

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 274**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2011 PCT/US2011/028893**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11116238**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2011 E 11757027 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2547762**

54 Título: **Moléculas sensibles a la luz que permiten el paso de iones**

30 Prioridad:

17.03.2010 US 314969 P

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

18.07.2018

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:

**ZHANG, FENG;
DEISSEROTH, KARL y
GRADINARU, VIVIANA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 676 274 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

Moléculas sensibles a la luz que permiten el paso de iones

5 **Documentos de patente relacionados**

El presente documento de patente reivindica el beneficio, según el punto 119(e) del artículo 35 del Código de Comercio de los Estados Unidos, de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos N.º 61/314.969 presentada el 17 de Marzo de 2010, y titulada "Light-Sensitive Ion-Passing Molecules".

10

Introducción general y resumen

Algunos aspectos de la presente divulgación se refieren de una forma general a sistemas y enfoques para estimular células diana, y más especialmente, al uso de la óptica para estimular las células diana. La estimulación de las diferentes células del organismo se ha utilizado para producir numerosos efectos beneficiosos. Un método de estimulación implica el uso de electrodos para introducir una señal generada externamente dentro de las células. Un problema al que se enfrentan las técnicas de estimulación cerebral basadas en electrodos es la naturaleza distribuida de las neuronas responsables de un proceso mental dado. A la inversa, diferentes tipos de neuronas se encuentran cerca unas de otras, de forma que solamente algunas células de una región del cerebro dada están activadas mientras realizan una tarea específica. Dicho de otra forma, no solamente tractos nerviosos heterogéneos recorren en paralelo estrechos confines espaciales, sino también los propios cuerpos celulares se pueden encontrar en configuraciones mixtas poco incluidas. Esta forma de procesamiento distribuido parece desafiar los mejores intentos para comprender el orden formal dentro del SNC, y convierte la neuromodulación en un empeño terapéuticamente difícil. Esta arquitectura del cerebro supone un problema para la estimulación basada en electrodos porque los electrones son poco discriminantes en lo que respecta a la fisiología subyacente de las neuronas que estimulan. En su lugar, la proximidad física entre los polos del electrodo y la neurona es, frecuentemente, el mayor factor individual determinante mediante el que estimular una neurona. En consecuencia, por lo general no es factible restringir de forma absoluta la estimulación a una única clase de neuronas usando electrodos.

30

Otro problema con el uso de electrodos para la estimulación se debe a que la colocación del electrodo determina qué neuronas se van a estimular, la estabilidad mecánica frecuentemente es inadecuada, y da como resultado la migración de plomo desde los electrodos a la zona diana. Asimismo, después de un periodo de tiempo dentro del cuerpo, los conectores del electrodo quedan frecuentemente encapsulados en las células gliales, lo que aumenta la resistencia eléctrica eficaz de los electrodos y, por tanto, la potencia eléctrica necesaria que se debe suministrar para alcanzar a las células diana. Un aumento compensatorio en la tensión, frecuencia o anchura de pulso, sin embargo, puede diseminar la corriente eléctrica y aumentar la estimulación no prevista de otras células.

35

Otro método de estímulo usa estructuras biomoleculares fotosensibles para estimular células diana en respuesta a la luz. Por ejemplo, se pueden usar proteínas activadas por luz para controlar el flujo de iones a través de las membranas celulares. Para facilitar o inhibir el flujo de iones positivos o negativos a través de membranas celulares, la célula se puede despolarizar un corto periodo de tiempo, despolarizarse y mantenerse en dicho estado, o hiperpolarizarse. Las neuronas son un ejemplo de un tipo de célula que utiliza las corrientes eléctrica creadas por la despolarización para generar señales de comunicación (es decir, impulsos nerviosos). Otras células excitables eléctricamente incluyen el músculo esquelético, músculo cardiaco, y células endocrinas. Las neuronas utilizan la despolarización rápida para transmitir señales a través del cuerpo y con diferentes objetivos, tales como el control motor, contracciones musculares), respuestas sensoriales (por ejemplo, tacto, audición, y otros sentidos) y funciones de cálculo (por ejemplo, funciones cerebrales). Por tanto, el control de la despolarización de las células puede ser beneficiosa para muchos fines diferentes, incluidos (aunque no de forma limitativa) terapia fisiológica, control muscular y funciones sensoriales.

50

Zhao et al. (2008) describe una halorodopsina de *Natronomonas pharaonis* sensible a la luz que contiene una señal de exportación al retículo endoplasmático (RE) en su extremo C. Esta proteína también se denomina en el presente documento como la proteína "eNpHR2.0".

55

La presente invención proporciona una proteína halorodopsina de *Natronomonas pharaonis* sensible a la luz (NpHR) que comprende en su extremo C una señal de exportación al retículo endoplasmático que tiene la secuencia de aminoácidos FCY-ENEV y una señal de tráfico de membrana que tiene la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV. La invención también se refiere a células neurales, vectores de transferencia de genes, métodos y animales no humanos tal como se define mediante las reivindicaciones.

60

La presente divulgación también define ('proporciona') numerosas realizaciones adicionales relativas a proteínas, células, métodos y sistema, como se discute en el presente documento de forma más detallada. No obstante, la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

65

En el presente documento se divulga una opsina que detecta luz azul capaz de inhibir la actividad neuronal. La

opsina procede de criptófitos de *Guillardia theta* (*G. theta*). La opsina de interés es la tercera opsina aislada de *G. theta*, y se abrevia como GtR3. GtR3 es capaz de mediar una corriente de hiperpolarización cuando se ilumina con luz. La caracterización del espectro de acción de GtR3 sugiere que el máximo de absorción está en aproximadamente 490 nm, y GtR3 no se activa mediante luz amarilla.

5 Varios aspectos de la presente divulgación se dirigen a una canalrodopsina detectora de luz azul capaz de excitar la actividad neural. La canalrodopsina se deriva de *Dunaliella salina*. La canalrodopsina de interés se abrevia como DChR. DChR se puede expresar heterológamente en neuronas de mamífero, y media una corriente de despolarización coherente cuando se ilumina con luz azul. La acción máxima de la DChR es aproximadamente 500 nm.

10 Consistente con una realización de la presente divulgación, se crea un flujo de corriente de inhibición mediante el diseño por ingeniería genética de una proteína derivada de *Guillardia theta* que responde a la luz produciendo una corriente inhibitoria para disuadir la despolarización de una neurona. La proteína se suministra a una neurona de interés y la neurona se expone a la luz.

15 Consistente con otra realización de la presente divulgación, un método de estimulación óptica de una célula que expresa la bomba de protones GtR3 comprende proporcionar una secuencia de estímulo a la célula, aumentando cada estímulo la probabilidad de que se produzca un evento de despolarización en la célula. Se proporciona luz a la célula para activar la expresión de la bomba de protones GtR3, disminuyendo de esta forma la probabilidad de que se produzca un evento de despolarización en la célula. En determinadas realizaciones específicas, la luz proporcionada está comprendida en el espectro de la luz azul.

20 Consistente con otra realización de la presente divulgación, se divulga un sistema para controlar un potencial de acción en una neurona u otra célula *in vivo*. El sistema comprende un dispositivo de administración que introduce una proteína sensible a la luz azul en la neurona o célula. La proteína sensible a la luz azul produce una corriente inhibitoria en respuesta a la luz azul. El sistema incluye una fuente de luz azul que genera luz para estimular la proteína sensible a la luz azul y un dispositivo de control que controla la generación de luz mediante la fuente de luz.

25 Consistente con otra realización de la presente divulgación, se divulga un método para proporcionar una proteína sensible a la luz para su expresión en mamíferos. Una proteína sensible a la luz se aísla de *G. theta*. La proteína aislada tiene un extremo C y un extremo N. Se añade una señal de exportación al retículo endoplasmático (RE) al extremo C de la proteína aislada para crear una proteína sensible a la luz mejorada. La proteína mejorada se introduce en un vector vírico vacío para su administración a una célula de interés. El vector vírico con la proteína mejorada se suministra a continuación a la célula de interés.

30 Consistente con una realización de la presente divulgación, se proporciona una célula animal. La célula animal incluye una molécula exógena integrada que expresa una bomba de protones sensible a la luz azul. La molécula exógena se deriva de *G. theta*. En determinadas realizaciones, la célula animal es una célula neural. La célula animal también puede ser una célula muscular o una línea celular, por ejemplo.

35 La discusión anterior de la presente invención no pretende describir cada realización ilustrada ni cada implementación de la presente invención. Las figuras y la descripción detallada que aparece a continuación ilustran más especialmente estas realizaciones.

45 **Breve descripción de los dibujos**

La invención se puede comprender más completamente al tener en cuenta la descripción detallada de diferentes realizaciones de la invención que aparecen a continuación, relacionadas con los dibujos adjuntos, de la siguiente forma:

- 50 La Fig. 1A muestra una bomba de iones en la membrana de un orgánulo;
- la Fig. 1B muestra una bomba de iones en una membrana celular;
- la Fig. 2A muestra poblaciones de células que expresan combinaciones de proteínas sensibles a la luz;
- 55 la Fig. 2B muestra un perfil de estímulo para su uso en determinadas realizaciones en las que dos o más proteínas sensibles a la luz se introducen en la misma población de células;
- la Fig. 3 muestra un diagrama de bloques de un sistema para estimular células diana, como se divulga en el presente documento;
- 60 la Fig. 4 muestra un diagrama de bloques de un dispositivo implantable para estimular células diana, como se divulga en el presente documento;
- la Fig. 5 muestra un diagrama de bloques de un dispositivo implantable, como se divulga en el presente documento;
- 65 la Fig. 6A muestra un diagrama de bloques de un dispositivo implantable, como se divulga en el presente documento;
- la Fig. 6B muestra un diagrama de circuito correspondiente al diagrama de bloques de la Fig. 6A, como se divulga en el presente documento;

Las Figs. 7A y la Fig. 7B muestran un diagrama de una malla para contener biomoléculas fotosensibles, como se divulga en el presente documento;

Las Figs. 8A y la Fig. 8B muestran un diagrama de una matriz vírica, como se divulga en el presente documento;

5 la Fig. 9 muestra un diagrama de circuito de un circuito que produce luz en respuesta a un campo magnético, como se divulga en el presente documento;

Las Figs. 10A, 10B y 10C muestran un diagrama de bloques y circuitos para la producción de luz en respuesta a una señal de RF, como se divulga en el presente documento;

Las Figs. 11A y la Fig. 11B, cada una de ellas, muestra un diagrama de un dispositivo de fibra óptica, como se divulga en el presente documento;

10 Las Figs. 12A, 12B, 12C y 12D representan gráficamente varias etapas en la producción de una porción biológica fotosensible, como se divulga en el presente documento; y

la Fig. 13 muestra un dispositivo de implante, como se divulga en el presente documento;

Las Figs. 14A y la Fig. 14B muestran un diagrama de otro dispositivo de implante, como se divulga en el presente documento;

15 la Fig. 15 representa gráficamente una disposición con múltiples fuentes de luz, como se divulga en el presente documento;

la Fig. 16 muestra un sistema para controla las propiedades eléctricas de una o más células *in vivo*, como se divulga en el presente documento;

la Fig. 17 muestra un sistema para controla las propiedades eléctricas de una o más células *in vivo*, como se divulga en el presente documento;

20 la Fig. 18A muestra un diagrama de bloques de un sistema para el cribado óptico de fármacos, como se divulga en el presente documento;

la Fig. 18B muestra una diagrama de sistema específico de un sistema de gran formato casi automatizado para el cribado de fármacos de acuerdo con la presente metodología, como se divulga en el presente documento;

25 la Fig. 19 muestra un diagrama de sistema de un sistema de cribado de fármacos de pequeño formato completamente automatizado que funciona de acuerdo con la metodología inventada, como se divulga en el presente documento;

la Fig. 20A representa gráficamente el funcionamiento de un ejemplo de unidades de emisión/detección, como se divulga en el presente documento;

30 la Fig. 20B representa gráficamente el funcionamiento de otra realización de unidades de emisión/detección, como se divulga en el presente documento;

la Fig. 21A y 21B representan gráficamente un mecanismo de circuito electrónico para activar los emisores LED usados dentro de las unidades de emisión/detección, como se divulga en el presente documento;

35 la Fig. 22 muestra una línea temporal de una secuencia de eventos en el contexto de un proceso de cribado ilustrativo, como se divulga en el presente documento;

la Fig. 23 ilustra un ejemplo de una disposición de muestras de células y fármacos dentro de los pocillos de una placa de pocillos, como se divulga en el presente documento; y

la Fig. 24 ilustra el contexto en el que los productos divulgados se pueden utilizar dentro de un sistema más grande que facilita el cribado de fármacos de alto rendimiento, como se divulga en el presente documento.

40 la Fig. 25D muestra trazas de fotocorriente representativas que se muestran en células transducidas con eNpHR3.0 y en células transducidas con eNpHR2.0, y gráficas resumidas de la misma;

la Fig. 25E muestra trazas de tensiones de hiperpolarización representativas que se muestran en células transducidas con eNpHR3.0 y en células transducidas con eNpHR2.0, y gráficas resumidas de la misma;

45 la Fig. 26B muestra un modelo de una activación génica transináptica mediante la fusión WGA-Cre. El esquema muestra gráficamente dos sitios de inyección (uno con el gen de fusión WGA-Cre y otro con el virus de opsina dependiente de Cre) y proyecciones de largo rango; Cre se puede administrar *trans*-sinápticamente desde células transducidas para activar la expresión de genes distantes solamente en las neuronas conectadas sinápticamente que han recibido el virus dependiente de Cre.

50 La Fig. 26C muestra un diseño de construcción para los vectores VAA WGA-Cre y dependiente de Cre optimizados con codones de mamífero;

la Fig. 27A muestra que luz de seiscientos treinta nanómetros evocan fotocorrientes coherentes en neuronas transducidas con eNpHR3.0 (a la izquierda, traza de fijación de tensión representativa). Gráfico resumen que compara las neuronas que expresan eNpHR2.0 y eNpHR3.0 (a la derecha); eNpHR2.0, $42,7 \pm 4,5$ pA; eNpHR3.0, $239,4 \pm 28,7$ pA; prueba de la t no emparejada $p = 0,00004$; $n = 10$).

55 La Fig. 27B muestra que la iluminación con seiscientos treinta nanómetros evoca una hiperpolarización coherente (a la izquierda, traza de fijación de tensión representativa). Gráfico resumen que compara las neuronas que expresan eNpHR2.0 y eNpHR3.0 (derecha); $15,6 \pm 3,2$ mV para eNpHR2.0 y $43,3 \pm 6,1$ mV para eNpHR3.0; prueba de la t no emparejada $p = 0,00116$; $n = 10$).

60 La Fig. 27C muestra un resumen de las fotocorrientes de salida evocadas por diferentes longitudes de onda de una iluminación de color rojo y en el rojo lejano/frontera de infrarrojo: 630 nm, $239,4 \pm 28,7$ pA (izquierda, $n = 10$); 660 nm, $120,5 \pm 16,7$ pA (centro, $n = 4$); y 680 nm: $76,3 \pm 9,1$ pA (derecha, $n = 4$). Densidad de potencia: $3,5$ mW/mm² (630 nm) y 7 mW/mm² (660 nm, 680 nm).

65 La Fig. 27D muestra que la iluminación con luz de color rojo y en el rojo lejano/frontera de infrarrojo inhibe la formación de espigas inducida por la inyección de corriente en neuronas que expresan eNpHR3.0. Las trazas de la tensión de fijación típicas muestran inhibición óptica a 630 nm (superior izquierda), 660 nm (superior derecha), y 680 nm (inferior). Densidad de potencia: $3,5$ mW/mm² (630 nm) y 7 mW/mm² (660 nm, 680 nm).

La Fig. 27G muestra que la luz azul (445 nm, pulsos de 5 ms) impulsan el enriquecimiento a 20 Hz (izquierdo) y 10 Hz (derecho), mientras que la aplicación simultánea de la luz amarilla (590 nm) inhibió las espigas.

La Fig. 27F muestra espectros de activación para eNPAC, ChR2 (H134R), y eNpHR3.0 solo;

la Fig. 28B muestra que luz de quinientos sesenta nanómetros indujo fotocorrientes de salida en células eBR, y la correspondiente traza muestra en fijación de tensión;

la Fig. 28C muestra que luz de quinientos sesenta nanómetros indujo hiperpolarizaciones en células eBR, y la correspondiente traza muestra en fijación de corriente;

la Fig. 29A muestra estrategias generales de direccionamiento subcelular para adaptar genes microbianos de la opsina a la biología de sistemas metazoicos intactos;

la Fig. 29B muestra el refinamiento del direccionamiento en niveles tisulares y subcelulares;

la Fig. 30A muestra estabilidad y recuperación de potentes fotocorrientes en células que expresan eNpHR3.0 cuando se exponen a parejas de pulsos de luz amarilla de 10 segundos de duración separadas en el tiempo por: 2,5 segundos, 5 segundos, 10 segundos, y 20 segundos;

la Fig. 30B muestra un curso temporal de fotocorrientes de eNpHR3.0 normalizadas para una exposición a la luz continua a largo plazo;

la Fig. 30C muestra la estabilidad de la corriente de salida de eNpHR3.0 durante más de 10 minutos; y

la Fig. 31C muestra las trazas de fijación de corriente y fijación de tensión de muestra y los datos de resumen para el funcionamiento de GtR3 con luz de 472 nm.

20 Aunque la invención se presta a diferentes modificaciones y formas alternativas, se han mostrado ejemplos de la misma de forma ilustrativa en los dibujos, y se van a describir detalladamente. Deberá entenderse, sin embargo, la intención no es limitar la invención a las realizaciones particulares mostradas y/o descritas. La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

25 Descripción detallada

Se cree que la presente invención es útil para facilitar la aplicación práctica de varias estructuras biomoleculares fotosensibles, y se ha descubierto que la invención es especialmente adecuada para su uso en disposiciones y métodos que se refieren al control de la tensión de la membrana celular y la estimulación. Aunque la presente invención no está necesariamente limitada a dichas aplicaciones, varios aspectos de la invención se apreciará mediante un análisis de los diferentes ejemplos que utilizan este contexto.

Como se usa en el presente documento, la estimulación de una célula diana se utiliza de manera general para describir una modificación de las propiedades de la célula. Por ejemplo, el estímulo de una célula diana puede dar como resultado un cambio en las propiedades de la membrana celular, que puede llevar a la despolarización o polarización de la célula diana. En un caso particular, la célula diana es una neurona, y el estímulo afecta a la transmisión de los impulsos facilitando o inhibiendo la generación de impulsos que produce la neurona.

Consistente con una realización ilustrativa de la presente invención, una proteína sensible a la luz se diseña mediante ingeniería genética en una célula. La proteína altera el flujo de iones (aniones, cationes o protones) a través de la membrana celular en respuesta a la luz. Este cambio en el flujo de iones crea el correspondiente cambio en las propiedades eléctricas de las células, que incluyen, por ejemplo, la tensión y el flujo de corriente a través de la membrana celular. En un caso, la proteína funciona *in vivo* usando un cofactor endógeno para modificar el flujo de iones a través de la membrana celular. En otro caso, la proteína cambia la tensión a través de la membrana celular, de forma que evite o estimule el disparo del potencial de acción en la célula. En otro caso más, la proteína puede alterar las propiedades eléctricas de la célula durante los pocos milisegundos que dura la luz introducida.

Una proteína inhibidora disuade el disparo del potencial de acción alejando el potencial de la célula del nivel de disparo del potencial de acción de la célula. En muchas neuronas, esto significa que la proteína aumenta la tensión negativa observada a través de la membrana celular. En un caso específico, la proteína actúa como una bomba de protones que transfiere protones activamente al exterior de la célula. De este modo, la proteína genera una corriente inhibidora a través de la membrana celular. Más específicamente, la proteína responde a la luz disminuyendo la tensión a través de la célula, disminuyendo de esta forma la probabilidad de que se produzca un potencial de acción o la despolarización.

Algunos aspectos de la presente divulgación se basan en la identificación y desarrollo de una molécula/proteína que funciona como una bomba de protones. Esta bomba de protones se deriva del criptófito de *Guillardia theta* (*G. theta*) y se ha desarrollado para su expresión en células diana. Tal como se divulga en el presente documento, la célula puede ser una neurona. La proteína diseñada mediante ingeniería genética, GtR3, responde a la luz azul produciendo una corriente inhibidora para evitar la despolarización de la célula. Cuando se expresa en células neurales, la bomba de protones (GtR3) se puede usar para inhibir la actividad neural en respuesta a la estimulación con luz azul. La bomba GtR3 responde al estímulo óptico creando una corriente inhibidora a través de la membrana neural. Esta corriente inhibe los potenciales de acción mientras la célula modificada está expuesta a la luz (azul).

65 La presente divulgación también proporciona la modificación de las proteínas activadas por luz expresadas en una célula mediante la adición de uno o más motivos de secuencia de aminoácidos que potencian el transporte hacia las

- membranas plasmáticas de las células de mamífero. Es posible que las células de mamífero no expresen o toleren proteínas activadas por luz derivadas de organismos evolutivamente más sencillos, o bien pueden mostrar una localización subcelular desequilibrada cuando se expresan a niveles elevados en células de mamífero. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la proteína activada por luz expresada en una célula se fusiona con uno o más motivos de secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en un péptido señal, una señal de exportación al retículo endoplasmático (RE), una señal de tráfico de membrana, una señal de exportación al aparato de Golgi en el extremo N. El uno o más motivos de secuencia de aminoácidos que mejoran el transporte de la proteína activada por luz hacia las membranas plasmáticas de células de mamífero se pueden fusionar con el extremo N, el extremo C, o tanto al extremo N como al extremo C de proteína activada por luz. Opcionalmente, la proteína activada por luz y el uno o más motivos de secuencia de aminoácidos pueden estar separados por un enlazador. Algunos motivos de proteína adicionales que pueden potenciar el transporte de la proteína activada por luz hacia la membrana plasmática de una célula se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 12/041.628.
- 15 La presente divulgación proporciona adicionalmente proteínas activadas por luz que contienen sustituciones, deleciones e inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de una proteína activada por luz natural (tal como, aunque no de forma limitativa, GtR3, NpHR, DChR, y BR naturales). Las proteínas activadas por luz incluyen aquellas en las que uno o más restos de aminoácidos han experimentado una sustitución de aminoácido pero retienen la capacidad de responder a la luz y la capacidad de controlar el estado de polarización de una membrana plasmática. Por ejemplo, las proteínas activadas por luz se pueden preparar por sustitución de uno o más aminoácidos en la secuencia de los aminoácidos de la proteína natural o no modificada. La divulgación proporciona proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos alteradas, en comparación con una secuencia de aminoácidos natural, en la que la proteína activada por luz alterada retiene la naturaleza característica activada por luz y/o la capacidad de regular el flujo de iones a través de las membranas plasmáticas de la proteína precursora, pero puede tener las propiedades alteradas en algunos aspectos (por ejemplo, una mayor o menor sensibilidad a la luz, una mayor o menor sensibilidad a determinadas longitudes de onda de la luz, y/o una mayor o menor capacidad para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de una célula de mamífero, en comparación con la proteína natural). Las sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína natural puede ser conservativa o no conservativa, y dichos restos de aminoácidos sustituidos pueden estar codificados, o no, por el código genético.
- 20 El "alfabeto" de veintidós aminoácidos convencional se divide en familias químicas según las propiedades químicas de sus cadenas secundarias. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas secundarias básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas secundarias ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas secundarias polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas secundarias no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas secundarias beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas secundarias que tienen grupos aromáticos (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Una "sustitución de aminoácido conservativa" es aquella donde el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena secundaria químicamente similar (es decir, sustituir un aminoácido que tiene una cadena secundaria básica por otro aminoácido que tiene una cadena secundaria básica). Una "sustitución de aminoácido no conservativa" es aquella donde el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena secundaria químicamente diferente (es decir, sustituir un aminoácido que tiene una cadena secundaria básica por un aminoácido que tiene una cadena secundaria aromática).
- 25 Algunos aspectos de la presente divulgación se dirigen a una célula animal que expresa la molécula GtR3. De este modo, la célula animal incluye una molécula exógena integrada que expresa una bomba de protones sensible a la luz azul. En determinadas realizaciones, la célula animal puede ser una célula neural, una célula muscular, una célula de bastoncillos o conos, o una línea de células. En algunas realizaciones, la célula animal es una célula de mamífero.
- 30 La presente divulgación proporciona una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína es sensible a la luz azul y se deriva de *Guillardia theta*, en la que la proteína es capaz de mediar una corriente de hiperpolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunas realizaciones, la luz tiene una longitud de onda comprendida entre aproximadamente 450 y 495 nm. En algunas realizaciones, la luz tiene una longitud de onda de aproximadamente 490 nm. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende sustituciones, deleciones, y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos natural para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a determinadas longitudes de onda de la luz, y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína activada por luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz contiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz contiene una o más sustituciones de aminoácidos no conservativas. La proteína activada por luz que comprende sustituciones, deleciones, y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos natural retiene, de forma adecuada, su capacidad para hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal en respuesta a la luz.

También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y una señal de exportación al retículo endoplasmático (RE). La señal de exportación al retículo endoplasmático RE se puede fusionar con el extremo C de la secuencia de aminoácidos central o se puede fusionar con el extremo N de la secuencia de aminoácidos central. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE está unida mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE comprende la secuencia de aminoácidos FXYENE, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE comprende la secuencia de aminoácidos VXXSL, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE comprende la secuencia de aminoácidos FCYENEV.

También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y un péptido señal (por ejemplo, que potencie el transporte hasta la membrana plasmática). El péptido señal se puede fusionar con el extremo C de la secuencia de aminoácidos central o se puede fusionar con el extremo N de la secuencia de aminoácidos central. En algunas realizaciones, el péptido señal está unido mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, el péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLPEDQCYCAGWIESRGTNG. En algunas realizaciones, se pueden usar otros péptidos señal (tales como los péptidos señal de otras opsinas).

También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y una señal de tráfico (por ejemplo, que potencie el transporte hasta la membrana plasmática). El péptido señal se puede fusionar con el extremo C de la secuencia de aminoácidos central o se puede fusionar con el extremo N de la secuencia de aminoácidos central. En algunas realizaciones, el péptido señal está unido mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de tráfico se deriva de la secuencia de aminoácidos del rectificador de entrada del canal del potasio Kir2.1 humano. En algunas realizaciones, la señal de tráfico comprende la secuencia de aminoácidos **KSRITSEG EYIPLDQIDINV**.

También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y dos o más motivos de secuencia de aminoácidos que potencian el transporte hacia las membranas plasmáticas de las células de mamíferos seleccionados del grupo que consiste de un péptido señal, una señal de exportación al RE, y una señal de tráfico de membrana. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende un péptido señal en el extremo N y una señal de exportación al RE en el extremo C. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende un péptido señal en el extremo N y una señal de tráfico en el extremo C. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una señal de exportación al RE en el extremo C y una señal de tráfico en el extremo C. En algunas realizaciones, la señal de exportación al RE en el extremo C y la señal de tráfico en el extremo C están unidas mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de exportación al RE está más localizada en el extremo C que la señal de tráfico. En algunas realizaciones, la señal de tráfico está más localizada en el extremo C que la señal de exportación al RE.

En el presente documento se proporcionan también polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de las proteínas descritas en el presente documento, tal como una proteína activada por luz que comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %

idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. En el presente documento se proporcionan también vectores de expresión (tales como los vectores víricos descritos en el presente documento) que comprenden un polinucleótido que codifica cualquiera de las proteínas descritas en el presente documento, tal como una proteína activada por luz que comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. Los polinucleótidos se pueden usar para la expresión de la proteína activada por luz en células animales.

Se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína es sensible a la luz azul y se deriva de *Dunaliella salina*, en la que la proteína es capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunas realizaciones, la luz tiene una longitud de onda comprendida entre aproximadamente 450 y 495 nm. En algunas realizaciones, la luz tiene una longitud de onda de aproximadamente 490 nm. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la secuencia mostrada en la los restos 25-365, 24-365, 23-365, 22-365, 21-365, 20-365, 19-365, 18-365, 17-365, 16-365, 15-365, 14-365, 13-365, 12-365, 11-365, 10-365, 9-365, 8-365, 7-365, 6-365, 5-365, 4-365, 3-365, 2-365, o 1-365 de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la los restos 25-365, 24-365, 23-365, 22-365, 21-365, 20-365, 19-365, 18-365, 17-365, 16-365, 15-365, 14-365, 13-365, 12-365, 11-365, 10-365, 9-365, 8-365, 7-365, 6-365, 5-365, 4-365, 3-365, 2-365, o 1-365 de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende sustituciones, deleciones, y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos natural para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a determinadas longitudes de onda de la luz, y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína activada por luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz contiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz contiene una o más sustituciones de aminoácidos no conservativas. La proteína activada por luz que comprende sustituciones, deleciones, y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos natural retiene, de forma adecuada, su capacidad para despolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal en respuesta a la luz.

También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la los restos 25-365, 24-365, 23-365, 22-365, 21-365, 20-365, 19-365, 18-365, 17-365, 16-365, 15-365, 14-365, 13-365, 12-365, 11-365, 10-365, 9-365, 8-365, 7-365, 6-365, 5-365, 4-365, 3-365, 2-365, o 1-365 de la SEQ ID NO: 2 y una señal de exportación al retículo endoplasmático (RE). La señal de exportación al retículo endoplasmático RE se puede fusionar con el extremo C de la secuencia de aminoácidos central o se puede fusionar con el extremo N de la secuencia de aminoácidos central. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE está unida mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE comprende la secuencia de aminoácidos FXYENE, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE comprende la secuencia de aminoácidos VXXSL, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE comprende la secuencia de aminoácidos FCYENEV.

También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la los restos 25-365, 24-365, 23-365, 22-365, 21-365, 20-365, 19-365, 18-365, 17-365, 16-365, 15-365, 14-365, 13-365, 12-365, 11-365, 10-365, 9-365, 8-365, 7-365, 6-365, 5-365, 4-365, 3-365, 2-365, o 1-365 de la SEQ ID NO: 2 y un péptido señal (por ejemplo, que potencie el transporte hasta la membrana plasmática). El péptido señal se puede fusionar con el extremo C de la secuencia de aminoácidos central o se puede fusionar con el extremo N de la secuencia de aminoácidos central. En algunas realizaciones, el péptido señal está unido mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, el péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLPEDQCYCAGWIESRGTNG. En algunas realizaciones, se pueden usar otros péptidos señal (tales como los péptidos señal de otras opsinas).

También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada

en la los restos 25-365, 24-365, 23-365, 22-365, 21-365, 20-365, 19-365, 18-365, 17-365, 16-365, 15-365, 14-365, 13-365, 12-365, 11-365, 10-365, 9-365, 8-365, 7-365, 6-365, 5-365, 4-365, 3-365, 2-365, o 1-365 de la SEQ ID NO: 2 y una señal de tráfico (por ejemplo, que potencie el transporte hasta la membrana plasmática). El péptido señal se puede fusionar con el extremo C de la secuencia de aminoácidos central o se puede fusionar con el extremo N de la secuencia de aminoácidos central. En algunas realizaciones, el péptido señal está unido mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de tráfico se deriva de la secuencia de aminoácidos del rectificador de entrada del canal del potasio Kir2.1 humano. En algunas realizaciones, la señal de tráfico comprende la secuencia de aminoácidos **KSRITSEGEYIPLDQIDINV**.

También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la los restos 25-365, 24-365, 23-365, 22-365, 21-365, 20-365, 19-365, 18-365, 17-365, 16-365, 15-365, 14-365, 13-365, 12-365, 11-365, 10-365, 9-365, 8-365, 7-365, 6-365, 5-365, 4-365, 3-365, 2-365, o 1-365 de la SEQ ID NO: 2 y dos o más motivos de secuencia de aminoácidos que potencian el transporte hacia las membranas plasmáticas de las células de mamíferos seleccionados del grupo que consiste de un péptidos señal, una señal de exportación al RE, y una señal de tráfico de membrana. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende un péptido señal en el extremo N y una señal de exportación al RE en el extremo C. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende un péptido señal en el extremo N y una señal de tráfico en el extremo C. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una señal de exportación al RE en el extremo C y una señal de tráfico en el extremo C. En algunas realizaciones, la señal de exportación al RE en el extremo C y la señal de tráfico en el extremo C están unidas mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de exportación al RE está más localizada en el extremo C que la señal de tráfico. En algunas realizaciones, la señal de tráfico está más localizada en el extremo C que la señal de exportación al RE.

En el presente documento se proporcionan también polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de las proteínas descritas en el presente documento, tal como una proteína activada por luz que comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la los restos 25-365, 24-365, 23-365, 22-365, 21-365, 20-365, 19-365, 18-365, 17-365, 16-365, 15-365, 14-365, 13-365, 12-365, 11-365, 10-365, 9-365, 8-365, 7-365, 6-365, 5-365, 4-365, 3-365, 2-365, o 1-365 de la SEQ ID NO: 2. En el presente documento se proporcionan también vectores de expresión (tales como los vectores víricos descritos en el presente documento) que comprenden un polinucleótido que codifica cualquiera de las proteínas descritas en el presente documento, tal como una proteína activada por luz que comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la los restos 25-365, 24-365, 23-365, 22-365, 21-365, 20-365, 19-365, 18-365, 17-365, 16-365, 15-365, 14-365, 13-365, 12-365, 11-365, 10-365, 9-365, 8-365, 7-365, 6-365, 5-365, 4-365, 3-365, 2-365, o 1-365 de la SEQ ID NO: 2. Los polinucleótidos se pueden usar para la expresión de la proteína activada por luz en células animales.

Se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína es sensible tanto a la luz ámbar como a la luz roja y se deriva de *Natronomonas pharaonis*, en la que la proteína es capaz de mediar una corriente de hiperpolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunas realizaciones, la luz tiene una longitud de onda comprendida entre aproximadamente 580 y 630 nm. En algunas realizaciones, la luz tiene una longitud de onda de aproximadamente 589 nm. En algunas realizaciones, la luz tiene una longitud de onda mayor de aproximadamente 630 nm (por ejemplo, menor de 740 nm). En algunas realizaciones, la luz tiene una longitud de onda de aproximadamente 630 nm. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende sustituciones, deleciones, y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos natural para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a determinadas longitudes de onda de la luz, y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína activada por luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz contiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz contiene una o más sustituciones de aminoácidos no conservativas. La proteína activada por luz que comprende sustituciones, deleciones, y/o inserciones introducidas en

la secuencia de aminoácidos natural retiene, de forma adecuada, su capacidad para hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal en respuesta a la luz.

También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 y una señal de exportación al retículo endoplasmático (RE). La señal de exportación al retículo endoplasmático RE se puede fusionar con el extremo C de la secuencia de aminoácidos central o se puede fusionar con el extremo N de la secuencia de aminoácidos central. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE está unida mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE comprende la secuencia de aminoácidos FXYENE, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE comprende la secuencia de aminoácidos VXXSL, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE comprende la secuencia de aminoácidos FCYENEV.

También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 y una señal de tráfico (por ejemplo, que potencie el transporte hasta la membrana plasmática). El péptido señal se puede fusionar con el extremo C de la secuencia de aminoácidos central o se puede fusionar con el extremo N de la secuencia de aminoácidos central. En algunas realizaciones, el péptido señal está unido mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de tráfico se deriva de la secuencia de aminoácidos del rectificador de entrada del canal del potasio Kir2.1 humano. En algunas realizaciones, la señal de tráfico comprende la secuencia de aminoácidos **KSRITSEGEYIPLDQIDINV**.

También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 y dos o más motivos de secuencia de aminoácidos que potencian el transporte hasta la membrana plasmática de células de mamífero seleccionadas del grupo que consiste de una señal de exportación al RE y una señal de tráfico de membrana. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una señal de exportación al RE en el extremo C y una señal de tráfico en el extremo C. En algunas realizaciones, la señal de exportación al RE en el extremo C y la señal de tráfico en el extremo C están unidas mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de exportación al RE está más localizada en el extremo C que la señal de tráfico. En algunas realizaciones, la señal de tráfico está más localizada en el extremo C que la señal de exportación al RE.

