEOS C		Опсин-5	OPN5	Neomonachus schauinslandi (гавайский тюлень- монах) (Monachus schauinslandi)	353
G3W28 4	G3W28 4_SAR HA		Опсин 5	OPN5	Sarcophilus harrisii (тасманийский дьявол) (Sarcophilus laniarius)	355

A0A3Q 0CTY5	A0A3Q 0CTY5 _MES AU		Опсин-5	Opn5	Mesocricetus auratus (сирийский хомячок)	254
A0A6P 5NS60	A0A6P 5NS60 _MUS CR		Опсин-5	Opn5	Mus caroli (мышь Рюкю) (Ricefield mouse)	377
H0V67 1	H0V67 1_CAV PO		Опсин 5	OPN5	Cavia porcellus (морская свинка)	333
I3M1B 1	I3M1B 1 ICT TR		Опсин 5	OPN5	Ictidomys tridecemlineatus (тринадцатиполосы й суслик) (Spermophilus tridecemlineatus)	353
Q7TQ N6	Q7TQ N6_RA T		Рецептор 136, связанный с G- белком (опсин 5)	Opn5 Gpr136	Rattus norvegicus (серая крыса)	534
A0A28 7CZD4	A0A28 7CZD4 _ICTT R		Опсин 5	OPN5	Ictidomys tridecemlineatus (тринадцатиполосы й суслик) (Spermophilus tridecemlineatus)	378
A0A1 W6KZ 83	A0A1 W6KZ 83_9R ODE		Нейропсин	OPN5	Cricetulus barabensis (барабинский хомячок)	377
A0A6I 9MCW 1	A0A6I 9MCW		Опсин-5	Opn5	Peromyscus maniculatus bairdii (олений хомячок)	377

	1_PER MB					
A0A6P 3EVC3	A0A6P 3EVC3 _OCT DE		Опсин-5	Opn5	Octodon degus (Дегу) (Sciurus degus)	353
A0A1S 3FD42	A0A1S 3FD42 _DIPO R		Белок низкого качества: opsin- 5	Opn5	Dipodomys ordii (кенгуровый прыгун Орда)	603
A0A6A 4VE33	A0A6A 4VE33 _AMP AM		Опсин-5	OPN5 FJT64_01 0458	Amphibalanus amphitrite (полосатый морской желудь) (Balanus amphitrite)	358
A0A4P 2TKU6	A0A4P 2TKU6 _PARO L		Нейропсин	OPN5	Paralichthys olivaceus (азиатский паралихт) (Hippoglossus olivaceus)	354
A0A67 0IDE8	A0A67 0IDE8_ PODM U		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Podarcis muralis (обыкновенная стенная ящерица) (Lacerta muralis)	358
A0A1U 7S163	A0A1U 7S163_ ALLSI		Опсин-5	OPN5	Alligator sinensis (китайский аллигатор)	350
A0A67 0Y2N7	A0A67 0Y2N7 _PSET E		Опсин 5	OPN5	Pseudonaja textilis (сетчатая коричневая змея)	385

K7FF W2	K7FF W2_PE LSI		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Pelodiscus sinensis (китайский трионикс) (Trionyx sinensis)	369
D9N3D 0	D9N3D 0_COT JA		Опсин 5	OPN5	Coturnix japonica (немой перепел) (Coturnix coturnix japonica)	378
Q6VZZ 7	OPN5_ MOUS E	рассмо тренны й	Опсин-5 (рецептор 136, связанный с G- белком) (рецептор PGR12, связанный с G- белком) (нейропсин)	Opn5 Gpr136 Pgr12	Mus musculus (домовая мышь)	377
D8KW H6	D8KW H6_ZO NAL		Опсин 5	OPN5	Zonotrichia albicollis (белошейная зонотрихия)	354
A0A67 4PPK4	A0A67 4PPK4 _TAK RU		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	opn5	Takifugu rubripes (бурый скалозуб) (Fugu rubripes)	363
A0A67 4HDZ6	A0A67 4HDZ6 _TAEG U		Белок, содержащий домен G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2	OPN5	Taeniopygia guttata (зебровая амадина) (Porphyrus guttata)	354
H2V56 8	H2V56 8_TAK RU		Белок, содержащий домен	opn5	Takifugu rubripes (бурый скалозуб) (Fugu rubripes)	394

			G_PROTEIN_R ЕСЕР_F1_2			
A0A6J 0H1N3	A0A6J 0H1N3 _9PAS S		Опсин-5	OPN5	Lepidothrix coronata (синеголовая пипра)	351
A0A67 2UEH1	A0A67 2UEH1 _STRH B		Опсин 5	OPN5	Strigops habroptila (какапо)	377
A0A67 2UBX7	A0A67 2UBX7 _STRH B		Опсин 5	OPN5	Strigops habroptila (какапо)	349
A0A6J 0U919	A0A6J 0U919 _9SAU R		Опсин-5	OPN5	Pogona vitticeps (бородатая агама)	348
A0A6J 8E395	A0A6J 8E395_ MYTC O		OPN5	MCOR_4 6347	Mytilus coruscus (Морская мидия)	317
A0A6J 7ZZ06	A0A6J 7ZZ06 _MYT CO		OPN5	MCOR_1 439	Mytilus coruscus (Морская мидия)	235
A0A2J 8RKQ7	A0A2J 8RKQ7 _PON AB		OPN5 изоформа 1	CR201_G 0050220	Pongo abelii (суматранский орангутан) (Pongo pygmaeus abelii)	382
A0A2J 8POV4	A0A2J 8POV4 _PANT R		OPN5 изоформа 4	CK820_G 0007353	Pan troglodytes (обыкновенный шимпанзе)	353

A0A21 2D584	A0A21 2D584 _CERE H		OPN5	Celaphus_ 00014381	Cervus elaphus hippelaphus (благородный олень)	263
----------------	------------------------------	--	------	-----------------------	---	-----

[0169] Пример 5

[0170] Животные:

[0171] 8-16 недель rd1/rd1 пигментный ретинит (RP) модельных мышей, которых кормили 12/12 циклом свет/темнота (свет выключается в 20:00).

[0172] Построение вектора AAV:

[0173] Плазмиды, необходимые для упаковки вируса AAV, включая pAAV-mSNCG-курицы orn5m-t2a-EGFP, pAAV-mSNCG-курицы orn5m-t2a-mcherry, pAAV-mSNCG-курицы orn5m и pAAV-mSNCG-EGFP.

[0174] Упаковка и получение аденоассоциированного вируса (AAV):

[0175] Рекомбинантный AAV получали путем котрансфекции плазмид. Подтипы AAV2.7M8 и AAV2/8 были упакованы соответственно. Оба они включают mSNCG-курицы orn5m-t2a-EGFP, mSNCG-курицы orn5m-t2a-mcherry, mSNCG-курицы orn5m и mSNCG-EGFP.

[0176] Внутриглазная инъекция AAV мышам:

[0177] После анестезии мышам вводили 1 мкм л AAV в полость стекловидного тела после прохождения через склеру с помощью сверхтонкого стеклянного электрода, и электрод вытягивали через несколько секунд. Последующие эксперименты проводили через 4 недели после инъекции AAV.

[0178] Иммунофлуоресцентный анализ:

[0179] Чтобы подтвердить, успешно ли AAV инфицирует клетки сетчатки, и сравнить эффективность инфекции и специфичность вируса среди различных подтипов AAV, необходим эксперимент по иммунофлуоресценции. Через 4 недели инъекции AAV сетчатку мыши вынимали и фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 30 минут. Фиксированную и очищенную сетчатку определяли и разрезали по вертикали с помощью криомикротомы Leica толщиной 15 мкм. Срезы промывали PBS, затем герметизировали 3% BSA (бычий сывороточный альбумин) при комнатной температуре на 1 час. Затем первое антитело к EGFP разбавляли 3% BSA с соотношением 1:500 и инкубировали при 4 °C в течение 48 часов. После очистки первого антитела его инкубируют с флуоресцентно меченным вторым антителом в течение 2 часов, наклеивают окрашенный срез сетчатки на предметном стекле и проводят конфокальное сканирование для получения

флуоресцентного изображения после герметизации. Эффективность инфекции каждого AAV с ганглиозной клеткой сетчатки (RGC) и интенсивность флуоресценции EGFP анализируют и сравнивают, и выбирают подтипы AAV с высокой частотой заражения и хорошей специфичностью для следующего эксперимента.

[0180] Электрофизиологическое испытание:

[0181] Чтобы дополнительно подтвердить, сохраняет ли cOPN5 свою физиологическую активность в клетках RGC после успешной экспрессии AAV, необходимы электрофизиологические эксперименты. AAV, имеющий высокую частоту заражения и хорошую специфичность, вводили в глаза мышам rd1/rd1 (приобретенным у GemPharmatech Co., Ltd). Через 4 недели инъекции вируса сетчатку мыши вынимали, а срез сетчатки помещали в камеру для электрофизиологического фиксирования. Слой RGC сетчатки был направлен вверх. Чтобы предотвратить световое повреждение сетчатки, лазер отключали после идентификации соматических клеток, экспрессирующих GFP, с помощью флуоресцентного микроскопа. Интенсивность тока регистрировали после стимуляции клеток лазером 488 нм с различной интенсивностью света.

[0182] Поведенческий тест:

[0183] Клетки зрительных рецепторов мышей Rd1/rd1 дегенерировали. Чтобы проверить, может ли визуальная информация передаваться в мозг через инфицированные ганглиозные клетки, чтобы восстановить их утраченную зрительную функцию, авторы выбрали несколько тестов зрительной функции:

[0184] (1) Реакция зрачка на свет (PLR)

[0185] У мышей Rd1/rd1 зрачок может реагировать только на сильный свет. Эксперимент PLR проводили через 4 недели после инъекции AAV в глаза мышей. Свет разной интенсивности используют для стимуляции зрачка мышей, экспрессирующих cOPN5, и мышей, экспрессирующих EGFP, для регистрации степени изменения зрачка и оценки чувствительности мышей к свету по степени изменения зрачка.

[0186] (2) Испытание на избегание в открытом поле

[0187] Нормальные мыши избегают открытых и светлых пространств. Эта врожденная склонность является основой для простой проверки их зрительных способностей. В эксперименте мышей помещали в освещенное пространство, а также было темное укрытие. Зрительные способности мышей оценивали путем измерения доли времени, которое они провели.

[0188] Проверка безопасности:

[0189] Долгосрочная гетерологичная экспрессия генов будет иметь различные эффекты на экспрессированные ткани. Необходимы долгосрочные эксперименты для

оценки безопасности гетерологичной экспрессии и проверки того, будут ли гены гетерологичной экспрессии стабильно экспрессироваться в тканях в течение длительного времени. AAV вводили в глаза в течение 6 месяцев, и вышеуказанную иммунофлуоресценцию, электрофизиологический тест и поведенческий тест повторяли через год для определения уровня экспрессии сOPN5 и того, изменилась ли физиологическая активность из-за долгосрочной экспрессии, и определения наличия воспалительной реакции в ткани сетчатки.

[0190] Результаты:

[0191] Как показано на фиг. 11 А показано экспрессию белка сOPN5 в ганглиозных клетках сетчатки у мышей rd1/rd1;

[0192] На В показано окрашивание маркером микроглии Iba1 срезов сетчатки после введения. Мыши, которым вводили H₂O₂ (положительный контроль), показали сильную активацию микроглии. Небольшое количество базальных сигналов Iba1 наблюдалось в сетчатке, в которую вводили AAV-сOPN5-t2a-EGFP, после 1 месяца введения, аналогично сигналу, наблюдаемому в сетчатке, в которую вводили AAV-EGFP, сетчатке, в которую вводили AAV-сOPN5-t2a-EGFP, после 10-месячной инъекции и сетчатке, в которой ничего не вводили. Красный, Iba1; зеленый, сOPN5 или EGFP; синий, DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) сигнал, указывающий на клеточные ядра. Масштабная линейка, 50 мкм;

[0193] На С показано окрашивание срезов сетчатки маркером RGC brn3a. Красный, brn3a; зеленый, сOPN5; синий, сигнал, указывающий на клеточные ядра. Масштабная линейка, 50 мкм.

[0194] На D показана флуоресцентная визуализация глазного дна.

