

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 819**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C07K 14/405 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2011 PCT/US2011/059276**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061679**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2011 E 11838855 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2635108**

54 Título: **Opsinas quiméricas activadas por luz y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

05.11.2010 US 410736 P

26.07.2011 US 201161511912 P

05.11.2010 US 410744 P

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

17.06.2019

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:

**DEISSEROTH, KARL;
YIZHAR, OFER;
FENNO, LIEF;
HEGEMANN, PETER y
PRIGGE, MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 716 819 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

Opsinas quiméricas activadas por luz y métodos de uso de las mismas

5 **Campo técnico**

La presente solicitud se refiere a composiciones que comprenden células animales que expresan proteínas quiméricas activadas por luz en sus membranas plasmáticas y métodos de uso de las mismas para despolarizar selectivamente neuronas excitadoras o inhibitoras que residen en el mismo microcircuito en la corteza prefrontal.

10

Antecedentes

Los sustratos neurofisiológicos de la mayoría de los trastornos psiquiátricos son poco conocidos, a pesar de que está surgiendo rápidamente información acerca de factores genéticos que se asocian a fenotipos complejos de comportamiento, tales como los observados en el autismo y la esquizofrenia (Cichon et al., *The American Journal of Psychiatry* 166 (5): 540 (2009); O' Donovan et al., *Human Genetics* 126 (1): 3 (2009)). Un principio emergente notable es que una gama muy amplia de anomalías genéticas aparentemente no relacionadas puede dar origen a la misma clase de fenotipo psiquiátrico (tal como una disfunción del comportamiento social; Folstein y Rosen-Sheidley, *Nature Reviews* 2 (12): 943 (2001)). Este patrón sorprendente ha señalado la necesidad de identificar percepciones a nivel de circuito simplificadoras que puedan unificar diversos factores genéticos con un principio fisiopatológico común.

15

20

Una de dichas hipótesis a nivel de circuito es que la elevación en la relación de excitación e inhibición celular cortical (equilibrio E/I celular) podría dar origen a déficits sociales y cognitivos del autismo (Rubenstein, *Current Opinion in Neurology* 23 (2): 118; Rubenstein y Merzenich, *Genes, Brain, and Behavior* 2 (5): 255 (2003)). Esta hipótesis podría posiblemente unificar diversas corrientes de evidencia fisiopatológica, incluyendo la observación de que muchos genes relacionados con el autismo están vinculados a fenotipos de ganancia de función en canales iónicos y proteínas sinápticas (Bourgeron, *Current Opinion in Neurobiology* 19 (2), 231 (2009)) y que el ~30 % de los pacientes autistas también muestran convulsiones clínicamente aparentes (Gillberg y Billstedt, *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 102 (5): 321 (2000)). Sin embargo, no está claro si un desequilibrio de este tipo (para que sea relevante para los síntomas de la enfermedad) sería operativo en la escala temporal crónica (por ejemplo, durante el desarrollo) o aguda. Además, esta hipótesis no se acepta universalmente de ninguna manera, en parte porque aún no se ha expuesto a ensayos directos. Las intervenciones farmacológicas y eléctricas carecen de la especificidad necesaria para favorecer selectivamente la actividad (de una manera fundamentalmente distinta de la modulación del receptor) de las células excitadoras neocorticales sobre las células inhibitoras, ya sea en el entorno clínico o en mamíferos de comportamiento libre durante tareas sociales y cognitivas. Tal vez se relaciona con problemas tales como que los déficits sociales y cognitivos del autismo y la esquizofrenia han demostrado en gran medida no responder a tratamientos psicofarmacológicos convencionales en la clínica.

25

30

35

40

45

50

La optogenética es la combinación de métodos genéticos y ópticos utilizados para controlar eventos específicos en células diana de tejido vivo, incluso en mamíferos que se mueven libremente y en otros animales, con la precisión temporal (en una escala temporal de milisegundos) necesaria para mantener el ritmo con sistemas biológicos intactos en funcionamiento. La característica distintiva de la optogenética es la introducción de proteínas de canal activadas por luz rápidas en las membranas plasmáticas de las células neuronales diana que permite temporalmente la manipulación precisa del potencial de membrana neuronal manteniendo al mismo tiempo la resolución de tipo celular a través del uso de mecanismos específicos de direccionamiento. Entre las opsinas microbianas que pueden usarse para investigar la función de los sistemas neurales están las canalrodopsinas (ChR2, ChR1, VChR1 y SFO) utilizadas para promover la despolarización en respuesta a la luz. En solo unos pocos años, el campo de la optogenética ha promovido la comprensión científica fundamental de cómo tipos celulares específicos contribuyen a la función de tejidos biológicos tales como los circuitos neurales *in vivo*. Además, en el aspecto clínico, la investigación impulsada por la optogenética ha conducido a la comprensión de la enfermedad de Parkinson y otros trastornos neurológicos y psiquiátricos.

55

60

65

Sin embargo, existen limitaciones con respecto a las herramientas optogenéticas existentes para explorar la hipótesis de que la elevación en la relación del equilibrio E/I cortical podría estar asociada a los déficits sociales y cognitivos del autismo y otros trastornos tales como la esquizofrenia. Las fotocorrientes de canalrodopsinas convencionales muestran una desensibilización significativa que impide la generación de cambios progresivos en el equilibrio E/I (en lugar de esto requiere rampas o pulsos, lo que no sería adecuado para la investigación de cambios estables en el equilibrio E/I celular); además, tanto las SFO como las ChR convencionales están impulsadas por luz azul, lo que impide una comparación dentro de la preparación de los efectos de la activación de diferentes poblaciones de elementos del circuito (tales como neuronas excitadoras e inhibitoras). Por tanto, lo que se necesita es una herramienta que permita la manipulación de los equilibrios E/I corticales y el control de las oscilaciones gamma en cortes corticales para permitir la investigación de cómo estas manipulaciones afectan a neuronas corriente abajo que se encuentran en el mismo microcircuito en la corteza prefrontal.

El documento WO2009/131837 y Yizhar et al, *Nature*, vol. 477; 171-178 (2011) describen proteínas ópticamente sensibles. El documento WO2009/119782 describe una proteína rodopsina modificada en la que al menos uno de los dos o más dominios que contienen una estructura transmembrana en la proteína rodopsina de tipo canal fotorreceptor es un dominio que contiene una estructura transmembrana correspondiente derivado de la canalopsina-1 de *Chlamydomonas reinhardtii* o un mutante del dominio que contiene una estructura transmembrana y/o al menos uno de los dos o más dominios que contienen una estructura transmembrana es un dominio que contiene una estructura transmembrana correspondiente derivado de la canalopsina-2 de *Chlamydomonas reinhardtii* o un mutante del dominio que contiene una estructura transmembrana.

10 Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un polipéptido quimérico activado por luz que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene más del 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, en la que el polipéptido es sensible a la luz y es capaz de mediar una corriente de despolarización en una célula cuando la célula se ilumina con luz.

La presente divulgación también establece una serie de otros métodos como se explica ("se proporciona en el presente documento") a continuación. Sin embargo, la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

20 En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden canales catiónicos de proteínas activadas por luz quiméricas que son capaces de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz.

25 En el presente documento se proporcionan células animales que comprenden una proteína activada por luz expresada en la membrana celular, en las que la proteína es (a) una proteína quimérica derivada de VChR1 de *Volvox carteri* y ChR1 de *Chlamydomonas reinhardtii*, en la que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de VChR1 que tiene al menos las hélices transmembrana primera y segunda reemplazadas por las hélices transmembrana primera y segunda de ChR1; (b) es sensible a la luz; y (c) es capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos aspectos, las células están aisladas o están en un medio de cultivo celular.

30 En el presente documento también se proporciona una población de células que comprende la célula que expresa la proteína quimérica que se describe en el presente documento en la membrana celular. También se proporcionan en el presente documento animales no humanos y cortes de tejido cerebral que comprenden una célula que expresa la proteína quimérica que se describe en el presente documento en la membrana celular.

35 En el presente documento se proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína activada por luz expresada en la membrana celular, en el que la proteína es una proteína quimérica derivada de VChR1 de *Volvox carteri* y ChR1 de *Chlamydomonas reinhardtii*, en el que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de VChR1 que tiene al menos las hélices transmembrana primera y segunda reemplazadas por las hélices transmembrana primera y segunda de ChR1; es sensible a la luz; y es capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. También se proporcionan vectores (tales como vectores de expresión) que comprenden los polinucleótidos. En algunos aspectos, el vector de expresión es un vector vírico (por ejemplo, un vector AAV, un vector retrovírico, un vector adenovírico, un vector del VHS o un vector lentivírico).

40 En el presente documento también se proporcionan métodos de uso de las células animales que expresan la proteína quimérica que se describe en el presente documento en la membrana celular, los métodos comprenden activar la proteína quimérica con luz.

45 En el presente documento también se proporcionan métodos de despolarización selectiva de neuronas excitadoras o inhibitoras que se encuentran en el mismo microcircuito, comprendiendo los métodos: despolarizar selectivamente una neurona excitadora que comprende una primera proteína activada por luz, en la que la primera proteína activada por luz se despolariza cuando se expone a luz que tiene una primera longitud de onda; o despolarizar selectivamente una neurona inhibitora que comprende una segunda proteína activada por luz, en la que la segunda proteína activada por luz se despolariza cuando se expone a luz que tiene una segunda longitud de onda.

50 En algunas realizaciones, la primera o la segunda proteína activada por luz es una proteína quimérica derivada de VChR1 de *Volvox carteri* y ChR1 de *Chlamydomonas reinhardtii*, en las que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de VChR1 que tiene al menos las hélices transmembrana primera y segunda reemplazadas por las hélices transmembrana primera y segunda de ChR1. En algunas realizaciones, en las que la primera proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7 y en las que la segunda proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 11, 12, 13 o 14.

65 Un método de despolarización selectiva de neuronas inhibitoras o excitadoras que se encuentran en el mismo microcircuito, comprendiendo el método: expresar una primera proteína activada por luz en una neurona excitadora;

y expresar una segunda proteína activada por luz en una neurona inhibitora, en el que la primera proteína activada por luz se despolariza independientemente cuando se expone a luz que tiene una primera longitud de onda y en el que la segunda proteína activada por luz se despolariza independientemente cuando se expone a luz que tiene una segunda longitud de onda. En algunas realizaciones, la primera o la segunda proteína activada por luz es una proteína quimérica derivada de VChR1 de *Volvox carteri* y ChR1 de *Chlamydomonas reinhardtii*, en las que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de VChR1 que tiene al menos las hélices transmembrana primera y segunda reemplazadas por las hélices transmembrana primera y segunda de ChR1. En algunas realizaciones, la primera proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7 y en las que la segunda proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 11, 12, 13 o 14.

En el presente documento también se proporcionan métodos para identificar un compuesto químico que inhiba selectivamente la despolarización de neuronas excitadoras o inhibitoras que se encuentran en el mismo microcircuito, comprendiendo el método: (a) despolarizar selectivamente una neurona excitadora que comprende una primera proteína activada por luz con luz que tiene una primera longitud de onda o despolarizar selectivamente una neurona inhibitora que comprende una segunda proteína activada por luz con luz que tiene una segunda longitud de onda; (b) medir un potencial postsináptico excitador (PPSE) en respuesta a la despolarización selectiva de la neurona que comprende una primera proteína activada por luz o medir una corriente postsináptica inhibitora (CPSI) en respuesta a la despolarización selectiva de una neurona inhibitora que comprende una segunda proteína activada por luz; (c) poner en contacto la neurona excitadora o la neurona inhibitora con un compuesto químico; (d) medir el potencial postsináptico excitador (PPSE) o medir la corriente postsináptica inhibitora (CPSI) para determinar si poner en contacto ya sea la neurona excitadora o la neurona inhibitora con el compuesto químico inhibe selectivamente la despolarización de cualquiera de las neuronas. En algunas realizaciones, la primera o la segunda proteína activada por luz es una proteína quimérica derivada de VChR1 de *Volvox carteri* y ChR1 de *Chlamydomonas reinhardtii*, en las que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de VChR1 que tiene al menos las hélices transmembrana primera y segunda reemplazadas por las hélices transmembrana primera y segunda de ChR1. En algunas realizaciones, la primera proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7 y en las que la segunda proteína activada por luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 11, 12, 13 o 14.

