

VERKKOKALVON GEENITERAPIA

Puranen Jooseppi

Biotieteiden koulutusohjelma, Biokemian pääaine

Itä-Suomen Yliopisto

Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta/Biotiede

Maaliskuu 2013

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta
Biotiede
Biotieteiden koulutusohjelma
PURANEN JOOSEPPI: Verkkokalvon geeniterapia
Opinnäytetutkielma, 58 sivua
Tutkielman ohjaajat: FT Elisa Toropainen ja dosentti Maria Halmekytö
Maaliskuu 2013

Avainsanat: Geeniterapia, Silmänpohjan ikärappeuma, Oksidatiivinen stressi, Lämpöshokkiproteiini

Silmänpohjan ikärappeuma (Age-related Macular Degeneration, AMD) on hoitamattomana yleisin sokeuteen johtava silmänsairaus länsimaissa. AMD jaetaan kuivaan ja kosteaan muotoon. Ikärappeuman kuivaa muotoa sairastaa yli 80 % ikärappeumapotilaista, eikä tähän sairauden muotoon ole vielä tehokasta hoitoa tarjolla.

AMD:n kuivalle muodolle tunnusomaisia piirteitä ovat verkkokalvon pigmenttiepiteelisolukerroksen sisäiset ja ulkoiset proteiinikertymät (drusenit ja lipofuskiinit), jotka ovat ensimmäisiä havaittavia rappeumamuutoksia silmänpohjassa. Sairauden etiologia on toistaiseksi huonosti tunnettu, mutta altistavia tekijöitä ikääntymisen lisäksi ovat mm. perinnöllisyys, krooninen oksidatiivinen stressi, elämäntavat ja ympäristöstä aiheutuvat riskitekijät.

Opinnäyttetyössä tutkittiin, mitä vaikutusta viraalisella geeninsiirrolla siirretyllä eGFP-hHsp70-proteiinin ilmenemisellä on oksidatiiviseen stressiin silmän verkkokalvolla *in vivo*. Tutkimuksessa kokeiltiin oksidatiivisen stressireaktion, joka on merkittävin silmänpohjan ikärappeuman aiheuttaja, hidasta aiheuttamista verkkokalvolle sinisen valon aallonpituutta käyttäen *in vivo*. Tutkimuksessa todettiin, että verkkokalvon alle injektoidut rAAV2/2-eGFP-hHsp70 virukset infektoivat useita solutyyppisiä verkkokalvolla ja siirtogeneeni tuotti soluissa oikeaa proteiinia ilman haitallisia sivuvaikutuksia. Kuitenkin käytetty sinisen valon aallonpituus ei aiheuttanut verkkokalvolle merkittävää muutosta oksidatiiviseen stressiin verrattua verrokisilmiin, jotta olisi pystytty arvioimaan fuusiogeenin vaikutuksia oksidatiivisen stressin ilmenemiseen. Sinisen valon kohdentaminen verkkokalvoon spesifisesti sopivilla annoksilla vaatii muutoksia koemallin tekniseen suorittamiseen. Saadut tulokset ovat kuitenkin lupaavia uuden hoitomuodon kehittämisessä silmänpohjan ikärappeuman hoitoon.

LYHENNELUETTELO

AAV	Adeno-associated virus
ABCA4	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4, proteiini verkkokalvon fotoreseptoreiden ulommalla rajakalvolla
AMD	age-related macular degeneration, silmänpohjan ikärappeuma
BHK	baby hamster kidney cell line, yhden vuorokauden ikäisten hamstereiden munuaisista eristetty jatkuva fibroblastisolulinja
CAR	coxsackievirus ja adenovirus reseptori
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
ERG	elektroretinografia
FBS	fetal bovine serum, sikiökautisen naudan seerumi
GCL	verkkokalvon gangliosolukerros
GFP	green fluorescent protein, vihreää fluoresoiva proteiini
GNAT2	guanine nucleotide-binding protein G subunit alpha-2, tarvitaan tappisolujen G-proteiini transdusiinin muokkaamiseen
Hsp70	lämpöshokkiproteiini 70
hHsp70	ihmisen lämpöshokkiproteiini 70
IPL	inner plexiform layer, verkkokalvon sisempi verkkomainen kerros
IS	inner segment, näköreseptorisolujen sisäjäsenet
ITR	inverted terminal repeat, käännetty terminaalinen toistojakso
LCA	Leberin synnyinäinen amauroosi
NFL	nerve fiber layer, hermosäiekerros
OCT	silmänpohjan valokerroskuvaus
ONL	outer nuclear layer, verkkokalvon ulompi tumakerros
OPL	outer plexiform layer, verkkokalvon ulompi verkkomainen kerros
OS	outer segment, näköreseptorisolujen ulkojäsenet
ORF	open reading frame, avoin lukukehys,
PEDF	pigment epithelium-derived factor

PFA	paraformaldehydi
PLR	pupillin valovaste
rAAV	rekombinantti adeno-associated virus
RPE	retinal pigment epithelium, verkkokalvon pigmenttiepiteeli
RPE65	retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein
scAAV	self-complementary AAV
TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinase-3
T-PER	tissue protein extraction reagent
VEGF- α	verisuonen endoteelin kasvutekijä- α
VEGF- β	verisuonen endoteelin kasvutekijä - β
VEP	visuaaliset herätepotentiaalit
β PDE	cGMP fosfodiesterasi β

SISÄLLYSLUETTELO

1. Johdanto.....	6
2. Kirjallisuuskatsaus	7
2.1 Silmä.....	7
2.1.1 Silmän rakenne	7
2.1.2 Verkkokalvon rakenne ja toiminta	8
2.1.3 Lääkkeiden annostelu silmään.....	10
2.2 Silmän geeniterapia	12
2.2.1 Viraalinen geeniterapia.....	15
2.2.2 Ei-viraalinen geeniterapia	24
2.3 Verkkokalvon geeniterapia	25
2.4 Yhteenveto.....	28
3. Tutkielman tavoitteet	30
4. Materiaalit ja menetelmät	32
4.1 Vektorin valmistus ja virusten tuotto	32
4.2 Soluviljely ja käsittelyt.....	32
4.3 Western Blotting.....	33
4.4 Eläimet	34
4.5 Subretinaaliset injektiot.....	34
4.6 Sininen valo	35
4.7 Immunohistokemia	36
4.8 Western Blotting.....	37
5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU.....	38
5.1 ARPE-19 solujen transduktio <i>in vitro</i>	38
5.2 Verkkokalvon injektiot <i>in vivo</i>	39
6. POHDINTA	44
6. LÄHDELUETTELO	47

1. Johdanto

Näköaisti on ihmisen tärkeimpiä aisteja. Silmän verkkokalvo muuttaa ulkoapäin tulevan sähkömagneettisen säteilyn valokemiallisten vaiheiden kautta sähköimpulsseiksi, jotka siirtyvät näkörataa pitkin aivojen näköalueille näköaistimukseksi. Verkkokalvolla tapahtuvat patologiset muutokset vaikuttavat signaalien kulkuun ja heikentävät näkökykyä.

Verkkokalvon sairaudet ovat yleisimpiä näkövammaisuuden aiheuttajia Suomessa ja muualla maailmassa (Suomen näkövammarekisterin vuosikirja 2010). Yksi keskeisimmistä ongelmista verkkokalvosairauksien hoidossa on lääkeaineen kohdentaminen haluttuun kudokseen. Silmä on hyvin suojattu sekä elimistön ulkoa- että sisältäpäin tulevilta patogeeneilta. Nämä ominaisuudet kuitenkin vaikeuttavat huomattavasti silmäsairauksien lääkehoitoa. Sarveiskalvon epiteelinsolujen tiiviit liitokset estävät silmän pintaan annosteltavien lääkkeiden pääsyn silmän takaosaan ja veri-retinaeste estää lääkkeiden pääsyn verkkokalvolle systeemisen verenkierron kautta. Lääkeainepitoisuudet pitää siis pitää suurina, jotta niillä saataisiin terapeuttinen hyöty. Tämä taas rasittaa elimistöä ja saattaa aiheuttaa systeemisiä sivuvaikutuksia.

Tutkimusten mukaan silmään kohdistetut lääkeaine-injektiot antavat parhaan hoitotuloksen verkkokalvosairauksien hoidossa (Peyman ym. 2009). Menetelmällä on mahdollistanut riittävän spesifisen ja haittavaikutuksettomän keinon, jolla terapeuttinen lääkeainepitoisuus on voitu saavuttaa. Geenin rakenteen ja toiminnan ymmärtäminen sekä geeninsiirtomenetelmien kehittyminen ovat tuoneet uusia välineitä myös silmäsairauksien hoitoon. Terapeuttista proteiinia ilmentävien siirtogeenien ja niiden säätelyyn vaikuttavien nukleiinihappojen tutkiminen tulee lähivuosina tuomaan uusia hoitomuotoja sairauksiin, joita ennen ei ole pystytty hoitamaan.

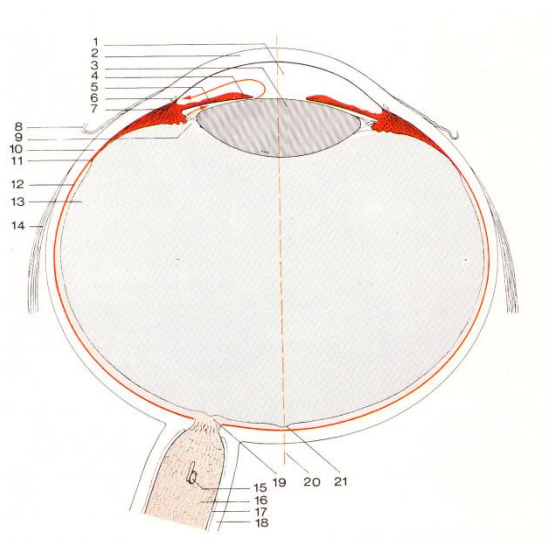
Tässä kirjallisuuskatsauksessa käydään läpi verkkokalvon geeniterapiassa käytettyjen kuljettimien ominaisuuksia ja niiden käyttömahdollisuuksia verkkokalvon sairauksien hoidossa.

2. Kirjallisuuskatsaus

2.1 Silmä

2.1.1 Silmän rakenne

Silmäkuopan etuosassa sijaitseva silmämuna on useista erilaisista rakenteista koostuva valonsäteilyä aistiva näköelin (kuva 1), joka muuttaa ulkoapäin tulevan sähkömagneettisen säteilyn valokemiallisin muutoksien kautta näköaistimukseksi (Saari 2011).



Kuva 1. Silmän rakenne. 1.Silmän etukammio 2.Sarveiskalvo 3.Mykiö 4.Mustuaisen kurojalihas 5.Mustuaisen laajentajalihas 6.Schlemmin kanava 7. Sädekehä 8. Sidekalvo 9. Silmän takakammio 10.Kovakalvo 11.Verkkokalvon eturaja 12.Suonikalvo 13.Lasiainen 14. Silmämunan liikuttajalihas 15.Verkkokalvon keskivaltimo 16.Näköhermo 17. Aivo-selkäydinnestekerros 18.Näköhermoa ympäröivä kalvo, joka vastaa aivojen kovakalvoa 19.Näköhermon nysty 20.Näköakseli 21. Verkkokalvon keskikuoppa (Nienstedt ym. 2009).

Silmämunan uloimpana kerroksena on **kovakalvo sclera**, jonka tehtävänä on suojata silmää kimmoisan rakenteensa ansiosta ja olla kiinnittymispintana silmän liikuttaja lihaksille.

Silmän etuosassa valkoinen kovakalvo vaihtuu läpinäkyvään ja verisuonettomaan **sarveiskalvoon** *cornea*, joka muodostuu viidestä kerroksesta päällimmäisen epiteelisolukerroksen suojatessa sarveiskalvon pintaa.

Sarveiskalvo taittaa silmään tulevia valonsäteitä etukammion nesteen tuoman kuperan rakenteensa johdosta. Silmän etuosaa suojaava **Sidekalvo** *Conjunctiva* muodostaa pussimaisen rakenteen silmäluomien sisäpinnan ja kovakalvon välille (Saari 2011).

Kovakalvon alapuolella on silmälaskimoista ja –valtimoista koostuva **suonikalvo** *Choroidea*, joka välittää ravinteita ympärillään oleville rakenteille. Silmän etuosassa suonikalvo yhtyy sileänlihaskudoksen muodostamaan sädekehään, joka tuottaa ravinteita sisältävää kammionestettä verisuonettomille; linssille ja sarveiskalvolle (Saari 2011).

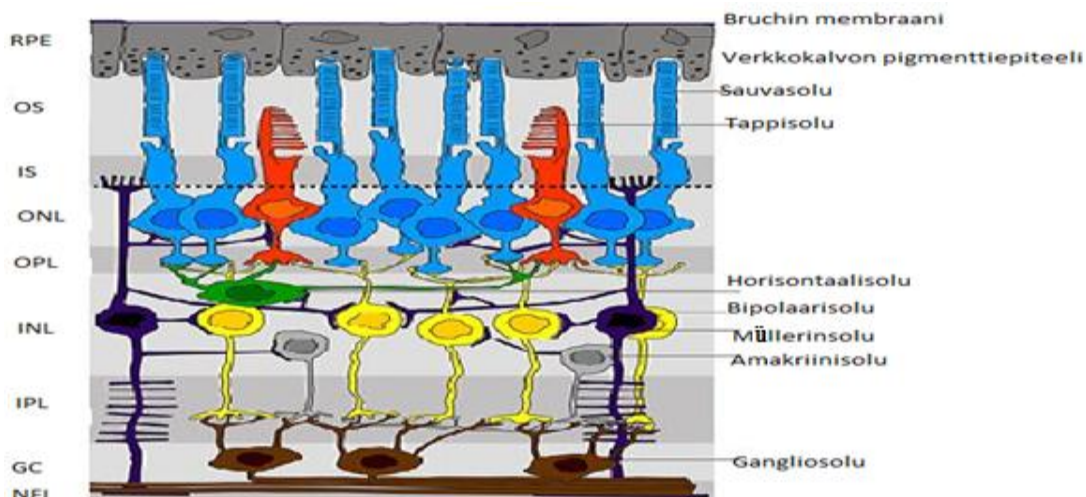
Silmän etuosassa suonikalvo jatkuu pigmentoituneeksi **värikalvoksi** *Iris*, jonka säteittäiset ja rengasrakenteisen lihaksistot vaikuttavat pupillin kokoon valon voimakkuuden mukaan. Värikalvon takana on läpinäkyvä **linssi** *lens*, joka sädekehän ripustinsäikeiden avulla muuttaa muotoaan näköaistimuksen vaatimalla tavalla (Saari 2011).

Suurimman osan silmästä täyttää pääosin vedestä muodostuva **lasiainen** *corpus vitreum*. Lasiainen tukee linssiä ja sarveiskalvoa kollageenisäikeistä muodostuneen verkoston ja hualuronihapon antaman hyytelömäisen rakenteen ansiosta. Lasiainen takaa valon heijastumattoman kulkeutumisen linssiltä verkkokalvolle (Saari 2011).

2.1.2 Verkkokalvon rakenne ja toiminta

Verkkokalvo *retina* on suonikalvon ja lasiaisen välissä sijaitseva läpinäkyvä silmän rakenne, joka koostuu fotoreseptorisolukerroksen lisäksi useista hermo- ja tukisolukerroksista (Kuva 2).

Suonikalvoa vasten olevat postmitoottiset verkkokalvon pigmenttiepiteelisolut, RPE-solut, huolehtivat fotoreseptorisolujen hyvinvoinnista tuottamalla kasvutekijöitä sekä välittämällä ravintoaineita ja happea soluille (Coscas ym. 1998).



Kuva 2. Verkkokalvon rakenne. Uloimpana suonikalvoa vasten on bruchin membraani ja verkkokalvon pigmenttiepiteeli RPE *retina pigment epithelium*. Seuraava kerros muodostuu tappien ja sauvojen ulkojäsenistä OS *outer segment*, joiden sisäjäsenet IS *inner segment* ja tumat ONL *outer nuclear layer* muodostavat myös omat kerroksensa. Tapit ja sauvat muodostavat synaptisia yhteyksiä bipolaari-, horisontaali- ja amakriinisolujen kanssa OPL *outer plexiform layer*. Nämä solut muodostavat yhteyksiä myös gangliosoluihin IPL *inner plexiform layer*, joiden aksonit muodostavat verkkokalvoon oman kerroksensa GC *ganglion cell layer*. Gangliosolujen aksonit NFL *nerve fiber layer* kulkevat kohti näköhermon nystyä ja muodostavat pääosan näköhermosta (ei kuvassa). Mukailtu lähteestä <http://fi.wikipedia.org/wiki/Verkkokalvo> 24.2.2013 11:24.

Fotoreseptoreita on kahta tyyppiä, sauvoja ja tappeja. Näiden rakenteet jaetaan sisä- ja ulkosegmentteihin, joissa valon sähkömagneettinen säteily muuntuu kemiallisten reaktioiden vaikutuksesta hermoimpulsseiksi. Kummassakin silmässä on yli 5 miljoonaa tappisolua ja 100 miljoonaa sauvasolua. Tappisoluja on kolmea erityyppiä, sini-, viher- ja punaherkkiä tappeja, jotka ovat sopivia valon eri aallonpituuksille. Sauvasolut eivät osallistu värien erottamiseen vaan niiden toiminta voimistuu hämärässä parantaen pimeänäköämme (Saari 2011). Verkkokalvon näköreseptorisoluille tuleva sähkömagneettinen säteily muuttuu kemiallisten vaiheiden kautta sähköimpulsseiksi, jotka siirtyvät verkkokalvolta (näköreseptorisolu-bipolaarisolu-gangliosolu) näköhermoa pitkin aivojen näköalueisiin.

Tarkan näkemisen alueella verkkokalvon keskikuopassa *fovea* on vain tappisolujen muodostama kerros (Saari 2011). Alueelta puuttuvat verkkokalvon muut kerrokset

pigmenttiepiteelikerrosta lukuun ottamatta. Tarkannäkemisen alueella voi yksittäisellä näköreseptorilla olla oma bibolaari- ja gangliosolunsa, joten pienien yksityiskohtien erottelukyky on hyvä. Muualla verkkokalvon näköreseptorisolut ovat yhteydessä samaan bibolaarisoluun, ja gangliosoluun on sidoksissa useita bibolaarisoluja. Yksityiskohtien erotuskyky on verkkokalvon reunaosissa heikompi, mutta valonherkkyys voimakkaampi.