[0195] Как показано на фиг. 12, на а показаны репрезентативные ответы RGC мышей СЗН, которым вводили AAV-Сорп5-t2a-EGFP при различной мощности лазерной стимуляции 488 нм;

[0196] На В показаны репрезентативные ответы RGC мышей СЗН, которым вводили AAV-Сорп5-t2a-EGFP при различной мощности лазерной стимуляции 561 нм;

[0197] На С показано, что сOrп5 опосредовал надежную и воспроизводимую фотоактивацию RGC;

[0198] Данные группы D и E показывают частота импульсов RGC после различной мощности лазерной стимуляции 488 нм (n=6);

[0199] Данные группы F показывают время задержки после различной мощности лазерной стимуляции 488 нм. (n=6)

[0200] Как показано на фиг. 13, на А показаны репрезентативные ответы нейронов v1 мышей С57 при 2-секундной световой стимуляции при 200 люкс;

[0201] На В показаны репрезентативные ответы нейронов v1 мышей C3H, которым вводили AAV-EGFP при 2-секундной световой стимуляции при 200 люкс;

[0202] На С показаны репрезентативные ответы нейронов v1 мышей C3H, которым вводили AAV-cOPN5-t2a-EGFP при 2-секундной световой стимуляции при 200 люкс;

[0203] На D показаны тепловые карты, показывающие ROC-представление (ROC - рабочая характеристика приемника) данных гистограммы времени перистимула от нейронов v1 мышей C57, которые подвергались 2-секундной световой стимуляции при 200 люкс (n = 107);

[0204] На E показаны тепловые карты, показывающие ROC-представление данных временной гистограммы перистимула мышей C3H, которым вводили нейроны AAV-EGFP v1, которые подвергались 2-секундной световой стимуляции при 200 люкс. (n=133);

[0205] На F показаны тепловые карты, показывающие ROC-представление данных временной гистограммы перистимула мышей C3H, которым вводили нейроны AAV-cOPN5-t2a-EGFP v1, которые подвергались 2-секундной световой стимуляции при 200 люкс. (n=100);

[0206] На G показаны индуцированные зрительные потенциалы (VEP) C57 (вверху), мышей rd/rd, которым вводили AAV-EGFP (в центре), и мышей rd1/rd1, которым вводили AAV-cOPN5-EGFP, при 2-секундном освещении (n=6).

[0207] На фиг. 14 схематически показан тест на избегание в открытом поле:

[0208] Метод: Светлый/темный бокс (45×27×25 см) был изготовлен из оргстекла и состоял из двух камер, соединенных отверстием (4×5 см), расположенным на уровне пола в центре разделительной стены. Светлый бокс занимает около 2/3 всего светлого/темного ящика, а темный бокс занимает около 1/3 всего светлого/темного бокса. Тестовое поле было диффузно освещено при 200 люкс. Мышей помещали в испытательную комнату в их домашней клетке. Испытание началось, когда мышь поместили в темное убежище на 2-минутный период привыкания с закрытым проходом из темного в светлое пространство. Затем мыши давали выйти из укрытия и исследовать освещенное поле в течение 5 мин. Для каждой мыши регистрировали продолжительность времени, проведенного животным на светлой стороне бокса. Видеокамера, расположенная над центром бокса, обеспечивала постоянную запись поведения мыши. Затем мышей извлекали из бокса и возвращали в домашнюю клетку.

[0209] Результаты теста избегания открытого поля показаны на фиг. 15, где на фиг. 15А показано, что через 7 недель слепые (rd/rd) мыши проводили около 80% времени в светлом боксе, а контрольные мыши (нормальные мыши) проводили около 50% времени в

светлом боксе, а мыши rd1 /rd1, которым вводили AAV-EGFP, проводили в светлом боксе около 30% времени; и

[0210] На фиг. 15В показано, что через 9 месяцев слепые (rd/rd) мыши проводили около 80% времени в светлом боксе, а контрольные мыши (нормальные мыши) проводили около 50% времени в светлом боксе, а мыши rd1/rd1, которым вводили AAV-EGFP, проводили в светлом боксе около 20% времени.

[0211] На фиг. 16 показано восстановление светочувствительности глаза мышей rd1/rd1, обработанных AAV-cOPN5, через 7 недель (A) и 9 месяцев (B), соответственно. Было обнаружено, что мыши rd1/rd1 (C3H_O5), обработанные AAV-cOPN5, имеют таким же % сужения зрачков (площадь) как и нормальные мыши (C57), а мыши rd1/rd1 (C3H_EGFP) почти не демонстрируют % сужения зрачков (площадь).

[0212] Литературные источники

1 Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schioth, H. B. & Gloriam, D. E. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* 16, 829-842, doi:10.1038/nrd.2017.178 (2017).

2 Wettschureck, N. & Offermanns, S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85, 1159-1204, doi:10.1152/physrev.00003.2005 (2005).

3 Exton, J. H. Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36, 481-509, doi:10.1146/annurev.pa.36.040196.002405 (1996).

4 Ritter, S. L. & Hall, R. A. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 819-830 (2009).

5 Kadamur, G. & Ross, E. M. Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol* 75, 127-154, doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183750 (2013).

6 Gomez, J. L. et al. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science* 357, 503-507, doi:10.1126/science.aan2475 (2017).

7 Adams, S. R. & Tsien, R. Y. Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annual review of physiology* 55, 755-784 (1993).

8 Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8, 1263-1268, doi:10.1038/nn1525 (2005).

9 Fenno, L., Yizhar, O. & Deisseroth, K. The Development and Application of Optogenetics. *Annual Review of Neuroscience* 34, 389-412, doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113817 (2011).

10 Quadrato, G. et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human

brain organoids. *Nature* 545, 48-53 (2017).

11 Rost, B. R., Schneider-Warme, F., Schmitz, D. & Hegemann, P. Optogenetic tools for subcellular applications in neuroscience. *Neuron* 96, 572-603 (2017).

12 Tye, K. M. & Deisseroth, K. Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nature Reviews Neuroscience* 13, 251-266 (2012).

13 Zhang, F. et al. The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell* 147, 1446-1457 (2011).

14 Airan, R. D., Thompson, K. R., Fenno, L. E., Bernstein, H. & Deisseroth, K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature* 458, 1025-1029, doi:10.1038/nature07926 (2009).

15 Tichy, A. M., Gerrard, E. J., Sexton, P. M. & Janovjak, H. Light-activated chimeric GPCRs: limitations and opportunities. *Curr Opin Struct Biol* 57, 196-203, doi:10.1016/j.sbi.2019.05.006 (2019).

16 Koyanagi, M. & Terakita, A. Diversity of animal opsin-based pigments and their optogenetic potential. *Biochim Biophys Acta* 1837, 710-716, doi:10.1016/j.bbabi.2013.09.003 (2014).

17 Yau, K.-W. & Hardie, R. C. Phototransduction motifs and variations. *Cell* 139, 246-264 (2009).

18 Copits, B. A. et al. A photoswitchable GPCR-based opsin for presynaptic inhibition. *Neuron* 109, 1791-1809 e1711, doi:10.1016/j.neuron.2021.04.026 (2021).

19 Mahn, M. et al. Efficient optogenetic silencing of neurotransmitter release with a mosquito rhodopsin. *Neuron* 109, 1621-1635 e1628, doi:10.1016/j.neuron.2021.03.013 (2021).

20 Güler, A. D. et al. Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* 453, 102-105 (2008).

21 Hankins, M. W., Peirson, S. N. & Foster, R. G. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends in neurosciences* 31, 27-36 (2008).

22 Hattar, S., Liao, H.-W., Takao, M., Berson, D. M. & Yau, K.-W. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065-1070 (2002).

23 Xue, T. et al. Melanopsin signalling in mammalian iris and retina. *Nature* 479, 67-73 (2011).

24 Qiu, X. et al. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature* 433, 745-749 (2005).

25 Melyan, Z., Tardtlin, E. E., Bellingham, J., Lucas, R. J. & Hankins, M. W. Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature* 433, 741-745,

doi:10.1038/nature03344 (2005).

26 Kojima, D. et al. UV-sensitive photoreceptor protein OPN5 in humans and mice. *PLoS One* 6, e26388, doi:10.1371/journal.pone.0026388 (2011).

27 Yamashita, T. et al. Opn5 is a UV-sensitive bistable pigment that couples with Gi subtype of G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22084-22089, doi:10.1073/pnas.1012498107 (2010).

28 Zhang, K. X. et al. Violet-light suppression of thermogenesis by opsin 5 hypothalamic neurons. *Nature* 585, 420-425, doi:10.1038/s41586-020-2683-0 (2020).

29 Nakane, Y. et al. A mammalian neural tissue opsin (Opsin 5) is a deep brain photoreceptor in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 15264-15268 (2010).

30 Nakane, Y., Shimmura, T., Abe, H. & Yoshimura, T. Intrinsic photosensitivity of a deep brain photoreceptor. *Current Biology* 24, R596-R597 (2014).

31 Rios, M. N., Marchese, N. A. & Guido, M. E. Expression of Non-visual Opsins Opn3 and Opn5 in the Developing Inner Retinal Cells of Birds. Light-Responses in Muller Glial Cells. *Front Cell Neurosci* 13, 376, doi:10.3389/fncel.2019.00376 (2019).

32 Mederos, S. et al. Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks. *Glia* 67, 915-934 (2019).

33 Taniguchi, M. et al. Structure of YM-254890, a Novel Gq/11 Inhibitor from *Chromobacterium* sp. QS3666. *Tetrahedron* 59, 4533-4538, doi:10.1016/s0040-4020(03)00680-x (2003).

34 Hartwig, J. et al. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356, 618-622 (1992).

35 Zhang, F., Wang, L.-P., Boyden, E. S. & Deisseroth, K. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nature methods* 3, 785-792 (2006).

36 Lin, J. Y. A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Experimental physiology* 96, 19-25 (2011).

37 Gomez, J. L. et al. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science* 357, 503-507 (2017).

38 Krashes, M. J. et al. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *The Journal of clinical investigation* 121, 1424-1428 (2011).

39 Rogan, S. C., Roth, B. L. & Morrow, A. L. Remote Control of Neuronal Signaling. *Pharmacological Reviews* 63, 291-315, doi:10.1124/pr.110.003020 (2011).

40 Charles, A. C., Merrill, J. E., Dirksen, E. R. & Sandersont, M. J. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and

glutamate. *Neuron* 6, 983-992 (1991).

41 Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S. & Smith, S. J. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247, 470-473 (1990).

42 Zhang, F., Wang, L. P., Boyden, E. S. & Deisseroth, K. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods* 3, 785-792, doi:10.1038/nmeth936 (2006).

43 Davalos, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience* 8, 752-758 (2005).

44 Zhang, J.-m. et al. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40, 971-982 (2003).

45 Zhang, Z. et al. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nature cell biology* 9, 945-953 (2007).

46 Wu, Z. & Li, Y. New frontiers in probing the dynamics of purinergic transmitters in vivo. *Neuroscience research* 152, 35-43 (2020).

47 Wu, Z. et al., doi:10.1101/2021.02.24.432680 (2021).

48 Lawlor, P. A., Bland, R. J., Mouravlev, A., Young, D. & During, M. J. Efficient gene delivery and selective transduction of glial cells in the mammalian brain by AAV serotypes isolated from nonhuman primates. *Molecular therapy* 17, 1692-1702 (2009).

49 Lee, Y., Messing, A., Su, M. & Brenner, M. GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* 56, 481-493 (2008).

50 Bal-Price, A., Moneer, Z. & Brown, G. C. Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia* 40, 312-323, doi:10.1002/glia.10124 (2002).

51 Murakami, K., Nakamura, Y. & Yoneda, Y. Potentiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes. *Neuroscience* 117, 37-42 (2003).

52 Lezmy, J. et al. Astrocyte Ca²⁺-evoked ATP release regulates myelinated axon excitability and conduction speed. *Science* 374, eabh2858, doi:10.1126/science.abh2858 (2021).

53 Tian, L. et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature methods* 6, 875-881 (2009).

54 Jennings, J. H., Rizzi, G., Stamatakis, A. M., Ung, R. L. & Stuber, G. D. The inhibitory circuit architecture of the lateral hypothalamus orchestrates feeding. *Science* 341, 1517-1521 (2013).

55 Stuber, G. D. & Wise, R. A. Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat Neurosci* 19, 198-205, doi:10.1038/nn.4220 (2016).

- 56 Li, Y. et al. Hypothalamic Circuits for Predation and Evasion. *Neuron* 97, 911-924 e915, doi:10.1016/j.neuron.2018.01.005 (2018).
- 57 Zhang, X. & van den Pol, A. N. Rapid binge-like eating and body weight gain driven by zona incerta GABA neuron activation. *Science* 356, 853-859, doi:10.1126/science.aam7100 (2017).
- 58 Tsukamoto, H. & Terakita, A. Diversity and functional properties of bistable pigments. *Photochemical & Photobiological Sciences* 9, 1435-1443 (2010).
- 59 Ellis-Davies, G. C. Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nature methods* 4, 619-628 (2007).
- 60 Adams, S. R. & Tsien, R. Y. Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annu Rev Physiol* 55, 755-784, doi:10.1146/annurev.ph.55.030193.003543 (1993).
- 61 Chen, T.-W. et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295-300 (2013).
- 62 Jing, M. et al. An optimized acetylcholine sensor for monitoring in vivo cholinergic activity. *Nature methods* 17, 1139-1146 (2020).
- 63 Sun, F. et al. A genetically encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. *Cell* 174, 481-496. e419 (2018).
- 64 Wan, J. et al. A genetically encoded sensor for measuring serotonin dynamics. *Nature Neuroscience* 24, 746-752 (2021).
- 65 Zhao, Y. et al. An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ indicators. *Science* 333, 1888-1891 (2011).
- 66 Hochbaum, D. R. et al. All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins. *Nat Methods* 11, 825-833, doi:10.1038/nmeth.3000 (2014).
- 67 Sahel, J.-A. et al. Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nature Medicine*, 1-7 (2021).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный светочувствительный опсин для восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации Gq-сигнализации.

