

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 992**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2011 E 11760432 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2614079**

54 Título: **Canalrodopsina 2 mutante**

30 Prioridad:

08.09.2010 US 380793 P
08.09.2010 EP 10175832

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.09.2015

73 Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.**
(100.0%)
Hofgartenstrasse 8
80539 München, DE

72 Inventor/es:

BAMBERG, ERNST;
BAMANN, CHRISTIAN;
KLEINLOGEL, SONJA;
WOOD, PHILLIP y
DEMPSKI, ROBERT E.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 545 992 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Canalrodopsina 2 mutante

La invención se refiere a canalrodopsinas mutantes que tienen propiedades mejoradas, a construcciones de ácidos nucleicos que las codifican, a vectores de expresión que llevan la construcción de ácidos nucleicos, a células que comprenden dicha construcción de ácidos nucleicos o vector de expresión y a sus usos respectivos, tal como se definen en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

El canal catiónico rectificado internamente, regulado por luz, la canalrodopsina-2 (ChR2) se ha convertido en una herramienta preferida para la activación impulsada por luz de las neuronas tanto *in vitro* como *in vivo*¹⁻⁴. Aunque la ChR2 de tipo natural (en lo sucesivo abreviadamente ChR2 WT, por la expresión inglesa *Wild-Type*) se puede emplear para la despolarización inducida por luz, hay una búsqueda en curso de mutantes de ChR2 con una mayor sensibilidad a la luz para potenciales aplicaciones clínicas futuras (documento WO 03/084994 y ⁵⁻⁷). Una mayor eficacia permitiría la despolarización de las capas de células distantes de la fuente de luz aplicada a pesar de la baja transmitancia óptica de, por ejemplo, el tejido cerebral. Un aumento en la sensibilidad a la luz también resolvería el problema del potencial daño celular bajo iluminación continua, debido a las altas intensidades de la luz azul necesarias para la activación completa de la ChR2 WT (10^{18} - 10^{19} fotones $s^{-1} cm^{-2}$ a 480 nm). Las variantes con mayor sensibilidad a la luz también son cruciales para la investigación relacionada con la recuperación de la visión ^{8,9}. A nivel de proteínas, una mayor eficacia de la luz sólo se puede lograr aumentando la duración del estado abierto y/o elevando la conductancia unitaria del canal, ya que la sensibilidad a la luz *per se* sólo se puede mejorar marginalmente debido a la naturaleza del retinal cromóforo ChR2. Investigaciones anteriores han demostrado que las mutaciones en las posiciones C128 y D156 en las hélices 3 y 4, respectivamente, dieron como resultado una cinética de los canales notablemente más lenta con duraciones del estado abierto de hasta 30 minutos y más, proporcionando una sensibilidad a la luz 500 veces mayor o incluso más ^{5,6}. Estos mutantes en C128 y D156 se pueden desconectar por luz roja a duraciones del estado abierto variables. A pesar de su superior sensibilidad a la luz, su cinética de cierre lento sigue siendo un factor limitante para su aplicabilidad.

Por consiguiente, existe todavía la necesidad de canales catiónicos inducibles por luz que presenten una mayor sensibilidad a la luz y una cinética de respuesta más rápida.

Sumario de la invención

Puesto que se sabe que el potencial de superficie de la membrana interna de las células está fuertemente influenciado por Ca^{++} , la modificación de los niveles de Ca^{++} intracelular de las submembranas dará lugar a la despolarización de la membrana y en las neuronas a la activación de los canales de Na^+ regulados por voltaje. Por lo tanto, los inventores plantearon la hipótesis de que la sensibilidad a la luz de una neurona se puede aumentar indirectamente elevando el potencial de superficie de su membrana interna *vía* la afluencia de Ca^{++} . Los inventores encontraron sorprendentemente un mutante de ChR2 con una permeabilidad mejorada al Ca^{++} , en lo sucesivo denominada canalrodopsina translocadora del Ca (abreviadamente en lo sucesivo CatCh por la expresión inglesa *Calcium translocating Channelrhodopsin*). En comparación con la ChR2 WT, la CatCh tiene una permeabilidad al Ca^{++} cuatro veces mayor, una sensibilidad a la luz 70 veces mayor y una cinética de respuesta más rápida cuando se expresa en las neuronas del hipocampo. Se demuestra que la mayor sensibilidad a la luz y la cinética rápida resultan de la afluencia de Ca^{++} regulada por luz relativamente alta, lo que eleva el potencial de superficie de la membrana interna y activa los canales de potasio (BK) de gran conductancia activados por Ca^{++} . Un aumento en $[Ca^{++}]_i$ eleva el potencial de la superficie interna, lo que facilita la activación de los canales de Na^+ regulados por voltaje y aumenta indirectamente la sensibilidad a la luz. La repolarización que sigue a la estimulación por luz está marcadamente acelerada por la activación del canal BK dependiente de Ca^{++} . La CatCh es un ejemplo de un nuevo principio por el cual los canales regulados por luz pueden ser modificados para aumentar la sensibilidad a la luz de la estimulación neuronal. Sus características, tales como el desencadenamiento de potenciales de acción precisos y rápidos requiriendo al mismo tiempo bajas intensidades de luz para su activación, abren el camino al uso de los canales regulados por luz en aplicaciones clínicas.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención se refiere a un canal iónico inducible por luz, en el que el canal iónico inducible por luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 1-309 de SEQ ID NO: 1 (CHOP-2) y que comprende una mutación en una posición correspondiente a L132 en la SEQ ID NO: 1, tal como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

En un segundo aspecto semejante, la invención también se refiere a una canalrodopsina, que comprende el canal iónico inducible por luz de acuerdo con el primer aspecto y un retinal o derivado de retinal.

Además, en un tercer aspecto, la invención proporciona una construcción de ácidos nucleicos, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el canal iónico inducible por luz de acuerdo con el primer aspecto. En otro aspecto más, la invención proporciona un vector de expresión, que comprende una secuencia de nucleótidos que

codifica el canal iónico inducible por luz de acuerdo con el primer aspecto o la construcción de ácidos nucleicos de acuerdo con el tercer aspecto.

5 Además, se proporciona una célula que comprende la canalrodopsina de acuerdo con el segundo aspecto, la construcción de ácidos nucleicos de acuerdo con el tercer aspecto o el vector de expresión de acuerdo con el cuarto aspecto.

Además, la invención se refiere al uso como medicamento del canal iónico inducible por luz de acuerdo con el primer aspecto, la canalrodopsina del segundo aspecto, la construcción de ácidos nucleicos o el vector de expresión de acuerdo con la invención y la célula de acuerdo con la invención. En particular, se contempla un uso del vector de expresión de acuerdo con la invención en terapia génica.

10 Más específicamente, se contempla el uso del canal iónico inducible por luz, la canalrodopsina, la construcción de ácidos nucleicos, el vector de expresión o la célula de acuerdo con la invención en el tratamiento de la ceguera o de visión reducida.

15 En otro aspecto más, la invención proporciona el uso del canal iónico inducible por luz de acuerdo con el primer aspecto, que tiene, además, treonina, serina o alanina en una posición correspondiente a la posición 128 de la SEQ ID NO: 1; y/o alanina en una posición correspondiente a la posición 156 de la SEQ ID NO: 1, en la ablación de células cancerosas.

En un aspecto final, la invención se refiere al uso de un canal iónico inducible por luz de acuerdo con el primer aspecto, o a una canalrodopsina de acuerdo con el segundo aspecto, o a una célula de acuerdo con la invención en un cribado de alto rendimiento.

20 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En un primer aspecto, la invención se refiere a un canal iónico inducible por luz, en el que el canal iónico inducible por luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 70% con la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 1-309 de la SEQ ID NO : 1 (CHOP-2), más preferiblemente con la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 1-315 de la SEQ ID NO: 1, o incluso con la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 1-737 de la SEQ ID NO: 1, y el cual comprende una mutación en una posición correspondiente a L132 en la SEQ ID NO: 1.

La CHOP2 de tipo natural tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MDYGGALSAV	GRELLFVTNP	VVVNGSVLVP	EDQCYCAGWI
ESRGTNGAQT	ASNVLQWLAA	GFSILLLMFY	AYQTWKSTCG
WEEIYVCAIE	MVKVILEFFF	EFKNPSMLYL	ATGHRVQWLR
YAEWLLTCPV	ILIHLSNLTG	LSNDYSRRTM	GLLVSDIGTI
VWGATSAMAT	GYVKVIFFLC	GLCYGANTFF	HAAKAYIEGY
HTVPKGRCRQ	VVTGMAWLFF	VSWGMPILF	ILGPEGFGVL
SVYGSTVGHT	IIDLMSKNCW	GLLGHYLRVL	IHEHILHGD
IRKTTKLNIG	GTEIEVETLV	EDEAEAGAVN	KGTGKYASRE
SFLVMRDKMK	EKGIDVRASL	DNSKEVEQEQ	AARAAMMMMN
GNGMGMGMGM	NGMNGMGMGN	GMAGGAKPGL	ELTPQLQPGR
VILAVPDISM	VDFFREQFAQ	LSVTYELVPA	LGADNTLALV

TQAQNLGGVD	FVLIHPEFLR	DRSSTSILSR	LRGAGQRVAA
FGWAQLGPMR	DLIESANLDG	WLEGPSFGQG	ILPAHIVALV
AKMQQMRKMQ	QMQQIGMMTG	GMNGMGGGMG	GGMNGMGGGN
GMNNMGNGMG	GGMNGMGGN	GMNGMGGGNG	MNNMGNGMA
GNGMGGGMGG	NGMGGSMNGM	SSGVVANVTP	SAAGGMGMM
NGGMAAPQSP	GMNGGRLGTN	PLFNAAPSPL	SSQLGAEAGM
GSMGGMGGMS	GMGGMGGMGG	MGGAGAATTQ	AAGGNAEAEM

30 LQNLMEINR LKRELGE (SEQ ID NO: 1)

El canal iónico inducible por luz de la invención es una proteína de membrana con al menos 5 hélices transmembranales, que es capaz de unirse a un polieno sensible a la luz. Son preferibles las proteínas transmembranales con 6 o 7 hélices transmembranales. Sin embargo, también están cubiertas por la invención las proteínas transmembranales con más de 7 hélices, por ejemplo 8, 9 o 10 hélices transmembranales. Además, la invención abarca proteínas transmembranales que además de la parte transmembranal incluyen secuencias C-terminales y/o N-terminales, en donde las secuencias C-terminales pueden extenderse en el interior del lumen rodeado por la membrana, por ejemplo el citoplasma de una célula o el interior de un liposoma, o también pueden estar dispuestas en la superficie exterior de la membrana. Lo mismo se aplica para las secuencias N-terminales opcionalmente presentes, que análoga-

mente pueden estar dispuestas tanto dentro del lumen como también en la superficie exterior de la membrana. La longitud de las secuencias C- y/o N-terminales no está en principio sometida a ninguna restricción; sin embargo, se prefieren los canales iónicos inducibles por luz con secuencias C-terminales no empotradas en la membrana, con 1 a 1000 aminoácidos, preferiblemente 1 a 500, especial y preferiblemente 5 a 50 aminoácidos. Independientemente de la longitud de las secuencias C-terminales, las secuencias N-terminales localizadas no empotradas en la membrana comprenden preferiblemente 1 a 500 aminoácidos, especial y preferiblemente 5 a 50 aminoácidos. El concepto de la hélice transmembranal es bien conocido por los expertos en la técnica. Estas son generalmente estructuras proteínicas α -helicoidales, que por regla general comprenden de 20 a 25 aminoácidos. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la membrana, que puede ser una membrana natural, por ejemplo una membrana celular o plasmática, o también una membrana sintética, los segmentos transmembranales pueden también ser más cortos o más largos. Por ejemplo, los segmentos transmembranales en las membranas artificiales pueden comprender hasta 30 aminoácidos, pero por otro lado también sólo unos pocos aminoácidos, por ejemplo 12 a 16.

En una realización preferida, el canal iónico inducible por luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad, preferiblemente al menos 75% de identidad, más preferiblemente al menos 80% de identidad, incluso más preferiblemente al menos 85% de identidad, tal como al menos 90% de identidad, y más preferiblemente al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 1-309 de la SEQ ID NO: 1.

En otra realización preferida, el canal iónico inducible por luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad, preferiblemente al menos 75% de identidad, más preferiblemente al menos 80% de identidad, incluso más preferiblemente al menos 85% de identidad, tal como al menos 90% de identidad, y más preferiblemente al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 1-315 de la SEQ ID NO: 1.

En general, una secuencia de aminoácidos tiene "al menos x% de identidad" con otra secuencia de aminoácidos o la SEQ ID NO: 1 anterior, cuando la identidad de secuencias entre las secuencias alineadas es al menos x%. Tal alineación puede realizarse utilizando, por ejemplo, los programas informáticos de homología disponibles públicamente, como el programa "BLAST" proporcionado en la página del NCBI en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>, usando los ajustes por defecto allí establecidos. Se conocen en la técnica otros métodos de calcular los porcentajes de identidad de secuencias de conjuntos de secuencias de ácidos nucleicos.

Ejemplos de tales canales iónicos inducibles por luz que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene identidad de al menos 70% con la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 1-309 o 1-315 de la SEQ ID NO: 1 es CHOP-1 de *C. reinhardtii* (gi: 15811379), CHOP-2 (gi: 167650748) y CHOP-1 (gi: 167650744) de *Volvox carteri*, o cualquier otra variante ortóloga o alélica de CHOP-2 o CHOP-1.

En una realización aún más preferida, el canal iónico inducible por luz comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 1-309 de la SEQ ID NO: 1 (CHOP-2), excepto una mutación en la posición L132.

En otra realización aún más preferida, el canal iónico inducible por luz comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 1-315 de la SEQ ID NO: 1 (CHOP-2), excepto una mutación en la posición L132.

La mutación en la posición L132, o en la posición correspondiente a L132 en la SEQ ID NO: 1, es una sustitución, más preferiblemente seleccionada de L132C, L132S, L132E, L132D y L132T, más preferiblemente en la que la sustitución es en L132C. Aún cuando los datos experimentales están limitados a L132C, se contempla que las sustituciones L132S, L132E, L132D y L132T presentarán propiedades similares, ya que todas estas sustituciones aumentarán la polaridad de la canal.

Además, el canal iónico inducible por luz comprende otras sustituciones (semi)-conservadoras. Las sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y propiedades químicas. Ejemplos de tales familias son aminoácidos con cadenas laterales básicas, con cadenas laterales ácidas, con cadenas laterales alifáticas no polares, con cadenas laterales aromáticas no polares, con cadenas laterales polares sin carga, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales grandes, etc. Las sustituciones semi-conservadoras y conservadoras típicas son:

Aminoácidos	Sustitución conservadora	Sustitución semi-conservadora
A	G; S; T	N; V; C
C	A; V; L	M; I; F; G
D	E; N; Q	A; S; T; K; R; H
E	D; Q; N	A; S; T; K; R; H
F	W; Y; L; M; H	I; V; A
G	A	S; N; T; D; E; N; Q
H	Y; F; K; R	L; M; A
I	V; L; M; A	F; Y; W; G
K	R; H	D; E; N; Q; S; T; A
L	M; I; V; A	F; Y; W; H; C
M	L; I; V; A	F; Y; W; C;
N	Q	D; E; S; T; A; G; K; R
P	V; I	L; A; M; W; Y; S; T; C; F
Q	N	D; E; A; S; T; L; M; K; R
R	K; H	N; Q; S; T; D; E; A
S	A; T; G; N	D; E; R; K
T	A; S; G; N; V	D; E; R; K; I
V	A; L; I	M; T; C; N
W	F; Y; H	L; M; I; V; C
Y	F; W; H	L; M; I; V; C

5 Además, el experto apreciará que las glicinas en las posiciones estéricamente exigentes no deben ser sustituidas y que la prolina no debe ser introducida en partes de la proteína que tengan una estructura alfa-helicoidal o de lámina beta.

En otra realización preferida, el canal iónico inducible por luz comprende el resto de consenso L(I)DxxxKxxW(F,Y). Los aminoácidos indicados entre paréntesis en cada caso pueden sustituir al aminoácido precedente. Esta secuencia de consenso es el resto que rodea al aminoácido lisina de unión a un retinal.

10 La posibilidad de activar CatCh con intensidades de luz de origen natural mientras se mantiene una alta precisión temporal hace que sea un candidato único particularmente para los esfuerzos de restauración visual por terapia génica, pero también para otras aplicaciones biomédicas. Debido a sus requerimientos de luz reducidos, se pueden generar picos de CatCh incluso por excitación lejos de su máximo espectral de 474 nm, por ejemplo, con luz verde

(532 nm - véase la Figura 4d.). Trabajar en los flancos exteriores del espectro de acción es factible debido a sus reducidos requerimientos de luz y facilita la penetración en el tejido.