Silmän näköhermon nystyn *papilla nervi optici* kohdalta kulkevat gangliosolujen aksonit sekä verkkokalvon keskivaltimo ja -laskimo. Tässä kohdassa näköreseptoreiden puute aiheuttaa näkökenttään sokean alueen. Kolmannes näköhermon syistä on verkkokalvon tarkannäkemisen alueelta tulevia hermoratoja.

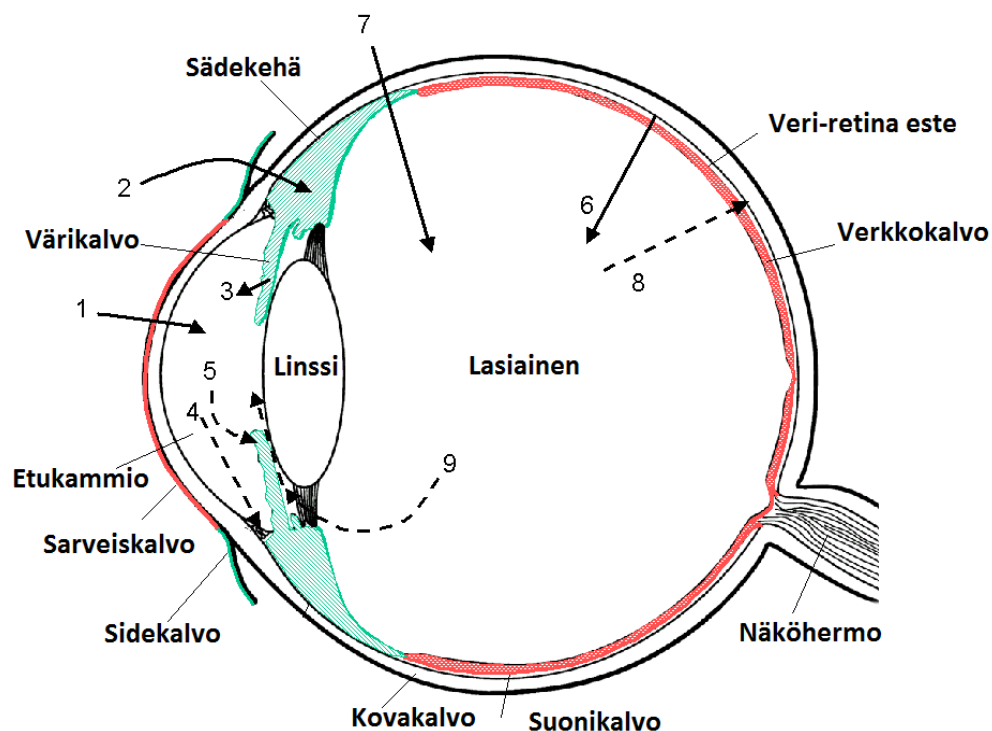
2.1.3 Lääkkeiden annostelu silmään

Silmä on sijaintinsa ja rakenteensa vuoksi hyvin suojassa sekä ulkoapäin tulevilta, että verenkierron välityksellä siirtyviltä taudinaiheuttajilta. Silmän sarveis- ja kovakalvon läpäisy onkin tehokkaan silmään kohdistuvan lääkehoidon edellytys. Sarveiskalvon epiteelisolujen tiiviit liitokset ja verkkokalvon veri-retina –este pienentävät sarveis- ja kovakalvon kautta annosteltavien silmätippojen ja suonensisäisten lääkeaineiden käyttöä silmäsairauksien hoidoissa (Maurice ja Mishima 1984).

Silmäsairauksien lääkehoito pohjautuu tällä hetkellä silmän pinnalle ja sisäosiin annosteltaviin lääkeaineisiin (Kuva3). Silmän pinnalle annosteltavien silmälääkkeiden ongelmana on, että ne huuhtoutuvat ja laimenevat kyynelnersteeseen, ja paikallisesta annostelusta huolimatta vain pieni osa (5 %) lääkeaineesta imeytyy silmän sisäosiin (Ghate ja Edelhauser 2006). Hoidoissa vaaditaan usein laskimonsisäisesti annosteltavia lääkeannoksia, jotka suurina pitoisuuksina rasittavat elimistöä ja tuovat mukanaan haitallisia sivuvaikutuksia.

Paikallisinjektiolla on mahdollista siirtää terapeuttiivinen lääkeaine silmän sisään ilman vakavia haittavaikutuksia. Menetelmä mahdollistaa suuremman lääkeainepitoisuuden saattamisen terapeuttille alueelle.

Silmän sisäisistä injektioista aiheutuvat haittavaikutukset jaetaan kahteen ryhmään: 1) pistoista aiheutuvat haitat ja 2) itse lääkeaineista sekä silmään kohdistuviin että systeemisiin haittoihin. Koska silmän sisäiset injektiot ovat hoitomuotoina vielä melko uusia, ei kaikkien lääkeaineiden kohdalla tiedetä millaisia pitkäaikaisvaikutuksia toistuvista toimenpiteistä seuraa (Brown ym. 2006 ; Rosenfelt ym. 2006). Injektioista aiheutuvat haittavaikutukset ovat harvinaisia, mutta voivat pahimmillaan aiheuttaa näkökyvyn romahtamisen.



Kuva 3. Lääkkeiden annostelureitit silmään. Lääkeaineiden imeytymisreitit on merkittynä kuvassa yhtenäisin viivoin ja poistumisreitit katkoviivoin. Lääkeaineiden annostelu etukammioon tapahtuu sarveiskalvon läpi imeytymällä (1), diffundoitumalla systeemisen verenkierron kautta värikalvon verisuonista (3) tai injektoimalla lääkeaine etukammion nestetilaan. Lääkeaineet voivat imeytyä sädekehään kovakalvon ja sidekalvon kautta (2). Etukammionesta lääkeaineet poistuvat joko etukammionesteen ulosvirtauksen kautta Schlemmin kanavaan (4) tai diffundoitumalla värikalvon verisuonistoon (5). Saavuttaakseen lasiainesteen systeemisessä lääkeannostelussa, lääkeaineen tulee läpäistä verkkokalvon pigmenttiepiteeli tai verkkokalvon verisuonten endoteelisolut (6). Lääkeaine voidaan myös injektoida lasiaiseen (7) tai verkkokalvoon. Lääkeaineet poistuvat lasiaisesta veri-retina -esteen kautta (8) tai diffundoitumalla kammionesteeseen (9). Kuva mukailtu lähteestä Hornof ym. 2005.

Lasiiseen injektoidut lääkeaineet liukenevat muutamassa tunnissa lasiiseen ja poistuvat joko etukammion kautta tai diffundoituvat verkkokalvon pigmenttiepiteelin läpi suonikalvostoon (Geroski ja Edelhauser 2000). Lääkkeen poistumisnopeuteen vaikuttavat molekyylin koko, pitoisuus sekä lipofiilisyytys. Sairauden luonteesta riippuen lääkeaine voidaan injektoida myös subretinaalisesti näköreseptoreiden ja RPE-solukerroksen väliseen tilaan tai pistoksena etukammioon.

2.2 Silmän geeniterapia

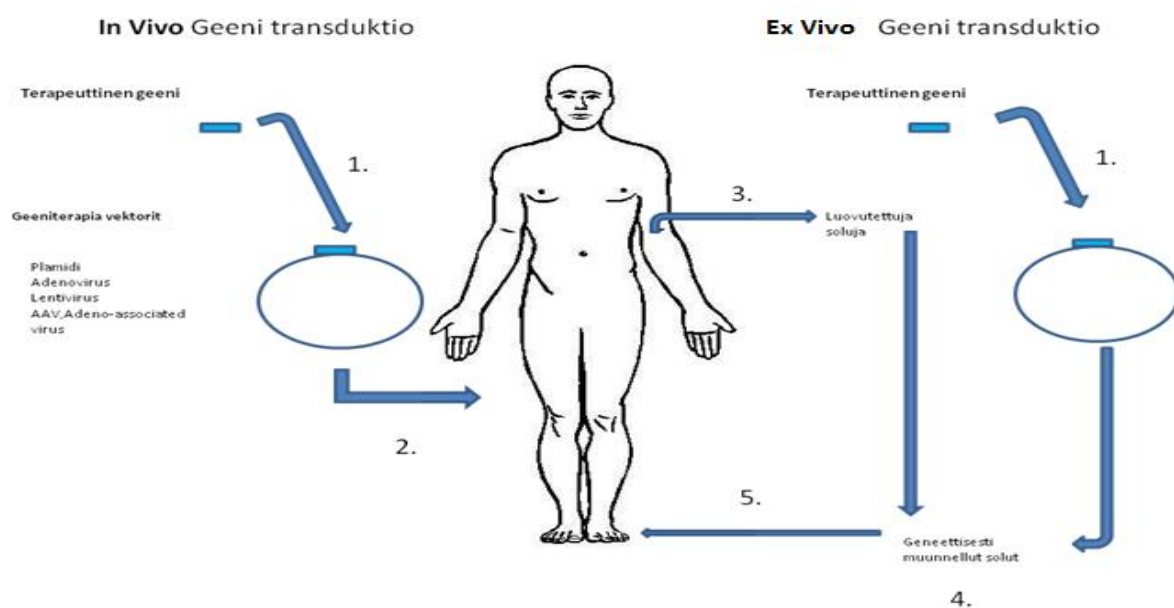
Kaikki elimistön entsyymit ja kasvutekijät ovat proteiineja ja ne ovat välttämättömiä ihmisen normaalille toiminnalle. Proteiinit muodostetaan DNA:n emäsjärjestyksen mukaan. Jos DNA:n luennassa tapahtuu virhe tai emäsjärjestys on poikkeava, myös tuotetun proteiinin rakenne muuttuu. Solu on tarkkaan säädelty kokonaisuus, jossa molekyylien oikeilla rakenteilla on suuri merkitys. Väärin laskostuneet proteiinit vaikuttavat solujen sisäiseen tasapainoon ja mahdollistavat sairauden syntymisen.

Geenilääkkeet ja geeniterapia eli geenihoito ovat nopeasti kasvava tutkimusala, joka on tuonut uusia mahdollisuuksia hoitaa tai jopa parantaa näitä sairauksia. Geeniterapiassa siirretään geneettistä materiaalia somaattisiin soluihin, pyrkimyksenä hidastaa taudin etenemistä tai ehkäistä sen syntymistä tuottamalla terapeuttista proteiinia/nukleiinihappoa solun sisään. Sairauksien luonteesta riippuen hoitoja voidaan toteuttaa erilaisien menetelmin; 1 sairauden kannalta haitallisen geenin toimintaa voidaan estää, 2 virheellinen geeni voidaan korvata toimivalla sekä 3 solussa voidaan tuottaa sairauden kannalta terapeuttisia proteiineja.

Koska paljas DNA on suuri kooltaan ja se hajoaa elimistöön siirrettynä nukleaasien toimesta on kehitetty erilaisia menetelmiä soluun kuljettamisen tehostamiseksi. Geenikuljettimet jakautuvat kahteen luokkaan; viraalisiin ja ei-viraalisiin. Viraaliset kuljettimet ovat heikennetyistä viruksista muokattuja muotoja, jotka eivät aiheuta ihmisille kliinistä tautia, mutta kuljettavat siirtogeenin tehokkaasti kohdesoluun. Viraaliset geeninsiirtovektorit tuotetaan pakkaussoluissa plasmiditransfektion avulla. Viruksista tunnetuimpia ovat *adeno-*, *herpes*, *AAV*, *retro-*, *Semliki forest*, *bakulo-* ja *lentivirukset*.

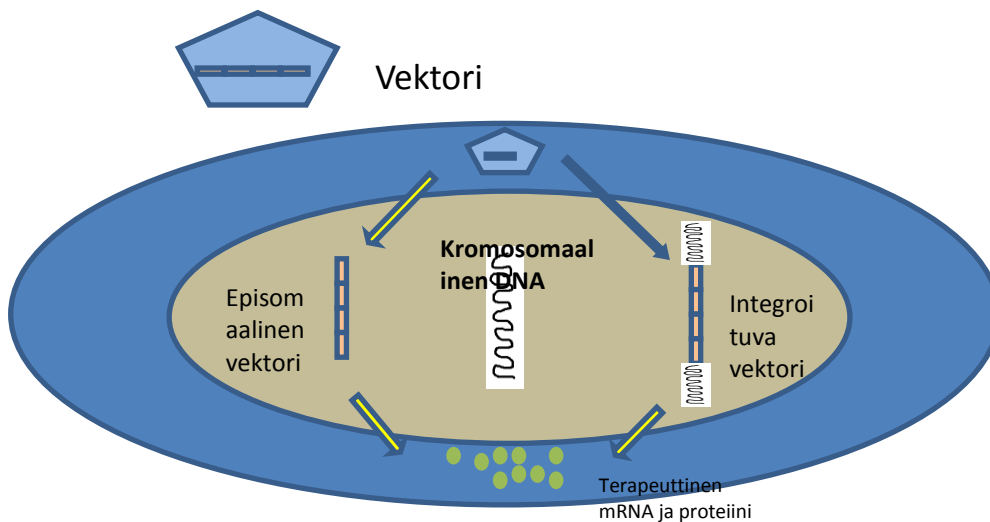
Ei-viraalisina kuljettimina käytetään mm. erilaisia liposomikomplekseja ja nanomateriaaleja, joiden sisään pakataan kuljetettavat nukleiinihappomolekyylit. Terapeuttinen DNA-plasmidi saatetaan liposomin sisään sonikoimalla tai haihduttamalla. Nonviraalinen kuljetin siirtyy kohdesoluun endosytoosilla ja siirtogeeniä ilmentetään ekstrakromosomaalisesta plasmidista. Toistaiseksi viraaliset kuljettimet ovat teholtaan selvästi parempi ei-viraalisiin kuljettimiin verrattuna (Ylä-Herttuala ja Aula 2002).

Nukleiinihappojen siirto somaattisiin soluihin toteutetaan geeninsiirtovektorien avulla *ex vivo*- ja *in vivo*-tekniikoin (Kuva 4).



Kuva 4. In vivo- ja ex vivo –geeninsiirto menetelmät. In vivo –menetelmällä terapeuttisen geenin sisältävä (1) geeniterapiavektori injisoidaan suoraan haluttuun kohdekudokseen elimistössä, hoitovasteen aikaansaamiseksi. (2). Ex vivo -menetelmässä kohdekudoksesta eristetään haluttuja soluja (3), joihin siirretään laboratorio-oloissa toimiva terapeuttinen geeni (1). Geneettisesti muunnellut solut (4) palautetaan takaisin elimistöön(5).

Viraaliset ja ei viraaliset kuljettimet voivat liittää siirtogeenin ominaisuuksiensa mukaan vastaanottavan solun perimään tai ne voivat pysyä soluissa vapaina episomeina (Erhardt 2008) (kuva 5). Siirtogeenin integroitua kohdesolun genomiin riski insertiomutageneesiin kasvaa (Kustikova 2010; Kustikova 2009).



Kuva 5. Integroituvan ja episomaalisen vektorin solukierto. Terapeuttisen -vektorin siirtogeneiä ilmennetään tumassa kuljettimesta riippuen, joko ekstrakromosomaalisena episomina tai kohdesolun genomiseen DNA:han integroituneena.

Silmä on otollinen kohde geeniterapialle. Sijaintinsa vuoksi silmään on käytössä useita lääkkeiden annostelureittejä, jolloin lääkitys voidaan kohdistaa tarkasti haluttuihin solukerroksiin (kuva 3). Silmä on helposti tavoitettavissa oleva elin ja oikeilla annostelureittien valinnoilla on mahdollista kohdentaa vaikutukset haluttuihin solukerroksiin. Myös silmän pienen tilavuuden ja eristyneen rakenteensa ansiosta vähäisemmällä hoitomäärällä voidaan saada aikaan tavoiteltu terapeuttinen hoitovaste. Transgeenin tai/sekä vektorin aiheuttamat immuunivasteet ovat silmän takaosiin kohdistuvissa hoidoissa lieviä verkkokalvon veri-retina-esteen ja RPE-solujen tiiviisliitosten ansiosta (Anand ym. 2002).

Laajamittaisissa tutkimuksissa on löydetty useisiin silmäsairauksiin viallisesti toimivia geenejä jotka vaikuttavat suoraan tai välillisesti tautien esiintyvyyteen. Tämä on mahdollistanut genomiperäisten eläinmallien kehityksen (Dejneka ym. 2003).

Lisäksi, silmän rakenteita ja toimintaa on helppo tutkia *in vivo* erilaisten tekniikoiden, kuten silmänpohjan valokerroskuvauksen OCT (optical coherent tomography), näköaistimuksen aiheuttamien potentiaalien VEPs (visual evoked potentials), valon aiheuttamien

pupillireaktioiden PLRs (pupillary light responses) ja verkkokalvon näköreseptorien vasteen eli ERG:n (electroretinography) avulla.

2.2.1 Viraalinen geeniterapia

Terapeuttisten geenien käyttö sairauksien hoidossa oivallettiin jo 1970-luvulla (Friedmann ja Roblin 1972). Näihin aikoihin havaittiin myös virusten kyky toimia geenien kuljettajana.

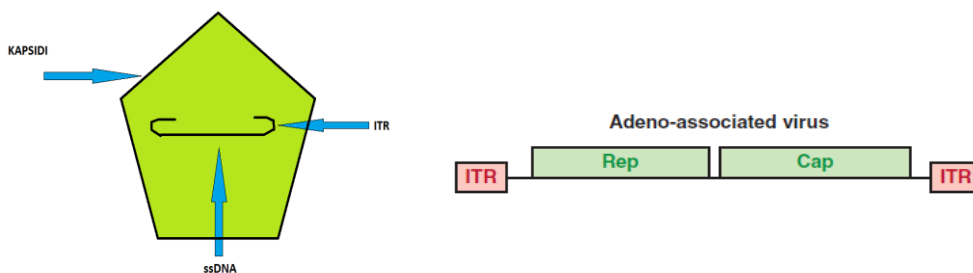
Virukset voidaan luokitella perimän (RNA, DNA), rakenteen (vaipattomat, vaipalliset) sekä integraatiokyvyn (integroitumattomat, integroituvat) mukaan. Ne ovat organismeja, joille on kehittynyt kyky siirtää geneettistä materiaalia soluun. Virusten luontaiset ominaisuudet mahdollistavat vektoreiden suunnittelun, vaikkakin niiden kyky aiheuttaa sairauksia luo potentiaalisen riskin niiden käytölle. Suunnittelulla pyritään minimoimaan nämä riskit käyttämällä vain viruksen geenejä, jotka ovat tärkeitä isäntäsolussa tapahtuvan transduktion ja siirtogeenin ilmentymisen kannalta. Proteiinihuoren ansiosta geneettinen materiaali pysyy suojassa kuljetuksesta aiheutuville ulkopuolisilta uhilta ja pintarakenteiden molekyylit määräävät infektoituvat solu- ja kudostyypit.