2. Выделенный опсин по п. 1, который представляет собой выделенный опсин организма, его гомологи, его ортологи, его паралоги, их фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации Gq-сигнализации.

3. Выделенный опсин по п. 1, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен опсину дикого типа указанного организма, его гомологам, его ортологам, его паралогам, их фрагментам или вариантам и имеет активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации Gq-сигнализации.

4. Выделенный опсин по п. 1, который представляет собой выделенный опсин 5 (Opn5) животного, его гомологи, его ортологи, его паралоги, их фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации Gq-сигнализации.

5. Выделенный опсин по п. 4, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен опсину 5 (Opn5) дикого типа указанного животного, его гомологам, его ортологам, его паралогам, их фрагментам или вариантам и имеет активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации Gq-сигнализации.

6. Выделенный опсин по п. 2, где организм представляет собой позвоночное животное.

7. Выделенный опсин по п. 6, где позвоночное животное представляет собой птицу, рептилию или рыбу, амфибию или млекопитающее,

предпочтительно животное представляет собой птицу, включая, но не ограничиваясь, курицу, утку, гуся, страуса, эму, нанду, киви, казуара, индейку, перепела, курицу, сокола, орла, ястреба, голубя, длиннохвостого попугая, какаду, ара, попугая, птицу из отряда воробьинообразных (такую как, певчая птица), сойку, черного дрозда, вьюрка, певуна и воробья; или

предпочтительно, животное представляет собой рептилию, включая, но не ограничиваясь, ящерицу, змею, аллигатора, черепаху, крокодила и сухопутную черепаху; или

предпочтительно, животное представляет собой рыбу, включая, но не ограничиваясь, сома, угрей, акул и рыбу-меч; или

предпочтительно животное представляет собой амфибию, включая, но не ограничиваясь, жабу, лягушку, тритона и саламандру.

8. Выделенный опсин по п. 4, где выделенный опсин 5 (Opn5) представляет собой выделенный опсин 5 (Opn5) дикого типа курицы или его фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации Gq-сигнализации; или

выделенный опсин 5 (Opn5) по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен опсину 5 (Opn5) дикого типа курицы и имеет активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки посредством активации Gq-сигнализации.

9. Выделенный опсин по п. 4, где выделенный опсин 5 (Opn5) представляет собой выделенный опсин 5 (Opn5) дикого типа черепахи или его фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации Gq-сигнализации; или

выделенный опсин 5 (Opn5) по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен опсину 5 (Opn5) дикого типа черепахи и имеет активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки посредством активации Gq-сигнализации.

10. Выделенный опсин по п. 4, где выделенный опсин 5 (Opn5) имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:1 (сOpn5) (Opn5 курицы), или ее фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации Gq-сигнализации; или

выделенный опсин 5 (Opn5) по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:1 (сOpn5), и имеет активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки посредством активации Gq-сигнализации.

11. Выделенный опсин по п. 4, где выделенный опсин 5 (Opn5) имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:2 (tOpn5) (Opn5 черепахи), или ее фрагменты или варианты, имеющие активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации Gq-сигнализации; или

выделенный опсин 5 (Opn5) по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:2 (tOpn5), и имеет активность в отношении восстановления чувствительности к свету клетки сетчатки посредством активации Gq-сигнализации.

12. Выделенный опсин по п. 1, где свет имеет длину волны в диапазоне от 360 до 520 нм, предпочтительно от 450 до 500 нм, более предпочтительно от 460 до 480 нм, в частности, 470 нм.

13. Выделенный опсин по п. 1, где клетка сетчатки представляет собой фоторецепторную клетку, палочковую клетку сетчатки, колбочковую клетку сетчатки, ганглиозную клетку сетчатки, биполярную клетку, ганглиозную клетку, горизонтальную клетку, многополярный нейрон, клетку Мюллера, амакриновую клетку или метилнитрозомочевину.

14. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный опсин по любому из пп. 1-13.

15. Химерный ген, содержащий последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п. 14, функционально связанную с подходящими регуляторными последовательностями;

предпочтительно который дополнительно содержит ген, кодирующий маркер, например, флуоресцентный белок.

16. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 14 или химерный ген по п. 15.

17. Вектор по п. 16, который представляет собой эукариотический вектор, прокариотический вектор экспрессии, вирусный вектор или дрожжевой вектор.

18. Вектор по п. 17, который представляет собой вектор вируса простого герпеса, вектор вируса осповакцины или аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор, ретровирусный вектор или вектор насекомых, предпочтительно, где вектор представляет собой рекомбинантный AAV1 (аденоассоциированный вирус), AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVS, AAVO или AAV10.

19. Вектор по п. 16, который представляет собой вектор экспрессии или вектор для генной терапии.

20. Выделенная клетка или клеточная культура, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п. 14, химерный ген по п. 15 или вектор по любому из пп. 16-19.

21. Применение выделенного опсина по любому из пп. 1-13, выделенной нуклеиновой кислоты по п. 14, химерного гена по п. 15, вектора по любому из пп. 16-19 или выделенной клетки или клеточной культуры по п. 20 для лечения или предотвращения заболевания или патологического состояния, опосредованного или связанного с потерей чувствительности к свету клетки сетчатки, путем активации Gq-сигнализации.

22. Способ лечения или предотвращения заболевания или патологического состояния, опосредованного или связанного с потерей чувствительности к свету клетки сетчатки посредством активации Gq-сигнализации у субъекта, включающий введение выделенного опсина по любому из пп. 1-13, выделенной нуклеиновой кислоты по п. 14, химерного гена по п. 15, вектора по любому из пп. 16-19 или выделенной клетки или клеточной культуры по п. 20.

23. Применение по п. 21 или способ по п. 22, где заболевание или патологическое состояние, опосредованное или связанное с потерей чувствительности к свету клетки сетчатки, включает, но не ограничивается, заболевания или патологические состояния, при которых восстановление чувствительности к свету клетки сетчатки путем активации Gq-сигнализации дает благоприятный эффект.

24. Применение по п. 21 или способ по п. 22, где заболевание или патологическое состояние, опосредованное или связанное с потерей чувствительности к свету клетки сетчатки, включает заболевания или патологические состояния, при которых активация клеток сетчатки, таких как фоторецепторная клетка, палочковая клетка сетчатки, колбочковая клетка сетчатки, ганглиозная клетка сетчатки, биполярная клетка, ганглиозная клетка, горизонтальная клетка, мультиполярный нейрон, клетка Мюллера, амакриновая клетка или метилнитрозомочевина, дает благоприятный эффект.

25. Применение по п. 21 или способ по п. 22, где заболевание или патологическое состояние включает повреждение внешнего слоя сетчатки, потерю или дегенерацию фоторецепторов, дегенеративное заболевание сетчатки, потерю чувствительности к свету или потерю восприятия света, потерю зрения из-за дефицита восприятия или чувствительности к свету и/или слепоту.

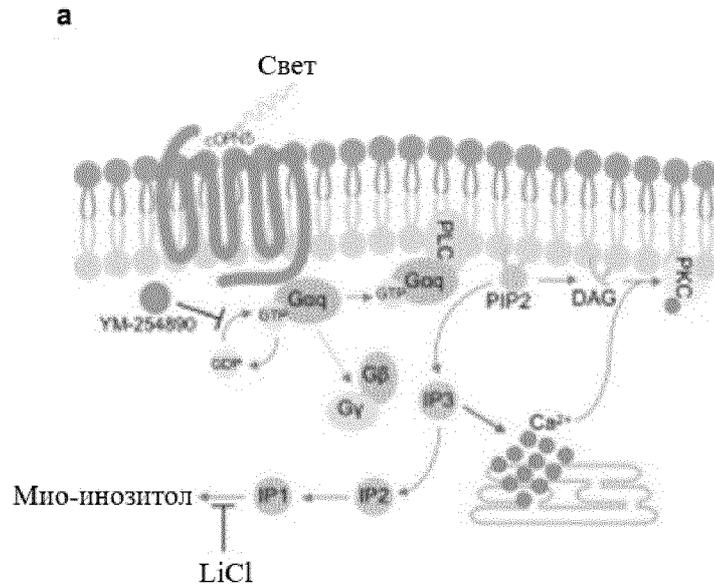
26. Применение по п. 21 или способ по п. 22, где заболевание или патологическое состояние включает, но не ограничивается, заболевания, связанные с дегенерацией и/или гибелью ганглиозных клеток сетчатки (RGC),

предпочтительно, заболевание или патологическое состояние включает пигментный ретинит (RP), макулодистрофию, возрастную макулодистрофию (AMD), аутосомно-доминантную атрофию зрительного нерва (ADOA) и/или глаукому.

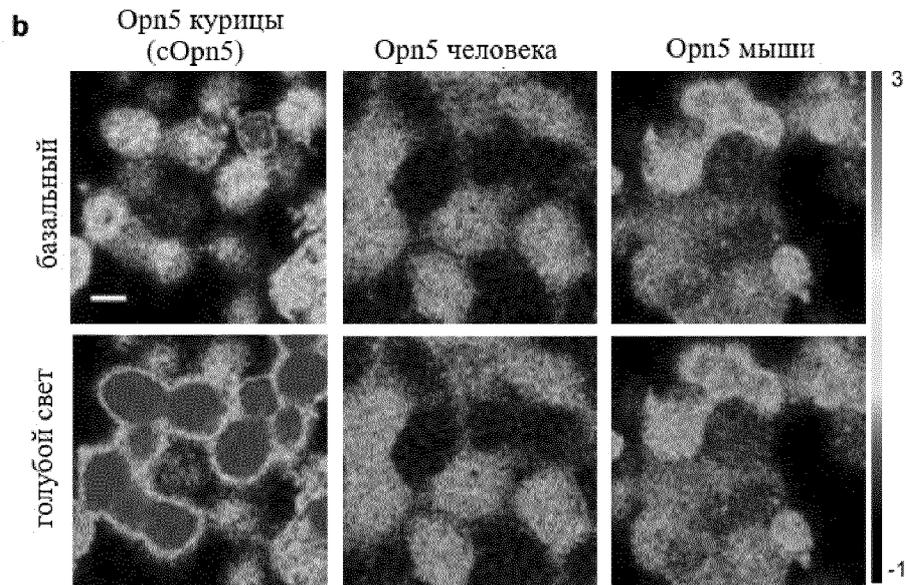
27. Способ по п. 22, включающий введение вектора AAV, экспрессирующего cOrn5, является субретинальным или интравитреальным, предпочтительно вектор AAV дополнительно экспрессирует флуоресцентный белок.