Por lo tanto, la sensibilidad a la luz del canal iónico mutante inducible por luz de la invención está aumentada preferiblemente en más de 5 veces, preferiblemente en más de 10 veces, más preferiblemente en más de 20 veces, tal como 30 veces, incluso más preferiblemente en más de 40 veces, tal como 50 veces, y lo más preferiblemente en más de 60 veces, o incluso en más de 70 veces, en comparación con CHOP-2 WT en las neuronas del hipocampo. Además, el canal iónico mutante inducible por luz de la invención presenta una frecuencia de estimulación que está aumentada al menos 1,5 veces, más preferiblemente 2 veces, o incluso más preferiblemente 2,5 veces, en comparación con CHOP-2 WT como se determina por registros electrofisiológicos de células completas en las neuronas del hipocampo. Como se muestra en los ejemplos, CHOP-2 WT presenta una frecuencia de estimulación en las neuronas del hipocampo de aproximadamente 10 Hz hasta aproximadamente 20 Hz, en donde la señalización a 20 Hz es ya imprecisa. Además, el experto en la técnica reconocerá que la frecuencia intrínseca de los picos también depende del tipo de célula. Por ejemplo, las células auditivas tienen una frecuencia intrínseca de los picos de hasta 500 Hz. Por otra parte, se han realizado experimentos *in vitro*, es decir, a temperatura ambiente. Sin embargo, el experto en la técnica esperará que la frecuencia de estimulación sea aún mayor en los animales de sangre caliente, tales como mamíferos, puesto que la cinética es también dependiente de la temperatura. Por lo tanto, dependiendo del tipo de célula y de la temperatura, es de esperar que el canal iónico mutante inducible por luz de la invención también pueda presentar una frecuencia de estimulación que está aumentada al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, tal como al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o más preferiblemente al menos 40 veces, al menos 50 veces, tal como al menos 60 veces, o al menos 70 veces, incluso más preferiblemente al menos 80 veces, al menos 90 veces, o al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 125 veces, tal como al menos 150 veces, o al menos 175 veces, e incluso más preferiblemente al menos 200 veces, en comparación con CHOP-2 WT como se determina con registros electrofisiológicos de células completas. El cultivo de neuronas del hipocampo y los registros electrofisiológicos de las neuronas del hipocampo se ilustran más adelante en los ejemplos.

Explicado brevemente, se aíslan hipocampos de ratas Sprague-Dawley postnatales P1 (Jackson Laboratory) y se tratan con papaína (20 U mL^{-1}) durante 20 minutos a 37°C . Los hipocampos se lavan con DMEM (Invitrogen/Gibco, con alto contenido en glucosa) complementado con 10% de suero fetal bovino y se trituran en un pequeño volumen de esta solución. Se cultivan ~ 75.000 células sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con poli-D-lisina/laminina en placas de 24 pocillos. Después de 3 horas, el medio de cultivo en placas se sustituye por el medio de cultivo (Neurobasal A que contiene 2% de suplemento B-27, Glutamax-I 2 mM y 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin). Las ChR2(L132C)-YFP y ChR2 (WT)-YFP se transfectan 5-10 días después del cultivo en placas utilizando el reactivo lipofectamina 2000 (Invitrogen). Alternativamente, se pueden añadir a cada pocillo $2\text{-}5 \times 10^9$ GC/mL del virus (AAV2/7-CAG-ChR2(L132C)-2A-EGFP-WPRE-bGH) 4-9 días después del cultivo. La construcción representativa del vector viral adeno-asociado se describe con detalle en los ejemplos siguientes. La expresión se hace visible 5 días después de la transducción. No se añade retinal todo-trans al medio de cultivo o medio de registro para cualquiera de los experimentos.

Para los registros de células completas en neuronas de hipocampos cultivadas, pipetas de parche con resistencias de 5-10 $\text{m}\Omega$ se llenan con gluconato de potasio 129 mM, HEPES 10 mM, KCl 10 mM, MgATP 4 mM y Na_3GTP 0,3 mM, ajustada a pH 7,2. Como solución extracelular se emplea solución de Tyrode (NaCl 125 mM, KCl 2 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 1 mM, glucosa 30 mM y HEPES 25 mM, ajustada a pH 7,4). La solución extracelular nominalmente exenta de Ca^{++} contiene esta misma solución, excepto que tiene Ca^{++} 0 mM y Mg^{++} 3 mM. Los registros se llevaron a cabo en presencia de los bloqueadores de la transmisión sináptica excitadora, 1,2,3,4-tetrahidro-6-nitro-2,3-dioxo-benzoflquinolina-7-sulfonamida (NBQX, 10 μM , Sigma) y ácido D(-)-2-amino-5-fosfonopentanoico (AP-5, 50 μM , Sigma). Para registros con pinza de voltaje se añade a la solución extracelular tetrodotoxina 1 μM . Para inhibir la actividad del canal BK, se añade TEA 1 mM. Los registros se realizan en un microscopio Zeiss Axiovert 25 invertido equipado con una lámpara de fluorescencia. La expresión satisfactoria de proteínas se demuestra por fluorescencia mediada por EGFP o YFP. La resistencia al acceso neuronal es 15-40 $\text{m}\Omega$ y la estabilidad se monitoriza durante todo el experimento. Las señales electrofisiológicas se amplifican utilizando un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Union City, CA), se filtran a 10 kHz, se digitalizan con un Axon Digidata 1600 (50 Hz) y se adquieren y analizan usando el programa informático pClamp9 (Axon Instruments). Las fotocorrientes son provocadas usando impulsos de luz de diferentes longitudes procedentes de láseres de estado sólido bombeados por diodos (Pusch Opto Tech GmbH; $\lambda_1 = 473 \text{ nm}$, $P_1 = 100 \text{ mW}$, $\lambda_2 = 532 \text{ nm}$, $P_2 = 50 \text{ mW}$) o destellos de 10 ns procedentes de un láser de colorante bombeado por excímero (cumarina 2, $\lambda = 450 \text{ nm}$). Las Intensidades específicas de luz son intensidades en el extremo de una fibra óptica de cuarzo de 400 μm de diámetro (STE-F100/400-Y-VIS/NIR; Laser 2000, Wessling, Alemania) a una distancia de $\sim 500 \mu\text{m}$ de la célula. Las corrientes medidas desde las neuronas que expresan ChR2(L132C)-YFP y ChR2(L132C)-2A-EGFP son idénticas.

Además, la conductividad del calcio del canal iónico mutante inducible por luz de la invención está aumentada al menos dos veces, preferiblemente al menos tres veces, más preferiblemente al menos cuatro veces en comparación con CHOP-2 WT, como se determina por formación de imágenes con Fura-2 en células HEK293. Con el fin de determinar la conductividad del calcio, se carga Fura-2 AM (5 mM; Invitrogen) a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1 hora. Después de la carga, las células se recuperan en una solución de NaCl 140 mM sin Ca^{++} (NaCl 140 mM, EGTA 7 mM, MgCl_2 2 mM y HEPES 10 mM). Se excita la proteína fluorescente amarilla (YFP) por una exposi-

ción de 500 ms a la luz usando un filtro de 460/40 nm (Visitron Systems, Puchheim, Alemania) para estimar el nivel de expresión de cada célula por su fluorescencia YFP. La solución se reemplaza luego por una solución de Ca^{++} extracelular que consiste en CaCl_2 90 mM, EGTA 7 mM, MgCl_2 2 mM y HEPES 10 mM. Después de 15 minutos en la oscuridad, los canales regulados por luz se estimulan durante 10 segundos con luz azul (460/40 nm). Fura-2 se excita con 340 nm (340/20) y 380 nm (380/20) y la luz emitida (540/80 nm) se detecta con una cámara CCD (todos los filtros son de Visitron Systems, Puchheim, Alemania).

Como se deduce de lo anterior, el canal iónico mutante inducible por luz puede comprender adicionalmente otras mutaciones, preferiblemente sustituciones. En una realización preferida, el canal iónico inducible por luz puede comprender adicionalmente al menos uno de los siguientes residuos de aminoácidos: ácido aspártico en una posición correspondiente a la posición 253 de la SEQ ID NO: 1; lisina en una posición correspondiente a la posición 257 de la SEQ ID NO: 1; triptófano en una posición correspondiente a la posición 260 de la SEQ ID NO: 1; ácido glutámico en una posición correspondiente a la posición 123 de la SEQ ID NO: 1; histidina o arginina, preferiblemente arginina, en una posición correspondiente a la posición 134 de la SEQ ID NO: 1; treonina, serina o alanina en una posición correspondiente a la posición 128 de la SEQ ID NO: 1; y/o alanina en una posición correspondiente a la posición 156 de la SEQ ID NO: 1. Por consiguiente, el canal iónico mutante inducible por luz puede comprender una de las siguientes combinaciones de residuos de aminoácidos en las posiciones indicadas, correspondiendo dichas posiciones a la SEQ ID NO: 1:

Cys 132 + Asp 253; Cys 132 + Lys 257; Cys 132 + Trp 260; Cys 132 + Glu 123; Cys 132 + His 134; Cys 132 + Arg 134; Cys 132 + Thr 128; Cys 132 + Ser 128; Cys 132 + Ala 128; Cys 132 + Ala 156;

Cys 132 + Asp 253 + Lys 257; Cys 132 + Asp 253 + Trp 260; Cys 132 + Asp 253 + Glu 123; Cys 132 + Asp 253 + His 134; Cys 132 + Asp 253 + Arg 134; Cys 132 + Asp 253 + Thr 128; Cys 132 + Asp 253 + Ser 128; Cys 132 + Asp 253 + Ala 128; Cys 132 + Asp 253 + Ala 156;

Cys 132 + Lys 257 + Trp 260; Cys 132 + Lys 257 + Glu 123; Cys 132 + Lys 257 + His 134; Cys 132 + Lys 257 + Arg 134; Cys 132 + Lys 257 + Thr 128; Cys 132 + Lys 257 + Ser 128; Cys 132 + Lys 257 + Ala 128; Cys 132 + Lys 257 + Ala 156;

Cys 132 + Trp 260 + Glu 123; Cys 132 + Trp 260 + His 134; Cys 132 + Trp 260 + Arg 134; Cys 132 + Trp 260 + Thr 128; Cys 132 + Trp 260 + Ser 128; Cys 132 + Trp 260 + Ala 128; Cys 132 + Trp 260 + Ala 156;

Cys 132 + Glu 123 + His 134; Cys 132 + Glu 123 + His 134; Cys 132 + Glu 123 + Arg 134; Cys 132 + Glu 123 + Thr 128; Cys 132 + Glu 123 + Ser 128; Cys 132 + Glu 123 + Ala 128; Cys 132 + Glu 123 + Ala 156;

Cys 132 + His 134 + Thr 128; Cys 132 + His 134 + Ser 128; Cys 132 + His 134 + Ala 128;
 Cys 132 + His 134 + Ala 156;
 Cys 132 + Arg 134 + Thr 128; Cys 132 + Arg 134 + Ser 128; Cys 132 + Arg 134 + Ala
 128; Cys 132 + Arg 134 + Ala 156;
 Cys 132 + Thr 128 + Ala 156; Cys 132 + Ser 128 + Ala 156; Cys 132 + Ala 128 + Ala
 156;

Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Glu 123; Cys
 132 + Asp 253 + Lys 257 + His 134; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Arg 134; Cys 132 +
 Asp 253 + Lys 257 + Thr 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Ser 128; Cys 132 + Asp
 253 + Lys 257 + Ala 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Ala 156;

Cys 132 + Lys 157 + Trp 260 + Glu 123; Cys 132 + Lys 157 + Trp 260 + His 134; Cys
 132 + Lys 157 + Trp 260 + Arg 134; Cys 132 + Lys 157 + Trp 260 + Thr 128; Cys 132 +
 Lys 157 + Trp 260 + Ser 128; Cys 132 + Lys 157 + Trp 260 + Ala 128; Cys 132 + Lys 157
 5 + Trp 260 + Ala 156;

Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + His 134; Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134; Cys 132
 + Trp 260 + Glu 123 + Thr 128; Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + Ser 128; Cys 132 + Trp
 260 + Glu 123 + Ala 128; Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + Ala 156;

Cys 132 + Glu 123 + His 134 + Thr 128; Cys 132 + Glu 123 + His 134 + Ser 128; Cys 132
 10 + Glu 123 + His 134 + Ala 128; Cys 132 + Glu 123 + His 134 + Ala 156;

Cys 132 + Glu 123 + Arg 134 + Thr 128; Cys 132 + Glu 123 + Arg 134 + Ser 128; Cys
 132 + Glu 123 + Arg 134 + Ala 128; Cys 132 + Glu 123 + Arg 134 + Ala 156;

Cys 132 + His 134 + Thr 128 + Ala 156; Cys 132 + His 134 + Ser 128 + Ala 156; Cys 132
 + His 134 + Ala 128 + Ala 156;

Cys 132 + Arg 134 + Thr 128 + Ala 156; Cys 132 + Arg 134 + Ser 128 + Ala 156; Cys
 132 + Arg 134 + Ala 128 + Ala 156;

Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + His 134; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Arg 134; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Thr 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Ser 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Ala 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Ala 156;

Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Thr 128; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Ser 128; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Ala 128; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Ala 156;

Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Thr 128; Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ser 128; Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ala 128; Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ala 156;

Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Thr 128; Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ser 128; Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ala 128; Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ala 156;

Cys 132 + Glu 123 + Arg 134 + Thr 128 + Ala 156; Cys 132 + Glu 123 + Arg 134 + Ser 128 + Ala 156; Cys 132 + Glu 123 + Arg 134 + Ala 128 + Ala 156;

Cys 132 + Glu 123 + His 134 + Thr 128 + Ala 156; Cys 132 + Glu 123 + His 134 + Ser 128 + Ala 156; Cys 132 + Glu 123 + His 134 + Ala 128 + Ala 156;

Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Thr 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Ser 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Ala 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Ala 156;

Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Thr 128; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ser 128; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ala 128; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ala 156;

Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Thr 128; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ser 128; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ala 128; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ala 156;

Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Thr 128 + Ala 156; Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ser 128 + Ala 156; Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ala 128 + Ala 156;

Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Thr 128 + Ala 156; Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ser 128 + Ala 156; Cys 132 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ala 128 + Ala 156;

5

Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Thr 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ser 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ala 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ala 156;

Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Thr 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ser 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ala 128; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ala 156;

10

Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Thr 128 + Ala 156; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ser 128 + Ala 156; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ala 128 + Ala 156;

Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Thr 128 + Ala 156; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ser 128 + Ala 156; Cys 132 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ala 128 + Ala 156;

Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Thr 128 + Ala 156; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ser 128 + Ala 156; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + His 134 + Ala 128 + Ala 156;

15

Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Thr 128 + Ala 156; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ser 128 + Ala 156; Cys 132 + Asp 253 + Lys 257 + Trp 260 + Glu 123 + Arg 134 + Ala 128 + Ala 156.

Sin embargo, en la lista anterior, Cys 132 puede ser sustituido también por cualquiera de Ser 132, Glu 132, Asp 132, o Thr 132.

5 En general, el retinal o derivado de retinal necesario para el funcionamiento del canal iónico inducible por luz es producido por la célula que se ha de transfectar con dicho canal iónico. Dependiendo de su conformación, el retinal puede ser retinal todo-trans, 11-cis-retinal, 13-cis-retinal o 9-cis-retinal. Sin embargo, también se contempla que el canal iónico mutante inducible por luz de la invención se pueda incorporar en vesículas, liposomas u otras membranas celulares artificiales. Por consiguiente, en un segundo aspecto, la invención proporciona una canalrodopsina, que comprende el canal iónico inducible por luz de acuerdo con el primer aspecto y un retinal o derivado de retinal. 10 Preferiblemente, el derivado de retinal se selecciona del grupo que consiste en 3,4-deshidrorretinal, 13-etilretinal, 9-dm-retinal, 3-hidroxiretinal, 4-hidroxiretinal, naftilretinal; 3,7,11-trimetil-dodeca-2,4,6,8,10-pentaenal; 3,7-dimetil-deca-2,4,6,8-tetraenal; 3,7-dimetil-octa-2,4,6-trienal; y retinales con la rotación 6-7 bloqueada, retinales con la rotación 8-9 bloqueada y retinales con la rotación 10-11 bloqueada. Además, las realizaciones preferidas del primer aspecto corresponden a las realizaciones preferidas del segundo aspecto.

15 En un tercer aspecto, la invención se refiere también a una construcción de ácidos nucleicos, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el canal iónico inducible por luz de acuerdo con el primer aspecto. Para asegurar la expresión óptima, el DNA codificante se puede también modificar adecuadamente, por ejemplo, añadiendo secuencias reguladoras y/o secuencias de direccionamiento adecuadas y/o haciendo coincidir la secuencia de DNA codificadora con el uso de codones preferidos del hospedante elegido. La secuencia de direccionamiento puede 20 codificar una extensión C-terminal que dirige el canal iónico inducible por luz a un sitio o compartimento particular dentro de la célula, tal como a la sinapsis o a un sitio post-sináptico, al cono del axón o al retículo endoplasmático. El ácido nucleico puede ser combinado con otros elementos, por ejemplo, un promotor y una señal de comienzo y parada de la transcripción y una señal de comienzo y parada de la traducción y una señal de poliadenilación con el fin de proporcionar la expresión de la secuencia de la proteína de la invención. El promotor puede ser inducible o 25 constitutivo, promotor general o específico de la célula. Un ejemplo de un promotor específico de la célula es el promotor mGlu6 específico para las células bipolares. La selección de promotores, vectores y otros elementos es una cuestión de diseño habitual dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica. Muchos de tales elementos están descritos en la bibliografía y disponibles en proveedores comerciales.