También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3, en la que el péptido señal del extremo N de la SEQ ID NO:3 está eliminado o sustituido. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la secuencia mostrada en la los restos 40-291, 39-291, 38-291, 37-291, 36-291, 35-291, 34-291, 33-291, 32-291, 31-291, 30-291, 29-291, 28-291, 27-291, 26-291, 25-291, 24-291, 23-291, 22-291, 21-291, 20-291, 19-291, 18-291, 17-291, 16-291, 15-291, 14-291, 13-291, 13-291, 12-291, 11-291, 10-291, 9-291, 8-291, 7-291, 6-291, 5-291, 4-291, 3-291, 2-291, o 1-291 de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, se pueden usar otros péptidos señal (tales como los péptidos señal de otras opsinas). La proteína activada por luz puede también comprender una señal de transporte al RE y una señal de tráfico de membrana descritas en el presente documento.

En el presente documento se proporcionan polinucleótidos que codifican cualesquiera de las proteínas descritas en el presente documento, tal como una proteína activada por luz que comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3, una señal de exportación al RE, y una señal de tráfico de membrana. Los polinucleótidos pueden estar en un vector de expresión (tal como un vector vírico descrito en el presente documento). Los polinucleótidos se pueden usar para la expresión de la proteína activada por luz en células animales.

- Se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína es sensible a la luz verde y se deriva de *Halobacterium salinarum* en la que la proteína es capaz de mediar una corriente de hiperpolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunas realizaciones, la luz tiene una longitud de onda comprendida entre aproximadamente 520 y 570 nm. En algunas realizaciones, la luz tiene una longitud de onda de aproximadamente 560 nm. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende sustituciones, deleciones, y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos natural para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a determinadas longitudes de onda de la luz, y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína activada por luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz contiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz contiene una o más sustituciones de aminoácidos no conservativas. La proteína activada por luz que comprende sustituciones, deleciones, y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos natural retiene, de forma adecuada, su capacidad para hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal en respuesta a la luz.
- También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4 y una señal de exportación al retículo endoplasmático (RE). La señal de exportación al retículo endoplasmático RE se puede fusionar con el extremo C de la secuencia de aminoácidos central o se puede fusionar con el extremo N de la secuencia de aminoácidos central. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE está unida mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE comprende la secuencia de aminoácidos FXYENE, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE comprende la secuencia de aminoácidos VXXSL, donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, la señal de exportación al retículo endoplasmático RE comprende la secuencia de aminoácidos FCYENEV.
- También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4 y una señal de tráfico (por ejemplo, que potencie el transporte hasta la membrana plasmática). El péptido señal se puede fusionar con el extremo C de la secuencia de aminoácidos central o se puede fusionar con el extremo N de la secuencia de aminoácidos central. En algunas realizaciones, el péptido señal está unido mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de tráfico se deriva de la secuencia de aminoácidos del rectificador de entrada del canal del potasio Kir2.1 humano. En algunas realizaciones, la señal de tráfico comprende la secuencia de aminoácidos **KSRITSEG EYIPLDQIDINV**.
- También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4 y dos o más motivos de secuencia de aminoácidos que potencian el transporte hasta la membrana plasmática de células de mamífero seleccionadas del grupo que consiste de una señal de exportación al RE y una señal de tráfico de membrana. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una señal de exportación al RE en el extremo C y una señal de tráfico en el extremo C. En algunas realizaciones, la señal de exportación al RE en el extremo C y la señal de tráfico en el extremo C están unidas mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador puede también comprender una proteína fluorescente, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde, o una proteína fluorescente azul. En algunas realizaciones, la señal de exportación al RE está más localizada en el extremo C que la señal de tráfico. En algunas realizaciones, la señal de tráfico está más localizada en el extremo C que la señal de exportación al RE.
- También se proporciona en el presente documento una célula animal que comprende una proteína activada por luz expresada sobre la membrana celular, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos central al

menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4, en la que el péptido señal del extremo N de la SEQ ID NO:4 está eliminado o sustituido. En algunas realizaciones, la proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95 % a la secuencia mostrada en la los restos 40-262, 39-262, 38-262, 37-262, 36-262, 35-262, 34-262, 33-262, 32-262, 31-262, 30-262, 29-262, 28-262, 27-262, 26-262, 25-262, 24-262, 23-262, 22-262, 21-262, 20-262, 19-262, 18-262, 17-262, 16-262, 15-262, 14-262, 13-262, 12-262, 11-262, 10-262, 9-262, 8-262, 7-262, 6-262, 5-262, 4-262, 3-262, 2-262, o 1-262 de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, se pueden usar otros péptidos señal (tales como los péptidos señal de otras opsinas). La proteína activada por luz puede también comprender una señal de transporte al RE y/o una señal de tráfico de membrana descritas en el presente documento.

En el presente documento se proporcionan polinucleótidos que codifican cualesquiera de las proteínas descritas en el presente documento, tal como una proteína activada por luz que comprende una secuencia de aminoácidos central al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4, una señal de exportación al RE, y una señal de tráfico de membrana. Los polinucleótidos pueden estar en un vector de expresión (tal como un vector vírico descrito en el presente documento). Los polinucleótidos se pueden usar para la expresión de la proteína activada por luz en células animales.

En determinadas realizaciones más específicas de la divulgación, se proporciona un método para proporcionar una proteína sensible a la luz para su expresión en mamíferos. Una proteína sensible a la luz se aísla de *G. theta* (GtR3). GtR3 tiene un extremo C y un extremo N. Se añade un promotor al extremo C de GtR3. En determinadas realizaciones, el promotor es una señal de exportación al retículo endoplasmático (RE). Para más especificaciones sobre la optimización de GtR3 para su expresión en células de mamífero, véase el Apéndice A presentado en la solicitud provisional subyacente y titulada "Molecular and Cellular Approaches for Diversifying and Extending Optogenetics".

Una proteína excitadora estimula el disparo del potencial de acción desplazando el potencial de la célula hacia el nivel de disparo del potencial de acción de la célula. En muchas neuronas, esto significa que la proteína disminuye la tensión negativa observada a través de la membrana celular. En un caso específico, la proteína actúa como un canal de iones adicional que transfiere cationes al interior de la célula. De este modo, la proteína genera una corriente excitadora a través de la membrana celular. Más específicamente, la proteína responde a la luz aumentando la tensión a través de la membrana celular, aumentando de esta forma la probabilidad de que se produzca un potencial de acción o la despolarización. En determinados casos, la tensión a través de la membrana celular se puede incrementar hasta el nivel de disparo del potencial de acción, o más alto, ocasionando la despolarización de la célula.

Algunos aspectos de la presente divulgación se basan en la identificación y desarrollo de un canal (DChR) que se deriva de *Dunaliella salina*. La canalrodopsina DChR media una corriente de despolarización coherente cuando se ilumina con luz azul. La corriente de despolarización puede hacer que una célula se excite en respuesta a la exposición a la luz azul. En determinadas realizaciones, DChR se expresa como proteína exógena en una célula de interés. Para las células neurales, DChR puede funcionar como proteína excitadora que utiliza un cofactor endógeno cuando se suministra a una célula de interés.

La introducción de GtR3 y DChR en el campo de la optogenética abre la puerta a varias aplicaciones. Por ejemplo, GtR3 y DChR se pueden usar junto con otras moléculas optogenéticas que permiten el paso de iones, tales como ChR2 (desarrollada a partir de *Chlamydomonas reinhardtii*). GtR3 y DChR tienen diferentes parámetros operativos, con respecto a otras moléculas sensibles a la luz. Esto facilita el desarrollo de una célula o población de células que tenga una respuesta afinada con precisión a diferentes longitudes de onda de la luz. El parámetro que se puede afinar incluye, aunque no de forma limitativa, densidad de corriente, nivel de hiperpolarización, conductancia de la membrana, frecuencia de estímulo, potencial de descanso, longitud de onda óptica y/o intensidad óptica.

En otra realización ilustrativa, un método para controlar el potencial de acción de una neurona implica las siguientes etapas: diseñar mediante ingeniería genética una proteína sensible a la luz en la neurona; produciendo, en respuesta a la luz, una corriente inhibitoria en la neurona y procedente de la primera proteína sensible a la luz; diseñar mediante ingeniería genética una segunda proteína sensible a la luz en la neurona; y producir, en respuesta a la luz, una corriente de excitación en la neurona procedente de la primera proteína sensible a la luz. La primera proteína sensible a la luz y la segunda proteína sensible a la luz pueden ser sensibles a diferentes longitudes de onda. En determinados casos, el uso de DChR o GtR3 puede facilitar densidades de corriente específicas para esta corriente de excitación o de inhibición, y/o la longitud de onda óptica a la que se produce dicha corriente.

En otra realización ilustrativa, un método para controlar el potencial de acción de una neurona implica las siguientes etapas: diseñar mediante ingeniería genética una proteína sensible a la luz en la neurona; produciendo, en respuesta a la luz, una corriente inhibitoria en la neurona y procedente de la primera proteína sensible a la luz; diseñar mediante ingeniería genética una segunda proteína sensible a la luz en la neurona; y producir, en respuesta a la luz, una segunda corriente de inhibición procedente de la segunda proteína sensible a la luz, inhibiendo más

intensamente la combinación de las dos corrientes la neurona de lo que lo hace una sola proteína sensible a la luz. Por ejemplo, la primera proteína sensible a la luz podría ser NpHR y la segunda proteína sensible a la luz podría ser GtR3.

5 Otro método para controlar el nivel de tensión a través de una membrana celular de una célula incluye medir el nivel de tensión de la membrana celular. Se diseña mediante ingeniería genética una proteína sensible a la luz, y la proteína sensible a la luz se introduce dentro de la célula, donde se expresa. Se proporciona una luz con una longitud de onda concreta, que produce una reacción en la célula mediante la proteína sensible a la luz. La respuesta de la proteína sensible a la luz produce una corriente a través de la membrana celular. La corriente es sensible al nivel de tensión medido.

10 Otro aspecto de la presente divulgación se dirige a un sistema para controlar un potencial de acción en una neurona *in vivo*. El sistema incluye un dispositivo de administración, una fuente de luz, y un dispositivo de control. El dispositivo de administración introduce una proteína sensible a la luz en la neurona, donde la proteína sensible a la luz produce una corriente de inhibición. La fuente de luz genera luz para estimular la proteína sensible a la luz, y el dispositivo de control controla la generación de luz mediante la fuente de luz. En otras realizaciones, la proteína sensible a la luz introducida en la neurona produce una corriente de excitación.

15 En realizaciones más detalladas, dicho sistema está adicionalmente adaptado de forma que el dispositivo de administración introduce la proteína sensible a la luz mediante una transfección, transducción y microinyección, y/o de tal forma que la fuente de luz introduce luz en la neurona mediante uno de un generador de luz implantable y fibra óptica. Para detalles adicionales relativos al método de administración y expresión de genes, véase, la publicación PCT n.º WO2010/019619 A1 (PCT/US2009/053474), titulada "Method and Composition for Controlling Gene Expression".

25 Otro aspecto de la presente divulgación se dirige a un método para tratamiento de un trastorno. El método se dirige a un grupo de neuronas asociadas con el trastorno; y en este grupo, el método incluye diseñar mediante ingeniería genética proteínas inhibitoras que responden a la luz mediante la producción de una corriente inhibitora para evitar la despolarización de las neuronas, y exponer las neuronas a la luz, evitando de esta forma la despolarización de las neuronas.

30 Otro aspecto más de la presente divulgación se dirige a un método adicional para tratamiento de un trastorno. El método se dirige a un grupo de neuronas asociadas con el trastorno; y en este grupo, el método incluye diseñar mediante ingeniería genética proteínas excitadoras que responden a la luz mediante la producción de una corriente de excitación para estimular la despolarización de las neuronas, y exponer las neuronas a la luz, estimulando de esta forma la despolarización de las neuronas. En otros aspectos de la presente divulgación proteínas tanto inhibitoras como excitadoras, sensibles a diferentes longitudes de onda de la luz, se introducen en un grupo objetivo de neuronas. Las neuronas se exponen alternativamente a diferentes longitudes de onda de la luz para excitar, e inhibir, la despolarización de las neuronas.

40 Realizaciones más detalladas se basan en dichas técnicas. Por ejemplo, otro aspecto más de la presente divulgación expresa simultáneamente GtR3 y DChR con otras opsinas conocidas, tales como NpHR y VChR1 en las especies (por ejemplo, un ratón y *C. elegans*). También, opsinas que crean corrientes de polaridad opuesta y que tienen diferentes sensibilidades al color se integran mediante obtención de imágenes con calcio en cortes agudos de cerebro mamífero para la modulación óptica bidireccional y lectura de la actividad neural. Del mismo modo, las opsinas acopladas se pueden dirigir al músculo de *C. elegans* y motoneuronas colinérgicas para controlar la locomoción bidireccionalmente. Las opsinas acopladas conjuntamente se pueden usar como un sistema optogenético completo y complementario para una interrogación óptica multimodal, de alta velocidad y genéticamente dirigida de los circuitos neurales vivos. Además, más e un conjunto de células se puede dirigir con diferentes acoplamientos de opsinas, lo que permite un control preciso de múltiples conjuntos de células independientemente entre sí.

55 Además de GtR3 y DChR, existen numerosas canalrodopsinas, halorodopsinas, y opsinas microbianas que se han diseñado mediante ingeniería genética para regular ópticamente el flujo de iones o segundos mensajeros dentro de las células. Diferentes realizaciones de la divulgación incluyen versiones optimizadas según el codón, mutadas, truncadas, proteínas de fusión, versiones dirigidas o versiones modificadas de cualquier otra forma de dichos reguladores ópticos de iones. Por ejemplo, GtR3 y DChR (por ejemplo, los Apéndices de B y C, tal como se presentó en la solicitud provisional subyacente). Las opsinas citadas se utilizan como representativas de numerosas realizaciones diferentes. Las discusiones que identifican específicamente GtR3 y DChR no pretenden limitar la divulgación a dichos ejemplos específicos de los reguladores ópticos salvo que se especifique otra cosa. Para detalles adicionales relativos a las secuencias anteriormente mencionadas, se puede hacer referencia a "Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry" de Feng Zhang, et al, Nature (5 de abril, 2007) Vol. 446: 633-639.

60

La Tabla 1 muestra opsinas identificadas para inhibir la actividad celular a través del espectro visible:

Tabla 1: Optogenética rápida: inhibición para todo el espectro visible			
Tipo de opsina	Origen biológica	Sensibilidad a la longitud de onda	Acción definida
<i>NpHR</i>	<i>Natronomonas pharaonis</i>	680 nm utilidad (con la serie 3.0) 589 nm máx.	Inhibición (hiperpolarización)
<i>BR</i>	<i>Halobacterium helobium</i>	570 nm máx.	Inhibición (hiperpolarización)
<i>AR</i>	<i>Acetabularia acetabulum</i>	518 nm máx.	Inhibición (hiperpolarización)
<i>GtR3</i>	<i>Guillardia theta</i>	472 nm máx.	Inhibición (hiperpolarización)

La Tabla 2 muestra opsinas identificadas para la excitación y modulación a través del espectro visible:

5

Tabla 2: Optogenética rápida: excitación y modulación a través del espectro visible			
Tipo de opsina	Origen biológica	Sensibilidad a la longitud de onda	Acción definida
<i>VChR1</i>	<i>Volvox carteri</i>	589 nm utilidad 535 nm máx.	Excitación (despolarización)
<i>optoXRs</i>	<i>Bos taurus</i>	505 nm máx.	Modulación (rutas Gs, Gq)
<i>DChR</i>	<i>Dunaliella salina</i>	500 nm máx.	Excitación (despolarización)
<i>SFOs</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	546 nm desactivar 470 nm activar	modulación (estados de activación eléctrica)
<i>ChR2</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	470 nm máx. 380-405 nm utilidad	Excitación (despolarización)

Las opsinas se describen en las solicitudes de patente de Estados Unidos con números 12/988.567 y 12/996.753, las publicaciones de patente de Estados Unidos con números: 2007/0054319, 2010/0234273, 2007/0261127, 2007/0053996, 2010/0145418, 2009/0093403, 2008/0085265, 2010/0190229, 2009/0099038, y la publicación PCT con n.º PCT/US09/64355.

10

En determinadas realizaciones de la presente divulgación, varias combinaciones de las opsinas citadas, por ejemplo, se administran a una población de células. Una segunda combinación se puede administrar a una población de células diferente. Usando la acción definida, y la información sobre la sensibilidad a la longitud de onda de cada opsina, se puede seleccionar combinaciones de opsinas para excitar determinadas poblaciones de células a la vez que inhiben otras, por ejemplo.

15

Consistente con una realización ilustrativa de la presente divulgación, la células diana se estimulan usando una disposición implantable. La disposición implantable incluye una parte biológica que facilita el estímulo de las células diana en respuesta a la recepción de la luz. La disposición implantable también incluye un generador de luz para crear luz que desencadene el estímulo de las células diana. En determinadas realizaciones, el dispositivo implantable incluye un microprocesador y un bucle de retroalimentación. El color de la luz creada por el generador de luz depende de la tensión de la célula. La célula diana puede incluir múltiples proteínas sensibles a la luz que responden a diferentes longitudes de onda de la luz para inhibir o estimular la despolarización de la célula diana.

25

Consistente con otra realización ilustrativa de la presente divulgación, se implementa un método para estimular células diana *in vivo* usando vectores de transferencia de genes (por ejemplo, virus) capaces de inducir el crecimiento de canales de iones fotosensibles (por ejemplo, canales de iones DChR) o bombas de iones fotosensibles (por ejemplo, bombas de protones GtR3). Los vectores se implantan en el cuerpo, junto con los componentes electrónicos del aparato. Un dispositivo productor de luz se implanta cerca de las células diana. Las células diana se estimulan en respuesta a la luz generada mediante el dispositivo productor de luz. En algunas realizaciones más específicas, los vectores de transferencia de genes son capaces de inducir el crecimiento de más de una bomba o canal de iones.

30

Consistente con una realización particular de la presente divulgación, se introduce una proteína en una o más células diana. Cuando se introduce en una célula, la proteína cambia el potencial de la célula en respuesta a la luz que tiene una determinada frecuencia. Esto puede dar como resultado un cambio en el potencial de descanso que se puede usar para controlar (evitar) el disparo del potencial de acción. En un ejemplo específico, la proteína es

35

GtR3 que actúa como bomba de membrana para transferir carga a través de la membrana celular en respuesta a la luz. Las bombas de membrana son transductores de energía que utilizan la energía electromagnética o de los enlaces químicos para translocar iones a través de la membrana. En otros ejemplos específicos, la proteína es una halorrodopsina que actúa como la bomba de membrana. La bomba de membrana de halorrodopsina desplaza iones específicos a través de la membrana. Para más información relativa a las bombas de membrana de halorrodopsina, se puede hacer referencia a "Halorhodopsin Is a Light-driven Chloride Pump" de Brigitte Schobert et al, The Journal of Biological Chemistry Vol. 257, n.º 17, 10 de septiembre, 1982, pp. 10306-10313.

En las realizaciones específicas divulgadas en el presente documento, GtR3 y NpHR se pueden introducir en diferentes poblaciones de células diana, respectivamente. Los dos inhibidores son sensibles a diferentes longitudes de onda de la luz, lo que permite utilizar las dos proteínas para inhibir diferentes poblaciones de células diana independientemente. GtR3 y NpHR también se pueden introducir en la misma población de células para un control en gradiente de la inhibición de una población de células. Por ejemplo, las moléculas GtR3 y NpHR dentro de la misma célula se pueden activar de forma relativamente independiente entre sí. Por tanto, se puede implementar un primer nivel de inhibición mediante la activación del tipo de molécula (GtR3 o NpHR) que proporciona los menores niveles de corriente para las condiciones de la célula. El siguiente nivel podría implementarse desactivando este primer tipo de molécula y activando el otro tipo de molécula. Se puede implementar un tercer nivel activando ambas moléculas simultáneamente. Se puede conseguir un control en gradiente adicional variando la longitud de onda de la luz, o por variación de la intensidad de la luz en o cerca del máximo de cada proteína, por ejemplo.

La combinación de múltiples inhibidores también puede conducir a una inhibición derivada, lo que combinado con una inhibición de la hiperpolarización, puede llevar a una hiperpolarización más intensa en el enfoque combinado que en el uso de una única proteína inhibidora. En una membrana celular, el potencial inverso (también conocido como el potencial de Nernst) de un ion es el potencial de membrana en el cual no hay flujo neto (global) de iones de un lado de la membrana al otro. Cada tipo de canal de iones tiene un potencial inverso específico. En el potencial de Nernst, las velocidades de entrada y salida del movimiento de iones son iguales (el flujo de iones está en equilibrio para el tipo de iones). Un cambio en el potencial de membrana en cualquier lado del potencial de Nernst invierte la dirección global del flujo de iones. Si el potencial inverso de un canal de iones está por debajo del potencial de descanso (o del potencial instantáneo en el caso de que se estimule un canal de iones con una proteína sensible a la luz y cambie el potencial "de descanso") de la membrana celular, el canal de iones contribuirá a la inhibición mediante la hiperpolarización de la célula. Por el contrario, si el potencial inverso de un canal de iones está comprendido entre el potencial de descanso y el umbral de generación de los potenciales de acción, el canal de iones tendrá un efecto de atenuación. El gradiente de concentración para cualquier ion dado (por ejemplo Cl⁻) se determina en parte por el equilibrio entre la actividad del resto de iones (por ejemplo Na⁺ y K⁺). La inhibición atenuada se denomina "atenuación" porque la conductancia del canal cortocircuita las corrientes que se generan en canales de excitación adyacentes. En consecuencia, la adición de un canal de proteína sensible a la luz con características de inhibición puede disminuir el potencial de membrana hasta un punto donde un canal de iones existente invierte la dirección y "atenúa" la corriente, lo que crea una ruta adicional que evita que el potencial de membrana alcance el potencial de acción.

Se proporcionan en el presente documento poblaciones de células, tejidos, y animales no humanos que comprenden una célula que expresa una o más proteínas activadas por luz descritas en el presente documento sobre la membrana celular. También se proporcionan métodos de usar las células, poblaciones de células, tejidos, y animales no humanos.

La Figura 1A muestra una molécula 150 sensible a la luz que permite el paso de iones (una bomba o canal) en una membrana celular 160. Por lo general, los canales de iones permiten el flujo hacia el potencial de inversión de los canales (o potencial de equilibrio del canal); la dirección se basa en si el potencial de membrana está por encima o por debajo del potencial de inversión del canal. Los canales de iones no requieren energía adicional para transportar el ion. Las bombas de iones transportan iones contra el flujo de equilibrio y requieren la introducción de alguna forma de energía, tal como ATP, para transportar el ion a través de la membrana. Los iones a162 pueden ser aniones o cationes. El ion de hidrógeno es un protón (así como un catión). La dirección del flujo de iones junto con la polaridad de los iones determinará si la molécula que permite el paso de iones tiene un efecto hiperpolarizante o despolarizante en la célula. En ciertas realizaciones, la molécula 150 que permite el paso de iones transporta protones al exterior de la célula, ocasionando la hiperpolarización de la célula y la inhibición del disparo de la célula. La bomba/canal 150 de iones sensible a la luz no está en estado abierto/activo salvo que esté presente luz de la frecuencia adecuada.

La Figura 1B muestra una realización alternativa de la presente divulgación donde una molécula 150 sensible a la luz que permite el paso de iones se expresa dentro de membranas que están en el interior de una célula. muchos de los componentes internos de la célula tienen membranas similares a la membrana celular que encierra la célula. La membrana de los orgánulos 152 contienen bombas/canales de iones naturales antes de la introducción de una proteína sensible a la luz. Dependiendo de los promotores introducidos junto con la proteína sensible a la luz exógena, la proteína sensible a la luz puede expresarse como bomba/canal de iones en la membrana de varios orgánulos diferentes, en la membrana celular, o una combinación de diferentes orgánulos y/o la membrana celular. En determinadas realizaciones, la molécula 150 sensible a la luz que permite el paso de iones es una bomba de

protones. En otras realizaciones, la bomba puede ser una bomba/canal de un catión específico o un anión específico. La bomba/canal 150 de iones está ubicado en la membrana 156 del orgánulo.

5 La transferencia de protones a través de la membrana en la que se expresa la molécula que permite el paso de iones se puede usar para cambiar el potencial de membrana de cualquiera o ambas de la membrana 156 a la membrana 160. El transporte de protones al exterior del citoplasma puede hacer que una célula quede hiperpolarizada, dando como resultado la inhibición de la célula.

10 En determinados casos, la bomba/canal 150 se puede usar para cambiar el pH del orgánulo 152 y el citoplasma 154 circundante. Asimismo, el pH del orgánulo en el que la proteína se expresa se puede cambiar y/o controlar. Puesto que la mayoría de las enzimas incluidas en una célula son sensibles al pH, el pH de cada orgánulo determina críticamente las reacciones bioquímicas coordinadas que se producen junto con las rutas endocíticas y secretoras. Las anomalías en la homeostasia del pH normal de los orgánulos puede conducir a cambios funcionales significativos. Dependiendo del nivel de expresión de la proteína sensible a la luz, y la ubicación (es decir, qué orgánulo), se pueden potenciar o retardar diferentes funciones de la célula. A niveles de expresión suficientemente elevados, la célula puede quedar destruida. Esto puede ser deseable en células no deseadas (es decir, cancerosas). Por ejemplo, las células se puede transfectar localmente en la ubicación de un tumor canceroso y posteriormente dirigir cuidadosamente pulsos de luz que se pueden usar para reducir o eliminar el tumor.

20 La Figura 2A muestra dos ejemplos del uso de proteínas sensibles a la luz, cada ejemplo incluye tres poblaciones de células, A, B, y C. Como se ha detallado resumidamente en lo que antecede, dos o más proteínas sensibles a la luz se pueden introducir en las mismas poblaciones de células. Las proteínas sensibles a la luz introducidas pueden ocasionar la misma respuesta o diferentes respuestas cuando se activan. Las diferentes proteínas también pueden tener tiempos de reacción diferentes, o intensidades de las reacciones. Dos proteínas de la misma polaridad se pueden activar a la vez, produciendo un efecto aditivo. Dos proteínas desnaturalizantes, por ejemplo, se pueden estimular alternativamente. Esto puede permitir un aumento en la frecuencia de disparo. En el Ejemplo 1, las poblaciones de células A y B expresan la misma proteína inhibidora, pero diferentes proteínas excitadoras. La población de células C tiene una proteína excitadora que reacciona a la luz alrededor de la misma longitud de onda que la proteína inhibidora de las poblaciones de células A y B. La inhibición de la población de células C reacciona a una longitud de onda similar que la proteína excitadora de la población de células A. Esta disposición permite varias combinaciones de reacciones de poblaciones celulares a la luz proporcionada para estimular las poblaciones de células. En la configuración del Ejemplo 1, la población de células B se puede excitar sin excitar o inhibir cualquiera de las otras dos poblaciones celulares. Sin embargo, las poblaciones de células A y C reaccionan de una forma prácticamente inversa a la luz proporcionada.

35 El Ejemplo 2 incluye la población de células A con tres proteínas sensibles a la luz y poblaciones de células B y C con dos proteínas sensibles a la luz. La población de células A incluye dos proteínas excitadoras que reaccionan con diferentes longitudes de ondas de la luz, y una proteína inhibidora. Cada una de las poblaciones de células B y C tiene una de las proteínas excitadoras de la población de células A y una proteína inhibidora que responde a longitudes de onda en el mismo espectro que la proteína excitadora presente en el resto de poblaciones celulares (B o C). Esta disposición permite combinar las poblaciones de células A y B a excitar, o las poblaciones B y C a excitar, mientras que la tercera población celular queda inhibida. Permite que la población celular A quede inhibida sin afectar cualquiera de las poblaciones de células B o C, y para que la población de células A se excite mientras que ambas poblaciones de células B y C queden inhibidas. La combinación ilustrativa de la Figura 2A no se entiende como limitante, sino para ilustrar algunas de las muchas combinaciones de proteínas sensibles a la luz tanto para una combinación de poblaciones de células únicas, y las combinaciones en diferentes poblaciones celulares.

50 Consistente con otra realización ilustrativa de la presente divulgación, las células diana son neuronas situadas en el cerebro de un mamífero. Las células diana se modifican genéticamente para expresar una disposición biomolecular biosensible, por ejemplo, canales de iones DChR. Se puede usar luz para estimular las neuronas. Dependiendo de numerosos factores, tal como la ubicación en el cerebro y la frecuencia y luz de la estimulación, se pueden conseguir diferentes objetivos. Por ejemplo, las técnicas actuales de estimulación profunda del cerebro (DBS) usan electrodos para aplicar una corriente directamente en la zona específicamente localizada del cerebro. La frecuencia de los estímulos eléctricos se denomina, a veces, como DBS de baja frecuencia o DBS de alta frecuencia. Los estudios han sugerido que la DBS de alta frecuencia inhibe la generación de impulsos procedentes de las células estimuladas, mientras que las frecuencias DBS facilitan la generación de impulsos procedentes de las celdas estimuladas. Las frecuencias que producen los efectos de DBS de alta frecuencia o baja frecuencia también se han mostrado variables dependiendo de la zona específica del cerebro que se va a estimular. De acuerdo con un ejemplo de DBS de alta frecuencia, las neuronas se estimulan usando electrodos que suministran pulsos de corrientes a frecuencias aproximadamente 100 Hz o más. Se ha demostrado que dicha frecuencia es eficaz en determinadas aplicaciones, tal como se analiza adicionalmente en el presente documento.

65 En diferentes poblaciones celulares, análogamente a lo ilustrado en la Fig. 2A, pueden estar presentes dos o más proteínas sensibles a la luz. Algunas (o todas) de las dos o más proteínas sensibles a la luz pueden dirigir la misma acción (es decir, excitación o inhibición) dentro de la población celular. Por ejemplo, la población de células A del ejemplo 2 incluye dos proteínas sensibles a la luz excitadoras, DChR y VChR1. La Fig. 2B muestra un perfil de

estímulos para su uso en determinadas realizaciones en las que dos o más tipos de proteínas sensibles a la luz, por ejemplo DChR y VChR1, se pueden introducir en la misma población de células. Cada molécula que permite el paso de iones tiene su correspondiente frecuencia de estímulo límite, que puede ser parcialmente sensible a factores ambientales tales como pH. Este límite refleja el tiempo de recuperación necesario para que la molécula pase de un estado activado a un estado inactivado. El uso de dos tipos de proteínas sensibles a la luz, sensible cada una de ellas a diferentes longitudes de onda ópticas, puede permitir que cada tipo de proteína se controle independientemente. Los correspondientes canales de iones se pueden activar alternativamente, permitiendo una frecuencia de estimulación del cerebro más alta.

Por ejemplo, el ejemplo 3 muestra que los pulsos de luz (líneas sólidas verticales) de una primera longitud de onda y proporcionados a una frecuencia F . Esta longitud de onda se selecciona para activar un primer tipo de molécula (triángulos). Una segunda serie de pulsos de luz (líneas verticales punteadas) de una segunda longitud de onda también se puede proporcionar a una frecuencia F . Este segundo conjunto de pulsos de luz se puede usar para activar un segundo tipo de molécula (cuadrados). La frecuencia de activación resultante de ambas células es, por tanto, dos veces la frecuencia de activación de cada molécula que permite el paso de iones individual. Por supuesto, las frecuencias no tienen que ser idénticas entre los dos tipos de moléculas y puede variar con el tiempo.

En otra implementación, como se muestra en el ejemplo 4, se puede activar un primer tipo de molécula que permite el paso de iones durante un periodo de tiempo, seguido por la activación de un segundo tipo de molécula que permite el paso de iones. Esto puede ser especialmente útil para permitir que cada una de las moléculas que permiten el paso de iones se pueda inactivar durante el periodo de tiempo durante el cual la otra molécula que permite el paso de iones está activada. En determinados casos, esto facilita la recuperación y el uso sostenido de las moléculas que permiten el paso de iones. Asimismo, los diferentes tipos de corriente, densidades, y capacidades de permiso del paso de iones se puede tener en cuenta cuando se decide sobre el perfil de estimulación específica que va a crear la respuesta deseada.

Un ejemplo específico de DBS se utiliza para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En la presente solicitud, DBS frecuentemente se aplica en el globo pálido interno, o en el núcleo subtalámico, dentro del cerebro de un paciente. Al implantar una disposición biológica que modifica las células para responder a la luz, se puede usar una luz parpadeante en lugar de electrodos. Por tanto, las células neuronales diana y la señal eléctrica externa no tiene que aplicarse directamente a las células diana. Asimismo, la luz puede viajar frecuentemente desde su punto de origen más lejos que la electricidad, aumentando de esta forma el área eficaz con respecto a la fuente de estimulación, y solamente se estimulan aquellas neuronas que hayan sido fotosensibilizadas.

Como en el caso de los métodos DBS basados en electrodos, una realización de la presente divulgación se puede implementar usando DBS de alta frecuencia para inhibir los impulsos generados por neuronas. Mientras que la DBS de alta frecuencia se realiza a frecuencias de aproximadamente 100 Hz, la DBS de alta frecuencia que utiliza varias realizaciones de la presente divulgación puede no requerir, necesariamente, la misma frecuencia. Por ejemplo, puede que sea posible reproducir los efectos inhibidores de la DBS de alta frecuencia a frecuencias más bajas (por ejemplo, 50 Hz) cuando se utilizan las técnicas activadas por luz. Por ejemplo, la activación de la bomba GtR3 favorece intrínsecamente la hiperpolarización y la resistencia a la generación de un potencial de acción. Se pueden usar diferentes frecuencias, dependiendo de la aplicación en particular (por ejemplo, la zona diana del cerebro y el efecto deseado), y la modalidad de estimulación que se va a aplicar.

Consistente con otra realización ilustrativa de la presente divulgación, se usan vectores de transferencia de genes que inducen la expresión de biomoléculas fotosensibles para dirigirse a un tipo específico de célula. Por ejemplo, proteínas de origen vírico (por ejemplo, lentivirus, virus adenoasociados o retrovirus) se pueden crear para dirigirse a tipos específicos de células, basándose en las proteínas que expresan de forma única. A continuación, las células diana se infectan con las proteínas de origen vírico por transferencia génica, y comienzan a producir un nuevo tipo de canal iónico (por ejemplo DChR), que se convierte de esta forma en fotosensible. Esto puede ser especialmente útil para estimular las células diana sin estimular otras células que se encuentran cerca de los tejidos diana. Por ejemplo, neuronas que se diferencian en longitud, diámetro, cronaxia, otras propiedades de la membrana, aislamiento eléctrico, salida de neurotransmisores, y función global, se encuentran en estrecha proximidad entre sí, y, de este modo, se pueden estimular sin querer cuando se utilizan electrodos para proporcionar estimulación a las neuronas. Para obtener más información sobre la generación de vectores víricos y la modificación y estimulación de células neurales *in vivo*, se puede hacer referencia a la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/459.636, presentada el 24 de julio de 2006, "An optical neural interface: *in vivo* control of rodent motor cortex with integrated fiber optic and optogenetic technology" de Alexander M. Aravanis, et al, Journal Neural Engineering 4 (2007) S143-S156, "Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons" de Antoine R. Adamantidis, et al, Nature, (15 de noviembre, 2007) Vol. 450: 420-424, "Targeting and Readout Strategies for Fast Optical Neural Control In Vitro and In Vivo" de Viviana Gradinaru, et al, The Journal of Neuroscience, (26 de diciembre, 2007) 27(52):14231-14238, "Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry" de Feng Zhang, et al, Nature (5 de abril, 2007) Vol. 446: 633-639, "Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems" de Feng Zhang, et al, Nature Reviews Neuroscience (Agosto 2007) Vol. 8: 577-581.

Una realización específica de la presente divulgación emplea una disposición implantable para uso *in vivo*. Un diodo

emisor de luz, láser, o fuente de luz similar se incluye para generar luz (como se muestra, por ejemplo, por el generador de luz 104 en la Fig. 3). Una parte biológica que modifica las células diana para incluir moléculas sensibles a la luz que facilita el estímulo de las células diana en respuesta a la luz generada por la fuente de luz.

5 Otra realización de la presente divulgación utiliza una disposición para estimular células diana usando una proteína fotosensible que permite que las células diana se estimulen en respuesta a la luz. Un dispositivo de administración biológico, tal como los descritos con respecto a la parte biológica 204 de la Fig. 4, se utiliza para implantar vectores que modifican las células diana para incluir la proteína fotosensible. Un componente de implante, tal como el descrito con respecto a la parte biológica 204, la malla de la Fig. 7 o la matriz vírica de la Fig. 8, se usa para implantar un
10 dispositivo generador de luz cerca de las células diana. Un dispositivo de control, tal como el descrito con respecto al circuito de control 208, se utiliza para activar el dispositivo generador de luz para que genera la luz que van a recibir las células diana, estimulando de esta forma las células diana en respuesta a la luz generada.