Rekombinantivirusvektoreiden suunnittelu on haasteellista virusten monimuotoisuuden vuoksi. Prosessin lähtökohtana on luonnollisesti parhaan mahdollisen terapeuttisen vasteen aikaansaaminen vähäisillä solu-, kudos- tai systeemisillä sivuvaikutuksilla. Viraalisen kuljettimen pitäisi transduktoida tehokkaasti ja spesifisesti vain kohdesoluja, -kudosta tai –elintä ja vektorin tulisi ilmentää terapeuttista geeniä vain tietyn ajan ja halutulla voimakkuudella. Jos geeniä ilmennetään liian vähän tai liian lyhyen aikaa hoitovaste voi jäädä tavoittamatta. Geenin liiallinen tai liian pitkäaikainen ilmeneminen voi taas aktivoida immuunivasteen aiheuttaen tulehdusreaktion ja patologisia sivuvaikutuksia. Tällöin terapeuttinen teho saattaa jäädä saavuttamatta. Lisäksi virusvektoreiden laajempaa kliinistä käyttöä ajatellen puhdasta virusvektoria pitäisi pystyä tuottamaan mahdollisimman nopeasti ja helposti suuria määriä. Toistaiseksi kliinisissä kokeissa käytetyt virusvektorit ovat pääasiassa olleet retro- tai adenoviruspohjaisia, mutta myös AAV- (adeno associated virus), herpes simplex-, rokko- ja alfaviruspohjaisia kuljettimia on onnistuneesti käytetty monissa tutkimuksissa (Daniel ym. 2009; Chiang ym. 2010; Bainbridge ym. 2006)

(www.genetherapynet.com/clinical-trials.html). Verkkokalvon geeniterapiatutkimuksissa ylivoimaisesti tutkituimpia ja käytetyimpiä viruksia ovat AAV- ja lentiviruspohjaiset rekombinanttiviruset (Georgiadis 2009). Adeno- ja retrovirusten käyttöä on tutkittu vähemmän.

Adeno-associated virus, AAV

Adeno-associated virus (AAV) on parvovirusten sukuun kuuluva virus, joka kykenee infektoimaan jakautuvia ja jakautumattomia soluja. Lisääntyäkseen virus tarvitsee kohdesoluun infektoituvan auttajaviruksen (adeno-, herpesvirus). Tumassa viraalinen AAV-genomi pysyy episomaalisena, mutta kykenee integroitumaan pienellä frekvenssillä kohdesolun kromosomiin 19 (McCarty ym. 2004).

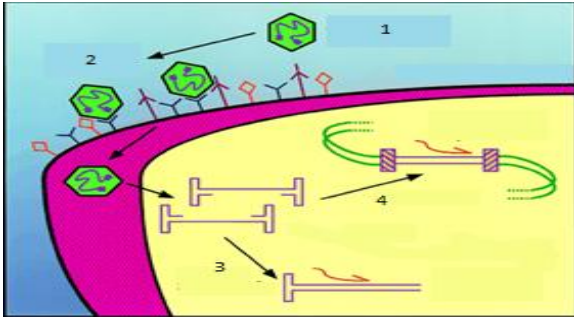


Kuva 6. AAV-virionin ja AAV-genomin rakenne. AAV-virioni muodostuu yksijuosteisesta DNA:sta, jota ympäröi kapsidi. AAV-genomi koostuu ITR-toistojaksoista, joiden välissä on Rep ja Cap lukukehykset. (Mukailtu kohteesta Inder 2005)

Kooltaan pienen virionin ~20-25 nm sisällä on lineaarinen yksijuosteinen DNA (ssDNA), jonka genomissa on kaksi avointa lukukehystä ORF (open reading frame); Rep ja Cap (kuva 6).

Rep ilmentää viruksen replikaatioon ja integraatioon tarvittavien proteiinien (40, 52, 68, 78) muodostumista ja Cap kapsidin proteiineja (VP1, VP2 ja VP3). Rep proteiini –mutaatiot vähentävät viruksen integroitumista kohdesolun genomiin (Kotin R.M ym. 1990; Mc Carty ym. 2004). Avointen lukukehysten molemmilla puolin on käänteiset toistojaksot (inverted

terminal repeat ITR), jotka vaikuttavat isäntäsolun genomiin integroitumiseen, viruksen replikoitumiseen ja kapsideihin pakkaukseen (Nash ym. 2008).



Kuva 7. AAV:n solukierto. AAV (1) siirtyy solun sisään reseptori-välitteisellä endosytoosilla (2). Virionin kapsidin sisältämä genomi lokalisoituu tumaan, jossa se luetaan mRNA:ksi episomaalisessa (3) tai integroituneessa muodossaan (4), auttajaviruksen (ei kuvassa) ja isäntäsolun translaatiokoneiston avustamana (Kuva mukailtu lähteestä Excoffon 2009).

AAV:n noin 4.7 kb kokoista genomia ympäröi kapsidi, jonka pinnalla olevat proteiinit sitoutuvat kohdesolukalvojen reseptoreihin. Viruksen serotyypin mukaan vaikutus kohdistuu spesifisesti eri solu- ja kudostyyppeihin. Toisistaan poikkeavia serotyyppejä on löydetty useita ja niiden määrä kasvaa vuosittain.

AAV2 (Adeno-associated virus –serotype 2) on yleisin kliinisissä tutkimuksissa olevista serotyypeistä, jonka ensisijaisena kohdereseptorina on hepariini sulfaatti-reseptorit (Summerfold ym. 1998). Muita tutkittuja kohdereseptoreja AAV:lle ovat laminiini-reseptori (serotyyppi 8; WU ym. 2006), n-linkattu galaktoosi-reseptori (serotyyppi 9; Shen ym. 2011) ja sialichappo-reseptori (serotyypit 1,4,5 ja 6; Kaludov ym. 2001). Reseptori-välitteisen endosytoosin jälkeen viruksen geneettinen materiaali lokalisoituu tumaan, jossa se pysyy latenttina ilman auttaja-viruksen mukanaoloa (kuva 7).

ITR –toistojakso muodostaa hiusneularakenteensa avulla replikaation aloituskohdan, jonka avulla kohdesolun ja auttaja-viruksen koneistot sekä rep- proteiinit aloittavat AAV -genomin translaation. ITR –toistojaksot ovat ainoa viraalinen geneettinen materiaali, joka siirtyy rAAV- kuljettimeen.

AAV-vektoreiden valmistus tapahtuu pakkaussoluissa. Kuljettimeen liitetyn siirtogeenin on oltava alle 4kb:n kokoinen ja sijaita viraalisten ITR-toistojaksojen välissä (Chaum ja Hatton 2002). Geeninsiirtoihin valmistetut rekombinantit AAV-vektorit (rAAV) kykenevät transduktoimaan sekä jakautuvia että jakautumattomia soluja. AAV-kuljettimen siirtogeenin ilmentyminen tasaantuu kahdessa viikossa *in vivo* annostelun jälkeen (Xiao ym. 1996). Peruste viiveeseen on vielä epäselvää. Mahdollisia syitä tähän on kohdesolun sytoplasman liikenne, viruksen kapsidin avautuminen ja isäntäsolun koneiston välittävä ssDNA:n luenta dsDNA:ksi (Bush ym. 2008).

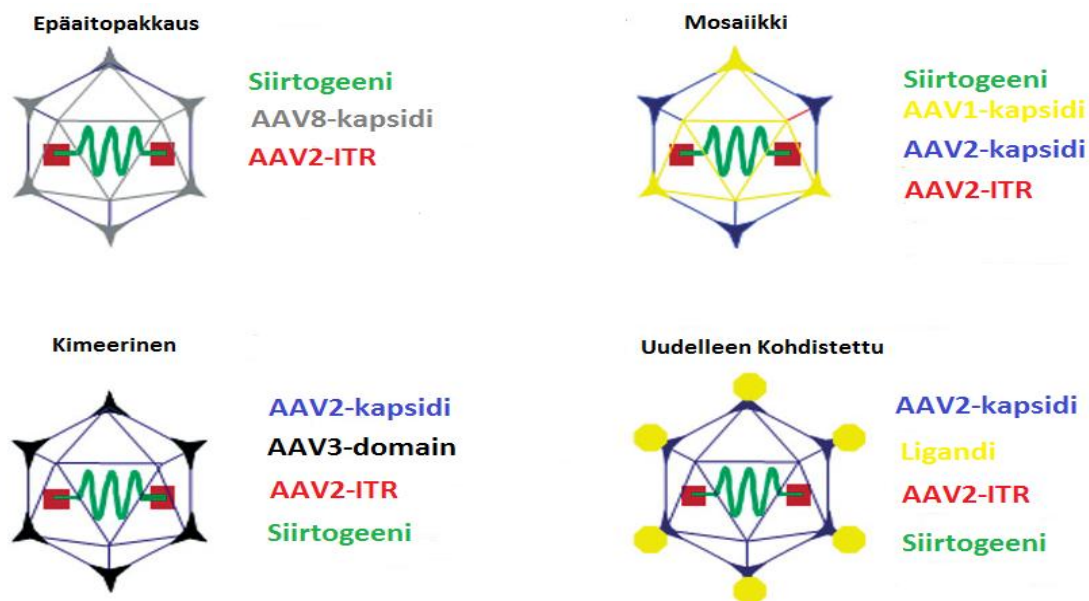
Siirtogeenin ilmentymistä on pyritty nopeuttamaan scAAV (self-complementary AAV) vektorilla, jossa yksijuosteinen DNA on komplementaarisenä dsDNA:na mutatoitujen ITR-toistojaksojen välissä (Nakai 2002; McCarty ym. 2001). Asetelman heikkoutena on insertin koon pieneneminen 2,2 kb. Kapsidin sisäisen kahden vektorin ja puolitettyjen vektoreiden (Trans-splicing vector) avulla on yritetty nostaa liittettävän insertin kokoa (Hirsch ym. 2010; Ghost ym. 2011). Insertin koolla on merkityksensä hoidettaessa sairauksia, jossa hoitovasteen aikaansaaminen edellyttää kooltaan suurempia terapeuttisia siirtogenejä (Allocca ym. 2008). Näiden menetelmien soveltuvuutta verkkokalvon geeniterapiaan on toistaiseksi tutkittu vähän joten ne vaativat vielä lisätutkimuksia (Reich ym. 2003).

AAV-vektoreiden tuotannollinen ongelma on rep ja auttaja -viruksen geenien sytotoksiset vaikutukset pakkaussolulle, minkä vuoksi kuljettimien määrät jäävät alhaisiksi (Wang ym. 2011). Tällä hetkellä ei ole vielä löydetty solulinjaa, jolla AAV-kuljettimia voitaisiin tuottaa tehokkaasti kliiniseen käyttöön (Wang ym. 2011).

Silmäsairauksien hoidossa rekombinantti AAV-kuljettimet ovat eniten käytettyjä, koska niiden on huomattu aiheuttavat muihin vektoreihin nähden vähäisen immunivasteen ja siirtogeenin ekspressiotaso on pitkä ja tasainen (Bennet ym. 2003). Vektorit aikaansaavat verkkokalvolla jopa vuosia kestävän tasaisen ilmentymisen *in vivo* (Bainbridge ym. 2003). AAV-kuljetin transduktoi serotyypistä riippuen laajakirjoisesti verkkokalvon eri solupopulaatioita, kuten gangliosoluja, fotoreseptoreita, Müllerinsoluja ja verkkokalvonpigmenttiepiteeli soluja (Bennet ym. 1999; Grant ym. 1997; Roy 2010). Soluspesifisyyteen vaikuttaa serotyypin lisäksi suuresti vektorin annostelureitti (Colella ym. 2009). Yhdistelemällä (pseudopacking) AAV-serotyypien genomeja eri AAV kapsideihin on saatu laajakirjoisempi joukko vektoreita,

joilla on sekä toisistaan eroava kinetiikka että siirtogeenin ekspressiotaso (Auricchio ym. 2003).

Rekombinantti AAV2/5 (AAV2 -genomi pakattuna AAV5 -kapsidiin) ja AAV2/2 on huomattu transduktoivan verkkokalvolla RPE-soluja ja fotoreseptoreita, kun taas AAV2/4 ja AAV4/4 –vektorit ilmentävät voimakkaimmin siirtogeeniä RPE-soluissa (Webber ym. 2003). Hiiren verkkokalvon AAV2/2-injektiolla vektorilla saadaan n. 6 viikossa tasainen siirtogeenin ekspressiotaso (Kostic 2003). AAV2/1-, AAV2/5- ja AAV5/5 -vektoreilla transduktoituilla hiiren verkkokalvon soluilla siirtogeenin ilmentymistä huomataan jo 3-4 päivää subretinaalisen injisoinnin jälkeen (Smith ym. 2005).

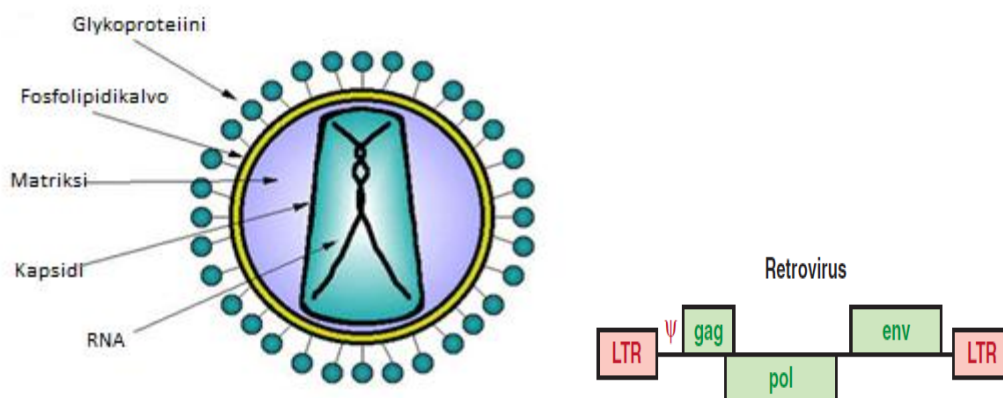


Kuva 8. Mosaiikki-, kimeriinen- ja uudelleen kohdistettu- AAV-vektori. Kuvassa vihreällä esitettyä siirtogeeni ja punaisella AAV2-ITR toistojaksot. Mosaiikki rAAV-vektorissa kapsidin geenit ovat useammasta AAV-serotyypistä (Wu Z 2006). Kimeerisessä AAV-vektorissa kapsidin proteiinit on ilmennetty eri AAV-serotyypin domainien vaihdolla (Bowles DE 2003). Uudelleen kohdistetussa AAV-vektorissa kapsidiin liitettyllä ligandilla voidaan vaikuttaa vektorin soluspesifisyyteen. (Kuva mukailtu kohteesta Loiler ym. 2003)

Retrovirus

Retrovirukset (*Retroviridae*) kuuluvat ssRNA-RT –virusten ryhmään. Nimi *retro lat.* kuvastaa virusten kykyä muodostaa RNA genomista käänteiskopioijaentsyymien avulla koodin mukaista DNA–juostetta. Retrovirukset olivat ensimmäisiä viruksia, joista muokattiin viraalisia vektoreita terapeuttisiin tarkoituksiin (Millet ym. 1992). Retroviruksen genomissa on kolme virukselle tärkeää geeniä, gag, pol ja env, joita reunustaa pitkä terminaalijakso LTR (long terminal repeat) (Kuva 9).

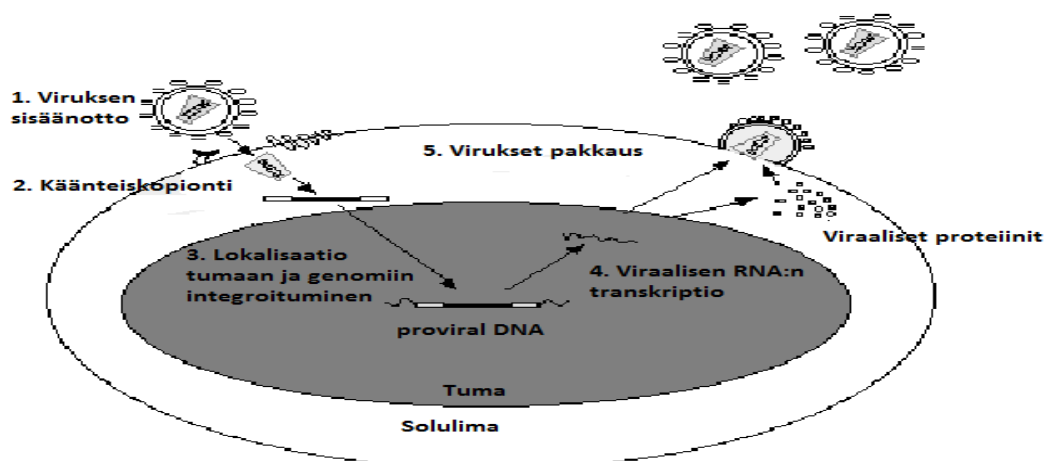
Retrovirukset voidaan jakaa koodittamiensa proteiinien mukaan yksinkertaisiin (alfa-, beta-, gamma- ja epsilonretrovirus) ja kompleksisiin (lenti-, spuma-, deltaretrovirus) retroviruksiin (Leis ym. 1998). Kompleksiset retrovirukset kykenevät infektoimaan sekä jakautuvia että jakautumattomia soluja (Lewis ja Emerman 1994).



Kuva 9. Retroviruksen genomi. Viruksen vektorissa oleva Gag –geeni ilmentää kapsidin ja nukleokapsidien proteiineja, ja pol käänteiskopioijaentsyymien, integraasin sekä proteaasin muodostumista. Viruksen kuoren glykoproteiinit, muodostuvat env–geenin ekspression myötä. Gamma ilmaisee pakkaussignaalia, jonka avulla solussa tunnistetaan virusperäiset proteiinit pakkausta varten (Mukailtu lähteestä Inder 2005).

Retrovirionin kahta ssRNA molekyyliä ympäröi kapsidi ja sen ulkopuolella oleva fosfolipidikalvo, joka on peräisin infektoidusta solusta (Kuva1) (Liu ym. 2010). Kohdesolun reseptoreihin sitoutuminen tapahtuu env-geenin tuottamien glykoproteiinien avulla (Johnson ym. 2011).