30 En consecuencia, en un cuarto aspecto, la invención proporciona un vector de expresión, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el canal iónico inducible por luz de acuerdo con el primer aspecto o la construcción de ácidos nucleicos de acuerdo con el tercer aspecto. En una realización preferida, el vector es adecuado para terapia génica, en particular, en la que el vector es adecuado para la transferencia génica mediada por virus. La expresión "adecuado para la transferencia génica mediada por virus" significa en la presente memoria que dicho vector puede ser empaquetado en un virus y por lo tanto ser suministrado al sitio o a las células de interés. Ejemplos 35 de virus adecuados para la terapia génica son retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, lentivirus, virus de la viruela, alfa-virus, virus de la rabia, virus del bosque Semliki y virus del herpes. Estos virus se diferencian en lo bien que transfieren genes a las células que reconocen y en la capacidad de infectarlas y si alteran el DNA de la célula de forma permanente o temporal. Sin embargo, la terapia génica también abarca métodos no virales, tales como la aplicación de DNA desnudo, lipoplexos (lípidos catiónicos) y poliplexos, y dendrímeros.

40 Como se describió anteriormente, la secuencia de ácidos nucleicos resultante se puede introducir en células, por ejemplo, utilizando un virus como vehículo o por transfección, incluyendo, por ejemplo, transfectantes químicos (tales como Lipofectamina, Fugeno, etc.), electroporación, co-precipitación con fosfato de calcio y difusión directa del DNA. Un método para transfectar una célula se detalla en los ejemplos y puede ser adaptado a la célula receptora respectiva. La transfección con DNA produce células o líneas celulares estables, si el DNA transfectado se integra en el 45 genoma, o células o líneas celulares inestables (transitorias) cuando el DNA transfectado existe en una forma extracromosómica. Además, se pueden obtener líneas celulares estables usando plásmidos episomales replicantes, lo que significa que la herencia del plásmido extracromosómico es controlada por elementos de control que están integrados en el genoma de la célula. En general, la selección de un vector o plásmido adecuado depende de la célula hospedante pretendida.

50 Por lo tanto, en un quinto aspecto, la invención se refiere a una célula que comprende la canalrodopsina de acuerdo con el segundo aspecto, la construcción de ácidos nucleicos de acuerdo con el tercer aspecto o el vector de expresión de acuerdo con el cuarto aspecto.

55 Como se describirá a continuación, una aplicación del canal iónico mutante inducible por luz de acuerdo con la presente invención es el tratamiento de sujetos ciegos, tales como seres humanos o animales. Hay una serie de enfermedades en las que las células visuales naturales ya no funcionan, pero todas las conexiones nerviosas son capaces de continuar funcionando. Hoy en día, se está tratando en diversos centros de investigación de implantar en la

retina películas delgadas con fotocélulas cerámicas artificiales. Estas fotocélulas están destinadas a despolarizar las células secundarias, todavía intactas de la retina, y por lo tanto a desencadenar un impulso nervioso (ojos biónicos). La expresión deliberada de los canales iónicos controlados por luz de acuerdo con la invención en estas células ganglionares, células amacrinas o células bipolares, sería una solución mucho más elegante y permitiría una mayor resolución visual tridimensional.

La incorporación del canal iónico mutante inducible por luz en la membrana de las células que no expresan los canales correspondientes en la naturaleza puede ser, por ejemplo, efectuada sencillamente, porque utilizando procedimientos conocidos de tecnología de DNA recombinante, el DNA que codifica este canal iónico se incorpora primeramente en un vector de expresión adecuado, por ejemplo, un plásmido, un cósmido o un virus, las células diana se transforman luego con dicho vector y la proteína se expresa en este hospedante. A continuación, las células se tratan de una manera adecuada, por ejemplo, con retinal, para permitir el enlace de una base de Schiff entre la proteína y el retinal.

En una realización preferida, esto se produce en diversas levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* o *Pichia pastoris*, como ya se ha realizado con éxito para rodopsinas, tales como bacteriorodopsina y/o rodopsina bovina.

La expresión se puede efectuar también en ciertos sistemas de células de mamífero o sistemas de células de insectos. Así, en una realización preferida, la célula es una célula de mamífero o una célula de insecto. La expresión se efectúa ya sea con vectores episomales como expresión transitoria, preferiblemente en células de melanoma (por ejemplo, la línea celular BLM), células COS (generadas por la infección de "células CV1 de riñón de mono verde africano") o células HEK ("células renales embrionarias humanas", por ejemplo, células HEK293), o células BHK ("células de riñón de cría de hámster") o en la forma de expresión estable (por integración en el genoma) en células CHO ("células de ovario de hámster chino"), células de mieloma o células MDCK ("células de riñón canino Madine-Darby") o en células de insecto Sf9 infectadas con baculovirus. Por consiguiente, en una realización más preferida, la célula de mamífero es una célula COS; una célula BHK; una célula HEK293; una célula CHO; una célula de mieloma; o una célula MDCK.

En el contexto de restauración de la visión, en una realización más preferida, la célula de mamífero es una célula fotorreceptora; una célula bastón de la retina; una célula cono de la retina; una célula ganglionar de la retina; una neurona bipolar; una célula ganglionar; una neurona pseudounipolar; una neurona multipolar; una neurona piramidal, una célula de Purkinje; o una célula granular.

Una neurona es una célula eléctricamente excitable que procesa y transmite información por señalización eléctrica y química, en la que la señalización química se produce a través de las sinapsis, que son conexiones especializadas con otras células. Existe cierto número de tipos especializados de neuronas, tales como las neuronas sensoriales que responden al tacto, al sonido, a la luz y a otros numerosos estímulos que afectan a las células de los órganos sensoriales, neuronas motoras que reciben señales del cerebro y de la médula espinal y que causan contracciones musculares y que afectan a las glándulas, y las interneuronas que conectan las neuronas a otras neuronas dentro de la misma región del cerebro o de la médula espinal. Generalmente, una neurona posee un soma, dendritas y un axón. Las dendritas son filamentos que surgen del cuerpo celular, frecuentemente se extienden cientos de micrómetros y se ramifican múltiples veces. Un axón es un filamento celular especial que surge desde el cuerpo celular en un sitio llamado el cono axónico. El cuerpo celular de una neurona da lugar con frecuencia a múltiples dendritas, pero nunca a más de un axón, aunque el axón puede ramificarse cientos de veces antes de que termine. En la mayoría de las sinapsis, las señales se envían desde el axón de una neurona a una dendrita de otra. Sin embargo hay muchas excepciones a estas reglas: neuronas que carecen de dendritas, neuronas que no tienen axón, sinapsis que conectan un axón a otro axón o una dendrita a otra dendrita, etc. La mayoría de las neuronas se pueden caracterizar además anatómicamente como unipolares o pseudounipolares (la dendritas y el axón emergen de un mismo proceso), bipolares (axón y una sola dendrita en los extremos opuestos del soma), multipolares (que tienen más de dos dendritas) y además se pueden clasificar como: (i) neuronas de Golgi I con procesos axonales con salientes largos, tales como las células piramidales, las células de Purkinje y las células del cuerno anterior y (ii) neuronas de Golgi II: neuronas cuyo proceso axonal sobresale localmente, por ejemplo, las células granulares.

Una célula fotorreceptora es una neurona especializada que se encuentra en la retina y que es capaz de fototransducción. Las dos células fotorreceptoras clásicas son bastones y conos, contribuyendo cada una a la información utilizada por el sistema visual. Una célula ganglionar de la retina es un tipo de neurona situada cerca de la superficie interna de la retina del ojo. Estas células tienen dendritas y axones largos que sobresalen del *protectum* (cerebro medio), el núcleo supraquiasmático en el hipotálamo y el cuerpo geniculado lateral (tálamo). Un pequeño porcentaje contribuye poco o nada a la visión, pero por sí mismas son fotosensibles. Sus axones forman el tracto retinohipotalámico y contribuyen a los ritmos circadianos y al reflejo pupilar a la luz y al cambio de tamaño de la pupila. Reciben la información visual de los fotorreceptores a través de dos tipos de neuronas intermedias: las células bipolares y las células amacrinas. Las células amacrinas son interneuronas de la retina y son responsables del 70% de la entrada a las células ganglionares de la retina. Las células bipolares, que son responsables del otro 30% de la entrada a los ganglios de la retina, son reguladas por las células amacrinas. Como parte de la retina, la célula bipolar existe entre los fotorreceptores (células bastones y células conos) y las células ganglionares. Dichas células actúan, directa o indirectamente, para transmitir señales desde los fotorreceptores a las células ganglionares.

La célula puede ser aislada (y modificada genéticamente), mantenida y cultivada a una temperatura y con una mezcla de gases apropiadas (típicamente, 37°C, 5% de CO₂), opcionalmente en una incubadora de células, como es conocido por los expertos y como es ilustrado en los ejemplos por ciertas líneas celulares o tipos de células. Las condiciones de cultivo pueden variar para cada tipo de célula y la variación de las condiciones para un tipo de célula particular puede dar como resultado diferentes fenotipos. Aparte de la temperatura y la mezcla de gases, el factor más usualmente variado en sistemas de cultivos celulares es el medio de crecimiento. Las recetas para medios de crecimiento pueden variar en pH, concentración de glucosa, factor de crecimiento y la presencia de otros componentes nutrientes, entre otros. Los medios de crecimiento están disponibles comercialmente o se pueden preparar de acuerdo con composiciones que son obtenibles en The American Tissue Culture Collection (ATCC). Los factores de crecimiento utilizados para medios de complementos proceden frecuentemente de sangre de animales, tales como suero de ternera. Además, se pueden añadir antibióticos a los medios de crecimiento. Entre las manipulaciones usuales realizadas en células de cultivo están los cambios de medios y el pasaje de células.

Hay campos potenciales adicionales de aplicación para CatCh. Puesto que el Ca⁺⁺ es un importante regulador intracelular, la CatCh abre las puertas a la intervención óptica en la homeostasis de Ca⁺⁺ de ajuste fino de la célula, modulando su estado y actividad. En investigación básica, la CatCh se puede utilizar para controlar ópticamente la exocitosis dependiente de Ca⁺⁺ como una alternativa al Ca⁺⁺ enjaulado²⁶ (por ejemplo, la liberación de transmisores en la sinapsis), para activar ópticamente procesos intracelulares aguas abajo a través de quinasas y fosfatasa activadas por calcio o para inducir apoptosis dirigiendo la CatCh a compartimentos intracelulares, tales como el aparato de Golgi o el retículo endoplasmático.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención es el uso como medicamento del canal iónico inducible por luz de acuerdo con el primer aspecto o la canalrodopsina de acuerdo con el segundo aspecto o la construcción de ácidos nucleicos de acuerdo con el tercer aspecto o la célula de acuerdo con la invención. En particular, el vector de expresión de la invención se puede utilizar en terapia génica. Más específicamente, el canal iónico inducible por luz de acuerdo con el primer aspecto, la canalrodopsina de acuerdo con el segundo aspecto, la construcción de ácidos nucleicos de acuerdo con el tercer aspecto o la célula de acuerdo con la invención se pueden utilizar en el tratamiento de la ceguera o vista reducida. Sin embargo, debido a su inicio rápido del pico de acción de hasta 300 Hz y la repolarización acelerada, también se contempla el uso del canal iónico inducible por luz en el restablecimiento de la audición o el tratamiento de la sordera.

Además, el canal iónico mutante inducible por luz de acuerdo con el primer aspecto puede comprender sustituciones adicionales (llamados SFO, o mutantes lentos, véase la Tabla 1), que conducen a una afluencia de calcio inducida por luz permanente, que a su vez conduce a la muerte celular. Por consiguiente, se contempla el uso en la ablación de células cancerosas del canal iónico inducible por luz de acuerdo con la invención, que tiene, además, treonina, serina o alanina en una posición correspondiente a la posición 128 de la SEQ ID NO: 1; y/o alanina en una posición correspondiente a la posición 156 de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el vector de expresión de acuerdo con la invención podría ser dirigido a las células cancerosas por transferencia de genes, mediada por virus mediante un marcador de superficie de células cancerosas. Además, se observa que en particular los retrovirus se integran preferiblemente en células que se dividen rápidamente, como las células cancerosas. Como consecuencia de ello, el canal iónico inducible por luz de acuerdo con la presente invención se expresa y se incorpora predominantemente en la membrana celular de las células cancerosas. Tras la estimulación por la luz, estos canales iónicos se abrirán e inducirán una afluencia permanente de calcio, lo que conduce a la muerte de la célula cancerosa. Dicho uso es particularmente ventajoso en la ablación de las células cancerosas que están naturalmente expuestas a la luz, tales como células cancerosa de melanoma. Por lo tanto, en una realización preferida, el cáncer es un melanoma.

En un aspecto final, la invención se refiere a un uso de un canal iónico inducible por luz de acuerdo con el primer aspecto o a una canalrodopsina de acuerdo con el segundo aspecto o a una célula de acuerdo con la invención en un cribado de alto rendimiento. Un cribado de alto rendimiento (abreviadamente HTS, por la expresión inglesa *High-Throughput Screening*), es un método de experimentación científica especialmente utilizado en el descubrimiento de fármacos y relevante para los campos de la biología y la química. El HTS permite a un investigador realizar eficazmente millones de ensayos bioquímicos, genéticos o farmacológicos en un corto período de tiempo, frecuentemente por medio de una combinación de modernos robots, procesamiento de datos y programas informáticos de control, dispositivos de manejo de líquidos y detectores sensibles. Por este proceso, se pueden identificar rápidamente agentes activos que modulan una vía biomolecular particular; particularmente, una sustancia modificadora de un canal iónico, tal como el canal iónico inducible por luz de acuerdo con la invención, un canal de potasio inducible por Ca⁺⁺ o un canal BK. Por ejemplo, se podrían co-expresar el canal de potasio inducible por Ca⁺⁺ y el canal iónico inducible por luz en una célula hospedante. Por estimulación con luz, el canal inducible por luz se abrirá y aumentará la concentración de Ca⁺⁺ intracelular, activando de este modo el canal de potasio. Por lo tanto, se recibirá un cambio en el potencial de membrana, que puede ser monitorizado por colorantes sensibles al potencial, tales como RH 421 (la sal interna N-(4-sulfobutil)-4-(4-(4-(dipentilamino)fenil)butadienil)piridinio). Dicho HTS puede comprender por lo tanto las siguientes etapas: (i) poner en contacto una célula que expresa un canal (de potasio) inducible por Ca⁺⁺ y el canal iónico inducible por luz de acuerdo con la invención con un agente candidato dirigido contra el canal inducible por Ca⁺⁺; (ii) aplicar un estímulo luminoso con el fin de inducir el canal inducible por luz; (iii) determinar la alteración del potencial de membrana (señal mixta); y (iv) comparar la señal determinada en la etapa (iii) con la señal determinada en una célula que expresa solamente el canal iónico inducible por luz de acuerdo con la invención so-

metida a la etapa (ii) (señal única). Una reducción en el cambio del potencial de membrana sería indicativa de un modulador prometedor del canal (de potasio) inducible por Ca^{++} . Se supone que dicho método proporciona una relación señal-ruido de aproximadamente 5:1, que es bastante mejor en comparación con las mediciones directas realizadas sobre una célula que expresa solamente el canal inducible por Ca^{++} . Debido a la mejor relación señal-ruido, dicho método, en particular, que usa el canal iónico inducible por luz, puede ser particularmente adecuado para el HTS.