15 Volviendo ahora a las figuras, la Fig. 3 muestra un diagrama de bloques de un sistema para estimular células diana, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación. El bloque 102 representa una ubicación interna de un organismo (por ejemplo, un mamífero), como se muestra por la designación *in vivo*. El generador de luz 104 es un dispositivo implantable que genera luz *in vivo*. La porción biológica 106 fotosensible altera las células diana de forma que el haz de luz generada produce la estimulación de la diana. En un caso, el generador de luz 104 es un pequeño dispositivo electrónico de aproximadamente unos pocos milímetros de tamaño. El pequeño tamaño es
20 especialmente útil para minimizar la intrusividad del dispositivo y del procedimiento de implantación asociado. En otro caso, el generador de luz 104 puede incluir un dispositivo de fibra óptica que se puede usar para transmitir luz desde una fuente externa hasta las células diana.

25 En una realización de la presente divulgación, las células diana se modifican para contener proteínas de tipo bomba/canal de protones activadas por luz. Un ejemplo específico de este tipo de proteína es GtR3, que es un producto basado en los criptófitos de *Guillardia theta*. La caracterización del espectro de acción de GtR3 sugiere que el máximo de absorción está en aproximadamente 490 nm. Otro ejemplo específico es DChR de *Dunaliella salina*. La acción máxima de la DChR es aproximadamente 500 nm.

30 Estas proteínas sensibles a la luz se pueden implantar usando numerosos métodos diferentes. Los métodos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, el uso de diferentes dispositivos de administración, tales como cápsulas de gelatina, inyecciones líquidas y similares. Dichos métodos incluyen también el uso de técnicas de cirugía estereotáctica tales como bastidores o sistemas de navegación quirúrgica informatizada para implantar o acceder de otra forma a zonas del cuerpo. Para obtener más detalles sobre la administración de dichas proteínas, se
35 puede hacer referencia a la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/459.636, presentada el 24 de julio de 2006 y titulada "Light-Activated Cation Channel and Uses Thereof".

La Fig. 4 muestra un diagrama de bloques de un dispositivo implantable para estimular células diana, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación. La figura incluye el circuito de control 208, fuente de luz
40 206, porción biológica 204 y células diana 202. La porción biológica 204 altera las células diana 202 de forma que las células diana se estimulan en respuesta a la luz.

En una realización de la presente divulgación, la porción biológica 204 puede estar compuesta de células diana 202 que se han modificado para ser fotosensibles. En otra realización de la presente divulgación, la porción biológica 204 puede incluir elementos biológicos tales como vectores de transferencia de genes, que pueden hacer que las células
45 diana 202 se conviertan en sensibles a la luz. Un ejemplo de esto es un lentivirus que transporta el gen para la expresión de DChR. De este modo, la estimulación de las células diana 202 se puede controlar mediante el dispositivo implantable. Por ejemplo, el circuito de control 208 se puede disponer para responder a una señal externa mediante activación, o desactivación, de la fuente de luz 206, o cargando la batería que alimenta la fuente de luz 206. En un caso, la señal externa es radiación electromagnética que recibe el circuito de control 208. Por ejemplo, se
50 pueden transmitir señales de radiofrecuencia (RF) mediante un transmisor de RF externo, que recibe el circuito de control 208. En otro ejemplo, se puede usar un campo magnético para activar y/o alimentar el circuito de control.

El circuito de control 208 se puede implementar usando diferentes grados de complejidad. En un caso, el circuito es una mera bobina que, cuando se expone a un campo magnético, genera una corriente. A continuación, la corriente
55 se usa para alimentar la fuente de luz 206. Dicha implementación puede ser especialmente útil para limitar el tamaño y la complejidad, así como para aumentar la longevidad del dispositivo. En otro caso, el circuito de control 208 puede incluir una antena RF. Opcionalmente, una batería o fuentes de alimentación similar, tal como un elemento capacitador, se puede usar mediante el circuito de control 208. Cuando está cargado, la fuente de alimentación permite que el circuito siga funcionando sin necesidad de una aplicación de energía simultánea desde el exterior del
60 cuerpo. Esto puede ser especialmente útil para proporcionar un control preciso de la luz emitida por la fuente de luz 206 y para aumentar la intensidad de la luz emitida. En una realización de la presente divulgación, la fuente de luz 206 se implementa mediante un diodo emisor de luz (LED). Se ha demostrado que los LED son útiles en aplicaciones de baja potencia y tienen también una respuesta relativamente rápida a las señales eléctricas.

65 En otra realización de la presente divulgación, la porción biológica 204 incluye una gelatina o sustancia similar que contiene vectores de transferencia de genes que codifican genéticamente las células diana según la fotosensibilidad.

5 En un caso, los vectores se liberan una vez implantados en el cuerpo. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante el uso de un material de confinamiento que permite que los vectores se liberen en solución acuosa (por ejemplo, usando materiales deshidratados o solubles en agua tales como gelatinas). La liberación de los vectores da como resultado que las células diana se modifiquen de tal forma que se estimulan en respuesta a la luz emitida por la fuente de luz 206.

10 En otra realización de la presente divulgación, la porción biológica 204 incluye una malla sintética que contiene la células fotosensibles. En un caso, las células son neuronas que se han modificado para ser fotosensibles. La malla sintética se puede construir de forma que permita que las dendritas y los axones atraviesen la malla sin permitir a la totalidad de la neurona (por ejemplo, el cuerpo celular) atravesarla. Un ejemplo de dicha malla tiene poros que tienen aproximadamente 3-7 micrómetros de diámetro, y está hecha de tereftalato de polietileno. En otra realización ilustrativa, la porción biológica 204 incluye un mecanismo de inyección tal como se divulga más detalladamente en el presente documento.

15 La Fig. 5 muestra un diagrama de bloques de un dispositivo implantable, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación. El dispositivo implantable de la Fig. 3 es sensible a un campo magnético. Más específicamente, un inductor construido con bobinas 302 y núcleo 304 genera una corriente/tensión en respuesta a un campo magnético. La corriente se pasa al circuito de control 310 a través de una ruta conductora 306. En respuesta, el circuito de control 310 activa la fuente de luz 312 usando la ruta conductora 308. La fuente de luz 312 ilumina la porción biológica 314 para estimular las células diana. En un caso, la porción biológica 314 incluye una gelatina, la malla sintética o el mecanismo de inyección como se describe con mayor detalle en el presente documento.

25 En una realización de la presente divulgación, la parte de control puede ser una conexión eléctrica simple, elemento resistivo, o se puede eliminar por completo. En una realización de ese tipo, la intensidad, duración y frecuencia de la luz generada se podría controlar directamente mediante la corriente generada a partir de un campo magnético. Esto puede ser especialmente útil para crear dispositivos baratos, duraderos y pequeños. Un ejemplo de dicha realización se analiza más detalladamente con respecto a la Fig. 6A y la Fig. 6B.

30 En otra realización de la presente divulgación, la parte de control se puede implementar como un circuito más complejo. Por ejemplo, el circuito de control puede incluir y por otra parte implementar diferentes circuitos rectificadores, baterías, temporalizaciones de pulsos, circuitos comparadores, y similares. En un ejemplo particular, el circuito de control incluye un circuito integrado (CI) producido usando CMOS u otros procesos. La tecnología de circuitos integrados permiten el uso de un elevado número de elementos del circuito en un área muy pequeña, y, de este modo, se puede implementar un circuito de control relativamente complejo para algunas aplicaciones.

40 En una realización particular de la presente divulgación, el inductor (302 y 304 de la Fig. 5) es un inductor montado en superficie, tal como un inductor 100uH número de pieza CF1008-103K suministrado por Gowanda Electronics Corp. La parte generadora de luz es un LED azul, tal como los LED en tamaños de envase 0603 o 0805. Un ejemplo concreto es un LED de color azul montado en superficie que tiene el número de pieza SML0805, disponible de LEDtronics, Inc (Torrance, CA). Las rutas conectoras 306 y 308 se pueden implementar usando diferentes conductores eléctricos, tales como conductores epóxidos, esparadrapos, soldaduras, u otros materiales adhesivos. Los LED que emiten luz en el espectro ámbar (como es aplicable para los canales NpHR) y otros espectros están disponibles de fuentes comerciales, incluido este mismo fabricante.

45 La Fig. 6A muestra un diagrama de bloques de un dispositivo implantable, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación. La Fig. 6A muestra un inductor que comprende las bobinas 402 y el núcleo 404 conectados al LED 408 usando las rutas conductoras mostradas en 406. La Fig. 6B muestra un diagrama de circuito correspondiente al diagrama de bloques de la Fig. 6A. El inductor 412 está conectado en paralelo con el LED 410. Por tanto, la corriente y la tensión generadas por un cambio en el campo magnético visto en el inductor 412 hace que el LED 410 produzca luz. La frecuencia y la intensidad del campo magnético alternante se pueden variar para producir la cantidad y periodicidad deseadas de luz procedente del LED 410.

50 La Fig. 7A y la Fig. 7B muestran un diagrama de una malla para contener biomoléculas fotosensibles, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación. La malla 502 se construye para que tenga orificios 504 de un tamaño que permite que la iluminación la atravesase pero para impedir que las células 506 pasen. Esto permite que las células 506 queden implantadas mientras siguen recibiendo luz desde un generador de luz.

60 En una realización de la presente divulgación, las células 506 son citoblastos que se han modificado para ser fotosensibles. Se deja que los citoblastos maduren, como se muestra en la Fig. 7B. En un caso particular, los citoblastos maduran en neuronas que tienen un cuerpo celular 512, axones/dendritas 508 y 510. Las neuronas están genéticamente modificadas para que sean fotosensibles. Los orificios 504 tienen aproximadamente 3-7 micrómetros de diámetro. Este tamaño permite que algunos axones y dendritas pasen por los orificios 504, a la vez que evitan que el cuerpo celular 512 pase.

65 La Fig. 8A y la Fig. 8B muestran un diagrama de una matriz vírica, de acuerdo con una realización ilustrativa de la

presente divulgación. La matriz vírica incluye la estructura 602, que contiene los vectores víricos 604. En un caso, la estructura 602 incluye un gel o sustancia fluida que contiene los vectores víricos 604 hasta que se hayan implantado en un mamífero 606. Una vez que los vectores víricos 604 se han liberado, infectan las células diana 608 en la proximidad de la matriz vírica implantada, como se muestra en la Fig. 8B. La célula diana 610 infectada se vuelve fotosensible, y, de este modo, se puede usar luz para controlar la estimulación de las células diana 610.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, la estructura 602 es una gelatina que se ha impregnado, o se ha sellado de otra forma con vectores víricos 604 variass dentro de la gelatina. Cuando la estructura 602 se implanta, la gelatina se hidrata y/o se disuelve, liberando de esta forma los vectores víricos 604. Se puede usar una mezcla de gelatina comercialmente disponible, además de compuestos tales como Matrigel de BD Biosciences Division de Becton Dickenson and Company (Franklin Lakes, NJ).

La Fig. 9 muestra un diagrama de circuito de un circuito que produce luz en respuesta a un campo magnético, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación. La Fig. 9 incluye un circuito de entrada 720 y un circuito de salida 730. El inductor 704 genera corriente en respuesta al campo magnético 702. Debido a las propiedades de los campos magnéticos, la corriente producida mediante el inductor 704 es una señal de corriente alterna (CA). Un rectificador 706 de puente de onda completa rectifica la señal CA y junto con un circuito RC genera una tensión relativamente estable a partir de la señal CA. Esta tensión generada es sensible al campo magnético 702 y al circuito de salida 730 que genera luz cuando la tensión generada es de nivel suficiente. Más específicamente, la energía de la batería 708 se utiliza para alimentar el LED 710 en respuesta al campo magnético 702. Esto es especialmente útil para aplicaciones donde el campo magnético 702 que recibe el inductor 704 es menos potente (por ejemplo, debido a la ubicación *in vivo* del inductor 704).

La Fig. 10A muestra un diagrama de circuito de un circuito que produce luz en respuesta a la señal RF 801, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación. La antena 802 se usa para recibir la transmisión RF 801 y convierte la señal en electricidad. La transmisión recibida se rectifica mediante el diodos 803 y se filtra adicionalmente mediante el capacitador 805. En un caso, el diodo 803 se puede implementar mediante un diodo que tiene capacidades de baja desviación hacia delante y de cambio rápido, tal como un diodo Schottky.

En una realización particular de la presente divulgación, la transmisión RF 801 contiene un componente de alimentación para cargar la batería 815 y un componente de señal para controlar el LED 825. El capacitador 805 se puede seleccionar para separar estos componentes para su uso en el circuito. Por ejemplo, el componente de alimentación puede ser una señal de baja frecuencia y gran amplitud relativamente, mientras que el componente de señal es una señal de alta frecuencia y pequeña amplitud, relativamente. El capacitador 805 se puede seleccionar para filtrar el componente de alimentación de la señal para crear la tensión correspondiente. El restante componente de alta frecuencia de la transmisión RF se suma a esta tensión. El componente de alimentación de la transmisión se puede usar a continuación para cargar la batería 815, y el componente de señal de la transmisión se usa para activar el LED 825. La luz generada por el LED 825 desencadena el estímulo de las células diana 827.

La Figura 10B ilustra una realización alternativa de un acumulador de energía de radiofrecuencia, que carga una batería, que a su vez, alimenta un generador de pulsos digitales, que alimenta un LED. Una señal electromagnética 850 se recibe mediante la antena de bucle 852, que genera la correspondiente señal eléctrica. La tensión generada en la antena de bucle 852 está limitada por la tensión de polarización inversa de los diodos 855 y 856 y se almacena en el capacitador 854. En un caso particular, estos diodos tienen una tensión de polarización baja que es relativamente precisa, tal como un diodo Zener. La señal electromagnética 850 se rectifica mediante el puente rectificador 858 del diodo y se filtra con el regulador de tensión 859 para producir una tensión CC. La CC se puede usar para cargar la fuente de alimentación 860.

La batería 860 está acoplada con la entrada del disparador Schmidt 865 mediante el capacitador 862. La retroalimentación desde la salida del disparador Schmidt se proporciona mediante la resistencia 864 con respecto a la carga del capacitador 863. En consecuencia, la frecuencia de la salida de onda cuadrada del disparador Schmidt 865 se determina por los valores de la red resistencia-capacitador que incluye el capacitador 863 y la resistencia 864. La resistencia 864 y el capacitador 863 pueden ser fijos o variables. La salida del disparador Schmidt 865 se alimenta mediante el inversor digital 867, que alimenta el LED 866. La luz del LED 866 se transmite a las neuronas 868 sensibles a la luz con respecto a la frecuencia de salida de onda cuadrada del disparador Schmidt 865.

La Figura 10C ilustra un diagrama de bloques de un enfoque de acumulador de energía de campo electromagnético (EMF) y emisión de pulsos en que el que la EMF 897 recibida (por ejemplo, energía de radiofrecuencia) incluye no solo energía de acumulación, sino también una señal codificada que contiene instrucciones para el microprocesador 895. En la etapa 885 (señal de energía y parámetro de control: codificación y transmisión), una señal de instrucciones de control se codifica para modular el componente de energía según métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modulación de frecuencia. El bloque 890 del receptor de energía usa una parte de la señal EMF para proporcionar energía al bloque 893. El bloque 891 del receptor de señal usa una parte de la señal EMF para proporcionar instrucciones de control al bloque microprocesador 895.

Las instrucciones de control se pueden utilizar para transmitir información relativa a los diferentes parámetros de la

luz generada, tales como frecuencia, la resistencia, la duración, color, y similares. Estas instrucciones se puede descodificar y procesar mediante un microprocesador o circuito lógico, como se muestra en el bloque 895. El bloque 895 puede generar una o varias señales de control en respuesta a las instrucciones decodificadas. En consecuencia, la frecuencia (y otros parámetros) de la luz generada por el LED 896 no necesita estar fijada para el dispositivo implantado dado. La antena 889 suministra la entrada del receptor de energía 890 (proporcionando alimentación al regulador de tensión y al circuito 893 de la batería). En paralelo, la antena 889 suministra datos codificados al receptor 891 de señal de control, que proporciona la entrada de control al microprocesador 895 que controla el LED 896. La luz 897 de longitud de onda seleccionada se suministra a continuación a la célula 898 excitable eléctricamente. La batería del regulador de tensión y el circuito 893 de la batería proporcionan alimentación al microprocesador 895 y al receptor 891 de control de la señal.

Los diagramas de circuito de la Fig. 9 y la Fig. 10A, 10B y 10C son meramente ilustrativos de unas pocas realizaciones particulares de la presente divulgación, y se suponen otras implementaciones diferentes. Por ejemplo, las realizaciones particulares implementan una fuente de luz que utiliza un LED azul; sin embargo, se pueden implementar otros colores y fuentes de luz dependiendo de la aplicación en particular. En otras realizaciones particulares, la fuente de luz incluye más de un color de fuente de luz. El circuito controla no solo cuando se proporciona la luz, sino de qué color es, dependiendo de si las instrucciones precisan la inhibición o la excitación de la célula. Por ejemplo, en un ejemplo específico, la célula diana expresa tanto un inhibidor (por ejemplo, GtR3) y un excitador (por ejemplo, VChR1), que responden a diferentes longitudes de onda de la luz. El sistema también puede controlar el nivel en el que las células se excitan o se inhiben. Esto se puede llevar a cabo incluyendo múltiples proteínas sensibles a la luz en las células diana que excitan (o inhiben) y mediante la programación de instrucciones para proporcionar más de una longitud de onda de la luz en un único momento.

La Fig. 11A y la Fig. 11B, cada una de ellas, muestra una diagrama de un dispositivo de fibra óptica, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación. El dispositivo de fibra óptica incluye una parte de control 908, un generador de luz 906 y un cable de fibra óptica 902.

El cable de fibra óptica 902 se puede colocar cerca de una porción biológica fotosensible, tal como una matriz vírica o malla sintética, como se analiza en el presente documento. Esto permite que la parte de control 908 y el generador de luz 906 se encuentren a una distancia desde las células diana 910 (por ejemplo, a una distancia correspondiente a la longitud del cable de fibra óptica 902). Esto puede ser especialmente útil para minimizar el tamaño de la parte del dispositivo implantado que está cerca de las células diana, por ejemplo, donde las células diana están situadas en o cerca de una ubicación sensible dentro del cerebro. En algunos casos, la ubicación remota de las partes 908 y 906 también facilita modificaciones del dispositivo, que incluyen, aunque no de forma limitativa, la sustitución de diferentes componentes (por ejemplo, batería), cambios en la frecuencia de estimulación y en la longitud.

La parte de control 908 se puede configurar para responder a una señal externa, tal como un campo magnético o señales RF. Como alternativa, la parte de control 908 se puede configurar para activar el generador de luz 906 de acuerdo con un calendario programado o una combinación entre una señal externa y una respuesta programada.

Las Figs. 12A-12D representan gráficamente varias etapas en la producción de una porción biológica fotosensible, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación. Más específicamente, La Fig. 12A muestra la estructura de moldeo 1004 que tiene varios moldes 1002. Los moldes 1002 se construyen en varios tamaños dependiendo de la aplicación en particular. En una de estas aplicaciones, los moldes tienen unos pocos milímetros o menos de diámetro.

La Fig. 12B muestra los moldes 1002 de la Fig. 12A después de aplicar una capa de gelatina o sustancia similar, como se muestra mediante 1006 y 1008. Asimismo, los vectores víricos (mostrados con 'v') están en los dos moldes superiores. Estos virus pueden estar suspendidos en medios 1012, que pueden ser medios líquidos o medios gelatinosos. Dichos líquidos incluyen solución salina normal, suero salino tamponado-HEPES, y otras sustancias víricas y medios de transferencia conocidos. Los medios gelatinosos adecuados incluyen Matrigel (BD Biosciences, San Jose CA). Estos vectores víricos son genes de transferencia diseñados para sensibilizar a la luz las membranas de las células diana después de la implantación.

La Fig. 12C muestra una vista lateral del molde 1006. 1016 representa la estructura de moldeo que conforma la forma de la capa de gelatina 1014. La capa de gelatina 1014 atrapa los vectores víricos variass dentro de los medios 1012. Una capa de gelatina 1010 superior se aplica para contener los vectores víricos en su totalidad.

La Fig. 12D muestra la cápsula del vector vírico resultante. Los vectores víricos 1018 están contenidos en el área 1022 por la carcasa 1020. La carcasa 1020 puede estar diseñada para disolverse, o permitir de otra forma que los vectores víricos 1018 se diseminen hacia las células diana una vez implantados. En un caso, la cápsula está fabricada de un material soluble en agua, por ejemplo, gelatina, de forma que, tras su implante, los vectores víricos puedan escapar al interior del cuerpo. Los materiales solubles en agua para cápsulas son bien conocidos en la industria farmacéutica.

La Fig. 13 muestra un dispositivo de implante, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación.

La porción biológica 1102 y el dispositivo 1108 generador de luz se implantan usando el dispositivo de implantación. Por ejemplo, el eje del dispositivo 1114 está colocado cerca de las células diana. A continuación, el usuario del dispositivo pulsa sobre la parte 1116, lo que hace que la parte 1112 coloque la porción biológica 1102 y el dispositivo 1108 generador de luz cerca de las células diana. A continuación, el dispositivo de implantación se puede retirar.

5 La Fig. 14A y la Fig. 14B muestran un diagrama de otro dispositivo de implante, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación. El dispositivo implantable 1204 generador de luz está rodeado por, y permeado por canales de fluido 1202. Los canales de fluido 1202 permiten que una solución 1210 que contiene material biomolecular (por ejemplo, vectores víricos fotosensibilizantes) se inyecten inmediatamente proximales al dispositivo
10 1204 generador de luz y las células diana. Los canales de fluido pueden estar situados fuera del dispositivo 1204 y/o dentro del dispositivo 1204, como se muestra en 1212 y 1214, respectivamente. De este modo, los vectores víricos se pueden inyectar en grandes cantidades o durante un periodo de tiempo. Por ejemplo, las células infectadas mediante vectores víricos puede revertir a su estado anterior a la infección después de un periodo de tiempo. Mediante el uso del dispositivo de la Fig. 12A, los vectores víricos se pueden reintroducir periódicamente en las
15 células diana. Como alternativa, se pueden introducir diferentes vectores víricos mediante los canales de fluido, lo que permite el direccionamiento de diferentes células en el sitio de implantación. Esto puede ser especialmente útil para el tratamiento estadificado mediante estimulación de diferentes tipos de células.

20 Una realización específica de la presente divulgación se refiere a un método para modificar neuronas genéticamente para expresar en canal de iones DChR sensible a la luz. En este método, los pulsos de luz azul hacen que las neuronas DChR disparen potenciales de acción correspondientes a cada pulso. La despolarización y la repolarización se producen en una escala temporal de milisegundos, lo que convierte este método en coherente para una neurofisiología de red normal.

25 Las neuronas diana específicas se modifican usando vectores víricos para la transferencia génica. Para obtener más información sobre la generación de vectores víricos, se puede hacer referencia a Boyden *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2006 titulado "Channelrhodopsin-2 and Optical Control of Excitable Cells," Nature Methods Vol. 3, n.º 10, Esta transfección da como resultado la introducción de un gen de una sola proteína, un canal de iones en la membrana celular, conocido como "DChR". En la naturaleza, DChR se encuentra en la membrana celular de *Dunaliella salina*.
30 Tras absorción de luz azul/verde (500 nm), este canal de iones se abre un corto periodo de tiempo, permitiendo la entrada de cationes. Cuando se transfecta a una célula nerviosa de mamífero, los nervios afectados se vuelven fotosensibles, produciendo potenciales de acción disparados por luz.

35 Una característica específica del tipo neurona que también es un promotor coherente se inserta adyacente al código DChR dentro del virus, y la línea se propaga mediante transfección con fosfato de calcio en células 293FT. A continuación, el sobrenadante se centrifuga para dar aglomerados víricos, que se introducen en suero salino tamponado con fosfato.

40 En un caso particular, la aplicación de un a DChR se utiliza para fotoestimulación. Los restos de aminoácidos que comprenden la canalrodopsina DChR de *Dunaliella salina* se puede utilizar para transmitir fotosensibilidad rápida en células nerviosas de mamífero, mediante el uso de un vector vírico para insertar el gen del DChR en células nerviosas diana que posteriormente pueden expresar dicho gen. Tras iluminación con luz azul/verde de aproximadamente 500 nm, ATR se isomeriza y desencadena en cambio conformacional para abrir el poro del canal. Como DChR es un canal de iones sensible a la luz, permite evocar una corriente de entrada.
45

En otro caso, la aplicación de GtR3 (derivado de *Guillardia theta*) se usa para la fotoestimulación. Esta bomba de protones se puede transmitir a las células nerviosas de mamífero mediante el uso de un vector vírico para introducir el gen de GtR3 en las células nerviosas diana, que posteriormente pueden expresar este gen. Tras iluminación con luz azul de aproximadamente 472 nm, el bombeo de protones activo al exterior del citoplasma neuronal da como resultado la hiperpolarización de la célula.
50

Puesto que la sensibilidad a la luz azul mediante DChR o GtR3 se induce cuando un vector vírico introduce el correspondiente gen en una célula que anteriormente era normal, la inserción puede estar genéticamente dirigida hacia los productos expresados por subtipos celulares específicos. Por ejemplo, podría ser ventajoso hacer que solamente las neuronas dopaminérgicas, y no las neuronas colinérgicas, reaccionaran a la luz azul.
55

Tal como se ha descrito anteriormente, determinadas realizaciones de la presente divulgación implican el uso de una bomba de iones o canal de iones ópticamente sensibles que se expresan en una célula. En un caso particular, la célula es tanto una célula neural o un citoblasto. Una realización específica implica células animales *in vivo* que expresan una bomba de iones. Algunos aspectos de la presente divulgación se basan en la identificación y desarrollo de una bomba de protones, derivada de *Guillardia Theta*, por ejemplo, para una inhibición óptica temporalmente precisa de la actividad neural. La bomba permite tanto la inactivación de potenciales de acción únicos dentro de trenes de espigas rápidos y el bloqueo sostenido con espigas durante varios minutos.
60

De acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación, una bomba de iones o canal de iones ópticamente sensible se expresa en uno o más citoblastos, células precursoras, o progenie de citoblastos o células precursoras. La estimulación óptica se utiliza para activar las bombas/canales expresados. Se puede usar la
65

activación para controlar la concentración de protones en las células. También se puede usar para controlar el pH de orgánulos subcelulares particulares. Esto puede ser especialmente útil para alterar la supervivencia, proliferación, diferenciación, desdiferenciación, o falta de diferenciación de las células. Por tanto, el estímulo óptico se implementa para proporcionar control de la (maduración) de los citoblastos o las células precursoras.

5 De acuerdo con otras realizaciones ilustrativas de la presente divulgación, los métodos para generar un flujo de corriente inhibitoria en la neurona implican, en una neurona, diseñar mediante ingeniería genética una proteína que responde a la luz mediante la producción de una corriente inhibitoria para evitar la despolarización de la neurona. En uno de esos métodos, la proteína es GtR3 y es una molécula exógena para la neurona, y en otro método, la proteína es una proteína inhibitoria que utiliza un cofactor endógeno.

15 En otra realización ilustrativa, un método para controlar el potencial de acción de una neurona implica la siguiente etapa: diseñar mediante ingeniería genética una proteína sensible a la luz en la neurona; produciendo, en respuesta a la luz, una corriente inhibitoria en la neurona y procedente de la primera proteína sensible a la luz; diseñar mediante ingeniería genética una segunda proteína sensible a la luz en la neurona; y producir, en respuesta a la luz, una corriente de excitación en la neurona procedente de la primera proteína sensible a la luz. La combinación de proteínas sensibles a la luz puede depender de la sensibilidad a la luz de la proteína, el tiempo de reacción de la proteína, y la acción definida de la proteína, por ejemplo. Múltiples proteínas sensibles a la luz del mismo tipo (inhibidoras o excitadoras) se pueden usar en la misma población celular para permitir, por ejemplo, el bloqueo a largo plazo del potencial de acción, o bien una única inhibición del potencial de acción dependiendo de la longitud de onda utilizada.

25 En otro método para controlar el nivel de tensión a través de una membrana celular de una célula, el método comprende: diseñar mediante ingeniería genética una primera proteína sensible a la luz en la célula; medir el nivel de tensión a través de la membrana celular; y producir, en respuesta a la luz de una primera longitud de onda y usando la primera proteína sensible a la luz, una corriente a través de la membrana celular que es sensible al nivel de tensión medido.

30 Otro aspecto de la presente divulgación se dirige a un sistema para controlar un potencial de acción en una neurona *in vivo*. El sistema incluye un dispositivo de administración, una fuente de luz, y un dispositivo de control. El dispositivo de administración introduce una proteína sensible a la luz en la neurona, donde la proteína sensible a la luz produce una corriente de inhibición. La fuente de luz genera luz para estimular la proteína sensible a la luz, y el dispositivo de control controla la generación de luz mediante la fuente de luz. En una realización particular, la fuente de luz es una fuente de luz azul, y la proteína sensible a la luz es sensible a la luz azul.

35 En realizaciones más detalladas, dicho sistema está adicionalmente adaptado de forma que el dispositivo de administración introduce la proteína sensible a la luz mediante una transfección, transducción y microinyección, y/o de tal forma que la fuente de luz introduce luz en la neurona mediante uno de un generador de luz implantable y fibra óptica.

40 Otro aspecto de la presente divulgación se dirige a un método para tratamiento de un trastorno. El método se dirige a un grupo de neuronas asociadas con el trastorno; y en este grupo, el método incluye diseñar mediante ingeniería genética proteínas inhibitorias que utilizan un cofactor endógeno para responder a la luz mediante la producción de una corriente de inhibición para inhibir la despolarización de las neuronas, y exponer las neuronas a la luz, evitando de esta forma la despolarización de las neuronas.

50 En otro aspecto de la presente divulgación, GtR3 se optimiza para su expresión en mamíferos. Una proteína sensible a la luz se aísla de *Guillardia theta*. La proteína aislada tiene un extremo C y un extremo N. Se añade un promotor de la señal de exportación al retículo endoplasmático (RE) al extremo C de la proteína aislada, creando una proteína sensible a la luz mejorada. En diversas realizaciones, el promotor añadido a GtR3 aislado varía dependiendo de la ubicación de expresión deseada.

La Fig. 15 representa gráficamente una disposición con múltiples fuentes de luz, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación. La Fig. 15 muestra fuentes de luz 1602 y 1604 que iluminan proteínas 1610 y 1614. Las proteínas 1610 y 1614 están diseñadas mediante ingeniería genética dentro de la célula 1612 para controlar la corriente a través de la membrana celular en respuesta a la luz procedente de las fuentes de luz 1602 y 1604, respectivamente. En un caso, la primera proteína 1610 funciona para evitar el disparo del potencial de acción, mientras que la segunda proteína 1614 funciona para estimular el disparo del potencial de acción. Cada una de las proteínas 1610 y 1614 es sensible a la luz. En un caso particular, la primera proteína es sensible a la luz procedente de la fuente de luz 1602, que tiene una longitud de onda A y la segunda proteína es sensible a la luz procedente de la fuente de luz 1604 que tiene la longitud de onda B. De esta forma, las fuentes de luz se pueden usar para controlar cada proteína independientemente. Esto puede ser útil tanto para estimular como para evitar potenciales de acción en la célula. En otro caso, tener ambos tipos de proteínas permite el control tanto positivo como negativo de la tensión de la membrana celular. Por tanto, las diferentes fuentes de luz y proteínas se podrían usar para controlar la tensión o el nivel de intensidad (por ejemplo, fijación) de la membrana celular.

Un método para determinar la sensibilidad implica cuantificar la sensibilidad en términos de intensidad de la luz necesaria para producir una respuesta dada. En algunos casos, la primera o segunda proteína puede seguir siendo sensible a la longitud de onda alternativa de la luz aunque la sensibilidad de la proteína pueda ser menor que para la longitud de onda primaria. En consecuencia, una proteína de un primer tipo puede tener cierta sensibilidad a una longitud de onda correspondiente al otro tipo de proteína, a la vez que mantiene suficiente independencia de funcionamiento. En uno de estos casos, el control de la célula se puede implementar desplazando bien la longitud de onda de luz o la intensidad de la luz. Por ejemplo, la longitud de onda se puede desplazar entre A y B para inducir el correspondiente aumento o disminución del potencial de tensión de membrana. Como alternativa, múltiples proteínas que tienen acciones similares, pero diferentes longitudes de onda de activación, se pueden introducir en la misma célula. La respuesta puede variar a medida que la longitud de onda se desplaza, en algunas zonas, la combinación de las dos respuestas crea una respuesta mayor que la procedente de una proteína individual.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, la bomba 1614 se puede implementar opcionalmente con fines distintos a evitar el disparo del potencial de acción, tal como controlar el nivel de tensión de la célula 1612. Más específicamente, se puede usar un sensor para proporcionar retroalimentación a la fuente de luz 1602. Por ejemplo, esta retroalimentación podría ser una medición de la tensión o la corriente a través de la membrana celular. Por tanto, la fuente de luz se podría configurar para mantener una corriente o tensión constante (por ejemplo, fijación) a través de la célula. Asimismo, la cantidad de sensibilidad se puede controlar modificando una o más de la intensidad y la longitud de onda de la luz.

La Fig. 16 muestra un sistema para controlar las propiedades eléctricas de una o más células *in vivo*, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación. La unidad 1702 de control/interfaz activa/desactiva la fuente de luz 1704 para que ilumine las células diana 1708. Un mecanismo de administración, tal como el cable de fibra óptica 1706, enruta o dirige de otra forma la luz a las células diana 1708. El cable de fibra óptica 1706 puede incluir un haz de cables ópticos, cada uno de ellos capaz de transportar y dirigir luz independientemente. Por tanto, el cable de fibra óptica 1706 se puede configurar para suministrar luz que tiene una o más longitudes de onda a diferentes ubicaciones. El sensor 1710 se puede implementar, por ejemplo, como un dispositivo óptico tal como un escopio óptico o como un voltímetro, para proporcionar retroalimentación a la unidad de control 1702. En un caso particular, la retroalimentación incluye la obtención de imágenes ópticas de las células diana o de otras células relacionadas. En otro caso, la retroalimentación podría controlar la respuesta de tensión de las células diana, incluida la cantidad de disparo del potencial de acción.

La Fig. 17 muestra un sistema para controlar las propiedades eléctricas de una o más células *in vivo*, de acuerdo con una realización ilustrativa de la presente divulgación. La unidad de control/interfaz 1802 activa/desactiva la fuente de luz 1804 implantable, que a su vez se ilumina las células diana 1806. La fuente de luz 1804 es muestra con dos fuentes de luz, una fuente de luz 1808 de corriente inhibidora y una fuente de luz 1810 de corriente de excitación. La fuente de luz 1808 produce luz con una longitud de onda e intensidad a la que es sensible una proteína inhibidora, mientras que la fuente de luz 1810 produce luz a una longitud de onda e intensidad a la que es sensible una proteína excitadora. Un experto en la materia reconocería que son posibles diferentes configuraciones de la fuente de luz 1810, incluida una sola fuente de luz de inhibición o una matriz de fuentes de luz que tengan una o más longitudes de onda. La unidad de control/interfaz 1802 se comunica con la fuente de luz 1804 mediante cualesquiera mecanismos de comunicación adecuados, tales como comunicaciones cableadas o comunicaciones inalámbricas usando señales de radiofrecuencia, señales magnéticas y similares. Como se ha analizado anteriormente respecto de la Fig. 16, se puede implantar opcionalmente el sensor 1812 para proporcionar retroalimentación a la unidad de control 1802.

Algunas realizaciones de la presente invención pueden ser útiles en el cribado de fármacos. Las diferentes proteínas sensibles a la luz, que sirven para regular la tensión de la membrana usando interruptores de iones que, cuando se activan (o desactivan) en respuesta a la luz, funcionan como canales o bombas y se denominan en lo sucesivo como interruptores sensibles a la luz o interruptores del potencial de membrana sensibles a la luz (LAMPS).

Consistente con una realización ilustrativa de la presente divulgación, un sistema criba compuestos que alteran las bombas de iones y los canales de iones. El sistema introduce uno o más fármacos candidatos que podrían tanto bloquear como potenciar la actividad de los canales de iones o bombas de iones en las células que se convirtieron en ópticamente sensibles mediante la adición de una combinación de las proteínas anteriormente mencionadas (ChR2, DChR y NpHR entre otras), con el fin de cribar los fármacos candidatos. La luz dispara los canales de iones ópticamente sensibles de las células produciendo un cambio en la tensión observada a través de la membrana celular. El cambio en la tensión estimula los canales de iones controlados por tensión de las células que, a continuación, producirán un cambio en las concentraciones de los iones que se puede leer como una salida óptica. Estas señales ópticas se detectan y se utilizan para determinar qué efecto, en caso de haberlo, tienen los fármacos candidatos sobre los canales de iones controlados por tensión. En una realización más específica, una proteína que expresa una bomba de protones se introduce en una célula.