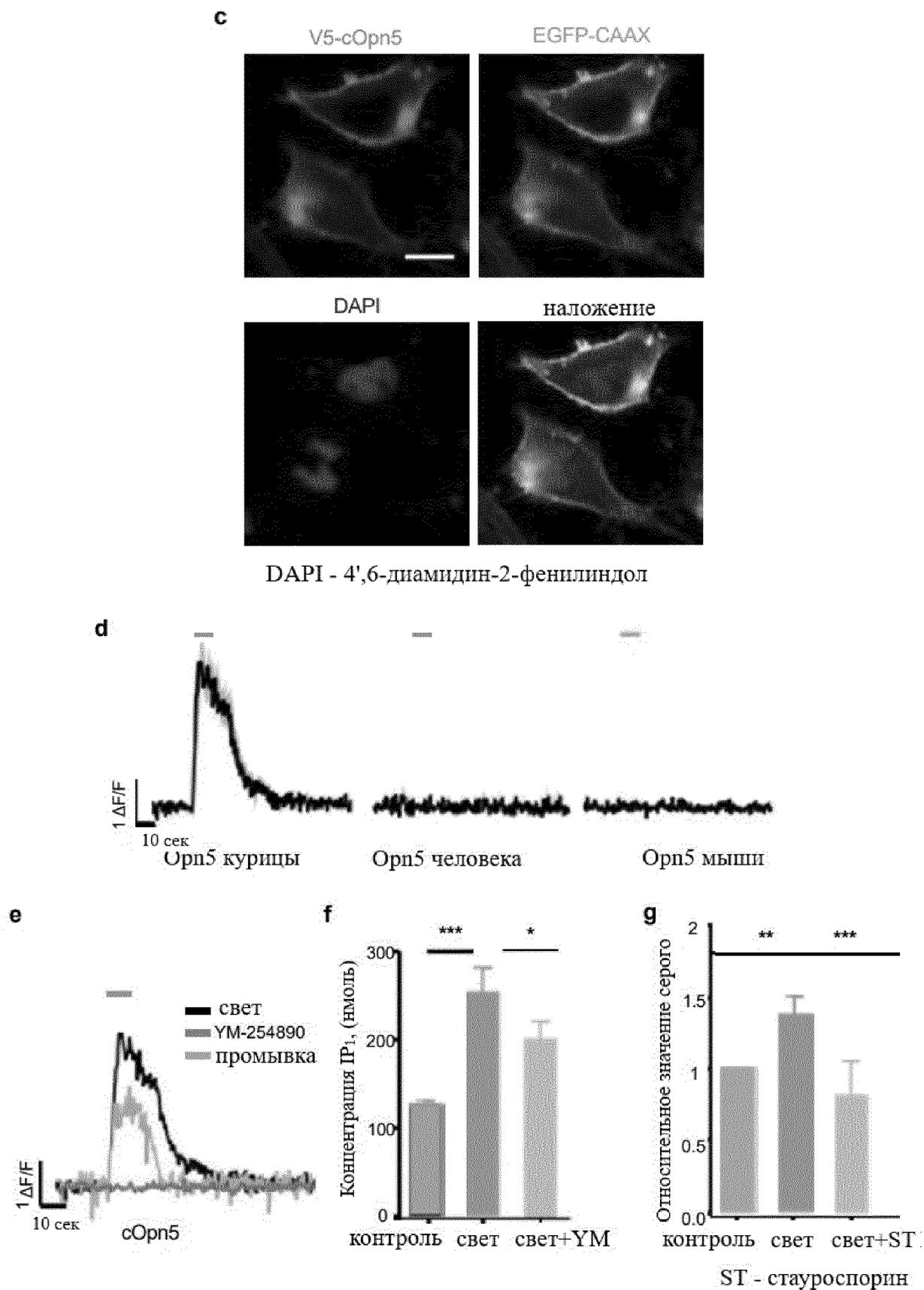
28. Способ по п. 22, дополнительно включающий применение синего света, имеющего длину волны в диапазоне от 360 до 550 нм, предпочтительно от 450 до 500 нм, более предпочтительно от 460 до 480 нм, в частности, 470 нм.

29. Способ по п. 22, дополнительно включающий применение двухфотонной активации с использованием света, имеющего длину волны 920 нм или более.

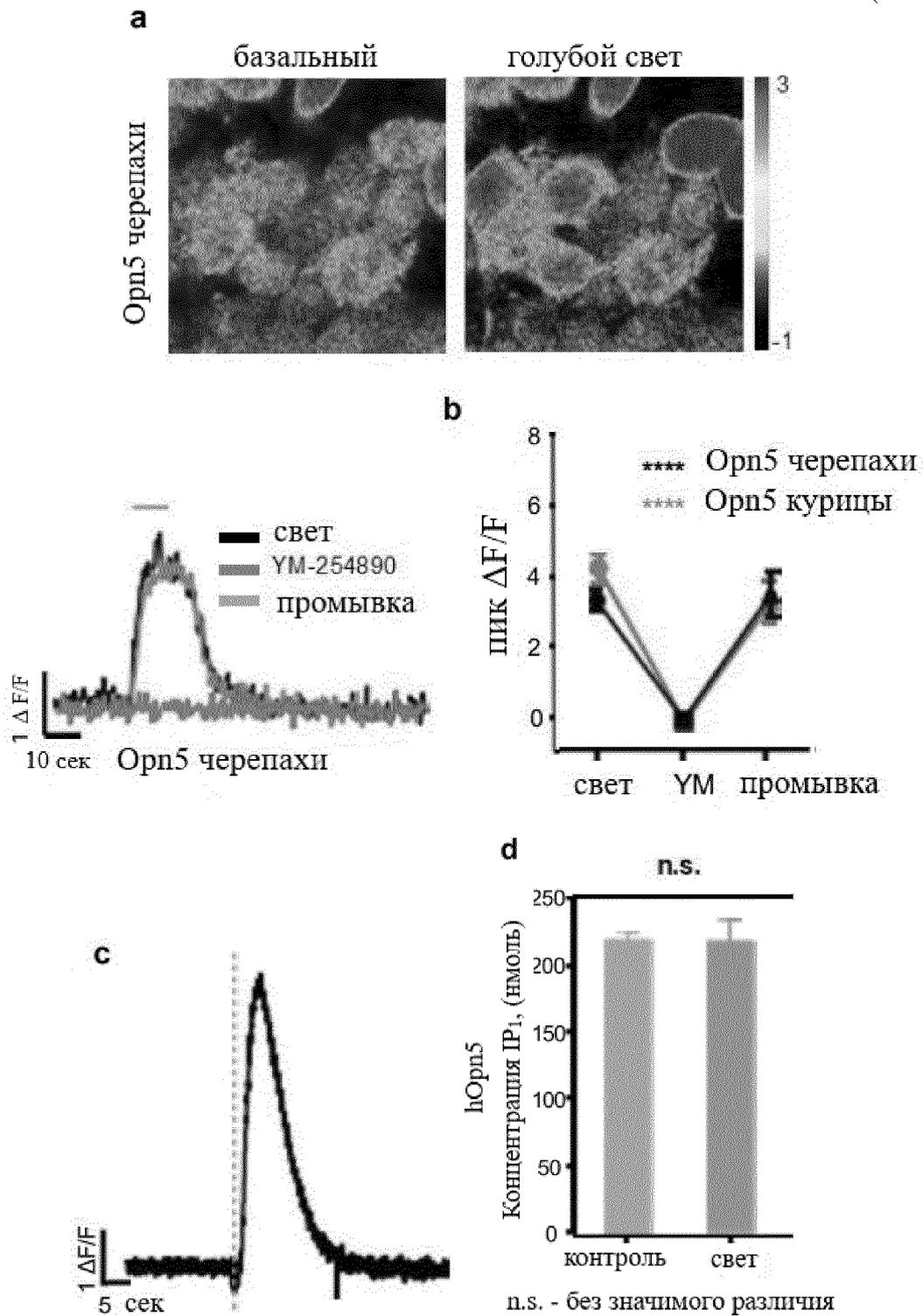


PLC - фосфолипаза
 PIP2 - фосфолипид фосфатидилинозитол бисфосфат
 DAG - диацилглицерин
 PKC - протеинкиназа
 IP - инозитолфосфат

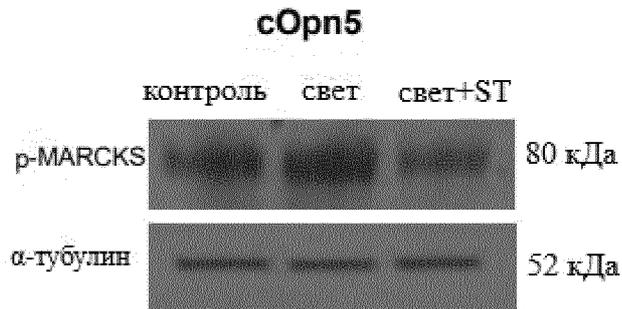




Фиг. 1

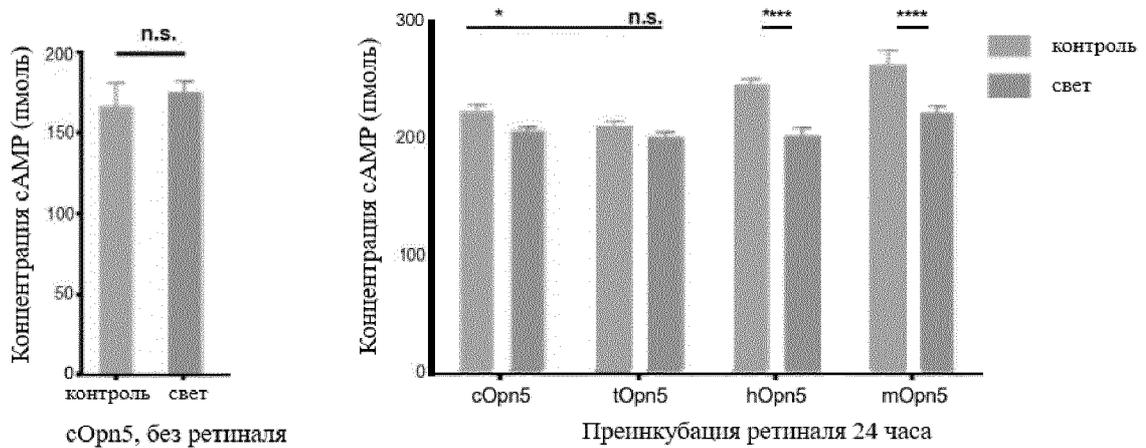


e



MARCKS - связанный с миристиновой кислотой, богатый аланином субстрат протеинкиназы C

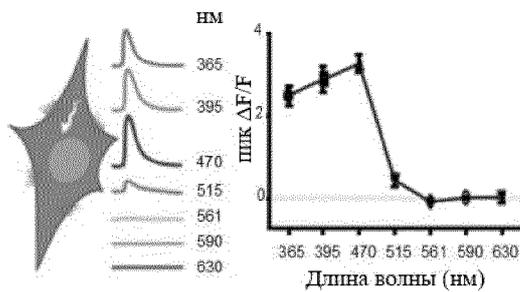
f



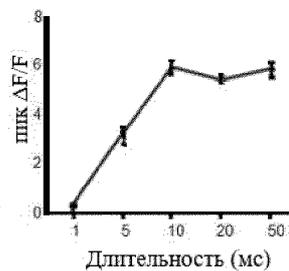
cAMP - циклический аденозинмонофосфат)