En esencia, el HTS utiliza un método para recoger una gran cantidad de datos experimentales sobre el efecto de una multitud de sustancias sobre una diana particular en un tiempo relativamente corto. Un cribado, en este contexto, es el experimento mayor, con un único objetivo (por lo general probar una hipótesis científica), al que posteriormente se pueden aplicar todos estos datos. Para el HTS, las células de acuerdo con la invención pueden ser sembradas en una placa de tejidos, tal como una placa de pocillos múltiples, por ejemplo, una placa de 96 pocillos. A continuación, la célula situada en la placa se pone en contacto con la sustancia de ensayo durante un tiempo suficiente para que interactúe con el canal iónico diana. La sustancia de ensayo puede ser diferente de un pocillo a otro pocillo de la placa. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se toman mediciones en todos los pocillos de la placa, ya sea manualmente o por una máquina y, opcionalmente, se comparan con las mediciones de una célula que no haya sido puesta en contacto con la sustancia de ensayo. Pueden ser necesarias mediciones manuales cuando el investigador está utilizando pinzas de parche, en busca de efectos que no se han implementado todavía en rutinas automatizadas. Por otra parte, una máquina de análisis automático especializado puede realizar una serie de experimentos en los pocillos (tales como el análisis de luz de una frecuencia particular o una medición con pinzas de parche de alto rendimiento). En este caso, la máquina proporciona el resultado de cada experimento, por ejemplo, como un conjunto de valores numéricos, representando cada número en un mapa el valor obtenido de un solo pocillo. Dependiendo de los resultados de este primer ensayo, el investigador puede realizar el seguimiento de los ensayos dentro del mismo cribado usando sustancias similares a las identificadas como activas (es decir, modificando un nivel de nucleótido cíclico intracelular) en nuevas placas de ensayo, y volviendo luego a realizar el experimento para recoger más datos, optimizando la estructura del agente químico para mejorar el efecto del agente sobre la célula. La automatización es un elemento importante en la utilidad del HTS. Un robot especializado es frecuentemente responsable de gran parte del proceso durante la vida útil de una placa de ensayo individual, desde la creación hasta el análisis final. Un robot para realizar un HTS generalmente puede preparar y analizar simultáneamente muchas placas, lo que acelera aún más el proceso de recopilación de datos. Ejemplos de aparatos adecuados para HTS, de conformidad con la presente invención comprenden un lector de placas para imágenes fluorométricas (FLIPR™; Molecular Devices), FLEXstation™ (Molecular Devices), un lector de sonda iónica de voltajes (VIPR, Aurora Biosciences), Attofluor® Ratio Vision® (ATTO).

A continuación la presente invención se ilustra mediante las figuras y ejemplos que no se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1- Modelo de homología de ChR2 basado en la estructura de la rodopsina sensorial 2 (PDB código 1H2S). La región diana para la exploración de cisteína (R115 a T139) está situada en la hélice transmembranal 3 (TM3) y está resaltada en rojo. El recuadro muestra la presumible localización de la L132C mutada, las C128 y D156 unidas por hidrógeno, conectando TM3 y TM4 como se indica por la línea de puntos, y los residuos homólogos para el donador de protones (H134) y el aceptor de protones (E123), respectivamente. El cromóforo está formado por retinal todo-*trans* (ATR) y K257 unidos covalentemente por una base de Schiff. La cavidad formada por la eliminación de los grupos metilo de las leucinas está representada como esferas y superpuesta sobre el grupo sulfhidrilo mutado del residuo de cisteína (bola amarilla). La figura se preparó con VMD³⁰.

Figura 2 - Caracterización biofísica de CatCh en células HEK293 y oocitos de *Xenopus*. **(a)** Izquierda, resumen de las amplitudes de la corriente en estado estacionario en respuesta a impulsos de luz azul de 500 ms medidos en células HEK293 a -60 mV que expresan CatCh (en negro) y ChR2 WT (en rojo), mostradas como el valor medio \pm d.t. (n = 6). Derecha, comparación de la cinética de desbloqueo de fotocorrientes normalizadas en corrientes en estado estacionario. **(b)** Izquierda, fotocorrientes reales en respuesta a impulsos de luz azul de 473 nm de 1 s. Las líneas están normalizadas para la amplitud máxima de fotocorriente para ilustrar el aumento de la relación corriente en estado estacionario a corriente máxima en CatCh (en negro) en comparación con ChR2 WT (en rojo). Derecha, comparación de la cinética de bloqueo de fotocorrientes normalizadas a corrientes máximas. **(c)** Respuestas a la luz de 473 nm de CatCh y ChR2 WT que expresan oocitos de *Xenopus* en Ca^{++} extracelular 80 mM (pH 9) a -120 mV (líneas inferiores continuas). La inyección de BAPTA quelante de Ca^{++} a una concentración citosólica final de 1 mM suprimió las corrientes superpuestas de los canales intrínsecos de cloruro activados por Ca^{++} , mientras que permanecieron las corrientes residuales de canalrodopsina Ca^{++} (líneas superiores discontinuas). Las corrientes estaban normalizadas para la corriente máxima de ChR2 WT y son típicas de otros seis experimentos. Obsérvese la mayor diferencia de amplitud de fotocorrientes de CatCh antes y después de la inyección de BAPTA, lo que indica su mayor permeabilidad a Ca^{++} en comparación con ChR2 WT. **(d)** Características del flujo de iones de CatCh en las células HEK293 a -80 mV (n = 6, véanse los métodos). **(e)** Relaciones corriente-voltaje de ChR2 WT (- ■ -) y CatCh (- ▲ -) en CaCl_2 90 mM en comparación con NaCl 140 mM (- ● -, ChR2 WT y CatCh superpuestas). Corrientes normalizadas a la corriente de ChR2 WT a -100 mV. El potencial inverso de CatCh en CaCl_2 está desplazado hacia los

potenciales positivos, lo que indica un aumento de la permeabilidad de Ca^{++} (valor medio \pm d.t., $n = 5$). **(f)** Mediciones con Fura-2 de la afluencia de Ca^{++} en células HEK293 que expresan ChR2 WT (\bullet) y CatCh (\blacksquare) a 10 s de luz de 460 nm (barra azul) en presencia de Ca^{++} extracelular 90 mM ($n=10$) que muestran una elevación cuatro veces mayor de Ca^{++} intracelular en CatCh (células HEK293 no transfectadas de control, \blacktriangle).

5 **Figura 3** - Expresión de CatCh en neuronas cultivadas de hipocampo. **(a)** Imagen confocal de una neurona de hipocampo cultivada que expresa ChR2 (L132C)-2A-EGFP bajo el promotor CAG. Barra a escala 20 μm . **(b)** Comparación de fotocorrientes típicas de CatCh (en negro) y ChR2 WT (en rojo) provocadas por un impulso de 600 ms de luz azul de 473 nm ($J_{473\text{nm}} 1 \times 10^{19}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$). **(c)** Resumen de las amplitudes de corrientes en estado estacionario (-60 mV, $n = 6$).

10 **Figura 4** - Fotoestimulación neural rápida y de alta sensibilidad. **(a-d)** Registros representativos con pinzas amperimétricas de células completas de una neurona de hipocampo que expresa CatCh en respuesta a impulsos de luz de 2 s. **(a)** La intensidad de la luz de 473 nm requerida para la ChR2 WT induce un bloque de despolarización ($J_{473\text{nm}} 2,5 \times 10^{17}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$). **(b)** Reduciendo la intensidad de luz se restablece el disparo ($J_{473\text{nm}} 2,5 \times 10^{16}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$). **(c)** Curva de ajuste de la luz representativa para un disparo de los picos ($J_{\text{max}} 9,7 \times 10^{16}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$, valor medio \pm d.t., 2 experimentos). **(d)** La iluminación verde moderada de 532 nm también provoca trenes de potenciales de acción ($J_{532\text{nm}} 2,5 \times 10^{17}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$). **(e)** Latencia máxima de impulso a pico de la luz a través de trenes de impulsos de luz que consisten en 25 impulsos de luz de 473 nm y 1 ms ($J_{473\text{nm}} 3 \times 10^{18}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$, valor medio \pm d.t., [inestabilidad]), en Ca^{++} extracelular 2 mM (\blacksquare) y como control a 5 Hz en Mg^{++} extracelular 3 mM (\blacksquare), lo que aumenta la latencia hasta valores similares a los de ChR2 WT. **(f)** Disparo de los picos en respuesta a impulsos de 473 nm y 1 ms a una frecuencia de 50 Hz ($J_{473\text{nm}} 2,8 \times 10^{19}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$) y **(g)** en respuesta a impulsos de luz de 473 nm y 10 ns a 10 Hz ($J_{473\text{nm}} 1,1 \times 10^{25}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$). **(h)** Repolarización incompleta de membranas (flecha de doble punta), debido a la inhibición de los canales BK por TEA 1 mM. Superposición del 3er pico del tren de impulsos (en negro), 1er pico (en rojo) y 3er pico (en azul) después de la aplicación de TEA ($J_{473\text{nm}} 1,8 \times 10^{18}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$). **(i)** La sustitución de Ca^{++} por Mg^{++} en la solución extracelular ralentiza la repolarización de los picos y causa la despolarización prolongada (5 Hz, izquierda) y la formación de múltiples picos a mayores frecuencias (20 Hz, derecha) ($J_{473\text{nm}} 8,3 \times 10^{18}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$).

Figura 5 - Caracterización espectroscópica de CatCh. Después de excitación con luz, la CatCh mutante (líneas negras) entra en un fotociclo comparable al de la ChR2 WT (líneas rojas) en cinética y en presencia de compuestos fotointermedios. La figura representa los cambios espectrales después de excitación con luz de 450 nm con las longitudes de onda características para la base de Schiff desprotonada, P390 (381 nm, panel superior), para P520, dominante en el estado abierto (541 nm, segundo panel) y para el estado fundamental (440 nm, tercer panel). El primer compuesto intermedio desplazado al rojo, presumiblemente P500, no se resuelve y sólo se detecta como desfase. Las base de Schiff se desprotona en la escala de tiempo de microsegundos ($\tau = 50 \mu\text{s}$), un evento que es escasamente observable debido a la baja amplitud a 381 nm, simultáneo con un aumento a 541 nm. El aumento del compuesto intermedio P520 se produce en el proceso siguiente ($t = 1,5 \text{ ms}$), antes de que se descomponga ($t = 9 \text{ ms}$) poblando con ello una segunda especie duradera (P480). El estado fundamental (D470) revierte en el proceso siguiente ($t = 10 \text{ s}$). Las transiciones en el fotociclo se parecen a las observadas en la ChR2 WT. En cuanto a la cinética de apertura y cierre en las mediciones de corriente, la mutación no causa cambios importantes en los estados funcionales. El estado abierto es determinado principalmente por el compuesto intermedio P520. La principal diferencia se encuentra en el grado de la amplitud de P390 en comparación con P520 que es inferior a la de la ChR2 WT. Por consiguiente, la mutación en L132C no afecta a la reacción a la luz en el sitio cromóforo. Observese que los datos espectroscópicos de la cinética del fotociclo no se alteraron en presencia de Ca^{++} 50 mM.

Figura 6 - Espectro de acción de CatCh determinado por una pinza de voltaje de dos electrodos en oocitos de *Xenopus*. Se midieron las amplitudes de corriente a diferentes longitudes de onda (λ) en ausencia de Ca^{++} (como se indica en los ejemplos), normalizadas al flujo de fotones ($n = 6$). Comparación del estado fundamental (-) y el espectro de acción (\blacksquare).

Figura 7- Cambios de potenciales de superficie inducidos por Ca^{++} . Se sabe, que la caída de voltaje a través de la membrana depende de la diferencia de potencial aplicada (Ψ) y es modificada por el potencial de superficie (Φ_0). En general Φ_0 depende de la densidad de carga negativa de la superficie, que puede ser modificada por apantallamiento con contraiones. Por consiguiente, la activación de los canales de sodio regulados por voltaje (y otros canales sensibles al voltaje) puede ser influenciada por el cambio de la carga superficial, sobre el lado externo o interno de la membrana¹⁸. En nuestro caso, el Ca^{++} conducido a través de CatCh neutraliza las cargas negativas de superficie sobre la cara interna de la membrana de la neurona. Por esto es inducido un efecto despolarizante sobre el potencial de membrana, lo que conduce a la inducción de potenciales de acción a menores intensidades de luz. Un dibujo esquemático de este mecanismo se representa en a-c (según Hille 2001). **(a)** En la oscuridad, se cierra el canal de CatCh, la diferencia de potencial sobre la membrana, E_M (potencial externo aplicado), es equivalente al potencial de la membrana en reposo (aquí ajustado a -60 mV). Por simplicidad, Φ_0 se ajustó a Φ_0^* . **(b)** Por activación con luz de CatCh, se produce una afluencia usual de Na^+ despolarizante de la membrana. Sin embargo, el Ca^{++} adicional que entra en la neurona aumenta el potencial de superficie en la cara interna de la membrana (Φ_0''). Cuanto mayor sea la afluencia de Ca^{++} , más positivo será Φ_0'' (indicado por la flecha de doble punta) y menor la caída de voltaje a través de la membrana. Esto facilita la activación de los canales de sodio regulados por voltaje. **(c)** Sustituyendo

Ca⁺⁺ extracelular por Mg⁺⁺, que no permea CatCh y está ya presente a ~4 mM en el citosol, sólo se produce un efecto despolarizante menor. Esto es debido a una unión más débil de Mg⁺⁺ al lado extracelular de la membrana en comparación con Ca⁺⁺, lo que disminuye ligeramente el potencial de la superficie extracelular Φ_0 . Obsérvese que el efecto despolarizante del potencial de superficie aumenta al disminuir la pendiente de la caída de voltaje a través de la membrana.

EJEMPLOS

Construcción y caracterización biofísica de CatCh

En contraste con los métodos anteriores, el objetivo de los inventores era identificar residuos dentro de ChR2 WT cuyas mutaciones modifican la permeabilidad de los cationes. Los inventores se centraron en el tercer dominio transmembranal puesto que diversos residuos mutados dentro de este dominio han demostrado que alteran el fotociclo y la regulación del canal (Fig.1) ^{5-7,12}. Cada residuo desde Arg¹¹⁵ hasta Thr¹³⁹ fue sustituido individualmente por cisteína y analizado para cambios funcionales en oocitos de *Xenopus laevis*.

Espectroscopía. Se expresó y purificó CatCh en *Pichia pastoris* como se ha descrito anteriormente. ^{5,13} Se realizaron estudios de fotólisis súbita y se midieron los cambios de absorbancia después de excitación con un destello de láser de 10 ns desde un láser de colorante bombeado por excímero (450 nm, 2-3 mJ) ¹³.

La mutación en L132C (CatCh) muestra alteraciones significativas en la amplitud y forma de las líneas de corriente.

Cultivo y biología molecular de células HEK293. Se transfectó ChR2(L132C)-YFP truncada en el extremo C (vector: pcDNA3(-)-chop2-309-(L132C)-EYFP) en células HEK293 y se mantuvo bajo selección de G418 en todo momento (0,6 mg/mL; PAA Alemania, Cölbe, Alemania). Para la ChR2 WT de tipo natural, la ChR2-YFP truncada en el extremo C (vector: pcDNA4TO-chop2-309-EYFP) se transfectó establemente en células HEK293-Trex (Invitrogen), se cultivó y se indujo como se ha descrito ¹³. Se determinó el pico en las relaciones estacionarias a partir de células HEK293 transfectadas transitoriamente (Effectene, QIAGEN) con construcciones pcDNA3.1(-)-ChR2-YFP optimizadas con codones humanos (WT, H134R o L132C) 24 horas antes de las mediciones.

Registros electrofisiológicos en células HEK293. Se fabricaron pipetas de parche con resistencias de 2-4 M Ω a partir de vidrio de borosilicato de paredes delgadas (GB150-8P, Science Products, Hofheim, Alemania) en un tirador horizontal DMZ-Universal (nº de serie 5318904120B, Zeitz-Instruments, Augsburg, Alemania). Se registraron las fotocorrientes con el método de pinza de parche de células completas y se activaron por impulsos de luz procedentes de un láser de estado sólido bombeado por diodos (Pusch Opto Tech GmbH, Baden-Baden, Alemania; $\lambda = 473$ nm) enfocados en una fibra óptica de 400 μ m. Se aplicaron impulsos de luz por un obturador rápido controlado por ordenador (Uniblitz LS6ZM2, Vincent Associates). Todas las intensidades de luz dadas se miden al final de la guía de luz. Para obtener un valor estimado de la permeabilidad para diferentes cationes, los inventores midieron las relaciones fotocorriente-voltaje y determinaron el potencial inverso. La solución intracelular contenía NaCl 140 mM, EGTA 7 mM, MgCl₂ 2 mM y Tris 10 mM (pH = 9) y la solución extracelular contenía NaCl 140 mM, MgCl₂ 2 mM y Tris 10 mM (pH = 9). Para las permeabilidades a los cationes, se intercambié NaCl 140 mM externo por KCl 140 mM, CaCl₂ 90 mM o MgCl₂ 90 mM, respectivamente. Se determinaron las permeabilidades a los protones a partir del desplazamiento del potencial inverso de la relación corriente-voltaje cuando el pH se redujo de 9 a 7,4 (o 6). Las relaciones de permeabilidad se calcularon de acuerdo con la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK), incluyendo los términos para Na⁺, K⁺, H⁺ y Ca⁺⁺.