Ha de entenderse que una, algunas o todas las propiedades de las diversas realizaciones que se describen en el presente documento pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente invención. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes para un experto en la materia.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa la modificación por ingeniería genética de una canalrodopsina mejorada desplazada al rojo para optogenética combinatoria. (a) Imágenes confocales de neuronas de hipocampo cultivadas transfectadas con VChR 1-eYFP o C1V1-eYFP bajo el control del promotor CaMKIIa. El recuadro denota la región expandida en el último panel, que muestra la ubicación de la membrana dendrítica de C1V1-tsYFP. Barras de escala: 20 μm (izquierda), 4 μm (derecha). (b) Fotocorrientes máximas a partir de registros de pinzamientos zonales de células enteras en neuronas de hipocampo en cultivo que expresaban las opsinas indicadas. (c) Alineación de secuencias de ChR1, ChR2 y VChR1. Se indican sitios de corte y empalme para dos variantes de C1V1. Las hélices transmembrana putativas 1-7 se indican con barras (TM1-7); los aminoácidos mutados se indican en gris. (d) Amplitudes de fotocorriente registradas en células HEK que expresaban las variantes 1 y 2 de corte y empalme de C1V1. (e) Imágenes del plano confocal único de neuronas de hipocampo cultivadas transfectadas con opsinas indicadas, fusionadas con EYFP. La concentración de ADN se emparejó en las construcciones. (f) Espectros de acción de ChR2, VChR1, C1V1 wt, C1V1 (E122T), C1V1 (E162T) y C1V1 (E122T/E162T). Se recogieron fotocorrientes con pulsos de luz de 2 ms en células HEK293. (g) Permeabilidad iónica de la variante 1 de corte y empalme de C1V1 medida por magnitud de fotocorriente a -40 mV en células HEK mediante pinzamiento zonal de células completas usando soluciones externas de aislamiento de cationes. Los datos se normalizaron a la corriente de Na de pico máximo. (h) Esquema de la quimera C1V1 con posiciones de mutaciones puntuales indicadas en blanco. Secuencia de ChR1 indicada con negro; Secuencia de VChR1 con gris.

La FIG. 2 muestra el ensayo de una canalrodopsina desplazada al rojo mejorada para optogenética combinatoria. (a) Rastros representativos y gráfico de sumario de la constante de tiempo de cierre de canal (t_{off}) en neuronas cultivadas que expresaban las opsinas indicadas; los trazos se normalizan a la corriente máxima. (b) Inactivación de C1V1-E122T comparada con la desactivación de ChR2. (c) Inactivación de la corriente en el mutante doble E122T/E162T de C1V1 frente a otras variantes de C1V1. (d) Fotocorrientes de pico promedio registradas en neuronas cultivadas que expresaban las opsinas indicadas en respuesta a un pulso de luz de 542 nm de 2 ms.

La FIG. 3 representa fotocorrientes a partir de registros de cortes agudos en neuronas piramidales prefrontales. (a) Las fotocorrientes máximas muestran una correlación uniforme con la intensidad de fluorescencia integrada. (b) Relación de fluorescencia-fotocorriente en ChR2(H134R) y C1V1 (E122T/E162T). Las líneas negras son

ajustes lineales a los datos. **(c)** Registros de cortes agudos en neuronas piramidales prefrontales estimuladas con series de pulsos de luz de 560 nm o inyecciones de corriente a las frecuencias indicadas. El gráfico de sumario muestra datos de población ($n = 6$). **(d)** Fracción de picos satisfactorios con respecto a inyecciones de corriente (200 pA, pulsos de 10 ms; parte superior a la izquierda) o pulsos de luz de 2 ms en las longitudes de onda y densidades de potencia lumínica indicadas. Todas las series de pulsos consistieron en pulsos de 20x2 ms entregados a través del objetivo del microscopio usando una fuente de luz Sutter DG-4, filtrados usando filtros de paso de banda de 20 nm y filtros de densidad neutra adicionales para atenuar la potencia lumínica ($n = 6$ células en 2 cortes). **(e)** Respuestas de pinzamiento de voltaje a pulsos de luz de 542 nm y 630 nm en células que expresaban C1V1-E122T o C1V1-E122T/E162T (parte superior). El registro de pinzamiento de corriente en una célula que expresa C1V1-E122T muestra picos en respuesta a una serie de 5 Hz de luz de 50 ms a 630 nm a $3,2 \text{ mW mm}^{-2}$ (parte inferior). **(f)** Cinética de la respuesta a la luz roja en C1V1 (E122T). Constantes de tiempo de activación (τ_{on}) de fotocorrientes registradas de neuronas cultivadas que expresan C1V1 (E122T) a 540 nm y 630 nm. Obsérvese que las potencias lumínicas fueron de $3,2 \text{ mW mm}^{-2}$ a 630 nm y de $7,7 \text{ mW mm}^{-2}$ a 540 nm ($n = 5$ células, $p = 0,0006$ ensayo t pareado). **(g)** Los trazos de pinzamiento de voltaje muestran respuestas en una neurona que expresa C1V1 (E122T) a pulsos de luz de 630 nm. Las longitudes de pulso se indican sobre los trazos. La τ_{on} calculada a partir del trazo de 150 ms es de 67 ms. **(h)** Registro de pinzamiento de corriente desde una neurona que expresa C1V1 (E122T) que muestra picos provocados por pulsos de 50 ms a 630 nm (densidad de potencia de $3,2 \text{ mW mm}^{-2}$).

La **FIG. 4** representa la activación independiente de neuronas piramidales excitadoras y células que expresan parvalbúmina inhibitoras. **(a)** Registros de pinzamiento de corriente de neuronas del hipocampo cultivadas que expresaban C1V1 (E1 22T/E162T) o ChR2(H134R) en respuesta a pulsos de luz de 2 ms a 560 nm o 405 nm (5 Hz; $7,6 \text{ mW/mm}^2$ a las dos longitudes de onda). **(b)** Configuración de registro en animales doblemente inyectados que expresaban C1V1 en neuronas piramidales corticales y ChR2(H134R) en interneuronas inhibitoras positivas para parvalbúmina. Para expresar opsinas de forma independiente, se inyectaron ratones PV::Cre con una mezcla de dos virus que contenía Lenti-CaMK11 α -C1V1 (E122T/E162T) y AAV5-EF 1a-DIO-Ch R2 (H 134R). **(c)** Registros de pinzamiento de voltaje de una neurona PYR sin expresión que recibe entrada sináptica de células PYR que expresaban C1V1 y células PV que expresaban ChR2. Pinzadas a 0 mV, los pulsos de luz de 405 nm disparan CPSI de latencia corta, mientras que los pulsos de 560 nm provocan solo respuestas sinápticas inhibitoras pequeñas y de latencia larga. **(d)** Registro de pinzamiento de voltaje de la misma célula que se muestra en **c**. Pinzada a -65 mV, los pulsos de luz de 560 nm disparan las CPSE, pero los pulsos de 405 nm no provocan corrientes sinápticas detectables. Las líneas grises muestran eventos individuales; las líneas negras muestran promedios disparados por pulsos de luz. **(e)** Registro de Optrode mPFC en un ratón PV::Cre anestesiado inyectado con CaMKIIa::C1V1 (E162T)-ts-eYFP y Efla-DIO::ChR2eYFP (el diagrama ilustra la configuración experimental). Los pulsos de luz violeta (405 nm) se presentan con un retardo variable (Δt) con respecto a los pulsos de luz verde (trazos de ejemplo). **(f)** El gráfico de sumario muestra la probabilidad de que se produzcan picos evocados por luz verde con pulsos de luz violeta que preceden a los pulsos de luz verde por los retrasos indicados. Los puntos individuales son de registros individuales. La línea negra muestra el promedio de todos los registros (> 3 sitios de registro por contenedor). **(g)** Registro de Optrode de un ratón inyectado con virus que muestra una presunta unidad piramidal y una presunta unidad PV, disparando en respuesta a una estimulación de 561 nm (*derecha*, forma de onda superior) y una estimulación de 405 nm (*derecha*, forma de onda inferior), respectivamente.

La **FIG. 5** representa la excitación optogenética combinatoria en distintas preparaciones de sistemas intactos. **(a)** Control de proyección combinatoria con C1V1-E122T/E162T y ChR2-H134R *in vitro*. Paradigma experimental que muestra la expresión de C1V1 y ChR2 en células cortico-talámicas (CT) y tálamo-corticales (TC) ventrobasales (VB), respectivamente. **(b)** Registro de pinzamiento por voltaje de una célula nRT que recibe proyecciones tanto de células CT como de células TC. La estimulación simultánea ($\Delta t = 0$ ms) conduce a una suma lineal de CPSE provocadas desde ambas proyecciones. **(c)** Las entradas de subumbral inferiores individuales de las fibras TC y CT conducen a la propagación en una neurona nRT solo cuando las entradas son precisamente coincidentes. **(d)** Los retrasos entre las entradas CT y TC se indican a la izquierda. Las líneas discontinuas horizontales indican picos truncados. El número normalizado de potenciales de acción (de 6 células nRT) provocados por las fibras CT y TC activadas con latencias variables (Δt) indica que las entradas de CT y TC conducen a una integración eficaz solo si coinciden en 5 ms. Los datos de sumario representan la media \pm ETM.

La **FIG. 6** representa la separación espectrot temporal y el control combinatorio: modulación de circuitos y patrones emergentes en estados E/I alterados con actividad sináptica en curso. **(a)** Paradigma experimental para la activación de SSFO de las neuronas PV y la activación de C1V1 en las neuronas piramidales. **(b)** Registro de pinzamiento por voltaje a 0 mV de una neurona piramidal en una preparación de corte agudo de un ratón PV::Cre que expresa CaMKIIa::C1V1 (E162T) y DIO-SSFO. SSFO y C1V1 se activan mediante un pulso de luz azul (2) y la frecuencia de CPSI se incrementa mediante la actividad sostenida de SSFO (3; compárense los trazos superior e inferior en el recuadro para la actividad de CPSI anterior y posterior a la activación). Un pulso de luz amarilla sostenido desactiva SSFO y activa C1V1 y aumenta transitoriamente la frecuencia de CPSI (4). Los espectros de potencia de la población (*derecha*) muestran una actividad de frecuencia gamma durante la activación de la neurona excitadora óptica (pulso de 590 nm) que aumenta durante la coactivación de las neuronas excitadoras y PV (pulso de 470 nm). Los diagramas debajo de los trazos muestran la actividad predicha de C1V1 y SSFO durante el experimento. **(c)** El pico de frecuencia gamma observado no dependía de la estimulación previa de la neurona PV a través de SSFO. **(d)** Sumario de las frecuencias de CPSI de **(b)** y **(c)**

en la línea basal y después del pulso azul o naranja inicial. Los diagramas debajo de los trazos muestran la actividad prevista de C1V1 y SSFO durante el experimento.