Фиг. 2

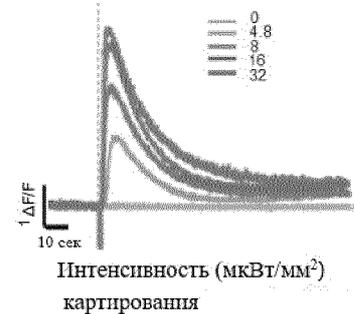
a



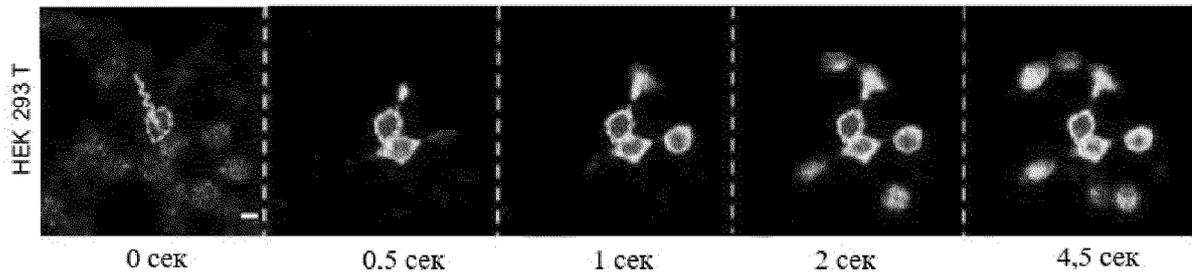
b



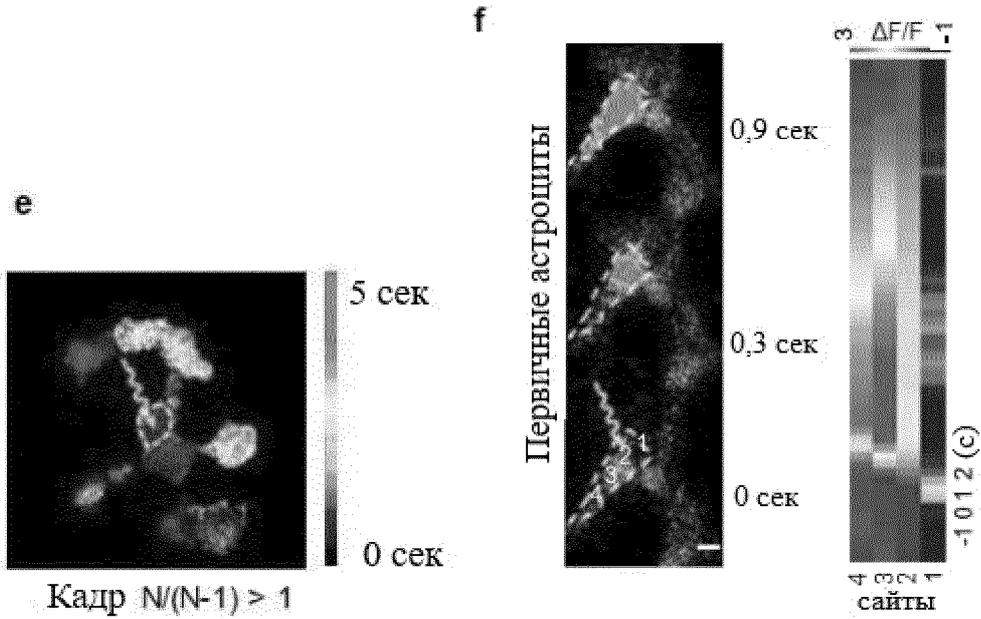
c



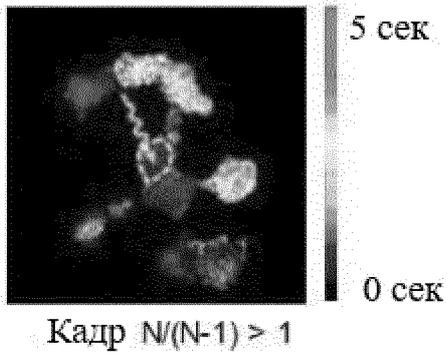
d



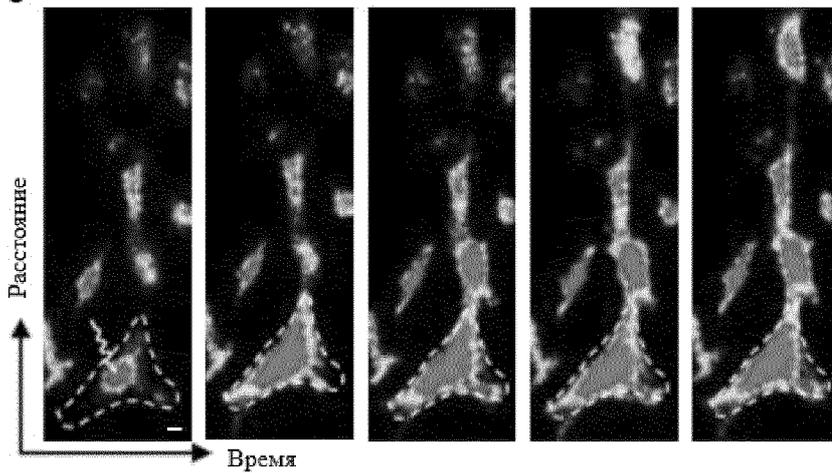
f



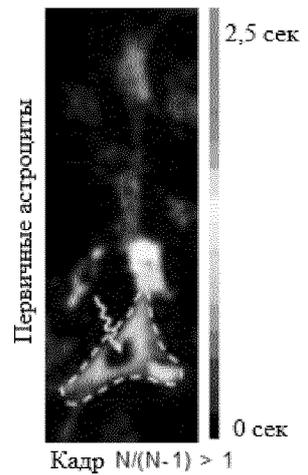
e



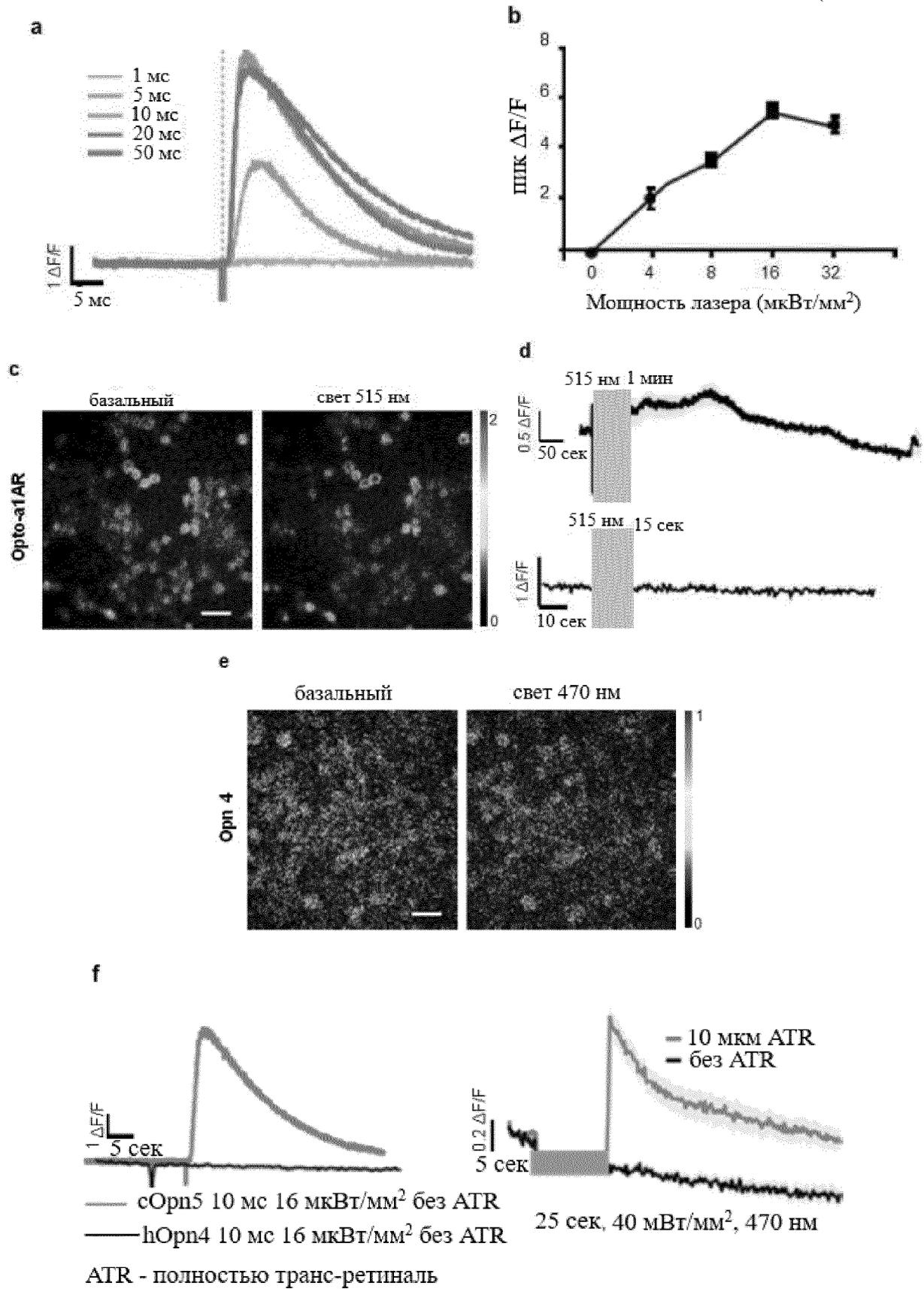
g

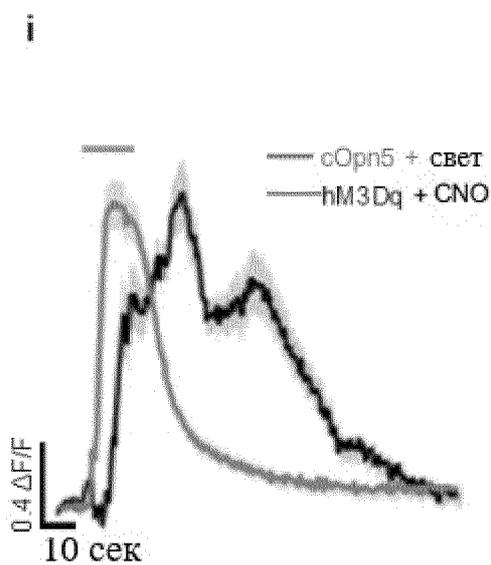
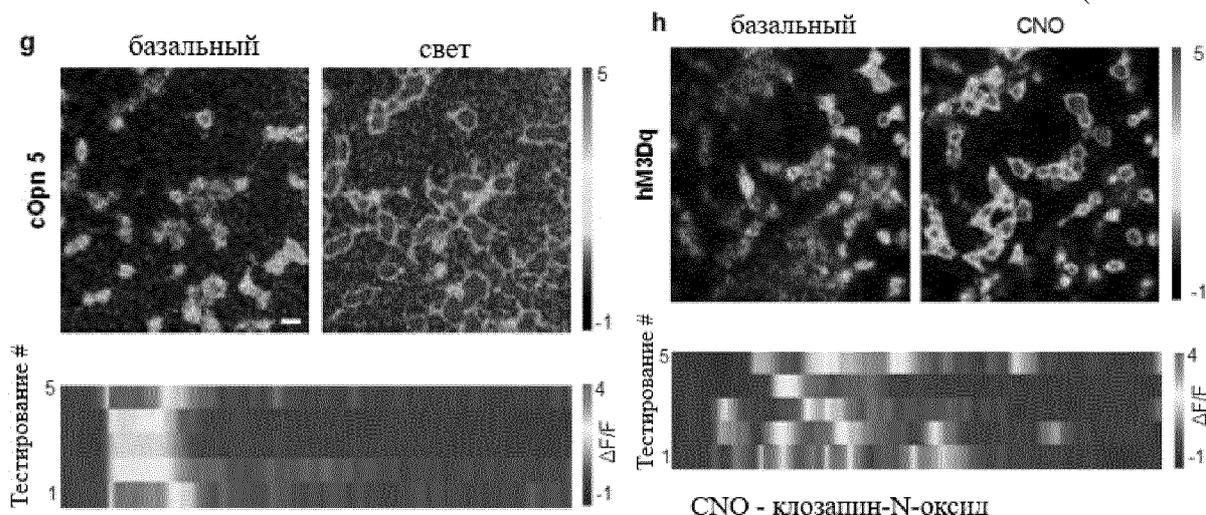