Viruksen soluun otto tapahtuu solumembraanien fuusioituessa, kun retroviruksen glykoproteiinit sitoutuvat kohdesolun reseptoreihin (Miller ym. 1996) (kuva 10). Käänteiskopioijaentsyymien vaikutuksesta viruksen ssRNA – genomi luetaan kaksijuosteiseksi proviral DNA:ksi ja preinteraktiokompleksi lokalisoituu tumaan. Tumassa integriini – proteiinin avustuksella viruksen genomi integroituu isäntä solun genomiin ja viruksen geenien luenta proteiineiksi tapahtuu samaan tapaan kuin kohdesolun omien.

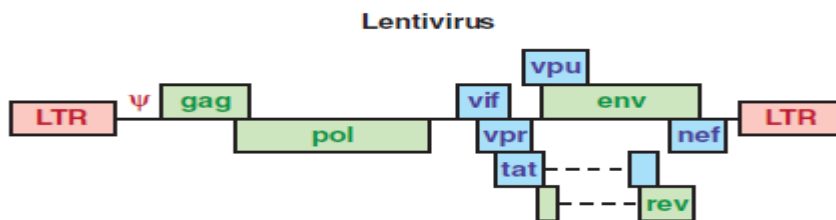


Kuva 10. Retroviruksen solukierto.

Retrovirusvektoreiden ongelmana on ollut insertiomutageneesin mahdollisuus. Tämän ongelman ratkaisemiseksi on suunniteltu ei-integroivia lentiviruksia; NIL (non-integrating lentiviral), jossa integriiniä koodittana alue pol tai LRT –terminaalijakso on mutatoitunut (Apolonia ym. 2007).

Lentivirus

Retrovirusten ryhmään kuuluvien lentivirusten genomissa on gag, pol ja env avointen lukukehysten lisäksi kolmesta kuuteen viraalista proteiinia koodittavaa geeniä, jotka ovat osallisena viruksen replikaatiossa ja kohdesolun infektoimisessa (kuva 11).



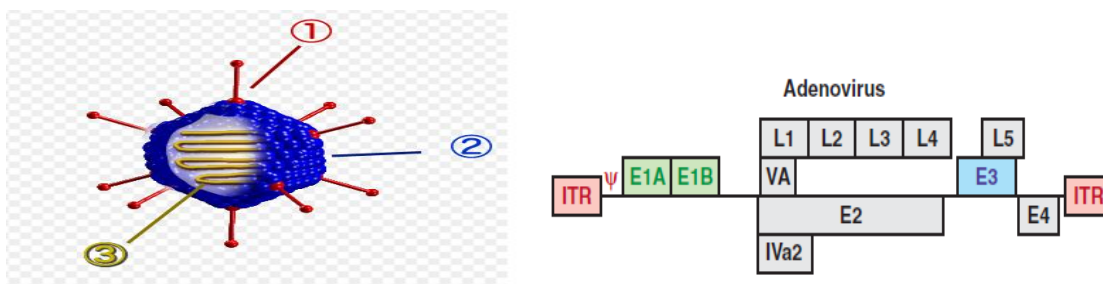
Kuva 11. Lentiviruksen genomi. Kaksi proteiinia koodittavaa aluetta; tat ja rev ilmentyvät kaikissa lentiviruksissa. Nämä osallistuvat transkriptioon ja viraalisen RNA:n tumasta poistamiseen (Mukaiilu lähteestä Inder 2005).

Retrovirusten ryhmään kuuluvista geenin kuljettimista lentivirusten genomiin pohjautuvat ovat yleisimpiä. Lentivirukset voidaan jakaa kahteen erilliseen ryhmään; kädellisistä (human immunodeficiency virus HIV-, simian immunodeficiency virus SIV) ja ei-kädellisistä (equine infectious anaemia virus EIAV, bovine immunodeficiency virus BIV) peräisin oleviin lentiviruksiin (Naldini ym. 1996).

Lentivirusvektorit tarjoavat hyvän mahdollisuuden hoitaa sairauksia, joissa tarvitaan integroituvan siirtogeeniin pitkää ilmentymistä. Subretinaali-injektiossa rekombinantti lentivirukset transdukoivat pääsääntöisesti RPE-soluja tehokkaasti ja spesifisesti ilmentäen siirtogeeniä vektorista riippuen 16 - 24 kuukautta (Ideka ym. 2003; Lotery ym. 2002; Cheng ym. 2002). Intravitreaalisesti annosteltaessa tehokkuus kärsii (Loewen ym. 2003).

Adenovirus

Adenovirukset ovat adenoviridae-heimoon kuuluvia viruksia, jotka infektoivat jakautuvia ja jakautumattomia soluja. Niiden erilaisia serotyyppejä tunnetaan yli 50. Ne ovat kooltaan 70-100 nm ja sisältävät kapselinsa sisäpuolella kaksijuosteisen lineaarisen ~36 kb kokoisen DNA molekyylin (Davison ym. 2003). Viruksen kapseli koostuu heksoosi-proteiinien muodostamasta kuoresta, johon on yhdistettynä penton kapsomeerejä (kuva 12).



Kuva 12. Adenovirioni virioni ja adenoviruksen genomi (Mukailtu lähteestä Inder 2005).

Adenoviruksen genomista voi jaotella geenit replikaation mukaan; varhaisiin (E1A, E1B E2, E3, E4)ja myöhempisiin (IX, Iva2) geeneihin. IX jaetaan viiteen eri osaan (L1-L5), jotka kaikki ilmentävät eri lähetti-RNA:ta. Lukukehykset E1,E2 ja E4 ilmentävät replikaatioon tarvittavia proteiineja, kuten viraalista polymeraasia. E3 alueen proteiinit osallistuvat immunovasteen estämiseen eivätkä vaikuta infektiotehokkuuteen (Betty ym. 1994 ; World ym. 1991).

Virusen soluunotto tapahtuu spesifisten kohdesolun CAR (coxsackievirus adenovirus reseptor) solukalvoreseptoreiden kautta, johon viruksen penton kapsomeerit sitoutuvat (Bergelson ym. 1997). Adenoviruksen genomi sisältää useita avoimia lukukehyksiä ja vaihtoehtoisen silmukoinnin avulla virus ilmentää noin 50:ntä eri proteiinia (Yeh ym. 1997). Adenoviruksen perimä ei integroidu kohdesolun genomiin vaan pysyy tumassa episomaalisessa muodossaan (Hillgenberg ym. 2001).

Adenovirusvektorit ilmentävät siirtogeeniä tasaisesti 1-2 viikkoa. Vektoreiden suunnittelussa genomista on poistettu E1 ja E3 alueet. Myös muiden lukukehysten poistamista on tutkittu,

kuten sisällöttömän ('guttet') viruksen mahdollisuuksia geenikuljettimena (Volpers ym. 2004). Suurimpana ongelmana on adenovirusvektoreiden annostelun myötä aktivoitua immuunivaste (Bessis ym. 2004). CTL-immuunivaste (cytotoxic T lymphocyte) heikentää huomattavasti kohdesolussa tapahtuvaa siirtogeenien ilmentymistä (McConnel ym. 2004; Chaum ja Hutton 2002). Tutkimusten mukaan adenovektoreilla voidaan infektoida monentyypisiä verkkokalvon soluja, mutta niiden käyttö verkkokalvon geeniterapiassa on vähäistä (Jomary ym. 1994; Li ym. 1994; Bennet ym. 1994).

2.2.2 Ei-viraalinen geeniterapia

Ei-viraalinen geeniterapia pohjautuu kemiallisiin ja fysikaalisiin menetelmiin, joilla voidaan siirtää haluttu nukleiinihappomolekyylit kohdesoluihin.

Kemiallisissa menetelmissä geenin ekspressiokasetti liitetään plasmidiin, joka pakataan positiivisesti varautuneen liposomin tai synteettisesti valmistetun rakenteen sisään, jolloin geeniaines siirtyy soluun fako-, pino- tai endosytoosilla.

Kationiset lipidit ja polymeerit ovat käytetyimpiä nonviraalisia geeninsiirtomenetelmiä. Kationiset lipidit, kuten liposomit rakentuvat hydrofiilisestä ja hydrofobisesta osasta, jonka sisälle geneettinen aines pakataan (Felgner 1987). Transfektiotehokkuuteen vaikuttavat kationisten lipidien kuoren rakenne sekä DNA-lipidi-kompleksin nettovaraus (Wasungu 2006). Kationiset polymeerit muodostavat kationisten lipidien tapaan kompleksirakenteen nukleiinihappojen kanssa, mutta ne ovat kooltaan pienempiä. Kationisten polymeerien transfektiotehokkuuteen vaikuttavat polymeerin molekyylipaino, muoto ja kompleksin nettovaraus (Fisher ym. 1999). Tehokkuuteen vaikuttaa myös kationisten lipidien ja polymeerien joutuminen solujen lysosomaattiseen kiertoon (Friend 1996). Liposomipohjaisia geenikuljettimia on tutkittu paljon silmätautien terapeuttisiin tarkoituksiin, mutta ristiriitaisin tuloksin (Naik ym. 2009).

Nanopartikkelit ovat uusi tieteenala, jossa alle 1 µm:n kokosiin partikkeleihin saadaan pakattua haluttu nukleiinihappomolekyylit. Nanopartikkeleiden etuna on, että ne pienen

kokonsa puolesta läpäisevät paremmin elimistön läpäisevyysesteitä, eivätkä kulkeudu lysosomaaliseen hajotukseen (Cai ym. 2007).

Paljaan DNA-molekyylin injektoiminen kohdekudokseen on vanhimpia **fysikaalisia geeninsiirtomenetelmiä** (Wolff ym. 1990). Menetelmä on kuitenkin transfektiotehokkuudeltaan heikko, joten rinnalle on kehitetty muita menetelmiä parantamaan siirtogeenin kulkeutumista kohteeseen.

Geenipyssy –menetelmässä (GeneGun) volframista, hopeasta tai kullasta valmistetut partikkelit päällystetään DNA:lla, ja `ammutaan` kohdesoluun/-kudokseen korkean paineen avulla. Menetelmän tehokkuuteen vaikuttavat partikkelin koko, määrä ja annosteltavan kaasun paine (Uchida ym. 2002).

Elektro- ja soniporaatioissa sähkön tai äänen avulla pyritään muodostamaan aukkoja kohdesolun plasmamembraaneihin, joiden kautta nukleiinihapot siirtyvät soluun (Trezise ym. 2003; Kim ym. 1996). Kyseisten menetelmien transfektiotehokkuudet ovat kuitenkin huonot ja lisäksi ne ovat osaltaan soluille tappavia.

Nonviraalisissa verkkokalvon geeniterapia tutkimuksissa pDNA:n transfektiotehokkuutta on pystytty parantamaan elektroporaation avulla subretinaalisen injektion jälkeen (Ishikawa ym. 2005). Elektroporaation avustamana on kyetty transfektoimaan Müllerinsoluja, bibolaarisoluja sekä fotoreseptoreita, joissa siirtogeenin ilmentyminen on kestänyt 50 päivää (Matsuda ym. 2004). Paljas pDNA transfektoi huonosti verkkokalvon soluja kun annostelumenetelmä on intravitreaalinen tai subretinaalinen injektio (Dezawa ym. 2002; Andrieu-Soler ym. 2006a,b).

2.3 Verkkokalvon geeniterapia

Tällä hetkellä tiedetään yli 200 verkkokalvosairauteen liittyvää genomialuetta ja 160 silmäsairauteen liittyvää geeniä (Retinal Information Networks: <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/> 02.10.2012 16:07) Tutkimusten mukaan yhden geenivirheen aiheuttamasta verkkokalvon rappeutumisesta kärsii joka kolmestuhannes ihminen ja sairastuneiden määrä kasvaa vuosittain (Bessant ym. 2001).

Verkkokalvosairaudet ovat moninainen joukko perittyjä ja hankittuja sairauksia. Monet tekijät, kuten verkkokalvon uudisverisuonten muodostuminen ja geenivirheet rappeuttavat verkkokalvon soluja ja aiheuttavat asteittaisen näkökyvyn heikkenemisen. Geeniterapialla pyritään löytämään hoitomuotoja verkkokalvon sairauksiin, joihin ei tällä hetkellä ole tehokasta hoitoa saatavilla.

Suonikalvon ja verkkokalvon uudisverisuonitus kuuluu oleellisesti keskosten verkkokalvosairauden ROP (retinopathy of prematurity; The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity 1984), diabeettisen retinopatian DR (Diabetic retinopathy; Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2003) ja verkkokalvon ikärappeuman AMD (age-related macular degeneration; Jong 2006) kostean muodon taudinkuvaan. Verisuonikasvutekijät VEGF- α ja VEGF- β (vascular endothelial growth factor ja PEDF (pigment epithelium-derived factor), ovat osallisena uudisverisuonten muodostumisessa. Vaikuttamalla kyseisten proteiinien ilmentymisiin on pystytty hillitsemään verkkokalvon uudisverisuonten kasvua ja kehitystä (Allocca ym. 2006).

Liukoinen VEGF reseptori (sFLT-1), PEDF, angiostatiini, endostatiini ja TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) ovat tutkittuja anti-angiogenisiä molekyyliä, joilla on havaittu olevan terapeuttisia vaikutuksia silmäsairauksissa (Kendall ym. 1993; Bainbridge ym. 2003). Adenovirusvälitteinen PEDF- geenin siirto hiiren silmään vähensi uudisverisuonten muodostusta (Saishin 2005; Edward 2007; Mori 2001; Gehlbach 2003). Myös rAAV-vektoreiden on todettu vähentävän verisuonten muodostumista sekä subretinaalisen että intravitreaalisenkin annostelujen jälkeen (Mori 2002; Auricchio 2002; Rakoczy 2003; Deng 2005; Lai 2005). Angiostatiinin ja endostatiinin ilmentyminen on estänyt uudisverisuonten muodostumista käyttämällä transduktiossa myös lentiviruspohjaisia (EIAV; equine infectious anaemia virus ja HIV-1; human immunodeficiency virus-1) virusvektoreita (Balaggan 2006; Igarashi 2003).

Jatkuvalla anti-angiogenisten molekyylien ilmentäminen voi vaikuttaa myös toksisesti silmään, joten ideaalin siirtogeeniekspression tulisi olla säädeltävissä (Saishin ym. 2005). Kuitenkin vaiheen 1 kliiniset kokeet osoittavat Ad.PEDF- ja AAV2-sFLT01 vektoreiden olevan

turvallisia käyttää ja antavan hyvän vasteen verkkokalvon kostean muodon tutkimuksissa (Campochiaro ym. 2006; Pechan ym. 2009).

Eniten verkkokalvon geeniterapiassa on edistytty näköreseptoreiden rappeutumisen estämisessä. Periferin (Prph2) on näköreseptorien ulkosegmentin glykoproteiini, jonka mutaatiot rappeuttavat soluja. Prph2-mutaatiota kantavien RD-hiirten näköreseptoreiden rakennetta ja toimintaa pystyttiin parantamaan AAV-vektori välitteisesti (Ali ym. 2000). Samalla sen on todettu parantavan aivojen yläkukkuloiden (superior coliculus) signaaliherkkyyttä (Schlichtenbrede ym. 2004). Kyseisellä hoidolla ei kuitenkaan voida parantaa sairautta pitkällä aikajaksolla (Schlichtenbrede ym. 2003).

Verkkokalvon näköreseptoreiden rappeutumista on ehkäisty myös lentivirusvälitteisen geeniterapian avulla, jossa rekombinantti HIV1-vektorilla on siirretty β PDE (cGMP fosfodiesterase β) geeni Rd- koe-eläinmallin verkkokalvon soluille (Takahashi ym. 1999). β PDE -geenivirheen on tutkittu johtavan näköreseptoreiden rappeutumiseen Prph2:den tavoin (Jomary ym. 1997).

Verkkokalvorappeuman (RP; retinis pigmentosa) taustalta löytyy useita geenivirheitä, joista yksi on Mertk (Hartong ym. 2006). Royal Collage Surgeons (RCS) rotat kantavat kyseistä mutaatiota, jonka seurauksena rottien RPE-solut ovat kykenemättömiä fakosytoimaan näköreseptoreiden ulkosegmenttejä. Rekombinantti AAV-, Ad- ja HIV1-Mertk vektoreilla on pystytty parantamaan RPE-solujen tehokkuutta ja vähentämään fotoreseptoreiden rappeutumisia 4, 9 ja 7 kuukauden seurantajaksojen aikana (Vollrath ym. 2001; Smith ym. 2003; Tschernutter ym. 2005).

Tappisolujen heikentyneestä tehosta johtuvaan akromatopsiaan on tällä hetkellä löydetty kolme tappisoluspesifistä geeniä, jotka vaikuttavat sairauden ilmenemiseen (Michaelides 2004). Yksi näistä on GNAT2geeni, joka vaikuttaa tappisolujen hyperpolarisaatioon. Rekombinantti AAV-välitteisesti siirretty GNAT2-geenin ilmeneminen paransi näkökykyä ja tappisolujen toimintaa (Alexander ym. 2007; Komaromy ym. 2008).

Stargardt tauti on yleisin lasten sokeuteen johtava silmäsairaus. Taudin kuvaan kuuluu verkkokalvon rappeutuminen yleisimmin ABCA4-geenimutaation seurauksena, jolloin proteiinin siirtämää retinoidia kasautuu RPE- ja näköreseptorisolujen väliin lipofuskiini-

kertymiksi (Molday ym. 2007). Abca-/- -hiirimallin avulla tehdyissä tutkimuksissa pystyttiin vähentämään syntyneitä kertymiä AAV- ja lentivirusvälitteisten geenisiirtojen avulla (Kong ym. 2008).

Leberin synnyinäinen amauroosi (LCA; Leber 1869) on resessiivisesti periytyvä silmäsairaus, joka vaikuttaa näköreseptoreiden sauva- ja tappisoluihin. Sairaus johtaa sokeuteen jo lapsuusiässä eikä siihen ole tehokasta hoitomuotoa tarjolla (Stone ym. 2007). Tällä hetkellä on löydetty 14 geeniä, jotka vaikuttavat joka toiseen tautitapauksista (den Hollander ym. 2006). Yksi sairauteen altistavista geneeistä on RPE65. RPE65-proteiini osallistuu verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen valosyklissä all-trans retinolin muuntamiseen 11-cis-muotoon (Marlhens ym. 1997). LCA potilaista 6%:a kärsii kyseisestä geenimutaatiosta (den Hollander ym. 2008).