En células HEK293, las corrientes estacionarias inducidas por luz azul de CatCh tenían una amplitud ~2,5 veces mayor en comparación con la de ChR2 WT, 24 horas después de la transfección (CatCh: 25,0 \pm 8,8 pA/pF; ChR2 WT: 10,1 \pm 4,1 pA/pF, valor medio \pm d.t., n = 6, -60 mV, Fig. 2a). La relación entre la corriente en estado estacionario y la corriente máxima aumentó también desde 0,37 \pm 0,18 en la ChR2 WT hasta 0,71 \pm 0,16 en CatCh (Fig. 2b). Durante la estimulación repetitiva con luz azul desapareció la corriente máxima de CatCh. Se recuperó en pocos minutos en la oscuridad, cuando la recuperación no fue inducida prematuramente por luz amarilla. En contraste, una recuperación completa de la corriente máxima de ChR2 WT bajo condiciones idénticas llevó 20 segundos ¹³. Las constantes de tiempo de activación y desactivación de CatCh ($\tau_{on} = 590 \pm 3$ μ s, $\tau_{off} = 15 \pm 2$ ms, n = 9, pH 7,4, -60 mV, valor medio \pm d.t.) eran ligeramente mayores en comparación con las de ChR2 WT ($\tau_{on} = 214 \pm 2$ μ s, $\tau_{off} = 10 \pm 1$ ms, n = 9, pH 7,4, -60 mV; valor medio \pm d.t.; Figs. 2a, b, Fig. 5 panel inferior, Tabla 1).

A continuación, los inventores compararon los efectos descritos sobre las propiedades de los canales con los cambios espectrales en el fotociclo. Los experimentos de fotólisis por destello en CatCh purificada revelaron sólo desviaciones menores con relación a los espectros de ChR2 WT ¹³ (véase la Fig. 5). 1. El compuesto intermedio temprano P390, que representa la base de Schiff desprotonada, es escasamente detectable. 2. El compuesto intermedio P520, que representa el estado abierto del canal, muestra un tiempo útil ligeramente alargado de 9 ms, comparable con el valor τ_{off} determinado electrofisiológicamente. Se obtuvieron valores de tiempos útiles abiertos similares para el H134R mutante, que mostró el doble de actividad en la conductancia unitaria no modificada ^{2,14}. Por lo tanto, también en el caso de CatCh, la cinética desacelerada del estado abierto podría ser responsable del aumento de 2,5 veces de las corrientes estacionarias medidas en células HEK293, por lo que la conductancia unitaria permanece

inalterada. Esto fue confirmado midiendo la conductancia de un solo canal de CatCh utilizando el análisis de ruido estacionario como se ha descrito anteriormente ¹⁴.

Análisis del ruido. Se realizaron experimentos en células HEK293 como se ha descrito anteriormente ¹⁴ y realizados a temperatura ambiente (23°C). La solución de la pipeta contenía guanidina-HCl 1 mM, NMG-Cl (N-metilglucamina) 199 mM, EGTA 10 mM, MgCl₂ 2 mM y Hepes 20 mM (pH 7,4), la solución del baño contenía guanidina-HCl 200 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM y Hepes 20 mM (pH 7,4). La respuesta de la corriente a un estímulo de luz azul se registró por aplicación de un protocolo en etapas del voltaje bajo condiciones de luz saturante y de nuevo bajo condiciones de luz en las que la respuesta de la corriente a -60 mV era la mitad de la corriente máxima ($I_{0,5}$; filtro de Bessel de paso bajo de 2 kHz; velocidad de muestreo: 100 kHz; diámetro de la celda: 15 μ m). Se utilizaron registros de la $I_{0,5}$ estacionaria durante iluminación prolongada (2 min) a un potencial de mantenimiento de -60 mV para estimar la conductancia del canal único (filtro de Bessel de paso bajo de 2 kHz; velocidad de muestreo 20 kHz). Alternando, se recogieron registros sin iluminación (control, 3 registros) y con iluminación (2 registros, 30 segundos después del inicio del estímulo luminoso), transformada de Fourier y la conductancia de un solo canal estimada a partir de una aproximación con una función de Lorentz (para detalles véase ¹⁴). Se eligieron las menores intensidades de luz con el fin de obtener la fluctuación máxima de la apertura y cierre del canal regulado por la luz.

En línea con los experimentos de análisis del ruido de ChR2 WT y H134R, se utilizó guanidina como ion conductor. Obsérvese que las propiedades cinéticas del canal son independientes del catión permeante ¹⁴. La evaluación de los espectros de diferencia de potencia produjo una conductancia de un solo canal y de 140 ± 5 fS ($n = 6$, -60 mV) para guanidina 200 mM a temperatura ambiente (23°C), que es similar a la conductancia de un solo canal de ChR2 WT a la temperatura ambiente extrapolada de 150 fS ¹⁴. La probabilidad de apertura de CatCh determinada a partir del análisis de ruido no está alterada en comparación con H134R ($P_o \sim 0,6$). Por lo tanto, un aumento del tiempo útil del canal abierto puede representar fácilmente el aumento observado en fotocorrientes en un factor de 2,5, sin embargo, no se puede excluir una expresión ligeramente mejorada de las copias de CatCh.

Preparación y biología molecular de oocitos de Xenopus laevis. Una variante de ChR2 truncada en el extremo C (residuos 1-315) sin residuos de cisteína expuestos extracelularmente (que contienen mutaciones C34A y C36A) se subclonó en el vector pTLN ²⁷. Se introdujeron mutaciones de una sola cisteína por mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Stratagene) y se verificó por secuenciación. El mRNA se preparó utilizando el kit SP6 mMessage mMachin (Ambion, Austin, TX). Se inyectaron 50 nL de cRNA, que incluían 30 ng de mRNA de ChR2 WT/CatCh, en cada oocito de *Xenopus*. Los oocitos se obtuvieron por tratamiento con colagenasa después de ovariectomía parcial. Después de inyección de cRNA, se incubaron los oocitos en retinal todo-trans (1 μ M, a partir de una disolución madre 1 mM en etanol) y se mantuvieron en tampón ORI (NaCl 90 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 2 mM y Mops 5 mM, pH 7,4) que contenía 1 mg/mL de gentamicina a 18°C durante dos a cuatro días.

Pinza de voltaje de dos electrodos en oocitos de Xenopus laevis. Se activaron fotocorrientes con una lámpara de 75 W de arco de xenón y un filtro de banda de 450 ± 25 nm, cuya luz se acopló en una guía luminosa de 1 mm con una producción de $\sim 10^{18}$ fotones $s^{-1} cm^{-2}$. Los espectros de acción se registraron utilizando filtros de ancho de banda estrecho (398-645 nm; ± 10 nm; serie K Balzer) en combinación con filtros de densidad neutra para lograr una producción en la fibra de $\sim 1,4 \times 10^{17}$ fotones $s^{-1} cm^{-2}$ para cada longitud de onda. Para la generación de los espectros de acción, el Ca⁺⁺ de la solución ORI fue reemplazado por Ba⁺⁺ para suprimir las corrientes de CaCC. Las amplitudes de corriente en cada longitud de onda se normalizaron para representar iguales exposiciones a fotones. A continuación, el espectro de fondo, determinado por espectroscopia se ajustó a los puntos de datos promediados. Para suprimir la activación del canal de cloruro activado por calcio (CaCC), se inyectaron en cada oocito 50 nL de una solución 20 mM del quelante rápido del Ca²⁺, 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacetato (BAPTA) (concentración final en el oocito ~ 1 mM).

La excitación de CatCh con longitudes de onda variables en oocitos de *Xenopus laevis* reveló un espectro de acción casi idéntico al espectro de ChR2 WT con una longitud de onda de excitación máxima a 474 nm (Fig.6). En presencia de Ca⁺⁺ extracelular y a potenciales de mantenimiento negativos, las corrientes de CatCh mostraron un aumento acusado en amplitud durante la iluminación debido a una corriente superpuesta exterior que se asemeja a la de los canales de cloruro activados por calcio (CaCC)^{15,16} (Fig 2c). En oocitos que expresan ChR2 WT también se observaron corrientes de CaCC, pero eran marcadamente menores que las inducidas por CatCh (Fig. 2c). Para ambas, ChR2 WT y CatCh, a un Ca⁺⁺ extracelular de 80 mM la inyección del quelante de Ca⁺⁺ rápido BAPTA, 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacetato, en la célula suprimió las corrientes de CaCC, mientras que permanecía una corriente de Ca⁺⁺ residual (Fig. 2c) ¹. La mayor diferencia de las fotocorrientes antes y después de la inyección de BAPTA para CatCh apoya la hipótesis de un aumento del flujo de Ca⁺⁺ después de la activación de CatCh.

Aumento de la permeabilidad al calcio de CatCh. Con el fin de obtener una estimación de la permeabilidad iónica de CatCh se midieron en células HEK293 la relaciones fotocorriente-voltaje y el potencial inverso para diferentes cationes. Estos experimentos revelaron que las permeabilidades para sodio, potasio y magnesio son comparables a las de ChR2 WT (Fig. 2d) ¹. La permeabilidad a protones de la CatCh ($p_H/p_{Na} = 4 \times 10^6$) es ligeramente mayor en comparación con la de ChR2 WT ($p_H/p_{Na} = 2,5 \times 10^6$). La permeabilidad a Ca⁺⁺ (p_{Ca}/p_{Na}) se determinó por el desplazamiento del potencial inverso cuando el Na⁺ 140 mM de la solución extracelular fue reemplazado por Ca⁺⁺ 90 mM. La permeabilidad relativa al Ca⁺⁺ de la CatCh aumentó desde 0,15 en ChR2 WT hasta 0,24, como se pone de manifiesto por el desplazamiento del potencial inverso (potencial bi-iónico) desde $-30,7 \pm 2,7$ mV (ChR2 WT, valor medio \pm d.t.,

n = 5) hasta $-21,6 \pm 3,8$ mV (CatCh, valor medio \pm d.t., n = 5; Fig. 2e). Para cuantificar aún más el aumento de la permeabilidad al Ca^{++} de la CatCh, se realizó la formación de imágenes con Fura-2 de calcio en células HEK293 que expresan CatCh y se comparó las relaciones medidas a 340/380 con las relaciones medidas en células que expresan ChR2 WT.

5 *Formación de imágenes con Fura-2 en células HEK293.* Se cargó Fura-2 AM (5 mM; Invitrogen) a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1 hora. Después de la carga, las células se recuperaron en una solución de NaCl 140 mM sin Ca^{++} (NaCl 140 mM, EGTA 7 mM, MgCl_2 2 mM y HEPES 10 mM). Se excitó la proteína fluorescente amarilla por una exposición de 500 ms a luz usando un filtro de 460/40 nm (Visitron Systems, Puchheim, Alemania) para estimar el nivel de expresión de cada célula por su fluorescencia de YFP. La solución se reemplazó luego por una
10 solución de Ca^{++} extracelular que consistía en CaCl_2 90 mM, EGTA 7 mM, MgCl_2 2 mM y HEPES 10 mM. Después de 15 minutos en la oscuridad, los canales regulados por luz fueron estimulados durante 10 s con luz azul (460/40 nm). Fura-2 fue excitado con 340 nm (340/20) y 380 nm (380/20) y la luz emitida (540/80 nm) se detectó con una cámara CCD (siendo todos los filtros de Visitron Systems, Puchheim, Alemania).

15 Para excluir niveles variables de expresión de proteínas como factor en la absorción de calcio, las relaciones 340/380 medidas se normalizaron al valor de la fluorescencia de YFP de cada célula individual. La Figura 2f muestra que por una fotoestimulación de 10 s con luz azul (470 nm) en solución de Ca^{++} 90 mM saturante, el aumento del Ca^{++} intracelular en las células que expresan CatCh es aproximadamente 4 veces mayor que en las células que expresan ChR2 WT.

Aplicación a las neuronas del hipocampo

20 Para analizar la idoneidad de las CatCh en aplicación neuronal, la construcción se expresó en células piramidales del hipocampo cultivadas.

25 *Cultivo de neuronas del hipocampo.* Se aislaron hipocampos de ratas Sprague-Dawley P1 postnatales (Jackson Laboratory) y se trataron con papaína (20 U mL^{-1}) durante 20 minutos a 37°C . Los hipocampos se lavaron con DMEM (Invitrogen/Gibco, con alto contenido de glucosa) complementado con 10% de suero fetal bovino y se trituraron en un pequeño volumen de esta solución. Se cultivaron en placas ~ 75.000 células en un portaobjetos de vidrio recubierto con poli-D-lisina/laminina en placas de 24 pocillos. Después de 3 horas, el medio de cultivo en placas fue reemplazado por el medio de cultivo (Neurobasal A que contenía 2% de complemento B-27, Glutamax-I 2 mM y 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin). La ChR2(L132C)-YFP y la ChR2-YFP se transfectaron 5-10 días después del cultivo en placa utilizando el reactivo lipofectamina 2000 (Invitrogen). Alternativamente, se añadieron a
30 cada pocillo $2-5 \times 10^9$ GC/mL del virus (AAV2/7-CAG-ChR2(L132C)-2A-EGFP-WPRE-bGH) 4-9 días después del cultivo en placas. La expresión llegó a ser visible 5 días después de la transducción. No se observó neurotoxicidad durante todo el cultivo (~ 5 semanas). No se añadió retinal todo-trans al medio de cultivo o medio de registro para cualquiera de los experimentos descritos.

35 *Construcción del vector viral adeno-asociado.* El potenciador temprano de citomegalovirus/promotor de β -actina de pollo (CAG) fue amplificado por PCR y se insertó en pAAV2-Rho-EGFP (amable obsequio de Alberto Auricchio²⁸) para obtener pAAV2-CAG-EGFP. El plásmido de expresión viral pAAV2-CAG-EGFP contenía además un elemento de regulación postranscripcional de marmota (WPRE) y una secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (BGH). Se construyó ChR2(L132C)-2A-EGFP (amable obsequio de Volker Busskamp - péptido autoescindible 2A/CHYSEL²⁹) por PCR con adaptador y se subclonó en pAAV2-CAG-EGFP por reemplazamiento de EGFP usando el kit de infusión de Clontech. El vector viral (pAAV2-CAG-ChR2(L132C)-2A-EGFP-WPRE-bGH)
40 fue empaquetado (serotipo 7) y purificado por afinidad en el Programa de Terapia Génica de la Universidad de Pensilvania con un título de virus infeccioso final del $2,26 \times 10^{11}$ copias del genoma/mL.

45 *Registros electrofisiológicos de neuronas del hipocampo.* Para el registro de células completas en las neuronas del hipocampo cultivadas, se llenaron pipetas de parche con resistencias de 5-10 m Ω con gluconato de potasio 129 mM, HEPES 10 mM, KCl 10 mM, MgATP 4 mM y Na_3GTP 0,3 mM, ajustada a pH 7,2. Se empleó solución de Tyrode como solución extracelular (NaCl 125 mM, KCl 2 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 1 mM, glucosa 30 mM y HEPES 25 mM, ajustada a pH 7,4). La solución extracelular nominalmente exenta de Ca^{++} contenía esta misma solución, excepto que tenía Ca^{++} 0 mM y Mg^{++} 3 mM. Los registros se llevaron a cabo en presencia de los bloqueadores de la transmisión sináptica excitadora, 1,2,3,4-tetrahidro-6-nitro-2,3-dioxo-benzof[quinoxalina-7-sulfonamida (NBQX, 10 μM , Sigma) y ácido D(-)-2-amino-5-fosfonopentanoico (AP-5, 50 μM , Sigma). Para registros con pinza de voltaje se añadió tetrodotoxina 1 μM a la solución extracelular. Para inhibir la actividad del canal BK, se añadió TEA 1 mM. Los registros se llevaron a cabo en un microscopio Zeiss Axiovert 25 invertido equipado con una lámpara de fluorescencia. El éxito de la expresión de proteínas se demostró por fluorescencia mediada por EGFP o YFP. La resistencia al acceso neuronal fue 15-40 m Ω y se monitorizó la estabilidad durante todo el experimento. Las señales electrofisiológicas fueron amplificadas utilizando un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Union City, CA), se filtraron a 10 kHz, se digitalizaron con un aparato Axon Digitdata 1600 (50 Hz) y se adquirieron y analizaron utilizando el programa informático pClamp9 (Axon Instruments). Se provocaron fotocorrientes usando impulsos de luz de diferentes longitudes procedentes de láseres de estado sólido bombeados por diodos (Pusch Opto Tech GmbH; $\lambda_1 = 473$ nm, $P_1 = 100$ mW, $\lambda_2 = 532$ nm, $P_2 = 50$ mW) o destellos de 10 ns procedentes de un láser de colorante bombeado por
60 excímero (cumarina 2, $\lambda = 450$ nm). Las intensidades de luz específicas se indican en las leyendas de las figuras y

en el texto y son intensidades en el extremo de una fibra óptica de cuarzo de 400 μm de diámetro (STE-F100/400-Y-VIS/NIR; Laser 2000, Wessling, Alemania) a una distancia de $\sim 500 \mu\text{m}$ de la célula. Las corrientes medidas de neuronas que expresan ChR2(L132C)-YFP y ChR2(L132C)-2A-EGFP fueron idénticas.