Descripción detallada

5 En el presente documento se describen, entre otras cosas, composiciones que comprenden células animales que expresan proteínas quiméricas activadas por luz en sus membranas plasmáticas y métodos de uso de las mismas para despolarizar selectivamente neuronas excitadoras o inhibitoras que se encuentran en el mismo microcircuito en la corteza prefrontal. Los inventores han desarrollado proteínas quiméricas que poseen propiedades
10 fisicoquímicas únicas que, por primera vez, permiten la manipulación experimental de elevaciones E/I corticales y la capacidad de controlar las oscilaciones gamma en cortes corticales. Estas proteínas quiméricas sensibles a la luz únicas pueden expresarse en circuitos neurales excitadores o inhibitoras en la corteza prefrontal de animales no humanos que después pueden despolarizarse en respuesta a luz que tiene longitudes de onda particulares. Además, pueden usarse cortes de cerebro de animales no humanos que contienen neuronas corticales excitadoras o inhibitoras que expresan las proteínas quiméricas sensibles a la luz que se desvelan en el presente documento
15 para buscar compuestos químicos que puedan inhibir selectivamente la despolarización de neuronas excitadoras o inhibitoras que se encuentren dentro del mismo circuito neural.

Técnicas generales

20 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que son bien conocidas por los expertos en la materia. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía, tal como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook et al., 1989) y *Molecular Cloning: A
25 Laboratory Manual*, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001), (denominado conjuntamente en el presente documento "Sambrook"); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., editores, 1987, incluyendo los suplementos hasta 2001); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., editores, 1994); Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York; Harlow y Lane (1999) *Using
30 Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (denominado conjuntamente en el presente documento "Harlow y Lane"), Beaucage et al. editores, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000), *Handbook of Experimental Immunology*, 4ª edición (D. M. Weir y C. C. Blackwell, editores, Blackwell Science Inc., 1987); y *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, editores, 1987).

Definiciones

35 Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que se indique lo contrario.

40 Un "animal" puede ser un vertebrado, tal como cualquier organismo modelo de laboratorio común o un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, animales de granja, animales deportivos, mascotas, primates, ratones, ratas y otros roedores.

45 Una "mutación" o "sustitución de aminoácidos" como se usa en el presente documento significa que al menos un componente de aminoácido de una secuencia de aminoácidos definida se altera o sustituye con otro aminoácido que conduce a la proteína codificada por esa secuencia de aminoácidos que tiene una actividad o niveles de expresión alterados dentro de una célula.

50 Una "proteína quimérica" es una proteína que comprende una o más porciones derivadas de una o más proteínas diferentes. Las proteínas quiméricas pueden producirse cultivando una célula recombinante transfectada con un ácido nucleico que codifica la proteína quimérica.

55 Se pretende que cada limitación numérica máxima proporcionada a lo largo de la presente memoria descriptiva incluya todas las limitaciones numéricas inferiores, como si dichas limitaciones numéricas inferiores estuvieran expresamente escritas en el presente documento. Cada limitación numérica mínima proporcionada a lo largo de la presente memoria descriptiva incluirá todas las limitaciones numéricas superiores, como si dichas limitaciones numéricas superiores estuvieran expresamente escritas en el presente documento. Cada intervalo numérico proporcionado a lo largo de la presente memoria descriptiva incluirá cada intervalo numérico más estrecho que caiga dentro de un intervalo numérico más amplio, como si todos esos intervalos numéricos más estrechos estuvieran expresamente escritos en el presente documento.
60

Proteínas quiméricas V1C1 y células que expresan las mismas

65 En algunos aspectos, las células animales que se desvelan en el presente documento comprenden una proteína quimérica sensible a la luz, conocida como "C1V1", que deriva del canal de cationes VChR1 de *Volvox carteri* y el canal de cationes ChR1 de *Chlamydomonas Reinhardtii*. La proteína puede comprender la secuencia de

aminoácidos de VChR1, pero adicionalmente puede tener al menos las hélices transmembrana primera y segunda del polipéptido VChR1 reemplazadas por las hélices transmembrana primera y segunda correspondientes de ChR1. Las proteínas opsinas quiméricas C1V1 se ensamblan a partir de trozos de otras proteínas opsinas que no se expresan bien solas en las neuronas y que son canalrodopsinas potentes, desplazadas al rojo y estables. En algunas realizaciones, la célula animal puede expresar una segunda proteína activada por luz en la membrana plasmática de la célula. La segunda proteína activada por luz puede ser capaz de mediar una hiperpolarización de la membrana plasmática celular en respuesta a la activación por luz. Pueden encontrarse ejemplos de proteínas activadas por luz capaces de mediar una hiperpolarización de la membrana plasmática celular, por ejemplo, en la Publicación PCT N.º: WO2011116238.

Las realizaciones de la presente divulgación también pueden dirigirse hacia versiones modificadas o mutadas de C1V1. Estas proteínas pueden usarse solas o en combinación con otras diversas opsinas para evaluar el control óptico sobre las neuronas. En particular, se cree que el uso de C1V1 modificada, en conjunto con otras opsinas, es útil para el control óptico sobre los trastornos del sistema nervioso. Los usos específicos de C1V1 se relacionan con los sistemas o métodos optogenéticos que correlacionan el control temporal, espacial y/o específico de tipo celular sobre un circuito neural con métricas medibles.

Proteínas quiméricas V1C1

En el presente documento se proporcionan proteínas quiméricas activadas por luz expresadas en una membrana plasmática de células animales. En algunos aspectos, la proteína activada por luz es una proteína quimérica derivada de VChR1 de *Volvox carteri* y ChR1 de *Chlamydomonas reinhardtii*. En algunos aspectos, la proteína quimérica comprende la secuencia de aminoácidos de VChR1 que tiene al menos las hélices transmembrana primera y segunda reemplazadas por las hélices transmembrana primera y segunda correspondientes de ChR1. En otros aspectos, la proteína quimérica comprende la secuencia de aminoácidos de VChR1 que tiene las hélices transmembrana primera y segunda reemplazadas por las hélices transmembrana primera y segunda correspondientes de ChR1 y comprende adicionalmente al menos una porción del dominio de bucle intracelular ubicado entre las hélices transmembrana primera y segunda reemplazadas por la porción correspondiente de ChR1. En algunos aspectos, todo el dominio de bucle intracelular entre las hélices transmembrana segunda y tercera de la proteína activada por luz quimérica puede reemplazarse con el dominio de bucle intracelular correspondiente de ChR1. En otros aspectos, la porción del dominio de bucle intercelular ubicada entre las hélices transmembrana segunda y tercera que se reemplaza con la porción correspondiente de ChR1 puede extenderse a A145 de la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos, la proteína quimérica comprende la secuencia de aminoácidos de VChR1 que tiene las hélices transmembrana primera y segunda y el dominio de bucle intracelular reemplazado por las hélices transmembrana primera y segunda correspondientes y el dominio de bucle intracelular de ChR1 y comprende adicionalmente al menos una porción de la tercera hélice transmembrana reemplazada por la porción correspondiente de CR1. En otro aspecto, la porción de la tercera hélice transmembrana reemplazada por la porción correspondiente de ChR1 puede extenderse a W163 de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz comprende los aminoácidos 1-145 de ChR1 y los aminoácidos 102-316 de VChR1. En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz comprende los aminoácidos 1-162 de ChR1 y los aminoácidos 119-316 de VChR1. En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1 sin la secuencia peptídica señal. En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1.

La proteína quimérica activada por luz es capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos aspectos la luz puede ser luz verde. En otros aspectos, la luz puede tener una longitud de onda de entre aproximadamente 540 nm y aproximadamente 560 nm. En algunos aspectos, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 542 nm. En algunos aspectos, la proteína quimérica puede no ser capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunos aspectos, la proteína quimérica puede no ser capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz que tiene una longitud de onda de 405 nm.

En algunos aspectos, la proteína puede comprender adicionalmente una proteína fluorescente C-terminal. En algunos aspectos específicos, la proteína fluorescente C-terminal puede ser una proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP), una proteína fluorescente verde (GFP), una proteína fluorescente cian (CFP) o una proteína fluorescente roja (RFP). En algunas realizaciones, la proteína quimérica activada por luz se modifica mediante la adición de una señal de tráfico (ts, por sus siglas en inglés) C-terminal que potencia el transporte de la proteína a la membrana plasmática celular. En algunos aspectos, la señal de tráfico deriva de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En algunos aspectos, la señal de tráfico comprende la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV. En algunos aspectos, la secuencia peptídica señal en la proteína puede reemplazarse con una secuencia peptídica señal diferente.

En algunos aspectos, la célula animal puede ser una célula neuronal, una célula muscular o una célula madre. En un aspecto, la célula animal es una célula neuronal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona excitadora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona excitadora puede ser una neurona piramidal. En otros aspectos, la neurona inhibidora puede ser una neurona de parvalbúmina.

5 En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona inhibidora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona inhibidora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano.

10 En algunos aspectos, las células animales pueden comprender adicionalmente una segunda proteína activada por luz expresada en la membrana plasmática de las células. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede ser capaz de mediar una corriente hiperpolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede ser NpHr, eNpHr2.0, eNpHr3.0, eNpHr3.1 o GtR3. Puede encontrarse información adicional con respecto a otros canales catiónicos, bombas de aniones y bombas de protones activados por luz en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º: 2009/0093403; y la Solicitud de Patente Internacional N.º: PCT/US2011/028893. En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz puede tener fotocorrientes potenciadas en células neurales expuestas a la luz con respecto a células que expresan otras proteínas del canal catiónico activadas por luz. En algunos aspectos, la potenciación en la fotocorriente proporcionada por la proteína quimérica activada por luz puede ser cualquiera de 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces o 15 veces, superior a las células que expresan otras proteínas de canales catiónicos activadas por luz, inclusive.

25 En el presente documento también se proporciona una o más proteínas activadas por luz expresadas en una membrana plasmática celular animal, en la que dicha una o más proteínas activadas por luz comprenden una secuencia de aminoácidos de núcleo al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 12, 13 o 14 y que comprende adicionalmente una señal de tráfico (por ejemplo, que potencia el transporte a la membrana plasmática). La señal de tráfico puede fusionarse con el extremo C de la secuencia de aminoácidos de núcleo o puede fusionarse con el extremo N de la secuencia de aminoácidos de núcleo. En algunos aspectos, la señal de tráfico puede unirse a la secuencia de aminoácidos de núcleo 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 comprender adicionalmente una proteína fluorescente, por ejemplo, pero no limitada a, una proteína fluorescente amarilla potenciada, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunas realizaciones, la señal de tráfico puede derivar de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En algunos aspectos, la señal de tráfico puede comprender la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV.

Variantes mutantes quiméricas de V1C1

40 En algunos aspectos, en el presente documento se describen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos sustituidas o mutadas, en los que el polipéptido mutante conserva la naturaleza activable por luz característica del polipéptido quimérico C1V1 precursor, pero también puede poseer propiedades alteradas en algunos aspectos específicos. Por ejemplo, las proteínas quiméricas activadas por luz mutantes que se describen en el presente documento pueden presentar un mayor nivel de expresión tanto dentro de una célula animal como sobre la membrana plasmática de la célula animal; una sensibilidad alterada cuando se expone a diferentes longitudes de onda de luz, en particular la luz roja; y/o una combinación de rasgos por los que el polipéptido C1V1 quimérico posee las propiedades de baja desensibilización, desactivación rápida, baja activación por luz violeta para una activación cruzada mínima con otros canales catiónicos activados por luz, y/o expresión fuerte en células animales.