h

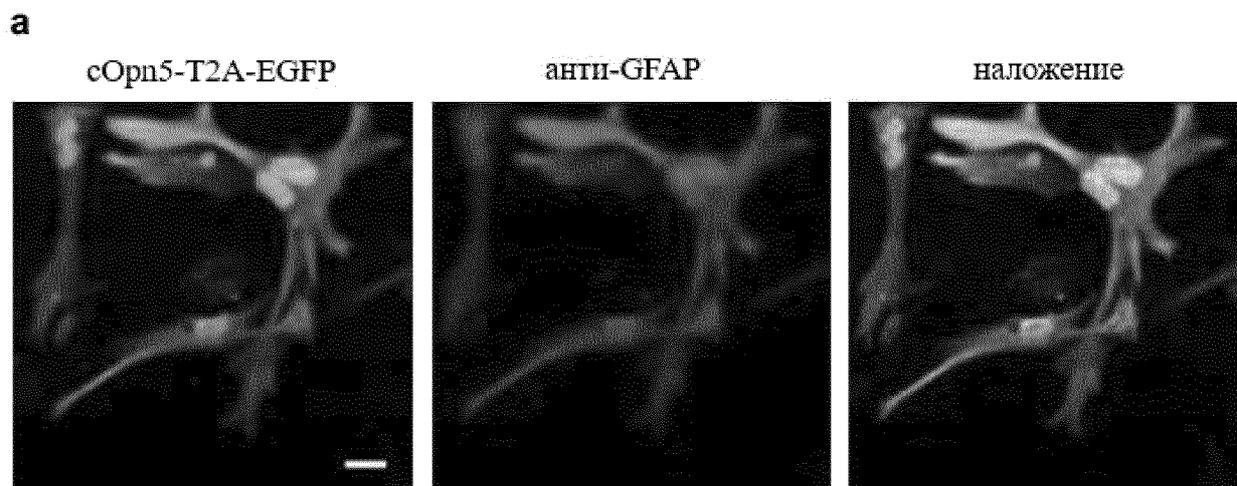


Фиг. 3

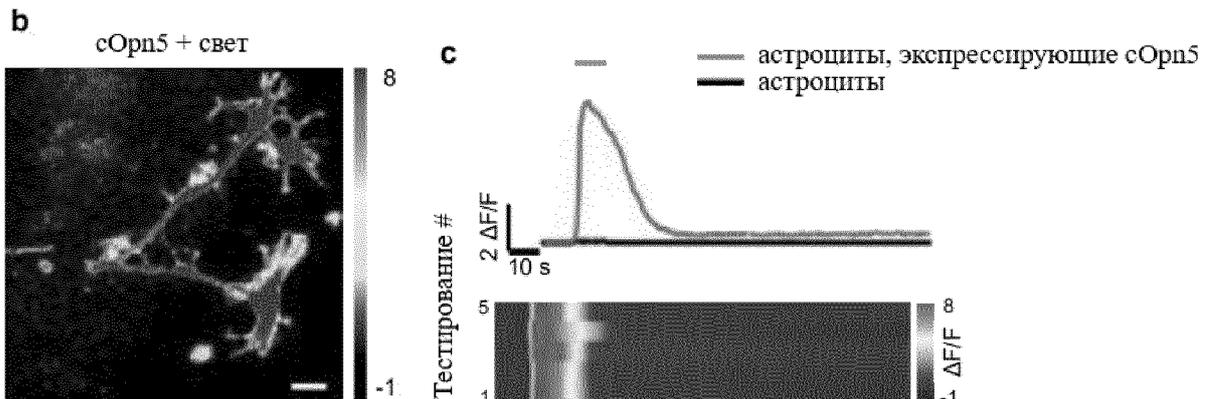




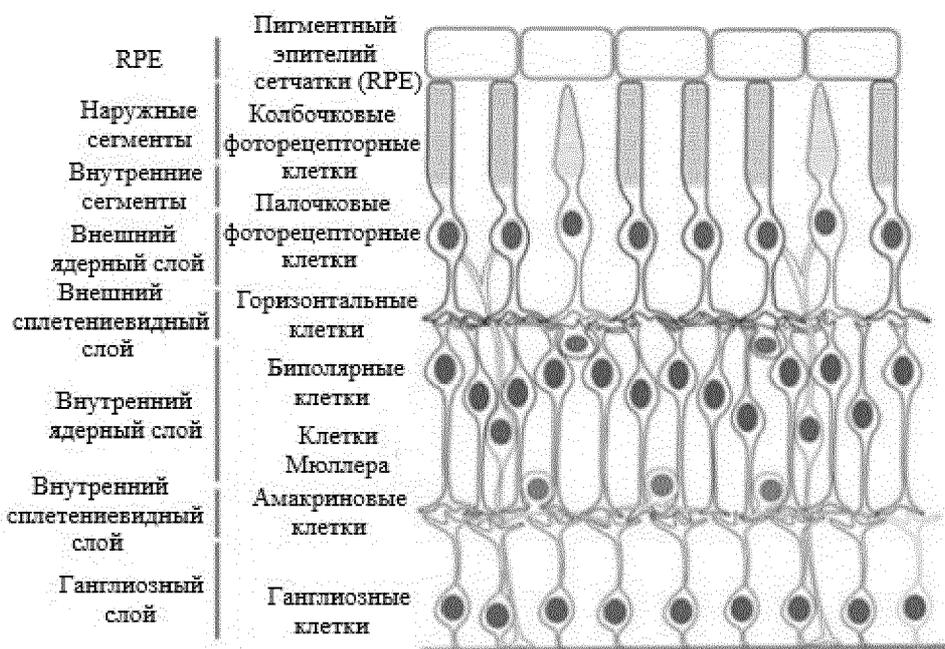
Фиг. 4



GFAP - глиальный фибриллярный кислый белок
EGFP - улучшенный зелёный флуоресцентный белок