En un caso, es sistema permite cribar diferentes fármacos candidatos sin necesidad una extensa configuración entre las cribas. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un ensayo usando óptica, tanto para estimular las células sensibles ópticamente como para detectar la eficacia del fármaco. El uso de óptica en lugar de contactos manuales, *por*

ejemplo, usando una técnica de fijación de membrana celular completa, puede ser especialmente útil para aumentar el rendimiento del proceso del ensayo de cribado. Por ejemplo, el tiempo entre cribados se puede reducir minimizando o eliminando las manipulaciones físicas, por otra parte necesarias para estimular o detectar el flujo de iones en las células diana. Las células también se pueden preparar antes del proceso de cribado porque el equipo de ensayo solamente debe estar ópticamente acoplado a las células preparadas. En otro caso, el rendimiento se puede aumentar cribando numerosos fármacos diferentes simultáneamente usando, por ejemplo, una matriz de fotodetectores y una matriz correspondiente de células modificadas expuestas a diferentes fármacos.

Un enfoque basado en líneas de células no está limitado a un canal de iones en particular. Por ejemplo, se pueden crear líneas de células dependientes del voltaje de sodio (por ejemplo, Na_v1.1 hasta Na_v1.9), potasio (por ejemplo, K_v tales como hERG, TASK1, Shaker, o KvLQT1), o canales/bombas conductores de cloro (por ejemplo, miembros de la familia CLC de canales del cloruro). Los métodos para introducir dichos genes en la línea de células son conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo transfección liposómica, o transferencia de genes víricos. Para obtener más información a este respecto, se puede hacer referencia a una o más de las siguientes referencias:

- Warren Pear, Transient Transfection Methods for Preparation of High-Titer Retroviral Supernatants, Suplemento 68, Current Protocols in Molecular Biology, 9.11.1-9.11.18, John Wiley & Sons, Inc. (1996).
- R.E. Kingston, C.A. Chen, H. Okayama, y J.K. Rose, Transfection of DNA into Eukarotic Cells. Suplemento 63, Current Protocols in Molecular Biology, 9.1.1-9.1.11, John Wiley & Sons, Inc. (1996).
- R. Mortensen, J.D. Chesnut, J.P. Hoeffler, y R.E. Kingston, Selection of Transfected Mammalian Cells, Suplemento 62, Current Protocols in Molecular Biology, 9.5.1-09.5.19, John Wiley & Sons, Inc. (1997).
- H. Potter, Transfection by Electroporation, Suplemento 62, Current Protocols in Molecular Biology, 9.3.1-9.3.6, John Wiley & Sons, Inc. (1996).
- T. Gulick, Transfection using DEAE-Dextran, Suplemento 40, Current Protocols in Molecular Biology, 9.2.1-9.2.10, John Wiley & Sons, Inc. (1997).
- R.E. Kingston, C.A. Chen, H. Okayama, Transfection and Expression of Cloned DNA, Suplemento 31, Current Protocols in Immunology (CPI), 10.13.1-10.13.9, John Wiley & Sons, Inc.

Estos y otros vectores de transferencia se pueden generar utilizando diferentes técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, los vectores de transferencia se pueden derivar de un provirus clon de un retrovirus, tal como un virus de la inmunodeficiencia (por ejemplo, VIH-1 o VIH-2, o VIS). Para detalles adicionales sobre el uso de células 293T y la transfección de las mismas, se puede hacer referencia a la patente de Estados Unidos n.º 6.790.657 (titulada, *Lentivirus Vector System*, de Arya).

En una realización de la divulgación, la estimulación óptica de las células modificadas se puede alterar para determinar las propiedades específicas de un fármaco candidato introducido. Por ejemplo, la intensidad del estímulo óptico se puede modificar para alterar el correspondiente nivel de despolarización. El nivel de despolarización deseado se puede ajustar para caracterizar adicionalmente la eficacia del fármaco en ensayo. En otro ejemplo, el estímulo óptico puede incluir el pulso rápido de la luz. Mediante la correlación de la relación temporal entre el estímulo óptico y la fluorescencia resultante detectada, el fármaco se puede caracterizar adicionalmente en lo respecta a su respuesta cinética. Por tanto, el fármaco se puede caracterizar para varios aspectos diferentes, que incluyen, aunque no de forma limitativa, el efecto en estado estacionario de las concentraciones de iones, un cambio en el nivel de despolarización necesario para disparar los canales de iones dependientes de la tensión, y el efecto de la despolarización repetida.

En una realización, el sistema permite la calibración simple del estímulo óptico y/o su detección. Las células modificadas se puede estimular ópticamente antes de la introducción del fármaco candidato. La sensibilidad del canal de iones se detecta y se registra. Los valores registrados se pueden utilizar como valor de referencia para su comparación con la sensibilidad del canal de iones de las mismas células modificadas después de la introducción del fármaco en estudio. Los valores registrados también se pueden utilizar para modificar el estímulo óptico o la sensibilidad del detector óptico. Dichas modificaciones se pueden aplicar a una muestra de ensayo individual o a una matriz de muestras de ensayo. Para dicha matriz de muestras de ensayo, cada muestra de ensayo se puede calibrar individualmente ajustando el correspondiente estímulo óptico. De forma análoga, cada correspondiente fotodetector se puede ajustar individualmente.

La Fig. 18A muestra un diagrama de bloques básico de un sistema para cribar fármacos que afectan los canales de iones, de acuerdo con una realización de la divulgación. El control óptico 1904 se comunica con la base de datos 1902, la fuente óptica 1906 y el detector óptico 1909. La fuente óptica 1906 proporciona estímulo óptico a la muestra de ensayo 1908. La muestra de ensayo 1908 incluye el fármaco en estudio, las células con canales de iones ópticamente sensibles, y un indicador de tensión/ion. En un caso, el indicador fluoresce en respuesta a la luz procedente de la fuente óptica 1906. El control óptico 1904 también puede incluir una lectura reconfigurable, de forma que, como se utilizan diferentes LAMPS y diferentes LEIA, el mismo sistema de control se puede adaptar fácilmente a cada paradigma. El detector óptico 1909 produce una señal sensible a dicha fluorescencia, y el control óptico 1904 recibe la señal producida. El control óptico 1904 almacena los datos obtenidos de la señal en la base de datos 1902. La información almacenada puede incluir factores tales como la intensidad, duración y longitud de onda de la luz detectada. En un caso particular, los datos almacenados se puede comparar con los datos de los valores

de referencia, donde los datos de referencia corresponden a los datos registrados antes de la introducción del fármaco en la muestra de ensayo 1908. En otro caso, la fuente óptica 1906 puede variar en intensidad, duración, u otros parámetros relacionados con el control de la fuente óptica 1906. Estos y otros parámetros se pueden almacenar en la base de datos 1902.

5 Será evidente que la fuente óptica 1906 se puede implementar usando una sola fuente de luz, tal como un diodo emisor de luz (LED), o mediante el uso de varias fuentes de luz. De forma análoga, el detector óptico 1909 puede usar uno o más detectores y la base de datos 1902 puede implementarse usando cualquier número de dispositivos de almacenamiento adecuados.

10 La Fig. 18B muestra una diagrama de sistema de un sistema de gran formato casi automatizado para el cribado de fármacos de acuerdo con una realización específica de la divulgación. El dispositivo de control 1901 (por ejemplo, un ordenador o lógica de control) controla varios procesos, y sirve como punto central de las funciones de entrada/salida del sistema. El entorno se puede mantener a una temperatura, humedad, nivel de dióxido de carbono y nivel de luz ambiental adecuados entre las paredes de una cámara 1905 de control climático, con la ayuda de uno o más sensores 1914 (por ejemplo, termostato, sensor de dióxido de carbono y sensor de humedad), dióxido de carbono y aparato humidificador 1912, y calentador 1910. La placa multipocillo 1941 contiene pocillos de ensayo 1940 para mantener células cultivadas, fármacos, y otros ingredientes necesarios para cada ensayo. La placa 1941 descansa sobre una mesa X-Y-Z 1925, cuyo movimiento se lleva a cabo mediante los accionadores de la mesa 1920, bajo el control del ordenador 1901. Una lámpara de xenón 1955 emite luz blanca 1956 de alta intensidad, que se pasa por el filtro de color 1960. En el caso de usar DChR para estimular las células dentro de los pocillos 1940, el filtro de color 1960 es azul, haciendo que luz azul 1961 salga del filtro, e incida sobre el espejo dicróico 1970. La luz azul 1961 a continuación viaja hacia arriba, a través de las lentes de objetivo del microscopio del aparato 1930, y a través del fondo de la placa transparente 1941. De esta forma, el contenido de los pocillos 1940, con sus fondos transparentes, queda iluminado. Cuando se necesita una longitud de onda de luz individual para estimular un indicador de la actividad celular emisor de luz fluorescente, un filtro de la especificación adecuada se puede sustituir por el filtro anterior 160, haciendo que la luz con la longitud de onda adecuada para esta última tarea se conduzca a través del pocillo 1940. Si las células dentro del pocillo 1940 se han sensibilizado a la luz, y si el fármaco a ensayar en cada uno de estos pocillos no suprimir el proceso, un indicador de la actividad celular emisor de luz (LEIA), que también se ha añadido a cada pocillo o se expresa en las células mediante una modificación genética, emitirá luz de acuerdo con el cambio de tensión ocasionado por el efecto de la luz. Esta segunda longitud de onda de la luz, que puede ser mucho más pequeña, en magnitud, que la luz de estímulo, se recoge mediante la torreta 1935 del microscopio, y también se pasará a través del espejo dicróico 1975, sobre la lente de la cámara (CCD) 1980.

35 El espejo dicróico 1970 permite la reflexión hacia arriba tanto de la longitud de onda necesaria para estimular la sincronización óptica de la membrana (por ejemplo, azul-verde para DChR), y la longitud de onda necesaria para cualquier LEIA usado (por ejemplo, ultravioleta para FURA-2). Este espejo dicróico puede configurarse para permitir el paso del espectro de salida del LEIA (por ejemplo, azul-verde para FURA-2) con una reflexión o absorción mínimas.

40 La Fig. 19 es un diagrama de sistema de un sistema de cribado de fármacos automatizado, de acuerdo con una realización ilustrativa de la divulgación. Las unidades 2050 del emisor/detector configuran la matriz 2051 de emisores/detectores. La matriz 2051 de emisores/detectores se corresponde con el número, tamaño, y disposición de los pocillos de la placa 2040. El dispositivo 2025 de sujeción de la placa permite que el mecanismo 2020 de cambio de la placa mueva rápidamente una placa a su sitio una vez que se ha completado el ensayo de una placa dada. El proceso completo puede ser automático, y bajo el control del dispositivo 2001. El dispositivo 2001 se puede implementar mediante un ordenador, lógica de control, matrices lógicas programables, lógica discreta y similares. La introducción de los fármacos candidatos en ensayo también se puede automatizar usando una máquina que proporciona un depósito para almacenar los fármacos y una boquilla de dispensación para inyectar los fármacos en la placa. De una manera similar a la mostrada en la Fig. 18, el entorno entre las paredes de la cámara 2005 de control climático se puede mantener a una temperatura, humedad, nivel de dióxido de carbono y nivel de luz ambiental adecuados, con la ayuda del termostato, sensor de dióxido de carbono y sensor de humedad 2014, dióxido de carbono y aparato humidificador 2012, y calentador 2010. El uso de múltiples elementos estimuladores/detectores simultáneamente y en paralelo, puede ser especialmente útil para aumentar la velocidad del proceso global. Se pueden usar elementos de bajo coste para fabricar múltiples detectores paralelos (por ejemplo, los componentes detallados a continuación en la descripción de la Fig. 20A y 20B); las múltiples unidades de emisores/detectores también pueden ser bastante económicamente viables.

60 La Fig. 20A representa gráficamente el funcionamiento de unidades de emisión/detección, tal como las mostradas en la Fig. 19, de acuerdo con una realización ilustrativa de la divulgación. Un LED estimula los canales de iones sensibles a la luz de células situadas dentro de un pocillo, y un fotodiodo detecta la respuesta de un LEIA. En esta realización, el dispositivo 2101 incluye el LED 2110, que produce pulsos de luz 2111, con la adecuada longitud de onda, frecuencia de pulsos e intensidad, de forma que se estimulen las células transgénicas 2105 sensibles a la luz cultivadas dentro del pocillo 2106. Debido a la presencia de un LEIA (por ejemplo, un colorante sensible a la tensión o un colorante de calcio), la luz 2116 se devuelve desde las células 2105, y se detecta con el fotodiodo 2115. Si se utiliza RH 1691, la luz roja fluoresce y se detecta con el fotodiodo 2115. En ausencia de despolarización

celular, el fotodiodo 2115 no detecta fluorescencia. También se pueden usar otras tecnologías detectoras de luz en lugar de un fotodiodo incluidos fototransistores, y elementos CCD.

La combinación de la fotoestimulación con las técnicas de adquisición de imágenes ópticas de los LEIA puede ser útil por numerosas razones diferentes. Por ejemplo, la fotoestimulación puede simplificar el estudio de células excitables reduciendo la necesidad de utilizar electrodos mecánicos para la estimulación. Algunos LEIA comercialmente disponibles son adecuados para indicar fotogramétricamente la activación de las células excitables eléctricamente. Uno de estos LEIA es el colorante de calcio Fura-2, que se puede estimular con luz violeta/ultravioleta a aproximadamente 340 nm, y cuya salida fluorescente se detecta como una luz de color azul-verde de aproximadamente 535 nm. Otro ejemplo es el colorante sensible a tensión RH 1691, que se puede estimular con luz verde a aproximadamente 550 nm, y cuya salida fluorescente se detecta como una luz de color rojo a aproximadamente 70 nm. Otro ejemplo es el colorante sensible a tensión di-4-ANEPPS, que se estimula con luz azul a aproximadamente 560 nm, y cuya salida fluorescente se detecta como una luz de color rojo a aproximadamente 640 nm.

La Fig. 20A representa gráficamente el funcionamiento de otra realización de las unidades de emisión/detección mostradas en la Fig. 19, en la que se estudian múltiples efectos en el contexto de un único pocillo. Por ejemplo, las células 2155 en los pocillos 2156 pueden expresar GtR3 y VChR1 a la vez y, por tanto, son sensibles tanto a los efectos de hiperpolarización de la luz azul, y a los efectos de despolarización de la luz ámbar. El dispositivo 2151 incluye el LED 2160, que se utiliza para la estimulación de la bomba de protones diana (por ejemplo, GtR3) de células transgénicas 2155 sensibles a la luz. Se puede usar un LED 2175 adicional para estimular un segundo canal de iones o bomba de iones diana (por ejemplo, VChR1). Otro LED 2180 más se puede usar para estimular un colorante sensible a la tensión (por ejemplo, RH1691 o un colorante de calcio, tal como Fura-2). Cada LED se puede disponer para emitir longitudes de onda e intensidades específicas para estimular los correspondientes compuestos diana. En un caso, un LED puede afectar a más de una diana, dependiendo de las sensibilidades específicas de cada compuesto utilizado. El fotodiodo 2165 detecta la fluorescencia de un colorante de tensión seleccionado, mientras que el fotodiodo 2170 es sensible al espectro de fluorescencia emitido por un colorante del calcio seleccionado. El uso de múltiples LED para la misma célula permite la estimulación de los LEIA a diferentes longitudes de onda. También se pueden usar múltiples LED para detectar diferentes longitudes de onda de la luz emitida por el LEIA.

La Fig. 21B representa gráficamente un mecanismo de circuito electrónico para activar los emisores LED usados dentro de las unidades de emisión/detección, de acuerdo con una realización ilustrativa de la divulgación. El dispositivo de control 2201 genera una "señal de encendido" 2202 en el transistor base 2205. Esta señal de encendido 2202 permanecerá activada durante la duración del destello de luz deseado, o de forma alternativa, se puede encender y apagar para producir destellos de luz rítmicos con una frecuencia determinada. La señal de encendido 2202 permite (convencional) que la corriente fluya desde la fuentes de alimentación 2210, a través de la resistencia 2211, y a través del colector 2207 del transistor y el emisor 2212 del transistor, a la tierra 2213. También se permite en lo anterior que la corriente pase por la resistencia 2215, y al LED 2220. El LED 2220 emite luz 2221, que cae dentro del pocillo 2225. En un caso particular, el transistor funciona como un amplificador de la señal 2202 mediante transconductancia. De este modo, la luz de la longitud de onda, intensidad y frecuencia adecuadas se suministra a las células del pocillo 2225, de forma que provoque el estímulo del canal en particular (por ejemplo, DChR) o la bomba (por ejemplo, GtR3), u otra estructura de membrana fotoactiva que se utilice para regular la actividad de las células excitables eléctricamente. También son posibles otros circuitos diferentes. Por ejemplo, se pueden usar otros circuitos en lugar del circuito 2206 para controlar el LED 2220 incluidos, aunque no de forma limitativa, sustituir el transistor por un amplificador operativo, un transistor de efecto campo, una red de divisores por resistencia, lógica transistor-transistor, circuitos de control tipo *push-pull* e interruptores.

La Fig. 21B representa gráficamente un mecanismo de circuito electrónico ilustrativo para la detección de luz mediante las unidades de emisión/detección, de acuerdo con una realización de la divulgación. El dispositivo de control 2250 puede (opcionalmente, dependiendo de la implementación específica) proporcionar alimentación al fotodiodo 2255. El fotodiodo 2255 recibe la luz fluorescente 2256 (emitida) desde el LEIA en las células del pocillo 2257. La luz recibida da como resultado una señal de salida. Esta salida pasa por la resistencia 2260, y se introduce en el inversor 2270 hex disparado por Schmitt, que condiciona la señal, proporcionando un valor limpio "alto" o "bajo" a introducir en el ordenador 2250.

El funcionamiento del fotodetector se muestra en modo fotovoltaico, pero el elemento también se puede utilizar en el modo de funcionamiento fotoconductor. Por supuesto, también se pueden usar otros muchos dispositivos y métodos de detección de luz, incluidos fototransistores, fototristores, y dispositivos de carga acoplada (CCD), o matrices de elementos.

Como alternativa, el circuito de la Fig. 21B se puede usar sin el inversor 2270 hex disparado por Schmitt, lo que permite un continuo de intensidades de señal a transmitir directamente a una entrada analógica del ordenador 2250 o a un convertidor analógico-digital. También son posibles otros circuitos de condicionamiento de la señal.

La Fig. 22 muestra una secuencia de etapas que utilizan la realización que se muestra en las Figs. 19, 20 y 21, en el

- contexto de un curso temporal 2300 proyectado para un proceso de alto rendimiento y de acuerdo con una realización de la divulgación. En la etapa 2305, luz con la longitud de onda e intensidad adecuadas para el canal de iones diana se hace parpadear -en este caso, durante aproximadamente tres segundos. En paralelo, se puede disparar opcionalmente un destello 2310 para estimular LEIA, dependiendo de la tensión o colorante de calcio
- 5 específicos, etc. utilizados. Este compuesto LEIA puede haberse añadido anteriormente al pocillo, o se pueden transmitir genéticamente (artificialmente) a las células de forma que la sustancia química se produce/expresa mediante las células. En la etapa 2315, la señal luminosa producida por el LEIA se detecta con el elemento fotodetector (por ejemplo, fotodiodo). Por ejemplo, RH1691, fluoresce como luz roja a aproximadamente 70 nm.
- 10 En la etapa 2320, la señal resultante de la incidencia de la luz sobre el elemento fotodetector se devuelve al ordenador. Esto puede ser binario (por ejemplo, una intensidad de señal "alta" versus "baja"), o se puede graduar para reflejar un continuo de niveles de activación. En el caso de usar múltiples fotodetectores para determinar energías a diferentes longitudes de onda, las lecturas individuales de estos fotodetectores se pueden registrar en paralelo o en secuencia para una interpretación apropiada en una etapa posterior del proceso automatizado.
- 15 En la etapa 2330, el sistema pide que el sistema automático coloque la siguiente placa. La siguiente placa se desplaza hasta su posición en la etapa 2335 y el proceso se puede repetir hasta que todas las placas del lote se hayan procesado.
- 20 La cantidad de tiempo asignado para administrar la luz puede variar, y depende de factores entre los que se incluyen el nivel de expresión de protones o de canal/bomba de iones controlada por luz, así como la densidad y las características de otros canales de protones iónicos y las características de dicha población celular. La cantidad de tiempo asignado para recibir la luz puede variar, y depende de factores entre los que se incluyen el grado de precisión deseado para la sesión de cribado. La cantidad de tiempo asignado para cambiar la placa de pocillos (bandeja) puede variar, y depende de factores entre los que se incluyen la velocidad mecánica del aparato
- 25 automatizado. Si se utilizan neuronas rápidas como las células del ensayo, los procesos de estimulación celular y detección de LEIA se pueden realizar en milisegundos.
- El proceso anterior se puede repetir en condiciones variables. Por ejemplo, un conjunto dado de células se puede someter a ensayo sin fármaco presente, y posteriormente, con uno o más fármacos presentes. La respuesta de las
- 30 células excitables eléctricamente en estas condiciones se puede documentar de esta forma, compararse y estudiarse. Si la divulgación se implementa con al menos un emisor/detector para pocillo de una bandeja y al menos dos equipos funcionamiento en paralelo, se puede el funcionamiento continuo durante un periodo de tiempo prolongado.
- 35 La Fig. 23 ilustra un ejemplo de una disposición de muestras de células y fármacos dentro de los pocillos de una placa de pocillos, que es adecuada para su uso en una realización de la divulgación. En esta figura, la placa de pocillos 2401 (también denominada en el presente documento como "bandeja" contiene los pocillos 2405 (ejemplos), que están organizados en columnas 2425, marcadas con números 1-12 y filas 2420, marcadas con las letras A-H. De forma más específica, una columna y fila ilustrativa se definen por 2410 y 2415 respectivamente.
- 40 Como ejemplo de una disposición funcional del contenido introducido en estos pocillos, las filas A-H de una sola placa se podrían utilizar para someter a ensayo dos fármacos diferentes. Para representar una condición inicial de referencia, la columna 1 podría contener células clasificadas ópticamente, un LEIA endógeno o exógeno, pero no fármaco. Las columnas 2-6 se podrían usar para cinco concentraciones diferentes del Fármaco X, un nivel de concentración por columna. Del mismo modo, las columnas 7-11 se podrían usar para cinco concentraciones diferentes del Fármaco Y, una concentración por columna. La columna 12, aunque totalmente útil, se deja sin usar en este ejemplo concreto.
- 45 Las variables de los diferentes pocillos deberían incluir el tipo de célula sometida a ensayo, el tipo de canal de iones que se estudia, el tipo de fármaco introducido en la célula, la concentración del fármaco introducida en el pocillo, el LEIA específico utilizado, y los parámetros de estimulación de la clasificación óptica (por ejemplo, longitud de onda, intensidad, frecuencia, duración) aplicada a las células de dicho pocillo.
- 50 La Fig. 24 ilustra el contexto en el que los productos divulgados se pueden utilizar dentro de un sistema más grande que facilita el cribado de fármacos de alto rendimiento. La placa 2506 de pocillos contiene los pocillos 2505. Esta se arrastra mediante el transportador 2520, que puede ser un dispositivo tal como una cinta transportadora, transportador robótico, u otro mecanismo de suministro. Las pipetas 2510 se mantienen en una matriz mediante el elemento robótico 2515, y sirven para inyectar el número adecuado de células cultivadas y de medio en los pocillos 2505. Posteriormente, la placa 2506 de pocillos se hace avanzar mediante el transportador 2520, donde el elemento robótico 2525, análogo al elemento robótico 2515 y que también contiene pipetas, inyecta la cantidad adecuada de un LEIA en los pocillos 2505. El transportador 2520 leva entonces la placa 2505 de pocillos a la cámara de cribado 2530. Un aparato de emisión/detección, como los descritos respecto a la Fig. 17, la Fig. 18A, la Fig. 18B, la Fig. 19A, y la Fig. 19B, se encuentra en el interior de la cámara 2530. Además, las porciones de los procesos descritos en la Fig. 20A y la Fig. 20B pueden tener lugar dentro de esta cámara. Posteriormente, la placa 2535 de pocillos se saca de la cámara de cribado 2530 mediante el transportador 2540, y se desecha en 2545. En una realización alternativa, uno o más dispositivos robóticos puede desplazar pipetas 2510, cámara de cribado 2530, etc. a las ubicaciones de
- 60
- 65

la placa 2506 de pocillos, el lugar de lo contrario.

Consistente con el análisis anterior, los métodos ilustrativos de cribado podrían incluir la recogida de múltiples puntos de datos sin tener que cambiar las muestras. Puesto que el control de las muestras es reversible en la misma preparación de muestras simplemente encendiendo y apagando la luz de activación con persianas rápidas, las mismas muestras se pueden reutilizar. Además, se puede proporcionar una gama de patrones de estimulación a la misma muestra de células de forma que el ensayo se pueda realizar para determinar el efecto de los fármacos sin preocupaciones relativas a las diferentes preparaciones de muestras. Al modular el nivel de excitación (por ejemplo, aumentando el nivel desde nada de luz hasta una intensidad elevada o máxima), se puede estudiar el efecto de un fármaco para una gama de potenciales de membrana. Esto permite identificar fármacos que son eficaces durante potenciales de membrana hiperpolarizados, naturales o despolarizados.

Las líneas celulares descritas en el presente documento pueden ser especialmente útiles para una caracterización detallada de los fármacos candidatos con alto rendimiento. El control óptico es relativamente rápido, permitiendo de esta forma el ensayo de la actividad del fármaco con más formas de activación fisiológica. Por ejemplo, se puede usar diferentes frecuencias de despolarización y/o hiperpolarización para determinar la forma en la que un fármaco interactúa con el canal según formas fisiológicas de actividad neural. En algunos casos, el proceso se puede llevar a cabo sin la aplicación de caros colorantes químicos a las líneas de células.

Junto con las diferentes propiedades descritas en el presente documento, el uso de diversas realizaciones de la invención puede ser especialmente útiles para mejorar el rendimiento del cribado al eliminar la necesidad de la compleja manipulación mecánica y la manipulación de líquidos. Diversas realizaciones también pueden ser útiles para repetir el ensayo de cribado usando las mismas muestras, reduciendo los costes del cribado al eliminar la necesidad de informes de fluorescencia dependiente de sustancias químicas, produciendo una elevada precisión temporal y pocos artefactos de señal (debido a la naturaleza óptica de la manipulación de la tensión), modulando el nivel de despolarización atenuando la intensidad de la luz utilizada para la estimulación, y dilucidando la cinética de la modulación del fármaco sobre el canal de iones mediante el uso de patrones de luz intermitentes.

La existencia de múltiples proteínas de excitación y de proteínas de inhibición que se pueden controlar independientemente abre la puerta a varias aplicaciones entre las que se incluyen, aunque no de forma limitativa, aplicaciones para el tratamiento de varios trastornos y el uso de proteínas sensibles a la luz que se pueden seleccionar para responder a una pluralidad de las respectivas longitudes de onda ópticas. Aunque no siempre se declara expresamente, la inhibición se puede usar junto con, además de, o en lugar de excitación en las aplicaciones. La familia de proteínas monocomponentes ha mostrado responder a múltiples longitudes de onda e intensidades de la luz. Los aspectos de la divulgación permiten mutaciones y/o búsquedas adicionales de secuencias que permitan longitudes de onda óptica y/o canales de proteínas controlables de forma individual. Las variaciones del estímulo óptico (por ejemplo, una longitud de onda, intensidad o perfil de duración) también pueden ser de utilidad. Por ejemplo, los perfiles de estimulación pueden aprovechar solapamientos en las longitudes de onda de excitación de dos proteínas de canales de iones diferentes para permitir la excitación de ambas proteínas al mismo tiempo. En uno de estos casos, las proteínas pueden tener diferentes niveles de responsabilidad. Por tanto, en una aplicación neural, un conjunto de canales de iones puede producir espigas con un porcentaje de éxito diferente con respecto a un segundo conjunto de canales de iones. De forma análoga, los solapamientos en las longitudes de onda de inhibición de dos canales de iones (o bombas) diferentes permite la inhibición de ambas proteínas al mismo tiempo. Como alternativa, se pueden usar múltiples fuentes de luz que permitan estimular las proteínas sensibles a la luz en la combinación deseada, dejando al mismo tiempo otras proteínas sin estimular.

Muchas aplicaciones en seres humanos de la presente divulgación necesitan autorización gubernamental antes de su uso. Por ejemplo, el uso de la terapia génica en seres humanos puede requerir dicha autorización. Sin embargo, las terapias génicas similares en neuronas (células no proliferativas que no son susceptibles a neoplasias) están avanzando rápidamente, con ensayos clínicos activos autorizados por la FDA ya en curso que implican la administración de genes víricos a cerebros humanos. Es probable que esto facilite el uso de diversas realizaciones de la presente divulgación en una gran variedad de aplicaciones. Se indica a continuación una lista no exhaustiva de unos pocos ejemplos de dichas aplicaciones y realizaciones.

La adicción está asociada con diversas funciones cerebrales, incluidas la recompensa y la expectativa. Además, la causa principal de la adicción puede variar entre individuos. De acuerdo con una realización, la adicción, por ejemplo, la adicción a la nicotina, se puede tratar con una estabilización optogenética de pequeñas áreas de la ínsula. Opcionalmente, la obtención de imágenes cerebrales funcionales, por ejemplo PET de estado complementado, o IRMf, se pueden usar para localizar un foco hipermetabólico para determinar un punto diana preciso para la intervención sobre la superficie de la ínsula.

La excitación optogenética del núcleo accumbens y el tabique puede proporcionar recompensa y placer a un paciente sin necesidad de recurrir al uso de sustancias, y por tanto puede ser una clave para el tratamiento de adicciones. A la inversa, la estabilización optogenética del núcleo accumbens y el tabique se pueden usar para disminuir el síndrome de abstinencia. En una realización alternativa, la estabilización optogenética de la actividad hipermetabólica observada en la flexura de la cápsula interna del cingulado anterior (BA32) se puede usar para

disminuir el síndrome de abstinencia. La estabilización optogenética de las células que se encuentran dentro del núcleo arqueado del hipotálamo medio que contiene los productos peptídicos de la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulador de la cocaína y anfetamina (CART) también se pueden utilizar para disminuir el comportamiento de drogodependencia. Para obtener más información a este respecto, se puede hacer referencia a:

5 Naqvi NH, Rudrauf D, Damasio H, Bechara A. "Damage to the insula disrupts addiction to cigarette smoking." Science. 26 Ene 2007; 315(5811):531-534.

La estimulación optogenética de las neuronas endocrinas del núcleo hipotalámico periventricular que segregan somatostatina se puede usar para inhibir la secreción de la hormona del crecimiento desde la pituitaria anterior, por ejemplo en la acromegalia. La estabilización optogenética de las neuronas neuroendocrinas que segregan somatostatina o la hormona del crecimiento se puede utilizar para aumentar el crecimiento y desarrollo físico. Entre los cambios que acompañan el envejecimiento "normal", se produce un agudo declive en los niveles de hormona del crecimiento después de la 4ª y 5ª décadas. Por consiguiente, el deterioro físico asociado con el envejecimiento puede disminuirse mediante la estabilización optogenética del núcleo periventricular.

La estabilización optogenética del núcleo ventromedial del hipotálamo, especialmente la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulador de la cocaína y anfetamina (CART) del núcleo arqueado, se pueden usar para aumentar el apetito, y de esta forma, para tratar la anorexia nerviosa. Como alternativa, la estimulación optogenética del núcleo lateral del hipotálamo se puede usar para aumentar el apetito y la conducta de alimentación.

La excitación optogenética de las células colinérgicas de las áreas afectadas incluidos el lóbulo temporal, el NBM (núcleo basal de Meynert) y el giro cingulado posterior (BA 31) proporciona estimulación, y de esta forma, impulsan la neurotrofia hacia las áreas deterioradas. Puesto que las áreas afectadas están diseminadas por el cerebro, un tratamiento análogo con electrodos implantados puede ser menos factibles que un enfoque optogenético.

Los trastornos de ansiedad suelen estar asociados con un aumento de actividad en la corteza temporal izquierda y frontal, así como en la amígdala, que tienen a volver a la normalidad cuando la ansiedad se resuelve. En consecuencia, las regiones temporal izquierda y frontal, así como la amígdala, afectadas se pueden tratar con la estabilización optogenética, de forma que se amortigüe la actividad en dichas regiones.

En la fisiología normal, las células neurales fotosensibles de la retina, que se despolarizan en respuesta a la luz que reciben, crean un mapa visual del patrón de luz recibida. Se pueden usar canales de iones optogenéticos para imitar este proceso en muchas partes del cuerpo, y los ojos no son una excepción. En el caso de alteración visual o ceguera debido a daños en la retina, se puede hacer crecer una nueva retina funcional, que utiliza la luz ambiental natural en lugar de patrones de luz parpadeante procedente de un dispositivo implantado. La retina artificial crecida se puede poner en lugar de la retina original (donde puede aprovechar el nervio óptico que sirve como conducto de retorno a la corteza visual). Como alternativa, la retina artificial se puede colocar en otro sitio, tal como la frente, siempre que un conducto transmita las señales de despolarización al tejido cortical capaz de descifrar la información codificada procedente de la matriz de sensores optogenéticos. La ceguera cortical también se podría tratar simulando las rutas visuales posteriores de la corteza visual. La estimulación se basaría en los datos visuales producidos que llegan hasta la corteza visual o mediante un sensor de luz artificial.

El tratamiento de la taquicardia se puede llevar a cabo mediante la estimulación optogenética de las fibras del sistema nervioso parasimpático incluidas el CN X o el nervio vago. Esto produce una disminución en la tasa del ganglio NA, disminuyendo de este modo la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción. De forma análoga, la estabilización optogenética de las fibras del sistema nervioso simpático incluido en los nervios espinales de T1 a T4, sirve para ralentizar el corazón. Para el tratamiento de la bradicardia patológica, la estabilización optogenética del nervio vago, o la estimulación optogenética de las fibras simpáticas de T1 a T4 servirá para aumentar la frecuencia cardíaca. Las disritmias cardíacas resultado de focos eléctricos anómalos que desestabilizan en ganglio sinoauricular se pueden suprimir tratando los focos eléctricos anómalos con una estabilización optogenética moderada. Esto disminuye la tasa intrínseca de disparos dentro del tejido tratado, y permite que el ganglio sinoauricular recupere su papel de pautar el sistema eléctrico del corazón. De forma similar, se podría tratar cualquier tipo de arritmia cardíaca. La degeneración del tejido cardíaco que se produce en la cardiomiopatía o en la insuficiencia cardíaca congestiva también se podría tratar según la presente divulgación; el tejido restante se podría excitar usando diversas realizaciones de la divulgación.

La excitación optogenética de regiones del cerebro incluidos el lóbulo frontal, los lóbulos parietales y los hipocampos, puede aumentar la velocidad de procesamiento, mejorar la memoria, y estimular el crecimiento y la interconexión de las neuronas, incluido el posible desarrollo de células precursoras neurales. Como ejemplo, una aplicación de este tipo de la presente divulgación se dirige a la estimulación mediante excitación optogenética de neuronas diana del tálamo con el propósito de sacar un paciente de un estado casi vegetativo (poco consciente). El crecimiento de canales de iones controlados por luz en la membrana de neuronas del tálamo diana se altera. Estas neuronas modificadas posteriormente se estimulan (por ejemplo, mediante óptica que puede también acceder por el mismo punto de paso) dirigiendo un destello de luz de forma que module el funcionamiento de las neuronas diana y/o de las células circundantes. Para obtener más información relativa a las técnicas de modulación adecuadas (mediante un tratamiento con electrodos) o más información relativa a las regiones del cerebro asociadas para dichos

pacientes, se puede hacer referencia a: Schiff ND, Giacino JT, Kalmar K, Victor JD, Baker K, Gerber M, Fritz B, Eisenberg B, O'Connor JO, Kobylarz EJ, Farris S, Machado A, McCagg C, Plum F, Fins JJ, Rezai AR "Behavioral improvements with thalamic stimulation after severe traumatic brain injury," Nature, Vol. 448, 2 de agosto, 2007, pp. 600-604.