Formación de imágenes confocales. Para la formación de imágenes se fijaron portaobjetos con neuronas del hipocampo a 4°C durante 10 minutos en paraformaldehído al 4% en tampón PBS que contenía 2% de sacarosa. Las células se incubaron a continuación durante 1,5 horas en α -GFP IgG de conejo (Invitrogen, A11122), seguido por una incubación de 45 minutos en IgG de burro- α -conejo Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A21206). La inmunofluorescencia de portaobjetos montados se fotografió en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 (Zeiss, Plan-Neofluar 40 \times /0,75).

- 10 El mutante de CatCh se expresó fuertemente en cultivos de hipocampos (Fig. 3a) durante semanas sin signos de neurotoxicidad y presentó, como en las células HEK293, una mayor relación corriente en estado estacionario a máxima en registros de células completas y aproximadamente amplitudes de corriente cuatro veces mayores de $644 \pm 31 \text{ pA}$ (-60 mV , $n = 6$, valor medio \pm d.t.) en comparación con la ChR2 WT con $164 \pm 39 \text{ pA}$ (-60 mV , $n = 6$, valor medio \pm d.t.) en respuesta a luz azul de 473 nm (Fig. 3b). En el modo de pinza amperimétrica, las intensidades de luz artificialmente altas utilizadas para activar la ChR2 WT (10^{18} - 10^{19} fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$) impulsaron las células piramidales que expresan CatCh a un bloque de despolarización (Fig. 4a). Para inducir trenes de picos fiables, la intensidad de la luz se redujo en 2 unidades logarítmicas (5×10^{16} - 2×10^{17} fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$) hasta una intensidad de luz dentro del intervalo natural de la visión fotópica impulsada por los fotorreceptores en forma de cono (Fig. 4b) ¹⁷. La Figura 4c muestra una curva de afinamiento representativa para la velocidad de disparo dependiente de la intensidad de la luz de una célula piramidal. La velocidad de disparo máxima mediada es $8,2 \times 10^{16} \pm 2,5 \times 10^{16}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$ (valor medio \pm d.t., $n = 5$). La mayor eficacia de la luz sobre las neuronas que expresan CatCh facilita la activación con longitudes de onda alejadas de la sensibilidad máxima, como se ilustra para la luz verde (532 nm) en la Figura 4d. Esto puede conferir beneficios en términos de reclutamiento de tejido más eficaz con luz verde de penetración más profunda. Los inventores asignaron la sensibilidad a la luz acusadamente aumentada de las neuronas que expresan CatCh a un aumento de la permeabilidad al Ca^{++} , con lo cual se aumenta transitoriamente el potencial de superficie en la superficie de la membrana citosólica ^{10,11,18,19} (para una explicación del efecto del Ca^{++} sobre el potencial de la superficie véase la Figura 7). Durante la excitación por luz, CatCh sirve como fuente rápida del Ca^{++} unido a membrana, aumentando temporalmente la concentración de Ca^{++} en la superficie intracelular local, neutralizando de ese modo las cargas superficiales negativas (Fig. 7). Se sabe que esto provoca un desplazamiento del potencial de la superficie interna a valores más positivos despolarizando de este modo la membrana (Fig. 7) ^{11,18}. Una consecuencia es que los canales de Na^+ regulados por voltaje se activan a potenciales de membrana más negativos ¹⁸. Después de cortos impulsos de luz o después de desconectar la luz estacionaria, el Ca^{++} se equilibra rápidamente (microsegundos) dentro del citoplasma, conduciendo a una recuperación rápida y a la desaparición inmediata de potenciales de acción. Así, para CatCh, se necesitan menos fotocorriente y, posteriormente, menos luz para la iniciación de los picos en comparación con ChR2 WT. La latencia del impulsos de luz a picos en CatCh fue más rápida (~ 5 -6 ms; Figura 4e) con una inestabilidad menor que la latencia para ChR2 WT (~ 10 ms) a intensidades de luz similares ($2,8 \times 10^{18}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$) ³. Los inventores analizaron además la CatCh por su capacidad para inducir potenciales de acción individuales a estimulación por luz de alta frecuencia. Un tren de impulsos de luz azul de 473 nm de 1 ms de duración ($2,8 \times 10^{19}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$) impulsó trenes de picos 100% fiables hasta frecuencias de 50 Hz ($n = 8$; Fig. 4f - la mayoría de las células piramidales no siguen mucho más allá de 50 Hz incluso con inyección de corriente continua). La ChR2 WT, por otra parte, requiere impulsos de luz de al menos 2 ms para inducir picos de forma fiable y esto solamente hasta frecuencias de 20 Hz ¹². Los inventores impulsaron incluso más los tiempos de activación cortos de la CatCh y provocaron potenciales de acción individuales hasta frecuencias de 10 Hz por impulsos de luz azul de 10 ns ($1,1 \times 10^{25}$ fotones $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$), una duración de impulsos lo suficientemente corta sólo para inducir un único recambio en cada proteína CatCh (Fig. 4g). Sin embargo, las frecuencias de estimulación rápida también requieren una repolarización rápida de la célula después de cada pico. A pesar de una τ_{off} desacelerada de CatCh en comparación con ChR2 WT, el aumento de ~ 4 veces la afluencia de Ca^{++} durante la activación de CatCh (véase mediciones con Fura-2, Fig. 2f) parece ser suficiente para activar los canales de potasio (canales BK) de conductancia grande activados por Ca^{++} ²⁰ para repolarizar potentemente la célula a su potencial de reposo original en milisegundos después de cada potencial de acción. Para demostrar que la repolarización rápida fue mediada a través de los canales BK, los inventores añadieron 100 μM del inhibidor del canal de potasio, tetraetilamonio (TEA), a la solución extracelular y observaron la repolarización incompleta de la membrana y la generación de un potencial de meseta que aparece típicamente en los protocolos de estimulación por impulsos con la ChR2 WT ³ (Fig 4h).
- 55 En conjunto, las neuronas que expresan CatCh presentan un inicio de picos más rápido, una repolarización más rápida y una mayor sensibilidad a la luz en comparación con las células que expresan ChR2 WT (para comparación véase la Tabla 1). Experimentos de control en ausencia de Ca^{++} externo y en presencia de Mg^{++} 3 mM que tiene un efecto menos pronunciado sobre el potencial de superficie ^{11,18} (Fig. 7) y no es conducido a través de ChR2 WT ni de CatCh, apoya las interpretaciones anteriores: 1) La relación latencia de impulsos de luz a picos aumentó para valores de ChR2 WT (Figura 4e); 2) En lugar de la repolarización rápida de picos como la observada en presencia de Ca^{++} , se observó una despolarización artificial prolongada similar a la que se ve en los experimentos con ChR2 WT (Fig. 4i, izquierda); 3) En ausencia de Ca^{++} , intensidades de luz idénticas dieron como resultado una despolarización

reducida en ~10 mV en condiciones experimentales por otra parte iguales; y 4) La formación de multi-picos como se espera del tiempo abierto prolongado de la CatCh se vuelve a producir en ausencia de Ca^{++} (Fig. 4i, derecha).

Por lo tanto, los inventores han demostrado que la CatCh, una canalrodopsina con una permeabilidad elevada al Ca^{++} , empareja la mayor sensibilidad a la luz con una cinética rápida y por lo tanto supera a la ChR2 WT y a los mutantes lentos y rápidos publicados (para una comparación de las propiedades de las diferentes variantes de ChR2 véase la Tabla 1).

Conclusiones

A primera vista la CatCh, el mutante L132C de ChR2 WT, muestra resultados bastante poco espectaculares en comparación con la ChR2 WT: 1) un aumento del doble en el tiempo útil del estado abierto; 2) una descomposición desacelerada del compuesto intermedio P520 en la cinética del fotociclo; 3) una conductancia de un solo canal inalterada; y 4) un máximo de absorción desplazado marginalmente al rojo (4 nm). Un aumento de la fotocorriente 2,5 veces puede explicarse fácilmente por los parámetros medidos con un aumento no relevante en el nivel de expresión. En una segunda consideración, sin embargo, una inspección más detallada de los datos de la pinza de voltaje obtenidos de oocitos de *Xenopus laevis* que expresan CatCh dio una primera indicación hacia una elevada permeabilidad al Ca^{++} , que luego fue confirmada por la determinación de los experimentos de potenciales inversos y de formación de imágenes de calcio en células HEK293. Mirando al modelo de la Figura 1, un aumento en la permeabilidad al Ca^{++} podría ser facilitado por la formación de una estructura más flexible y por lo tanto la formación de una cavidad, como se muestra para la mutación L94A de la bomba de protones bacteriorodopsina accionada por luz (compárese con la Fig. 1) ²¹. Esta cavidad estaría localizada en un parche hidrófobo como parte de la hélice tres transmembranal (TM3) conservada, solo una vuelta helicoidal excepto C128. La manipulación de la interacción entre C128 (TM3) y D156 (TM4) desacelera acusadamente el ciclo de reacción de ChR2 ^{5,6}, un efecto que también se observó en el mutante L93A de bacteriorodopsina ^{22,23}, es decir, el residuo vecino de L94. En ChR2, la interacción de TM3 y TM4 parece afectar tanto a la regulación como a la selectividad, lo que apunta a un elemento estructural como transductor de la reacción de la luz en el poro iónico ²⁴. La inserción de cisteína más pequeña y más hidrófila podría aumentar la flexibilidad del segmento helicoidal, facilitando el acceso de Ca^{++} .

Cuando se suministró a las células piramidales del hipocampo, la CatCh presentó un aumento de ~70 veces en la sensibilidad a la luz en comparación con ChR2 WT. Por lo general, un aumento de la eficacia de la luz va acompañado de una duración de la apertura del canal fuertemente prolongada ^{2,6,13}. Este no es el caso para CatCh. La sensibilidad a la luz observada difiere notablemente de la que se ha observado hasta ahora para otras canalrodopsinas. Como se explica más adelante, los efectos secundarios sobre la excitabilidad neuronal son inducidos por la afluencia de Ca^{++} a través de la CatCh. A pesar de tener una cinética de cierre más lenta en comparación con la ChR2 WT, la CatCh muestra una mayor fiabilidad de los picos y precisión durante la estimulación con luz de alta frecuencia, lo que reduce los picos extra y elimina los potenciales de meseta artificiales observados normalmente en las células que expresan ChR2 WT a frecuencias de estimulación por encima de 20 Hz ^{3,7,12}. Los impulsos de luz de 1 ms suministrados a temperatura ambiente indujeron trenes de picos fiables de hasta 50 Hz en células piramidales que expresan CatCh (su límite natural de formación de picos, Fig. 4f). Están pendientes de analizar la inducción de picos mediada por CatCh a mayores frecuencias en células con formación más rápida de picos, tales como las interneuronas corticales de paralbumina ¹². Puesto que las cinéticas de las canalrodopsinas dependen de la temperatura con un Q_{10} de aproximadamente ~2,3 ¹⁴, los inventores esperarían una cinética de las CatCh 3,2 veces acelerada para experimentos *in vivo* a 37°C sin perder sensibilidad a la luz. Esto permitiría la estimulación de picos mediada por CatCh de hasta al menos 300 Hz. El aumento de la sensibilidad a la luz combinado con la cinética rápida y alta precisión temporal permitió a los inventores activar la CatCh con impulsos de luz tan cortos como 10 ns, que activan un solo recambio en cada molécula de CatCh seguido por un solo pico. Las observaciones en células excitables se explican mejor por el aumento de la afluencia de Ca^{++} en la neurona durante la iluminación. Téngase en cuenta que se puede despreciar la contribución del Ca^{++} a la fuerza impulsora debido al aumento de la permeabilidad. Sin embargo, los inventores pueden considerar una CatCh como una fuente de Ca^{++} unida a membrana regulada por luz ("un Ca^{++} enjaulado unido a membrana"), que suministra transitoriamente Ca^{++} a la superficie citosólica de la membrana celular, siempre y cuando esté abierto el canal de CatCh. Esto neutraliza temporalmente las cargas negativas en la cara interna de la membrana, aumentando con ello el potencial de la superficie, que es equivalente a una despolarización de la membrana ¹¹ (Fig. 7). Como era de esperar, cuando el Ca^{++} extracelular fue sustituido por Mg^{++} no permeante, fueron suprimidos todos los efectos del Ca^{++} observados sobre el potencial de acción, restaurando el fenotipo de ChR2 WT. Esto demuestra que los efectos del Ca^{++} observados fueron debidos a la afluencia de Ca^{++} extracelular y no causados por un aumento del $[\text{Ca}^{++}]_i$; a través de una expresión potencial de CatCh en los orgánulos celulares como el retículo endoplasmático. La despolarización inicial rápida *vía* el potencial de superficie reduce a la mitad la relación latencia de impulso de luz a pico desde ~10 ms en las células que expresan ChR2 WT ³ hasta ~5 ms en las células que expresan CatCh. En comparación con la de ChR2 WT, la relación de corriente máxima a corriente en estado estacionario es mucho más reducida en CatCh (véase la Tabla 1). Por lo tanto, durante la iluminación prolongada de la CatCh, el nivel de despolarización de la célula permanece casi estacionario. La afluencia continua de Ca^{++} durante la iluminación persistente puede activar canales catiónicos no selectivos activados por calcio, lo que apoya aún más el mantenimiento de un nivel de despolarización estacionario. Por otro lado, un requisito previo para la estimulación satisfactoria por impulsos de alta frecuencia es una repolarización rápida de la célula después de cada potencial de acción. El ligero aumento del tiempo útil del estado abierto de la CatCh en comparación

con la ChR2 WT debería limitar su máxima frecuencia de estimulación. Sin embargo, un aumento de la permeabilidad al Ca^{++} contrarresta esta limitación por la potente activación de canales de potasio (canales BK) de gran conductancia regulados por calcio. Esto restablece el potencial de membrana en reposo de la neurona en cuestión de milisegundos después de cada potencial de acción. Esta teoría fue confirmada por la inhibición de los canales BK con el bloqueador de canal abierto TEA, lo que dio como resultado una despolarización persistente de la neurona mientras dura el protocolo de estimulación por impulsos.

En comparación con las herramientas optogenéticas ya disponibles, la CatCh tiene una mayor sensibilidad a la luz similar a la de los mutantes lentos¹³ o a la de SFO⁶ pero con una cinética de respuesta más acelerada debido a su mayor permeabilidad al Ca^{++} y las consecuencias sobre la excitabilidad neuronal. Esto hace a la CatCh superior a las variantes disponibles de ChR2, donde se tenía que establecer una alta sensibilidad a la luz a costa de una cinética rápida y *viceversa* con respecto a las canalrodopsinas rápidas^{7,12} (para una visión general véase la Tabla 1).

Con respecto a la aplicación optogenética, observamos que será importante validar los parámetros de impulsos de luz óptimos en cada preparación experimental, tales como la duración y la intensidad de la estimulación, así como la respuesta específica que será controlada finalmente por las propiedades biofísicas intrínsecas de la expresión de la neurona y los niveles de expresión de CatCh.

Tabla 1: Comparación de las propiedades de la CatCh con otras herramientas optogenéticas excitadoras

	T_{on} [ms]	T_{off} [ms,s]	γ [fS]	I (pA) estac	$Y_{esta.}/Y_{max}$	λ_{max} (nm)	J (fotones $s^{-1} cm^{-2}$) [CE50 (mW/mm ²)]	v max de los picos	p_{Ca}/p_{Na}	AD	Ref.
CatCh	$0,6 \pm 0,003$	15 ± 2 ms	140 ± 5	$643,8 \pm 30,9$	$0,71 \pm 0,16$	474	$10^{16}-10^{17}$ 70 x WT inferior [0,7]	≥ 50 Hz	0,24	No	
ChR2 WT	$0,2 \pm 0,002$	10 ± 1 ms	$\sim 150^b$	$216,3 \pm 39,0$	$0,37 \pm 0,18$	470	$5 \times 10^{17}-10^{19}$ [0,7]	≤ 20 Hz	0,15	Sí	[2,3,14]
ChR2 H134R	$\sim 0,6$	19 ± 2 ms	$\sim 150^b$	$\sim 1,5 \times I_{WT}$	$0,53 \pm 0,09$	450	$5 \times 10^{17}-10^{19}$ [0,7]	~ 20 Hz	-	Sí	[1,7,14]
Mutantes lentos de SFO	C128T	$9 \pm 1,6$	$2 \pm 0,5$ s	-	$\sim 0,73 \times I_{WT}$	$\sim 0,5$	$5 \times 10^{17}-10^{19}$ [0,03]	c	-	Sí	[5,6]
	C128A	$5,7 \pm 1,0$	52 ± 2 s	-	$\sim 0,30 \times I_{WT}$	$\sim 0,7$	$5 \times 10^{17}-10^{19}$ [0,01]	c	-	Sí	
	C128S	$30 \pm 7,5$	106 ± 9 s	-	$\sim 0,25 \times I_{WT}$	$\sim 0,85$	$5 \times 10^{17}-10^{19}$ [0,01]	c	-	Sí	
	D156A	$3,3 \pm 0,1$	> 150 s ^a	-	$\sim I_{WT}$	~ 1	$5 \times 10^{17}-10^{19}$ [0,01]	d	-	Sí	
ChETA	-	$4,8 \pm 0,6$ ms	-	$\sim 0,9 \times I_{WT}$	$0,6 \pm 0,04$	500	$10^{18}-10^{19}$ menos sensible que WT	200 Hz	-	No	[12]
ChIEF	-	$9,8 \pm$	-	$\sim 3 \times I_{WT}$	$\sim 0,8$	450	$10^{18}-10^{19}$	25 Hz	0,12	Sí	[7]

	T_{on} [ms]	T_{off} [ms,s]	γ [fS]	I (pA) estac	$Y_{esta.}/Y_{max}$	λ_{max} (nm)	J (fotones $s^{-1} cm^{-2}$) [CE50 (mW/mm ²)]	v max de los picos	p_{Ca}/p_{Na}	AD	Ref.
		0,7 ms					menos sensible que WT [0,92]				

5 T_{on} : Valores de las mediciones de recambio individuales, γ : en guanidina-HCl 200 mM, Temperatura ambiente, -60 mV; I : HCN, -60 mV; I_{WT} \equiv corriente de ChR2 WT bajo las respectivas condiciones experimentales, J : intensidad de luz requerida para inducir potencial de acción; **CE50**: Intensidades de luz de semisaturación aparente; **v max de los picos**: frecuencia máxima de los picos fiables inducidos por impulsos de luz, **AD**: artificial después de la despolarización, ^a los datos no se puede determinare con precisión y representan la estimación del límite inferior, ^b valor extrapolado, ^c despolarización sub-umbral, ^d control conexión/desconexión de dos colores con amarillo-azul

LISTA DE REFERENCIAS

WO 03/084994

1. Nagel, G. et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 13940-13945 (2003).
2. Nagel, G. et al. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol* **15**, 2279-2284 (2005).