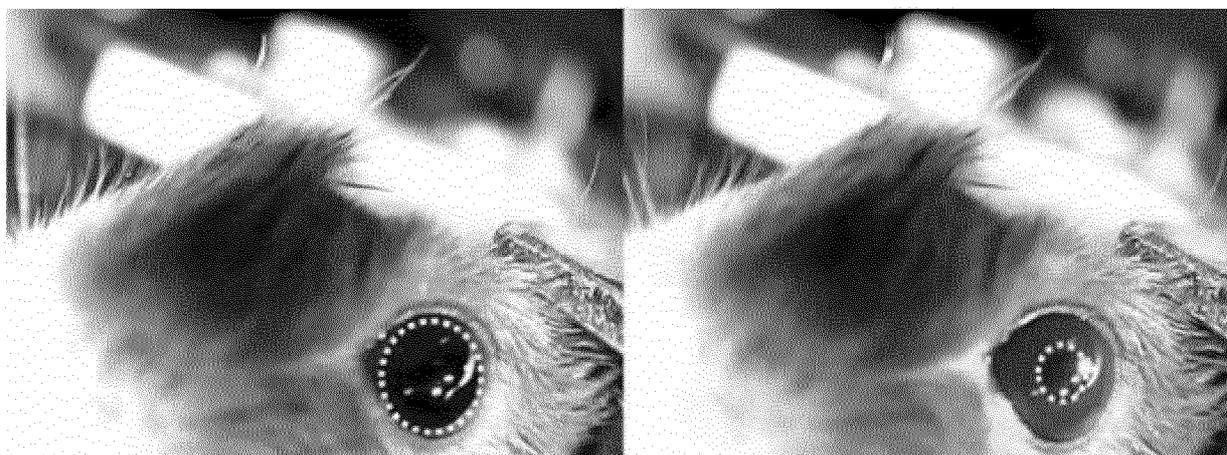


Фиг. 5

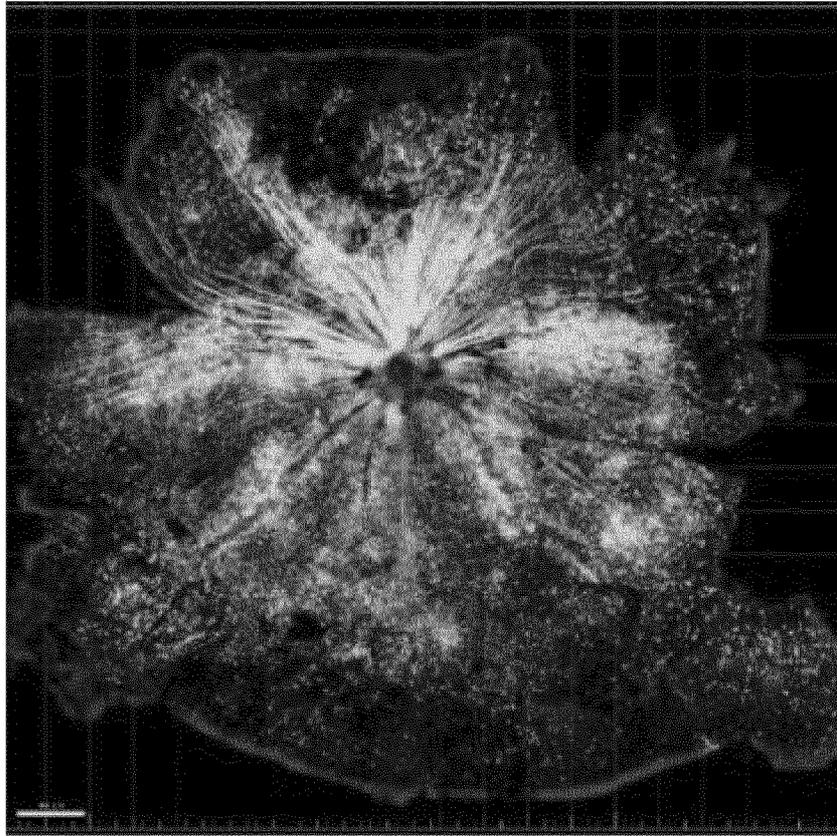


RPE - пигментный эпителий сетчатки

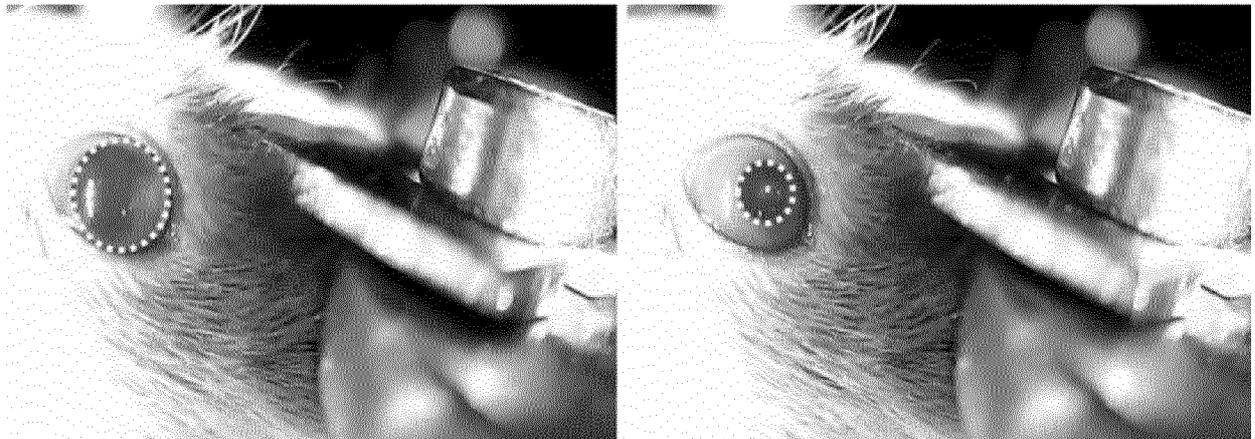
Фиг. 6



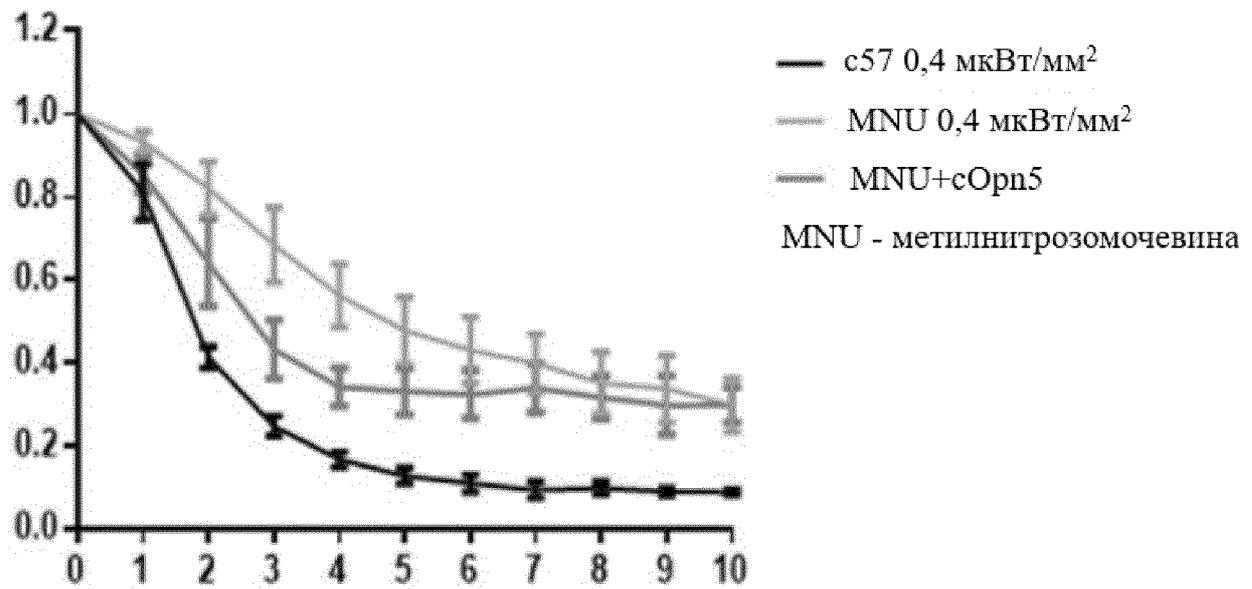
Фиг. 7



Фиг. 8

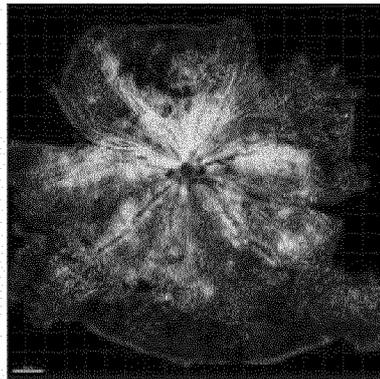


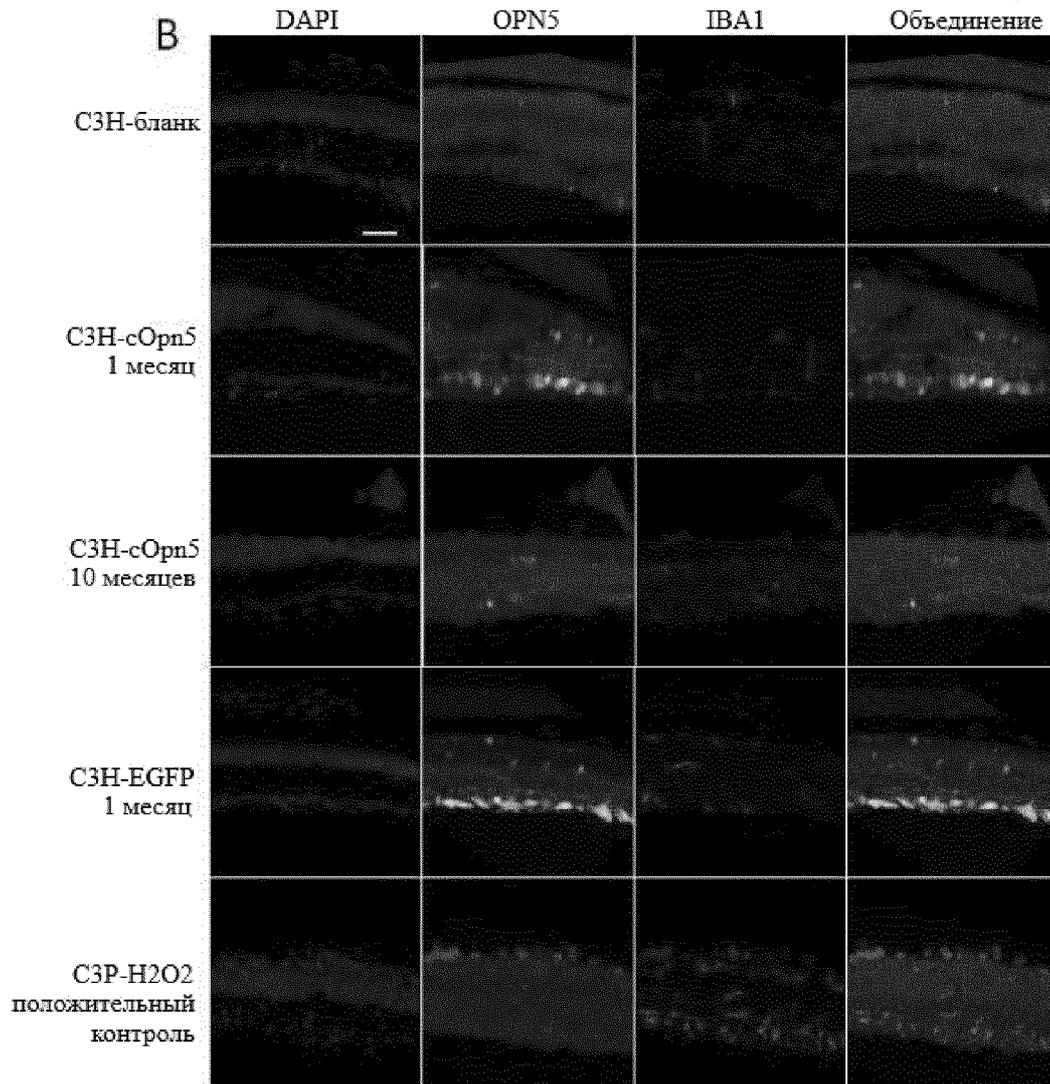
Фиг. 9



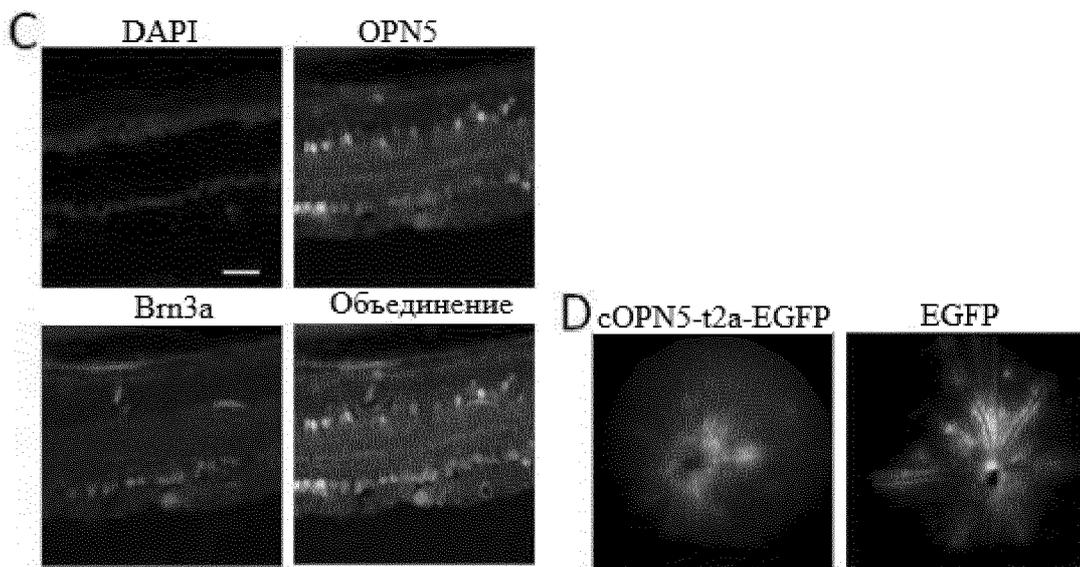
Фиг. 10

A

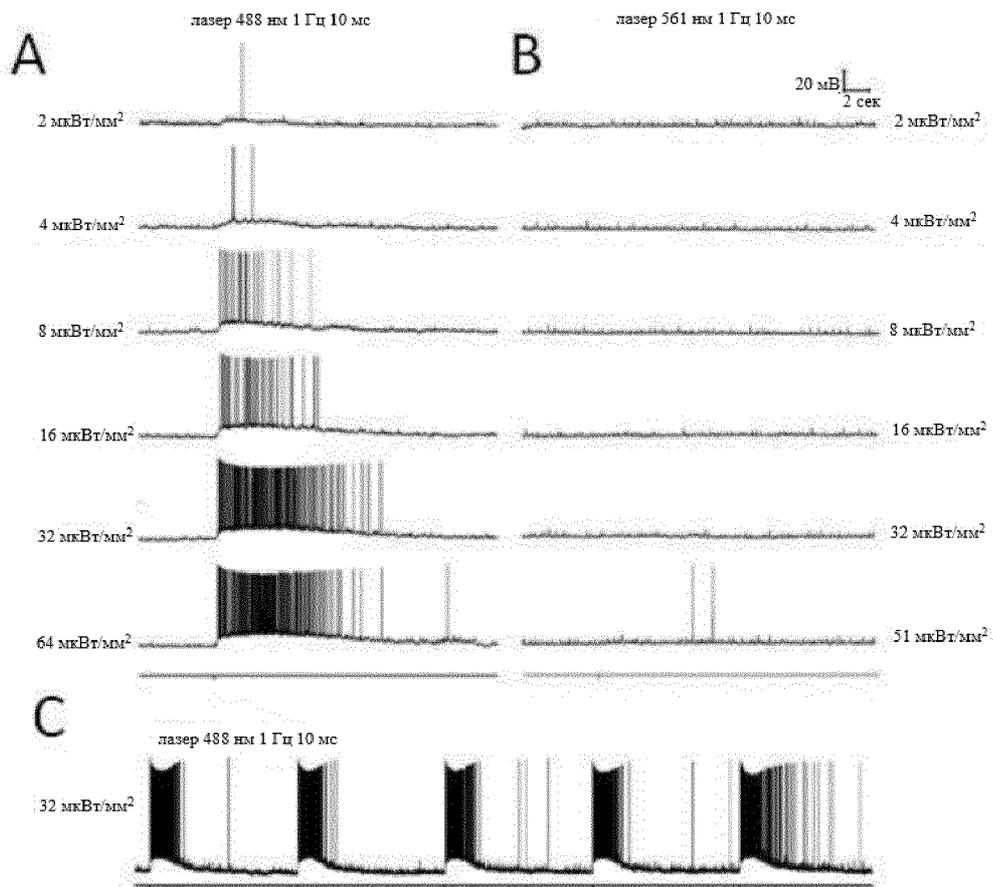
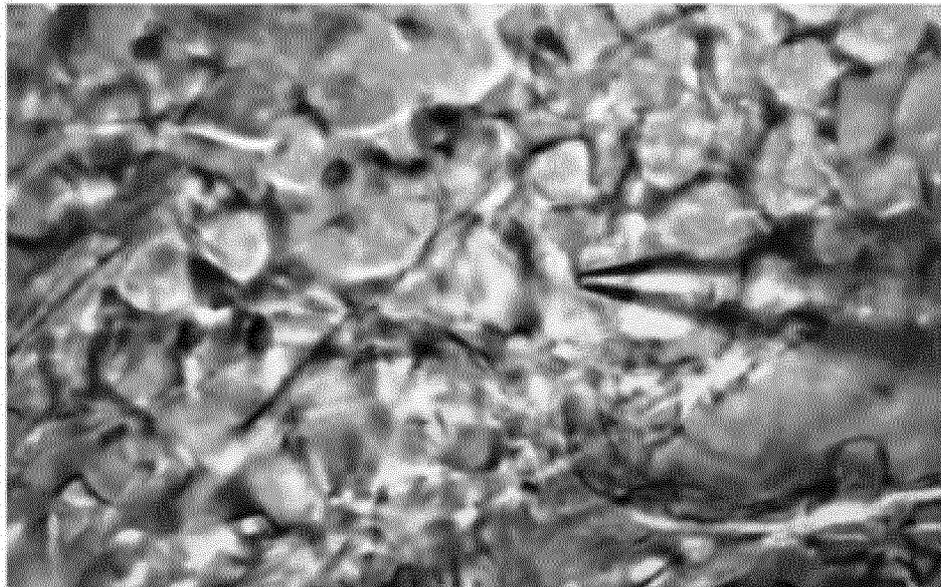