5 En una realización alternativa, la excitación optogenética se puede utilizar para tratar el músculo cardiaco debilitado en dolencias tales como la insuficiencia cardiaca congestiva. La ayuda eléctrica a un músculo cardiaco del CHF en fallo generalmente no es práctica, debido al frágil estado del tabique cardiaco adelgazado, y la dificultad de proporcionar un acoplamiento eléctrico uniformemente distribuido entre los electrodos y el músculo. Por este motivo, hasta el momento, los métodos preferidos para aumentar la contractilidad cardíaca han implicado bien métodos farmacológicos tales como los beta agonistas, y enfoques mecánicos tales como dispositivos de asistencia ventricular. En esta realización de la presente divulgación, la excitación optogenética se suministra al músculo cardiaco debilitado mediante elementos emisores de luz situados en la superficie interior de una camisa que rodea el corazón y de otra forma contra la pared cardiaca afectada. La luz se puede difundir por medios bien conocidos en la materia, para cubrir uniformemente grandes áreas del músculo, impulsando la contracción con cada pulso de luz.

La estabilización optogenética de la parte subgenual del giro cingulado (Cg25), la luz amarilla se puede aplicar con un dispositivo implantado. El objetivo sería tratar la depresión suprimiendo la actividad diana de una forma análoga a la que se enseña en Mayberg HS et al., "Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression," Neuron, Vol. 45, 651-660, 3 de marzo de 2005, pp. 651-660. En una realización alternativa, un método de estimulación por excitación optogenética es aumentar la actividad en dicha región de una forma análoga a la que se enseña en Schlaepfer et al., "Deep Brain stimulation to Reward Circuitry Alleviates Anhedonia in Refractory Major Depression," Neuropsychopharmacology 2007, pp. 1-10.

25 En otra realización adicional, la corteza prefrontal dorsolateral izquierda (LDPFC) es la diana de un método de estimulación por excitación optogenética. El pautado de LDLPFC a 5-20 Hz sirve para aumentar el nivel metabólico basal de esta estructura que, mediante los circuitos de conexión, sirve para disminuir la actividad de Cg 25, mejorando la depresión en el proceso. La supresión de la corteza prefrontal dorsolateral derecha cortex (RDLPFC) es también una estrategia de tratamiento eficaz contra la depresión. Esto se puede llevar a cabo mediante la estabilización optogenética del RDLPFC, o bien, la supresión también se puede realizar usando una estimulación por excitación optogenética, y enviar pulsos a baja velocidad (por ejemplo, 1 Hz o menos) mejorando la depresión en el proceso. La estimulación del nervio vago (ENV) se puede mejorar mediante un enfoque optogenético. El uso de la excitación optogenética se puede utilizar para estimular solamente los componentes del vago aferentes al cerebro, tales como los ganglios nodulares y el ganglio yugular. Los componentes eferentes del cerebro no recibirían estimulación, según este enfoque, lo que eliminaría algunos de los efectos secundarios de la ENV, incluida la incomodidad en la garganta, tos, dificultades para tragar y una voz ronca. En una realización alternativa, el hipocampo se puede excitar optogenéticamente, lo que conduce a un aumento en los brotes dendríticos y axonales, y el crecimiento global del hipocampo. Otras regiones cerebrales implicadas en la depresión que se podrían tratar usando la presente divulgación incluyen la amígdala, accumbens, corteza orbitofrontal y orbitomedial, hipocampo, corteza olfatoria, y proyecciones dopaminérgicas, serotoninérgicas y dopaminérgicas. Los enfoques optogenéticos se podrían utilizar para controlar la diseminación de la actividad entre estructuras como el hipocampo para controlar los síntomas depresivos.

45 Siempre que haya poblaciones viables de células alfa y beta en los islotes pancreáticos de Langerhans, los islotes pueden ser la diana de un tratamiento de la diabetes. Por ejemplo, cuando la glucosa sérica es elevada (según se determina manualmente o mediante un sistema de detección de la glucosa en circuito cerrado), se puede utilizar la excitación optogenética para producir la liberación de insulina desde las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, mientras que la estabilización optogenética se utiliza para evitar la liberación de glucagón desde las células alfa de los islotes de Langerhans del páncreas. A la inversa, cuando la glucosa en sangre es demasiado baja (según se determina manualmente o mediante un sistema de detección de la glucosa en circuito cerrado), se puede utilizar la excitación optogenética para detener la secreción de insulina desde las células beta, y se puede utilizar la excitación optogenética para aumentar la secreción de glucagón desde las células alfa.

55 Para el tratamiento de la epilepsia, la inactivación o bloqueo de la actividad epileptógena es algo factible mediante enfoques optogenéticos. La mayoría de pacientes de epilepsia tienen un patrón de actividad estereotipado de actividad extendida desde un foco epileptógeno. Se podría utilizar la estabilización optogenética para suprimir la actividad anómala antes de que se extienda o truncarla antes cuando está en curso. Como alternativa, la activación del tejido de excitación mediante una estimulación por excitación optogenética se podría administrar en una serie de patrones deliberadamente asíncronos para alterar la actividad convulsiva emergente. Otra alternativa implica la activación mediante estimulación con excitación optogenética de las neuronas GABAérgicas para proporcionar un resultado similar. Los relés talámicos pueden ser la diana de la estabilización optogenética desencadenada cuando se detecta un patrón anómalo en el EEG.

65 Otra realización implica el tratamiento de trastornos gastrointestinales. El sistema digestivo tiene su propio sistema nervioso semiautónomo que contiene neuronas sensoriales, neuronas motoras e interneuronas. Estas neuronas controlan el movimiento del tracto GI, y también estimulan células específicas del intestino para que liberen ácido,

enzimas digestivas, y hormonas incluidas gastrina, colecistoquinina y secretina. Los síndromes que incluyen la secreción inadecuada de cualquiera de estos productos celulares se pueden tratar mediante la estimulación optogenética de estos tipos de células productoras, o de las neuronas que estimulan su actividad. A la inversa, se puede utilizar la estabilización optogenética para tratar los síndromes en los que se crean cantidades excesivas de productos endocrinos y exocrinos. Los trastornos de motilidad intestinal reducida, que van desde el estreñimiento (especialmente en pacientes con lesión en la médula espinal) al megacolon se puede tratar mediante la excitación optogenética de las neuronas motoras de los intestinos. Los trastornos de hipermotilidad intestinal, incluidas algunas formas del síndrome del intestino irritable, se pueden tratar mediante estabilización optogenética de las neuronas que controlan la motilidad. Las obstrucciones de la salida gástrica neurogénicas se pueden tratar mediante estabilización optogenética de las neuronas y de la musculatura del píloro. Un enfoque alternativo a los síndromes de hipomotilidad sería proporcionar excitación optogenética a neuronas sensibles a la tensión en las paredes del intestino, aumentando la señal de que el intestino está lleno y que debe vaciarse.

Con este mismo paradigma, un enfoque para los síndromes de hipermotilidad del intestino sería proporcionar estabilización optogenética a las neuronas receptoras de la tensión del tracto Gi inferior, proporcionando de esta manera una "señal falsa" de que el intestino está vacío, y que no necesita vaciarse. En el caso de incontinencia fecal establecida, conseguir un control mejorado de los esfínteres interno y externo se puede preferir a la ralentización de la motilidad de todo el tracto. Durante los periodos de tiempo en los que el paciente debe retener las heces, la excitación optogenética del esfínter anal interno proporcionará la retención. La provisión de estimulación optogenética al esfínter externo se puede usar para proporcionar una continencia adicional. Cuando el paciente debe defecar, el esfínter anal interno, y después el esfínter anal externo, deben relajarse, bien pausando la estimulación optogenética, o bien añadiendo estabilización optogenética.

La pérdida de la audición conductiva se puede tratar mediante el uso de implantes cocleares ópticos. Una vez que la cóclea se ha preparado para la estimulación optogenética, se puede utilizar un implante coclear que emite luz discontinua. La pérdida de la audición sensorineural se puede tratar mediante la estimulación óptica de las dianas posteriores de la ruta auditiva.

Otra realización de la presente divulgación se dirige al tratamiento de los trastornos de la tensión arterial, tales como la hipertensión. Los barorreceptores y quimiorreceptores de regiones tales como la aorta (cuerpos aórticos y cuerpos paraaórticos) y las arterias carótidas ("cuerpos carótidos") participan en la regulación de la tensión arterial y la respiración enviando aferentes a través del nervio vago (CN X), y otras rutas hacia la médula y el puente troncoencefálico, especialmente el tracto solitario y el núcleo. La excitación optogenética de los cuerpos carótidos, cuerpos aórticos, cuerpos paraaórticos, se puede usar para enviar un mensaje falso de "hipertensión" al tracto solitario y el núcleo, haciendo que notifique que la tensión arterial debe reducirse. La excitación o estabilización optogenética directamente a partes adecuadas del tronco encefálico también se puede usar para disminuir la tensión arterial. La modalidad opuesta hace que el enfoque optogenético sirva como presor, aumentando la tensión arterial. También se puede conseguir un efecto similar mediante la excitación optogenética del nervio vago, o mediante la estabilización optogenética de las fibras del simpático incluidas en los nervios espinales de T1 a T4. En una realización alternativa, la hipertensión se puede tratar mediante la estabilización optogenética del corazón, que da como resultado una disminución de la salida cardiaca y una disminución de la tensión arterial. De acuerdo con otra realización, la estabilización optogenética de las células productoras de aldosterona incluidas en la corteza suprarrenal se puede usar para disminuir la tensión arterial. En otra realización alternativa adicional, la hipertensión se puede tratar mediante la estabilización optogenética de la musculatura vascular lisa. La luz de activación puede pasar por vía transcutánea al lecho vascular periférico.

Otra realización ilustrativa se dirige al tratamiento de trastornos en el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal. En el tratamiento del hipotiroidismo, la excitación optogenética de las neuronas neuroendocrinas parvocelulares, las neuronas en el núcleo paraventricular y el núcleo hipotalámico anterior se puede utilizar para aumentar la secreción de la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH). TRH, a su vez, estimula la hipófisis anterior para secretar TSH. A la inversa, el hipertiroidismo se puede tratar mediante la estabilización optogenética de las neuronas neuroendocrinas parvocelulares. Para el tratamiento de la insuficiencia suprarrenal, o enfermedad de Addison, la excitación optogenética de las neuronas neuroendocrinas parvocelulares del núcleo supraóptico y los núcleos paraventriculares se puede utilizar para aumentar la secreción de vasopresina, que, con la ayuda de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), estimula la hipófisis anterior para secretar ACTH. El síndrome de Cushing, causado frecuentemente por un exceso de secreción de ACTH, se puede tratar mediante la estabilización optogenética de las neuronas neuroendocrinas parvocelulares del núcleo supraóptico con la misma cadena de efectos fisiológicos que se ha descrito anteriormente. Las neuronas neuroendocrinas del núcleo arqueado producen dopamina, que inhibe la secreción de prolactina desde la hipófisis anterior. La hiperprolactinemia puede tratarse, por tanto, mediante excitación optogenética, mientras que la hipoprolactinemia puede tratarse mediante la estabilización optogenética de las neuronas neuroendocrinas del núcleo arqueado.

En el tratamiento de los estados hiperautónomos, por ejemplo trastornos de ansiedad, la estabilización optogenética de la médula suprarrenal se puede utilizar para reducir la salida de norepinefrina. De forma análoga, la estimulación optogenética de la médula suprarrenal se puede utilizar en personas que necesitan aportes adicionales de adrenalina, por ejemplo los que padecen asma grave, o trastornos que se manifiestan como somnolencia crónica.

- La estimulación optogenética de la corteza suprarrenal producirá la liberación de sustancias químicas entre las que se incluyen el cortisol, testosterona, y aldosterona. A diferencia de la médula suprarrenal, la corteza suprarrenal recibe sus instrucciones desde las hormonas neuroendocrinas secretadas desde la hipófisis y el hipotálamo, los pulmones, y los riñones. Independientemente, la corteza suprarrenal es adecuada para la estimulación optogenética.
- 5 La estimulación optogenética de las células productoras de cortisol de la corteza suprarrenal se puede utilizar para tratar la enfermedad de Addison. La estabilización optogenética de las células productoras de cortisol de la corteza suprarrenal se puede utilizar para tratar la enfermedad de Cushing. La estimulación optogenética de las células productoras de testosterona se puede utilizar para tratar trastornos de interés sexual en mujeres: La estabilización optogenética de esas mismas células se puede utilizar para reducir el vello facial en mujeres. La estabilización
- 10 optogenética de las células productoras de aldosterona incluidas en la corteza suprarrenal se puede usar para disminuir la tensión arterial. La excitación optogenética de las células productoras de aldosterona incluidas en la corteza suprarrenal se puede usar para aumentar la tensión arterial.
- La excitación optogenética de regiones alteradas específicas del cerebro se puede utilizar para aumentar la velocidad de procesamiento, y estimular el crecimiento y la interconexión de las neuronas, incluido acelerar la maduración de células precursoras neurales. Dichos usos pueden ser especialmente útiles para el tratamiento del retraso mental.
- 15 De acuerdo con otra realización de la presente divulgación, se pueden tratar varias enfermedades y lesiones musculares. Las parálisis relacionadas con daños musculares, daños en los nervios periféricos y enfermedades distróficas se pueden tratar con excitación optogenética para producir la contracción, y con estabilización optogenética para producir la relajación. Esta última relajación mediante un enfoque de estabilización optogenética también se puede utilizar para prevenir la pérdida de masa muscular, mantenimiento del tono, y permitir el movimiento coordinado cuando se contraen grupos musculares opuestos. Del mismo modo, la espasticidad manifiesta se puede tratar mediante estabilización optogenética.
- 20 En áreas tan diversas como truncamiento de nervios periféricos, ictus, lesión cerebral traumática y lesión de la médula espinal, existe la necesidad de fomentar el crecimiento de nuevas neuronas, y ayudar a su integración en una red funcional con otras neuronas y con su tejido diana. El recrecimiento de nuevos tractos neuronales se puede estimular mediante excitación optogenética, que sirve para señalar los citoblastos para que emitan axones y dendritas, y para que se integren por sí mismas en la red. El uso de una técnica optogenética (en oposición a los electrodos) evita que el tejido intacto reciba las señales, y sirve para garantizar que el nuevo tejido diana crece gracias a una configuración de las comunicaciones con las neuronas en desarrollo, y no con una señal artificial como una corriente producida por un electrodo.
- 30 La obesidad se puede tratar mediante excitación optogenética del núcleo ventromedial del hipotálamo, especialmente la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulador de la cocaína y anfetamina (CART) del núcleo arqueado. En una realización alternativa, la obesidad se puede tratar mediante estabilización optogenética de los núcleos laterales del hipotálamo. En otra realización, la estimulación optogenética de las células productoras de leptina o de células con receptores de leptina del hipotálamo se puede utilizar para disminuir el apetito y, por tanto, para tratar la obesidad.
- 35 Las lesiones destructoras de la cápsula anterior y DBS análogas a dicha región son medios establecidos para tratar el trastorno obsesivo-compulsivo 48 (OCD48) grave intratable. Dichos enfoques se pueden emular usando la estabilización optogenética del segmento anterior de la cápsula interna, o de regiones como BA32 y Cg24 que muestran una disminución metabólica a medida que OCD remite.
- 45 El dolor crónico se puede tratar usando otra realización de la presente divulgación. Los métodos de estimulación eléctrica incluyen estimulación local de los nervios periféricos, la estimulación local de nervios craneales y la estimulación "por debajo del umbral" de la corteza motora. Los enfoques autogénicos razonables incluyen la estabilización optogenética en los sitios dolorosos locales. La atención a la selección de promotores garantizaría que otras fibras sensoriales y motores no se vean afectadas. La excitación optogenética selectiva de las interneuronas en la corteza motora primaria también puede proporcionar alivio eficaz del dolor. También, la estabilización optogenética del tálamo sensorial, (especialmente los núcleos talámicos medios), materia gris periventricular, y
- 50 núcleos del rafe ventral, se pueden usar para producir alivio del dolor. En una realización alternativa, la estabilización optogenética del direccionamiento de células que expresan parvoalbúmina como estrategia de direccionamiento, se puede utilizar para tratar el dolor disminuyendo la producción de la sustancia P. La liberación de opioides endógenos se puede llevar a cabo usando excitación optogenética para aumentar la actividad en el nucleus accumbens. En una realización alternativa, cuando las neuronas POMC del núcleo arqueado del hipotálamo medial se excitan optogenéticamente, la beta endorfina aumenta, proporcionando enfoques de tratamiento viables para la depresión y el dolor crónico.
- 55 Determinados trastornos de la personalidad, incluidos el tipo de personalidad límite y antisocial, demuestran déficits focales en trastornos cerebrales incluidos la "hipofrontalidad". Se anticipa que la excitación optogenética directa o indirecta de estas regiones produce una mejora de los síntomas. También se sabe que los estallidos anómalos de actividad en la amígdala también precipitan súbitos aumentos de agresividad no previstos: un síntoma del trastorno
- 60
- 65

límite de la personalidad, así como otras dolencias, que se pueden beneficiar de la estabilización optogenética de la amígdala. Los enfoques optogenéticos podrían mejorar la comunicación y la sincronización entre diferentes partes del cerebro, incluida la amígdala, estriado, y corteza frontal, que podrían ayudar para reducir la impulsividad y mejorar su comprensión.

5 El modelo amigdalocéntrico del trastorno por estrés postraumático (PTSD) propone que está asociado con la hiperexcitación de la amígdala e insuficiente control arriba-abajo de la corteza prefrontal medial y el hipocampo. En consecuencia, el PTSD se puede tratar mediante la estabilización optogenética de la amígdala o el hipocampo.

10 La esquizofrenia se caracteriza por anomalías que incluyen alucinaciones auditivas. Esta se puede tratar mediante la supresión de la corteza auditiva usando estabilización optogenética. La hipofrontalidad asociada con la esquizofrenia podría tratarse con excitación optogenética de las regiones frontales afectadas. Los enfoques optogenéticos podrían mejorar la comunicación y la sincronización entre diferentes partes del cerebro, lo que podría ayudar a reducir la atribución incorrecta de los estímulos incorrecta de estímulos autogenerados.

15 La estabilización optogenética de las células que se encuentran dentro del núcleo arqueado del hipotálamo, que contienen los productos peptídicos de la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulador de la cocaína y anfetamina (CART), se puede usar para reducir la conducta sexual compulsiva. La excitación optogenética de las células que se encuentran dentro del núcleo arqueado del hipotálamo medio que contiene los productos peptídicos de la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulador de la cocaína y anfetamina (CART) se pueden utilizar para aumentar el interés sexual para el tratamiento de casos de trastornos del deseo sexual. Para el tratamiento de trastornos del deseo sexual hipoactivo, la producción de testosterona por los testículos y las glándulas suprarrenales se puede aumentar mediante la excitación optogenética de la glándulas hipófisis. La excitación optogenética del núcleo accumbens se puede utilizar para el tratamiento de la anorgasmia.

25 El núcleo supraquiasmático segrega melatonina, que sirve para regular los ciclos del sueño/vigilia. La excitación optogenética del núcleo supraquiasmático se puede utilizar para aumentar la producción de melatonina, induciendo el sueño, y tratando de esta forma el insomnio. Las neuronas orexina (hipocretina) excitan intensamente numerosos núcleos cerebrales para estimular la vigilia. La excitación optogenética de las poblaciones de células productoras de orexina se puede utilizar para tratar la narcolepsia, y la somnolencia diurna crónica.

30 La estimulación optogenética del núcleo supraóptico se puede utilizar para inducir la secreción de oxitocina, se puede utilizar para estimular el parto durante el alumbramiento, y se puede utilizar para tratar trastornos de adhesión social.

35 Análogamente a las parálisis musculares, las funciones motoras que se han desconectado debido a una lesión de médula espinal se puede tratar con excitación optogenética para producir la contracción, y con estabilización optogenética para producir la relajación. Esta última relajación mediante un enfoque de estabilización optogenética también se puede utilizar para prevenir la pérdida de masa muscular, mantenimiento del tono, y permitir el movimiento coordinado cuando se contraen grupos musculares opuestos. Del mismo modo, la espasticidad manifiesta se puede tratar mediante estabilización optogenética. El recrecimiento de nuevos tractos neuronales espinales se puede estimular mediante excitación optogenética, que sirve para señalar los citoblastos para que emitan axones y dendritas, y para que se integren por sí mismas en la red.

45 Los déficits por ictus incluyen cambios de personalidad, déficits motores, déficits sensoriales, pérdida cognitiva, e inestabilidad emocional. Una estrategia para el tratamiento de los déficits por ictus es proporcionar estimulación optogenética al cerebro y a las estructuras corporales que se han desconectado de las conexiones de excitación. De forma análoga, Se pueden transmitir capacidades de estabilización optogenética al cerebro y las estructuras corporales que se han desconectado de las conexiones de inhibición.

50 La investigación indica que la patología subyacente del síndrome de Tourette es una disfunción fásica de la transmisión de dopamina en las regiones corticales y subcorticales, el tálamo, ganglios basales y corteza frontal. Con el fin de proporcionar tratamiento, las áreas afectadas se identifican preferentemente en primer lugar usando técnicas que incluyen la obtención de imágenes cerebrales funcionales y la magnetoencefalografía (MEG). Se hayan identificado específicamente o no, la estabilización optogenética de los tractos candidatos se puede usar para suprimir tics motores. Los ensayos empíricos posteriores al implante de los parámetros del dispositivo revelan qué sitios de estabilización optogenética, y en qué sitios ya no es necesario continuar.

60 Para tratar trastornos de incontinencia urinaria o fecal, la estabilización optogenética se puede usar en los esfínteres, por ejemplo mediante la estabilización optogenética del músculo liso detrusor de la vejiga o en las inervaciones de dicho músculo. Cuando la micción sea necesaria, estos procesos optogenéticos se desactivan, o de forma alternativa, se pueden invertir, con estabilización optogenética del esfínter urinario (externo), y excitación optogenética del músculo detrusor de la vejiga o en sus inervaciones. Cuando una vejiga se ha desconectado, por ejemplo, cuando las raíces sacras dorsales se cortan o se destruyen las raíces dorsales por enfermedades de las raíces dorsales tales como tabes dorsal, todas las contracciones reflejas de la vejiga se anulan, y la vejiga queda distendida. La excitación optogenética del músculo se puede utilizar directamente para restaurar el tono del detrusor,

Evitar el daño renal, y ayudar en el proceso de micción. A medida que la vejiga se "descentraliza" y se vuelve hiepersensible al movimiento, y por tanto propensa a la incontinencia, la estabilización optogenética del músculo de la vejiga se puede usar para minimizar la reactividad del órgano.

- 5 Para excitar/inhibir selectivamente una población dada de neurona, por ejemplo las implicadas en la patología de una enfermedad, se pueden usar varias estrategias para dirigir las proteínas/moléculas optogenéticas a poblaciones específicas.

10 Para diversas realizaciones de la presente invención, se puede usar el direccionamiento genético para expresar diversos proteínas o moléculas optogenéticas. Dicho direccionamiento implica la expresión dirigida de las proteínas/moléculas optogenéticas mediante elementos de control genéticos tales como promotores (por ejemplo, parvalbúmina, somatostatina, colecistoquinina, GFAP), potenciadores/silenciadores (por ejemplo, el potenciador temprano inmediato del citomegalovirus), y otros elementos reguladores de la transcripción o la traducción (por ejemplo, elemento regulador posterior a la transcripción del virus de la hepatitis Woodchuck). Se pueden usar permutaciones de la combinación permutador+potenciador+elemento regulador para restringir la expresión de las sondas optogenéticas a las poblaciones genéticamente definidas.

20 Se pueden implementar diversas realizaciones de la presente invención usando direccionamiento espacial/anatómico. Dicho direccionamiento aprovecha el hecho que los patrones de proyección de las neuronas, virus u otros reactivos que contienen información genética (ADN plásmidos, o fragmentos, etc.), se pueden administrar de manera focalizada en un área hacia la que se proyecta una población de neuronas dada. A continuación, el material genético se transportará de vuelta a los cuerpos de las neuronas para mediar en la expresión de las sondas optogenética. Como alternativa, si se desea etiquetar células en una región focal, virus o material genético se pueden administrar de manera focalizada en la región de interés para mediar la expresión localizada.

30 Varios sistemas de administración de genes son útiles para implementar una o más realizaciones de la presente invención. Uno de estos sistemas de administración es el virus adenoasociado (VAA). El VAA se puede usar para administrar un casete de promotor+sonda optogenética a una región de interés específica. La elección del promotor impulsará la expresión en una población específica de neuronas. Por ejemplo, el uso del promotor CaMKIIa impulsará la expresión específica de las neuronas de excitación de las sondas optogenéticas. El VAA mediará la expresión a largo plazo de la sonda optogenética durante al menos un año o más. Para conseguir mayor especificidad, el VAA se puede pseudotipar con serotipos específicos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8, teniendo cada uno de ellos diferente tropismo para diferentes tipos de células. Por ejemplo, se sabe que los serotipos 2 y 5 tienen buen tropismo específico de neuronas.

40 Otro mecanismo de administración génica es el uso de un retrovirus. El VIH u otros vectores retrovíricos de tipo lentivirus se puede usar para administrar un casete de promotor+sonda optogenética a una región de interés específica. Los retrovirus también se pueden pseudotipar con la glicoproteína de la envoltura del virus de la rabia para conseguir el transporte retrógrado para marcar células dependiendo de sus patrones de proyección axonal. Los retrovirus se integran en el genoma de la célula hospedadora, por tanto, son capaces de mediar la expresión permanente de las sondas optogenéticas. Se pueden usar vectores retrovíricos no basados en lentivirus para marcar selectivamente células en división.

45 El adenovirus dependiente de auxiliar y el virus del herpes simple (VHS) son dos virus de ADN que se pueden utilizar también para administrar un casete de promotor+sonda optogenética en regiones específicas del cerebro. El VHS y el adenovirus tienen capacidades de empaquetamiento mucho más grandes y, por tanto, pueden alojar elementos promotores mucho más grandes y también se pueden utilizar para administrar múltiples sondas optogenética u otros genes terapéuticos junto con las sondas optogenéticas.

50 La electroporación focal también se puede usar para transfectar transitoriamente las neuronas. Los ADN plásmidos o fragmentos se pueden administrar focalmente a una región específica del cerebro. Mediante la aplicación de corriente eléctrica suave, las células locales circundantes recibirán el material de ADN y la expresión de las sondas optogenéticas.

55 En otro caso, se puede utilizar lipofección mezclando el material genético con reactivos lípidos y posteriormente inyectarse en el cerebro para mediar la transfección de las células locales.

60 Diversas realizaciones implican el uso de diferentes elementos de control. Además de los elementos de control genético, otros elementos de control (especialmente promotores y potenciadores cuyas actividades son sensibles a los productos químicos, estimulación magnética o radiación infrarroja) se pueden usar para mediar la expresión temporalmente controlada de las sondas optogenéticas. Por ejemplo, un promotor cuya actividad transcripcional está sujeto a radiación infrarroja permite el uso de radiación enfocada para ajustar la expresión de las sondas optogenéticas en una región focal solamente en el momento deseado.

65 La enfermedad de Parkinson se puede tratar mediante la expresión de la estabilización optogenética en las

neuronas glutamatérgicas tanto en el núcleo subtalámico (STN) como en el globo pálido interno (GPI) mediante el uso de un promotor específico de la excitación tal como CaMKII α , y aplicar estabilización optogenética. A diferencia de la modulación eléctrica, en la que todos los tipos de células se ven afectados, solamente se suprimirían las neuronas glutamatérgicas STN.

5 Algunos aspectos de la presente divulgación se dirigen hacia el ensayo de un modelo de un circuito neural o enfermedad. El modelo puede definir la respuesta de salida del circuito en función de las señales de entrada. La respuesta de salida se puede evaluar usando numerosas características mensurables diferentes. Por ejemplo, las características pueden incluir una respuesta eléctrica de las neuronas posteriores y/o una respuesta conductual del paciente. Para someter a ensayo el modelo, las sondas optogenéticas se expresan en una posición de entrada del modelo. Las sondas optogenéticas se estimulan, y las características de salida se vigilan y se comparan con la salida prevista por el modelo.

15 En determinadas implementaciones, el uso de sondas optogenéticas permite el ajuste de los modelos definidos usando sondas eléctricas. Puesto que las sondas eléctricas proporcionan solamente una capacidad limitada para dirigir el estímulo y, por tanto, no son muy adecuadas para estimular determinadas áreas sin estimular también directamente áreas vecinas. Las sondas optogenéticas divulgadas el presente documento proporcionan un mecanismo para una selección más precisa de la ubicación del estímulo. Por ejemplo, el estímulo procedente de las sondas optogenéticas se puede dirigir a tipos muy específicos de circuitos/células, tales como las fibras aferentes. La siguiente descripción proporciona una implementación ilustrativa consistente con dicha realización, y se entiende que muestra la factibilidad y amplia aplicabilidad de los aspectos de la presente divulgación.

25 De acuerdo con una realización de la presente divulgación, los productos divulgados se pueden utilizar en modelos animales de DBS, por ejemplo, en ratas parkinsonianas, para identificar los tipos de células diana responsables de los efectos terapéuticos (un campo de intenso debate y enorme importancia clínica). Este conocimiento por sí solo puede conducir al desarrollo de estrategias farmacológicas y quirúrgicas mejoradas para tratar enfermedades humanas.

30 Una de estas aplicaciones implican la potenciación a largo plazo (LTP) y/o la depresión a largo plazo (LTD) entre dos grupos neurales. Al dirigir la expresión de VChR1 y ChR2 a diferentes poblaciones neurales y estimulando cada una de ellas con una frecuencia diferente de luz, se puede llevar a cabo la LTP o la LTD entre los dos grupos. Cada grupo se puede controlar individualmente usando la correspondiente longitud de onda de la luz. Esto puede ser especialmente útil en aplicaciones en las que la disposición espacial de los dos grupos presenta problemas con el control individual usando la misma longitud de onda de la luz. Por tanto, el uno o varios dispositivos de administración de luz son menos propensos a excitar el grupo neural erróneo y pueden ser menos dependientes de la ubicación espacial precisa del estímulo óptico.

40 La administración de las proteínas a las células *in vivo* se puede llevar a cabo utilizando numerosos dispositivos de administración, métodos y sistemas. Uno de estos dispositivos de administración es un dispositivo implantable que administra una secuencia de nucleótidos para modificar las células *in vivo*, tal como un vector vírico. El dispositivo implantable también puede incluir un mecanismo de administración de luz. La administración de luz puede llevarse a cabo usando, por ejemplo, diodos emisores de luz (LED), fibras ópticas y/o láseres.

45 Otra realización de la presente divulgación implica el uso de VChR1 para alterar el destino de citoblastos incluida la supervivencia/muerte, diferenciación y replicación. La modulación de las propiedades eléctricas ha demostrado controlar el destino de los citoblastos. Se pueden utilizar diferentes técnicas para proporcionar patrones de estímulo que modifique el destino de los citoblastos. Un ejemplo específico es consistente con las técnicas explicadas en Deisseroth, K. et al. "Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells," *Neuron* 42, pp. 535-552 (2004).

50 Otra realización de la presente divulgación se dirige al uso de DChR y/o GtR3 para evaluar la eficacia de los tratamientos. Esto puede incluir, aunque no de forma limitativa, cribado de fármacos, regímenes de tratamiento o modelización de tratamientos/trastornos. En una realización específica, DChR se utiliza como la proteína primaria ópticamente sensible en dichas evaluaciones. En realizaciones alternativas, DChR se utiliza con otros tipos de proteínas ópticamente sensibles (por ejemplo, VCHR1, GtR3, ChR2 y/o NpHR) que responden a diferentes longitudes de onda.

60 También se proporcionan en el presente documento métodos para identificar la conexión transináptica entre células neuronales en un animal o un tejido, que comprende: a) administrar un primer vector vírico que codifica una recombinasa Cre fusionada con una proteína trazadora transcelular a células neuronales en la región A del animal o tejido; b) administrar un segundo vector vírico que codifica una proteína activada por luz a las células neuronales en la región B del animal o tejido, en la que la expresión de la proteína activada por luz depende de la presencia de la recombinasa Cre; y c) identificar las células neuronales que expresan la proteína activada por luz en la región B, en la que la expresión de la proteína activada por luz en las células neuronales indica que dichas células están en conexión transináptica con las células de la región A.

65

También se proporcionan en el presente documento métodos para generar control óptico de las células neuronales diana en una animal o tejido, que comprende: a) administrar un primer vector vírico que expresa una recombinasa Cre fusionada con una proteína trazadora transcelular en la región A del animal o tejido; b) administrar un segundo vector vírico que codifica una proteína activada por luz a la región B del animal o tejido, en la que la expresión de la proteína activada por luz depende de la presencia de la recombinasa Cre, y en la que las células neuronales de la región A y de la región B están conectadas transinápticamente; y c) controlar el potencial de acción de una célula neuronal de la región B con luz que activa la proteína.

También se proporcionan en el presente documento métodos para controlar el potencial de acción de una neurona en un animal, que comprenden activar una proteína activada por luz en la neurona con luz para generar un cambio en el potencial de acción, en la que la expresión de la proteína activada por luz en la neurona se genera mediante a) administrar un primer vector vírico que expresa una recombinasa Cre fusionada con una proteína trazadora transcelular en la región A del animal, b) administrar un segundo vector vírico que codifica una proteína activada por luz a la región B del animal que contiene la neurona, en la que la expresión de la proteína activada por luz depende de la presencia de la recombinasa Cre, en la que las neuronas de la región A y la región B están en conexión transináptica.

En algunas realizaciones, el vector vírico es un vector vírico seleccionado del grupo que consiste en VAA, VHS, y lentivirus. En algunas realizaciones, la proteína trazadora transcelular es aglutinina del germen de trigo (WGA) o el fragmento C de la toxina tetánica (TTC).

Se debe entender que una, algunas, o todas las propiedades de las diversas realizaciones descritas en el presente documento se pueden combinar entre sí. Estos y otros aspectos de la divulgación resultarán evidentes para los expertos en la materia.

Se entiende que el aspecto y las variaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen "consisten" y/o "consisten esencialmente en" aspectos y realizaciones.

Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a una "célula animal" es una referencia de una a muchas células.

Un polinucleótido "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que se dirigen a este valor o parámetro per se. Por ejemplo, la descripción que se refiere a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X". El término "aproximadamente" tiene su significado normal de alrededor de. En algunas realizaciones, "aproximadamente" significa $\pm 10\%$ o $\pm 5\%$.