Useissa tutkimuksissa *in vivo* näköreseptoreiden toiminta on parantunut AAV-RPE65 välitteisellä geeninsiirrolla (Jacobson ym. 2006; Le ym. 2007; Acland ym. 2005; Bemelmans 2006; Narfstrom ym. 2003; Pang ym. 2006; Dejneka ym. 2004). Kliiniset tutkimukset AAV2/2-välitteisellä geeninsiirrolla ovat osoittaneet hoitomuodon olevan suhteellisen tehokas ja turvallinen (Bainbridge ym. 2008; Maguire ym. 2008; Hauswirth ym. 2008). RPE65-geeniterapian tehokkuus on verrannollinen sairauden vaikeusasteeseen, jolloin nuoret potilaat saavat parhaan hoitovasteen. Terapiamuodon vaiheen 1 kliiniset tutkimukset jatkuvat edelleen (<http://clinicaltrials.gov/> 02.10.12 16:28).

2.4 Yhteenveto

Geeniterapia on sairauksien täsmähoitoa, jossa solun viallista genomialuetta korjataan taudin kannalta terapeuttisten nukleiinihappomolekyylien avulla. Hoitomuotona geeniterapiaa ei toistaiseksi juuri pystytä käyttämään, vaikka geenihoidojen mahdollisuuksia on tutkittu jo neljännesvuosisadan ajan. Hidas kehitys on osaltaan johtunut sairauksien taustojen ymmärtämättömyydestä, mutta myös tehokkaiden ja turvallisten geenin siirtomenetelmien puutteellisuuksista. Kahdenkymmenen vuoden aikana geenien kuljettimet ovat parantuneet huomasti soluspesifisyyden ja immunogeenisyyden osalta. Tällä hetkellä meneillään olevat vaiheen II ja III kliiniset geenihoidotutkimukset pohjautuvat jo

1990-luvulla kehitettyihin kuljettimiin, joten geenilääkkeiden ja geeniterapian mahdollisuudet laajemmassa potilaskäytössä vaativat vielä aikaa.

Aitotumallinen solu on monimutkainen organismi, jonka ylläpito vaatii useiden molekyylien täsmällistä yhteistyötä ja tarkkaa säätelyä. Yksi geeniterapian ongelmakohtista onkin ollut siirtogeenien ilmentymisen puutteellinen säätely. Geenien säätelyn ja proteiinien tarkan toiminnan tunteminen on avain geenihoidojen onnistuvuudelle. Ilman tätä tietoa terapeutin annoksen suuruus ja hoidon vaste eivät kohtaa. Ongelmana geeniterapiassa on edelleen kuljettimien epäspesifisyys. Tehokkaat geeninsiirtokuljettimet kuljettavat terapeutin siirtogeenin sekä terveisiin että sairaisiin soluihin. Vaarana on myös, että kuljettimet saattavat integroida siirrettävän geenin perimään alueelle, joka voi olla solulle haitallinen. Turvallisinta olisi, jos genomialueesta pystyttäisiin tunnistamaan mahdollisimman turvalliset alueet, johon siirrettävät nukleiinihappomolekyylit pystyttäisiin liittämään. Tämä on toistaiseksi mahdotonta.

Vaikka silmä onkin ihanteellinen elin geeniterapiahoidoille pienen kokonsa ja hyvän sijaintinsa vuoksi, verkkokalvosairauksia ei pystytä täysin parantamaan tai edes taudinkulkua hidastamaan, jos hoitomuodot ovat puutteellisia. Geeniterapialla on saatu hyviä hoitotuloksia hoidettaessa yhden geenimutaation aiheuttamia perinnöllisiä sairauksia (Chiang ym. 2010). Hankittujen ja multigeenisten verkkokalvosairauksien hoitokokeiluja ei ole aloitettu, koska näiden sairauksien etiologiset taustat ovat vielä tuntemattomia.

Samalla kun kokeellinen solubiologian tutkimus kartuttaa tietouttamme solujen kemiasta, kehittyvät myös vaadittavat geeniterapian työvälineet. Tulevaisuus näyttää millainen terapiamuoto on toimivin verkkokalvo sairauksien hoitoon.

3. Tutkielman tavoitteet

Silmänpohjan ikärappeuma (age-related macular degeneration eli AMD) on merkittävin näkövammaisuutta aiheuttava silmäsairaus länsimaissa (Resnikoff ym. 2004). Arvion mukaan yli 50 miljoonaa ihmistä kärsii ikärappeuman aiheuttamista oireista ja näistä kolmannes on sokeita tai vakavasti näkövammaisia sairauden vuoksi (Gehrs ym. 2006). Suomessa on arviolta noin 100 000 ikärappeumaa sairastavaa potilasta, joka kattaa noin 40% koko väestön näkövammaisista (Näkövammarekisterin vuosikirja 2011). Pidentyneen eliniän myötä on oletettavaa, että potilaiden määrät tulevat kaksinkertaistumaan seuraavan kahdenkymmenen vuoden aikana (Rein ym. 2009).

Ikärappeuma heikentää lähi- ja kaukonäköä. Se on heterogeeninen sairaus, joka muuttaa verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen, Bruchin membraanin sekä suonikalvon rakenteita ja toimintaa makulan alueella (Bressler ym. 1988; de Jong ym. 2006). Vaikkakin ikärappeuman synty on huonosti ymmärretty tiedetään, että keskeisiä tekijöitä ovat verkkokalvon krooninen oksidatiivinen stressikuormitus, RPE:n solunsisäiset ja -ulkoiset proteiinikertymät (lipofuskiinit ja drusenit), altistavat geenit, tulehdus sekä ympäristötekijät (Beatty ym. 2000; Gehrs ym. 2006).

Ikärappeuma jaetaan kuivaan ja kosteaan muotoon. Kosteasta muodosta kärsii 20 % potilaista ja siihen kuuluu tyypillisesti suonikalvon uudisverisuonitusta ja siitä seuraavaa mahdollista verenvuotoa, verkkokalvon irtoamista ja surkastumista (Chakravarthy ym. 2010). Kosteaa muodon etenemistä on mahdollista hidastaa verisuonien muodostumista inhiboivilla lääkeaineilla, mutta verkkokalvolla jo tapahtuneita muutoksia ei voida parantaa (Palosaari ym. 2008). Sairauden kuivaa muotoa sairastaa 80% ikärappeumapotilaista. Solujen sisä- ja ulkopuolelle muodostuvat proteiiniaggregaatit ovat tunnusomaisia piirteitä tälle muodolle (Anderson ym. 2004). Kuiva muoto etenee yleensä hitaasti. Haitallisten muutosten vaikutuksesta makula ohenee ja aistinsolut menettävät toimintansa. Koska varsinaiset syyt ovat vielä epäselviä, kuivaan ikärappeumaan ei tällä hetkellä ole olemassa parantavaa lääketieteellistä hoitoa.

Verkkokalvon pigmenttiepiteelisolut ovat keskeisessä asemassa ikärappeuman kehityksessä. RPE-solut sijaitsevat verkkokalvolla valoa aistivien näköreseptorisolujen

(fotoreseptorit) ja suonikalvon välissä. Ne huolehtivat fotoreseptoreiden elävyyden säilymisestä ylläpitämällä oikeaa ionitasapainoa, fagosytoimalla valoastinsolujen jatkuvasti uusiutuvia kärkiosia ja kalvopusseja sekä välittävät ravintotekijöitä ja happea suonikalvostosta niitä ympäröiville soluille (Beatty ym. 2000). RPE-solujen ulkoisten (jatkuva valoaltistus, ympäristötekijät, tupakointi) ja sisäisten tekijöiden (fagosytoosi, normaali aineenvaihdunta, voimakas verenvirtaus) aiheuttamat vauriot altistavat solut oksidatiiviselle stressille, mikä heikentää solujen normaalia toimintaa (Lakshmi ym. 2009, Gehrs ym. 2006). Ikään liittyvä epätasapaino heikentyneen oksidatiivisten puolustusmekanismien ja lisääntyneen oksidatiivisen stressin muodostumisen välillä johtaa RPE-solujen toiminnan heikkenemiseen, valoastinsolujen tuhoon ja lopulta näön menetykseen (Chakravarthy ym. 2010). Tiedetään, että tehokas proteiiniaggregaattien puhdistus on edellytys RPE-solujen hyvinvoinnille (Brunk ym. 2002).

Verkkokalvon soluille aiheutuvan stressikuormituksen seurauksena lämpöshokki- eli stressigeenien induktio lisääntyy (Douglas ym. 2009). Lämpöshokkiproteiinit (Heat Shock Protein; Hsp) ehkäisevät ja korjaavat stressin aiheuttamia vaurioita, kontrolloivat solun proteiiniliikennettä ja ohjaavat vaurioituneita proteiineja proteolyyttiseen hajoitukseen (Benjamin ja McMillan 1998). Hsp70 on yksi lämpöshokkiproteiineista, jolla tutkimusten mukaan on oksidatiivista stressiä ehkäisevä rooli verkkokalvon soluissa (Park 2007; Bailey 2004).

Tässä tutkimuksessa viraalisella geeninsiirtovektorilla siirrettiin hHsp70-proteiinia koodittava geeni hiiren verkkokalvon RPE-soluihin *in vivo*. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää voiko ylimäärä hHsp70-proteiinia estää ja/tai vähentää RPE-soluihin kohdistuvan oksidatiivisen stressin haittavaikutuksia.

4. Materiaalit ja menetelmät

4.1 Vektorin valmistus ja virusten tuotto

Rekombinantti AAV2/2 virukset valmistettiin Lontoossa (UCL Institute of Ophthalmology, Lontoo, Iso-Britannia) Zhang ym., 1999 julkaisemalla menetelmällä. Tuotantoprosessi on lyhyesti seuraava. Rekombinanttivirustuotannossa käytettävät BHK-solut (baby hamster kidney) tansfektoidaan non-viraalisesti liposomikomplekseilla. Kompleksit muodostuvat liuoksessa, joka sisältää lipofektiiniä (Lipofectin), integriiniin liittyvää peptidiä (an integrin-targeting peptide) ja kahta pDNA:ta. Plasmidi DNA pHAV7.3 (AAV helper plasmid), sisältää geenit *rep* ja *cap*, joita tarvitaan mm. viraalisen genomien monistamiseen ja AAV:n vaippaproteiinien koodaamiseen. Toinen pDNA (vector plasmid) sisältää transgeenikasetin, johon haluamamme fuusiogeeni (hHSP70-eGFP) on kloonattu ITR jaksojen (inverted repeat sequences) väliin. ITR-elementit ovat välttämättömiä rekombinanttigeenin monistumisessa ja pakkaamisessa. Muutaman tunnin inkubaation jälkeen solut infektoidaan auttajaviruksella DISC-HSV-1 (disabled infectious single-cycle herpes virus), jota tarvitaan auttajaplasmidin monistamisessa ja siten *rep*- ja *cap*-proteiinien ilmenemisessä sekä rAAV2/2:n pakkaamisessa. Parin päivän inkubaation jälkeen solut kerätään, sentrifugoidaan ja llyysataan, jolloin solujen tuottamat rekombinanttivirukset vapautuivat soluista. AAV2/2-virukset puhdistetaan hepariinipylväissä ja konsentroidaan sekä pestiään Centricon pylväissä. Valmiit virukset säilytetään -80 °C:ssa. Puhdistettujen vektoreiden konsentraatiot määritetään infektoimalla 293T-soluja eri viruskonsentraatioilla (lineaarinen laimennussarja) tai dot-blot menetelmällä.

4.2 Soluviljely ja käsittelyt

Tutkimuksissa käytettiin ARPE-19 soluja (human adult retinal pigment epithelial cell line). Solut kasvatettiin soluinkubaattorissa (10 % CO₂, 37 °C). Solujen kasvatusliuoksena oli Dulbeccon MEM/Nut Mix F-12, Life Technologies, Invitrogen, GIBCO®, Paisley, UK), johon oli lisätty 10 % naudan sikiön seerumia (FBS; foetus bovine serum) (Thermo Scientific, Hyclone,

Logan, UT, USA) , 100 u/ml penisiliiniä, 100 µg/ml streptomysiiniä (Cambrex, Lonza, Basel, Switzerland) ja 2 mM L-glutamiiniä (Life Technologies, Lonca). Solut jaettiin keskimäärin neljän päivän välein ja medium vaihdettiin kerran viikossa. Käsittely aloitettiin, kun solut täyttivät kasvatusmaljasta 70 % .

ARPE-19 SOLUJEN TRANSDUKTOINTI Viraalisen vektorin toimivuuden testaamiseksi ARPE-19 solut transdukoitiin AAV2/2-viiruksilla. Soluja kasvatettiin 6-kuoppalevyllä kaksi päivää. Soluille vaihdettiin tuore medium ja rekombinanttiviruksia pipetoitiin 4 µl/kuoppa. 48 tunnin inkubaation (37 °C) jälkeen, soluja viritettiin 488 nm:n allonpituksella valolla ja eGFP proteiinin lähettämä fluoresenssi analysoitiin Olympus AX70 mikroskoopilla (Olympus Optical, Tokyo, Japan).

4.3 Western Blotting

Western blotting -menetelmällä tutkittiin siirtogeenien ilmentymistä. Käsitellyt solut raaputettiin lysispuskuriin M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific) ja solut sentrifugoitiin pohjaan (13700 g, 10 min, 4 °C). Supernatantin proteiinipitoisuus määritettiin Bradford -menetelmää käyttäen (Bradford 1976, Marshall, Williams 1992, Zor, Selingen 1996), missä Coomassie Brilliant Blue -väriaineen sitoutuminen proteiiniin muuttaa väriaineen absorbanssimaksimia 465nm:stä 595nm:n. Absorbanssin muutos 595nm:ssä määritetään spektrofotometrisesti.

Proteiiniuutteiden (25 µg/näyte) erotteluajo suoritettiin 10 %:n natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesin (SDS-PAGE) läpi, ja vyöhykkeet siirrostettiin nitroselluloosakalvolle (GE Healthcare, Chalfont St Giles, United Kingdom) märkä-blottaus (Bio-Rad, Kalifornia, USA) laitteistolla.

Näytteiden yhtäläiset proteiinipitoisuudet tarkistettiin Ponceau S -värjäystä käyttäen (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Nitroselluloosakalvoa inkuboitiin tunnin ajan huoneenlämmössä (5 % kuivattu rasvaton maito; 0,3 % Tween 20/1x PBS) epäspesifisten sitoutumisten estämiseksi, jonka jälkeen membraania huuhdeltiin pesuliuoksessa 3 x 5 minuuttia (0,3 % Tween 20/1x PBS). Primäärinen vasta-aine (Hsp70 1:1000; Cell Signaling #4873, USA) lisättiin ja kalvoa inkuboitiin yön yli. Kolme kertaa toistetun 5 minuutin PBS-0,3 % Tween 20 pesun jälkeen, kalvoa inkuboitiin sekundaarisilla vasta-aineilla (anti-rat 1:2000; Amersham Biosciences cat.NA935V, USA) huoneenlämmössä tunnin ajan. Vyöhykkeet kehitettiin kuviksi tehostetulla kemiluminenssi-menetelmällä (Pierce Rockford, Illinois, USA).

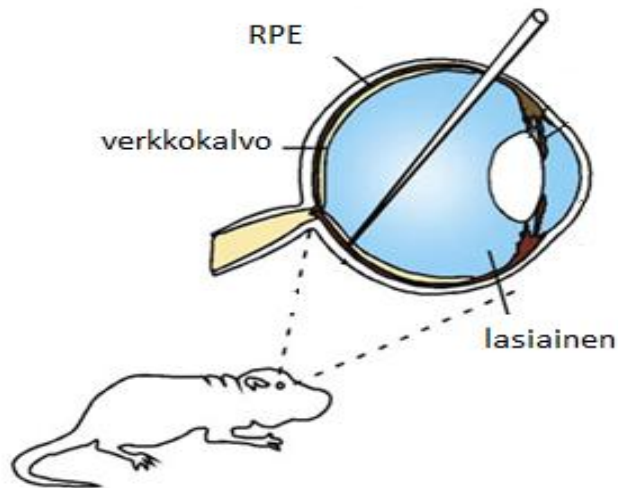
4.4 Eläimet

Tutkimuksissa käytettiin kolmen kuukauden ikäisiä Jaxc57bl/6j hiiriä (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). Hiiriä pidettiin kosteus- ja lämpösäädellyssä tilassa, jossa oli 12 tunnin valo/pimeäsykli. Hiiret olivat normaalidietillä.

4.5 Subretinaaliset injektiot

Hiiret punnittiin ja nukutettiin ketamiini-medetomidiniiluoksella (KETALAR® 3 osaa, DOMITOR® 1 osa). Silmäterät laajennettiin silmätipoin silmänpohjan näkyvyyden parantamiseksi (OFTAN® Tropikamidi 5mg/ml, Santen Oy Finland).

Hiiren toisen silmän verkkokalvon ja RPE solukerroksen väliseen tilaan injisoitiin sekä superiorisesti että interiorisesti 2 µl AAV2/2- virusta (kuva 13). Toiseen silmään injisoitiin vastaavasti superiorisesti että interiorisesti 2 µl 1xPBS puskuria.



Kuva 13. Subretinaalinen injektio. AAV2/2 virukset ja 1x PBS liuos injisoitiin hiiren silmän RPE solukerroksen ja verkkokalvon väliseen tilaan ohutta injektioneulaa käyttäen. (Mukailtu lähteestä Donovan 2007)

Injektioiden jälkeen, hiirten silmiin lisättiin topikaalisesti silmävoidetta (OFTAN® Chlora 10 mg/g, Santen Oy Finland) infektioiden estämiseksi. Medetomidiniin vasta-ainetta, (ANTISEDAN® Atipametsolihydrokloridi, Orion Oy Finland) käytettiin 0,01 mg/10 g välittömästi toimenpiteiden jälkeen ja hiiret asetettiin lämpöpeitteelle herämiseen saakka.

4.6 Sininen valo

Tutkimusten mukaan 405-460 nm:n sähkömagneettinen säteily saa aikaan patologisia muutoksia verkkokalvon soluissa. Muutosten voimakkuusaste ja vaikutusalueen koko riippuvat altistusajasta ja säteilyn intensiteetistä (Wu ym. 2006).

Lisäsimme verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen fototoksista kuormaa asettamalla C57Bl hiiret noin 400 nm:n aallonpituiseen valolähteen alle. Kontrollihiiret elivät saman ajan normaalivalossa. Tutkimukseen valitut aikapisteet olivat 2 vk, 1 kk, 2 kk, 3 kk, 4 kk.