50 Las proteínas quiméricas activadas por luz que comprenden mutaciones o sustituciones de aminoácidos incluyen aquellas en las que uno o más restos aminoacídicos han experimentado una sustitución de aminoácidos conservando al tiempo la capacidad de responder a la luz y la capacidad de controlar el estado de polarización de una membrana plasmática. Por ejemplo, pueden prepararse proteínas activadas por luz que comprenden mutaciones o sustituciones de aminoácidos sustituyendo uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la invención incluye proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos alteradas en comparación con la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1, como se define en las reivindicaciones, en las que la proteína quimérica activada por luz alterada conserva la naturaleza activada por luz característica y/o la capacidad de regular el flujo de iones a través de las membranas plasmáticas de la proteína con la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1, pero puede tener propiedades alteradas en algunos aspectos específicos.

60 Las sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína nativa pueden ser conservadoras o no conservadoras y dichos restos aminoacídicos sustituidos pueden o no estar codificados por el código genético. El "alfabeto" convencional de veinte aminoácidos se divide en familias químicas basadas en las propiedades químicas de sus cadenas laterales. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales

no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales que tienen grupos aromáticos (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es aquella en la que el resto aminoacídico se reemplaza con un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral químicamente similar (es decir, el reemplazo de un aminoácido que posee una cadena lateral básica con otro aminoácido con una cadena lateral básica). Una "sustitución de aminoácidos no conservadora" es aquella en la que el resto aminoacídico se reemplaza con un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral químicamente diferente (es decir, el reemplazo de un aminoácido que tiene una cadena lateral básica con un aminoácido que tiene una cadena lateral aromática). Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras o no conservadoras. Adicionalmente, las sustituciones de aminoácidos pueden ubicarse en el bolsillo de unión retiniano C1V1, en uno o más de los dominios de bucle intracelular C1V1, y/o en el bolsillo de unión retiniano o en los dominios de bucle intracelular.

En consecuencia, en el presente documento se proporcionan proteínas quiméricas activadas por luz C1V1 que pueden tener sustituciones de aminoácidos específicas en posiciones clave en todo el bolsillo de unión retiniano de la porción VChR1 del polipéptido quimérico. En algunos aspectos, la proteína C1V1 puede tener una mutación en el resto aminoacídico E122 de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la proteína C1V1 puede tener una mutación en el resto aminoacídico E162 de la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos, la proteína C1V1 puede tener una mutación en los restos aminoacídicos E162 y E122 de la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, cada una de las proteínas quiméricas C1V1 mutantes desveladas puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una célula animal en respuesta a la luz.

Polipéptidos mutantes C1V1-E122

En el presente documento se proporcionan las proteínas quiméricas C1V1 activadas por luz que se desvelan en el presente documento expresadas sobre una membrana plasmática de célula animal, en la que uno o más restos aminoacídicos han experimentado una sustitución de aminoácidos conservando al mismo tiempo la actividad de C1V1 (es decir, la capacidad de catalizar la despolarización de una célula animal en respuesta a la activación de la luz) y en las que la mutación puede ser un resto de ácido glutámico que corresponde a E122 de la SEQ ID NO: 1 (C1V1-E122). En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz mutante C1V1-E122 comprende sustituciones introducidas en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 en el aminoácido E122 que puede dar como resultado que la proteína quimérica tenga mayor sensibilidad a la luz, mayor sensibilidad a longitudes de onda particulares de luz, y/o mayor capacidad para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula con respecto a las proteínas quiméricas activadas por luz C1V1 que no tienen una mutación en E122. En algunos aspectos, la mutación puede ser una sustitución de aminoácidos conservadora. En algunos aspectos, la mutación puede ser una sustitución de aminoácidos no conservadora. En algunos aspectos, la mutación en el aminoácido E122 puede ser en la treonina (C1V1-E122T). En otros aspectos, la proteína quimérica activada por luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 3 sin la secuencia peptídica señal. En otros aspectos, la proteína quimérica activada por luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones, la proteína quimérica activada por luz mutante C1V1-E122 puede fusionarse con una señal de tráfico C-terminal. En algunos aspectos, la señal de tráfico puede unirse a la proteína quimérica activada por luz C1V1-E122 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 comprender adicionalmente una proteína fluorescente, por ejemplo, pero no limitada a, una proteína fluorescente amarilla potenciada, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunos aspectos, la señal de tráfico puede derivar de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En algunos aspectos, la señal de tráfico puede comprender la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV.

En otros aspectos, la proteína quimérica C1V1-E122 es capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos aspectos la luz puede ser luz verde. En otros aspectos, la luz puede tener una longitud de onda de entre aproximadamente 540 nm y aproximadamente 560 nm. En algunos aspectos, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 546 nm. En otros aspectos, la proteína quimérica C1V1-E122 puede mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz roja. En algunas realizaciones, la luz roja puede tener una longitud de onda de aproximadamente 630 nm. En algunos aspectos, la proteína quimérica C1V1-E122 puede no ser capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunos aspectos, la proteína quimérica puede no ser capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz que tiene una longitud de onda de 405 nm. En algunos aspectos, la célula animal puede ser una célula neuronal, una célula muscular o una célula madre. En un aspecto, la célula animal puede ser una célula neuronal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona excitadora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona excitadora puede ser una neurona piramidal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona inhibidora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la

neurona excitadora puede ser una neurona piramidal. En otros aspectos, la neurona inhibidora puede ser una neurona de parvalbúmina. En algunos aspectos, las células animales pueden comprender adicionalmente una segunda proteína activada por luz expresada en la membrana plasmática de las células. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede ser capaz de mediar una corriente hiperpolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede ser NpHr, eNpHr2.0, eNpHr3.0, eNpHr3.1 o GtR3.

Polipéptidos mutantes C1V1-E162.

En el presente documento se proporcionan las proteínas quiméricas C1V1 activadas por luz que se desvelan en el presente documento expresadas en una membrana plasmática de una célula animal, en las que uno o más restos aminoacídicos han experimentado una sustitución de aminoácidos conservando al mismo tiempo la actividad de C1V1 (es decir, la capacidad de catalizar la despolarización de una célula animal en respuesta a la activación por luz), en las que la mutación puede ser en un resto de ácido glutámico correspondiente a E162 de la SEQ ID NO: 1 (C1V1-E162). En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz mutante C1V1-E162 comprende sustituciones introducidas en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 en el aminoácido E162 que puede dar como resultado que la proteína quimérica tenga mayor sensibilidad a la luz, mayor sensibilidad a longitudes de onda particulares de luz y/o capacidad aumentada para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula con respecto a las proteínas quiméricas activadas por luz C1V1 que no tienen una mutación en E162. En algunos aspectos, la mutación puede ser una sustitución de aminoácidos conservadora. En algunos aspectos, la mutación puede ser una sustitución de aminoácidos no conservadora. En algunos aspectos, la mutación en el resto aminoacídico E162 puede ser treonina (C1V1-E162T). En otros aspectos, la proteína quimérica activada por luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5 sin la secuencia peptídica señal. En otros aspectos, la proteína quimérica activada por luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5. En otros aspectos, la proteína quimérica activada por luz mutante C1V1-E162 puede fusionarse con una señal de tráfico C-terminal. En algunos aspectos, la señal de tráfico puede unirse a la proteína quimérica activada por luz mutante C1V1-E162 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 comprender adicionalmente una proteína fluorescente, por ejemplo, pero no limitada a, una proteína fluorescente amarilla potenciada, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunos aspectos, la señal de tráfico puede derivar de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En algunos aspectos, la señal de tráfico puede comprender la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV.

En otros aspectos, la proteína quimérica C1V1-E162 es capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos aspectos la luz puede ser luz verde. En otras realizaciones, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 540 nm a aproximadamente 535 nm. En algunos aspectos, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 542 nm. En otros aspectos, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 530 nm. En algunos aspectos, la proteína quimérica C1V1-E162 puede no ser capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunos aspectos, la proteína quimérica puede no ser capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz que tiene una longitud de onda de 405 nm. En algunos aspectos, la proteína quimérica C1V1-E162 puede comprender adicionalmente una proteína fluorescente C-terminal. En algunos aspectos, la célula animal puede ser una célula neuronal, una célula muscular o una célula madre. En un aspecto, la célula animal puede ser una célula neuronal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona excitadora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona excitadora puede ser una neurona piramidal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona inhibidora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona excitadora puede ser una neurona piramidal. En otros aspectos, la neurona inhibidora puede ser una neurona de parvalbúmina. En algunos aspectos, las células animales pueden comprender adicionalmente una segunda proteína activada por luz expresada en la membrana plasmática de las células. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede ser capaz de mediar una corriente hiperpolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede ser NpHr, eNpHr2.0, eNpHr3.0, eNpHr3.1 o GtR3. En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz C1V1-E162 puede tener un fotociclo acelerado con respecto a las proteínas C1V1 que carecen de mutaciones en E162 o con respecto a otras proteínas del canal catiónico activadas por luz. En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz C1V1-E162 puede tener un fotociclo más de 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces o 5 veces más rápido que las proteínas C1V1 que carecen de mutaciones en E162 o con respecto a otras proteínas del canal catiónico activadas por luz, inclusive.

Polipéptidos mutantes dobles C1V1-E122/E162

En el presente documento se proporcionan las proteínas quiméricas C1V1 activadas por luz que se desvelan en el presente documento expresadas en una membrana plasmática de células animales, en las que uno o más restos

aminoácidos han experimentado una sustitución de aminoácidos conservando al mismo tiempo la actividad de C1V1 (es decir, la capacidad de catalizar la despolarización de una célula animal en respuesta a la activación por luz), en las que las mutaciones pueden ser en los restos de ácido glutámico correspondientes a E122 y E162 de la SEQ ID NO: 1 (C1V1-E122/E162). En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz mutante C1V1-E122/E162 puede comprender sustituciones introducidas en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 en los aminoácidos E122 y E162 que pueden dar como resultado que la proteína quimérica tenga mayor sensibilidad a la luz, aumento de la sensibilidad a longitudes de onda particulares de luz y/o aumento de la capacidad para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula con respecto a las proteínas quiméricas activadas por luz C1V1 que no tienen una mutación en E122 y E162. En algunos aspectos, las mutaciones pueden ser sustituciones conservadoras de aminoácidos. En algunos aspectos, las mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos no conservadoras. En algunos aspectos, las mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos tanto conservadoras como no conservadoras. En algunos aspectos, la mutación tanto en el resto aminoácido E122 como en E162 puede ser en la treonina (C1V1-E122T/E162T). En otros aspectos, la proteína quimérica activada por luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 7 sin la secuencia peptídica señal. En otros aspectos, la proteína quimérica activada por luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 7. En otros aspectos, la proteína quimérica activada por luz mutante C1V1-E122/E162 puede fusionarse con una señal de tráfico C-terminal. En algunos aspectos, la señal de tráfico puede unirse con la proteína quimérica activada por luz mutante C1V1-E122/E162 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 comprender adicionalmente una proteína fluorescente, por ejemplo, pero no limitada a, una proteína fluorescente amarilla potenciada, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunos aspectos, la señal de tráfico puede derivar de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En algunos aspectos, la señal de tráfico puede comprender la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV.