<p>Tabla 3: Secuencia de GtR3</p> <p>>GtR3</p> <p>ATGGACTACGGAGGAGCACTGTCTGCTGTGGGCCGTGAATTACTCTTTGTGACCAATCCAGTCGTTGTA AATGGGAGCGTCCTGGTGCCGGAGGATCAATGCTACTGCGCCGTTGGATTGAAAGCAGAGGCACGA ATGGGGCCTCATCCTTCGGCAAGGCCCTACTGGAGTTTGTCTTCATCGTCTTCGCGTGTATCACATTACT GTTGGGAATTAACGCTGCGAAATCAAAGGCTGCATCTAGGGTGCTGTTTCCCGCTACTTTCGTCCTGG AATCGCAAGTATCGCATATTTTTCCATGGCAAGCGGCCGGGTGGGTGATTGCCCTGACTGTCGGC AGCTCTTTGTGGCCCGCTATCTGGACTGGCTCATTACTACACCACTTCTACTCATAGATTTGGGTCTGGT TGCAGGGGTCAGTCGGTGGGATATAATGGCCCTCTGCCTGTCTGATGTCCTGATGATTGCTACGGGTG CTTTCGGGAGCCTGACAGTGGGTAACGTGAAGTGGGTGTGGTGGTTCTTTGGAATGTGTTGGTTTCTT CACATAATCTTCGCGCTTGGGAAAAGTTGGGCAGAAGCAGCCAAGGCCAAGGGCGGCGACTCTGCTTC TGTGTAATCCAAAATCGCCGGCATACCGTGATTACATGGTTCTGTTATCCCGTGGTATGGGTCTTCGCT GAGGGCTTCGGAAACTTTTCCGTAACCTTCGAAGTCTCATCTATGGAGTGTTGGATGTTATTTCAAAG GCCGTTTTGGCCTTATACTGATGTCAGGGGCCGCCACCGGATACGAGTCCATT</p> <p>Mapa de traducción GtR3</p>

<p>1 ATGGACTACGGAGGAGCACTGTCTGCTGTGGGCCGTGAATTACTCTTTGTGACCAATCCA 1 M D Y G G A L S A V G R E L L F V T N P 61 GTCGTTGTAATGGGAGCGTCTGGTGCCGGAGGATCAATGCTACTGCGCCGGTTGGATT 21 V V V N G S V L V P E D Q C Y C A G W I 121 GAAAGCAGAGGCACGAATGGGGCCTCATCCTTCGGCAAGGCCCTACTGGAGTTTGTCTTC 41 E S R G T N G A S S F G K A L L E F V F 181 ATCGTCTTCGCGTGTATCACATTACTGTTGGGAATTAACGCTGCGAAATCAAAGGCTGCA 61 I V F A C I T L L L G I N A A K S K A A 241 TCTAGGGTGTGTTTCCCGCTACTTTCGTCACTGGAATCGCAAGTATCGCATATTTTCC 81 S R V L F P A T F V T G I A S I A Y F S 301 ATGGCAAGCGGCGGGGTGGGTGATTGCCCTGACTGTCGGCAGCTCTTTGTGGCCCCG 101 M A S G G G W V I A P D C R Q L F V A R 361 TATCTGGACTGGCTCATTACTACACCCTTACTCATAGATTGGGTCTGGTTGCAGGG 121 Y L D W L I T T P L L L I D L G L V A G 421 GTCAGTCGGTGGGATATAATGGCCCTCTGCCTGTCTGATGTCCTGATGATTGCTACGGGT 141 V S R W D I M A L C L S D V L M I A T G 481 GCTTCGGGAGCCTGACAGTGGGTAACGTGAAGTGGGTGTGGTGGTTCTTTGGAATGTGT 161 A F G S L T V G N V K W V W W F F G M C 541 TGGTTTCTTACATAATCTTCGCGCTTGGGAAAAGTTGGGCAGAAGCAGCCAAGGCCAAG 181 W F L H I I F A L G K S W A E A A K A K 601 GCGCGGACTCTGCTTCTGTGTACTCCAAAATCGCCGGCATCACCGTGATTACATGGTTC 201 G G D S A S V Y S K I A G I T V I T W F 661 TGTTATCCCGTGGTATGGGTCTTCGCTGAGGGCTTCGGAAACTTTTCCGTAACCTTCGAA 221 C Y P V V W V F A E G F G N F S V T F E 721 GTTCTCATCTATGGAGTGTGGATGTTATTTCAAAGGCCGTTTTTGGCCTTATACTGATG 241 V L I Y G V L D V I S K A V F G L I L M 781 TCAGGGGCGCCACCGGATACGAGTCCATT 261 S G A A T G Y E S I</p>		
Sitios de restricción		
Nombre	Sec.	Emplazamientos
AatI	AGGCCT	ninguna
AccI	GTMKAC	ninguna
AflII	CTTAAG	ninguna
Sitios de restricción		
Nombre	Sec.	Emplazamientos
AgeI	ACCGGT	ninguna
AlwI	GGATC 92	
AlwNI	CAGNNCTG	ninguna
ApaI	GGCCC	ninguna
ApaLI	GTGCAC	ninguna
AscI	GGCGGCC	ninguna
AseI	ATTAATnone	
AvaI	CYCGRG	ninguna
Avall	GGWCCnone	
AvrII	CCTAGG	ninguna
BamHI	GGATCC	ninguna
BbsI	GAAGAC	174(c), 183(c), 678(c)
BbvI	GCAGC	341, 585, 219(c), 234(c)
BclI	TGATCA	ninguna

ES 2 676 274 T3

BglI	GCCNNNNNGGC	Ninguna
BglII	AGATCT	ninguna
BlnI	GCTNAGC	ninguna
BsaI	GGTCTC	ninguna
BsmAI	GTCTC	ninguna
BsmBI	CGTCTC	ninguna
BstEII	GGTNACC	ninguna
BstXI	CCANNNNNNTGG	ninguna
ClaI	ATCGAT	ninguna
DraIII	CACNNNGTG	ninguna
EagI	CGGCCG	ninguna
EarI	CTCTTC	ninguna
EcoRI	GAATTC	ninguna
EcoRV	GATATC	ninguna
FokI	GGATG	740, 1145(c)
FseI	GGCCGGCC	ninguna
HindIII	AAGCTT	ninguna
KasI	GGCGCC	ninguna
KpnI	GGTACC	ninguna
MluI	ACGCGT	ninguna
NarI	GGCGCC	ninguna
NcoI	CCATGG	298
NdeI	CATATG	ninguna
NheI	GCTAGC	ninguna
NotI	GCGGCCGC	ninguna
NsiI	ATGCAT	ninguna
PacI	TTAATTAA	ninguna
PciI	ACATGT	ninguna
PmeI	GTTTAAAC	ninguna
PstI	CTGCAG	ninguna
PvuI	CGATCG	ninguna
PvuII	CAGCTG	ninguna
SacI	GAGCTC	ninguna
SacII	CCGCGG	ninguna
SaiI	GTCGAC	ninguna
SapI	GCTCTTC	ninguna
SfiI	GGCCNNNNNGGCC	ninguna
SgrAI	CRCCGGYG	ninguna
SmaI	CCCGGG	ninguna
SpeI	ACTAGT	ninguna
SphI	GCATGC	ninguna
SspI	AATATT	ninguna
StuI	AGGCCT	ninguna
Swal	ATTTAAAT	ninguna
TliI	CTCGAG	ninguna
XbaI	TCTAGA	ninguna
XhoI	CTCGAG	ninguna
XmaI	CCCGGG	ninguna
XmnI	GAANNNTTC	697
AvallI	atgcat	ninguna
AfeI	AGCGCT	ninguna

AvrII	CCTAGG	ninguna
BspEI	TCCGGA	ninguna
BsrGI	TGTACA	ninguna

Tabla 4: Secuencia de DChR

>DChR
 ATGCGTAGAAGGGAGTCTCAGCTCGCATACCTTTGCCTGTTTCGTTTTGATCGCTGGCTGGGCCCCACGT
 CTGACTGAAAGCGCCCCTGATCTAGCCGAGCGGCGGCCTCCCTCCGAGCGAAACACCCCTTACGCCAAT
 ATAAAAAGGTGCCCAATATAACTGAACCAACGCCAATGTGCAACTTGATGGGTGGGCTCTGTACCA
 GGATTTTTACTACCTGGCTGGTTCAGATAAGGAATGGGTTCGTTGGCCCTAGCGACCAGTGTACTGCCG
 AGCATGGTCTAAATCACACGGCACCGACAGAGAGGGCGAGGCGGCTGTGGTGTGGGCGTACATCGTA
 TTCGCCATTTGTATCGTACAACCTGGTTTATTTTCATGTTTGGCCGTTGGAAGGCAACGGTTCGGATGGGAG
 GAAGTCTACGTGAACATCATTGAGCTGGTGCACATTGCCCTGGTGATTTGGGTTCGAGTTCGATAAACC
 GCCATGCTCTACCTAACGACGGTCAGATGGTTCATGGTTCGCTATAGTGCATGGCTCCTTCCCTGCC
 CAGTCATCCTAATTCACCTGAGCAACTAACAGGGCTAAAGGGGGACTATAGTAAGAGAACCATGGGG
 CTTTTGGTCTCTGACATCGGAACCATAGTGTGGTACAAGCGCCGCACTCGCTCCGCCAAACCATGTC
 AAAGTCATCTTATTTACAATTGGGTTGCTGTATGGACTCTTCACTTTTTTACGGCAGCGAAGGTATATA
 TTGAGGCCTACCACACCGTTCCAAAAGGCCAATGTAGAAACCTCGTGAGGGCTATGGCCTGGACTTATT
 TCGTAAGTTGGGCGATGTTCCCATCCTGTTTATCCTGGGAAGAGAGGGTTTTGGCCATATTACATATTT
 TGGCTCATCCATCGGACACTTCATACTGGAGATATTTCAAAAAATCTGTGGAGTCTACTGGGCCACGG
 ATTACGGTATCGCATAAGGCAGCATATCATCATTTCATGGCAATTTGACAAAGAAGAATAAGATTAATAT
 CGCAGGGGACAACGTCGAAGTGGAAGAGTACGTGGATTCTAACGACAAGGACAGCGACGTT

>DChR
 ATGCGTAGAAGGGAGTCTCAGCTCGCATACCTTTGCCTGTTTCGTTTTGATCGCTGGCTGGGCCCCACGT
 CTGACTGAAAGCGCCCCTGATCTAGCCGAGCGGCGGCCTCCCTCCGAGCGAAACACCCCTTACGCCAAT
 ATAAAAAGGTGCCCAATATAACTGAACCAACGCCAATGTGCAACTTGATGGGTGGGCTCTGTACCA
 GGATTTTTACTACCTGGCTGGTTCAGATAAGGAATGGGTTCGTTGGCCCTAGCGACCAGTGTACTGCCG
 AGCATGGTCTAAATCACACGGCACCGACAGAGAGGGCGAGGCGGCTGTGGTGTGGGCGTACATCGTA
 TTCGCCATTTGTATCGTACAACCTGGTTTATTTTCATGTTTGGCCGTTGGAAGGCAACGGTTCGGATGGGAG
 GAAGTCTACGTGAACATCATTGAGCTGGTGCACATTGCCCTGGTGATTTGGGTTCGAGTTCGATAAACC
 GCCATGCTCTACCTAACGACGGTCAGATGGTTCATGGTTCGCTATAGTGCATGGCTCCTTCCCTGCC
 CAGTCATCCTAATTCACCTGAGCAACTAACAGGGCTAAAGGGGGACTATAGTAAGAGAACCATGGGG
 CTTTTGGTCTCTGACATCGGAACCATAGTGTGGTACAAGCGCCGCACTCGCTCCGCCAAACCATGTC
 AAAGTCATCTTATTTACAATTGGGTTGCTGTATGGACTCTTCACTTTTTTACGGCAGCGAAGGTATATA
 TTGAGGCCTACCACACCGTTCCAAAAGGCCAATGTAGAAACCTCGTGAGGGCTATGGCCTGGACTTATT
 TCGTAAGTTGGGCGATGTTCCCATCCTGTTTATCCTGGGAAGAGAGGGTTTTGGCCATATTACATATTT
 TGGCTCATCCATCGGACACTTCATACTGGAGATATTTCAAAAAATCTGTGGAGTCTACTGGGCCACGG
 ATTACGGTATCGCATAAGGCAGCATATCATCATTTCATGGCAATTTGACAAAGAAGAATAAGATTAATAT
 CGCAGGGGACAACGTCGAAGTGGAAGAGTACGTGGATTCTAACGACAAGGACAGCGACGTT

Tabla 4: Secuencia de DChR

Mapa de traducción
 DChR
 Mapa de traducción

1 ATGCGTAGAAGGGAGTCTCAGCTCGCATACCTTTGCCTGTTTCGTTTTGATCGCTGGCTGG
 1 M R R R E S Q L A Y L C L F V L I A G W
 61 GCCCCACGTCTGACTGAAAGCGCCCCTGATCTAGCCGAGCGGCGGCCTCCCTCCGAGCGA
 21 A P R L T E S A P D L A E R R P P S E R
 121 AACACCCCTTACGCCAATATTA AAAAGGTGCCCAATATAACTGAACCCAACGCCAATGTG
 41 N T P Y A N I K K V P N I T E P N A N V
 181 CAACTTGATGGGTGGGCTCTGTACCAGGATTTTACTACCTGGCTGGTTCAGATAAGGAA
 61 Q L D G W A L Y Q D F Y Y L A G S D K E
 241 TGGGTCGTTGGCCCTAGCGACCAAGTGTACTGCCGAGCATGGTCTAAATCACACGGCACC
 81 W V V G P S D Q C Y C R A W S K S H G T
 301 GACAGAGAGGGCGAGGGCGGCTGTGGTGTGGGCGTACATCGTATTCGCCATTTGTATCGTA
 101 D R E G E A A V V W A Y I V F A I C I V
 361 CAACTGGTTTATTTTCATGTTTGGCGTTGGAAGGCAACGGTCGGATGGGAGGAAGTCTAC
 121 Q L V Y F M F A A W K A T V G W E E V Y
 421 GTGAACATCATTGAGCTGGTGCACATTGCCCTGGTGATTTGGGTGCGAGTTCGATAAACCC
 141 V N I I E L V H I A L V I W V E F D K P
 481 GCCATGCTCTACCTAACGACGGTCAGATGGTTCATGGTTGCGCTATAGTGCATGGCTC
 161 A M L Y L N D G Q M V P W L R Y S A W L
 541 CTTTCCTGCCAGTCATCCTAATTCACCTGAGCAACTTAACAGGGGCTAAAGGGGGACTAT
 181 L S C P V I L I H L S N L T G L K G D Y
 601 AGTAAGAGAACCATGGGGCTTTTGGTCTCTGACATCGGAACCATAGTGTGGTACAAGC
 201 S K R T M G L L V S D I G T I V F G T S
 661 GCCGCACTCGCTCCGCCAAACCATGTCAAAGTCATCTTATTTACAATTGGGTTGCTGTAT
 221 A A L A P P N H V K V I L F T I G L L Y
 721 GGACTCTTCACTTTTTTACGGCAGCGAAGGTATATATTGAGGCCTACCACACCGTTCCA
 241 G L F T F F T A A K V Y I E A Y H T V P
 781 AAAGGCCAATGTAGAAACCTCGTGAGGGCTATGGCCTGGACTTATTTTCGTAAGTTGGGCG
 261 K G Q C R N L V R A M A W T Y F V S W A
 841 ATGTTCCCATCCTGTTTATCCTGGGAAGAGAGGGTTTTGGCCATATTACATATTTTGGC
 281 M F P I L F I L G R E G F G H I T Y F G
 901 TCATCCATCGGACACTTCATACTGGAGATATTTTCAAAAAATCTGTGGAGTCTACTGGGC
 301 S S I G H F I L E I F S K N L W S L L G
 961 CACGGATTACGGTATCGCATAAGGCAGCATATCATTCATGGCAATTTGACAAAGAAG
 321 H G L R Y R I R Q H I I I H G N L T K K
 1021 AATAAGATTAATATCGCAGGGGACAACGTCGAAGTGAAGAGTACGTGGATTCTAACGAC
 341 N K I N I A G D N V E V E E Y V D S N D
 1081 AAGGACAGCGACGTT
 361 K D S D V

Sitios de restricción		
Nombre	Sec.	Emplazamientos
AatI	AGGCCT	760
Accl	GTMKAC	414, 949
AfilI	CTTAAG	ninguna
Agel	ACCGGT	ninguna
AlwI	GGATC	ninguna
AlwNI	CAGNNNCTG	ninguna
Apal	GGGCCC	58
ApalI	GTGCAC	438
Ascl	GGCGCGCC	ninguna
Asel	ATTAAT	1026

ES 2 676 274 T3

AvaI	CYCGRG	ninguna
AvaiI	GGWCC	ninguna
AvrII	CCTAGG	ninguna
BamHI	GGATCC	ninguna
BbsI	GAAGAC	ninguna
BbvI	GCAGC	741, 983
Bell	TGATCA	ninguna
BglI	GCCNNNNNGGC	ninguna
BglII	AGATCT	ninguna
BlpI	GCTNAGC	ninguna
BsaI	GGTCTC	623
BsmAI	GTCTC	14, 624
BsmBI	CGTCTC	ninguna
BstEII	GGTNACC	ninguna
BstXI	CCANNNNNNTGG	ninguna
Clal	ATCGAT	ninguna
DrallI	CACNNNGTG	ninguna
EagI	CGGCCG	ninguna
EarI	CTCTTC	723, 865(c), 1056(c)
EcoRI	GAATTC	ninguna
EcoRV	GATATC	ninguna
FokI	GGATG	402, 554(c), 848(c), 901(c)
FseI	GGCCGGCC	ninguna
HindIII	AAGCTT	ninguna
KasI	GGCGCC	ninguna
KpnI	GGTACC	ninguna
MluI	ACGCGT	ninguna
NarI	GGCGCC	ninguna
NcoI	CCATGG	513.610
NdeI	CATATG	ninguna
NheI	GCTAGC	ninguna
NotI	GCGGCCGC	ninguna
NsiI	ATGCAT	ninguna
PacI	TTAATTA	ninguna
PciI	ACATGT	ninguna
PmeI	GTTTAAAC	ninguna
PstI	CTGCAG	ninguna
PvuI	CGATCG	ninguna
PvuII	CAGCTG	ninguna
SacI	GAGCTC	ninguna
SacII	CCGCGG	ninguna
SalI	GTCGAC	ninguna
SapI	GCTCTTC	ninguna
SfiI	GGCCNNNNNGGCC	ninguna
SgrAI	CRCCGGYG	ninguna
SmaI	CCCGGG	ninguna
SpeI	ACTAGT	ninguna
SphI	GCATGC	ninguna
SspI	AATATT	135
StuI	AGGCCT	760
Swal	ATTTAAAT	ninguna
TliI	CTCGAG	ninguna

XbaI	TCTAGA	ninguna
XhoI	CTCGAG	ninguna
XmaI	CCCGGG	ninguna
XmnI	GAANNNTTC	ninguna
Avall	atgcat	ninguna
AfeI	AGCGCT	ninguna
AvrII	CCTAGG	ninguna
BspEI	TCCGGA	ninguna
BsrGI	TGTACA	ninguna

Se proporciona en el presente documento una célula animal que incluye, aunque no de forma limitativa, células neurales, líneas celulares y células musculares, comprendiendo la célula animal: una molécula exógena integrada que expresa una bomba de protones sensible a la luz azul, La molécula exógena se deriva de *Guillardia theta*.

5 También se proporciona en el presente documento un método que comprende: modificar una proteína sensible a la luz derivada de *Guillardia theta* para añadir una señal de exportación al retículo endoplasmático (RE) en el extremo C de la proteína sensible a la luz.

10 También se proporciona en el presente documento un sistema para controlar el potencial de acción de una neurona *in vivo*, comprendiendo el sistema: un dispositivo de administración que introduce una proteína en la neurona, siendo la proteína sensible a la luz azul, en la que produce una corriente de inhibición procedente de una fuente de luz azul que genera luz para estimular la proteína sensible a la luz azul; y un dispositivo de control que controla la generación de luz por la luz fuente de luz.

15 También se proporcionan en el presente documento sistemas, métodos, disposiciones, o kits dirigidos a: la estimulación óptica de una célula que expresa la bomba de protones GtR3.

20 También se proporcionan en el presente documento sistemas, métodos, disposiciones, o kits dirigidos al control de los procesos subcelulares usando GtR3 y/o DChR.

También se proporcionan en el presente documento sistemas, métodos, disposiciones, o kits dirigidos al uso de GtR3 y DChR en diferentes poblaciones de células de una red celular común.

25 También se proporcionan en el presente documento sistemas, métodos, disposiciones, o kits dirigidos a DChR.

También se proporciona en el presente documento una proteína consistente con cualquiera de las secuencias descritas en el presente documento (por ejemplo, las secuencias mostradas en la Tabla 1).

30 También se proporcionan en el presente documento sistemas, métodos, disposiciones, o kits dirigidos a combinaciones de DChR o GtR3 con otros tipos de opsinas sensibles a la luz, que se puede basar en perfiles de reacción de las mismas.

35 También se proporcionan en el presente documento sistemas, métodos, disposiciones, o kits dirigidos a combinaciones de tres o más tipos de opsinas sensibles a la luz.

También se proporcionan en el presente documento métodos para proporcionar niveles terciados de actividad usando múltiples tipos de opsinas en la misma célula, pero que reaccionan a luz diferente.

40 También se proporcionan en el presente documento métodos para proporcionar niveles terciados de actividad usando múltiples tipos de opsinas en la misma célula para proporcionar un aumento en la función del canal mediante la estimulación alternante de cada tipo de opsina.

45 También se proporcionan en el presente documento sistemas, métodos, disposiciones, o kits dirigidos al control muscular.

También se proporcionan en el presente documento sistemas, métodos, disposiciones, o kits dirigidos a un control combinado de varios tipos de células diferentes, teniendo cada grupo una combinación de opsinas diferente, de forma que cada grupo se puede controlar independientemente de al menos otro grupo.

50 También se proporciona en el presente documento un sistema que comprende un bucle de retroalimentación para controlar una célula (o población de células) teniendo la una o varias células múltiples tipos de proteínas sensibles a la luz expresadas en el anterior.

También se proporcionan en el presente documento aplicaciones terapéuticas que incluyen, aunque no de forma limitativa, tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

5 También se proporcionan en el presente documento sistemas, métodos, disposiciones, o kits dirigidos al implante en células retinianas/recuperación del cerebro para responder a la intensidad de múltiples longitudes de onda.

También se proporcionan en el presente documento sistemas, métodos, disposiciones, o kits dirigidos al ensayo de fármacos.

10 También se proporcionan en el presente documento sistemas, métodos, disposiciones, o kits dirigidos al uso de GtR3 y/o DChR con animales transgénicos.

15 También se proporcionan en el presente documento sistemas, métodos, disposiciones, o kits dirigidos al control de los niveles de pH en células que incluye, aunque no de forma limitativa, el control de los niveles de pH en un orgánulo, que se puede implementarse, sin limitación, para estimular o inhibir funciones de los mismos o para destruir o recortar la célula.

Ejemplos

20 De acuerdo con determinadas realizaciones, las estrategias de tráfico subcelular y transcelular permiten ahora (1) la regulación óptica en el límite del rojo lejano/infrarrojo y la extensión del control optogenético a través de la totalidad del espectro visible; (2) mayor potencia de la inhibición óptica sin aumento en la potencia de luz necesaria (fotocorrientes mediadas por cloruro a escala nanoamperio que mantienen la sensibilidad a la luz y una estabilidad cinética por paso reversible de las herramientas anteriores); y (3) estrategias generalizables para direccionar células basándose no solo en la identidad genética, sino también en la morfología y en la topología del tejido, para permitir un direccionamiento versátil cuando no son conocidos o en organismos genéticamente intratables. Estos resultados ilustran el uso de los principios de biología celular para permitir la expansión de tecnologías versátiles de optogenética rápida adecuadas para la biología y el comportamiento de sistemas intactos.

30 Los aspectos específicos de la presente divulgación se dirigen a aplicaciones de las estrategias de tráfico molecular, para derivar un panel de herramientas que potencien tanto cuantitativa como cualitativamente la potencia de la optogenética y abra diferentes vías de investigación. En particular, se han desarrollado herramientas que permiten el direccionamiento de células solamente por sus relaciones topológicas dentro de los tejidos, y extienden el alcance del control óptico hasta la frontera del infrarrojo, consiguiendo potenciar la función efectora más que el resto de herramientas conocidas, y para la totalidad del espectro visible.

40 De acuerdo con la presente divulgación, el examen de las neuronas hipocámpicas que expresan eNpHR2.0 reveló la ausencia de acumulaciones en el RE con el marcado intracelular persistente y escasa localización en la membrana, lo que sugiere que las modificaciones adicionales posteriores a la etapa de exportación al RE son importantes. El estudio de las diferencias en la secuencia primaria entre dos formas de un rectificador de entrada del canal del potasio con diferentes localizaciones en la membrana (Kir2.1 y Kir2.4) reveló diferencias no solamente en los motivos de exportación al RE del extremo C, sino también en las señales de exportación al aparato de Golgi en el extremo N y en las señales de tráfico en el extremo C (Hofherr et al., 2005). De manera sorprendente, la provisión de una señal de exportación al aparato de Golgi no alteró significativamente la expresión superficial, pero la adición de la señal de tráfico procedente de Kir2.1 bien entre eNpHR y la fusión EYFP, o en el extremo C de la proteína de fusión, redujo drásticamente el marcado intracelular y aumentó la expresión aparente en la superficie de la membrana y también una mejora en el marcado de los procesos celulares. De hecho, las imágenes confocales de alta resolución revelaron una notable localización en los procesos, con membranas marcadas identificables que amplían regiones intracelulares aparentemente desprovistas de la proteína de fusión opsina-EYFP, con un patrón nunca antes observado con NpHR o sus derivados.

55 Los inventores examinaron fotocorrientes, usando registros de fijación de membrana celular completa para cuantificar de buena fe la localización en membrana plasmática funcional de moléculas de la bomba de halorrodopsina. De esta forma, las fotocorrientes aumentaron de manera importante (hasta un nivel ~20 veces mayor que las corrientes NpHR inicialmente descritas; media \pm el error estándar de la media [SEM], la fotocorriente $747,2 \pm 93,9$ pA en neuronas hipocámpicas transducidas lentivíricamente bajo el promotor I de la sinapsis humano; $n = 10$). La Fig. 25D muestra trazas representativas en la parte izquierda de la figura, y gráficas resumen en la parte derecha de la figura. Las trazas representativas y las gráficas resumen de la Fig. 25D muestra los niveles de fotocorriente promedio en células que expresan eNpHR3.0 ($747,2 \pm 93,9$ pA), mostrada en negro, y eNpHR2.0, mostrada en gris, ($214,1 \pm 24,7$ pA; prueba de la p no emparejada t , $0,0005$; $n = 10$). La resistencia de entrada de la membrana fue similar para todas las neuronas fijadas (eNpHR: $193,1 \pm 36,6$ M Ω ; eNpHR3.0: $151,6 \pm 28,5$ m Ω ; prueba de la t no emparejada $p = 0,37$). En el máximo del espectro de acción descrito más adelante, se observaron fácilmente corrientes de salida promedio a escala nanoamperios con luz amarilla de $3,5$ mW/mm², una intensidad un orden de magnitud inferior de la requerida por las bombas de protones para conseguir este nivel de fotocorriente (mantener baja las intensidades de luz es un problema importante solamente para los experimentos *in vivo*, en donde el control seguro de volúmenes de luz de tejido significativos es fundamental) (Aravanis et al., 2007; Adamantidis et

al., 2007; Chow et al., 2010). La Fig. 25E muestra trazas de tensión representativas, en la parte izquierda de la figura, y gráficas resumen, en la parte derecha, de eNpHR3.0 (negro) y eNpHR2.0 (gris). En neuronas transducidas víricamente, las hiperpolarizaciones inducidas por luz >100 mV se conseguían de forma rutinaria, para los mismos niveles de potencia de luz bajos, como se muestra en la Fig. 25E (hiperpolarización media en células que expresan eNpHR3.0: $101,0 \pm 24,7$ mV, $n = 10$; y eNpHR2.0: $57,2 \pm 6,8$ mV, prueba de la p no emparejada t , $0,0005$, $n = 10$). Los cambios en el potencial de membrana de esta nueva magnitud representan un avance funcionalmente diferente en la inhibición optogenética, y en consecuencia, los inventores designan este NpHR de tercera generación como eNpHR3.0 (la halorrodopsina de *Natronomonas* se denominó NpHR en 2005 [Sato et al., 2005], y la primera versión potenciada para el tráfico desarrollada por Gradinaru et al. [2008] se denomina actualmente como eNpHR2.0). Como se esperaba de un trabajo anterior (Zhang et al., 2007a) mostrando que las fotocorrientes NpHR estaban escalonadas y mostraban poca inactivación durante más de 10 min de iluminación continua (de esta forma, NpHR se seleccionó por este motivo, como se describe en Zhang et al. [2007a]), las fotocorrientes eNpHR3.0 también son escalonadas, resistentes a la inactivación, y muy estables para múltiples pulsos de luz y escalas de tiempo prolongadas (conductualmente relevante) (Zhang et al., 2007a).

La Fig. 30A muestra la estabilidad y la recuperación de eNpHR3.0 en una escala temporal corta. Las trazas representativas en la parte izquierda de la Fig. 30A muestran fotocorrientes en células que expresan eNpHR3.0 cuando se exponen a parejas de pulsos de luz amarilla de 10 segundos de duración separadas en el tiempo por, de la parte superior a la inferior de la Fig. 30A: 2,5 segundos, 5 segundos, 10 segundos, y 20 segundos. La parte superior derecha de la Fig. 30A muestra el gráfico resumen para pulsos de 20 segundos separados mostrando niveles de fotocorriente promedio normalizados en células que expresan eNpHR3.0 (P1 = primer pico de pulso, 1,00, S1 = primer pulso estacionario, $0,74 \pm 0,01$; P2 = segundo pico de pulso, $0,86 \pm 0,02$; $n = 11$). La parte inferior derecha de la Fig. 30A muestra el gráfico resumen para pulsos de 20 segundos separados mostrando aproximadamente un 50 % de la recuperación del pico (P2-S1)/(P1-S1). Después de 20 segundos, el pico se recupera hasta ($45,2 \pm 6,6$) %. La Fig. 30B muestra el curso temporal de fotocorrientes de eNpHR3.0 normalizadas para una exposición a la luz continua a largo plazo ($n = 11$; varias gráficas son media \pm SEM). La Fig. 30C muestra la corriente de salida de la estabilidad de eNpHR3.0 durante 10 minutos (la administración de luz de 593 nm se indica mediante la barra rellena; densidad de potencia de salida: $2,5$ mW/mm²).

Para abordar si la expresión mejorada coherente se presenta en el cerebro mamífero *in vivo*, los inventores inyectaron vectores lentivíricos que suministran el novedoso gen de la opsina bajo control del promotor CaMKII α a la región CA1 de la formación hipocámpida de ratones adultos, y se examinó la distribución de la fusión EYFP expresada. Análogamente a las células cultivadas, se observó una expresión intensa no solo en las dendritas, sino también en los axones *in vivo* con eNpHR3.0 y eNpHR3.1 (una versión más corta de eNpHR3.0 con una funcionalidad equivalente, pero del que se ha eliminado la señal peptídica del extremo N). Una oportunidad importante *in vivo* para los sistemas neurobiológicos es controlar no solo una proyección de la región A a la región B, sino un tipo de célula que tenga (entre sus conexiones) una proyección de A a B. Este resultado fundamentalmente diferente requiere el multiplexado del control óptico con otros métodos de direccionamiento. Dicho control sería de gran valor en sistemas neurobiológicos; por ejemplo, las neuronas piramidales de la corteza excitadora forman una clase de células definida genética y anatómicamente, pero dentro de esta clase hay células que se proyectan, cada una de ellas, a múltiples zonas del cerebro (por ejemplo, tálamo, médula espinal, estriado, y otras zonas corticales) y, por tanto, tienen papeles fundamentalmente diferentes (Lein et al., 2007; Yoshimura et al., 2005). Es improbable que las herramientas genéticas avancen lo suficiente para separar todas estas clases celulares diferentes, apuntando la necesidad de inhibir o excitar células definidas por la topología de conexión (Fig. 26B). Una forma de conseguir este objetivo es aprovechar el tráfico transcelular: introducir en la ubicación del cuerpo celular local un virus dependiente de Cre que expresa condicionalmente el gen de la opsina microbiana de elección (por ejemplo, Tsai et al., 2009), y en lugar de utilizar adicionalmente una línea de ratón activada por Cre, en lugar de introducir en una estructura diana distante (seleccionada para definir las células de interés mediante conectividad anatómica) un virus que expresa una recombinada Cre fusionada con una proteína trazadora transcelular, por ejemplo, aglutinina del germen de trigo (WGA) (Fig. 26B) o el fragmento C de la toxina tetánica (TTC) (Kissa et al., 2002; Maskos et al., 2002; Perreault et al., 2006; Sano et al., 2007; Sugita y Shiba, 2005). La recombinasa Cre en la proteína de fusión se transportaría por mecanismos de tráfico endosómico supuestos junto con el trazador hasta la ubicación local del cuerpo celular, si está anatómicamente conectado, en el subconjunto de células locales definido por esta conectividad (Fig. 26B) (Gradinaru et al., 2007, 2009; Petreanu et al., 2007, 2009). Tenga en cuenta que este enfoque no requiere ningún fragmento promotor específico o definición genética de células diana (una ventaja evidente para el uso en especies menos genéticamente tratables como ratas y primates); sino que, si es necesario, dichos refinamientos genéticos adicionales se pueden añadir fácilmente (por ejemplo, tanto WGA-Cre como la opsina dependiente de Cre podrían administrarse bajo el control de promotores específicos de tipo celular cuando estén disponibles), creando un medio versátil para abordar las células definido en la intersección entre conectividad, ubicación, y genética.

Este concepto se validó en primer lugar en ratas diseñando una estrategia para introducir selectivamente eNpHR3.0 en estos microcircuitos de la corteza motora primaria (M1) que están implicados en las conexiones corteza-corteza con la corteza sensorial primaria (S1) (Colechio y Alloway, 2009). Para hacer esto, los inventores inyectaron el VAA dependiente de Cre anteriormente descrito, que expresa ahora condicionalmente eNpHR3.0 en la corteza motora, e inyectaron un novedoso VAA que expresa WGA-Cre (AAV2-EF1 α -mCherry-IRES-WGA-Cre) remotamente en la

corteza somatosensorial primaria. Por tanto, se observó una expresión coherente de eNpHR3.0-EYFP en un subconjunto distribuido de neuronas de la corteza motora 5 semanas después de la inyección, a pesar de la lejanía de la inyección remota del VAA con la recombinasa Cre; en animales de control sin la recombinasa Cre, no se observó expresión desde estos VAA dependientes de Cre (Tsai et al., 2009; Sohal et al., 2009). La Fig. 26C muestra el diseño de la construcción para los vectores WGA-Cre y VAA dependiente de Cre, en los que los genes WGA y Cre están ambos optimizados con codones de mamífero. Consistente con el modo previsto de transporte transináptico o transcelular de Cre, no se observaron cuerpos celulares positivos para mCherry en la corteza motora, y no se observaron cuerpos celulares positivos para EYFP en la corteza sensorial S1. Cre se puede administrar trans-sinápticamente desde células transducidas para activar la expresión de genes distantes solamente en las neuronas conectadas sinápticamente que han recibido el virus dependiente de Cre, y no en otros. Las terminales previstas del axón EYFP-eNpHR3.0 que proceden de M1 estaban presentes en S1. La estimulación/registro simultáneos con optrodos (Gradinaru et al., 2007) se llevó a cabo para validar la funcionalidad de eNpHR3.0 en el sistema WGA; así, se observó una inhibición coherente en M1, como se esperaba de la intensa fluorescencia de la proteína de fusión XFP-opsina. Estos datos indican que las neuronas implicadas en las conexiones corteza-corteza se pueden abordar y dirigir no simplemente como una proyección, sino como un tipo celular definido por conectividad.

Para validar independientemente esta tecnología de direccionamiento en un circuito diferente y con una opsina diferente, los inventores se dirigieron después a las neuronas del giro dentado de la formación hipocámpica implicadas en las proyecciones interhemisféricas. En el interior del hilo dentado, la única proyección contralateral monosináptica conocida procede de las células musgosas hiliares, que terminan en las células granulares del dentado del lado contrario, en dendritas de la capa molecular (Freund y Buzsáki, 1996; Ratzliff et al., 2004). El VAA WGA-Cre AAV se inyectó unilateralmente en un giro dentado, mientras que el VAA dependiente de Cre se inyectó en el giro dentado del lado contrario del mismo animal. Increíblemente, la expresión de la opsina se observó solamente en las células hiliares del lado contrario. De hecho, en este caso y en este punto temporal, la acumulación de Cre fue retrógrada y monosináptica con respecto a las células hiliares del lado contrario, puesto que no se observó marcado EYFP en la capa de células granulares del lado contrario; además, apuntando a la falta de transducción directa de los terminales axónicos con el serotipo de este VAA, no se observó mCherry en el dentado del lado contrario. Los únicos elementos del circuito que expresan EYFP en el dentado ipsilateral, que dan como resultado oportunidades precisas para el control óptico, fueron fibras axonales cuya terminación se observa en la capa molecular de la capa de las células granulares, precisamente como se esperaba para las fibras procedente del hilo dentado del lado contrario. De hecho, los registros realizados *in vivo* con optrodos confirmaron la funcionalidad de ChR2 activado con WGA/Cre para impulsar las espigas activadas por luz tanto en los cuerpos celulares que expresan la opsina como en las neuronas posteriores a las proyecciones axonales de las células que expresan ChR2, en el hemisferio contrario; de acuerdo con estudios optogenéticos anteriores (Zhang et al., 2007a, 2007b), pulsos de luz de 470 nm a 30 Hz (5 ms de anchura de pulso) suministrados mediante fibra óptica impulsaron de forma fiable la activación neuronal *in vivo*.

