(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 606 458**

(51) Int. CI.:

C12P 21/06 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2009 E 14191235 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2857519**

(54) Título: **Línea celular, sistema y procedimiento para el control óptico de mensajeros secundarios**

(30) Prioridad:

29.05.2008 US 57108 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2017

(73) Titular/es:

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Office of the General Counsel Building 170, 3rd Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford CA 94305-2038, US

(72) Inventor/es:

AIRAN, RAAG D. y
DISSEROTH, KARL

(74) Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

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

Línea celular, sistema y procedimiento para el control óptico de mensajeros secundarios

Campo de la Invención

[0001] La presente memoria se refiere generalmente a sistemas y estrategias para generar mensajeros secundarios en respuesta al estímulo óptico y, más particularmente, a líneas celulares, secuencias nucleotídicas, proteínas quiméricas y usos de las mismas, cada una relacionada con la producción de mensajeros secundarios en respuesta a la luz.

Antecedentes

[0002] Se cree que las proteínas de unión a nucleótidos de guanina (proteínas G) alternan entre un estado de difosfato de guanosina (GDP) inactivo y un estado unido a trifosfato de guanosina (GTP) activo. Estos dos estados se han vinculado a la liberación de un mensajero secundario dentro de una célula. El mensajero secundario liberado puede funcionar para regular los procesos celulares cascada abajo.

[0003] Los mensajeros secundarios incluyen moléculas de señalización que se generan/liberan rápidamente. Estas moléculas producen respuestas celulares al activar las proteínas efectoras dentro de la célula. Los sistemas de señalización celulares de ejemplo incluyen el sistema de fosfoinositol, el sistema de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) y el sistema de ácido araquidónico.

[0004] Los cambios entre los diferentes estados de las proteínas G se pueden desencadenar como un resultado de proteínas denominadas receptores acoplados a proteína G (GPCR), receptores unidos a proteína G (GPLR), receptores de siete dominios de transmembrana (receptores 7TM) o receptores heptahelicoidales. Esta familia de proteínas incluye una diversidad de receptores transmembrana. Estos receptores responden a los estímulos externos (por ejemplo, luz, neurotransmisores, olores u hormonas) activando las rutas de transducción de señal internas a la célula. Específicamente, los ligandos unen y activan las rutas de transducción causando en consecuencia que las proteínas G alternen los estados. La actividad relacionada con GPCR se asocia con muchas enfermedades y, de esta manera, los GPCR son el objetivo de muchos productos farmacéuticos y tratamientos.

[0005] Se cree que más del 30% de todos los fármacos en el mercado se dirigen a los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) y que muchos de esos fármacos se relacionan con la producción o inhibición del mensajero secundario cAMP. Existe una abundancia de procesos patológicos que implican directamente el cAMP, incluyendo enfermedades neurofisiológicas, endocrinológicas, cardiacas, metabólicas e inmunes. En el estudio de comportamientos de mamífero complejos, las limitaciones tecnológicas han impedido un control espacio-temporalmente preciso sobre los procesos de señalización intracelular. Los procedimientos basados en productos químicos actuales para modular los niveles de mensajeros secundarios, tales como niveles de cAMP, operan relativamente de manera lenta y presentan problemas para estudiar la actividad en las escalas de tiempo rápido que el cuerpo usa en conexión con cierto tejido, tal como en el tejido nervioso cardiaco. Estos procedimientos químicos carecen frecuentemente de la velocidad para sondear estas escalas de tiempo rápido (por ejemplo, mientras que se clasifican para productos terapéuticos novedosos). Li y col., (Proc. Natl. Acad. Sci., USA (2005), 102; 17816-17821) describe una activación e inhibición rápida no invasiva de la actividad neural y de red por la rodopsina de vertebrados y la rodopsina-canal de algas verdes.

Descripción resumida de la Invención

[0006] La presente memoria se dirige a superar los retos que se han mencionado anteriormente y otros relacionados con la generación de mensajeros secundarios y dispositivos de formación de imágenes relacionados y sus implementaciones. La presente invención se define en las reivindicaciones que se acompañan y se ilustra en varias implementaciones y aplicaciones, algunas de las cuales se resumen a continuación.

[0007] En concordancia con una realización de la presente memoria, se implementa un procedimiento para generar mensajeros secundarios en una célula. Se modifica una secuencia nucleotídica para expresar una proteína de membrana quimérica sensible a la luz (por ejemplo, rodopsina) con una o más subunidades de receptor heterólogo {por ejemplo, un receptor adrenérgico (alfa1, Beta2)}. La proteína de membrana sensible a la luz se expresa en una célula para producir un mensajero secundario en respuesta a la luz.

[0008] En concordancia con una realización de la presente memoria, se implementa un procedimiento para evaluar la eficacia de un posible régimen de tratamiento (por ejemplo, un fármaco o estimulo eléctrico o cualquiera que funcione a través de estos mensajeros secundarios) en relación con mensajeros intracelulares. Se modifica una secuencia nucleotídica para expresar una proteína de membrana quimérica sensible a la luz (rodopsina) con una o más subunidades de receptor heterólogo {por ejemplo, un receptor adrenérgico (alfa1, Beta2)}. La proteína de membrana sensible a la luz se expresa en una célula para producir un mensajero secundario en respuesta a la luz. La proteína se expone a la luz. Se evalúan los efectos del tratamiento.

[0009] Una realización de la presente memoria se dirige a una célula que expresa una proteína de membrana quimérica sensible a luz (rodopsina) con una o más subunidades de receptor heterólogo {por ejemplo, un receptor adrenérgico (alfa1, Beta2)}.

[00010] Una realización de la presente memoria se dirige a una secuencia nucleotídica para expresar una proteína de membrana quimérica sensible a la luz (rodopsina) con una o más subunidades de receptor heterólogo {por ejemplo, un receptor adrenérgico (alfa1, Beta2)}.

[00011] El resumen anterior de la presente memoria no pretende describir cada realización ilustrada o cada implementación de la presente memoria. Las figuras y la descripción detallada que se indican a continuación ejemplifican más particularmente estas realizaciones.

Breve Descripción de los Dibujos

[00012] La memoria se puede entender más completamente en consideración de la descripción detallada de diversas realizaciones de la memoria que se indican a continuación junto con los dibujos adjuntos, en los que:
la figura 1A muestra una representación esquemática que muestra optoGs y optoGq, consistentes con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria;
la figura 1B muestra el Ensayo Inmunoabsorbente Ligando a Enzimas (ELISA) de cAMP, cGMP e IP1 de células transfectadas con ya sea nada, optoGs u optoGq, consistentes con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria;
la figura 1C muestra la formación de imágenes de Ca de células transfectadas con proteínas de fusión mCherry de optoGs y optoGq, consistentes con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria;
la figura 2 la formación de imágenes de Ca de células transfectadas con las proteínas de fusión mCherry de optoGs y optoGq, consistentes con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria;
la figura 3A muestra los niveles de cAMP, IP_1 e IP_3 para las células HEK que expresan diversas construcciones, consistentes con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria;
la figura 3B muestra un vector de expresión lentiviral, inmunotinción GAD de células que expresan opto-atAR y la activación pCREB observada en células que expresan optoXR (mCherry+) después de 10 min de estimulación óptica, consistentes con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria;
la figura 4A muestra el objetivo de optrodo de accumbens traducidos, formas de onda pico y velocidad de disparo de línea basal para construcciones indicadas, consistentes con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria;
la figura 4B muestra registros de optrodos *in vivo* con estimulación de luz, consistentes con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria;
la figura 4C muestra el cambio en la frecuencia pico con la luz frente a la línea basal, consistentes con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria;
la figura 4D muestra la cinética de cambio de velocidad de disparo, consistente con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria;
la figura 5A muestra el objetivo estereotáctico de una región transducida, un ratón que se mueve libremente con fibras ópticas implantadas, una representación esquemática del lugar del aparato de preferencia y prueba y un rastro de un ratón que se mueve libremente, consistente con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria;
la figura 5B muestra preferencias para el control y opto-α_1AR, consistentes con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria; y
la figura 5C muestra los resultados de la distancia total para diversas pruebas de campo abierto; consistente con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria.

[00013] Mientras que la memoria es susceptible a diversas modificaciones y formas alternativas, aspectos específicos de la misma se han mostrado a modo de ejemplo en los dibujos y se describirán con detalle. Sin embargo, se debe entender que la intención no es limitar la memoria a las realizaciones particulares descritas. Por el contrario, la intención es incluir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que entran dentro del espíritu y alcance de la memoria.

Descripción Detallada

[00014] Se cree que la presente memoria es útil para permitir aplicaciones prácticas de una diversidad de sistemas y procedimientos ópticos, y se ha descubierto que la memoria es particularmente adecuada para su uso en sistemas y procedimientos relacionados con el control óptico de los niveles de mensajeros secundarios dentro de una célula. Mientras que la presente memoria no se limita necesariamente a tales aplicaciones, se pueden apreciar diversos aspectos de la memoria a través de un análisis de diversos ejemplos usando este contexto.

[00015] Las realizaciones de la presente memoria implican una proteína quimérica de membrana que responde a estímulos ópticos causando la liberación de un mensajero secundario en el interior de la célula. En un caso específico, la proteína quimérica es una combinación de una subunidad de receptor heterólogo y una proteína que experimenta una conformación en reacción a la luz a través de la fotoisomerización y, de este modo, es activada por la luz. Las rodopsinas o proteínas de retinilideno proporcionan un grupo de ejemplo de proteínas sensibles a la luz que se pueden modificar para incluir una subunidad de receptor heterólogo.

[00016] Según una realización de la presente memoria, se modifica una proteína que se cree que contiene siete dominios transmembrana α-helicoidales para incluir una subunidad de receptor heterólogo asociada con un mensajero secundario. Cuando se expresa en una membrana celular, la proteína reacciona a la luz experimentando un cambio conformacional. El cambio conformacional desencadena la liberación/producción del mensajero secundario.

[00017] Las realizaciones de la presente memoria implican una secuencia de nucleótidos para codificar una proteína quimérica de membrana que responde a estímulos ópticos causando la liberación de un mensajero secundario en el interior de la célula.

[00018] Las realizaciones de la presente memoria implican una célula que expresa una proteína de membrana heteróloga y quimérica. La proteína de membrana quimérica responde a un estímulo óptico desencadenando la liberación de un mensajero secundario dentro de la célula. En ciertas realizaciones, la expresión de la proteína de membrana quimérica tiene lugar *in vivo.* En otras realizaciones, la expresión de la proteína de membrana quimérica tiene lugar *in vitro.*

[00019] Las realizaciones de la presente memoria pueden implementarse para la producción de cualquier mensajero secundario adecuado modificando una proteína receptora acoplada a una proteína de unión a nucleótidos de guanina (GPCR) para incluir la subunidad de receptor apropiada.

[00020] Las realizaciones de la presente memoria permiten el uso de proteínas que responden a una diversidad de longitudes de onda e intensidades de luz.