En otros aspectos, la proteína quimérica C1V1-E122/E162 es capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos aspectos, la luz puede ser luz verde. En otros aspectos, la luz puede tener una longitud de onda de entre aproximadamente 540 nm y aproximadamente 560 nm. En algunos aspectos, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 546 nm. En algunos aspectos, la proteína quimérica C1V1-E122/E162 puede no ser capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunos aspectos, la proteína quimérica puede no ser capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz que tiene una longitud de onda de 405 nm. En algunos aspectos, la proteína quimérica C1V1-E122/E162 puede presentar menos activación cuando se expone a luz violeta con respecto a las proteínas C1V1 que carecen de mutaciones en E122/E162 o con respecto a otras proteínas del canal catiónico activadas por luz. En algunos aspectos, la célula animal puede ser una célula neuronal, una célula muscular o una célula madre. En un aspecto, la célula animal puede ser una célula neuronal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona excitadora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona excitadora puede ser una neurona piramidal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona inhibitoria ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona inhibitoria puede ser una neurona de parvalbúmina. En algunos aspectos, las células animales pueden comprender adicionalmente una segunda proteína activada por luz expresada en la membrana plasmática de las células. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede ser capaz de mediar una corriente hiperpolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede ser NpHr, eNpHr2.0, eNpHr3.0, eNpHr3.1 o GtR3. En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz mutante C1V1-E122/E162 puede tener una inactivación disminuida con respecto a las proteínas C1V1 que carecen de mutaciones en E122/E162 o con respecto a otras proteínas del canal catiónico activadas por luz. En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz mutante C1V1-E122/E162 puede inactivarse por cualquiera de aproximadamente el 15 %, el 16 %, el 17 %, el 18 %, el 19 %, el 20 %, el 21 %, el 22 %, el 23 %, el 24 %, el 25 %, el 26 %, el 27 %, el 28 %, el 29 % o el 30 % en comparación con las proteínas C1V1 que carecen de mutaciones en E122/E162 o con respecto a otras proteínas de canales catiónicos activadas por luz, inclusive. En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz C1V1-E122/E162 puede tener un fotociclo más de 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces o 10 veces más rápido que las proteínas C1V1 que carecen de mutaciones en E122/E162 o con respecto a otras proteínas de canales catiónicos activadas por luz, inclusive.

60 Motivos de aminoácidos de transporte intracelular potenciado

La presente divulgación proporciona la modificación de proteínas quiméricas activadas por luz expresadas en una célula mediante la adición de uno o más motivos de secuencia de aminoácidos que potencian el transporte a las membranas plasmáticas de células de mamíferos. Las proteínas quiméricas activadas por luz que tienen componentes derivados de organismos evolutivamente más simples pueden no ser expresadas o toleradas por las células de mamíferos o pueden presentar una ubicación subcelular alterada cuando se expresan a niveles altos en

células de mamíferos. En consecuencia, en algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz expresada en una célula se fusiona con uno o más motivos de secuencia de aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en un péptido señal, una señal de exportación del retículo endoplásmico (RE), una señal de tráfico de membrana y una señal de exportación de Golgi N-terminal. Los uno o más motivos de secuencia de aminoácidos que potencian el transporte de proteínas quiméricas activadas por luz a las membranas plasmáticas de las células de mamíferos pueden fusionarse con el extremo N, el extremo C o ambos extremos N y C de la proteína activada por luz. Opcionalmente, la proteína activada por luz y los uno o más motivos de secuencia de aminoácidos pueden separarse mediante un enlazador. En algunos aspectos, la proteína quimérica activada por luz se modifica mediante la adición de una señal de tráfico (ts) que potencia el transporte de la proteína a la membrana plasmática celular. En algunos aspectos, la señal de tráfico deriva de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En algunos aspectos, la señal de tráfico comprende la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV. Se describen motivos de proteínas adicionales que pueden potenciar el transporte de proteínas activadas por luz a la membrana plasmática de una célula en la Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 12/041.628. En algunos aspectos, la secuencia peptídica señal en la proteína quimérica se suprime o se sustituye con una secuencia peptídica señal de una proteína diferente.

Células animales, animales no humanos y cortes de cerebro

En el presente documento se proporcionan células que comprenden las proteínas quiméricas activadas por luz que se desvelan en el presente documento. En algunos aspectos, las células son células animales. En algunos aspectos, las células animales comprenden la proteína C1V1 correspondiente a la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos, las células animales comprenden la proteína C1V1-E122T mutante correspondiente a la SEQ ID NO: 3. En otros aspectos, las células animales comprenden la proteína C1V1-E162T mutante correspondiente a la SEQ ID NO: 5. En otros aspectos, las células animales comprenden la proteína mutante C1V1-E122T/E162T correspondiente a la SEQ ID NO7. En algunos aspectos, la célula animal puede ser una célula neuronal, una célula muscular o una célula madre. En un aspecto, la célula animal puede ser una célula neuronal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona excitadora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona excitadora puede ser una neurona piramidal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona inhibidora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona inhibidora puede ser una neurona de parvalbúmina.

En el presente documento, también se proporcionan animales no humanos que comprenden las proteínas quiméricas activadas por luz que se desvelan en el presente documento expresadas en la membrana celular de las células en los animales. En algunos aspectos, las células animales comprenden la proteína C1V1 correspondiente a la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos, las células animales comprenden la proteína C1V1-E122T mutante correspondiente a la SEQ ID NO: 3. En otros aspectos, las células animales comprenden la proteína C1V1-E162T mutante correspondiente a la SEQ ID NO: 5. En otros aspectos, las células animales comprenden la proteína mutante C1V1-E122T/E162T correspondiente a la SEQ ID NO7. En algunos aspectos, los animales que comprenden las proteínas quiméricas activadas por luz que se describen en el presente documento expresan transgénicamente dichas proteínas quiméricas activadas por luz. En otros aspectos, los animales que comprenden las proteínas quiméricas activadas por luz que se describen en el presente documento se han transfectado de forma vírica con un vector que lleva la proteína activada por luz, tal como, pero no limitado a, un vector adenovírico.

En el presente documento se proporcionan cortes de cerebro vivo de un animal no humano que comprende las proteínas quiméricas activadas por luz que se describen en el presente documento expresadas en la membrana celular de las células en los cortes. En algunos aspectos, los cortes de cerebro son de animales no humanos que expresan transgénicamente las proteínas quiméricas activadas por luz que se describen en el presente documento. En otros aspectos, los cortes de cerebro son de animales no humanos que se han transfectado de forma vírica con un vector que lleva dicha proteína activada por luz, tal como, pero no limitado a, un vector adenovírico. En algunos aspectos, los cortes de cerebro son cortes de cerebro coronal. En algunos aspectos, los cortes del cerebro tienen cualquier espesor de entre aproximadamente 100 µm, aproximadamente 150 µm, aproximadamente 200 µm, aproximadamente 250 µm, aproximadamente 300 µm, aproximadamente 350 µm, aproximadamente 400 µm, aproximadamente 450 µm o aproximadamente 500 µm, inclusive, incluyendo cualquier espesor entre estos números.

Polinucleótidos aislados

En el presente documento se proporcionan polinucleótidos C1V1 aislados que codifican cualesquier polipéptidos quiméricos que se describen en el presente documento que, por ejemplo, tienen al menos una actividad de un polipéptido C1V1. La divulgación proporciona polinucleótidos aislados, sintéticos o recombinantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente el 70 %, por ejemplo, al menos aproximadamente el 71 %, el 72 %, el 73 %, el 74 %, el 75 %, el 76 %, el 77 %, el 78 %, el 79 %, el 80 %, el 81 %, el 82 %, el 83 %, el 84 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 89 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia o una identidad de secuencia completa (100 %) con el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8 en una región de al menos aproximadamente 10, por ejemplo, al menos aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 nucleótidos.

La divulgación proporciona específicamente un ácido nucleico que codifica C1V1 y/o una variante mutante del mismo. Por ejemplo, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada, en la que la molécula de ácido nucleico codifica: (1) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; (2) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; (3) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; o (4) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7.

Promotores y vectores

La divulgación también proporciona casetes y/o vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos descritos anteriormente. Convenientemente, el ácido nucleico que codifica una proteína quimérica de la divulgación está unido operativamente a un promotor. Los promotores son bien conocidos en la técnica. Cualquier promotor que funcione en la célula hospedadora puede usarse para la expresión de C1V1 y/o cualquier variante de la misma de la presente divulgación. Las regiones de control de iniciación o los promotores, que son útiles para impulsar la expresión de una proteína quimérica C1V1 o una variante de la misma en una célula animal específica son numerosas y familiares para los expertos en la materia. Puede usarse prácticamente cualquier promotor capaz de impulsar estos ácidos nucleicos.

Específicamente, cuando se desea la expresión recombinante de proteínas quiméricas C1V1 en una célula neural excitadora, puede usarse un promotor de la proteína quinasa II alfa (CaMKIIa) dependiente de la calmodulina humana. En otros aspectos, puede usarse un promotor del factor de elongación 1a (EF-1a) junto con un vector de AAV recombinante inducible por Cre con ratones transgénicos parvalbuminCre para dirigir las proteínas quiméricas C1V1 a las neuronas inhibitoras.

En el presente documento también se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos que se desvelan en el presente documento que codifican un polipéptido quimérico C1V1 o cualquier variante del mismo. Los vectores que pueden administrarse de acuerdo con la presente divulgación también incluyen vectores que comprenden un polinucleótido que codifica un ARN (por ejemplo, ARNi, ribozimas, miARN, ARNip) que cuando se transcriben a partir de los polinucleótidos del vector darán como resultado la acumulación de proteínas quiméricas activadas por luz en las membranas plasmáticas de las células animales diana. Los vectores que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, vectores lentivíricos, VHS y adenovíricos. Los lentivirus incluyen, pero no se limitan a, VIH-1, VIH-2, VIS, VIF y VAIE. Los lentivirus pueden ser pseudotipados con las proteínas de la envoltura de otros virus, incluyendo, pero no limitados a, VEV, rabia, VLM-Mo, baculovirus y ébola. Dichos vectores pueden prepararse usando métodos convencionales en la técnica.

En algunos aspectos, el vector es un vector de AAV (virus adeno-asociado, por sus siglas en inglés) recombinante. Los vectores de AAV son virus de ADN de tamaño relativamente pequeño que pueden integrarse, de manera estable y específica de sitio, en el genoma de las células que infectan. Son capaces de infectar un amplio espectro de células sin inducir ningún efecto sobre el crecimiento celular, la morfología o la diferenciación y no parecen estar implicados en patologías humanas. El genoma de AAV se ha clonado, secuenciado y caracterizado. Abarca aproximadamente 4700 bases y contiene una región de repeticiones terminales invertidas (ITR, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 145 bases en cada extremo, que sirve como origen de replicación para el virus. El resto del genoma se divide en dos regiones esenciales que llevan las funciones de encapsidación: la parte izquierda del genoma, que contiene el gen rep implicado en la replicación vírica y la expresión de los genes víricos; y la parte derecha del genoma, que contiene el gen cap que codifica las proteínas de la cápside del virus.

La aplicación de AAV como vector para la terapia génica se ha desarrollado rápidamente en los últimos años. El AAV de tipo silvestre podría infectar, con un título comparativamente alto, células en división o no en división o tejidos de mamíferos, incluyendo seres humanos, y también puede integrarse en células humanas en un sitio específico (en el brazo largo del cromosoma 19) (Kotin, R. M. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2211-2215, 1990) (Samulski, R. J. et al, *EMBO J.* 10: 3941-3950, 1991). El vector AAV sin los genes *rep* y *cap* pierde la especificidad de la integración específica de sitio, pero aún puede mediar en la expresión estable a largo plazo de genes exógenos. El vector de AAV existe en células en dos formas, en las que una es episómica fuera del cromosoma; otra está integrada en el cromosoma, con la primera como la forma principal. Además, hasta la fecha no se ha encontrado que el AAV esté asociado a ninguna enfermedad humana, ni se ha observado ningún cambio en las características biológicas que derive de la integración. Existen dieciséis serotipos de AAV publicados en la bibliografía, denominados respectivamente AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 y AAV16, en los que AAV5 se aisló originalmente en seres humanos (Bantel-Schaal y H. zur Hausen. 1984. *Virology* 134: 52-63), mientras que AAV1-4 y AAV6 se encuentran en el estudio del adenovirus (Ursula Bantel-Schaal, Hajo Delius y Harald zur Hausen). *J. Virol.* 1999, 73: 939-947).