4.7 Immunohistokemia

Hiiret lopetettiin yliannoksella ketamiini- medetomidiniliuosta (KETALAR® 3 osaa, Pfizer Oy Finland, DOMITOR® 1 osa, Orion Oy Finland) ja perfusoiitiin ensin kolmen minuutin ajan 0,7 % NaCl:lla, jonka jälkeen kudokset fiksattiin 3min 4 % PFA perfuusiolla. Silmät irrotettiin ja jälkifiksoitiin 4 % PFA-liuoksessa yön yli. Silmät pedattiin parafiiniin ja leikattiin mikrotomilla 5µm paksuiksi leikkeiksi objektilaseille.

Leikkeet deparaffinoitiin ksyleenissä ja rehydratoitiin laskevassa etanolisarjassa (100 %, 96 %, 70 %), jonka jälkeen ne huuhdottiin 0.05 M TBS-puskurissa (tris-buffered saline). Parafiinileikkeet tumavärjättiin DAPI-liuoksella (1:10000) (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), ja pedattiin Mowiol-liuoksella (Mowiol mounting solution, Calbiochem, USA). Näytteet analysoitiin fluoresenssimikroskoopilla (Olympus Optical, Tokyo, Japan) ja kuvattiin kameralla (Olympus Optical, Tokyo, Japan; (Viewfinder Lite 1.0, Pixera Corporation, San Jose, USA).

Sinisen valon aiheuttamia muutoksia verkkokalvolla tutkimme 4-HNE (4- hydroksinonenaali) ja Ubikitiini vasta-aineiden avulla.

Immunovärjäyksessä leikkeet pestiin 1xTBS:llä (2x2 min), jonka jälkeen leikkeet blokattiin epäspesifisten sitoutumisten estämiseksi kaupallisella liuoksella 30 min ajan (Invitrogen, Histostain Plus Broad Spectrum, Reagent A). Leikkeet pestiin (2 x 2 min 1xTBS) ja inkuboitiin primäärissä vasta-aineessa (yön yli +4 °C). Tämän jälkeen pesut uusittiin ja primäärinen vasta-aine lisättiin leikkeiden päälle (yön yli +4 °C) (taulukko 4). Ylimääräinen vasta-aine huuhdottiin leikkeiltä (1xTBS) ja inkuboitiin sekundärisellä vasta-aineella (3 h RT). Tämän jälkeen leikkeet tumavärjättiin.

Taulukko 4. Vasta-aine laimennokset immunohistokemiallisissa värjäyksissä.

Vasta-aine	Valmistaja	Laimennos
<i>rabbit anti-4-HNE</i>	<i>LifeSpan Biosciences, Inc. LS Bio</i>	<i>1/500</i>
<i>rabbit anti-Ubiquitin</i>	<i>Abcam (Ab7780)</i>	<i>1/500</i>
<i>Goat Alexa-Fluor 568 anti-rabbit IgG</i>	<i>Invitrogen (A11011)</i>	<i>1/500</i>

4.8 Western Blotting

Hiiret lopetettiin niskamurrolla, ja verkkokalvot siirrettiin välittömästi nestetyypeen. Verkkokalvot murskattiin T-PER-reagenssiin (Pierce Rockford, Illinois, USA). Kudossuspensio sentrifugoitiin ja (13700 g, 10 min, +4 °C) proteiinipitoisuudet mitattiin supernatantista Bradfordin menetelmällä (Bradford 1976, Marshall, Williams 1992, Zor, Selingen 1996). Menetelmä perustuu Coomassie Brilliant Blue G-250 -leimaan. Happamassa liuoksessa leiman (punainen liuos) absorbanssimaksimi muuttuu aallonpituudesta 465nm allonpituuteen 595 nm, kun leima sitoutuu proteiiniin (kompleksi sininen). Absorbanssi (595 nm) on suoraan verrannollinen liuoksen proteiinikonsentraatioon.

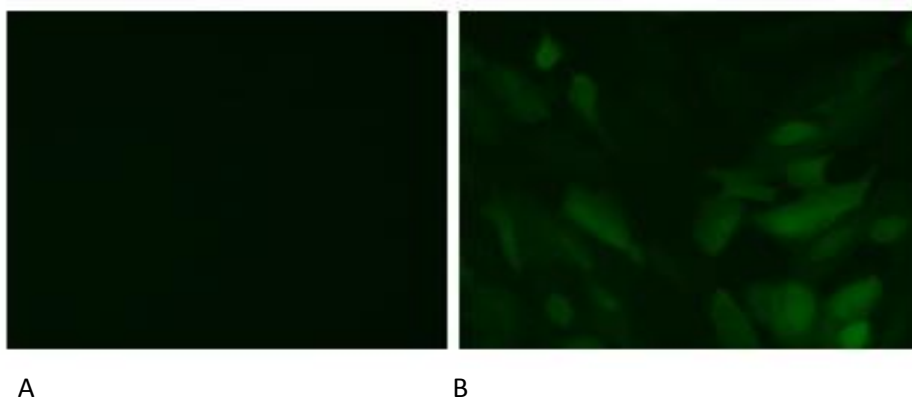
Nitroselluloosakalvon blokkaukseen sekä primääristen, että sekundääristen vasta-aineiden inkubaatiot suoritettiin edellä kuvatulla tavalla (s.34).

Proteiniälyhyökkeitä kalvolla kehitettiin näkyviksi kemiluminesenssilla (Pierce Rockford, Illinois, USA).

5 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

5.1 ARPE-19 solujen transduktio *in vitro*

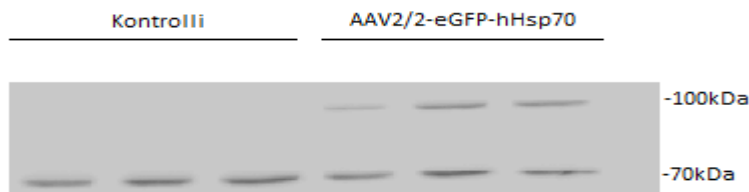
Rekombinantti AAV2/2-eGFP-hHsp70 virusten tiitterit olivat 1×10^{11} – 1×10^{12} viruspartikkelia/ml. Virusten transduktiotehokkuutta testattiin ARPE-19 soluilla *in vitro*. Transduktoidut solut tuottivat fuusioproteiinia, joka näkyi eGFP:n ansiosta vihreänä fluoresenssimikroskoopissa (Kuva 14). Transduktoimattomissa verrokkisoluisissa ei eGFP:tä havaittu.



Kuva 14. ARPE19 solujen transfektio rekombinanttiviruksilla AAV2/2-eGFP-hHsp70. A) käsittelemättömät solut (n = 3) B) transfektoidut solut (n = 3). Fuusioproteiini eGFP-hHsp70 näkyy vihreänä. Suurennus 200-kertainen.

5.1.1 Western blot

Western blot -menetelmällä tutkittiin ARPE19 –solujen tuottamien proteiinien hHSP70 ja hHsp70-eGFP ilmenemistä (Kuva 15). Kuvassa 2 kontrolli- ja viruskäsitellyt ARPE-19 solut kolmena rinnakkaisena ryhmänä.



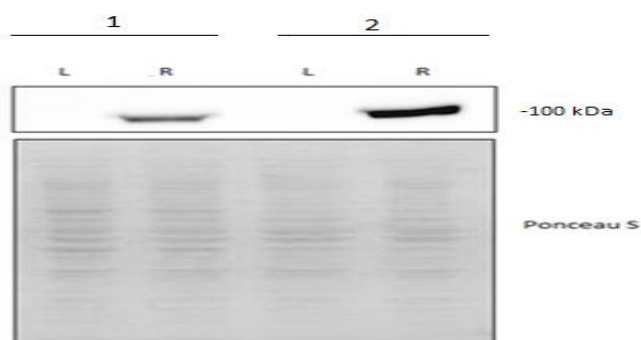
Kuva 15. AAV2/2-eGFP-hHsp70 transduktoitujen ARPE-19 solujen Western Blot- analyysi. ARPE-19 genomista peräisin olevat hHsp70 proteiinit näkyvät kuvassa molekyylipainonsa mukaisesti 70kDa kohdalla. Viruskäsittelyn seurauksena ilmentynyt fuusioproteiini eGFP-hHSP70 kuvassa 100kDa:n kohdalla.

5.2 Verkkokalvon injektiot *in vivo*

Verkkokalvon alaiset injektiot eivät aiheuttaneet silmätulehduksia eikä tutkimuksen aikana havaittu myöskään hiirten yleiskunnon heikkenemistä.

5.2.1 Western blot

Verkkokalvon alle injisoidun AAV2/2- viruksen sisältämän egfp-hHsp70 geenin ilmentymistä verkkokalvolla tutkimme Western blot- menetelmällä kahden hiiren silmistä. Kuvassa 16 anti-Hsp70 vasta-aineella inkuboitu nitroselluloosa kalvo.



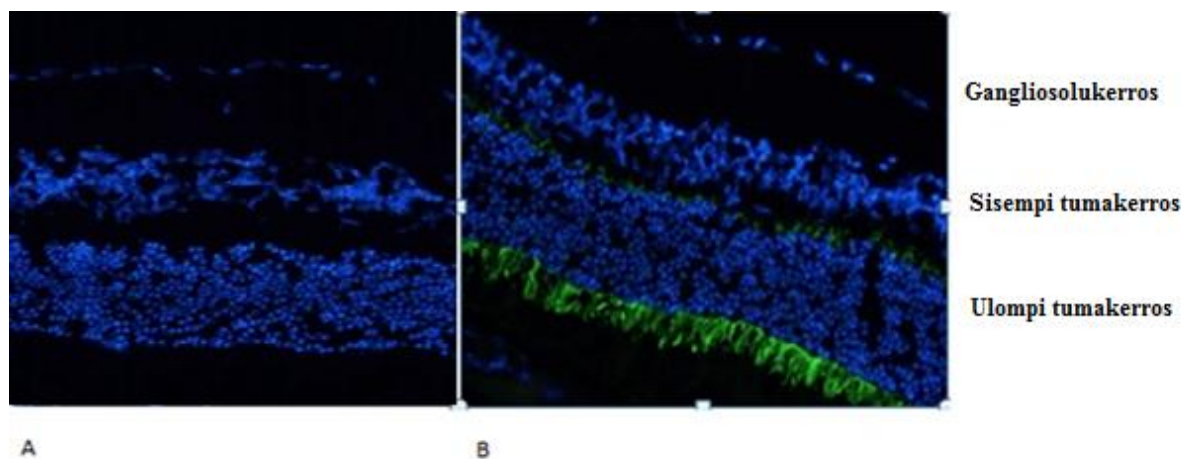
Kuva 16. Hsp70- proteiinin Western Blot- analyysi AAV2/2-eGFP-hHsp70 viruksella transduktoidusta verkkokalvolysaatista. Hiiret 1 ja 2. R = right eye, Injektoitu rekombinantvirusta L = left eye, injektoitu fosfaattipuskuria. Näytteiden yhtäläiset proteiinipitoisuudet tarkastettu Ponceau S- värjäyksellä.

Virusinjisoidun silmän (oikea silmä; R) eGFP-hHsp70-proteiinien signaali näkyy membraanilla tummana vyöhykkeenä, kun virusinjektiosta on kulunut neljä viikkoa. Kontrollisilmässä (L=left) fuusioproteiinia ei havaita. Kuvan 2 Hsp70-proteiinin signaali on peräisin AAV2/2 kuljettimen mukaan ilmennetystä eGFP-hHsp70-fuusioproteiinista, jonka molekyylipaino eroaa ~29 kDa hiiren (C57BL/6) genomissa sisällyttämän Hsp70- geenin tuottamasta lämpöshokkiproteiinista (ei kuvassa). Anti-Hsp70 vasta-aineen sitoutuminen osoittaa Hsp70-fuusioproteiinin kolmiulotteisen rakenteen säilyvän natiivin Hsp70- proteiinin kaltaisena. Tämä ei kuitenkaan kerro proteiinin toiminnallista tilaa.

Proteiinien intensiteettierot johtuvat mm. injisointien laadullisista vaihteluista. Verkkokalvon alaisissa injektioissa saattaa osa virusliuoksesta virrata takaisin injektiokohdasta, jolloin yhtäläisen injektioilavuuden saaminen näköreseptorien ja RPE-solukerroksen väliseen tilaan on hankalaa. Injektio saattaa myös osua osittain lasiaiseen. Yksilöiden väliset erot voivat osaltaan vaikuttaa myös fuusioproteiinin ilmenemiseen.

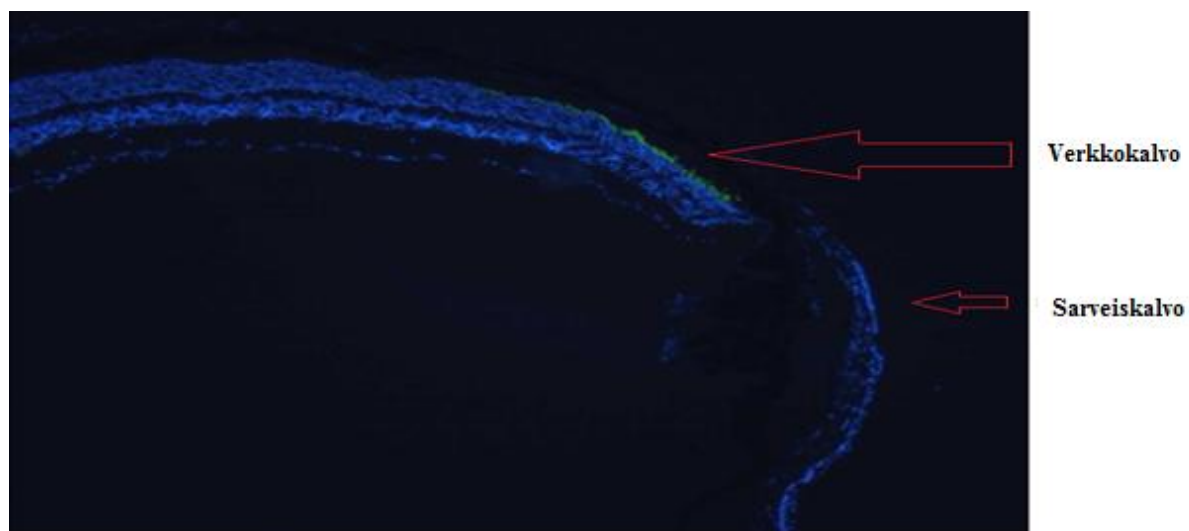
5.2.2 Immunohistokemia

Immunohistokemialla selvitettiin missä verkkokalvon solukerroksissa fuusioproteiinia ilmenee ja mitä vaikutusta sinisellä valolla on verkkokalvolla. Fuusioproteiinia eGFP-hHsp70 ilmeni verkkokalvon uloimmassa ja sisemmässä verkkomaisessa kerroksessa, uloimmassa ja sisemmässä tumakerroksessa, näköreseptoreissa ja verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluissa. Virus kykeni jossain määrin transduktoimaan myös verkkokalvon gangliosolukerroksen soluja (kuva 17).



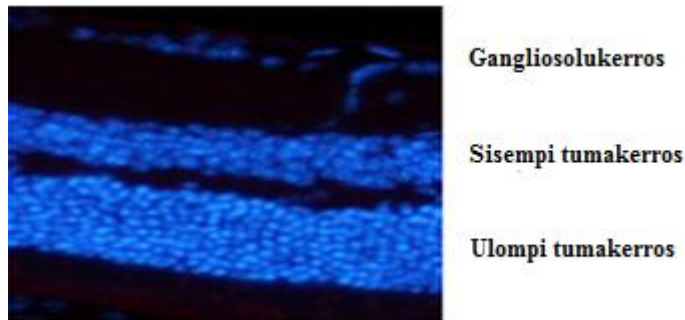
Kuva 17. Fuusioproteiinin eGFP-hHsp70 ilmeneminen verkkokalvolla. Kuva A) Fosfaattipuskurilla injektoitu verkkokalvo. Kuva B) rAAV2/2-eGFP-hHsp70 viruksella injektoitu verkkokalvo. Tumat näkyvät kuvissa sinisinä ja eGFP (eGFP-hHsp70) vihreänä. Suurennos 20-kertainen.

eGFP-proteiinin lähettämän valon intensiteetti ei ole verkkokalvolla tasaisena vyöhykkeenä, vaan signaali erottuu voimakkaimmin niillä verkkokalvon alueilla, mihin injisoitiin (kuva18). AAV2/2 virus ei ole soluspesifinen, mutta soveltuu hyvin RPE-solujen transduktioon.

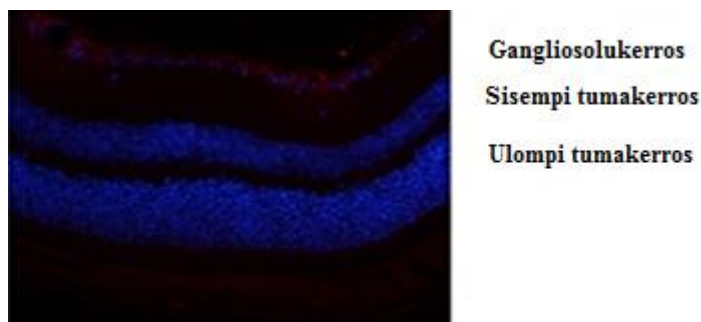


Kuva 18. Fuusioproteiinin eGFP-hHsp70 lokalisaatio verkkokalvolla. Kuvassa fuusioproteiini vihreänä ja tumat sinisinä. Suurennos 4-kertainen.

4-HNE molekyyli syntyy oksidatiivisen stressin metaboliatuotteena LDL-kolesterolista (Chen ym. 2006). Hiirten kuukauden pituinen altistus 400 nm:n valolle lisäsi 4-HNE:n määrää verkkokalvon gangliosolukerroksessa kontrollihiiriin verrattuna (kuva 19 ja kuva 20). Pidempi siniselle valolle altistuminen ei lisännyt 4-HNE -molekyylin ilmenemistä lyhyempiäaikaiseen altistukseen verrattuna.