[00021] Una realización de la presente memoria implica el uso de una proteína GPCR quimérica, tal como se describe en este documento, para determinar cualquier efecto cascada abajo de la actividad del mensajero secundario de interés.

[00022] Las realizaciones de la presente memoria se dirigen a la expresión de una proteína GPCR quimérica en una diversidad de tipos de células, incluyendo, pero sin limitación, células de mamífero, células madre, células vegetales, y organismos unicelulares, como levadura y *E. coli.*

[00023] Una realización específica de la presente memoria se refiere a una expresión optimizada de una proteína quimérica con proteínas fluorescentes unidas para facilitar la visualización, y el uso optimizado de la modalidad para estudiar los efectos cascada abajo de la actividad del mensajero secundario inducida por la luz.

[00024] Una realización de la presente memoria se refiere a dirigir genéticamente una proteína GPCR quimérica, tal como se describe en este documento, a poblaciones celulares específicas para la expresión en las mismas. Existen promotores específicos del tipo de célula que se expresan selectivamente en un tipo de célula diana (por ejemplo, Sinapsina-1 para neuronas diana; variantes de Troponina para tejido cardiaco). La colocación de estos promotores cascada arriba de la proteína GPCR quimérica en un vector de expresión se puede usar para dirigir la expresión de la proteína a un tipo de célula de interés. Esto incluye sistemas de promotores inducibles, reversibles, o en cualquier caso, controlables, tales como la respuesta Tet, respuesta ER y sistemas Cre/Lox.

[00025] Según una realización de ejemplo de la presente memoria, se desarrolla una proteína genéticamente codificable, de tal forma que, cuando éstas se expresan en tipos de células de interés, se produce adenosín monofosfato cíclico (cAMP) en respuesta a la luz. Esto puede ser útil, por ejemplo, para visualizar los efectos cascada abajo sobre la fisiología celular que incluyen, pero sin limitación, el cribado de productos farmacéuticos. Otras realizaciones usan un GPCR quimérico y heterólogo que da como resultado la liberación de mensajeros secundarios en respuesta a la luz. Los mensajeros secundarios de ejemplo incluyen cAMP, guanosín monofosfato cíclico (cGMP), trifosfato de inositol/1,4,5-trifosfato de inositol/trifosfoinositol (IP_3) y ácido araquidónico.

[00026] En concordancia con una realización de la presente memoria, se implementa un procedimiento para evaluar la eficacia de un posible régimen de tratamiento (por ejemplo, un fármaco o estímulo eléctrico o cualquiera que funcione a través de estos mensajeros secundarios) en relación con los mensajeros intracelulares. Se modifica una secuencia nucleotídica para expresar una proteína de membrana quimérica sensible a la luz (por ejemplo, rodopsina) con una o más subunidades de receptor heterólogo {por ejemplo, un receptor adrenérgico (alfa 1, Beta2)}. La proteína de membrana sensible a la luz se expresa a una célula para producir un mensajero secundario en respuesta a la luz. La proteína se expone a la luz. Se evalúan los efectos del tratamiento.

[00027] La luz se puede aplicar de acuerdo con un perfil de estímulo deseado. En una realización, la proteína de membrana expresada responde a la luz en decenas de milisegundos. De esta manera, el perfil de estímulo puede incluir una serie de pulsos de luz en una sucesión rápida y los efectos resultantes se pueden supervisar usando, por ejemplo, tintes sensibles a Ca^{2+}.

[00028] En un caso, en primer lugar la célula se puede estimular sin el tratamiento. Una vez que el tratamiento se administra, después la célula se puede estimular de nuevo. Los resultados de cada prueba se pueden comparar para evaluar la eficacia del tratamiento.

[00029] El tratamiento puede incluir una amplia diversidad de diferentes implementaciones incluyendo, pero sin limitación, productos farmacéuticos, modificaciones a la célula (genéticas o de otro modo), parámetros físicos de la célula (por ejemplo, cambios de temperatura o estímulo eléctrico) o un régimen de tratamiento aplicado a un organismo.

[00030] En una realización, el tratamiento es el estímulo óptico de la proteína de membrana expresada. En tal caso, la efectividad se puede medir, por ejemplo, supervisando los síntomas asociados con trastorno que se va a tratar.

[00031] En otra realización, el régimen de tratamiento se implementa como parte de la modelación de una enfermedad o trastorno. Por ejemplo, puede usarse un modelo de enfermedad (células o animales) y el estado de fondo/de referencia se puede evaluar antes de que la proteína se exprese y el régimen del tratamiento se evalúe.

[00032] Los resultados experimentales muestran que la regulación del cAMP óptimamente evocada de canales iónicos dirigidos se pueden visualizar al transfectar células tanto con el inductor de cAMP como un canal catiónico dirigido a cAMP y visualizando la actividad resultante usando tintes sensibles a Ca^{2+}. Esta adaptación de los moduladores ópticamente activados, genéticamente codificables de la actividad del mensajero secundario puede ser útil en la clasificación de productos terapéuticos novedosos, así como también siendo una modalidad terapéutica en sí misma, dada la implicación del cAMP en numerosas patologías, como a ADHD y canalopatías cardiacas. La proteína se puede diseñar por ingeniería para su uso con diversos mensajeros secundarios diferentes (por ejemplo, IP3), otros colores para la activación de luz diseñando por ingeniería el sitio de unión retinal o seleccionando para la quimera una rodopsina u opsina de cono con un espectro diferente de absorbancia/acción, y otros efectos cascada abajo del mensajero secundario, tal como señalización de calcio y/o actividad de la cinasa.

[00033] Las figuras 1A, 1B y 1C muestran los datos experimentales de optoGs y optoGq, dos ejemplos de inductores activados con luz de señalización del mensajero secundario ("optoXRs") que se han desarrollado. Estos inductores activados con luz son un quimerismo de rodopsina/GPCR. El OptoGq proporciona un control sensible a la luz de la señalización Gq, mientras que optoGs, proporciona un control sensible a la luz de la señalización de Gs.

[00034] Tanto en optoGs como en optoGq se ha mostrado que existe una diferencia insignificante en los niveles de cAMP e IP_3 de referencia en la oscuridad y que no existe cruce con otras rutas del mensajero secundario, tal como cGMP. El aumento de los niveles de cAMP observados con la estimulación de luz de optoGq es un efecto cascada abajo esperado de la producción de IP_3.

[00035] La figura 1A muestra una representación esquemática de optoGs y optoGq, consistente con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria. Para cada propina, los bucles intracelulares de la rodopsina se reemplazan por los de las proteínas adrenérgicas acopladas normalmente a Gs (beta2) o Gq (alfa 1). Las secuencias codificantes genéticas se optimizan para la expresión en células humanas y de murino. Los ejemplos de secuencias resultantes incluyen optoGs: SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2; y optoGq: SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

[00036] Como se aprecia por el experto en la técnica, las secuencias aminoacídicas de las proteínas se presentan como ejemplos no limitantes en el soporte de las realizaciones que se extienden a las variaciones (por ejemplo, mutaciones puntuales) en la secuencia genética que, de otra manera, proporcionan resultados coherentes, intercambiables o equivalentes.

[00037] La figura 1B muestra el ensayo inmunoabsorbente ligando a enzimas (ELISA) de cAMP (parte superior), cGMP (centro), e IP_1 (parte inferior; un producto de degradación de IP_3) de las células transfectadas con ya sea nada, optoGs u optoGq, consistentes con una realización ejemplar de la presente memoria. Los resultados de la figura 1B se obtuvieron a partir de células que se estimularon con una luz de 504 nm (banda ancha de 20 nm) durante un minuto por punto, o se mantuvieron en la oscuridad, según se indica.

[00038] La estimulación se implementó usando un microscopio de cultivo invertido de ambiente controlado (Leica DMI6000B). En el ensayo de cAMP, algunas células se trataron con forskolina 10 uM durante 30 minutos en forma de un control positivo de saturación del ensayo. El optoGs aumento significativamente los niveles de cAMP en respuesta a la luz. No se descubrió un aumento significativo de la línea de referencia de cAMP, ni desviaciones de los niveles de cGMP o IP_3 con optoGs. El OptoGq aumento significativamente los niveles de IP3 en respuesta a la luz sin alterar significativamente los niveles de cGMP. Se creen que un aumento en los niveles de cAMP con la producción de IP_3 es una consecuencia de la liberación de Ca^{2+} intracelular.

[00039] La figura 1C muestra la formación de imágenes de Ca de las células transfectadas con las proteínas de fusión mCherry de optoGs y optoGq, consistente con las realizaciones de ejemplo de la presente memoria. Para detectar el cAMP, se transfectó un mutante selectivo de cAMP del canal de Ca^{2+} regulado por nucleótidos cíclicos CNGA2 en exceso de optoGs. El IP_3 activa la liberación de depósitos de Ca^{2+} intracelulares, proporcionando en consecuencia una señal fiable de la activación de Gq. Una población de control también se transfectó con la mCherry sola con el mutante CNGA2 en exceso. Las células se cargaron con fura-2 (20-25 minutos de incubación) y se adquirieron exposiciones de 2 ms de 340 nm y 380 nm cada dos segundos. En cada uno del optoGs y optoGq, las adquisiciones solas fueron suficientes para producir una señal de Ca, mientras que no se detectó ninguna señal significativa en la población de control.

[00040] La figura 1 muestra los datos obtenidos de una configuración experimental específica, sin embargo, la memoria no se limita de esta manera. Por ejemplo, se contemplan diversas técnicas de administración diferentes a la transfección incluyendo, pero sin limitación, transducción vírica, administración de genes balísticos (pistola génica) y captación de ácidos nucleicos espontáneos.

[00041] La rodopsina base se puede modificar para su uso con cualquier subunidad de receptor heteróloga adecuada, tal como los receptores acoplados a Gi similares al receptor adrenérgico alfa 2 o el receptor D2 de dopamina o el receptor 5HT2A de serotonina; u otros receptores acoplados a Gs o Gq similares al receptor D1A de dopamina o los receptores de glutamato metabotrópico.

[00042] De acuerdo con una realización ejemplar, la rodopsina base es una proteína obtenida del bovino *Bos taurus.*

[00043] De acuerdo con una realización, la proteína base diferente de la rodopsina base que se ha mencionado anteriormente también se puede usar e incluye diversas proteínas 7-transmembrana, tales como las opsinas de cono (rojas, verdes o azules), rodopsinas de otras especies, y receptores regulados por ligandos similares a los receptores de dopamina o serotonina.

[00044] Diversas implementaciones se refieren a aplicaciones *in vivo* en mamíferos. Estas implementaciones incluyen, pero sin limitación, un circuito neural de prueba y confirmación y modelos de enfermedad.

[00045] Las figuras 3A y 3B muestran los datos experimentales de una aplicación *in vivo* de optoGs (opto-β_2AR) y optoGq (opto-α_1AR), que son dos ejemplos de inductores activados con luz de la señalización del mensajero secundario. Los aspectos de la presente memoria se refieren al uso y desarrollo de una familia versátil de

herramientas ópticas genéticamente codificadas ('optoXRs') que aprovechan las relaciones de estructura-función comunes entre los receptores acoplados a proteína G (GPCR) para reclutar y controlar, con una alta precisión espacio-temporal, las rutas de señalización bioquímicas iniciadas por receptores.