Los vectores de AAV pueden prepararse usando métodos convencionales en la técnica. Son adecuados los virus adenoasociados de cualquier serotipo (véase, por ejemplo, Blacklow, págs. 165-174 de "Parvoviruses and Human Disease" J. R. Pattison, ed. (1988); Rose, *Comprehensive Virology* 3:1, 1974; P. Tattersall "The Evolution of Parvovirus Taxonomy" en *Parvoviruses* (JR Kerr, SF Cotmore, ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) p5-14, Hudder Arnold, Londres, Reino Unido (2006) y DE Bowles, JE Rabinowitz, RJ Samulski "The Genus Dependovirus" (JR Kerr, SF Cotmore, ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, editores) p15-23, Hudder Arnold, Londres, Reino Unido (2006). Se pueden encontrar métodos para la purificación de vectores en, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 6566118, 6989264 y 6995006 y WO/1999/011764, tituladas "Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors". La preparación de vectores híbridos se describe, por ejemplo, en la Solicitud PCT N.º PCT/US2005/027091. El uso de vectores derivados de los AAV para transferir genes *in vitro* e *in vivo* ha sido descrito (véase, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional N.º: 91/18088 y WO 93/09239; las Patentes de los EE.UU. N.º 4.797.368, 6.596.535 y 5.139.941; y la Patente Europea N.º: 0488528). Estas publicaciones describen diversas construcciones derivadas de AAV en las que los genes *rep* y/o *cap* se suprimen y se reemplazan por un gen de interés, y el uso de estas construcciones para transferir el gen de interés *in vitro* (a células cultivadas) o *in vivo* (directamente a un organismo). Los AAV recombinantes defectuosos en la replicación de acuerdo con la divulgación pueden prepararse por la cotransfección de un plásmido que contiene la secuencia de ácido nucleico de interés flanqueada por dos regiones de repetición terminal invertida (ITR) de AAV y un plásmido que lleva los genes de encapsidación de AAV (genes *rep* y *cap*), en una estirpe celular que está infectada con un virus auxiliar humano (por ejemplo, un adenovirus). Los recombinantes de AAV que se producen se purifican después mediante técnicas convencionales.

En algunos aspectos, el o los vectores para su uso en los métodos de la divulgación se encapsidan en una partícula vírica (por ejemplo, una partícula vírica de AAV que incluye, pero no se limita a, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 y AAV16). En consecuencia, la divulgación incluye una partícula de virus recombinante (recombinante porque contiene un polinucleótido recombinante) que comprende cualquiera de los vectores que se describen en el presente documento. Se conocen en la técnica métodos para producir dichas partículas y se describen en la Patente de los EE.UU. N.º 6.596.535.

Para las células animales que se describen en el presente documento, se entiende que pueden administrarse uno o más vectores a células neurales, células cardíacas o células madre. Si se usa más de un vector, se entiende que pueden administrarse al mismo tiempo o en diferentes momentos a la célula animal.

Métodos de la divulgación

En el presente documento se proporcionan métodos para despolarizar selectivamente neuronas excitadoras o inhibitoras que se encuentran en el mismo microcircuito mediante la expresión en esas neuronas de las proteínas quiméricas activadas por luz que se describen en el presente documento. En algunos aspectos, una primera proteína activada por luz, como las que se desvelan en el presente documento, puede expresarse en una neurona excitadora, mientras que una segunda proteína activada por luz puede expresarse en una neurona inhibitora. En algunos aspectos, la primera proteína activada por luz expresada en la neurona excitadora puede activarse mediante una longitud de onda de luz diferente a la de la segunda proteína activada por luz expresada en la neurona inhibitora. En algunos aspectos, la primera y la segunda proteínas activadas por luz pueden expresarse en un animal vivo no humano o en una porción de cerebro vivo de un animal no humano.

En otros aspectos, se proporciona un método para identificar un compuesto químico que inhiba selectivamente la despolarización de neuronas excitadoras o inhibitoras que se encuentran en el mismo circuito neural mediante la expresión en esas neuronas de las proteínas quiméricas activadas por luz que se describen en el presente documento. En algunos aspectos, una primera proteína activada por luz puede expresarse en una neurona excitadora, mientras que una segunda proteína activada por luz puede expresarse en una neurona inhibitora. En algunos aspectos, la primera proteína activada por luz expresada en la neurona excitadora puede activarse mediante una longitud de onda de luz diferente a la de la segunda proteína activada por luz expresada en la neurona inhibitora. En algunos aspectos, las proteínas activadas por luz primera y segunda pueden expresarse en un animal vivo no humano o en una porción de cerebro vivo de un animal no humano.

Métodos para alterar selectivamente el equilibrio E/I en neuronas que se encuentran en el mismo microcircuito

En algunos aspectos, se proporciona un método de despolarización selectiva de neuronas excitadoras o inhibitoras que se encuentran en el mismo microcircuito, comprendiendo el método: despolarizar selectivamente una neurona excitadora que comprende una primera proteína activada por luz, en la que la primera proteína activada por luz se despolariza cuando se expone a luz que tiene una primera longitud de onda o despolarizar selectivamente una neurona inhibitora que comprende una segunda proteína activada por luz, en la que la segunda proteína activada por luz se despolariza cuando se expone a luz que tiene una segunda longitud de onda. En algunos aspectos, la primera proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos, la primera proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o

un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la primera proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede comprender una
 5 proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede comprender una
 10 proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 14. Puede encontrarse más información acerca de la divulgación de otros canales catiónicos activados por luz en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 2007/0054319; la Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º: 61/410.704; y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º: WO 2010/056970.

En otros aspectos, se proporciona un método de despolarización selectiva de las neuronas excitadoras o inhibitoras que se encuentran en el mismo microcircuito, comprendiendo el método: expresar una primera proteína activada por luz en una neurona excitadora; y expresar una segunda proteína activada por luz en una neurona inhibitora, en donde la primera proteína activada por luz se despolariza independientemente cuando se expone a luz que tiene una primera longitud de onda y en donde la segunda proteína activada por luz se despolariza independientemente cuando se expone a luz que tiene una segunda longitud de onda. En algunas realizaciones, la primera proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos, la primera proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, la primera proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 14.

En algunos aspectos, la primera proteína activada por luz puede activarse con luz verde. En un aspecto, la primera proteína activada por luz puede activarse mediante luz que tenga una longitud de onda de aproximadamente 560 nm. En un aspecto, la primera proteína activada por luz puede activarse mediante luz roja. En otro aspecto, la primera proteína activada por luz puede activarse mediante luz que tenga una longitud de onda de aproximadamente 630 nm. En otros aspectos, la segunda proteína activada por luz puede activarse mediante luz violeta. En un aspecto, la segunda proteína activada por luz puede activarse mediante luz que tenga una longitud de onda de aproximadamente 405 nm. En otros aspectos, la segunda proteína activada por luz puede activarse mediante luz verde. En algunos aspectos, las proteínas activadas por luz se activan mediante pulsos de luz que pueden tener una duración de aproximadamente 1 milisegundo (ms), aproximadamente 2 ms, aproximadamente 3, ms, aproximadamente 4 ms, aproximadamente 5 ms, aproximadamente 6 ms, aproximadamente 7 ms, aproximadamente 8 ms, aproximadamente 9 ms, aproximadamente 10 ms, aproximadamente 15 ms, aproximadamente 20 ms, aproximadamente 25 ms, aproximadamente 30 ms, aproximadamente 35 ms, aproximadamente 40 ms, aproximadamente 45 ms, aproximadamente 50 ms, aproximadamente 60 ms, aproximadamente 70 ms, aproximadamente 80 ms, aproximadamente 90 ms, aproximadamente 100 ms, aproximadamente 200 ms, aproximadamente 300 ms, aproximadamente 400 ms, aproximadamente 500 ms, aproximadamente 600 ms, aproximadamente 700 ms, aproximadamente 800 ms, aproximadamente 900 ms, aproximadamente 1 segundo, aproximadamente 1,25 segundos, aproximadamente 1,5 segundos o aproximadamente 2 segundos, inclusive, incluyendo los tiempos entre estos números. En algunos aspectos, las proteínas activadas por luz pueden activarse mediante pulsos de luz que pueden tener una densidad de potencia lumínica de cualquiera de entre aproximadamente 0,05 mW mm⁻², aproximadamente 0,1 mW mm⁻², aproximadamente 0,25 mW mm⁻², aproximadamente 0,5 mW mm⁻², aproximadamente 0,75 mW mm⁻², aproximadamente 1 mW mm⁻², aproximadamente 2 mW mm⁻², aproximadamente 3 mW mm⁻², aproximadamente 4 mW mm⁻², aproximadamente 5 mW mm⁻², aproximadamente 6 mW mm⁻², aproximadamente 7 mW mm⁻², aproximadamente 8 mW mm⁻², aproximadamente 9 mW mm⁻², aproximadamente 10 mW mm⁻², aproximadamente

11 mW mm⁻², aproximadamente 12 mW mm⁻², aproximadamente 13 mW mm⁻², aproximadamente 14 mW mm⁻², aproximadamente 15 mW mm⁻², aproximadamente 16 mW mm⁻², aproximadamente 17 mW mm⁻², aproximadamente 18 mW mm⁻², aproximadamente 19 mW mm⁻², aproximadamente 20 mW mm⁻², aproximadamente 21 mW mm⁻², aproximadamente 22 mW mm⁻², aproximadamente 23 mW mm⁻², aproximadamente 24 mW mm⁻² o aproximadamente 25 mW mm⁻², inclusive, incluyendo cualquier valor entre estos números. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona excitadora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona excitadora puede ser una neurona piramidal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona inhibidora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona inhibidora puede ser una neurona de parvalbúmina. En algunos aspectos, las neuronas inhibidoras y excitadoras pueden estar en un animal vivo no humano. En otros aspectos, las neuronas inhibidoras y excitadoras pueden estar en una porción de cerebro de un animal no humano.

Métodos para identificar un compuesto químico que altere selectivamente el equilibrio E/I en neuronas que se encuentran en el mismo microcircuito

En algunos aspectos, se proporciona un método para identificar un compuesto químico que inhiba selectivamente la despolarización de las neuronas excitadoras o inhibidoras que se encuentran en el mismo microcircuito, comprendiendo el método: (a) despolarizar selectivamente una neurona excitadora que comprende una primera proteína activada por luz con luz que tiene una primera longitud de onda o despolarizar selectivamente una neurona inhibidora que comprende una segunda proteína activada por luz con luz que tiene una segunda longitud de onda; (b) medir un potencial postsináptico excitador (PPSE) en respuesta a la despolarización selectiva de la neurona que comprende una primera proteína activada por luz o medir una corriente postsináptica inhibidora (CPSI) en respuesta a la despolarización selectiva de una neurona inhibidora que comprende una segunda proteína activada por luz; (c) poner en contacto la neurona excitadora o la neurona inhibidora con un compuesto químico; (d) medir el potencial postsináptico excitador (PPSE) o medir la corriente postsináptica inhibidora (CPSI) para determinar si el contacto entre la neurona excitadora o la neurona inhibidora con el compuesto químico inhibe selectivamente la despolarización de cualquiera de las neuronas. En algunas realizaciones, la primera proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos, la primera proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la primera proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 5. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 11. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede comprender una proteína al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el compuesto químico puede ser un miembro de una biblioteca química combinatoria. En otros aspectos, el método comprende adicionalmente someter a ensayo el compuesto químico para determinar si afecta adversamente a la función del tejido cardíaco o al potencial de acción cardíaco en los mamíferos.