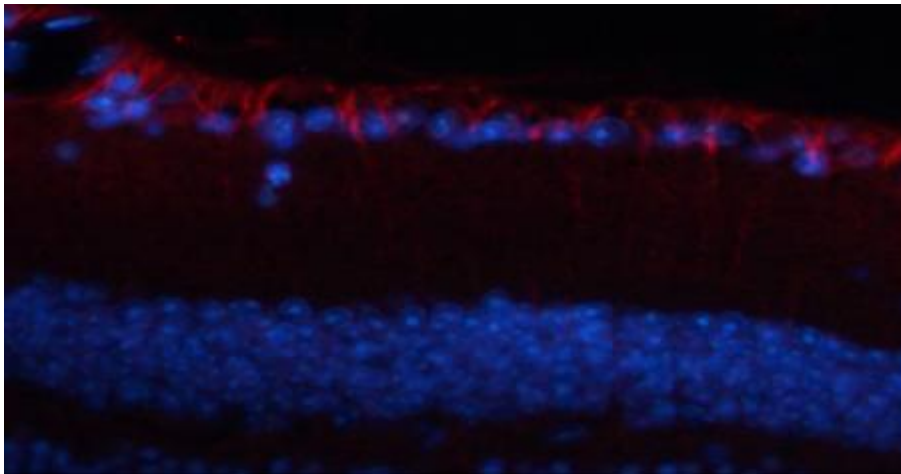


Kuva 19. 4-HNE molekyylin ilmeneminen kontrollihiiren verkkokalvolla. Kuvassa 4 viikon aikapiste. Tumat näkyvät kuvassa sinisenä. Suurennos 20-kertainen.



Kuva 20. 4-HNE molekyylin ilmeneminen verkkokalvolla. Kuvassa 4 viikon aikapiste. Tumat näkyvät kuvassa sinisenä ja 4-HNE molekyyli punaisena. Suurennos 20-kertainen.

Gangliosolukerroksen tukisoluissa; astrosyyteissä ja Müllerin solujen päätyjaloissa (müller cell end-feet) havaittiin selvästi lisääntynyt 4-HNE:n ilmeneminen (kuva 21). Muissa verkkokalvon solukerroksissa muutosta ei havaittu. HNE:n määrä oli vähäisempi verkkokalvon reuna-alueilla kuin foveassa.

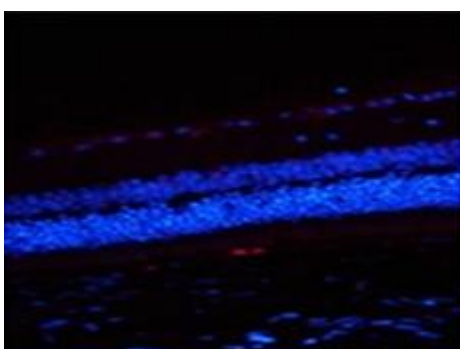


Gangliosolukerros

Kuva 21. 4-HNE molekyylin ilmeneminen verkkokalvon gangliosolukerroksessa. Kuvassa 4 viikon aikapiste. Tumat näkyvät kuvassa sinisenä ja 4-HNE molekyyli punaisena. Suurennos 40-kertainen.

Silmänpohjan ikärappeuman kuivassa muodossa solun sisään kasautuvan lipofuskiinin on katsottu liittyvän osaltaan heikentyneeseen proteiinihajotukseen RPE-soluissa (Shaban ym. 2002). Heikentyneen proteiinihajotuksen seurauksena syntyvien haitallisten agregaatien yhtenä rakenteellisena osana on ubikitiini molekyyli. Ubikitiini on säätelyproteiini, jonka yhtenä tehtävänä on ohjata proteiini proteosomaiseen hajotukseen.

Kontrolleihin verrattuna valoaltistus ei lisännyt merkittävästi RPE tai muiden verkkokalvon solujen ubikitiinimäärää (kuva 22). Kuvassa 22 näkyviä muutoksia voidaan pitää solujen normaalin metabolian aiheuttamina.



Gangliosolukerros

Sisempi tumakerros

Ulompi tumakerros

Verkkokalvon pigmenttiepiteeli

Kuva 22. Ubikitiinin ilmeneminen verkkokalvolla. Kuvassa 4 viikon aikapiste. Ubikitiini näkyy kuvassa punaisena ja tumat sinisenä. Suurennos 20-kertainen

6. POHDINTA

Silmänpohjan ikärappeuman kuiva muoto on hoitamattomana sokeuteen johtava sairaus, jonka syntymekanismit tunnetaan huonosti ja sairauden hoitomuodot ovat toistaiseksi puutteellisia. Tutkimusten mukaan merkittävin riskitekijä taudin synnylle on pitkään jatkuva oksidatiivinen stressitila verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluissa (RPE), mikä heikentää soluja suojaavien mekanismien toimintaa (Cai ym. 2000; Ambati ym. 2003). Tämän seurauksena lysosomaalinen toiminta hidastuu, ja solujen sisään muodostuu haitallisia proteiinikertymiä (Ryhänen ym. 2009).

Taudille tunnusomaisia piirteitä ovat RPE-solukerrokseen muodostuvat lipofuskiinikertymät ja solukerroksen alle kasautuvat drusenit (Kaarniranta ym. 2009). Nämä tarkan näön alueelle muodostuvat kuona-aineet heikentävät vähitellen verkkokalvon valoa aistivien solujen toimintaa (Gehrs ym. 2006). Druseneiden tarkkaa koostumusta ei tiedetä, mutta ne sisältävät esim. vitronektiiniä, klusteriiniä, seerumin albumiiniä, komplemmenttejä, amyloidia, krystalliinia, vimenttiiniä, apolipoproteiini E:tä ja immunoglobuliineja (D'souza ym. 2007). Lipofuskiineissa on mm. lipoproteiiniagregaatteja, kuten A2E-molekyylejä, joka auto-oksianttina vahvistaa RPE- solujen stressitilaa (Shaban ym. 2002). Tämän hetken tutkimusten mukaan proteiiniagregaatit ovat keskeisessä asemassa kuivan ikärappeuman synnyssä ja tarjoavat uuden kohteen hoitomuotojen kehitykseen.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli vähentää oksidatiivisen stressin aiheuttamia haitallisia muutoksia AAV2/2 –kuljettimella siirretyn terapeuttisen hHsp70- geenin avulla kokeellisessa stressimallissa *in vivo*. Hsp70 lämpöshokkiproteiini on tutkimusten mukaan osallisena oksidatiivisen stressin säätelyssä (Park 2007; Bailey 2004; Franklin ym. 2005). Ne osallistuvat proteiiniagregaatien muodostukseen ja autofagiseen hajotukseen RPE-soluissa *in vitro* (Ryhänen 2009 ja 2010). Silmänsairauksien hoidossa rekombinantti AAV-kuljettimet ovat eniten käytettyjä, koska niiden on huomattu aiheuttavat muihin vektoreihin nähden vähäisen immunivasteen ja siirtogeenin ekspressiotaso on pitkä ja tasainen (Bennet 2003). AAV2/2 on tällä hetkellä käytetyin AAV serotyyppi hiirille suoritetuissa verkkokalvon geenihoidoissa. Sen on huomattu transduktoivan tehokkaasti näköreseptori- ja RPE-soluja *in vivo* (Disculescu ym. 2005).

Oksidatiivisen stressi aiheutettiin hiiren verkkokalvolle sinisellä valolla (~400 nm) (Maeda ym. 2009; Mark ym. 2008; O`driscoll ym. 2008; Rohner ym. 2003; Sun ym. 2003; Yu ym. 2007). AMD-eläinmalleja *in vivo*, varsinkin kosteaan muotoon, on saatavilla useita (Ramkumar ym. 2010). Kuitenkin sairauden kuivaan muotoon ei ole toistaiseksi löydetty luotettavaa eläinmallia (Ulrich ym. 2009).

Kokeellisen stressimallin aiheuttamia haitallisia solumuutoksia tutkittiin 4-HNE ja ubikitiini vasta-aineiden avulla. Runsaasti lipidejä sisältävien näköreseptorisolujen ulkosegmenttien hapettuessa syntyy useita tuotteita, joista yksi on 4-HNE (Chen ym. 2006). Tämän molekyylin lisääntynyt pitoisuus soluissa on yhdistetty moniin sairauksiin kuten AMD:hen (Poli ym. 2008; Kopitz ym. 2004). Ubikitiini vasta-aineella tutkittiin kokeellisen valoaltistuksen vaikutusta ubikitiini-proteosomijärjestelmään. Ubikitiini –molekyyli on rakenteellisena osana RPE-solunsisäisissä proteiiniagregaatteissa (Kaarniranta ym. 2009).

Kokeellinen stressimalli ei aiheuttanut hiirten verkkokalvon RPE-soluille muutoksia, joiden kautta geeniterapian toimivuutta olisi pystynyt seuraamaan. Vasta-aineiden avulla havaitut muutokset kohdistuivat verkkokalvon sisempiin kerroksiin ja niiden tukisoluihin; astrosyytteihin ja Müllerinsoluihin. AMD:ssa pitkäaikainen oksidatiivinen stressi aiheuttaa vähitellen patologisia muutoksia verkkokalvolla. Kuitenkin tulokset osoittavat, että tutkimuksessa käytetty valon intensiteettitaso oli RPE-solumuutoksiin vaadittavalta teholtaan liian alhainen tai altistusaika liian lyhyt. Valon intensiteetin kasvattaminen olisi mahdollisesti lisännyt solukuolemaa, varsinkin verkkokalvon gangliosolukerroksessa ja muutokset verkkokalvolla olisivat syntyneet liian nopeasti ajatellen AMD:n synnyn patologiaa. Histologisissa värjäyksissä havaittiin selkeästi sarveiskalvon epiteelisolujen 4-HNE -määrän kasvua, joka kuvastaa energian absorboitumisen osaksi tähän solukerrokseen.

Verkkokalvon geeniterapiahoitossa fotoreseptorisolujen ja RPE-solujen väliseen tilaan injektoidut AAV2/2-eGFP-hHsp70 kuljettimet transduktoivat vaihtelevin määrin kaikkia verkkokalvon solukerroksia, joista vahvimmin näköreseptori- ja RPE-soluja. Transduktoitujen solujen lokalisaatiot ja määrät olivat luonnollisesti riippuvaisia injektion teknisen suorituksen onnistumisesta.

Tutkimuksen perusteella ei ollut mahdollista arvioida eGFP-hHSP70 fuusioproteiinin toimintaa eikä sen tehokkuutta RPE-soluissa. On mahdollista, että fuusioproteiini vaikuttaa

terapeuttisen hHsp70-proteiinin toimintaan ja terapiavasteeseen varsinkin *in vivo* tilanteissa. Toisaalta *in vitro* -tutkimuksissa ei ole kyseistä ilmiötä havaittu tämän fuusioproteiinin osalta (Ryhänen ym. 2009). Vihreää fluoresoivan merkkiaineen ei ole todettu olevan soluille haitallinen, mutta liiallinen ilmentäminen voi muuttaa solun sisäistä tasapainoa (Liu ym. 1999).

Tällä hetkellä pystytään hoitamaan verkkokalvon ikärappeuman kosteaa muotoa. Kuitenkin suurin osa ikärappeumapotilaista kärsii sairauden kuivasta muodosta, minkä vuoksi uusien hoitomuotojen kehittäminen on erittäin tärkeää. Uusimpien tutkimusten mukaan haitalliset solun sisäiset ja ulkoiset proteiiniagregaatit ovat keskeisessä asemassa kuivan muodon kehittämisessä. Iän ja eskaloituneen valoaltistuksen myötä RPE-solujen suojausmekanismit heikkenevät vähitellen, mikä johtaa näköreseptorisolujen asteittaiseen rappeutumiseen ja lopulta näkökyvyn heikkenemiseen.

Lämpöshokkiproteiineilla on tutkimusten mukaan solustressiä vähentävä rooli soluissa. *In vitro* -tutkimuksissa proteiinien on huomattu vähentävän haitallisten proteiiniagregaatien muodostumista. Terapeuttisten proteiinien ilmentäminen sairauden kannalta keskeisellä alueella luo uuden hoitokeinon moniin proteiinikertymäsairauksiin, kuten AMD:hen.

Tässä erikoistyössä tutkittiin, mitä vaikutusta viraalisella geeninsiirrolla siirretyllä eGFP-hHsp70-proteiinin ilmenemisellä on oksidatiiviseen stressiin silmän verkkokalvolla *in vivo*. Tutkimuksessa kokeiltiin oksidatiivisen stressireaktion, joka on merkittävin silmänpohjan ikärappeuman aiheuttaja, hidasta aiheuttamista verkkokalvolle sinisen valon aallonpituutta käyttäen *in vivo*. Tutkimuksessa todettiin, että verkkokalvon alle injektoidut rAAV2/2-eGFP-hHsp70 virukset infektoivat useita solutyyppejä verkkokalvolla ja siirtogeneeni tuotti soluissa oikeaa proteiinia ilman haitallisia sivuvaikutuksia. Kuitenkin käytetty sinisen valon aallonpituus ei aiheuttanut verkkokalvolle merkittävää muutosta oksidatiiviseen stressiin verrattua verrokisilmiin, jotta olisi pystytty arvioimaan fuusiogeenin vaikutuksia oksidatiivisen stressin ilmenemiseen. Sinisen valon kohdentaminen verkkokalvoon spesifisesti sopivilla annoksilla vaatii muutoksia koemallin tekniseen suorittamiseen. Saadut tulokset ovat kuitenkin lupaavia uuden hoitomuodon kehittämisessä silmänpohjan ikärappeuman hoitoon.

6. LÄHDELUETTELO

Acland GM, Aguirre GD, Bennet J. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther* 2005;12:1072-1082

Alexander JJ. Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia. *Nat Med* 2007;13:685-687

Ali RR, Sarra GM, Stephens C, Alwis MD, Bainbridge JW, Munro PM. Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet* 2000;25:306-310

Allocca M, Doria M, Petrillo M, Colella P, Garcia-Hoyos M, Gibbs D. Serotype dependent packing of large genes in adeno-associated viral vectors result in effective gene delivery in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1955-1964

Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ, Ambati BK.

An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med*. 2003;9:1390-7.

Anand V, Duffy B, Yang Z, Dejneka NS, Maguire AM, Bennet J. A deviant immune response to viral proteins and transgene product is generated on subretinal administration of adenovirus and adeno-associated virus. *Mol Ther*. 2002;5:125-132

Anderson DH, Talaga KC, Rivest AJ, Barron E, Hageman GS, Johnson LV. Characterization of beta amyloid assemblies in drusens: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research* 2004;78:243-256

Andrieu-Soler C, Bejjani RA, Bizemont T. Ocular gene therapy: a review of nonviral strategies. *Mol Vis* 2006a; 12:1334-1347

Andrieu-Soler C, Doat M, Halhal M. Enhanced oligonucleotide delivery to mouse retinal cells using iontophoresis. *Mol Vis* 2006b;12:1098-1107

Apolonia L. Stable gene transfer to muscle using non-integrating lentiviral vectors. *Mol Ther* 2007;15:1947-1954

Auriccio A, Behling KC, Macuire AM. Inhibition of retinal neovascularization by intraocular viral-mediated delivery of anti-angiogenic agents. *Mol Ther* 2002;6:490-494

Bainbridge JW, Mistry A, Schlichtenbrede FC, Smith A, Broderick C, de AM. Stable rAAV-mediated transduction of rod and cone photoreceptors in the canine retina. *Gene Ther* 2003;10:1336-1344

Bainbridge JW, Mistry AR, Thrasher AJ. Gene therapy for ocular angiogenesis. *Clin Sci (Lond)* 2003;104:561-575

Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Hendelson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petterson-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008; 358:2231-2239

Balaggan KS, Binley K, Esapa M. EIAV vector –mediated delivery of endostatin or angiostatin inhibits angiogenesis and vascular hyperpermeability in experimental CNV. *Gene Ther* 2006;13:1153-1165

Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis and age-related macula degeneration. *Surv. Ophthalmol* 2000;45:115-134

Benjamin IJ, McMillan ER. Stress (Heat shock) proteins , molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 1998;2:117-132

Bemelmans Ap, Kostic C, Crippa SV. Lentiviral gene transfer of RPE65 rescues survival and function of cones in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *PLoS Med* 2006;3:e347

Bennet J. Immune response following intraocular delivery of recombinant viral vectors. *Gene Ther.* 2003;10:977-982

Bennet J, Maguire AM, Clideciyan AV, Schnell M, Glover E, Anand V, Aleman TS, Chirmule N, Gupta AR, Huang Y, Gao GP, Nyberg WC, Tacelaar J, Hughes J, Wilson JM, Jacobson SG. Stable transgene expression in rod photoreceptors after recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to monkey retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9920-9925

Bennet J. Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer into adult murine retina. *Invest Ophthalmology* 1994;35:2535-2542

Bergelson JM. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997;275:1320-1323

Bessis N. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* 2004; 11:10-17

Bessant DA, Ali RR, Bhattacharya SS. Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:307-316

Bett AJ. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1994;91:8802-8806

Bowles DE, Rabinowitz JE, Samulski RJ. Marker rescue of adeno-associated virus (AAV) capsid mutants: a novel approach for chimeric AAV production. *J Virol* 2003;77:423-432

Brown DM, Kaiser PK, Michels M. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355:1432 - 1444.

Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related macular accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biology & Medicine* 2002 ;33:611-619

Buch PK, Bainbridge JW, Ali RR. AAV-mediated gene therapy for retinal disorders: from mouse to man. *Gene ther.* 2008;15:849-857

Cai Jiyang, Nelson Kasey C., Wu Mei, Paul Sternberg Jr* and Jones Dean P. Oxidative Damage and Protection of the RPE. *2000 Progress in Retinal and Eye Research* 19; 2: 205- 221

Cai X, Conleys S, Naash M. Nanoparticle applications in ocular gene therapy. *Vision res* 2008;48:319-324

Campochiaro PA, Nguyen QD, Shan SM. Adenoviral vector-delivered pigment epithelium – derived factor neovascular age-related macular degeneration : results of a phase 1 human clinical trial. *Hum Gene Ther* 2006;17:167-176

Chakravarthy U, Evans J, Rosenfeld PJ. Age Related macular degeneration. *BMJ* 2010;340:981

Chaum E, Hatton MP. Gene Therapy for genetic and acquired retinal diseases. *Surv Ophthalmol* 2002;47:449-469

Chen ZH, Niki E. 4-hydroxynonenal (4-HNE) has been widely accepted as an inducer of oxidative stress. Is this the whole truth about it or can 4-HNE also exert protective effects? *IUBMB Life* 2006;58:372-3.

Cheng L, Toyoguchi M, Looney DJ, Lee J, Davidson MC, Freeman WR. Efficient gene transfer to retinal pigment epithelium cells with long –term exspression. *Retina* 2005;25:193-201

Colella P, Cotugno G, Auricchio A. Ocular gene therapy : Current progress and future prospects. *J Mol. Med.* 2008;15:23-31

Davison AJ. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen. Virol.* 2003; 84: 2895-2908

den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK ym. Leber congenital amaurosis: genes proteins and disease mechanism. *Prog Retin Eye Res* 2008;27:391-419

den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends MI, Voeselek KE, Zonneweld MN, Strom TM, Meitinger T, Brunner HG, Hoyng CB, van der Born LI, Rohrscheider K, Cremers FB.