[00046] Los resultados mostrados en las figuras 3A y 3B se refieren a dos optoXRs específicos que reclutan selectivamente rutas de señalización dirigidas distintas en respuesta a la luz. Los dos optoXR ejercen efectos opuestos sobre el disparo de pico en el núcleo accumbens *in vivo*, y la fotoestimulación del optoXR cronometrada con precisión en el núcleo accumbens fue suficiente por sí misma para impulsar la preferencia del lugar acondicionado en los ratones que se mueven libremente. La estrategia de optoXR permite la prueba de la hipótesis con respecto al impacto causal de la señalización bioquímica en el comportamiento de los mamíferos, de una manera dirigible y temporalmente precisa.

[00047] El control óptico sobre la señalización intracelular se implemento en mamíferos, usando las relaciones de estructura-función compartidas entre los GPCR para desarrollar y expresar múltiples quimeras de opsina/GPCR2 distintas *in vivo* con una lógica de transducción novedosa que acopla la señal al efector. Coherentes con diversas implementaciones, se diseñan una o más proteínas de receptor de opsinas quiméricas para que sean funcionales en mamíferos *in vivo,* dirigibles a las células específicas, y sensibles a los pulsos de luz cronometrados con precisión. Dichas estrategias permiten el uso de un estímulo óptico de alta velocidad (respuesta a la proteína) para someter a prueba y caracterizar los eventos bioquímicos intracelulares en tiempos precisamente definidos y de comportamiento relevantes. Algunas implementaciones de ejemplo no limitantes incluyen, modulación pulsátil frente a tónica, sincronía entre diferentes sistemas moduladores, y otros procesos fisiológicos y patológicos fundamentales en tipos de células definidos sobre un intervalo de intervalos de tiempo.

[00048] Las implementaciones de mamífero se han implementado con éxito. En una implementación ejemplar, los bucles intracelulares de la rodopsina se reemplazaron por los de los receptores adrenérgicos específicos alineando en primer lugar residuos conservados del receptor α_{1a} adrenérgico humano acoplado a Gq (α_1AR) y el receptor β_2-adrenérgico de hámster acoplado a Gt (β_2AR) con la rodopsina de bovino acoplada a Gt (figura 1A). Los intercambios de las regiones intracelulares (que incluyen dominios carboxi-terminales) se diseñaron para cada receptor en base a los modelos estructurales para transferir el acoplamiento de la proteína G del Gt, y se optimizó cada receptor para la expresión *in vivo* en mamíferos. Tras la activación por los ligandos variados, los receptores nativos pueden explorar múltiples estados de conjunto para reclutar rutas canónicas y no canónicas en un fenómeno de señalización mediada por ligando. Los optoXR son probablemente para seleccionar un estado de conjunto activo individual tras la detección de la luz de una manera dependiente en un contexto biológico.

[00049] Los genes que codifican quimeras (opto-α_1AR y optoβ_2AR) se condensaron a una proteína fluorescente. La validación de la expresión optoXR funcional se realizó a través de $[Ca^{2+}]i$ formado por imágenes (concentración de calcio intracelular) en células HEK transfectadas con opto-α_1AR solo (esperado para reclutar $[Ca^{2+}]i$ a través de Gq), o con tanto opto-β_2AR (esperado para reclutar AMP cíclico a través de GS) como con el canal Ca^{2+} regulado por cAMP CNGA2-C460W/E583M. La formación de imágenes de $[Ca^{2+}]i$ ratiométrica demostró que 60 s de estimulación de luz verde (504 + /- 6 nm, 7 mW mm^{-2}) fueron suficientes para conducir señales de $[Ca^{2+}]i$ prominentes cascada abajo de cualquier optoXR, pero no en las condiciones de control (figura 2), revelando una expresión funcional. Para probar la especificidad de las señalización controlada por cada optoXR, se iluminaron células HEK transducidas con 3 mW mm^{-2} 504 +/- 6 nm de luz durante 60 s y después se lisaron y se analizaron para comprobar los niveles de cGMP, cAMP e IP_1 (un producto de degradación de IP_3) a través de inmunoensayos. El patrón canónico fue como se esperó para el optó-β_2AR que corresponde a su diseño molecular, ya que la estimulación óptica produjo una producción significativa de cAMP en las células que expresan opto-β_2AR (figura 3A, parte superior), comparable a la lograda con la estimulación farmacológica del β_2AR de tipo natural y sin el reclutamiento de IP_3 (figura 3A, centro), $[Ca^{2+}]i$ (figura 2), o actividad oscura sustancial. Por el contrario, la estimulación óptica produjo una regulación ascendente significativa de la señalización de IP_3 en las células que expresan opto-α_1AR (figura 3A, centro), comparable a los niveles inducidos por la estimulación farmacológica del α_1AR de tipo natural. Junto con las elevaciones de $[Ca^{2+}]i$ (figura 2), estos datos revelan el patrón esperado para el reclutamiento de Gq, un patrón que no se observa en las células que expresan opto-β_2AR (figura 3A, parte superior). La estimulación óptica de células que expresan cualquier construcción son incapaces de modular los niveles de cGMP (figura 3A, parte inferior), indicando adicionalmente la especificidad de señalización de las proteínas quiméricas. Ensayos similares revelaron que los optoXR retienen un espectro de acción cercano al de la rodopsina nativa, son capaces de integrar las señales en un intervalo de flujos de luz biológicamente adecuados, y pueden activar rutas no canónicas a un grado similar que los receptores de tipo natural, como para la señalización p42/p44-MAPK.

[00050] La función del OptoXR en el tejido neural intacto se ha sometido a prueba, incluyendo si la suplementación de los co-factores retínales fue necesaria o no. En una prueba de este tipo, los vectores lentivirales que llevan los genes de fusión optoXR bajo el control del promotor de la sinapsina I (para dirigir la modulación bioquímica a las neuronas locales en lugar de otros elementos tisulares celulares potencialmente sensibles a Gs/Gq, tales como células gliales y endoteliales; figura 3B, parte superior izquierda) se inyectaron estereotácticamente en el núcleo accumbens de ratones adultos. Esta estrategia dirige la modulación bioquímica a las neuronas con compartimentos somatodendríticos en los accumbens (neuronas espinosas medianas GABAergicas al ~95%, sin la especificidad del subtipo adicional; figura 3B, izquierda) y excluye las fibras de paso o terminales presinápticos aferentes, ya que estos lentivirus no transducen las células a través de los axones. Dos semanas después de la transducción, las rebanadas coronales agudas de los accumbens se prepararon en fluido cerebroespinal artificial, se estimularon ópticamente durante 10 min, se fijaron inmediatamente y se tiñeron para el CREB fosforilado con Ser 133 (pCREB), un integrador bioquímico de cascadas de señalización acopladas tanto a cAMP como a Ca^{2+}. Sin la suplementación de los retinoles exógenos, se observó el pCREB significativamente elevado en las poblaciones que expresan optoXR (figura 3B, derecha) y no en el tejido no iluminado.

[00051] Las consecuencias funcionales de la activación del optoXR en la actividad eléctrica local de los accumbens se determinó mediante el registro del disparo neuronal *in vivo* de múltiples unidades con un optrodo dirigido a los accumbens transducidos (figura 4A). No se observaron diferencias significativas en las velocidades de disparo de referencia en la oscuridad con ninguna construcción (figura 4A, parte inferior derecha). La estimulación óptica dio como resultado una disminución del disparo de red en los accumbens que expresan opto-β_2AR (el rastro izquierdo en la figura 4B ilustra la cinética de efecto; datos de resumen mostrados en la figura 4C y 4D, respectivamente), de acuerdo con estudios farmacológicos previos que se dirigen al Gs. La estimulación óptica aumentó el disparo en los accumbens que expresan opto-α_1AR (figura 4B derecha; figuras 4C y 4D). Los histogramas de frecuencias de pico mostraron que la cinética de los efectos del optoXR en las velocidades de disparo fue coherente con la bioquímica en lugar de la iniciación eléctrica de la señal (figura 4D). Estos datos electrofisiológicos, junto con las validaciones bioquímicas anteriores, apoyan que los optoXR puedan expresarse funcionalmente *in vivo*, para permitir el control fotoactivable diferencial de las cascadas intracelulares y para modular la fisiología de la red.

[00052] En una implementación, se usaron optogenéticas para evaluar la capacidad de la estimulación del optoXR cronometrada con precisión para modular el comportamiento en ratones que se mueven libremente. La administración de luz de estado sólido portátil se combinó con la expresión transgénica de los optoXR para controlar ópticamente la señalización intracelular dentro de las neuronas accumbens de la manera temporalmente precisa usada para el comportamiento operante (figura 5A). El análisis confocal reveló la expresión que se limita a las neuronas accumbens locales; en particular no se observó etiquetado en las fibras aferentes, en distintas regiones que se proyectan a los accumbens, en glía, o en las regiones circundantes. La estimulación óptica se dirigió a los accumbens transducidos como parte de un ensayo de preferencia de lugar acondicionado operante de tres días (figura 5A). En cada día de la prueba, se dejó que los animales explorasen libremente el aparato de preferencia del lugar (figura 5A, parte inferior). El día 1, los animales exploraron libremente el aparato sin estimulación óptica. El día 2, cada vez que el animal entró libremente a la cámara acondicionada designada, una fibra óptica acoplada a un diodo láser registrada a la región transducida suministró pulsos de luz a 10 Hz a aproximadamente la intensidad probable de la entrada monoaminérgica durante una fuerte recompensa. El rastreo de la ruta reveló que el procedimiento de fibra óptica flexible permitió una exploración completa y no impedida de todas las cámaras (figura 5A, parte inferior). El día 3, los animales exploraron libremente de nuevo el aparato sin estimulación óptica, y el tiempo agotado en la cámara acondicionada se cuantificó por dos clasificadores ciegos independientes. Notablemente, los animales que expresan opto-α_1AR mostraron un fuerte aumento en la preferencia por el lado acondicionado del aparato después de la estimulación óptica (figura 5B). Este efecto de modulación bioquímica temporalmente precisa fue reproducible a través de dos cohortes separados de animales que expresan opto-α_1AR ($n = 5$-6, $P<0,05$, prueba t de Student para cada cohorte durante el tiempo en la cámara acondicionada; $n = 11$, $P<0,01$ para la población total), mientras que los demás genes de opsina, opto-β_2AR y ChR2, parecieron menos eficaces en la preferencia de conducción. El efecto de la estimulación opto-α_1AR en las neuronas accumbens fue específico para el comportamiento relacionado con la recompensa y no se extendió a la modulación directa de comportamientos relacionados con la ansiedad o actividad locomotora, ya que la estimulación óptica idéntica suministrada a un cohorte de los mismos animales en una prueba de campo abierto no reveló ningún efecto significativo en la distancia recorrida o de preferencia para la proximidad de la pared (figura 5C).