DAPI - 4',6-диамидино-2-фенилиндо́л

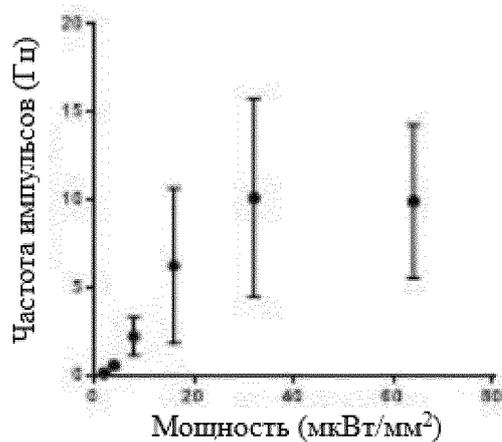


Фиг. 11

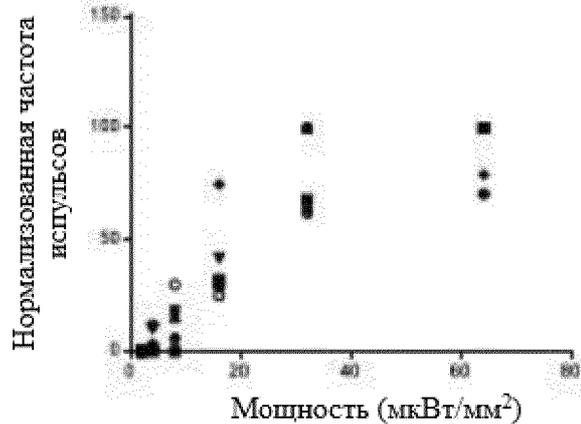


лазер 488 нм

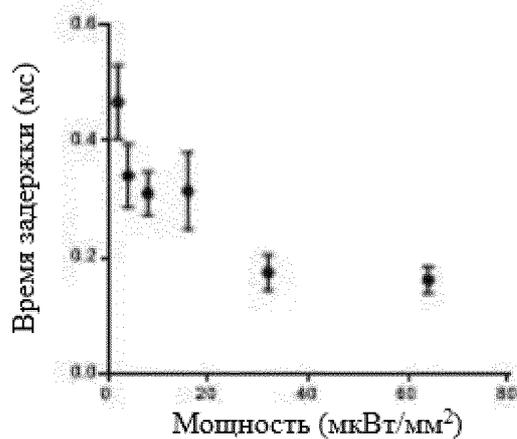
D



E

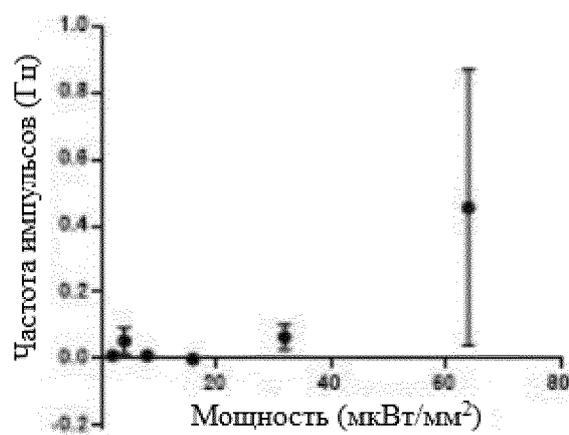


F

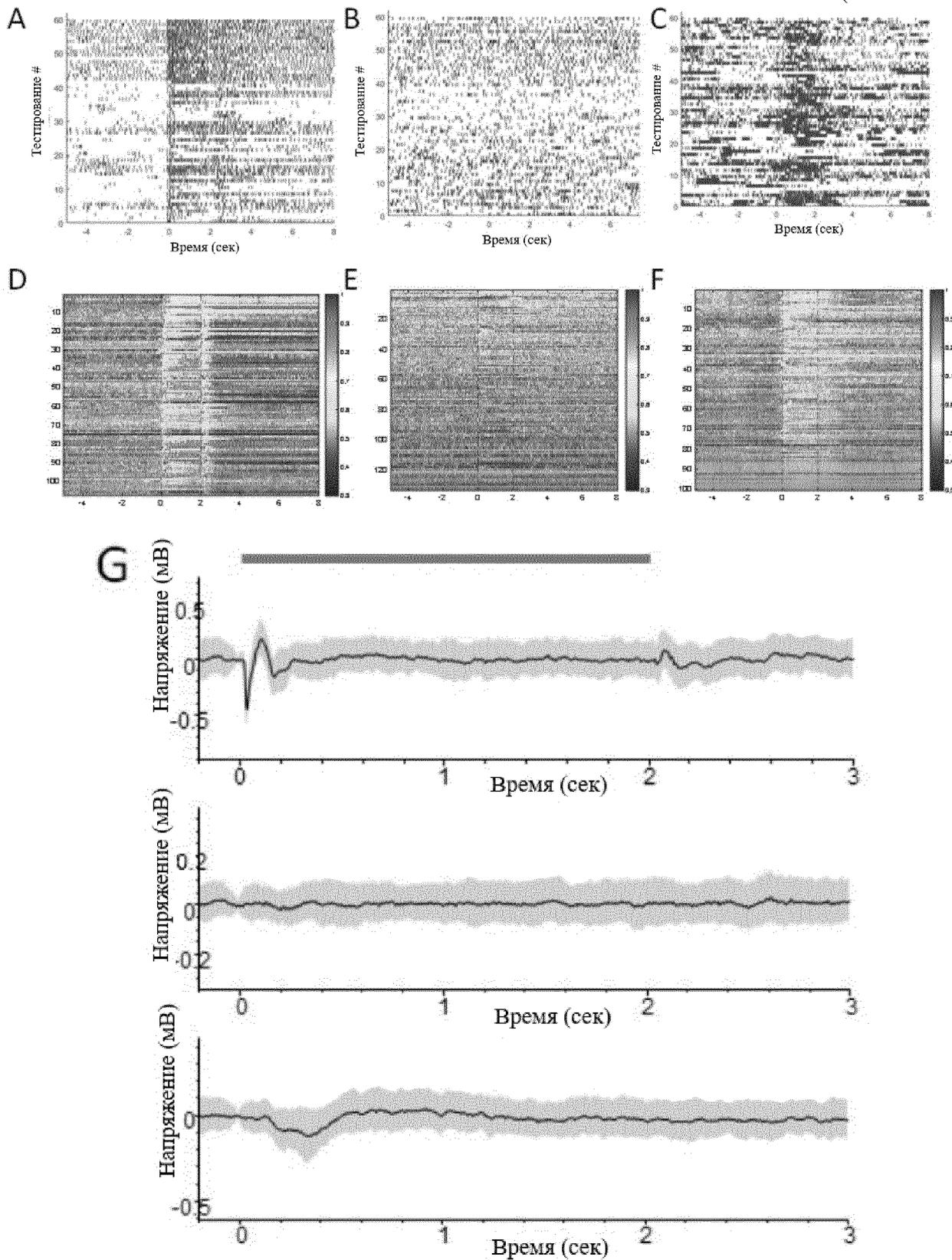


G

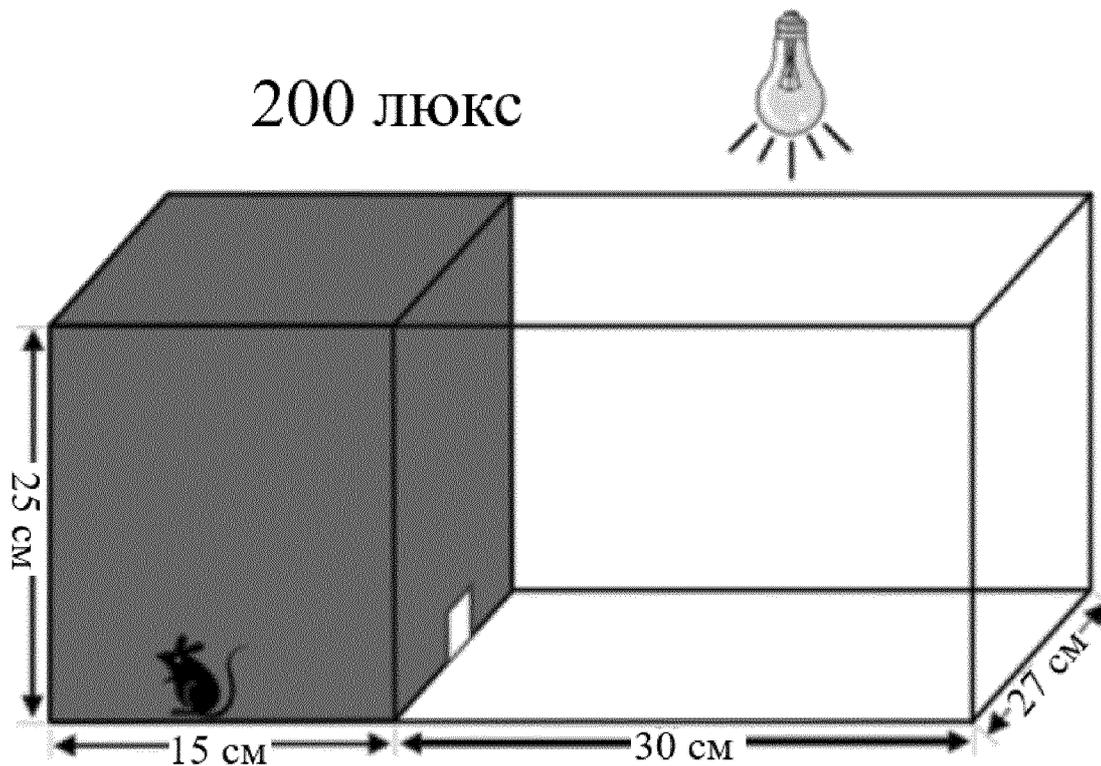
лазер 561 нм



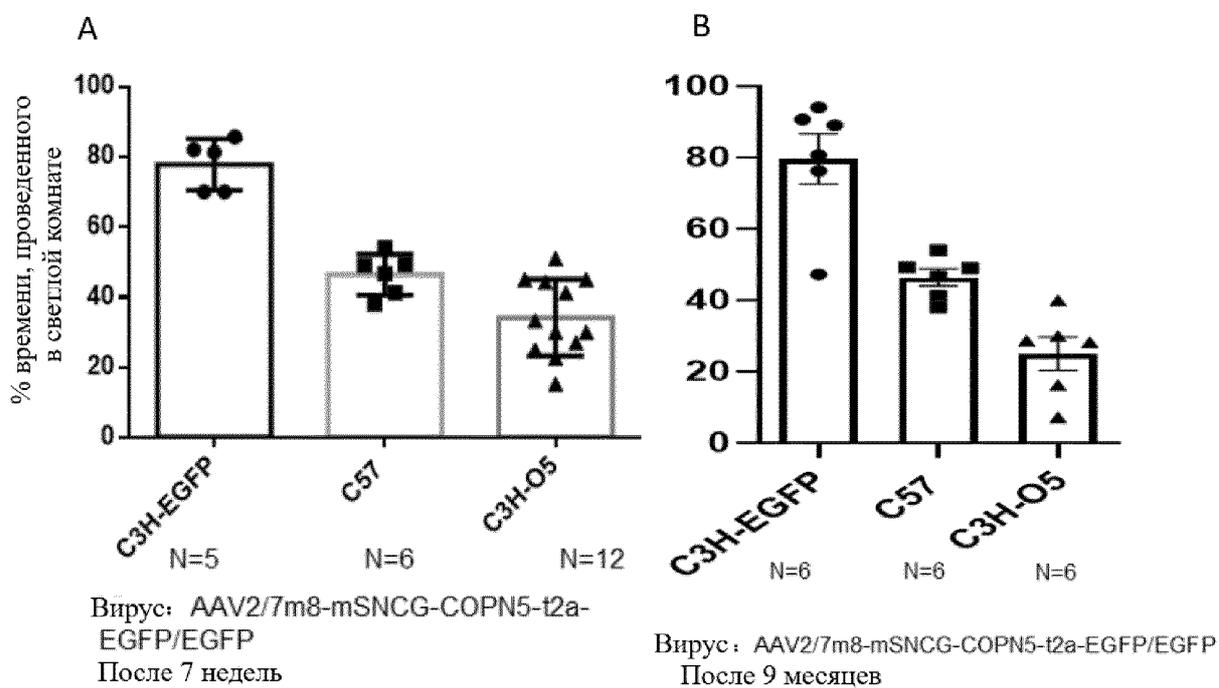
Фиг. 12



Фиг. 13



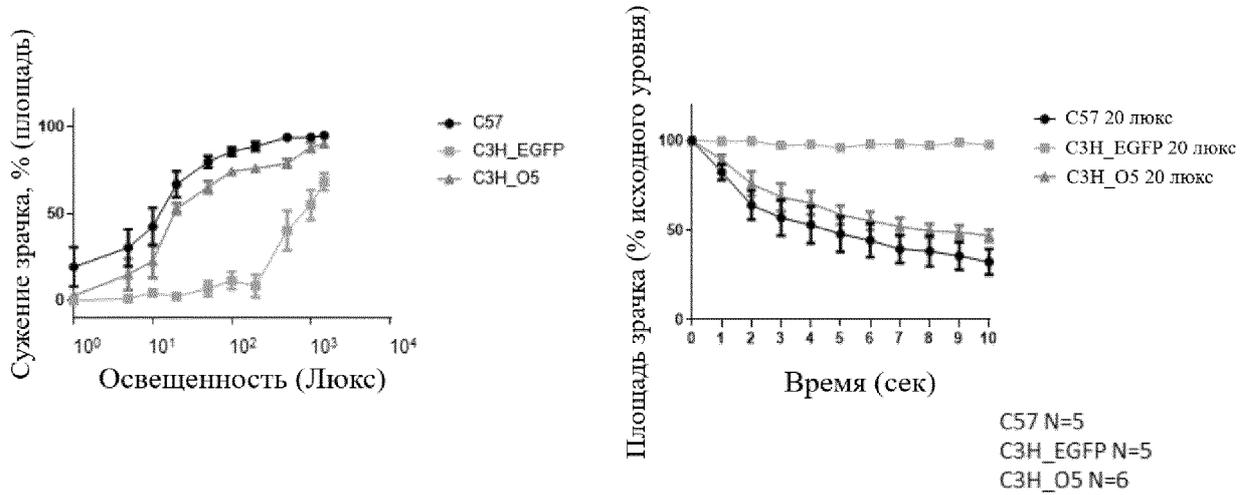
Фиг. 14



Фиг. 15

А

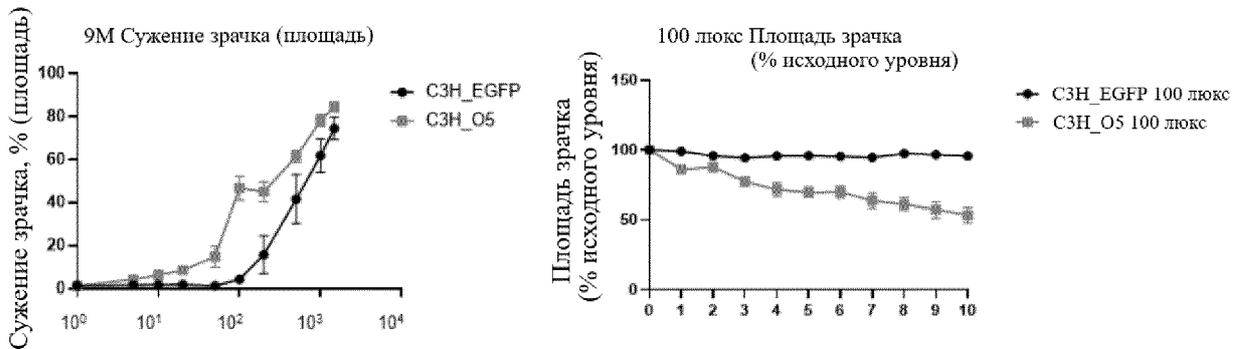
Восстановление чувствительности к свету глаза мышей rd1/rd1,
обработанных AAV-cOPN5 после 7 недель



В

Восстановление чувствительности к свету глаза мышей rd/rd,
обработанных AAV-cOPN5 после 9 месяцев

100 люкс Площадь зрачка (исходного уровня)



Фиг. 16