Mutation in the *cep290* (NPHP6) gene are the frequent cause Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 2006;79:556-561

Deng WT, Yan Z, Dinculescu A, Pang J, Teusner JT, Cortez NG. Adeno-associated virus-mediated expression of vascular endothelial growth factor peptides inhibits retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Hum Gene Ther* 2005;16:1247-1254

de Jong PT. Age-related macular degeneration. *The new journal of medicine* 2006;14:1474-1485

Dejneka NS. Gene therapy and animal models for retinal disease. *Dev Ophthalmol* 2003;37:188-198

Dejneka NS. In utero gene therapy rescues vision in a murine model of congenital blindness *Mol Ther* 2004;9:182-188

Desawa M, Takano M, Negishi H. Gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation: a new approach. *Micron* 2002;33:1-6

Dinculescu A, Glushakova L, Min SH, Hauswirth WW. Adeno-associated virus-vectored gene therapy for retinal disease. *Hum Gene Ther.* 2005 ;16:649-63.

Donovan SL, Dyer MA. Preparation and square wave electroporation of retinal explants cultures. *Nature protocols* 2007;1:2710-2718.

Douglas PM, Summers DW, Cyr DM. Molecular chaperones antagonize proteotoxicity by differentially modulating protein aggregation pathways. *Prion* 2009;2:51-58

Edward A, Malek G. Molecular genetics of AMD and current animal models. *Angiogenesis* 2007;10:119-132

Ehrhardt A, Haase R, Schepers A, Deutsch M.J, Lipps HJ, Baiker A. Episomal vectors for gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 2008;8:147-461.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26: 5-20

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7413-7417

Fisher D, Bieber T, Li Y, Elsässer HP, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Phar Res* 1999; 16:1273-1279

Friend DS, Papahadjopoulos D, Debs RJ. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1278:41-50

Gehlbach P, Demetriades AM, Yamamoto S, Deering T, Duh EJ, Yang HS, Cingolani C, Lai H, Wei L, Campochiaro PA. Periocular injection of an adenoviral vector encoding pigment epithelium derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Gene Ther* 2003;10:637-64

Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, Hageman GS. Age-related macular degeneration-emerging pathogenetic and therapeutic concepts 2006 *Annals of medicine* 38;7:450-471

Geroski DH, Edelhauser HF. Drug delivery for posterior segment eye disease. *Invest Ophthalmology Vis Sci* 2000;41:961-964

Ghate D, Edelhauser HF. Ocular drug delivery . *Expert Opin Drug Deliv.* 2006;3:275-287

Grant CA, Ponnazhagan S, Wang XS, Srivastava A, Li T. Evaluation of recombinant adeno-associated virus as a gene transfer vector for the retina. *Curr Eye Res* 1997;16:949-956

Hartnott DT. Retinitis Pigmentosa. *Lancet* 2006;368:1795-1809

Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, Conlon TJ, Boye SL, Flotte TR, Byrne BJ, Jacobson SG. Treatment of Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutation by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: Short term result of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 2008;19:979-990

Hillgenberg M. Chromosomal integration pattern of a helper-dependent minimal adenovirus vector with a selectable marker inserted into a 27,4-kilobase genomic stuffer. *J. Virol* 2001;75:9896-9908

Ideka Y, Goto Y, Yonemitsu Y. Simian immunodeficiency virus-based lentivirus vector for retinal gene transfer: a preclinical safety study in adult rats. *Gene Ther* 2003;10:1161-1169

Igarashi T, Miyake K, Kato K. Lentivirus-mediated expression of angiostatin efficiently inhibits neovascularization in a murine proliferative retinopathy model. *Gene Ther* 2003;10:219-226

Ishikawa H, Takano M, Matsumoto N, Sawada H, Ide C, Mimura O. Effect of GDNF gene transfer into axotomized retinal ganglion cells using in vivo electroporation with a contact lens-type electrode. *Gene Ther* 2005;12:289-298

Jacobson SG, Boye SL, Alerman TS. Safety in nonhuman primates of ocular AAV2-RPE65, a candidate treatment for blindness in Leber congenital amaurosis. *Hum Gene Ther* 2006;17:845-858

Johnson MC. Mechanisms for Env glycoprotein acquisition by retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2011;27:239-247

Jomary C, Piper TA, Dickson G, Couture LA, Smith AE, Neal MJ, Jones SE. Adenovirus mediated gene transfer to murine retinal cells in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 1994;347:117-122

Jomary C, Vincent KA, Grist J. Rescue of photoreceptor function by AAV-mediated gene transfer in a mouse model of inherited retinal degeneration. *Gene Ther* 1997;4:683-90

Jong PT. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2006;14:1474–1485

Kaarniranta K, Seitsonen S, Paimela T, Meri S, Immonen I. Pathogenesis of age-related macular degeneration. *Duodecim.* 2009;125:145-53.

Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vacular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble reseptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10705-10709

Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, Bronk JT, Bolander ME. Ultrasound mediated transfection of mammalian cells. *Hum Gene Ther* 1996;7:1339-1346

Komaromy AM. Targetin gene expression to cones with human cone opsin promoters in recombinant AAV *Gene Ther* 2008;15:1073

Kong J. Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargards disease by lentiviral gene therapy. *Gene Ther* 2008;15:1311-1320

Kopitz J, Holz FG, Kaemmerer E, Schutt F. Lipids and lipid peroxidation products in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Biochimie.* 2004;86:825-31.

Kostic C, Chidini F, Salmon P, Wiznerowicz M, Deglon N, Hornfeld D. Activity analysis of housekeeping promoters using self-inactivating lentiviral vector delivery into the mouse retina. *Gene Ther* 2003;10: 818-821

Kostic C, Chidini F, Salmon P, Wiznerowicz M, Deglon N, Hornfeld D. Activity analysis of housekeeping promoters using self-inactivating lentiviral vector delivery into the mouse retina. *Gene Ther* 2003; 10: 818-821

Kotin R.M Site -specific integration by adeno-associated virus *Proc. Natl Acad. Sci* 1990; 87:2211-2215

Kustikova O, Brugman M, Baum C. The genomic risk of somatic gene therapy. *Semin Cancer Biol* 2010;20: 269–278.

Kustikova OS, Schiedlmeier B, Brugman MH, Stahlhut, M, Bartels S, Li Z, Baum C. Cell-intrinsic and vector-related properties cooperate to determine the incidence and consequences of insertional mutagenesis. *Mol. Ther.* 2009;17: 1537–1547.

Lai CC, Wu WC, Chen SL, Sun MH, Xiao X, Ma L. Recombinant adeno-associated virus vector expressing angiostatin inhibits preretinal neovascularization in adult rats. *Ophthalmics Res* 2005;37:50-56

Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, Kutala VK. Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian journal of Biochemistry & Biophysics* 2009;46:421-440

Leber T. Über Retinitis pigmentosa und angeborene Amaurose. *Archiv für Ophthalmologie* 1869;15 : 1–25

Leis J. Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J Virol* 1998;62:1808-1809

Le MG, Stieger K , Smith AJ ym. Restoration of vision in RPE65 –deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* 2007;14:292-303

Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 1994;68: 510-516

Liu HS, Jan MS, Chou CK, Chen PH, Ke NJ. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 14;260:712-717.

Liu J. 3D visualization of HIV virions by cryoelectron tomography. *Methods Enzymol* 2010; 483:267-290

Li T, Adamian M, Roof D, Berson E, Dryja T, Roessler B, Davidson B. In vivo transfer of a reporter gene to the retina mediated by an adenoviral vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:2543-2549

Loewen N, Leske DA, Chen Y. Comparison of wild-type and class 1 integrase mutant-FIV vectors in retina demonstrates sustained expression of integrated transgenes in retinal pigment epithelium. *J Gene Med* 2003;5:1009-1017

Loiler SA, Conlon TJ, Song S. Targeting recombinant adeno-associated virus vectors to enhance gene transfer to pancreatic islets and liver. *Gene Ther* 2003;10:1551-1558

Lotery AJ, Derksen TA, Russel SR. Gene transfer to the nonhuman primate retina with recombinant feline immunodeficiency viral vectors. *Hum. Gene Ther.* 2002;13:689-696

Maeda Akiko, Maeda Tadao, Golczak Marcin, Chou Steven, Desai Amar, Hoppel Charles L. , Matsuyama Shigemi, Palczewski Krzysztof. Involvement of All-trans-retinal in Acute Light-induced Retinopathy of Mice. *JBC* 2009; 22:15173–15183

Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Mingozzi F, Bennicelli J , Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J,

Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zelenia O, Shindler KS, MaguireMarlhens F, Bareil C, Griffoin JM, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C, Liu SY, Harris E, Redmond TM, Arnaud B, Claustres M, Hamel CP. Mutation in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* 1997;17:139-141

Marc Robert E., Jones B.W., Watt C.B., Vazquez-Chona F., Vaughan D.K., Organisciak D.T. Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Mol. Vis.* 2008; 14:782-806

Matsuda T, Cepko CL. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:16-22

Maurice DM, Mishima S. Ocular pharmacokinetics . In: Sears LM, ed. *Pharmacology of the eye*. Berlin: Springer-Verlag 1984: 19-116

McCarty D.M Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu. Rev. Genet.* 2004;38:819-845

McConnel MJ, Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 2004;15:1022-1033

MG, Wright JF, Volpe NJ, McDollet JW, Auricchio A, High KA, Bennet J. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 2008;358:2240-2248

Michaelides M. The cone dysfunction syndromes. *Br J Ophthalmol* 2004;88:291-297

Miller AD. Cell –surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93:11407-11413

Mohan RR, Possin DE, Sihna S, Wilson SE. Gene transfer into rabbit keratocytes using AAV and lipid-mediated plasmid DNA vectors with a lamellar flap for stromal access. *Exp Eye Res* 2003b;76:373-383

Mohammed S, Al-Dosari, Xiang Gao. Nonviral delivery : Principle, Limitations, and recent progress. *The AAPS Journal* 2009;11:671-681

Molday RS. ATP-binding –cassette transporter ABCA4:molecular properties and role in vision and macular degeneration. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39:507-517

Mori K, Duh E, Gehlbach P, Ando A, takahaski K, Pearlman J, Yang HS, Zack DJ, ETTYREDDY D, BROUGH DE, WEI LL, Campochiaro PA. Pigment-epithelium derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 2001;188:253-263

Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmology Vis Sci* 2002;43:1994-2000

Naik R, Mukhopadhyay A, Ganguli M. Gene delivery to the retina: focus on non-viral approaches. *Drug Discov Today* 2009;14:306-315

Naldini L, Blomer U, Gallay P. In Vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996;272:263-267

Narfstrom K, Katz ML, Bragedottir R, Seeliger M, Boulanger A, Redmond TM. Functional and structural recovery of a retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1663-1672

O'Driscoll Carolyn, O'Connor Jeremy, O'Brien Colm J., Cotter Thomas G.. Basic fibroblast growth factor-induced protection from light damage in the mouse retina in vivo. *Journal of neurochemistry* 2008;105 : 524–536

Palosaari T, Mäkinen E, Kataja M. Silmämpöjien nesteinen ikärappeuma: mitä tiedämme lasiaisen sisäisestä angiogeneesin estosta? *Suom.Lääkäril.*2008;63:2229-2236

Pang JJ. Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis. *Mol Ther* 2006;13:565-572

Pechan P, Rubin H, Lukason M. Novel anti-VEGF chimeric molecules delivered by AAV vectors for inhibition of retinal neovascularization. *Gene Ther* 2009;16:10-16

Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev.* 2008;28:569-631.

Rakoczy PE, Brankov M, Fonceca A, Zaknich T, Rae BC, Lai CM. Enhanced recombinant adeno-associated virus-mediated vascular endothelial growth factor expression in the adult mouse retina: a potential model for diabetic retinopathy. *Diabetes* 2003;52:857-863

Ramkumar HL, Zhang J, Chan C. Retinal ultrastructure of murine models of dry age-related macular degeneration (AMD). *Retinal and eye research* 2010;29:169-190

Reich S J, Auricchio A, Hildinger M, Glover E, Maguire A M, Wilson JM, Bennett J. Efficient trans-splicing in the retina expands the utility of adeno-associated virus as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther* 2003;14:37-44

Rein DB, Wittenborn JS, Zhong X, Honeycutt AA, Lesesne SB, Saaddine J, Vision Health Cost-effectiveness Study Group 2009. Forecasting age-related macular degeneration through the year 2050: potential impact of new treatments. *Archives of Ophthalmology* 127;4:533-540

Resnikoff S, Pascoloni D, Etyaàle D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, Mariotti SP. Global data on visual impairment in the year 2002, *Bulletin of the World Health Organization* 2002;82:844-851

Rohrera B., Matthes M.T., LaVail M.M., Reichardt L.F. Lack of p75 receptor does not protect photoreceptors from light-induced cell death. *Exp Eye Res* 2003; 76: 125–129.

Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355:1419 - 1431.

Roy K, Stein L, Kauskal S. Ocular gene therapy: An evaluation of recombinant adeno-associated virus-mediated gene therapy interventions for the treatment of ocular disease. *Hum. Gene Ther* 2010;21:915-927

Ryhänen T, Hyttinen JM, Kopitz J, Rilla K, Kuusisto E, Mannermaa E, Viiri J, Holmberg CI, Immonen I, Meri S, Parkkinen J, Eskelinen EL, Uusitalo H, Salminen A, Kaarniranta K. Crosstalk between Hsp70 molecular chaperone, lysosomes and proteasomes in autophagy-mediated proteolysis in human retinal pigment epithelial cells. *J Cell Mol Med.* 2009;13:3616-31

Ryhänen T, Viiri J, Hyttinen JM, Uusitalo H, Salminen A, Kaarniranta K. Influence of Hsp90 and HDAC inhibition and tubulin acetylation on perinuclear protein aggregation in human retinal pigment epithelial cells. *J Biomed Biotechnol.* 2011:798052.

Saishin Y. Periocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization in a human-sized eye. *Gene Ther* 2005;16:473-478

Schlichtenbrede FC, de CL, Stephens C, Smith AJ, Georgiadis A, Thrasher AJ. Long-term evaluation of retinal function in Prph2Rd2/Rd2 mice following AAV-mediated gene replacement therapy. *J Gene Med* 2003;5:757-764

Schlichtenbrede FC, Smith AJ, Bainbridge JW. Improvement of neuronal visual responses in the superior colliculus in Prph2(Rd2/Rd2) mice following gene therapy. *Mol Cell Neurosci* 2004;25:103-110

Shaban H, Richter C. A2E and blue light in the retina: the paradigm of age-related macular degeneration. *Biol Chem.* 2002.;383:537-45.

Smith AJ, Schlichtenbrede FC, Tschernutter M. AAV-mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 2003;8:188-195

Smith JR, Verwaerde C, Rolling F, Naud MC, Delanoye A, Thillaye-Goldenberg B. Tetracycline-inducible viral interleukin-10 intraocular gene transfer, using adeno-associated virus in experimental autoimmune uveoretinitis. *Hum Gene Ther* 2005;16:1037-1046

Smith JR, Verwaerde C, Rolling F, Naud MC, Delanoye A, Thillaye-Goldenberg B. Tetracycline-inducible viral interleukin-10 intraocular gene transfer, using adeno-associated virus in experimental autoimmune uveoretinitis. *Hum Gene Ther* 2005;16:1037-1046

Stone EM. Leber congenital amaurosis — a model for efficient genetic testing of heterogeneous disorders. *Am J Ophthalmol* 2007;144: 791–811

Sun Ming-Hui, Su Pang Jong-Hwei, Chen Show-Li, Kuo Ping-Chang, Chen Kuan-Jen, Kao Ling-Yuh, Wu Ju-Yun, Lin Ken-Kuo, Tsao Yeou-Ping. Photoreceptor Protection against Light Damage by AAV-Mediated Overexpression of Heme Oxygenase-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:5699–5707

Takahashi M, Miyoshi H, Verma IM. Rescue from photoreceptor degeneration in the Rd mouse by human immunodeficiency virus vector mediated gene transfer. *J Virol* 1999;73:7812-7816

The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity
Arch Ophthalmol. 1984; 102: 1130-1134

Tschernutter M, Schlictenbrede FC, Howe S. Long term preservation of the retinal function in the RCS rat model of retinitis pigmentosa following lentivirus-mediated gene therapy. *Gene Ther* 2005;12:694-701

Uchida M, Natsume H, Kobayashi K, Morimoto Y. Effects of particle size , helium gas pressure and microparticle dose on the plasma concentration of indomethacin after bombardment of indomethacin –loaded poly-L-lactic microspheres using a Helios gun system. *Biol Pharm Bull* 2002;25:690-693

Uricchio A. Pseudotyped AAV-vectors for constutive and regulated gene expression in the eye. *Vision Res* 2003;43:913-918

Villemejeane J, Mir LM. Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. *Br J Pharmacol* 2009;157:207-219

Vollrath D, Feng W, Dundan JI. Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Merkt. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12584-12589

Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J. Gene Med*. 2004; 6: 164-171

Wang L, Blouin V, Brument N, Bello-Roufai M, Francois A. Production and purification of recombinant adeno-associated vectors. *Meth Mol Biol* 2011;807:361-404

Wasungu L, Hoekstra D. Cationic lipids, lipoplexes and intra-cellular delivery of genes. *J Control Release* 2006;116:255-264

Weber M, Rabinowitz J, Provost N, Conrath H, Folliot S, Briot D. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigment epithelium in rat, dog and nonhuman primate after subretinal delivery *Mol Ther* 2003; 7:774-781

Wu J, Seregard S, Peep A. Photochemical damage of the retina. *Survey of ophthalmology* 2006;51:461-481

Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 2006;14:316-327

Wold WS & Gooding LR. Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology* 1991; 184:1-8

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A ym. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-1468

Yeh P & Perricaudet M. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *FASEB J* 1997;11:615-623

Ylä-Herttuala S. *Geenihoito*. *Duodecim* 2009;125:1729-39

Zhang, X., De Alwis, M., Hart, S.L., Fitzke, F.W., Inglis, S.C., Bournsnel, M.E., Levinsky, R.J., Kinnon, C., Ali, R.R. and Thrasher, A.J: High-titer recombinant adeno-associated virus production from replicating amplicons and herpes vectors deleted for glycoprotein H. *Hum. Gene Ther.* 1999;10: 2527–2537