La utilidad de estas estrategias de direccionamiento para las opsinas diseñadas mediante ingeniería genética con tejidos intactos suscitan la cuestión de qué ventajas adicionales se conseguirían con respecto al volumen de tejido modulable *in vivo*. Aunque las modificaciones en el tráfico de membrana solas no desplazan el espectro de acción, la capacidad para controlar las neuronas en el rojo lejano es una meta largo tiempo deseada de la optogenética, ya que esto permitiría el uso de luz que penetra mucho más profundamente en los tejidos biológicos dispersos (puesto que la utilidad del rojo lejano se ha demostrado recientemente para proteínas fluorescentes) (Shu et al., 2009), y por tanto permitirá el reclutamiento de volúmenes más grandes (Aravanis et al., 2007; Adamantidis et al., 2007; Gradinaru et al., 2009). Las masivas fotocorrientes observadas para eNpHR3.0 (~20x de las inicialmente notificadas para NpHR, que por sí mismas son capaces de bloquear la formación de espigas en respuesta a la luz ámbar de 589 nm), siguieren que se puede lograr el control optogenético con luz en el rojo lejano. Por tanto, los inventores exploraron el control óptico en el rojo lejano con eNpHR3.0 potenciada para el tráfico.

Incluso en respuesta a una verdadera luz de color rojo (630 nm) de solo 3,5 mW/mm², los inventores observaron potentes fotocorrientes de salida de ~250 pA en células transducidas víricamente -aún 6 veces más grandes que las primeras corrientes NpHR observadas con luz amarilla (Fig. 27A), y mantener las características escalonadas, cinética estable típica de NpHR (neuronas que expresan eNpHR3.0 y que expresan eNpHR2.0: eNpHR3.0: 239,4 ± 28,7 pA; eNpHR2.0: 42,7 ± 4,5 pA; prueba de la t no emparejada p = 0,00004; n = 10) (Zhang et al., 2007a). Asimismo, los inventores han descubierto que estas corrientes evocadas por la luz de color rojo se podrían usar para disparar hiperpolarizaciones grandes (> 40 mV) en neuronas piramidales hipocámpicas (Fig. 27B) (neuronas que expresan eNpHR3.0 y que expresan eNpHR2.0: eNpHR3.0: 43,3 ± 6,1 mV; eNpHR2.0: 15,6 ± 3,2 mV; prueba de la t no emparejada p = 0,00116; n = 10). Los inventores exploraron por tanto incluso luz más desplazada al rojo. Los inventores continuaron observando fotocorrientes coherentes en el rojo profundo con luz a 660 nm y en el límite del rojo/infrarrojo con luz a 680 nm (Fig. 27C). A 680 nm, las fotocorrientes (~75 pA) fueron aún más grandes que el máximo (luz de color amarillo) de las corrientes eNpHR2.0 anteriormente notificado en 7 mW/mm². De forma importante, en todas las longitudes de onda del rojo y el rojo lejano probadas, las fotocorrientes eNpHR3.0 bloquean fácilmente los potenciales de acción inducidos por la inyección de corriente (Fig. 27D) con 7 mW/mm² o menos, validando la extensión de los canales de control optogenéticos para la luz del rojo lejano. Las fotocorrientes de salida evocadas por diferentes longitudes de onda de la iluminación con rojo y en el límite del rojo lejano/infrarrojo son:

239,4 ± 28,7 pA (n = 10) a 630 nm; 120,5 ± 16,7 pA (n = 4) a 660 nm; y 76,3 ± 8,1 pA (n = 4) a 680 nm.

Una característica importante de NpHR es su compatibilidad espectral con ChR2: las dos opsinas tienen espectros de acción muy separables y funcionan con requisitos similares de densidad de potencia de luz, permitiendo el control bidireccional de la actividad óptica (Zhang et al., 2007a) *in vitro* o *in vivo* a pesar de una pequeña región de superposición espectral. Para someter a ensayo si eNpHR3.0 se había vuelto demasiado potente, dada la superposición espectral, para su uso junto con ChR2 en la misma célula, los inventores crearon un vector bicistrónico que contenía eNpHR3.0; se emplearon vectores combinados basados en análogos de 2A (Ryan y Drew, 1994) con las herramientas anteriores, y con este método, las corrientes de canalrodopsina están comprendidas de 150 a 240 pA y las corrientes de halorrodopsina de 11 a 40 pA (Tang et al., 2009, Han et al., 2009b). Los inventores transfirieron la construcción eNpHR3.0-2A-ChR2 (abreviada eNPAC) en las neuronas piramidales del hipocampo. Con estos experimentos, se observó el tráfico de ambos productos génicos de opsina hacia procesos celulares. Para verificar que la excitación y la inhibición independientemente seguía siendo posible a pesar de las corrientes aumentadas procedentes de eNpHR3.0, los inventores cartografiaron el espectro de acción de la fotocorriente en estado estacionario detalladamente para eNPAC y para ChR2(H134R) (Gradinaru et al., 2007) y eNpHR3.0 solo. La Fig. 27F, muestra los espectros de activación para eNPAC, la parte izquierda de la Fig. 27F, y para ChR2 (H124R) y eNpHR3.0, en la parte derecha de la Fig. 27F. En la parte derecha de la Fig. 27F, el espectro de activación de ChR2 se muestra en gris oscuro, y el espectro de activación de eNpHR3.0 se muestra en gris claro. Las corrientes excitadora e inhibidora máximas de eNPAC en estado estacionario fueron ambas aproximadamente el 60 % de las observadas cuando cada opsina se expresó individualmente, proporcionando fotocorrientes máximas de >550 pA en cada dirección (Figs. 27F-G); los espectros de acción que se superponen modestamente pueden proporcionar una característica, en que esa potente inhibición de atenuación combinada con inhibición hiperpolarizante es probablemente posible con esta estrategia de combinación. Más específicamente, el máximo de excitación de eNPAC en estado estacionario era de 567 ± 49 pA a 427 nm (n = 9), el 62 % del valor de ChR2(H134R) solo (916 ± 185 pA, n = 5). De forma análoga, el máximo de inhibición de eNPAC era de 679 ± 109 pA a 590 nm (n = 9), el 61 % del valor de eNpHR3.0 solo (1110 ± 333 pA; n = 4). La densidad de corriente de salida para los valores de corriente máximos era de 3,5-5 mW/mm² (3,5 mW/mm² a 590 nm). La validación *in vivo* requerirá la demostración de que el método P2A específico (u otra estrategia enlazadora) es funcional en un circuito concreto u otro tipo de célula (aún por determinar); sin embargo, estos datos en neuronas hipocámpicas cultivadas demuestran que se pueden conseguir potentes fotocorrientes bidireccionales de >500 pA cada una en una única célula, sin interferencia incapacitante de la opsina potenciada por el tráfico.

El amplio espectro de acción conocido de las opsinas microbianas plantea desafíos con respecto a la consecución de múltiples canales de control independientes; de manera interesante, eNpHR3.0 se convierte no solo en una potente herramienta de control óptico en el rojo lejano, sino también en el inhibidor basado en opsina activado por luz azul más potente conocido (>400 pA a 472 nm). De hecho, las estrategias de tráfico de membranas delineadas aquí pueden formar una estrategia generalizable para adaptar diversas opsinas microbianas con propiedades únicas para fines del control optogenético. En una serie final de experimentos, los inventores exploraron si estos y otros principios del tráfico de membrana potenciado podrían permitir la adición de componentes genética y funcionalmente distintos a la caja de herramientas optogenética.

Aunque en la naturaleza existe un número muy grande de genes de opsinas microbianas, los inventores y otros investigadores no han encontrado hasta ahora ninguno que supere eNpHR3.0 (como se describe en el presente documento) con respecto al tamaño de la fotocorriente, requisitos de luz, o cinética (Zhang et al., 2007a; Han y Boyden, 2007; Chow et al., 2010). Es importante continuar expandiendo la caja de herramientas fotogenética, pero los inventores han descubierto que la mayoría de opsinas microbianas tienen un tráfico pobre en las células de mamíferos. Sin embargo, la aplicación de los principios del tráfico para el diseño mediante ingeniería genética de opsinas microbianas reseñado aquí puede permitir que la optogenética continúe haciendo progresar la genómica en los últimos años (Zhang et al., 2008), capitalizando la inmensa diversidad natural de las opsinas microbianas (Zhang et al., 2008; Chow et al., 2010). Los inventores intentan probar la adaptabilidad del principio del tráfico de membrana con la opsina microbiana mejor caracterizada, bacteriorrodopsina (BR) (Stoeckenius y Bogomolni, 1982), de *H. salinarum*, un regulador activado por luz verde de la conductancia de iones transmembrana (Marti et al., 1991).

Los inventores descubrieron que se observaban acumulaciones intracelulares prominentes expresadas en la forma no modificada, similares a las observadas cuando la halorrodopsina de *Natronomonas* se expresa con altos niveles, y no se observaron fotocorrientes. Sin embargo, la adición de la señal de tráfico (TS, como la empleada para eNpHR3.0) entre BR y EYFP mejoró sustancialmente la localización de la membrana y el proceso, con acumulaciones análogas a RE persistentes más pequeñas que se eliminaron con la adición de más señales exportación al RE en el extremo C, FCYENEV. La construcción resultante (eBR, diseñada mediante doble ingeniería genética para un tráfico óptimo de membranas) se toleró bien en neuronas cultivadas, con una marcada localización en la membrana y direccionamiento del proceso. La validación del direccionamiento funcional de la membrana plasmática desveló que eBR podría suministrar normalmente ~50 pA de fotocorriente externa e hiperpolarizaciones de ~10 mV que fueron suficientes para bloquear la formación de espigas en las neuronas piramidales del hipocampo cuando se expusieron a la luz de longitud de onda óptima de 560 nm, proporcionando por tanto otro canal para el control optogenético e ilustrando la generalizabilidad potencial de la estrategia de tráfico de membranas de la opsina microbiana. Más específicamente, como se observa en la Fig. 28B, la luz de quinientos sesenta nanómetros

indujeron fotocorrientes de salida de $46,4 \pm 7,2$ pA en células eBR (media \pm la SEM está representada gráficamente, $n = 12$). La resistencia de entrada de la membrana fue similar para todas neuronas fijadas ($131,6 \pm 19,5$ m Ω). La densidad de potencia luminosa en la muestra fue de 7 mW/mm². Como se observa en la Fig. 28C, las hiperpolarizaciones inducidas por la fueron de $10,8 \pm 1,0$ mV (promedio \pm SEM representado gráficamente, $n = 12$).

5 Los inventores continuaron también estrategias genómicas similares a las que permitieron su identificación de la opsina excitadora desplazada al rojo VChR1 derivada de *Volvox carteri* (Zhang et al., 2008); así, se ha notificado que numerosos microbios presentan sensibilidades de la luz desde el violeta al infrarrojo cercano. Los inventores continuaron de acuerdo con ello su amplia estrategia de minería genómica en bases de datos de secuenciación ambiental, bibliotecas de etiquetas de secuencias expresadas en plantas/microbios (EST), y repositorios de
10 secuenciación aleatoria de genomas completos (WGS) para investigar nuevas rodopsinas con propiedades de canal o bomba y novedosas sensibilidades a la luz (Zhang et al., 2008). Utilizando las secuencias de aminoácidos primarios para ChRs, HRs, y BRs como la secuencia del molde, los inventores continuaron investigando entre especies evolutivamente distintas (Zhang et al., 2008; Chow et al., 2010). Entre otras secuencias candidatas de
15 hospedadores diversos (*Cryptomonas*, *Guillardia*, *Mesostigma*, *Dunaliella*, *Gloeobacter*, etc.), una de estas procedente de *Guillardia theta* era diferente de las GtR1 y GtR2 notificadas anteriormente (Sineshchekov et al., 2005) y mostró una alta homología de aminoácidos con ChR2. Los inventores designaron esta nueva proteína como *G. theta* rodopsina-3 (GtR3), optimizaron el sesgo del codón de GtR3 para la expresión en mamífero, y administraron los genes de la fusión GtR3-EYFP a las neuronas piramidales del hipocampo. En un tema emergente,
20 GtR3 mostró acumulaciones intracelulares y sin fotocorrientes. La aplicación de la señal TS entre GtR3 y EYFP redujo solo en cierta medida las acumulaciones, sino que, junto con la adición de la señal de exportación al RE FCYENEV al extremo C, se suprimieron las acumulaciones y aumentó la localización en la superficie y el proceso observados.

25 El GtR3 modificado resultante hiperpolariza las neuronas del hipocampo en respuesta a 472 nm de luz azul, aunque con corrientes menores que eBR, y podría inhibir también la formación de espigas. Los inventores consiguieron también la inhibición azul de la formación de espigas con una opsina (AR) procedente de *Acetabularia acetabulum* (Tsunoda et al., 2006; Chow et al., 2010) diseñada mediante ingeniería genética para un tráfico mejorado; AR genera poca corriente sola pero se agregó inicialmente libre y requirió solo la adición de la señal TS entre AR y
30 EYFP para la localización funcional en la membrana y la inhibición de la formación de espigas. Las trazas de fijación de corriente y de fijación de tensión de la muestra y los datos de resumen muestran el funcionamiento de GtR3 con luz a 472 nm ($18,5$ mW/mm²) se muestran en las partes izquierda y derecha, respectivamente, de la Fig. 31C. Se muestra un resumen de la fotocorriente de salida inducida por luz en el gráfico de barras de la izquierda de la Fig. 31C, y el correspondiente resumen de la hiperpolarización para el máximo de luz azul se muestra en el gráfico de
35 barras de la derecha. Los fotocorrientes e hiperpolarizaciones correspondientes fueron: $0,5 \pm 0,4$ pA y $0,12 \pm 0,09$ mV para la luz amarilla (589 nm; $7,5$ mW/mm²); $20,0 \pm 6,7$ pA y $5,6 \pm 1,2$ mV para la luz azul (472 nm; $18,5$ mW/mm²); $1,7 \pm 0,9$ pA y $0,6 \pm 0,3$ mV para la luz púrpura (406 nm; 3 mW/mm²) (promedio \pm SEM representado gráficamente; $n = 10$; la resistencia de entrada fue similar para todas las neuronas: $113,5 \pm 24,2$ m Ω).

40 Aunque estos y otros inhibidores de opsinas microbianas publicados no son aún tan potentes como eNpHR3.0 (y por este motivo, los inventores continúan con eNpHR3.0 para las aplicaciones optogenéticas), la funcionalidad mejorada conseguida aquí por las modificaciones del tráfico de membrana apuntan a la versatilidad potencial de esta estrategia en la liberación de todo el potencial de la diversidad ecológica, y en las estrategias individualizadas que se
45 indicarán para diferentes genes de opsinas microbianas. La Fig. 29A muestra estrategias de direccionamiento subcelular generales para adaptar genes microbianos de opsinas a la biología de sistemas de metazoos intactos. La Fig. 29B muestra el refinamiento del direccionamiento en niveles tisulares y subcelulares (se han descrito anteriormente métodos de direccionamiento de opsinas subcelulares, véase Gradinaru et al. [2007] y Lewis et al., [2009]; se describen en el presente documento métodos de direccionamiento de opsinas tisulares/transcelulares).

50 Los enfoques optogenéticos encontraron anteriormente utilidad sustancial en el control de procesos biológicos y comportamiento en mamíferos que se mueven libremente (Adamantidis et al., 2007; Airan et al., 2009; Gradinaru et al., 2009; Petreanu et al., 2007, 2009; Sohal et al., 2009; Tsai et al., 2009) y otros animales (Douglass et al., 2008; Hwang et al., 2007; Lerchner et al., 2007; Zhang et al., 2007a), con la alta precisión temporal que es importante para la biología de sistemas intactos. Los inventores han encontrado que las capacidades específicas de tráfico de
55 membrana diseñadas mediante ingeniería genética para proteínas microbianas es una etapa importante para generar diversas tecnologías optogenéticas para la biología de sistemas intactos. No todas las estrategias de tráfico serán adecuadas para todas las opsinas microbianas, requiriéndose diferentes motivos para opsinas que encuentran dificultades de tráfico en diferentes etapas; por lo tanto, un cuidadoso análisis subcelular con selección lógica de las modificaciones conjuntas adecuadas constituye una estrategia dirigida y basada en principios que puede ser
60 aplicable a todas las opsinas de origen no mamífero, permitiendo por tanto la generación sistemática de novedosas herramientas optogenéticas procedentes de recursos genómicos.

Los inventores habían observado previamente que la inhibición con NpHR y NpHR2.0, aunque útil para muchas aplicaciones (Gradinaru et al., 2009; Sohal et al., 2009; Tønnesen et al., 2009; Arrenberg et al., 2009), puede en
65 algunos casos superarse con una excitación muy fuerte (Sohal et al., 2009). Las hiperpolarizaciones mayores de 100 mV con eNpHR3.0 proporcionan un paso sustancial hacia delante en la potencia de la inhibición óptica. La inhibición

proporcionada ahora con eNpHR3.0 más de 20 veces más fuerte que NpHR inicial, permanece sintonizable con la intensidad de la luz o los ajustes del ciclo de trabajo, como con cualquiera de las herramientas optogenéticas. En el máximo del espectro de acción, corrientes de salida promedio a escala nanoamperios dieron como resultado fácilmente 3,5 mW/mm² de luz amarilla (10 veces menos potencia de luz que la requerida para conseguir corrientes similares con las bombas de protones anteriormente descritas). Al mismo tiempo, eNpHR3.0 preservó la cinética por etapas, recuperación rápida, y la resistencia a la inactivación durante escalas de tiempo largas de NpHR (Zhang et al., 2007a).

eNpHR3.0 es particularmente bien adecuada para aplicaciones *in vivo*, como el inhibidor optogenético más desplazado al rojo y potente hasta la fecha, pero, sin duda, emergerán estrategias adicionales para aumentar la potencia de esta y otras herramientas, y el trabajo del tráfico de membranas como se describe aquí puede permitir inhibidores incluso más potentes en el futuro. Cuando se emplea eNpHR3.0, la inhibición se puede marcar fácilmente si es necesario utilizando promotores más débiles, tiempos de expresión más cortos, o niveles de luz reducidos, manteniendo a la vez el acceso a nuevas longitudes de onda de ~100 nm desplazadas al rojo a partir de informes anteriores (680 nm frente 589 nm) para permitir el funcionamiento en el límite del infrarrojo con penetración más profunda y fotones más seguros. Por supuesto, no solo el gen de la opsina y la fuente de luz seleccionada, sino también la estrategia para el direccionamiento de los elementos del circuito, pueden determinar la eficacia; por ejemplo, el trabajo optogenético sobre modelos parkinsonianos (Gradinaru et al., 2009) mostró que la estimulación cerebral profunda (DBS) terapéuticamente eficaz en el núcleo subtalámico (STN) se inicia probablemente por la actuación de axones aferentes (que a su vez modulan a continuación las redes posteriores y anteriores). Aunque la inhibición basada en fibra óptica directa de los cuerpos de células locales del STN no mostró efectos conductuales comparables con los observados con la modulación directa de axones aferentes, estos resultados no significan que la inhibición del STN no sea importante (por tanto, la modulación axonal optogenética del STN da como resultado la inhibición de la formación de espigas en el STN, como señalaron Gradinaru et al. [2009]). Más bien, estos resultados informaron de cuestiones clínicas significativas duraderas que rodean el mecanismo y se dirigen a DBS mostrando que la modulación axonal constituye el mecanismo terapéutico más probable y un medio muy eficaz para una fuente puntual tal como un electrodo DBS (o fibra óptica) para controlar una estructura o red en una circuitería neural enferma (Gradinaru et al., 2009). Además de estas consideraciones de dirigidas a los elementos del circuito, la intensidad de la luz y la longitud de onda, la elección del promotor, los títulos de virus, el tropismo del virus, el tiempo de expresión de la opsina, la biofísica de la célula diana, y los modelos locales de actividad y modulación endógena afectarán a la eficacia de la inhibición optogenética y deben considerarse cuidadosamente para cada sistema experimental (Cardin et al., 2010).

Para permitir el control de los tipos de células sobre la base de las propiedades de conectividad, los investigadores aprovecharon la administración transcelular de una recombinasa Cre. En primer lugar, en rata, los inventores se dirigieron selectivamente a las neuronas M1 que están implicadas en las conexiones cortico-corticales con S1, y en segundo lugar, los inventores se dirigieron a las neuronas del giro dentado de la formación hipocámpica implicadas en las proyecciones interhemisféricas; en ambos casos, las células se dirigieron definidas solo por la conectividad, sin el uso de fragmentos de promotores específicos de tipo célula o animales transgénicos. En cada sistema, esta estrategia debe validarse para la direccionalidad (antero o retrógrada) y la extensión del transporte de Cre, que puede depender de la dinámica endosómica específica de célula y del punto temporal de la experimentación; esta estrategia puede también trabajar solo con virus en lugar de con transgénesis de ratones, permitiendo el acceso de Cre al ADN episómico. Esta estrategia es más adecuada para vectores que no transducen directamente los terminales axónicos, que puede no ser el caso de todos los serotipos VAA (como los inventores y otros investigadores han observado en algunos circuitos [Paterna et al., 2004]). Cualquier transducción directa de los terminales axónicos puede detectarse o descartarse con marcadores XFP adecuados, y en algunos casos, puede ser deseable la transducción directa de terminales axónicos y puede conseguirse con los VFS, algunos serotipos de VAA, y lentivirus pseudotipados; sin embargo, dicho enfoque (a diferencia de la presente estrategia) no permite la selección del tipo de célula postsináptica en los terminales transducidos y no es eficaz con determinados VAA, que son el vector de elección para muchas aplicaciones debido al alto título, penetración en el tejido, seguridad, y tolerabilidad.

El direccionamiento del proceso celular permitido por el tráfico de membranas permite el control de las células que se definen topológicamente, es decir, por el carácter esencial de sus conexiones en el tejido. Actualmente, no se garantiza que el transporte sea sináptico o monosináptico (como en los experimentos de circuitos hipocámpicos, dichas propiedades necesitarán validarse en cada sistema); por lo tanto, la expresión "direccionamiento topológico" en lugar que direccionamiento sináptico se usa aquí para destacar la independencia de la deformación del carácter fundamental de la conexión-una conexión axonal puede tomar cualquier ruta desde A hasta B, y siempre que la conexión esté presente, la estrategia de direccionamiento topológico sigue siendo válida. Esta propiedad es importante en organismos genéticamente menos tratables, pero también de valor sustancial incluso en animales tales como ratones, donde las herramientas de direccionamiento genético son en muchos casos inadecuadas. Por supuesto, las estrategias de direccionamiento genético pueden multiplexarse con el direccionamiento topológico; por ejemplo, la expresión del vector dependiente de Cre y el vector de fusión de Cre pueden controlarse, cada una de ellas, mediante secuencias de direccionamiento genético específicas si están disponibles. Asimismo, la disponibilidad de múltiples canales de control óptico abre la puerta a estrategias de direccionamiento topológico combinatorias.

Al igual que ChR2, NpHR, y VChR1, los inventores señalan que la mayoría de opsinas microbianas pueden beneficiarse del diseño mediante ingeniería genética de proteínas sustanciales para conseguir nuevos tipos de funcionalidad. De hecho, los inventores y otros investigadores han demostrado anteriormente que las estrategias moleculares para la estimulación de opsinas microbianas aumentaron la sensibilidad de la luz (Berndt et al., 2009), aumentaron la magnitud de la fotocorriente (Gradinaru et al., 2007, 2008; Zhao et al., 2008), cinética más rápida (Gunaydin et al., 2010; Lin et al., 2009), y un comportamiento de conmutación biestable (Berndt et al., 2009). Otras posibilidades tales como un espectro de acción desplazado (Zhang et al., 2008; Gunaydin et al., 2010), aumento de la sensibilidad a dos fotones, y cambios en la permeabilidad iónica (por ejemplo, para Ca²⁺) pueden conseguirse también en el futuro.

Aunque la conductancia iónica que regula las opsinas ha sido la más versátil para una traducción rápida (empleando un lenguaje eléctrico común), es también posible el control bioquímico con luz en tipos de células definidos (pero con un conjunto diferente de estrategias, dado que la transducción de la señal microbiana emplea principios diferentes a la señalización de metazoos). De hecho, el control optogenético de rutas de señalización bioquímica bien definidas se ha conseguido recientemente en células cultivadas y en mamíferos que se mueven libremente, utilizando el método optoXR para el control óptico de la señalización del receptor acoplado a la proteína G especificada (Airan et al., 2009). Se ha estudiado una adenilil ciclasa fotoactivable procedente de *Euglena*, aunque con una actividad elevada en la oscuridad que limita la aplicación *in vivo* (Schröder-Lang et al., 2007), y un trabajo posterior en los dominios PAS o LOV sensibles a la luz (Levskaya et al., 2009; Wu et al., 2009) pueden abrir nuevos caminos para controlar la asociación proteína-proteína si se pueden preparar estas estrategias para funcionar en animales vivos.

Los inventores han descubierto que en el sistema nervioso, pueden aplicarse herramientas optogenéticas para sondear las bases del circuito neuronal de la transmisión de información, oscilaciones, locomoción, despertar, y recompensa, así como sondear el funcionamiento de los circuitos neuronales importantes en numerosas enfermedades cerebrales incluyendo la enfermedad de Parkinson y la epilepsia (Adamantidis et al., 2007; Airan et al., 2009; Cardin et al., 2009; Gradinaru et al., 2009; Sohal et al., 2009; Tønnesen et al., 2009; Tsai et al., 2009). Asimismo, los resultados apuntan hasta el momento a una versatilidad sustancial de la estrategia optogenética para diferentes especies animales (Adamantidis et al., 2007; Airan et al., 2009; Aravanis et al., 2007; Arenkiel et al., 2007; Bi et al., 2006; Boyden et al., 2005; Chow et al., 2010; Douglass et al., 2008; Gradinaru et al., 2008, 2009; Hägglund et al., 2010; Han et al., 2009a; Huber et al., 2008; Hwang et al., 2007; Ishizuka et al., 2006; Li et al., 2005; Nagel et al., 2003, 2005; Petreanu et al., 2007, 2009; Tsai et al., 2009; Wang et al., 2007; Zhang et al., 2006, 2007a; Zhang y Oertner, 2007; Zhao et al., 2008). Junto con la fibra óptica (Adamantidis et al., 2007; Aravanis et al., 2007) y conjuntos de electrodos de fibra óptica-electrodo "optroodos" integrados (Gradinaru et al., 2007), incluso células localizadas profundamente en órganos grandes y densos pueden ser accesibles fácilmente y cuestionarse en mamíferos que viven libremente. Los recursos adicionales definidos aquí surgen de la aplicación de estrategias moleculares, celulares, y genómicas para permitir la expansión de las capacidades del control óptico, y, como esta caja de herramientas crece rápidamente, la optogenética puede jugar un papel cada vez más potente y versátil en la biología de sistemas intactos para el control rápido de las células definidas en los tejidos en funcionamiento.

40 Procedimientos experimentales

Construcciones

Todas las variantes NpHR se produjeron mediante amplificación de la PCR de la construcción NpHR-EYFP anteriormente publicada (Zhang et al., 2007b). Todas las opsinas descritas aquí se han optimizado para su expresión en mamíferos cambiando la utilización del codón de cada gen para conformar una distribución de la utilización de codones humanos. Están disponibles mapas y vectores actualizados y se distribuyen libremente desde el laboratorio Deisseroth (afiliado a la Universidad de Stanford, Stanford, California) y se describen en el 2010 *Scientific American*, "Method of the Year," diciembre de 2010 (<http://www.optogenetics.org/>).

La secuencia de aminoácidos de GIR3 sin la secuencia del péptido señal

A S S F G K A L L E F V F I V F A C I T
 L L L G I N A A K S K A A S R V L F P A
 T F V T G I A S I A Y F S M A S G G G W
 V I A P D C R Q L F V A R Y L D W L I T
 T P L L L I D L G L V A G V S R W D I M
 A L C L S D V L M I A T G A F G S L T V
 G N V K W V W W F F G M C W F L H I I F
 A L G K S W A E A A K A K G G D S A S V
 Y S K I A G I T V I T W F C Y P V V W V
 F A E G F G N F S V T F E V L I Y G V L
 D V I S K A V F G L I L M S G A A T G Y
 E S I (SEQ ID NO:1)

5 La secuencia de aminoácidos de GIR3 con la secuencia del péptido señal procedente de Chr2

M D Y G G A L S A V G R E L L F V T N P
 V V V N G S V L V P E D Q C Y C A G W I
 E S R G T N G A S S F G K A L L E F V F
 I V F A C I T L L L G I N A A K S K A A
 S R V L F P A T F V T G I A S I A Y F S

 M A S G G G W V I A P D C R Q L F V A R
 Y L D W L I T T P L L L I D L G L V A G
 V S R W D I M A L C L S D V L M I A T G
 A F G S L T V G N V K W V W W F F G M C
 W F L H I I F A L G K S W A E A A K A K
 G G D S A S V Y S K I A G I T V I T W F
 C Y P V V W V F A E G F G N F S V T F E
 V L I Y G V L D V I S K A V F G L I L M
 S G A A T G Y E S I (SEQ ID NO:5)

La secuencia de aminoácidos de DChR

M R R R E S Q L A Y L C L F V L I A G W
 A P R L T E S A P D L A E R R P P S E R
 N T P Y A N I K K V P N I T E P N A N V
 Q L D G W A L Y Q D F Y Y L A G S D K E
 W V V G P S D Q C Y C R A W S K S H G T
 D R E G E A A V V W A Y I V F A I C I V
 Q L V Y F M F A A W K A T V G W E E V Y
 V N I I E L V H I A L V I W V E F D K P
 A M L Y L N D G Q M V P W L R Y S A W L
 L S C P V I L I H L S N L T G L K G D Y
 S K R T M G L L V S D I G T I V F G T S
 A A L A P P N H V K V I L F T I G L L Y
 G L F T F F T A A K V Y I E A Y H T V P
 K G Q C R N L V R A M A W T Y F V S W A
 M F P I L F I L G R E G F G H I T Y F G
 S S I G H F I L E I F S K N L W S L L G
 H G L R Y R I R Q H I I I H G N L T K K
 N K I N I A G D N V E V E E Y V D S N D
 K D S D V (SEQ ID NO:2)

5 La secuencia de aminoácidos de NpHR

M T E T L P P V T E S A V A L Q A E V T Q R E L F E F V L N
 D P L L A S S L Y I N I A L A G L S I L L F V F M T R G L D

 D P R A K L I A V S T I L V P V V S I A S Y T G L A S G L T
 I S V L E M P A G H F A E G S S V M L G G E E V D G V V T M
 W G R Y L T W A L S T P M I L L A L G L L A G S N A T K L F
 T A I T F D I A M C V T G L A A A L T T S S H L M R W F W Y
 A I S C A C F L V V L Y I L L V E W A Q D A K A A G T A D M
 F N T L K L L T V V M W L G Y P I V W A L G V E G I A V L P
 V G V T S W G Y S F L D I V A K Y I F A F L L L N Y L T S N
 E S V V S G S I L D V P S A S G T P A D D (SEQ ID NO:3)

La secuencia de aminoácidos de BR

M L E L L P T A V E G V S Q A Q I T G R P E W I W L A L G T
 A L M G L G T L Y F L V K G M G V S D P D A K K F Y A I T T
 L V P A I A F T M Y L S M L L G Y G L T M V P F G G E Q N P
 I Y W A R Y A D W L F T T P L L L L D L A L L V D A D Q G T
 I L A L V G A D G I M I G T G L V G A L T K V Y S Y R F V W
 W A I S T A A M L Y I L Y V L F F G F T S K A E S M R P
 E V A S T F K V L R N V T V V L W S A Y P V V W L I G S E G
 A G I V P L N I E T L L F M V L D V S A K V G F G L I L L R
 S R A I F G E A E A P E P S A G D G A A A T S D (SEQ ID
 NO: 4)

5 Cultivos hipocámpicos

Se prepararon neuronas hipocámpicas de cultivos primarios procedentes de crías de ratas P0 Sprague-Dawley. Se aislaron las regiones CA1 y CA3, se digirieron con 0,4 mg/ml de papaína (Worthington, Lakewood, NJ), y se sembraron sobre cubres de vidrio prerrevestidos con 1:30 de Matrigel (Beckton Dickinson Labware, Bedford, MA) a una densidad de 65.000/cm². Los cultivos hipocámpicos que crecieron sobre los cubres se transfectaron o transdujeron a los 4 días *in vitro* (DIV) con los virus emparejados por título para todas las construcciones (dilución final 10⁴ unidades infecciosas (u. i.)/ml en medio de crecimiento neuronal). Se realizaron los registros de fijación de membrana celular completa como se ha descrito anteriormente (Zhang et al., 2007b). Los cultivos hipocámpicos primarios se infectaron a 4r DIV con virus emparejados por títulos (dilución final 10⁴ u.i./ml en medio de crecimiento neuronal). A 14 DIV, los cultivos se fijaron durante 30 min con paraformaldehído al 4 % enfriado en hielo y a continuación se permeabilizaron durante 30 min con saponina al 0,4 % en suero de burro normal al 2 % (NDS). Se llevaron a cabo las incubaciones de anticuerpos primarios durante la noche a 4°C; Los anticuerpos secundarios conjugados con Cy3 (Jackson Laboratories, West Grove, PA) se aplicaron en NDS al 2 % durante 1 h a temperatura ambiente. Se obtuvieron imágenes en un microscopio confocal Leica con un objetivo de inmersión en aceite de 63x/1.4 NA.

Inyección estereotáctica en el cerebro de roedor y registros de optrodos

Ratones adultos y ratas Long Evans se alojaron de acuerdo con los protocolos homologados en Stanford. Se llevaron a cabo todas las cirugías en condiciones asépticas. Los animales se anestesiaron con inyecciones intraperitoneales de un cóctel de ketamina (80 mg/kg)/xilazina (15-20 mg/kg) (Sigma). El virus se administró mediante una jeringuilla de 10 µl y una aguja metálica de calibre 34 fina; el volumen de inyección y el caudal (1 µl a 0,1 µl/min) se controlaron con una bomba de inyección de World Precision Instruments (Sarasota, FL). Para la validación de la funcionalidad de la opsina, se llevó a cabo la estimulación óptica y el registro eléctrico simultáneamente en roedores vivos como se ha descrito anteriormente (Gradinaru et al., 2007) con un optrodo compuesto de un electrodo de tungsteno extracelular (1 MΩ, ~125 µm) unido a la fibra óptica (~200 µm) con la punta del electrodo más profunda (~0,4 mm) que la punta de la fibra para asegurar la iluminación de las neuronas registradas. La fibra óptica se acopló con un láser de diodo a 473 nm (para Chr2) o 560 nm (para eNpHR3.0) (10 mW de salida de la fibra) de CrystaLaser. Se llevaron a cabo los registros de los optrodos en roedores anestesiados con isoflurano al 1,5 %, y el optrodo se colocó a través de pequeñas craneotomías realizadas en las regiones diana anteriores. Se utilizaron pClamp 10 y una placa Digidata 1322A para recoger los datos y generar pulsos de luz a través de la fibra. La señal registrada se filtró con un filtro paso de banda a 300 Hz bajo/5 kHz alto (1800 Microelectrode AC Amplifier).

40 Preparación de los cortes de tejido

Para la preparación de los cortes cerebrales, los ratones o ratas se sacrificaron 4 a 5 semanas después de la inyección de virus. Los roedores se perfundieron con 20 ml de PBS enfriado con hielo, seguido por 20 ml de paraformaldehído al 4 %. A continuación, los cerebros se fijaron durante la noche en paraformaldehído al 4 % y se transfirieron a una solución de sacarosa al 30 % durante 2 días. Los cerebros se congelaron y se prepararon cortes coronales (40 µm) con un criostato Leica SM2000R y se preservaron a 4°C en crioprotector (glicerol al 25 % y etilenglicol al 30 % en PBS). Los cortes (tinción DAPI 1:50.000) se montaron con PVA-DABCO sobre portas de

microscopio, y secciones ópticas confocales individuales (por ejemplo, a través de la región CA1 dorsal, ~1-2,5 mm posterior a bregma o el subículo dorsal, 2,7-3 mm posterior a bregma) se adquirieron utilizando objetivos 10x aéreo y 40x/1,4 NA de inmersión en aceite en un microscopio confocal Leica.

5 Procedimientos experimentales ampliados

Fuentes de opsina

10 Todas las opsinas descritas en el presente documento se han optimizado para su expresión en mamíferos cambiando la utilización del codón de cada gen para asemejarse a la distribución de la utilización de codones humanos (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=9606>). Los números de registro de GenBank para las secuencias AR, BR, y GtR3 originales son DQ074124, M11720, y EG722553.