[00053] A continuación, se describe una implementación especifica y no limitante que es coherente con los experimentos anteriores. El registro y el análisis *in vivo* se realizó usando optrodos que consisten en una fibra óptica

de múltiples modos de 200 mm de diámetro (Thorlabs) acoplada a un electrodo de registro (tungsteno 1 MV, A-M Systems) con una distancia de punta a punta del electrodo/fibra de 200-400 mm se disminuyeron en los accumbens transducidos (punta de electrodo 4,8-5,2 mm bajo el bregma) de ratones colocados en una estructura estereostática (David Kopf Instruments) y se anestesiaron con isoflurano. La luz de un láser de diodo de 473 nm (CrystaLaser) se suministró a través de la fibra. Las señales eléctricas se filtraron por paso de banda y se amplificaron (0,3-1 kHz, Amplificador de AC 1800 Microelectrode, A-M Systems) y se analizaron con pClamp 10.0 (Molecular Devices). Las puntas se detectaron por el umbral y se confirmaron individualmente mediante inspección.

[00054] El análisis de comportamiento se realizó usando estimulación óptica que se aplicó a través de una fibra óptica (diámetro de 200 mm, Thor Labs) acoplada a un láser de diodo azul de 473 nm (CrystaLaser) y se registró con una cánula que se dirigía a los accumbens (0-100 mm de punta) . La luz se administró con un ancho de pulso de 50 ms para los optoXR a través de un generador de función (Agilent 33220A). La preferencia de lugar se realizó en un aparato convencional (SD Instruments) con las paredes entre las cámaras retiradas para permitir la libre exploración. Los datos se analizaron a partir del video para observar la cantidad de tiempo gastado en cada cámara por dos observadores ciegos e independientes usando una realización de script de recuento personalizada en MATLAB (Mathworks). Para las pruebas de campo abierto, los animales se colocaron en un campo abierto cuadrado que medía 40340 cm; la estimulación de luz se suministró con los mismos parámetros que para los experimentos de preferencia del lugar. Los videos se analizaron usando un software automatizado (Viewpoint), para comprobar el tiempo total y la distancia en el cuadrado de 15315 cm central frente el anillo exterior (resto del campo).

[00055] El análisis estadístico, cuando se indicó, se realizó usando las pruebas t de Student de dos colas (calculadas en Microsoft Excell) o ANOVA de una vía con pruebas *post-hoc* de de Tukey (GraphPad Prism). Todas las gráficas de barras de resumen se presentan como media +/- s.e.m., con una significancia que se representa como se indica a continuación: *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

[00056] Pueden encontrarse detalles adicionales que apoyan los sorprendentes resultados y la eficacia de diversas realizaciones de la presente memoria en Temporally precise in vivo control of intracellular signalling, Raag D. Airan, y col., Nature 458, 1025-1029 (23 de abril de 2009).

[00057] La siguiente descripción proporciona detalles para el procedimiento específico y no limitante que es coherente con una realización de la presente memoria. Se prevén numerosas variaciones de esta metodología y están dentro del alcance de la presente memoria.

Construcción del Vector

[00058] Se sintetizaron secuencias optimizadas de codón de mamífero de opto-α_1AR y opto-β_2AR (secuencias aminoacídicas en la figura 1A) y se clonaron en pcDNA3.1, y se condensaron en el extremo N de mCherry o YFP (con su codón de inicio suprimido) usando el sitio NotI. El enlazador entre el optoXR y mCherry/YFP es 5' GCGGCCGCC 3'. Los vectores lentivirales que contienen Sinapsina I optoXR mCherry se construyeron clonando el transgen para cada optoXR mCherry en los sitios AgeI y EcoRI del vector pLenti Sinapsina I hChR2 mCherry WPRE.

Producción Lentiviral

[00059] Se produjo un lentivirus de alta titulación. En resumen, las células HEK 293FT se colocaron en placas al 90% de confluencia en una fábrica de células en 4 capas (Nunc) cultivada con DMEM que contenía FBS al 10%. Las células se co-transfectaron con 690 μg del vector lentiviral que se ha descrito anteriormente y dos plásmidos auxiliares (690 μg de pΔCMVR8.74 y 460 μg de pMD2.G). El medio se cambió 15 horas después de la transfección. 24 horas después de la transfección, el medio se cambió con 200-220 ml de UltraCULTURE sin suero (Cambrex) que contenía butirato sódico 5 mM. 40 horas después de la transfección, el sobrenadante de cultivo, que ahora contenía virus, se hizo girar a 1000 rpm durante 5 min para eliminar los restos celulares y después se filtró usando un matraz de filtro de baja unión a proteína de 0,45 μm. Después, el sobrenadante aclarado se ultracentrifugó durante 2 h a 55.000 g usando un rotor SW 28 (Beckman) para precipitar el virus. Después de la centrifugación, el sobrenadante se desechó y el gránulo viral resultante se disolvió en un total de 100 μl de PBS frío (4 ºC). El virus re-suspendido se centrifugó durante 5 min a 7000 rpm para eliminar los restos celulares y virales restantes. Las alícuotas se congelaron a -80 ºC hasta si uso posterior.

Cirugía y comportamiento del animal

[00060] Ratones C57BL/6 hembras, de 10-12 semanas de edad, se alojaron y se manejaron de acuerdo con el

protocolo de animales vertebrados de laboratorio de la Universidad de Stanford. La solución del virus se suministró al núcleo accumbens derecho como se indica a continuación. Los animales se anestesiaron con isoflurano y el pelaje de la parte superior de la cabeza se trasquiló. Mientras que estaban bajo los efectos de la anestesia con isoflurano, la cabeza del animal se colocó en una estructura estereotáctica (David Kopf Instruments). Se hizo una incisión en el cuero cabelludo de línea media y se perforó una craneotomía de ~1 mm de diámetro, 1,10 mm anterior, y 1,45 mm lateral al bregma. Después, una aguja de calibre 33 biselada (NanoFil, World Precision Instruments) pre-cargada con el virus se bajó dentro del accumbens (punta de la aguja a 4,70-4,80 mm ventral al bregma) y se inyecto 1,0 μl del virus a 100 nl/min usando una bomba de jeringa automatizada (NanoFil, World Precision Instruments). Después de la inyección, se permitieron 3-5 minutos para la relajación del tejido y la difusión del fluido antes de la retracción de la aguja. Para los animales dirigidos para los experimentos de registro de rebanada aguda o *in vivo*, la craneotomía se rellenó con cemento dental (Lang Dental) y la incisión se cerró usando VetBond (3M). Para los animales dirigidos para el análisis de comportamiento, se colocaron cánulas (C316G, corte de 4,5 mm bajo el pedestal; PlasticsOne) con lavado de pedestal al cráneo. Las cánulas se fijaron usando Metabond (Parkell) y cemento dental (Lang Dental). Después del secado del VetBond o cemento, los animales se extrajeron de la estructura y se dejaron recuperar durante al menos una semana antes de una manipulación adicional. Los animales de control para los experimentos de comportamiento se sometieron a las mismas manipulaciones (cirugía, implantación de la cánula, estimulación de luz) como los animales experimentales, y se les inyectó el vehículo (PBS) solo en lugar del virus. Para los experimentos de preferencia de lugar, los animales que no mostraron una preferencia de referencia para la cámara lateral (>70% o <10%) o para la cámara central (>40%) se admitieron en el estudio; >90% de todos los animales cumplen estos criterios para un diseño de preferencia del lugar no parcial balanceado.

Preparación de la rebanada aguda

[00061] Los animales se anestesiaron con isoflurano y se decapitaron usando cuchillas quirúrgicas (Fine Science Tools). Se cortaron rebanadas de 275 μm de grosor coronales que contenían accumbens y se almacenaron en una solución de corte que contenía NaCl 64 mM, KCl 2,5 mM, NaH_2PO_4 1,25 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, glucosa 10 mM, sacarosa 120 mM, $CaCl_2$ 0,5 mM y $MgCl_2$ 7 mM (equilibrada con O_2 al 95%/CO_2 al 5%). Después del rebanado, las rebanadas se incubaron en la solución de corte a 32-35 ºC durante 30 minutos y después a temperatura ambiente hasta la experimentación. Para la estimulación de optoXR *ex vivo*, las rebanadas se cargaron sobre la plataforma de un microscopio vertical (BX51 W, Olympus) y se perfundieron con un fluido cerebroespinal artificial que contenía NaCl 124 mM, KCl 3 mM, NaH_2PO_4 1,25 mM, $NaHCO_3$ 26 mM, glucosa 10 mM, $CaCl_2$ 2,4 mM y $MgCl_2$ 1,3 mM (equilibrado con O_2 al 95%/CO_2 al 5%. Se hizo pasar luz de un Lambda DG-4 de 300 W (Sutter) a través de un filtro de paso de banda de 473 nm ± 20 nm (Semrock) y se aplicó a las rebanadas usando un objetivo de 4 aumentos (0,28 NA) durante 10 min seguido inmediatamente de la fijación para análisis posteriores.

Ensayos de *validación de señalización*

[00062] Se transfectaron células HEK293FT (Invitrogen) usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en placas de 24 pocillos y se cambiaron a un medio sin suero 4-6 horas después de la transfección. Para la formación de imágenes de Ca^+, las células colocadas en placas sobre cubreobjetos recubiertos con matrigel se cargaron con 5 μg/ml de fura-2 AM en F-127 Pluronic/DMSO (Sondas) en Tyrode que contenía 1 μM de ATR, a 37 ºC y CO_2 atmosférico al 5% durante 20-25 minutos. Después de la carga, los cubreobjetos se formaron en imágenes en 340 nm/380 nm en un Olympus BX51W usando Metafluor (Axon Instruments) que controla un Lambda DG-4 de 300 W (Sutter). Para los inmunoensayos, 18-24 horas después de la transfección, se añadió 1 μM de ATR y LiCl 50 mM (para impedir la degradación del IP_1) y las placas se transfirieron a un microscopio controlado ambientalmente (Leica DMI6000; 37 ºC, CO_2 atmosférico al 5%). Las 5 regiones/pocillos se estimularon ópticamente durante 1 min cada una (Lambda DG-4 de 300 W Sutter; filtro de paso de banda 504/12 nm Semrock; objetivo 10X 0,30 HA); 3 pocillos/condición. Después de la incubación (cAMP/cGMP: 20 minutos; IP_1: 1 hora), las células se lisaron y se analizaron por HTRF (CisBio) y un lector Biotek Synergy4.