En algunos aspectos, la primera proteína activada por luz puede activarse con luz verde. En un aspecto, la primera proteína activada por luz puede activarse mediante luz que tenga una longitud de onda de aproximadamente 560 nm. En un aspecto, la primera proteína activada por luz puede activarse mediante luz roja. En otro aspecto, la primera proteína activada por luz puede activarse mediante luz que tenga una longitud de onda de aproximadamente 630 nm. En otros aspectos, la segunda proteína activada por luz puede activarse mediante luz violeta. En un aspecto, la segunda proteína activada por luz puede activarse mediante luz que tenga una longitud de onda de aproximadamente 405 nm. En algunos aspectos, las proteínas activadas por luz pueden activarse mediante pulsos de luz que pueden tener una duración de aproximadamente 1 milisegundo (ms), aproximadamente 2 ms, aproximadamente 3 ms, aproximadamente 4 ms, aproximadamente 5 ms, aproximadamente 6 ms, aproximadamente 7 ms, aproximadamente 8 ms, aproximadamente 9 ms, aproximadamente 10 ms, aproximadamente 15 ms, aproximadamente 20 ms, aproximadamente 25 ms, aproximadamente 30 ms, aproximadamente 35 ms, aproximadamente 40 ms, aproximadamente 45 ms, aproximadamente 50 ms, aproximadamente 60 ms, aproximadamente 70 ms, aproximadamente 80 ms, aproximadamente 90 ms, aproximadamente 100 ms, aproximadamente 200 ms, aproximadamente 300 ms, aproximadamente 400 ms, aproximadamente 500 ms, aproximadamente 600 ms, aproximadamente 700 ms, aproximadamente 800 ms, aproximadamente 900 ms, aproximadamente 1 segundo, aproximadamente 1,25 segundos, aproximadamente 1,5 segundos o aproximadamente 2 segundos, inclusive, incluyendo los tiempos entre estos números. En algunos aspectos, las proteínas activadas por luz pueden activarse mediante pulsos de luz que pueden tener una densidad

de potencia lumínica de aproximadamente 0,05 mW mm⁻², aproximadamente 0,1 mW mm⁻², aproximadamente 0,25 mW mm⁻², aproximadamente 0,5 mW mm⁻², aproximadamente 0,75 mW mm⁻², aproximadamente 1 mW mm⁻², aproximadamente 2 mW mm⁻², aproximadamente 3 mW mm⁻², aproximadamente 4 mW mm⁻², aproximadamente 5 mW mm⁻², aproximadamente 6 mW mm⁻², aproximadamente 7 mW mm⁻², aproximadamente 8 mW mm⁻²,
 5 aproximadamente 9 mW mm⁻², aproximadamente 10 mW mm⁻², aproximadamente 11 mW mm⁻², aproximadamente 12 mW mm⁻², aproximadamente 13 mW mm⁻², aproximadamente 14 mW mm⁻², aproximadamente 15 mW mm⁻², aproximadamente 16 mW mm⁻², aproximadamente 17 mW mm⁻², aproximadamente 18 mW mm⁻², aproximadamente 19 mW mm⁻², aproximadamente 20 mW mm⁻², aproximadamente 21 mW mm⁻², aproximadamente 22 mW mm⁻²,
 10 aproximadamente 23 mW mm⁻², aproximadamente 24 mW mm⁻² o aproximadamente 25 mW mm⁻², inclusive, incluyendo cualquier valor entre estos números. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona excitadora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona excitadora puede ser una neurona piramidal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona inhibidora ubicada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona inhibidora puede ser una neurona de parvalbúmina. En algunos aspectos, las neuronas inhibidoras y excitadoras pueden estar en un animal vivo no humano. En otros aspectos, las neuronas inhibidoras y excitadoras pueden estar en una porción de cerebro de un animal no humano.

REALIZACIONES DE EJEMPLO

20 La presente divulgación se refiere a una opsina quimérica activada por luz que modifica el voltaje de una membrana cuando se expresa en ella. Aunque la presente divulgación no está necesariamente limitada en estos contextos, pueden apreciarse diversos aspectos de la divulgación a través de un análisis de ejemplos que usan estos y otros contextos.

25 Diversas realizaciones de la presente divulgación se refieren a una opsina activada por luz modificada para la expresión en membranas celulares incluyendo células de mamíferos. La opsina deriva de una combinación de dos opsinas diferentes, canalrodopsina de *Volvox* (VChR1) y canalrodopsina de *Chlamydomonas reinhardtii* (ChR1). La opsina puede ser útil para expresarse a niveles de una velocidad más alta que cualquiera de las opsinas individuales de las que deriva.

30 En determinados aspectos más específicos, la secuencia genética de la quimera ChR1/VChR1 (C1V1) es principalmente VChR1. Algunas partes de la secuencia VChR1 asociada al tráfico se reemplazan con secuencias homólogas de ChR1.

35 Diversos aspectos se relacionan con la modificación dirigida a la adición de una señal de tráfico para mejorar la expresión en células de mamíferos.

Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren a versiones modificadas adicionales de C1V1. Por ejemplo, determinados aspectos incluyen una mutación de E162T a C1V1, experimentos que sugieren que proporciona un fotociclo acelerado (por ejemplo, casi 3 veces).

40 Diversos aspectos de la presente divulgación se refieren a un sistema o método optogenético que correlaciona el control temporal, espacial y/o específico de tipo celular sobre un circuito neural con métricas medibles. El sistema optogenético usa basándose opsinas, incluyendo las variantes C1V1 y/o C1V1, para evaluar el control sobre porciones de circuitos neuronales. Por ejemplo, diversas métricas o síntomas pueden asociarse a un trastorno neurológico. El sistema optogenético se refiere a un circuito neural en un paciente para el control selectivo del mismo. El sistema optogenético implica controlar al paciente para determinar las métricas o los síntomas asociados al trastorno neurológico. De esta manera, el sistema optogenético puede proporcionar información detallada acerca del circuito neural, su función y/o el trastorno neurológico.

50 De acuerdo con los aspectos que se analizan en el presente documento, aspectos particulares se refieren al estudio y la investigación de trastornos que usan basándose opsinas. Otros aspectos se refieren a la identificación y/o el estudio de fenotipos y endofenotipos. Otros aspectos se refieren a la identificación de dianas de tratamiento.

55 Aspectos de la presente divulgación se refieren a la inducción artificial a trastornos/patologías en una escala temporal de tiempo rápido. El uso de una opsina tal como C1V1 puede ser particularmente útil basándose en las características en lo que concierne a un fotociclo acelerado. Además, determinados aspectos permiten patologías reversibles, que pueden ser particularmente útiles para establecer puntos basales/de control para someter a ensayo y/o para someter a ensayo los efectos de un tratamiento en el mismo animal cuando presenta la patología y cuando no presenta la patología. El uso de opsinas tales como C1V1 permite el control de una célula usando una fuente de luz. La C1V1 reacciona a la luz, provocando un cambio en el potencial de membrana de la célula. La retirada de la luz y el posterior cese de la activación de C1V1 permite que la célula vuelva a su estado basal. Existen otras posibilidades diversas, algunas de las cuales se analizan con más detalle en el presente documento.

65 Diversos aspectos de la presente divulgación se refieren a una mutación E122T de una opsina C1V1. En determinados aspectos de la presente divulgación, la mutación E122T desplaza la absorción máxima de C1V1 o sus

variantes hacia el espectro de luz roja con respecto a la opsina no mutada.

Diversos aspectos de la presente divulgación se refieren a una opsina modificada para la expresión en células de mamíferos y desplazada, con respecto a ChR2, para la absorción máxima en el espectro de luz verde. La opsina C1V1 deriva de una combinación de opsinas y se expresa a una velocidad más alta que cualquiera de las opsinas de las que deriva. La opsina, C1V1, deriva de canalrodopsina de *Volvox* (VChR1) y canalrodopsina de *Chlamydomonas reinhardtii* (ChR1). La opsina resultante, C1V1 y sus variantes, tienen una absorción máxima en longitudes de onda entre 530 nm y 546 nm.

Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren a versiones modificadas adicionalmente de C1V1. Por ejemplo, determinados aspectos incluyen una mutación E122T, que desplaza la absorción máxima de C1V1 hacia el espectro de luz roja. Otras modificaciones pueden incluir una mutación adicional E162T, experimentos que sugieren que proporciona un fotociclo acelerado además del desplazamiento al rojo proporcionado por la mutación E122T.

En algunos aspectos, se proporciona una molécula transmembrana derivada de VChR1 y que tiene las secuencias de tráfico reemplazadas con secuencias homólogas de ChR1. En algunos aspectos, la molécula incluye adicionalmente una mutación E122T. En otros aspectos, la molécula incluye adicionalmente mutaciones en E162T y E122T. En determinados aspectos, la molécula activa un canal iónico en respuesta a la luz verde. En un aspecto, la molécula tiene una absorción de luz máxima de aproximadamente 546 nm. En otro aspecto, la molécula tiene una absorción de luz máxima de aproximadamente 535 nm.

En algunos aspectos, se proporciona una célula animal que comprende: una molécula exógena integrada que expresa un canal iónico que responde a la luz roja; la molécula exógena derivada de VChR1 y que incluye secuencias de tráfico transmembrana de la misma reemplazadas por secuencias homólogas de ChR1. En algunos aspectos, la molécula exógena incluye adicionalmente E122T. En otros aspectos, la célula tiene una relación de activación neural de aproximadamente el 14 % al 94 % en respuesta a la luz que tiene longitudes de onda de 405 nm y 560 nm, respectivamente. En otros aspectos, la célula tiene una relación de activación neural de aproximadamente el 11 % al 72 % en respuesta a la luz que tiene longitudes de onda de 405 nm y 560 nm, respectivamente.

Aspectos de ejemplo adicionales de la presente divulgación se relacionan con el uso de una quimera híbrida ChR1/VChR1 que no contiene ninguna secuencia ChR2, deriva de dos genes de opsinas que no se expresan bien individualmente y, en el presente documento, se denomina C1V1. Los aspectos de la presente divulgación también se refieren a mejoras del direccionamiento a la membrana de VChR1 a través de la adición de una señal de tráfico de membrana derivada del canal $K_{ir}2.1$. Imágenes confocales de neuronas cultivadas que expresan VChR1-EYFP revelaron una gran proporción de proteína intracelular en comparación con ChR2; por tanto, se usó una señal de tráfico de membrana (ts) derivada del canal $K_{ir}2.1$ para mejorar el direccionamiento a la membrana de VChR1. El direccionamiento a la membrana de este VChR1-ts-EYFP se potenció ligeramente en comparación con VChR1-EYFP; sin embargo, las fotocorrientes medias registradas a partir de neuronas del hipocampo cultivadas que expresan VChR1-ts-EYFP fueron solo ligeramente más grandes que las de VChR1-EYFP. En consecuencia, aspectos de la presente divulgación se refieren a VChR1, que se ha modificado mediante el intercambio de hélices con las hélices correspondientes de otros ChR. Por ejemplo, se ha descubierto una mejora robusta en dos quimeras donde las hélices 1 y 2 se reemplazaron con los segmentos homólogos de ChR1. Se descubrió que si los sitios de corte y empalme se encontraban en el bucle intracelular entre las hélices 2 y 3 (en el resto Ala145 de ChR1) o en la hélice 3 (en el resto Trp163 de ChR1), las quimeras resultantes se expresaban de manera robusta y mostraban propiedades de fotocorriente y espectrales potenciadas de forma similar. Este resultado fue inesperado ya que ChR1 solo se expresa débilmente y se integra escasamente en las membranas de la mayoría de las células hospedadoras de mamíferos.