15 Construcciones de ADN

15 Todas las variantes NpHR se produjeron mediante amplificación de la PCR de la construcción NpHR-EYFP anteriormente publicada (Zhang et al., 2007b) y se clonaron en marco en los sitios de restricción Agel y EcoRI de un lentivirus que transporta los promotores CaMKII α o de la Sinapsina-1 de acuerdo con los protocolos de biología molecular normalizados. Se utilizó una estrategia similar para BR y AR. Se identificó GIR3 a través de búsquedas genómicas. Todas las opsinas descritas aquí se han optimizado para su expresión en mamífero cambiando la utilización del codón de cada gen para conformar una distribución de la utilización de codones humanos (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=9606>), y la secuencia optimizada se sintetizó de forma personalizada (DNA2.0, Inc., Menlo Park, CA). Los números de registro de GenBank para las secuencias AR, BR, y GtR3 originales son DQ074124, M11720, y EG722553. Se construyó el vector pAAV-EF1a-mCherry-IRES-WGA-Cre utilizando protocolos de biología molecular normalizados. Los codones de los genes WGA y Cre se optimizaron para su expresión en células de mamífero. Los genes se sintetizaron mediante DNA2.0 (Menlo Park, CA). Cre se fusionó en marco con el extremo C de WGA, que a la vez se fusionó con IRES. El casete de expresión bicistrónico mCherry-IRES-WGA-Cre se designó utilizando la secuencia EMCV IRES. La estructura principal del plásmido pAAV-EF1a es la misma que se ha descrito anteriormente (Sohal et al., 2009; Tsai et al., 2009). pAAV-hSyn-eNpHR3.0-EYFP-P2A-ChR2H134R-mCherry se construyó con un cebador 120-mer (5'caagttctgctacgagaacgaggtgggctccggagccacgaactctctctgtaaagcaagcagg
20 agacgtggaagaaaccccggtccatggactatggcggcgtttgtctgccg 3') que contenía la región p2A con la secuencia de exportación ER en el extremo 5' y las 20 bases del inicio de hChR2 en el extremo 3'. En primer lugar, el fragmento ChR2(H134R)-mCherry se amplificó usando el cebador de 120 mers como el cebador directo y 5'-
25 atatcgaattctcattactgtacagctcgt-3' como el cebador inverso. En segundo lugar, este producto amplificado se usó como cebador inverso junto con el cebador directo 5'-ccggatccccgggtaccggtaggccaccatgacagagaccctgcct-3' para fusionar eNpHR 3.0-EYFP con ChR2 (H134R)-mCherry, con la región p2A intercalada. El fragmento de 3,4 Kb se purificó y clonó a continuación en los sitios BamHI y EcoRI del vector pAAV-hSyn. Todas las construcciones se secuenciaron completamente para determinar la precisión de la clonación; los mapas actualizados están disponibles
30 en línea en <http://www.optogenetics.org>.

Preparación y titulación de Lentivirus

45 Se produjeron lentivirus para la infección de neuronas cultivadas y para la inyección *in vivo* como se ha descrito anteriormente (Zhang et al., 2007b). Se llevó a cabo la titulación vírica en células HEK293 que se hicieron crecer en placas de 24 pocillos y se inocularon con diluciones en serie de 5 veces en presencia de polibreno (8 μ g/ml). Después de 4 días, los cultivos se volvieron a suspender en PBS y se clasificaron mediante fluorescencia EYFP en un citómetro de flujo FACScan (que recoge 20.000 eventos por muestra) seguido por análisis utilizando el programa informático FlowJo (Ashland, OR). Se determinó el título del virus del siguiente modo: [(% de células infectadas) x (número total de células en un pocillo) x (factor de dilución)] / (volumen de inóculo añadido a las células) = unidades infecciosas/ml. El título de virus para la infección del cultivo fue de 10⁵ u.i./ml. El título de virus concentrado para la inyección *in vivo* fue de 10¹⁰ u.i./ml.

55 Cultivos hipocámpicos

60 Se prepararon neuronas hipocámpicas de cultivos primarios procedentes de crías de ratas P0 Sprague-Dawley. Se aislaron las regiones CA1 y CA3, se digirieron con 0,4 mg/ml de papaína (Worthington, Lakewood, NJ), y se sembraron sobre cubres de vidrio prerrevestidos con 1:30 de Matrigel (Beckton Dickinson Labware, Bedford, MA) a una densidad de 65.000/cm². Se mantuvieron los cultivos en una estufa incubadora húmeda con CO₂ al 5 % con medio Neujrobasal-A (Invitrogen Carlsbad, CA) que contenía FBS al 1,25 % (Hyclone, Logan, UT), suplemento B-27 al 4 % (GIBCO, Grand Island, NY), Glutamax 2 mM (GIBCO), y FUDR (2 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO).

Transfección con fosfato de calcio

65 6-10 neuronas hipocámpicas *div* se hicieron crecer a 65.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos. mezcla de ADN/CaC Cl₂ para cada pocillo: 1.5-3 μ g de ADN (preparación exenta de endotoxina QIAGEN) + 1,875 μ l de CaC

Cl₂ 2M (concentración final de Ca²⁺ 250 mM) en un total de 15 µl de H₂O. A ADN/CaCl₂ se añadieron 15 µl de 2X solución salina tamponada con HEPES (pH 7,05), y el volumen final se mezcló bien pipeteando. después de 20 min a TA, los 30 µl de la mezcla de ADN/CaCl₂/HBS se hicieron gotear en cada pocillo (a partir del cual el medio de crecimiento se ha eliminado temporalmente y se ha sustituido con 400 µl de MEM caliente) y se permitió que la transfección continuara a 37 °C durante 45-60 min. A continuación se lavó cada pocillo con 3 X 1 ml de MEM caliente y se sustituyó el medio de crecimiento. Se observó generalmente la expresión de la opsina en 20-24 h.

Electrofisiología

Los cultivos hipocámpicos que crecieron en cubres se transdujeron a 4 div con virus emparejados por título para todas las construcciones (dilución final 10⁴ u.i./ml en medio de crecimiento neuronal) y se dejaron expresar durante una semana. Se realizaron los registros de fijación de membrana celular completa como se ha descrito anteriormente (solución intracelular: K-gluconato 129 mM, HEPES 10 mM, KCl 10 mM, MgATP 4 mM, Na₃GTP 0,3 mM, titulado a pH 7,2; Tirodo extracelular: NaCl 125 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 3 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 30 mM, y HEPES 25 mM, titulado a pH 7,3). para los registros de fijación de tensión, las células se mantuvieron a -70mV. La luz en el intervalo visible se administró desde una lámpara DG-4 de 300W (Sutter Instruments, Novato, CA) a través de filtros de diferente selectividad de longitud de ondas (Semrock, Rochester, NY) y un objetivo de inmersión en agua Leica 40X/0.8NA. Filtros, excepto para los espectros de potencia (proporcionados aquí como longitud de onda en nm / ancho de banda en nm / potencia de salida en mW/mm²) fueron: 406 / 15 / 3; 472 / 30 / 18,5; 560 / 14 / 7; 589 / 15 / 7,5; 593 / 40 / 15,5; 630 / 20 / 3,5. Administración de luz en el rojo lejano y el infrarrojo cercano: se administró luz (7 mW/ mm²) para una inhibición a 660nm utilizando un diodo emisor de luz y un objetivo de inmersión en agua de 40x/0,8 NA. Se administró luz (7 mW/mm²) para una inhibición a 680 nm utilizando la fuente de luz halógena X-Cite de 120W a través de un filtro de 680 ± 13 nm y un objetivo de inmersión en agua de 40x/0.8 NA. La administración de luz para los espectros de potencia de eNPAC, ChR2(H134R), y eNpHR3.0 se administró desde una lámpara DG-4 de 300W con una rueda de filtros Lambda 10-3 (Sutter Instruments) con una rueda de 10 posiciones para filtros de 25 mm de diferentes longitudes de onda y un objetivo de inmersión en agua de 40X/0,8 NA. Los filtros (proporcionados aquí como longitudes de onda en nm / ancho de banda en nm / potencia de salida en mW/mm²) fueron: 387 / 10 / 3,5; 406 / 15 / 3,5; 427 / 10 / 4,0; 445 / 20 / 4,0; 470 / 22 / 4,0; 494 / 20 / 4,5; 520 / 15 / 4,5; 542 / 27 / 5,0; 560 / 20 / 5,0; 590 / 20 / 3,5; 630 / 20 / 3,5. Para las Figuras 1, 3A-3D, y 4 y la Figura S2 (véase, Tabla 5 siguiente), las imágenes confocales y los datos de fijación de membrana celular completa son de neuronas hipocámpicas cultivadas ya sean transfectadas (datos confocales) o bien transducidas (datos de la ruta) con construcciones basadas en NpHR, BR, GtR3 y AR lentivíricos, y se permitió expresar durante una semana. La expresión se impulsó mediante el promotor de la Sinapsina I y se visualizó mediante la fusión con EYFP.

La Tabla 5 muestra herramientas potenciadas de tráfico adicionales para la inhibición azul, y una nueva secuencia de opsina: rodopsina-3 o GtR3 de *G. theta*.

Tabla 5

	MDYGGALS AVGRELLFVTNPFVVVNGSVLVPEDQC [*] YCAGWIESRGTNCAQTASNVLQWLAA 60
ChR2	-----EGAKLDVHGCKTVDMASSFGKALLEFVF 60
GtR3	----- <u>TM1</u> -----
	GFSILLMFYAYQTKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLR 120
ChR2	IVFACITLLLGINAAKSKAASRVLPATFVTGIASIAYFSMASGGGVIAPDCRQLFVAR 120
GtR3	----- <u>TM2</u> -----
	YAEWLLTCPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFL 180
ChR2	YLDWLITTPLLLDLGLVAGVS---RWDIMALCLSDVLMIAATGAFGSLTVGNVQVWVWFF 177
GtR3	----- <u>TM3</u> ----- <u>TM4</u> -----
	GLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPRGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMPFILFILGPEGFGVL 240
ChR2	GMCWFLHIIFALGKSWAEAAKAK-GGDSASVYSKIAGITVITWFCYPVWVFA-EGFGNF 235
GtR3	----- <u>TM5</u> ----- <u>TM6</u> -----
	SVYGSTVGHITIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILINGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV 300
ChR2	SVTFEVLIIYGVLDVISKAVFGLIILMSGAAATGYESI----- 270
GtR3	----- <u>TM7</u> -----
ChR2	EDEAEAGAVP 310
GtR3	-----

Nueva secuencia de opsina: rodopsina-3 o GtR3 de *G. theta*. La secuencia EST incluyó las siete hélices transmembrana; la secuencia de aminoácidos en 5' se proporcionó a partir de ChR2 (motivos transmembrana: barras; restos conservado; destacados; sitio de truncamiento para el péptido: *; péptido señal proporcionado a partir de ChR2: gris.

Inmunohistoquímica

Los cultivos hipocámpicos primarios se infectaron a 4 div con virus emparejados por títulos (dilución final 10^4 u.i./ml en medio de crecimiento neuronal). A 14 div los cultivos se fijaron durante 30 min con paraformaldehído al 4 %
 5 enfriado en hielo y a continuación se permeabilizaron durante 30 min con saponina al 0,4 % en suero de burro normal al 2 % (NDS). Se llevaron a cabo incubaciones con anticuerpos primarios durante la noche a 4°C utilizando un marcador monoclonal de retículo endoplásmico que reconoce las proteínas endógenas residentes en ER que
 10 contienen la señal de retención KDEL (KDEL 1:200, Abcam, Cambridge, MA). Los anticuerpos secundarios conjugados con Cy3 (Jackson Laboratories, West Grove, PA) se aplicaron en NDS al 2 % durante 1 h a temperatura ambiente. Se obtuvieron imágenes en un microscopio Leica confocal utilizando un objetivo de inmersión en aceite
 63X/1,4NA.

Inyección estereotáctica en el cerebro de roedor

15 Ratones adultos y ratas Long Evans se alojaron de acuerdo con los protocolos homologados en Stanford. Se llevaron a cabo todas las cirugías en condiciones asépticas. Los animales se anestesiaron con inyecciones intraperitoneales de un cóctel de ketamina (80 mg/kg)/xilazina (15-20 mg/kg) (Sigma). La cabeza se colocó en un
 20 aparato estereotáctico (Kopf Instruments, Tujunga, CA; estereomicroscopio Olympus). Se aplicó pomada oftálmica para prevenir la sequedad del ojo. Se realizó una incisión con escalpelo en la línea media del cerebro y se llevó a cabo una craneotomía pequeña utilizando un taladro montado en el aparato estereotáctico (Fine Science Tools,
 25 Foster City, CA). El virus se administró mediante una jeringuilla de 10 μ l y una aguja de metal de calibre 34 fina; se controlaron el volumen de inyección y el caudal (1 μ l a 0,1 Cl₂/min) con una bomba de inyección de World Precision Instruments (Sarasota, FL). Tras la inyección, la aguja se dejó en su lugar durante 5 minutos más, y a continuación se retiró lentamente. La piel se pegó de nuevo con el adhesivo de tejidos Vetbond. el animal se mantuvo en una
 30 manta calefactora hasta que se recuperó de la anestesia. Se administró buprenorfina (0,03 mg/kg) por vía subcutánea tras el procedimiento quirúrgico para minimizar la sensación desagradable. Para el experimento en la Figura 2A, para cubrir un área grande en CA1 dorsal, 1 μ l de lentivirus concentrado (10^{10} u.i./ml) que transporta eNpHR3.1 (una forma más corta de eNpHR3.0 con el péptido señal en el extremo N, los primeros 17 aminoácidos de
 35 NpHR original, eliminado) en el promotor CaMKII α se microinyectaron en 2 sitio en cada hipocampo (sitio uno: anteroposterior -1.5 mm desde bregma; lateral, \pm 1 mm; ventral, 1,5 mm; sitio dos: AP, - 2,5 mm desde bregma; lateral, \pm 2 mm; ventral, 1,5 mm). Para las Figuras 2D y 2E, dos diferentes virus adenoasociados (VAA) (título del virus 2×10^{12} g.c./ml), se inyectaron estereotácticamente durante la misma cirugía con una velocidad de inyección de 0,15 μ l/min. Se produjo un título alto (2×10^{12} g.c./ml) de VAA por el UNC VectorCore. Para la Figura 2D, se inyectó VAA5 de doble flujo dependiente de Cre que transporta eNpHR3.0-EYFP (AAV5-Efla-DIO-eNpHR3.0-EYFP) en M1,
 40 y se inyectó VAA2-Ef1 α -mCherry-IRESWGA-Cre en S1 de ratas Long-Evans adultas. se administró 1 μ l of virus en cinco sitios diferentes definidos por las siguientes coordenadas: inyección I en M1: AP, +1 mm desde bregma; lateral, 1,5 mm; ventral, 2 mm; inyección II en M1: AP, +2 mm; lateral, 1,5 mm; ventral, 2 mm; S1 inyección I: AP, - 0,3 mm; lateral, 3,4 mm; ventral, 2 mm; inyección II en S1: AP, -1,3 mm; lateral, 3 mm; ventral, 2 mm; S1 inyección III: AP, -2,12 mm; lateral, 3 mm; ventral, 2 mm. Para la Figura 2E, se inyectó 1 μ l de virus bilateralmente en el giro dentado (DG) de ratones BL6 adultos. Se inyectó VAA8-EF1a-DIO-ChR2-EYFP en el DG derecho y se inyectó AAV2-EF1a-mCherry-IRES-WGA-Cre en el DG izquierdo con las siguientes coordenadas: AP, -2,1 desde bregma; lateral, \pm 1,05 mm; ventral, 2,1 mm.

Registros de optrodos *in vivo*

45 Para validar la funcionalidad de la opsina en el sistema WGA-Cre, se llevó a cabo la estimulación óptica simultánea y el registro eléctrico en roedores vivos como se ha descrito anteriormente (Gradinaru et al., 2007) utilizando un optrodo compuesto de un electrodo de tungsteno extracelular (1M Ω , \sim 125 μ m) unido a la fibra óptica (\sim 200 μ m) con la punta del electrodo más profunda (\sim 0,4 mm) que la punta de la fibra para asegurar la iluminación de las neuronas
 50 registradas. La fibra óptica se acopló con un láser de diodo a 473 nm (para ChR2) o 560 nm (para eNpHR3.0) (10 mW de salida de la fibra) de Crystalaser. Se llevaron a cabo los registros de los optrodos en roedores anestesiados con isoflurano al 1,5 % y el optrodo se colocó mediante craneotomías pequeñas creadas por encima de las regiones diana. Se utilizaron pClamp 10 y una placa Digidata 1322A para recoger los datos y generar pulsos de luz a través de la fibra. La señal registrada se filtró con un filtro paso de banda a 300Hz bajo/5 kHz alto (1800 Microelectrode AC Amplifier). Para la colocación precisa del par de fibra/electrodo, se utilizó instrumentación estereotáctica.

Preparación de los cortes de tejido

60 Para la preparación de los cortes cerebrales, los ratones o ratas se sacrificaron 4 a 5 semanas después de la inyección de virus. Los roedores se perfundieron con 20 ml de PBS enfriado con hielo, seguido por 20 ml de paraformaldehído al 4 %. A continuación, se fijaron los cerebros durante la noche en paraformaldehído al 4 %, y se transfirieron a una solución de sacarosa al 30 % durante 2 días. Se congelaron los cerebros y se prepararon los cortes coronales (40 μ m) utilizando un criostato Leica SM2000R, y se preservaron a 4 °C en crioprotector (glicerol al 25 %, etilenglicol al 30 %, en PBS). Los cortes (tinción DAPI 1:50.000) se montaron con PVA-DABCO sobre portas de microscopio, y secciones ópticas focales individuales (por ejemplo, a través de la región CA1 dorsal, -1-2,5 mm posterior a bregma o el subículo dorsal, 2,7-3 mm posterior a bregma) se adquirieron utilizando objetivos 10X
 65

varias en aire y 40X/ 1.4NA de inmersión en aceite en un microscopio confocal Leica.

Para los detalles y la discusión adicional de las realizaciones anteriormente señaladas, se puede hacer referencia a "Molecular and Cellular Approaches for Diversifying and Extending Optogenetics" por Viviana Gradinaru et al., Cell 141, 154-165, 2 de abril, 2010.

Referencias

- Adamantidis, A.R., Zhang, F., Aravanis, A.M., Deisseroth, K., y de Lecea, L. (2007). Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450, 420-424.
- Airan, R.D., Thompson, K.R., Fenno, L.E., Bernstein, H., y Deisseroth, K. (2009). Temporally precise *in vivo* control of intracellular signalling. *Nature* 458, 1025-1029.
- Aravanis, A.M., Wang, L.P., Zhang, F., Meltzer, L.A., Mogri, M.Z., Schneider, M.B., y Deisseroth, K. (2007). An optical neural interface: *in vivo* control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *J. Neural Eng.* 4, S143-S156.
- Arenkiel, B.R., Peca, J., Davison, I.G., Feliciano, C., Deisseroth, K., Augustine, G.J., Ehlers, M.D., y Feng, G. (2007). *In vivo* light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron* 54, 205-218.
- Arrenberg, A.B., Del Bene, F., y Baier, H. (2009). Optical control of zebrafish behavior with halorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 17968-17973.
- Berndt, A., Yizhar, O., Gunaydin, L.A., Hegemann, P., y Deisseroth, K. (2009). Bi-stable neural state switches. *Nat. Neurosci.* 12, 229-234.
- Bi, G.Q., y Poo, M.M. (1998). Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J. Neurosci.* 18, 10464-10472.
- Bi, A., Cui, J., Ma, Y.P., Olshevskaya, E., Pu, M., Dizhoor, A.M., y Pan, Z.H. (2006). Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 50, 23-33.
- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., y Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263-1268.
- Cardin, J.A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.H., y Moore, C.I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459, 663-667.
- Cardin, J.A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.H., y Moore, C.I. (2010). Targeted optogenetic stimulation and recording of neurons *in vivo* using cell-type-specific expression of Channelrhodopsin-2. *Nat. Protoc.* 5, 247-254.
- Chow, B.Y., Han, X., Dobry, A.S., Qian, X., Chuong, A.S., Li, M., Henninger, M.A., Belfort, G.M., Lin, Y., Monahan, P.E., y Boyden, E.S. (2010) High-performance genetically targetable optical neural silencing by lightdriven proton pumps. *Nature* 463, 98-102.
- Colechio, E.M., and Alloway, K.D. (2009). Differential topography of the bilateral cortical projections to the whisker and forepaw regions in rat motor cortex. *Brain Struct. Funct.* 213, 423-439.
- Deisseroth, K., Feng, G., Majewska, A.K., Miesenböck, G., Ting, A., y Schnitzer, M.J. (2006). Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J. Neurosci.* 26, 10380-10386.
- Douglass, A.D., Kraves, S., Deisseroth, K., Schier, A.F., y Engert, F. (2008). Escape behavior elicited by single, channelrhodopsin-2-evoked spikes in zebrafish somatosensory neurons. *Curr. Biol.* 18, 1133-1137.
- Fleischmann, A., Shykind, B.M., Sosulski, D.L., Franks, K.M., Glinka, M.E., Mei, D.F., Sun, Y., Kirkland, J., Mendelsohn, M., Albers, M.W., y Axel, R. (2008). Mice with a "monoclonal nose": perturbations in an olfactory map impair odor discrimination. *Neuron* 60, 1068-1081.
- Freund, T.F., y Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347-470.
- Gradinaru, V., Thompson, K.R., Zhang, F., Mogri, M., Kay, K., Schneider, M.B., y Deisseroth, K. (2007). Targeting and readout strategies for fast optical neural control *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurosci.* 27, 14231-14238.
- Gradinaru, V., Thompson, K.R., y Deisseroth, K. (2008). eNpHR: a *Natronomonas* halorhodopsin enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol.* 36, 129-139.
- Gradinaru, V., Mogri, M., Thompson, K.R., Henderson, J.M., y Deisseroth, K. (2009). Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* 324, 354-359.
- Gunaydin, L.A., Yizhar, O., Berndt, A., Sohal, V.S., Deisseroth, K., y Hegemann, P. (2010). Ultrafast optogenetic control. *Nat. Neurosci.* 13, 387-392.
- Häggglund, M., Borgius, L., Dougherty, K.J., y Kiehn, O. (2010). Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion. *Nat. Neurosci.* 13, 246-252.
- Han, X., y Boyden, E.S. (2007). Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PLoS ONE* 2, e299.
- Han, X., Qian, X., Bernstein, J.G., Zhou, H.H., Franzesi, G.T., Stern, P., Bronson, R.T., Graybiel, A.M., Desimone, R., y Boyden, E.S. (2009a). Millisecond-timescale optical control of neural dynamics in the nonhuman primate brain. *Neuron* 62, 191-198.
- Han, X., Qian, X., Stern, P., Chuong, A.S., y Boyden, E.S. (2009b). Informational lesions: optical perturbation of spike timing and neural synchrony via microbial opsin gene fusions. *Front Mol Neurosci* 2, 12.
- Hofherr, A., Fakler, B., y Klöcker, N. (2005). Selective Golgi export of Kir2.1 controls the stoichiometry of functional Kir2.x channel heteromers. *J. Cell Sci.* 118, 1935-1943.

- Huber, D., Petreanu, L., Ghitani, N., Ranade, S., Hromádka, T., Mainen, Z., y Svoboda, K. (2008). Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature* 451,61-64.
- Hwang, R.Y., Zhong, L., Xu, Y., Johnson, T., Zhang, F., Deisseroth, K., y Tracey, W.D. (2007). Nociceptive neurons protect *Drosophila* larvae from parasitoid wasps. *Curr. Biol.* 17, 2105-2116.
- 5 Ishizuka, T., Kakuda, M., Araki, R., y Yawo, H. (2006). Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neurosci. Res.* 54, 85-94.
- Kalaidzidis, I.V., Kalaidzidis, Y.L., y Kaulen, A.D. (1998). Flash-induced voltage changes in halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*. *FEBS Lett.* 427, 59-63.
- 10 Kissa, K., Mordelet, E., Soudais, C., Kremer, E.J., Demeneix, B.A., Brûlet, P., y Coen, L. (2002). *In vivo* neuronal tracing with GFP-TTC gene delivery. *Mol. Cell. Neurosci.* 20, 627-637.
- Lanyi, J.K., y Oesterheld, D. (1982). Identification of the retinal-binding protein in halorhodopsin. *J. Biol. Chem.* 257, 2674-2677.
- Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168-176.
- 15 Lerchner, W., Xiao, C., Nashmi, R., Slimko, E.M., van Trigt, L., Lester, H.A., y Anderson, D.J. (2007). Reversible silencing of neuronal excitability in behaving mice by a genetically targeted, ivermectin-gated Cl-channel. *Neuron* 54, 35-49.
- Levskaia, A., Weiner, O.D., Lim, W.A., y Voigt, C.A. (2009). Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* 461,997-1001.
- 20 Lewis, T.L., Jr., Mao, T., Svoboda, K., y Arnold, D.B. (2009). Myosindependent targeting of transmembrane proteins to neuronal dendrites. *Nat. Neurosci.* 12, 568-576.
- Li, X., Gutierrez, D.V., Hanson, M.G., Han, J., Mark, M.D., Chiel, H., Hegemann, P., Landmesser, L.T., y Herlitze, S. (2005). Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 17816-17821.
- 25 Lin, J.Y., Lin, M.Z., Steinbach, P., y Tsien, R.Y. (2009). Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys. J.* 96, 1803-1814.
- Lozier, R.H., Bogomolni, R.A., and Stoebenius, W. (1975). Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halo-bacterium Halobium*. *Biophys. J.* 15, 955-962.
- 30 Marti, T., Otto, H., Mogi, T., Ro" sselet, S.J., Heyn, M.P., y Khorana, H.G. (1991). Bacteriorhodopsin mutants containing single substitutions of serine or threonine residues are all active in proton translocation. *J. Biol. Chem.* 266, 6919-6927.
- Maskos, U., Kissa, K., St Cloment, C., and Brûlet, P. (2002). Retrograde transsynaptic transfer of green fluorescent protein allows the genetic mapping of neuronal circuits in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10120-10125.
- 35 Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., and Bamberg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13940-13945.
- Paterna, J.C., Feldon, J., y Bueler, H. (2004). Transduction profiles of recombinant adeno-associated virus vectors derived from serotypes 2 and 5 in the nigrostriatal system of rats. *J. Virol.* 78, 6808-6817.
- 40 Perreault, M.C., Bernier, A.P., Renaud, J.S., Roux, S., y Glover, J.C. (2006). C fragment of tetanus toxin hybrid proteins evaluated for muscle-specific transsynaptic mapping of spinal motor circuitry in the newborn mouse. *Neuroscience* 141,803-816.
- Petreanu, L., Huber, D., Sobczyk, A., y Svoboda, K. (2007). Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat. Neurosci.* 10, 663-668.
- 45 Petreanu, L., Mao, T., Sternson, S.M., y Svoboda, K. (2009). The subcellular organization of neocortical excitatory connections. *Nature* 457, 1142-1145.
- Ratzliff, A.H., Howard, A.L., Santhakumar, V., Osapay, I., y Soltesz, I. (2004). Rapid deletion of mossy cells does not result in a hyperexcitable dentate gyrus: implications for epileptogenesis. *J. Neurosci.* 24, 2259-2269.
- 50 Ryan, M.D., y Drew, J. (1994). Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J.* 13, 928-933.
- Sano, H., Nagai, Y., and Yokoi, M. (2007). Inducible expression of retrograde transsynaptic genetic tracer in mice. *Genesis* 45, 123-128.
- 55 Sato, M., Kubo, M., Aizawa, T., Kamo, N., Kikukawa, T., Nitta, K., y Demura, M. (2005). Role of putative anionbinding sites in cytoplasmic and extracellular channels of *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin. *Biochemistry* 44, 4775-4784.
- Schröder-Lang, S., Schwärzel, M., Seifert, R., Strünker, T., Kateriya, S., Looser, J., Watanabe, M., Kaupp, U.B., Hegemann, P., y Nagel, G. (2007). Fast manipulation of cellular cAMP level by light *in vivo*. *Nat. Methods* 4, 39-42.
- 60 Shu, X., Royant, A., Lin, M.Z., Aguilera, T.A., Lev-Ram, V., Steinbach, P.A., y Tsien, R.Y. (2009). Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science* 324, 804-807.
- Silberberg, G., Wu, C., y Markram, H. (2004). Synaptic dynamics control the timing of neuronal excitation in the activated neocortical microcircuit. *J. Physiol.* 556, 19-27.
- 65 Simon, S.M., y Blobel, G. (1993). Mechanisms of translocation of proteins across membranes. *Subcell. Biochem.* 21, 1-15.
- Sineshchekov, O.A., Govorunova, E.G., Jung, K.H., Zauner, S., Maier, U.G., y Spudich, J.L. (2005). Rhodopsin-

- mediated photoreception in cryptophyte flagellates. *Biophys. J.* 89, 4310-4319.
- Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O., y Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698-702.
- 5 Stoeckenius, W., and Bogomolni, R.A. (1982). Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 51,587-616.
- Sugita, M., y Shiba, Y. (2005). Genetic tracing shows segregation of taste neuronal circuitries for bitter and sweet. *Science* 309, 781-785.
- Tang, W., Ehrlich, I., Wolff, S.B., Michalski, A.M., Wölfel, S., Hasan, M.T., Lüthi, A., y Sprengel, R. (2009). Faithful expression of multiple proteins via 2A-peptide self-processing: a versatile and reliable method for manipulating brain circuits. *J. Neurosci.* 29, 8621-8629.
- 10 Tengholm, A., y Gylfe, E. (2009). Oscillatory control of insulin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 297, 58-72.
- Tønnesen, J., Sorensen, A.T., Deisseroth, K., Lundberg, C., y Kokaia, M. (2009). Optogenetic control of epileptiform activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12162-12167.
- Tsai, H.C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G.D., Bonci, A., de Lecea, L., y Deisseroth, K. (2009). Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* 324, 1080-1084.
- 15 Tsunoda, S.P., Ewers, D., Gazzarrini, S., Moroni, A., Gradmann, D., y Hegemann, P. (2006). H⁺-pumping rhodopsin from the marine alga *Acetabularia*. *Biophys. J.* 91, 1471-1479.
- Wang, H., Peca, J., Matsuzaki, M., Matsuzaki, K., Noguchi, J., Qiu, L., Wang, D., Zhang, F., Boyden, E., Deisseroth, K., et al. (2007). High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 8143-8148.
- 20 Wu, Y.I., Frey, D., Lungu, O.I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B., y Hahn, K.M. (2009). A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* 461, 104-108.
- Yooseph, S., Sutton, G., Rusch, D.B., Halpern, A.L., Williamson, S.J., Remington, K., Eisen, J.A., Heidelberg, K.B., Manning, G., Li, W., et al. (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: expanding the universe of protein families. *PLoS Biol.* 5, e16.
- 25 Yoshimura, Y., Dantzer, J.L., y Callaway, E.M. (2005). Excitatory cortical neurons form fine-scale functional networks. *Nature* 433, 868-873.
- Zhang, Y.P., and Oertner, T.G. (2007). Optical induction of synaptic plasticity using a light-sensitive channel. *Nat. Methods* 4, 139-141.
- 30 Zhang, F., Wang, L.P., Boyden, E.S., y Deisseroth, K. (2006). Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat. Methods* 3, 785-792.
- Zhang, F., Wang, L.P., Brauner, M., Liewald, J.F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P.G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A., y Deisseroth, K. (2007a). Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446, 633-639.
- 35 Zhang, F., Aravanis, A.M., Adamantidis, A., de Lecea, L., y Deisseroth, K. (2007b). Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 577-581.
- Zhang, F., Prigge, M., Beyrière, F., Tsunoda, S.P., Mattis, J., Yizhar, O., Hegemann, P., y Deisseroth, K. (2008). Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat. Neurosci.* 11, 631-633.
- 40 Zhao, S., Cunha, C., Zhang, F., Liu, Q., Gloss, B., Deisseroth, K., Augustine, G.J., y Feng, G. (2008). Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity. *Brain Cell Biol.* 36, 141-154.

Las diferentes realizaciones descritas anteriormente se proporcionan solamente a modo de ejemplo. También se divulga el uso de lógica digital o microprocesadores para controlar la luz emitida.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína halorodopsina de *Natronomonas pharaonis* sensible a la luz (NpHR) que comprende en su extremo C una señal de exportación al retículo endoplasmático que tiene la secuencia de aminoácidos FCYENEV y una señal de tráfico de membrana que tiene la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV.
2. Una célula neural que expresa la proteína sensible a la luz de la reivindicación 1.
3. Un vector de transferencia de genes que expresa la proteína sensible a la luz de la reivindicación 1.
- 10 4. El vector de transferencia de genes de la reivindicación 3 que es un lentivirus o un virus adenoasociado.
5. Un método *in vitro* para usar la célula de la reivindicación 2, comprendiendo el método activar con luz la proteína activada por luz.
- 15 6. Un animal no humano que comprende células que expresan la proteína de la reivindicación 1.

Figura 1A

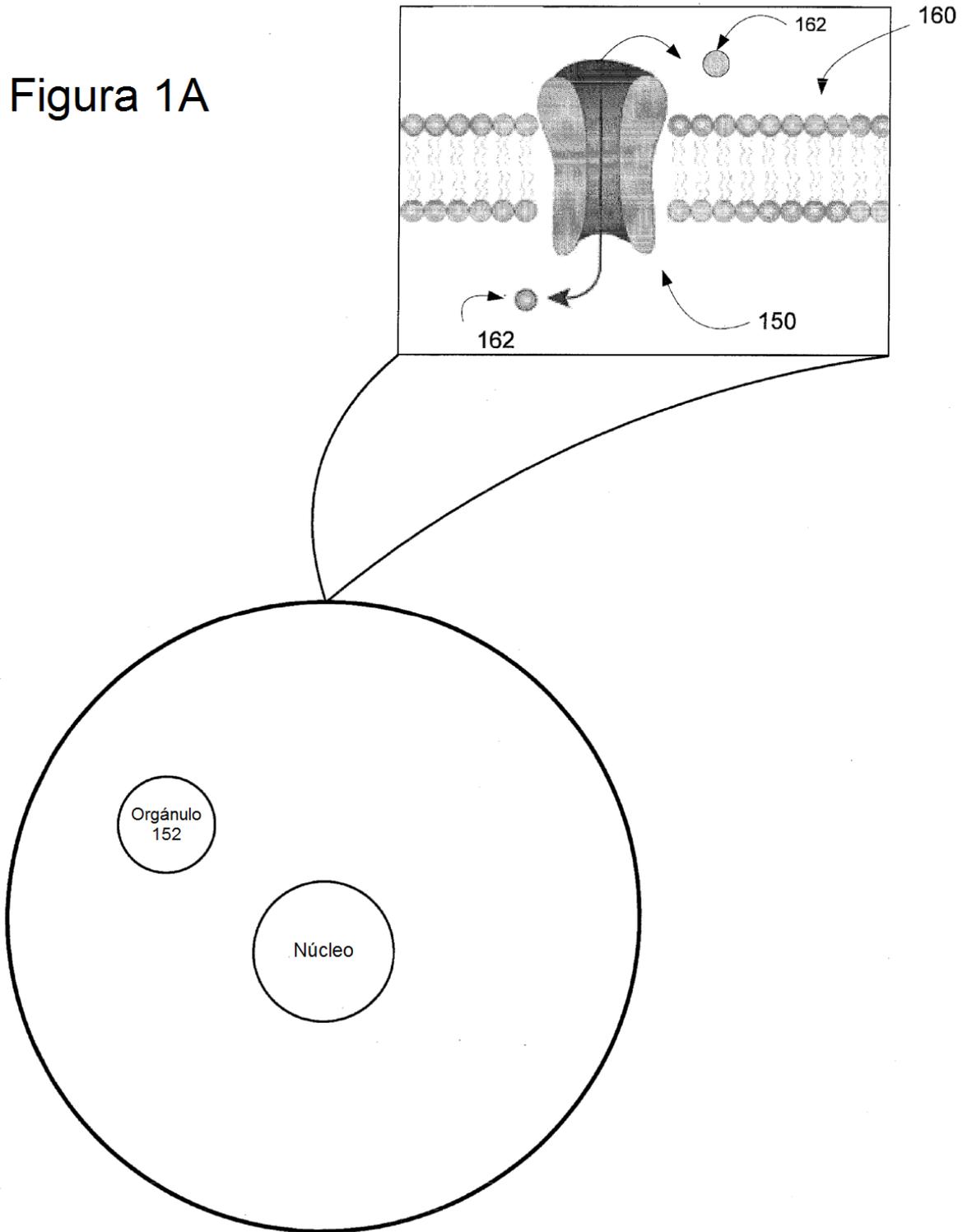


Figura 1B