Análisis inmunohistoquimico y confocal

[00063] Después de la estimulación *in vivo,* los ratones se perfundieron por vía transcardial con paraformaldehído al 4% enfriado con hielo (PFA) en PBS (pH 7,4) 90 minutos después de la finalización de la estimulación. Los cerebros se extrajeron y se fijaron durante una noche en PFA al 4% y después se equilibraron en sacarosa al 30% en PBS. Las secciones de 40 μm de grosor coronales se cortaron sobre un micrótomo de congelación y se almacenaron en crioprotector a 4 ºC hasta que se procesaron para la inmunohistoquímica. Las secciones flotantes libres se lavaron en PBS y después se incubaron durante 30 min en Tx100 al 0,3% y suero de

burro normal al 3% (NDS). Para los experimentos de rebanada aguda, inmediatamente después de la estimulación, las rebanadas de 275 μm de grosor se fijaron durante 1 h en PFA al 4% enfriado con hielo y se incubaron con Tx100 al 0,5% y NDS al 3%. Para los ensayos de MAPK, inmediatamente después de la estimulación de las células HEK293, los cubreobjetos se fijaron durante 15 min, se incubaron con H_2O_2 al 0,6% y después se permeabilizaron con Tx100 al 0,1% en NDS al 3%. Las incubaciones de anticuerpos primarios se realizaron durante una noche en Tx100 al 0,01% y NDS al 3% para anti-GAD67 de ratón 1:500, Millipore, Billerica, MA; anti-cfos de conejo 1:500, Calbiochem, San Diego, CA; anti-fosfo-CREB Ser133 de conejo 1:500, Millipore. Las secciones se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios (1:1000) conjugados con FITC o Cy5 (Jackson Laboratories, West Grove, PA) durante 3 h a temperatura ambiente. Después de 20 minutos de incubación con DAPI (1:50.000), las secciones se lavaron y se montaron sobre portaobjetos de microscopio con PVD-DABCO. Las incubaciones de anticuerpos primarios durante la noche restantes (anti-fosfoErk1/2 de conejo; anti-fosfo-MAPK p38 1:500, Promega, Madison, WI; receptor de anti-dopamina C1 monoclonal de ratón 1:50, Chemicon; receptor de anti-dopamina D2 policlonal de conejo 1:50, Millipore; anti-colina-acetiltransferasa policlonal de cabra 1:200, Millipore) se siguieron de la incubación con un anticuerpo secundario biotinilado (1:500, Jackson Laboratories), tratamiento con avidina-biotina-peroxidasa de rábano rusticano (ABC kit, Vector Labs, Burlingame, CA) y detección de TSA (Perkin Elmer, Shelton, CT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[00064] Las imágenes de fluorescencia confocales se adquirieron en un microscopio láser de exploración Leica TCS SP5 usando un objetivo de inmersión en aceite 20X/0,70NA o 40X/1,25NA. Se adquirieron cuatro imágenes de apilamiento en serie por condición dentro de una región de 500 μm bajo el tracto de la cánula. Se usó tinción DAPI para delinear los núcleos para la determinación de la intensidad de píxeles media de cfos o la inmunorreactividad pCREB usando el software Volocity (Improvision). Se identificaron células positivas o activas para pCREB por el umbral de intensidad, y la adquisición de imágenes y el análisis se realizaron en modo ciego con respecto a las condiciones experimentales.

Tabla S1

Intensidades pCREB numéricas sin procesar (au) para los datos representados en la figura 3B. Media y SEM en negrita para cada subgrupo; valores de p para una prueba t de dos colas del subgrupo frente al control en cursiva				
	opto-α_1AR		opto-β_2AR	
mCherry	-	+	-	+
Media	65,326	97,95309	63,6385	82,83284
SEM	3,758281	7,199024	3,847409	6,907057
valor de p frente a mCherry-		*0,000272*		*0,019559*

Tabla S2

Velocidades de disparo de referencia numéricas sin procesar (Hz) para datos presentados en la figura 4A. Media y SEM en negrita para cada subgrupo; valores de p para prueba t del subgrupo frente al control en cursiva.			
	XFP	oα_1AR	oβ_2AR
Media	2,596154	2,439357	2,687798
SEM	0,436406	0,603845	0,346556
valor de p frente a XFP		*0,834496*	*0,869791*

Tabla S3

Cambios numéricos sin procesar en la velocidad de disparo (Hz) para los datos presentados en la figura 4C calculados dentro de la propia línea basal ("Base") y entre la línea basal y los períodos de estimulación de luz ("Luz").				
	opto-β_2AR		Opto-α_1AR	
Media	0,061788	-0,68113	-0,01287	3,816198
SEM	0,134665	0,162402	0,336387	0,812251
valor de p frente a Base		*0,000861*		*0,000239*

[00065] Por consiguiente, las realizaciones de la presente memoria se refieren al control optogenético de la señalización intracelular y son útiles para la precisión temporal mientras que operan *in vivo* dentro del comportamiento de los mamíferos, mientras que exhiben actividad en la oscuridad extremadamente baja, y reclutan el tejido complejo de múltiples moléculas de señalización cascada abajo de los receptores nativos, unificando así en una sola tecnología muchos de los aspectos positivos individuales de otras estrategias. Las realizaciones similares prueban directamente la importancia causal de las rutas de señalización dependientes de siete transmembranas desencadenadas por otros moduladores, que incluyen innumerables neurotransmisores y hormonas endocrinas. Otras realizaciones usan una estrategia optoXR en formas que se extienden más allá de las células excitables para capitalizarse tras la integración versátil de la profundidad de fibra óptica que se dirige con la fotosensibilidad optogenéticamente dirigidas. Una realización de este tipo se refiere a probar la importancia causal de la señalización bioquímica temporalmente precisa en diversos tejidos no excitables.

[00066] Las realizaciones de la presente memoria se refieren a consideraciones del fenómeno de la señalización predispuesta del ligando, donde los ligandos variados puedan estabilizar los estados conformacionales de receptor de conjunto y en consecuencia predisponen la acción intracelular del receptor en el acoplamiento a las cascadas de transducción alternativas. Los optoXR se usan para inducir estas cascadas alternativas a niveles similares que con la manipulación farmacológica (por ejemplo, opto-β_2AR puede inducir cambios similares en la activación de MAPK en comparación con el ligando nativo que actúa sobre el β_2-AR de origen natural); sin embargo, se ha descubierto que los optoXR individuales no siempre permiten el control de todos los estados conformacionales que contribuyen a la señalización predispuesta del ligando. Las herramientas basadas en la retina pueden ser particularmente útiles debido a la presencia del cromóforo endógeno en los tejidos de mamífero, y la actividad extremadamente baja en la oscuridad. La optogenética puede tomar la forma de diversos efectores unidos a módulos de unión a la retina de un componente rápidos, que se capitalizan en la precisión temporal de la óptica.

[00067] Las realizaciones de la presente memoria usan procedimientos optoXR para complementar las estrategias de opsina microbianas, proporcionando otra dimensión de control celular dirigible rápido operativo en el comportamiento de mamíferos.

[00068] Consistente con otra realización de la presente memoria, se usan las versiones de longitud de onda desplazadas de los optoXR, en base a genes de opsina conocidos con diferentes espectros de acción. Dichos OptoXR pueden ser particularmente útiles para proporcionar canales separables de control bioquímico y eléctrico.

[00069] Las variantes de las secuencias de proteínas específicas analizadas en este documento son coherentes con las realizaciones de la presente memoria. Algunas variantes tienen una homología mayor de aproximadamente el 75% con respecto a estas secuencias de proteínas, mientras que otras son mayores de aproximadamente el 80%, 85% o el 90%. En algunas realizaciones, la homología será tan alta como de aproximadamente el 93 a aproximadamente el 95 o aproximadamente el 98%. Las composiciones de la presente memoria incluyen las secuencias de proteínas y ácidos nucleicos proporcionadas en este documento que incluyen variantes que tienen una homología de más de aproximadamente el 50% con respecto a la secuencia proporcionada hasta e incluyendo una homología del 100%.

[00070] Las diversas realizaciones analizadas en este documento podrían integrarse con tecnologías de lectura de circuito rápidas para la interrogación cada vez más sofisticada y la ingeniería inversa de los circuitos neuronales,

ambos en la operación normal y en estados patológicos.

[00071] Las diversas realizaciones que se han descrito anteriormente se proporcionan únicamente a modo de ilustración y no se deben considerar para limitar la invención. En base al análisis e ilustraciones anteriores, los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que pueden hacerse diversas modificaciones y cambios a la presente invención sin seguir estrictamente las realizaciones y aplicaciones de ejemplo ilustradas y descritas en este documento. Por ejemplo, dichos cambios pueden incluir variaciones del mensajero secundario producido.

LISTA DE SECUENCIAS

[0073]

<110> The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University

<120> LÍNEA CELULAR, SISTEMA Y PROCEDIMIENTO PARA EL CONTROL ÓPTICO DE MENSAJEROS SECUNDARIOS

<130> 6886097

<140>
<141> 29/05/2009

<150> EP09759107.7
<151> 29/05/2009

<150> PCT/US2009/045611
<151> 29/05/2009

<150> US 61/057,108
<151> 29/05/2008

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1302
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> quimerismo de rodopsina/GPCR

<400> 1

```
atgaacggaa cagagggccc aaacttttac gttcccttct ccaataagac tggggtcgtg      60

agaagcccat ttgaggcgcc tcaatactac cttgctgagc cgtggcagtt ttctatgctc     120

gctgcttaca tgttcttgct gatcatgctg gggttcccta tcaatttcct gacgctgtac     180

gttatagcaa agttcgaacg cctccaaacc gtgttgaact acatactcct taacctcgcg     240

gttgccgacc tcttcatggt tttcgggggt ttcaccacca ccctctacac ctcccttcac     300

ggctacttcg tgttcggccc taccggatgc aatctggaag gctttttcgc aacgctgggg     360

ggggagattg ccctttggag cctggtggtc ttggccatag agaggtacgt ggtggtcaca     420

tccccattca agtaccagag tttgcttaca aagaacaagg ctatcatggg ggtcgccttc     480

acatgggtga tggcgctggc ttgcgctgcc ccaccgctgg taggctggtc ccggtatatt     540

ccggagggaa tgcagtgcag ttgtgggatc gactactaca ccccacacga agagactaac     600

aacgagtctt ttgtgattta tatgttcgtg gtccacttca tcatcccccc gatagtgatc     660

tttttctgtt acggcagggt gttccaggtc gccaaaaggc agctccagaa gatcgacaaa     720

agcgaaggcc gctttcacag ccccaatctt ggacaggttg aacaggacgg caggtcaggg     780

cacgggctgc gacgcagttc taagttctgc ctgaaggaac ataaggcctt gagaatggtg     840

atcatcatgg taatcgcctt cctgatatgc tggcttccat acgctggcgt ggcttttttat     900

atattcacgc accaggggtc agattttggg cctatcttta tgaccatacc tgctttcttc     960

gctaagacga gtgcggtgta taacccagtg atatacatca tgatgaacaa acaattcaga    1020

attgccttcc aggaattgct ctgtctcaga cgcagctctt ccaaagcgta cggaaatggc    1080

tattcatcta acagcaacgg aaagactgat tatatgggcg aagccagtgg ctgccagctg    1140

ggccaggaaa aagagagcga gcggctttgt gaagatcccc caggcactga gagcttcgtg    1200

aattgtcagg gaacagttcc gagtctctct cttgattcac agggacgcaa ttgctctacc    1260

aacgacagcc ccctggagac ttcccaggtc gctccggcct aa                       1302
```