3. Boyden, E., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* **8**, 1263-1268 (2005).
4. Zhang, F. et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* **446**, 633-639 (2007).
5. Bamann, C., Gueta, R., Kleinlogel, S., Nagel, G. & Bamberg, E. Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry* **49**, 267-278 (2010).
6. Berndt, A., Yizhar, O., Gunaydin, L., Hegemann, P. & Deisseroth, K. Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci* **12**, 229-234 (2009).
7. Lin, J., Lin, M., Steinbach, P. & Tsien, R. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys J* **96**, 1803-1814 (2009).
8. Lagali, P. et al. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration *Nat Neurosci* **11**, 667-675 (2008).
9. Bi, A. et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* **50**, 23-33 (2006).
10. Frankenhäuser, B. & Hodgkin, A. The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J Physiol (Lond)* **137**, 218-244 (1957).
11. Hille, B. 649-662 (Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts USA, 2001).
12. Gunaydin, L. et al. Ultrafast optogenetic control. *Nat Neurosci* **13**, 387-392 (2010).
13. Bamann, C., Kirsch, T., Nagel, G. & Bamberg, E. Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. *J Mol Biol* **375**, 686-694 (2008).
14. Feldbauer, K. et al. Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *Proc Natl Acad Sci USA* (2009).
15. Caldwell, J. et al. Increases in intracellular calcium triggered by channelrhodopsin-2 potentiate the response of metabotropic glutamate receptor mGluR7. *J Biol Chemistry* **283**, 2430024307 (2008).
16. Weber, W.-M. Ion currents in *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* **1421**, 213-233 (1999).
17. Thyagarajan, S. et al. Visual function in mice with photoreceptor degeneration and transgenic expression of channelrhodopsin 2 in ganglion cells. *J Neurosci* **30**, 8745-8758 (2010).
18. Hille, B., Woodhull, B. & Shapiro, B. Negative surface charge near sodium channels of nerve: divalent ions, monovalent ions, and pH. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **270**, 301-318 (1975).
19. Muller, R. & Finkelstein, A. The effect of surface charge on the voltage-dependent conductance induced in thin lipid membranes by monazomycin. *J General Physiol* **60**, 285-306 (1972).
20. Faber, E. & Sah, P. Calcium-activated potassium-channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist* **9**, 181-194 (2003).

21. Joh, N., Oberai, A., Yang, D., Whitelegge, J. & Bowie, J. Similar energetic contributions of packing in the core of membrane and water-soluble proteins. *J Am Chem Soc* **131**, 10846–10847 (2009).
22. Subramaniam, S., Faruqi, A., Oesterhelt, D. & Henderson, R. Electron diffraction studies of light-induced conformational changes in the Leu-93→Ala bacteriorhodopsin mutant. *Proc Nat Acad Sci USA* **94** 1767-1772 (1997).
23. Subramaniam, S., Greenhalgh, D., Rath, P., Rothschild, K. & Khorana, H. Replacement of leucine-93 by alanine or threonine slows down the decay of the N and O intermediates in the photocycle of bacteriorhodopsin: implications for proton uptake and 13-cis-retinal all-trans-retinal reisomerization. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 6873-6877 (1991).
24. Nack, M. et al. The DC gate in Channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156. *Photochemical & Photobiological Sciences* **9**, 194-198 (2010).
25. Busskamp, V. et al. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science* **329**, 413-417 (2010).
26. Ellis-Davies, G. C. R. Neurobiology with caged calcium. *Chem Rev* **108**, 1603-1613 (2008).
27. Lorenz, C., Pusch, M. & Jentsch, T. Heteromultimeric ClC chloride channels with novel properties. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 13362-13366 (1996).
28. Allocca, M. et al. Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virology* **81**, 11372–11380 (2007).
29. de Felipe, P. et al. E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends Biotechnol* **24**, 68-75 (2006).
30. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J Molec Graphics* **14**, 33-38 (1996).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.

<120> Canalrodopsina 2 mutante

5 <130> M67346PC

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 737

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

15 <400> 1

Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp
20 25 30

Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala
35 40 45

Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile
50 55 60

Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly
65 70 75 80

Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu
85 90 95

Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr
100 105 110

Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys
115 120 125

Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp
130 135 140

Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile
145 150 155 160

Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile
165 170 175

ES 2 545 992 T3

Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala
 180 185 190

Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys
 195 200 205

Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly
 210 215 220

Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
 225 230 235 240

Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
 245 250 255

Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
 260 265 270

Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
 275 280 285

Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
 290 295 300

Glu Ala Gly Ala Val Asn Lys Gly Thr Gly Lys Tyr Ala Ser Arg Glu
 305 310 315 320

Ser Phe Leu Val Met Arg Asp Lys Met Lys Glu Lys Gly Ile Asp Val
 325 330 335

Arg Ala Ser Leu Asp Asn Ser Lys Glu Val Glu Gln Glu Gln Ala Ala
 340 345 350

Arg Ala Ala Met Met Met Met Asn Gly Asn Gly Met Gly Met Gly Met
 355 360 365

Gly Met Asn Gly Met Asn Gly Met Gly Gly Met Asn Gly Met Ala Gly
 370 375 380

Gly Ala Lys Pro Gly Leu Glu Leu Thr Pro Gln Leu Gln Pro Gly Arg
 385 390 395 400

Val Ile Leu Ala Val Pro Asp Ile Ser Met Val Asp Phe Phe Arg Glu
 405 410 415

Gln Phe Ala Gln Leu Ser Val Thr Tyr Glu Leu Val Pro Ala Leu Gly
 420 425 430

Ala Asp Asn Thr Leu Ala Leu Val Thr Gln Ala Gln Asn Leu Gly Gly
 435 440 445

Val Asp Phe Val Leu Ile His Pro Glu Phe Leu Arg Asp Arg Ser Ser
 450 455 460

Thr Ser Ile Leu Ser Arg Leu Arg Gly Ala Gly Gln Arg Val Ala Ala
 465 470 475 480

Phe Gly Trp Ala Gln Leu Gly Pro Met Arg Asp Leu Ile Glu Ser Ala
 485 490 495

Asn Leu Asp Gly Trp Leu Glu Gly Pro Ser Phe Gly Gln Gly Ile Leu
 500 505 510

Pro Ala His Ile Val Ala Leu Val Ala Lys Met Gln Gln Met Arg Lys
 515 520 525

Met Gln Gln Met Gln Gln Ile Gly Met Met Thr Gly Gly Met Asn Gly
 530 535 540

Met Gly Gly Gly Met Gly Gly Gly Met Asn Gly Met Gly Gly Gly Asn
 545 550 555 560

Gly Met Asn Asn Met Gly Asn Gly Met Gly Gly Gly Met Gly Asn Gly
 565 570 575

Met Gly Gly Asn Gly Met Asn Gly Met Gly Gly Gly Asn Gly Met Asn
 580 585 590

Asn Met Gly Gly Asn Gly Met Ala Gly Asn Gly Met Gly Gly Gly Met
 595 600 605

Gly Gly Asn Gly Met Gly Gly Ser Met Asn Gly Met Ser Ser Gly Val
 610 615 620

Val Ala Asn Val Thr Pro Ser Ala Ala Gly Gly Met Gly Gly Met Met
 625 630 635 640

Asn Gly Gly Met Ala Ala Pro Gln Ser Pro Gly Met Asn Gly Gly Arg
 645 650 655

Leu Gly Thr Asn Pro Leu Phe Asn Ala Ala Pro Ser Pro Leu Ser Ser
 660 665 670

Gln Leu Gly Ala Glu Ala Gly Met Gly Ser Met Gly Gly Met Gly Gly

ES 2 545 992 T3

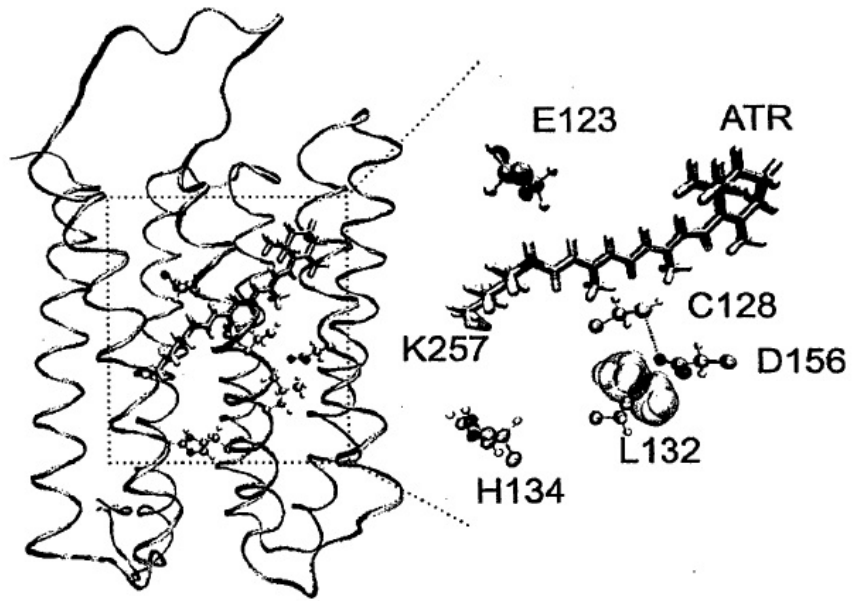
675			680			685									
Met	Ser	Gly	Met	Gly	Gly	Met	Gly	Gly	Met	Gly	Gly	Met	Gly	Gly	Ala
690						695						700			
Gly	Ala	Ala	Thr	Thr	Gln	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Ala	Glu	Ala	Glu	Met
705					710					715					720
Leu	Gln	Asn	Leu	Met	Asn	Glu	Ile	Asn	Arg	Leu	Lys	Arg	Glu	Leu	Gly
				725					730					735	
Glu															

REIVINDICACIONES

1. Un canal iónico inducible por luz, en donde el canal iónico inducible por luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 1-309 de la SEQ ID NO: 1 (CHOP-2), y que comprende una sustitución en una posición correspondiente a L132 en la SEQ ID NO: 1, cuya sustitución aumenta la polaridad del canal, y en donde la conductividad del calcio de dicho canal iónico inducible por la luz está aumentada al menos dos veces en comparación con CHOP-2 WT, como se determina por formación de imágenes con Fura-2 en células HEK293.
2. El canal iónico inducible por luz de la reivindicación 1, en donde el canal iónico inducible por luz comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 1-309 de la SEQ ID NO: 1 (CHOP-2), excepto por una sustitución en la posición L132, en donde la sustitución aumenta la polaridad de la canal.
3. El canal iónico inducible por luz de la reivindicación 1 o 2, en donde la sustitución se selecciona de L132C, L132S, L132E, L132D y L132T, en donde preferiblemente la sustitución es L132C.
4. El canal iónico inducible por luz de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
 - (a) la sensibilidad a la luz está aumentada en más de 5 veces, preferiblemente en más de 10 veces, más preferiblemente en más de 20 veces, tal como 30 veces, incluso más preferiblemente en más de 40 veces, tal como 50 veces, y lo más preferiblemente en más de 60 veces, o incluso en más de 70 veces, en comparación con la de CHOP-2 WT en las neuronas del hipocampo; y/o
 - (b) la conductividad del calcio está aumentada al menos tres veces, más preferiblemente al menos cuatro veces en comparación con CHOP-2 WT, como se determina por formación de imágenes con Fura-2 en células HEK293; y/o
 - (c) la frecuencia de estimulación está aumentada al menos 1,5 veces, más preferiblemente 2 veces o incluso más preferiblemente 2,5 veces, en comparación con CHOP-2 WT como se determina por sus registros electrofisiológicos de células completas en neuronas del hipocampo.
5. El canal iónico inducible por luz de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el canal iónico inducible por luz comprende adicionalmente al menos uno de los siguientes residuos de aminoácidos: ácido aspártico en una posición correspondiente a la posición 253 de la SEQ ID NO: 1; lisina en una posición correspondiente a la posición 257 de la SEQ ID NO: 1; triptófano en una posición correspondiente a la posición 260 de la SEQ ID NO: 1; ácido glutámico en una posición correspondiente a la posición 123 de la SEQ ID NO: 1; histidina o arginina, preferiblemente arginina, en una posición correspondiente a la posición 134 de la SEQ ID NO: 1; treonina, serina o alanina en una posición correspondiente a la posición 128 de la SEQ ID NO: 1; y/o alanina en una posición correspondiente a la posición 156 de la SEQ ID NO: 1.
6. El canal iónico inducible por luz de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el canal iónico inducible por luz comprende el resto de consenso L(I)DxxxKxxW(F,Y).
7. Una canalrodopsina, que comprende el canal iónico inducible por luz de acuerdo con las reivindicaciones 1-6 y un retinal o un derivado de retinal, en donde preferiblemente el derivado de retinal se selecciona del grupo que consiste en 3,4-deshidroretinal, 13-etilretinal, 9-dm-retinal, 3-hidroxitretinal, 4-hidroxitretinal, naftilretinal; 3,7,11-trimetil-dodeca-2,4,6,8,10-pentaenal; 3,7-dimetil-deca-2,4,6,8-tetraenal; 3,7-dimetil-octa-2,4,6-trienal; y retinales con la rotación 6-7 bloqueada, retinales con la rotación 8-9 bloqueada y retinales con la rotación 10-11 bloqueada.
8. Una construcción de ácido nucleico, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el canal iónico inducible por luz de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
9. Un vector de expresión, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el canal iónico inducible por luz de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, en donde preferiblemente el vector es adecuado para terapia génica, en donde en particular el vector es adecuado para transferencia de genes mediada por virus.
10. Una célula que comprende la canalrodopsina de acuerdo con la reivindicación 7, la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 9.
11. La célula de la reivindicación 10, en donde la célula es una célula de mamífero o una célula de insecto, o en donde la célula es una célula de levadura, preferiblemente de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* o *Pichia pastoris*.
12. La célula de la reivindicación 11, en donde la célula de mamífero es:

- (a) una célula fotorreceptora, una célula bastón de la retina, una célula cono de la retina, una célula ganglionar de la retina, una neurona bipolar, una célula ganglional, una neurona pseudounipolar, una neurona multipolar, una neurona piramidal, una célula de Purkinje o una célula granular; o
- (b) una célula de melanoma, una célula COS; una célula BHK; una célula HEK293; una célula CHO; una célula de mieloma; o una célula MDCK.
- 5
13. El canal iónico inducible por luz de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, o la canalrodopsina de acuerdo con la reivindicación 7, o la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 9, o la célula de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso como medicamento.
- 10
14. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 10, para uso en terapia génica.
15. El canal iónico inducible por luz de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, o la canalrodopsina de acuerdo con la reivindicación 7, o la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 9, o la célula de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de la ceguera o vista reducida.
- 15
16. El canal iónico inducible por luz de acuerdo con la reivindicación 5, que tiene treonina, serina o alanina en una posición correspondiente a la posición 128 de la SEQ ID NO: 1; y/o alanina en una posición correspondiente a la posición 156 de la SEQ ID NO: 1, para su uso en la ablación de células cancerosas, en donde preferiblemente las células cancerosas son células cancerosas de melanoma.
- 20
17. El uso de un canal iónico inducible por luz de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, o una canalrodopsina de acuerdo con la reivindicación 7, o una célula de acuerdo con la reivindicación 10, en un cribado de alto rendimiento.