<210> 2
<211> 434
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> quimerismo de rodopsina/GPCR

<400> 2

```
Met Asn Gly Thr Glu Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Lys
1               5                  10                  15

Thr Gly Val Val Arg Ser Pro Phe Glu Ala Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala
            20                  25                  30

Glu Pro Trp Gln Phe Ser Met Leu Ala Ala Tyr Met Phe Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Met Leu Gly Phe Pro Ile Asn Phe Leu Thr Leu Tyr Val Ile Ala Lys
    50                  55                  60

Phe Glu Arg Leu Gln Thr Val Leu Asn Tyr Ile Leu Leu Asn Leu Ala
65                  70                  75                  80

Val Ala Asp Leu Phe Met Val Phe Gly Gly Phe Thr Thr Thr Leu Tyr
                85                  90                  95

Thr Ser Leu His Gly Tyr Phe Val Phe Gly Pro Thr Gly Cys Asn Leu
            100                 105                 110

Glu Gly Phe Phe Ala Thr Leu Gly Gly Glu Ile Ala Leu Trp Ser Leu
        115                 120                 125

Val Val Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Val Val Val Thr Ser Pro Phe Lys
    130                 135                 140

Tyr Gln Ser Leu Leu Thr Lys Asn Lys Ala Ile Met Gly Val Ala Phe
145                 150                 155                 160

Thr Trp Val Met Ala Leu Ala Cys Ala Ala Pro Pro Leu Val Gly Trp
```

```
                165                 170                 175

Ser Arg Tyr Ile Pro Glu Gly Met Gln Cys Ser Cys Gly Ile Asp Tyr
            180                 185                 190

Tyr Thr Pro His Glu Glu Thr Asn Asn Glu Ser Phe Val Ile Tyr Met
        195                 200                 205

Phe Val Val His Phe Ile Ile Pro Leu Ile Val Ile Phe Phe Cys Tyr
    210                 215                 220

Gly Arg Val Phe Gln Val Ala Lys Arg Gln Leu Gln Lys Ile Asp Lys
225                 230                 235                 240

Ser Glu Gly Arg Phe His Ser Pro Asn Leu Gly Gln Val Glu Gln Asp
                245                 250                 255

Gly Arg Ser Gly His Gly Leu Arg Arg Ser Ser Lys Phe Cys Leu Lys
            260                 265                 270

Glu His Lys Ala Leu Arg Met Val Ile Ile Met Val Ile Ala Phe Leu
        275                 280                 285

Ile Cys Trp Leu Pro Tyr Ala Gly Val Ala Phe Tyr Ile Phe Thr His
    290                 295                 300

Gln Gly Ser Asp Phe Gly Pro Ile Phe Met Thr Ile Pro Ala Phe Phe
305                 310                 315                 320

Ala Lys Thr Ser Ala Val Tyr Asn Pro Val Ile Tyr Ile Met Met Asn
                325                 330                 335

Lys Gln Phe Arg Ile Ala Phe Gln Glu Leu Leu Cys Leu Arg Arg Ser
            340                 345                 350

Ser Ser Lys Ala Tyr Gly Asn Gly Tyr Ser Ser Asn Ser Asn Gly Lys
        355                 360                 365

Thr Asp Tyr Met Gly Glu Ala Ser Gly Cys Gln Leu Gly Gln Glu Lys
    370                 375                 380

Glu Ser Glu Arg Leu Cys Glu Asp Pro Pro Gly Thr Glu Ser Phe Val
385                 390                 395                 400

Asn Cys Gln Gly Thr Val Pro Ser Leu Ser Leu Asp Ser Gln Gly Arg
                405                 410                 415
```

Asn Cys Ser Thr Asn Asp Ser Pro Leu Thr Glu Thr Ser Gln Val Ala
420 425 430

Pro Ala

<210> 3
<211> 1485
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> quimerismo de rodopsina/GPCR

<400> 3

atgaatggga ccgagggtcc aaatttttac gtacccttta gtaacaagac tggcgtggtg 60

cgcagtccat tcgaagcccc acagtactac ctcgcagagc cgtggcaatt ctcaatgctg 120

gccgcttata tgttccttct gattatgctg gggtttccca tcaattttct taccctgtat 180

gtggtagcat gccacagaca tttgcactcc gtattgaatt atattcttct gaacctcgcg 240

gtggcagatc ttttcatggt gttcggcggg tttacgacta ctctgtatac gtccctgcat 300

ggttattttg tgttcgggcc cacaggctgc aacttggaag gcttcttcgc cactcttggc 360

ggtgagatcg ctctttggag cctggtcgtc ctggccatcg agcggtatgt ggtggtgtct 420

tatcctctca gatatcccac catagtgacc cagcggaggg ccattatggg tgtagccttt 480

acctgggtca tggctttggc ctgtgctgct ccccccctgg tgggttggtc ccgctatatt 540

ccagaaggta tgcagtgttc ttgcggaatc gactactata ccccgcacga agagacaaac 600

aacgagtcct tcgtcatata tatgtttgta gtccacttta tcatcccctt gattgttatt 660

ttttttgct atggacgcgt ctacgtcgtg gccaaaaggg agtccagggg cttgaaatct 720

ggactgaaga cagataagag cgattccgag caggtgaccc ttcgcattca taggaagaac 780

gccccagcag gcggaagcgg gatggcatcc gccaagacta aaacccactt ttccgtgcgg 840

cttctcaagt tctcccgcga gaaaaaggcg gcgcgcatgg tcatcatcat ggttatcgcc 900

tttctcattt gctggctgcc ttacgctgga gtcgcgtttt acatcttcac acatcaaggt 960

tctgacttcg gcccaatctt tatgaccatc cctgccttct tcgccaagac ctctgccgtg 1020

tataaccccg ttatctatat tatgatgaac aagcagttcc ggaaggcatt tcagaatgtg 1080

ctgagaatcc aatgcctctg tcggaagcag tctagtaagc atgccctggg gtatactctg 1140

cacccaccca gtcaggctgt agagggccaa cacaaggata tggtgcggat accagtcggt 1200

tccagggaga cattttatcg gattagtaag accgacggag tctgcgagtg gaagtttttc 1260

tcttccatgc ccaggggatc tgcaaggatc acagtttcta aggatcagtc cagctgtacc 1320

acagcccgcg tgcgctccaa atcctttctt caggtctgct gctgtgttgg cccctcaacc 1380

ccctccctcg ataagaacca tcaggttccc accatcaagg tgcacactat atccttgagc 1440

gaaaacggcg aggaagttga aacttcacag gttgcccccg cctaa 1485

<210> 4
<211> 495
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> quimerismo de rodopsina/GPCR

<400> 4

```
Met Asn Gly Thr Glu Gly Pro Asn Phe Tyr Val Pro Phe Ser Asn Lys
1               5                  10                  15

Thr Gly Val Val Arg Ser Pro Phe Glu Ala Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala
            20                  25                  30

Glu Pro Trp Gln Phe Ser Met Leu Ala Ala Tyr Met Phe Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Met Leu Gly Phe Pro Ile Asn Phe Leu Thr Leu Tyr Val Val Ala Cys
    50                  55                  60

His Arg His Leu His Ser Val Leu Asn Tyr Ile Leu Leu Asn Leu Ala
65                  70                  75                  80

Val Ala Asp Leu Phe Met Val Phe Gly Gly Phe Thr Thr Thr Leu Tyr
                85                  90                  95

Thr Ser Leu His Gly Tyr Phe Val Phe Gly Pro Thr Gly Cys Asn Leu
            100                 105                 110

Glu Gly Phe Phe Ala Thr Leu Gly Gly Glu Ile Ala Leu Trp Ser Leu
        115                 120                 125

Val Val Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Val Val Val Ser Tyr Pro Leu Arg
    130                 135                 140

Tyr Pro Thr Ile Val Thr Gln Arg Arg Ala Ile Met Gly Val Ala Phe
145                 150                 155                 160

Thr Trp Val Met Ala Leu Ala Cys Ala Ala Pro Pro Leu Val Gly Trp
                165                 170                 175
```

```
Ser Arg Tyr Ile Pro Glu Gly Met Gln Cys Ser Cys Gly Ile Asp Tyr
            180                 185                 190

Tyr Thr Pro His Glu Glu Thr Asn Asn Glu Ser Phe Val Ile Tyr Met
        195                 200                 205

Phe Val Val His Phe Ile Ile Pro Leu Ile Val Ile Phe Phe Cys Tyr
    210                 215                 220

Gly Arg Val Tyr Val Val Ala Lys Arg Glu Ser Arg Gly Leu Lys Ser
225                 230                 235                 240

Gly Leu Lys Thr Asp Lys Ser Asp Ser Glu Gln Val Thr Leu Arg Ile
                245                 250                 255

His Arg Lys Asn Ala Pro Ala Gly Gly Ser Gly Met Ala Ser Ala Lys
            260                 265                 270

Thr Lys Thr His Phe Ser Val Arg Leu Leu Lys Phe Ser Arg Glu Lys
        275                 280                 285

Lys Ala Ala Arg Met Val Ile Ile Met Val Ile Ala Phe Leu Ile Cys
    290                 295                 300

Trp Leu Pro Tyr Ala Gly Val Ala Phe Tyr Ile Phe Thr His Gln Gly
305                 310                 315                 320

Ser Asp Phe Gly Pro Ile Phe Met Thr Ile Pro Ala Phe Phe Ala Lys
                325                 330                 335

Thr Ser Ala Val Tyr Asn Pro Val Ile Tyr Ile Met Met Asn Lys Gln
            340                 345                 350

Phe Arg Lys Ala Phe Gln Asn Val Leu Arg Ile Gln Cys Leu Cys Arg
        355                 360                 365

Lys Gln Ser Ser Lys His Ala Leu Gly Tyr Thr Leu His Pro Pro Ser
    370                 375                 380

Gln Ala Val Glu Gly Gln His Lys Asp Met Val Arg Ile Pro Val Gly
385                 390                 395                 400

Ser Arg Glu Thr Phe Tyr Arg Ile Ser Lys Thr Asp Gly Val Cys Glu
                405                 410                 415
```

```
Trp Lys Phe Phe Ser Ser Met Pro Arg Gly Ser Ala Arg Ile Thr Val
            420                 425                 430

Ser Lys Asp Gln Ser Ser Cys Thr Thr Ala Arg Val Arg Ser Lys Ser
        435                 440                 445

Phe Leu Gln Val Cys Cys Cys Val Gly Pro Ser Thr Pro Ser Leu Asp
    450                 455                 460

Lys Asn His Gln Val Pro Thr Ile Lys Val His Thr Ile Ser Leu Ser
465                 470                 475                 480

Glu Asn Gly Glu Glu Val Thr Glu Thr Ser Gln Val Ala Pro Ala
                485                 490                 495
```

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión quimérica sensible a la luz que comprende una proteína de membrana sensible a la luz basada en rodopsina y un receptor adrenérgico alfa-1 heterólogo, en la que la proteína de fusión quimérica sensible a la luz tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85% de homología con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 4, y en la que la expresión de la proteína de fusión en una célula de mamífero permite la producción de un mensajero secundario en la célula en respuesta a la luz.