Fig. 1



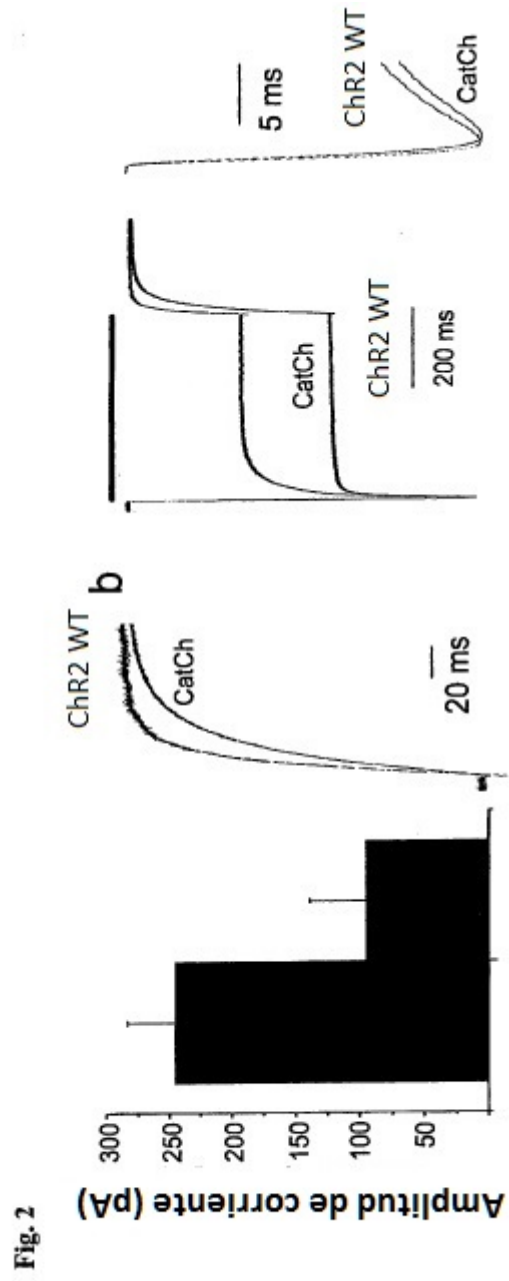


Fig. 2 cont. 1

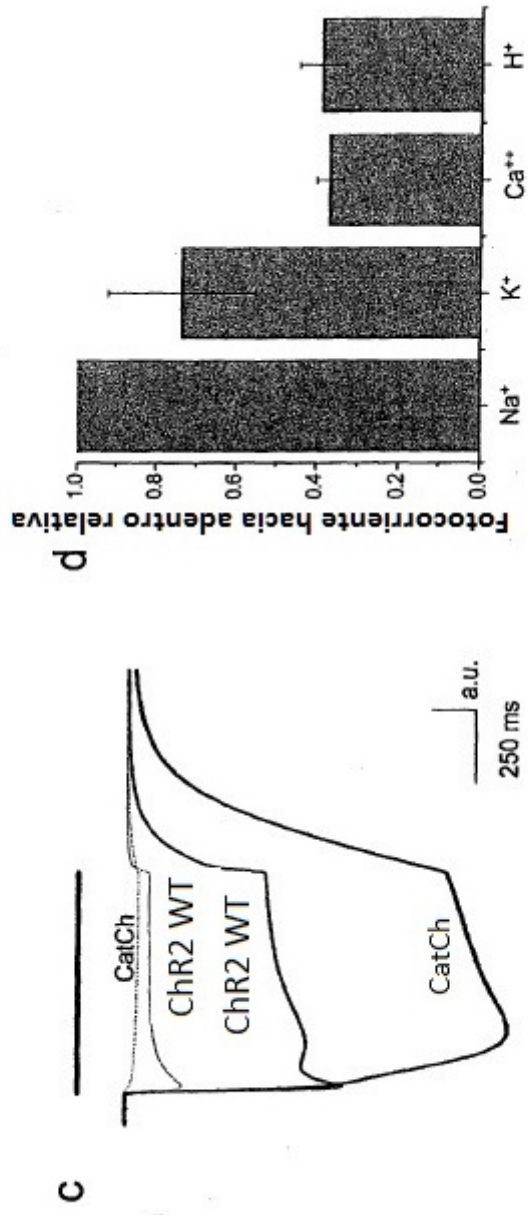
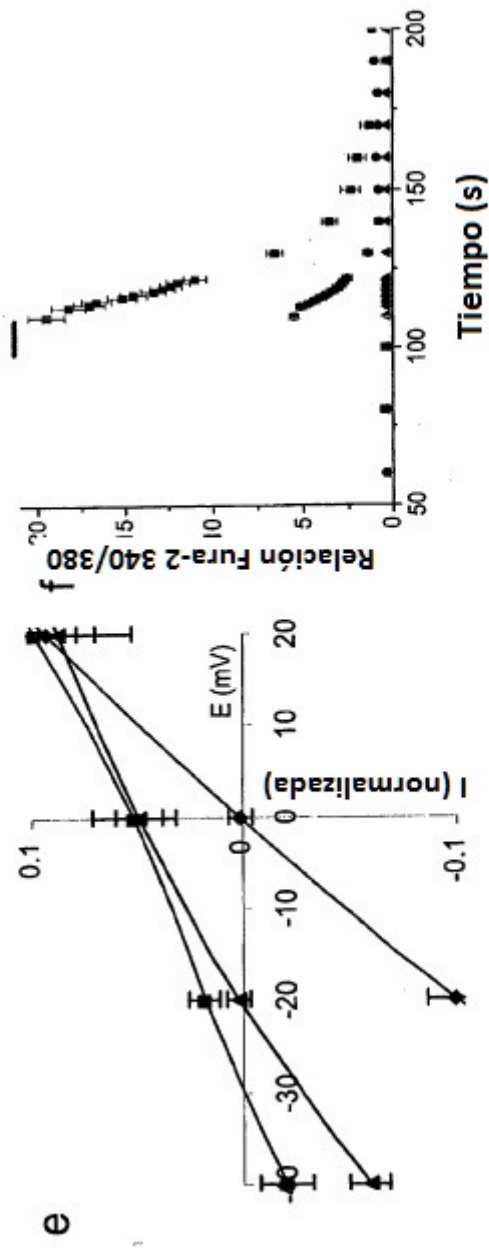


Fig. 2 cont. 2



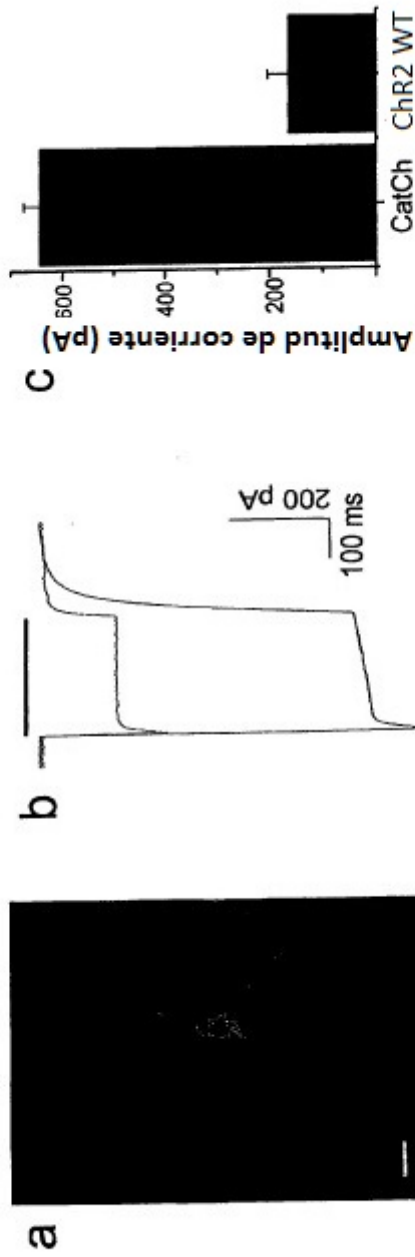


Fig. 3

Fig. 4

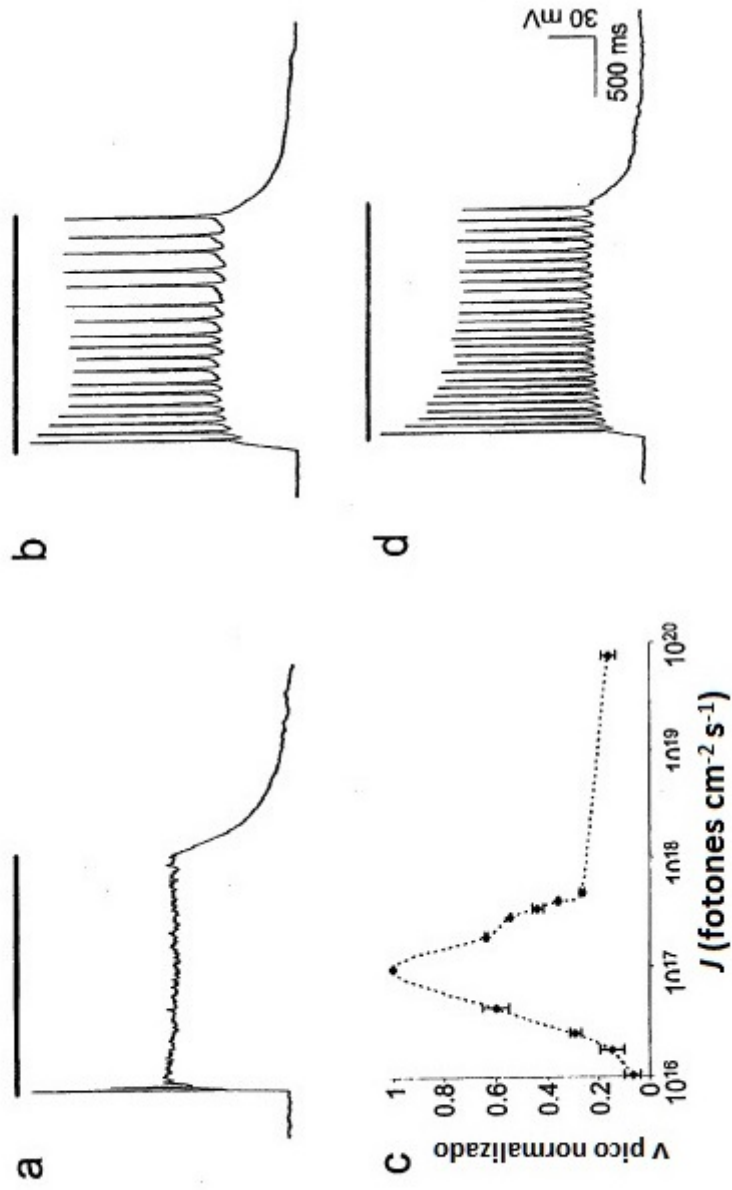
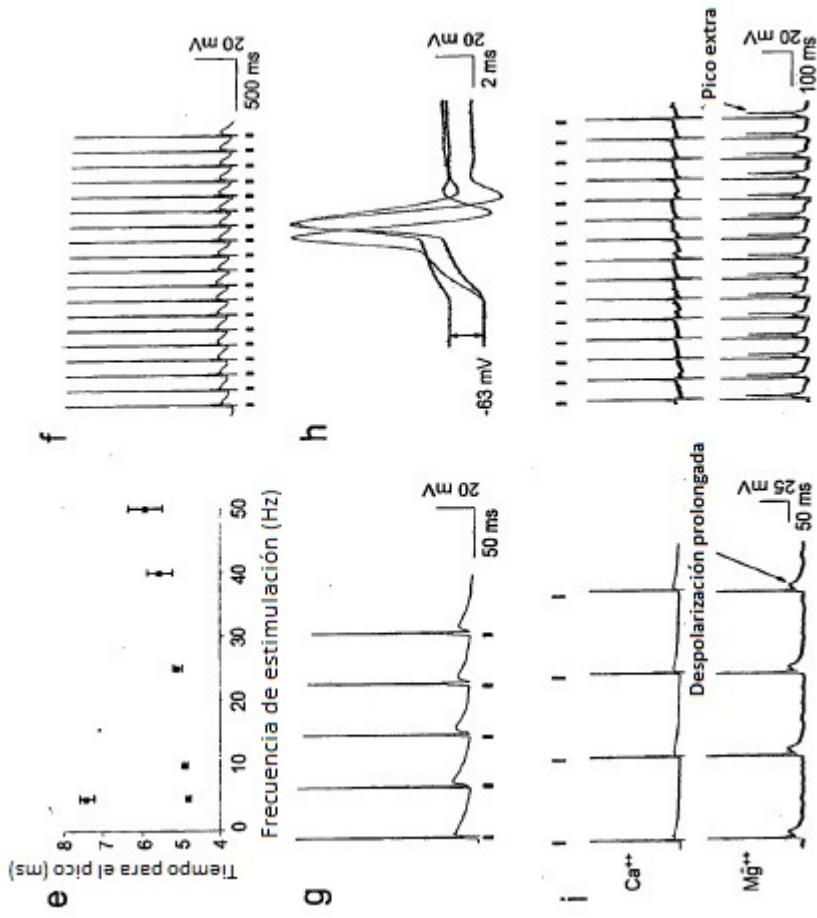


Fig. 4 cont.



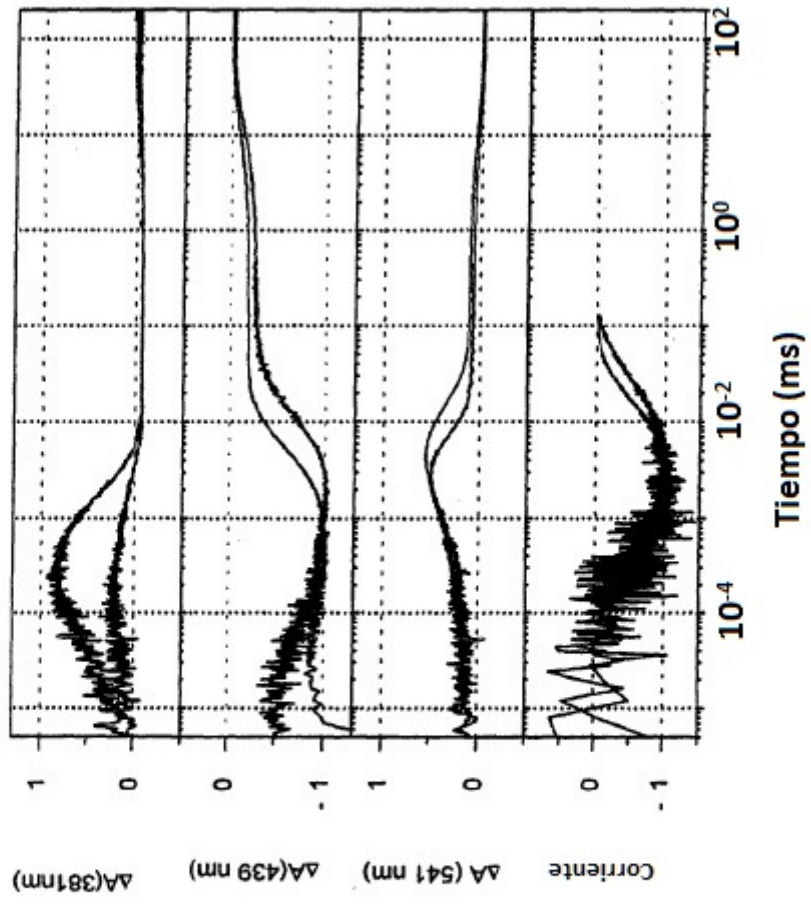


Fig. 5

Fig. 6

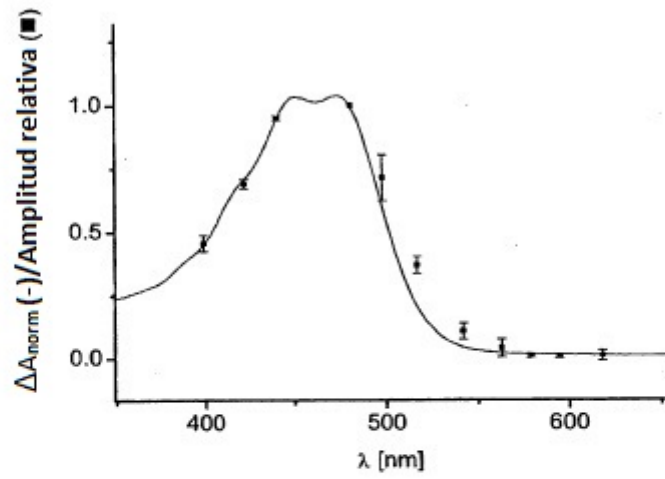


Fig. 7