2. Proteína de fusión quimérica sensible a la luz, según la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 4.

3. Proteína de fusión quimérica sensible a la luz, según la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 4.

4. Proteína de fusión quimérica sensible a la luz, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el mensajero secundario es inositol trifosfato/inositol 1,4,5-trisfosfato/trifosfoinositol (IP_3).

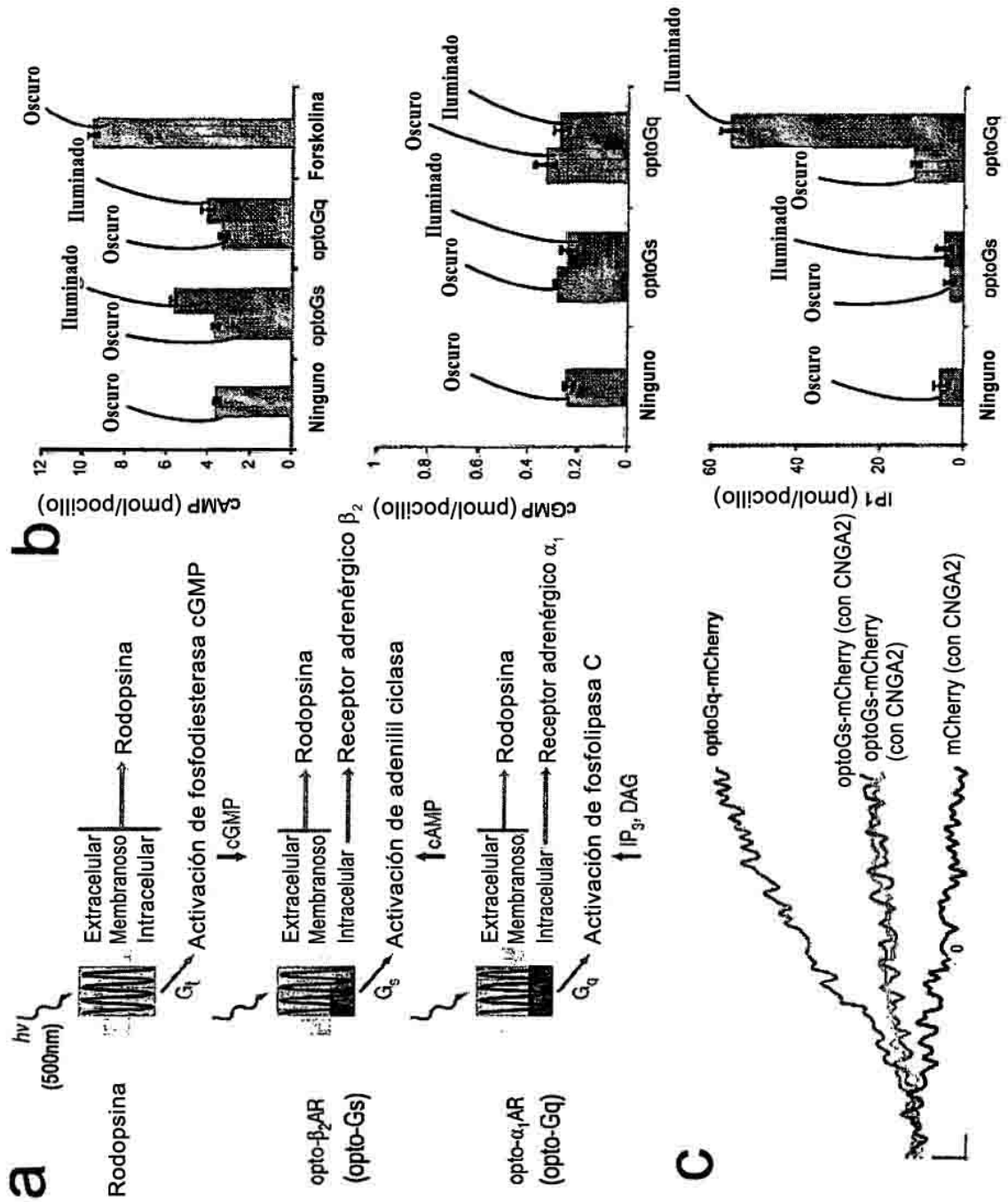

a
hν (500nm)
Rodopsina
Extracelular
Membranoso
Intracelular
Rodopsina
Activación de fosfodiesterasa cGMP
↓cGMP
opto-β2AR (opto-Gs)
Receptor adrenérgico β2
Activación de adenilil ciclasa
↑cAMP
opto-α1AR (opto-Gq)
Receptor adrenérgico α1
Activación de fosfolipasa C
↑IP3, DAG
b
cAMP (pmol/pocillo)
Oscuro
Iluminado
Ninguno
optoGs
optoGq
Forskolina
cGMP (pmol/pocillo)
IP1 (pmol/pocillo)
c
optoGq-mCherry
optoGs-mCherry (con CNGA2)
optoGs-mCherry (con CNGA2)
mCherry (con CNGA2)

FIG. 1

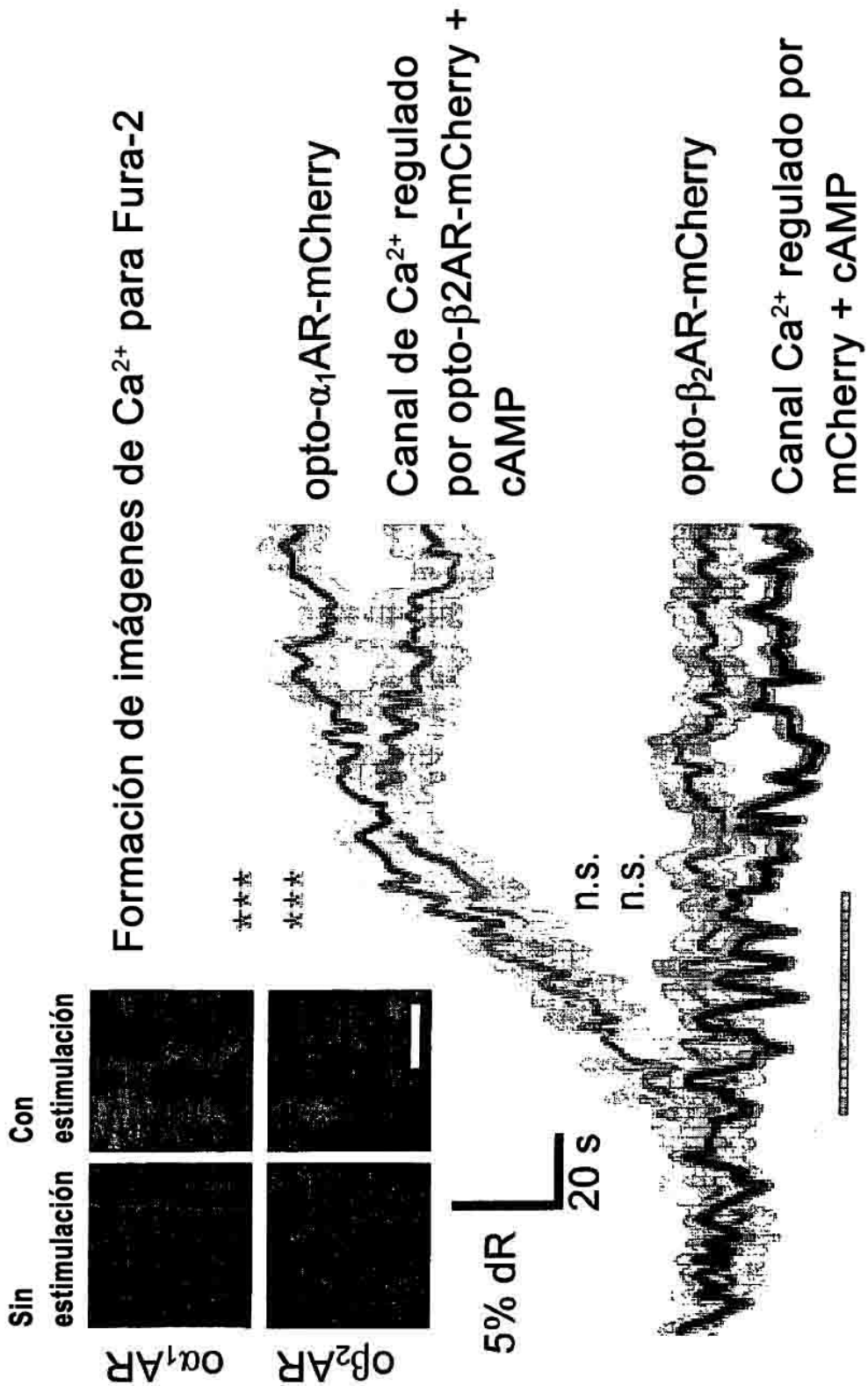

Formación de imágenes de Ca2+ para Fura-2
Sin estimulación
Con estimulación
opto-α1AR-mCherry
opto-β2AR-mCherry
***
***
n.s.
n.s.
Canal de Ca2+ regulado por opto-β2AR-mCherry + cAMP
Canal Ca2+ regulado por mCherry + cAMP
5% dR
20 s

FIG. 2

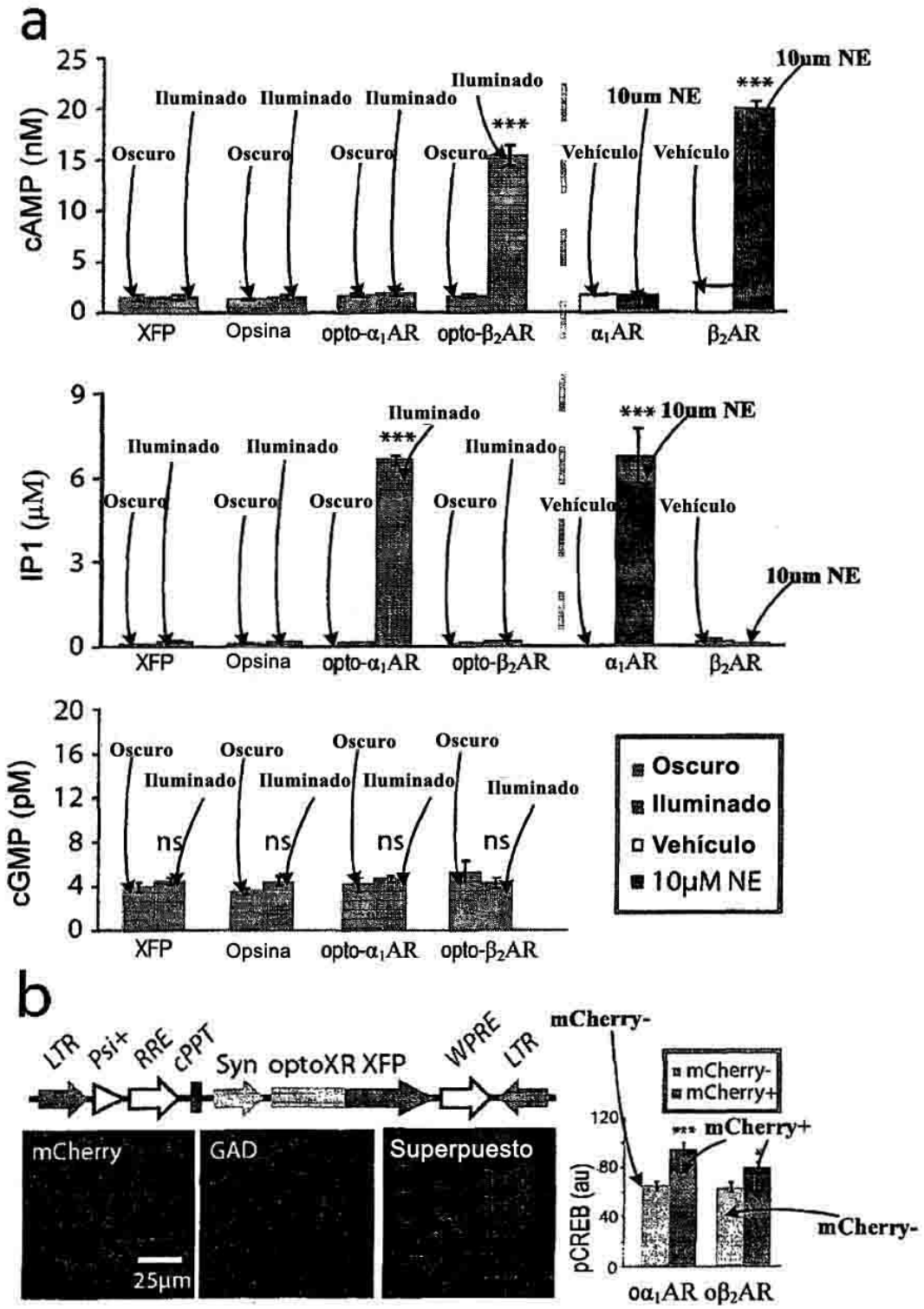
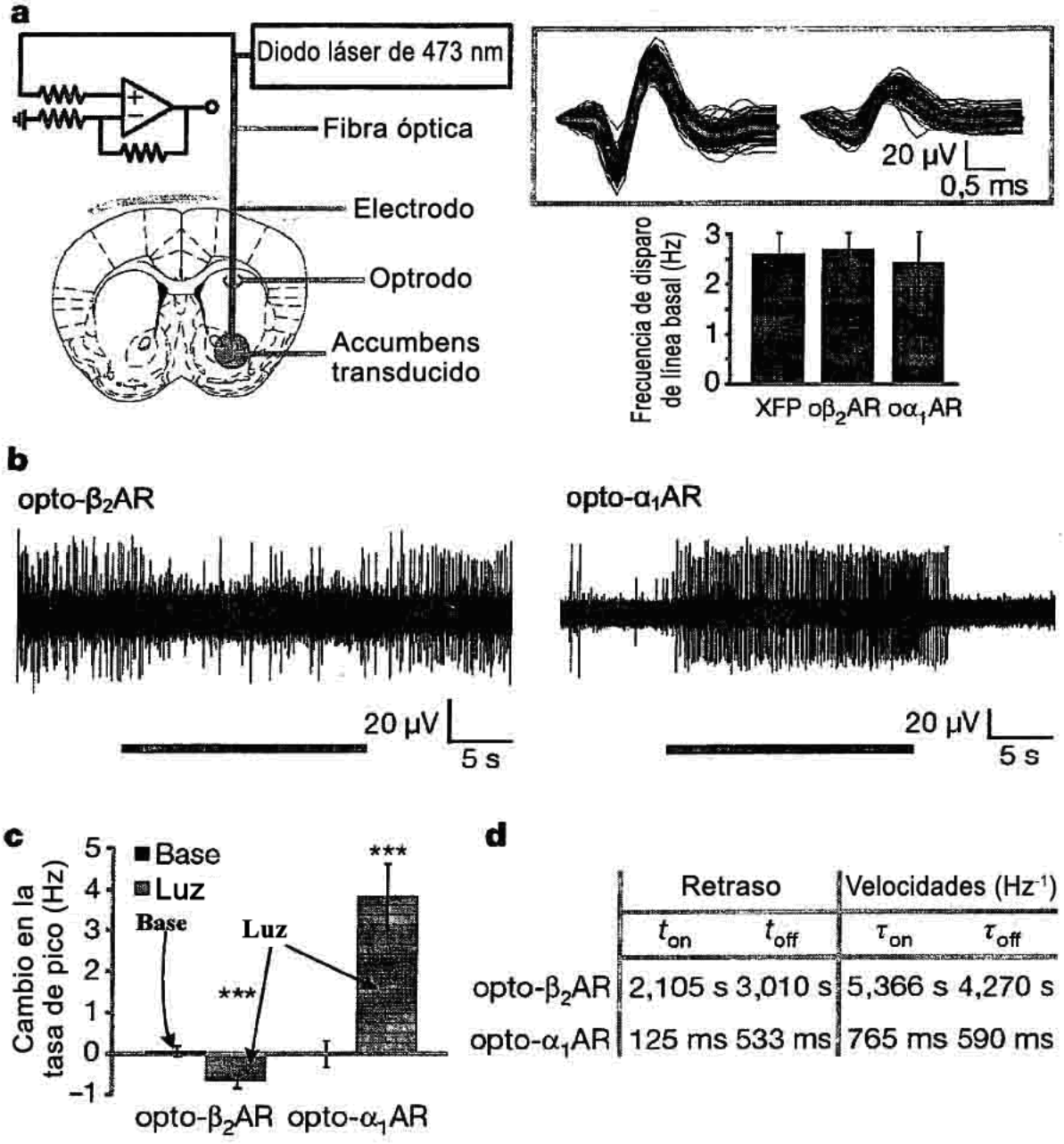

a
cAMP (nM)
25
20
15
10
5
0
Oscuro
Iluminado
Vehículo
10um NE
***
XFP
Opsina
opto-α1AR
opto-β2AR
α1AR
β2AR
IP1 (μM)
9
6
3
0
cGMP (pM)
20
16
12
8
4
ns
Oscuro
Iluminado
Vehículo
10μM NE
b
LTR
Psi+
RRE
cPPT
Syn optoXR XFP
WPRE
LTR
mCherry
GAD
Superpuesto
25μm
mCherry-
mCherry+
pCREB (au)
120
80
40
0
oα1AR oβ2AR

FIG. 3



d

	Retraso		Velocidades (Hz^{-1})	
	t_{on}	t_{off}	τ_{on}	τ_{off}
opto-β_2AR	2,105 s	3,010 s	5,366 s	4,270 s
opto-α_1AR	125 ms	533 ms	765 ms	590 ms

FIG. 4

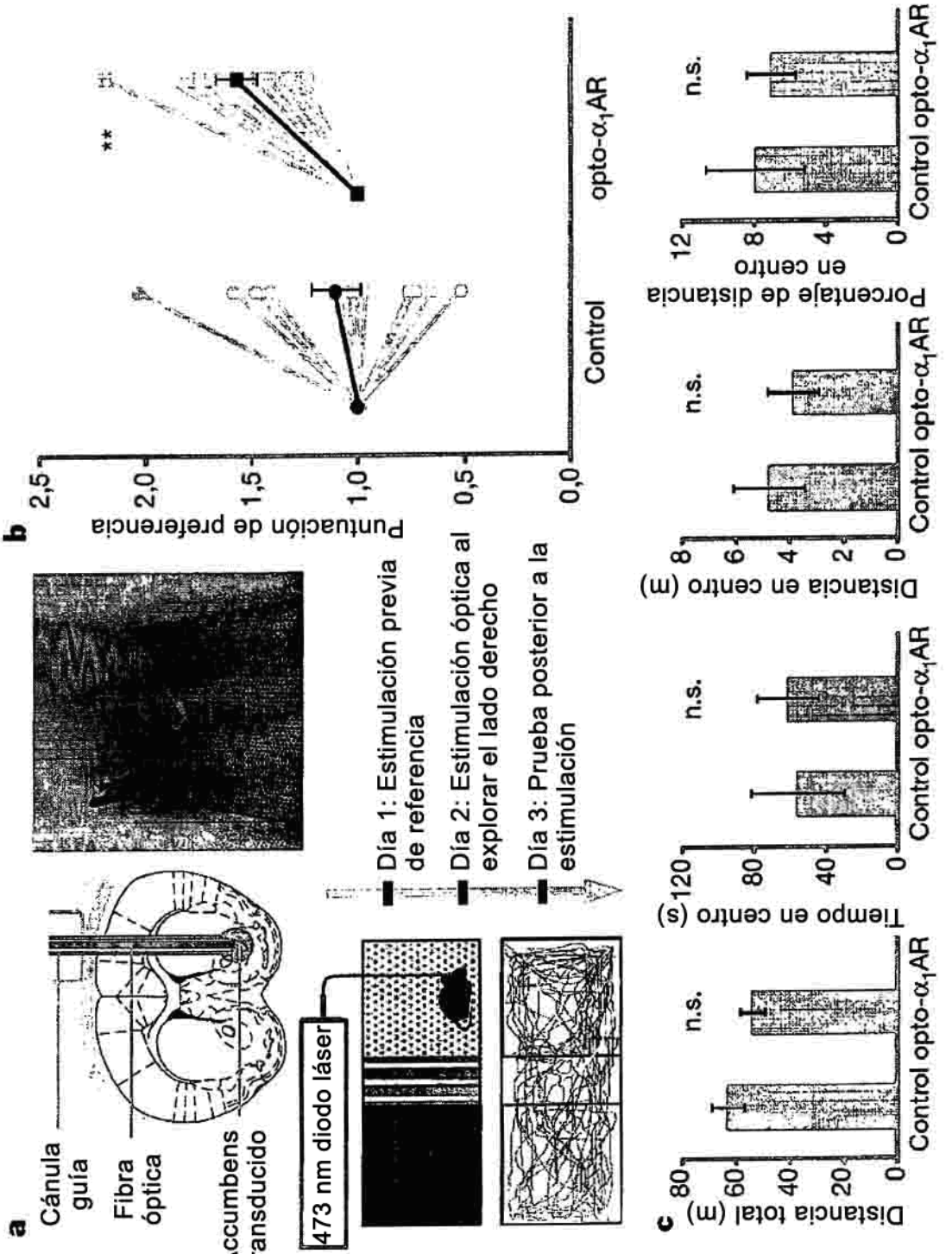

a
Cánula guía
Fibra óptica
Accumbens transducido
473 nm diodo láser
Día 1: Estimulación previa de referencia
Día 2: Estimulación óptica al explorar el lado derecho
Día 3: Prueba posterior a la estimulación
b
Puntuación de preferencia
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Control
opto-α1AR
**
c
Distancia total (m)
Tiempo en centro (s)
Distancia en centro (m)
Porcentaje de distancia en centro
n.s.
Control opto-α1AR

FIG. 5