Aspectos específicos de la presente divulgación se relacionan con genes de opsina microbiana adaptados para la neurociencia, permitiendo la transducción de series de pulsos de luz en cambios potenciales de la membrana en escalas temporales de milisegundos en tipos celulares específicos dentro del cerebro de mamíferos intactos (por ejemplo, canalrodopsina (ChR2), canalrodopsina de *Volvox* (VChR1) y halorodopsina (NpHR). ChR2 es una rodopsina derivada del alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. El término "rodopsina", como se usa en el presente documento, es una proteína que comprende al menos dos componentes básicos, una proteína opsina y un cofactor unido covalentemente, por lo general retinal (retinaldehído). La rodopsina ChR2 deriva de la opsina Canalopsina-2 (Chop2), originalmente denominada Chlamiopsina-4 (Cop4) en el genoma de *Chlamydomonas*. Las propiedades temporales de una canalrodopsina despolarizante, ChR2, incluyen una cinética rápida de activación y desactivación, lo que permite la generación de series de potenciales de acción de tiempo preciso. Para las aplicaciones que buscan una activación a largo plazo, se ha descubierto que la cinética-off de las canalrodopsinas puede ser más lenta. Por ejemplo, determinadas implementaciones de canalrodopsinas aplican luz 1 mW/mm² durante prácticamente todo el tiempo en que se desea la despolarización, lo que puede ser menos que deseable.

Gran parte del análisis en el presente documento se refiere a ChR2. A menos que se indique lo contrario, la divulgación incluye una serie de variantes similares. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, Chop2, ChR2-310, Chop2-310 y canalrodopsina de *Volvox* (VChR1). Para obtener detalles adicionales acerca de VChR1, puede

hacerse referencia a "*Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carterii**", *Nat Neurosci.* Junio de 2008, 11 (6): 631-3. Epub 2008 23 de abril. En otras implementaciones, pueden hacerse modificaciones similares a otras moléculas de opsina. Por ejemplo, pueden hacerse modificaciones/mutaciones a variantes de ChR2 o VChR1. Además, las variantes modificadas pueden usarse en combinación con bombas de iones activadas por luz.

Aspectos de la presente divulgación incluyen variantes de aminoácidos relativamente menores de las secuencias de origen natural. En un caso, las variantes son más de aproximadamente un 75 % homólogas a la secuencia proteínica de las secuencias de origen natural. En otras variantes, la homología es superior a aproximadamente el 80 %. Sin embargo, otras variantes tienen una homología superior a aproximadamente el 85 %, superior al 90 % o incluso tan alta como de aproximadamente el 93 % a aproximadamente el 95 % o de aproximadamente el 98 %. Homología en este contexto significa similitud o identidad de secuencia, prefiriéndose la identidad. Esta homología puede determinarse usando técnicas convencionales conocidas en el análisis de secuencias. Las composiciones de la presente divulgación incluyen las secuencias de proteína y ácido nucleico proporcionadas en el presente documento, incluyendo variantes que son más de aproximadamente un 50 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente un 55 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente un 60 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente un 65 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente un 70 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente un 75 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente un 80 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente un 85 % homólogas a la secuencia proporcionada, más de aproximadamente un 90 % homólogas a la secuencia proporcionada o más de aproximadamente un 95 % homólogas a la secuencia proporcionada.

Como se usa en el presente documento, la "estimulación de una célula diana" se usa generalmente para describir la 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 conducir a la despolarización o la polarización de la célula diana. En un caso particular, la célula diana es una neurona y el estímulo afecta a la transmisión de impulsos mediante la facilitación o la inhibición de la generación de impulsos (potenciales de acción) por la neurona.

Para obtener detalles adicionales acerca de opsinas activadas por luz, puede hacerse referencia a la Publicación PCT N.º WO 2010/056970, titulada "*Optically-Based Stimulation of Target Cells and Modifications Thereto*", a Deisseroth et al.

Ejemplos

Ejemplo 1: Desarrollo de la variante de canalrodopsina quimérica C1V1

En este ejemplo, se buscó una herramienta que permitiera la conducción de elevaciones de E/I corticales y el control de oscilaciones gamma en cortes corticales, así como *in vivo* en experimentos con animales vivos, con tres propiedades clave: 1) una potencia mucho mayor para permitir la investigación de dosis-respuesta; 2) baja desensibilización para permitir cambios graduales en el equilibrio E/I; y 3) excitación desplazada al rojo para permitir el impulso comparativo de diferentes poblaciones dentro de la misma preparación.

Estos experimentos se intentaron inicialmente con VChR1, que muestra tanto un desplazamiento al rojo como una reducción de la desensibilización¹⁴, pero una investigación previa sugirió que las fotocorrientes en las células que expresan VChR1 eran pequeñas (-100-150 pA¹⁴) y no desencadenaron una actividad sináptica robusta en células corriente abajo (no se muestra). De hecho, cuando se intentó por primera vez expresar VChR1 en células, solo se observaron fotocorrientes pequeñas (**FIG. 1A**) coherentes con hallazgos anteriores. La adición de una señal de tráfico de membrana derivada del canal Kir2.1 para generar VChR1-is-EYFP entregó solamente una tendencia modesta hacia fotocorrientes potenciadas en comparación con VChR1-EYFP (**FIG. 1B**). Sin embargo, teniendo en cuenta que en ChR2, el reemplazo de segmentos transmembrana con la región homóloga de ChR1 aumentó el direccionamiento de la membrana y las fotocorrientes potenciadas, se planteó la hipótesis de que un intercambio sistemático similar entre las hélices de VChR1 con las hélices correspondientes de otros ChR, podría dar como resultado igualmente una expresión de membrana potenciada en células HEK.

Materiales y métodos

Se generó una variante de canalrodopsina quimérica C1V1 fusionando una canalrodopsina-1 de tipo silvestre u optimizada con codón humano con un VChR1 adaptado con codón humano (número de acceso de GenBank™ ACD70142.1) mediante PCR de extensión por solapamiento. Se generaron variantes de corte y empalme de C1V1 mediante PCR solapada. La variante uno contenía los primeros 145 aminoácidos de ChR1 y los aminoácidos de 102 a 316 de VChR1. La variante dos contenía los primeros 162 aminoácidos de ChR1 y los aminoácidos 119 a 316 de VChR1. Los fragmentos de PCR quiméricos resultantes se clonaron en pECFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA) y en vectores de expresión lentivíricos con el promotor CaMKII α . La señal de tráfico de membrana derivó del canal Kir2.1. Las mutaciones se confirmaron mediante la secuenciación de la secuencia de codificación y los sitios de corte y empalme. Para la entrega de genes mediada por AAV, se subclonaron fusiones de opsina-EYFP junto con el

promotor CaMKII α en una versión modificada del vector pAAV2-MCS. La expresión de opsina dependiente de Cre se consiguió clonando el casete opsina-EYFP en la orientación inversa entre pares de sitios lox incompatibles (loxP y 1ox2722) para generar un marco de lectura abierto invertido de doble efecto (D10) con el control promotor del factor de elongación 1a (EF-1 α). Todas las construcciones están disponibles en Deisseroth Lab (www.optogenetics.org).

Se cultivaron células HEK293 en medio esencial mínimo de Dulbecco complementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina 2 mM (Biochrome, Berlín, Alemania) y penicilina/estreptomicina al 1 % (p/p). Se sembraron células en cubreobjetos a una concentración de $0,175 \times 10^6$ células/ml y se complementaron con retina todo-trans 1 mM. La transfección transitoria se realizó con Fugene 6 (Roche, Mannheim, Alemania) y se realizaron registros entre 20 y 28 horas más tarde. Se registraron fotocorrientes en células HEK293 transfectadas transitoriamente mediante pinzamiento zonal convencional de células completas. La solución externa contenía [mM]: NaCl 140, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, KCl 2, HEPES 10 (pH 7,2). La solución interna contenía [mM]: NaCl 110, EGTA 10, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1, KCl 5, HEPES 10 (el pH se ajustó a 7,2, ya sea usando CsOH o HCl). Las pipetas zonales se extrajeron con un extractor de micropipetas modelo P-97 (Sutter Instrument Co., Novato, CA) de tubos de microhematocrito (Hecht-Assistant, Sondheim, Alemania) con una resistencia de 1,5-2 M Ω . El pinzamiento zonal de célula completa de células HEK se realizó con un amplificador EPC 7 (HEKA, Elektronik GmbH, Lambrecht, Alemania). Se muestrearon datos analógicos a 20 kHz, se digitalizaron con Digidata1440 (Molecular Devices, Foster City, CA) y se mostraron usando el software pClamp10.1 (Molecular Devices, Foster City, CA). Para registrar la dependencia de la longitud de onda, se instaló una guía de luz de una unidad Polychrome V (TILL Photonics, Planegg, Alemania) en el puerto de epiluminiscencia de un microscopio Olympus IX70. Para reflejar la luz en el objetivo, se usó un divisor de haz (70 % R/30 % T) dando como resultado una densidad final de fotones de $\sim 1 \times 10^{22}$ fotones m⁻² s⁻¹ a 470 nm en el cubreobjetos. Para registrar los espectros de acción solo se usó el 50 % de la intensidad de la luz. La Unidad Polychrome V se controló con el software Tillvision (TILL Photonics, Planegg, Alemania) sincronizado con el software pClamp.

Resultados

Curiosamente, la mejora más robusta en las quimeras se descubrió cuando las hélices 1 y 2 se reemplazaron con los homólogos de ChR1 (FIG. 1C-D). Se sometieron a ensayo dos canales quiméricos ChR1-VChR1 para determinar el direccionamiento a la membrana y el tamaño de fotocorriente en células HEK293 cultivadas. El primero se unió en el segundo bucle intracelular después de A1a145 de ChR1 y el segundo se unió dentro de la hélice tres después de Trp163 de ChR1 (FIG. 1C). Mientras que ambas variantes se expresaron casi igual de bien en células HEK293 (FIG. 1D), en neuronas cultivadas, la segunda variante se expresó de forma más robusta (FIG. 1E) y mostró fotocorrientes de pico muy potenciadas (888 ± 128 pA, $n = 11$ células; $p < 0,0005$) en comparación con VChR1-EYFP (FIG. 1B). El pico del espectro de acción permaneció desplazado al rojo robustamente con respecto a ChR2 (Tabla 1; Figura 1F) y la selectividad iónica de la quimera fue similar a la publicada anteriormente para ChR2 y VChR1 (FIG. 1G). La adición de la secuencia de tráfico Kir2.1 a este híbrido tendió a aumentar adicionalmente las fotocorrientes (1104 ± 123 pA, $n = 12$ células; $p < 0,0005$ en comparación con VChR1-EYFP, $p = 0,23$ en comparación con C1V1-EYFP; FIG. 1B; Tablas 1-2). La quimera ChR1/VChR1 híbrida resultante no contiene ninguna secuencia ChR2, deriva en particular de dos genes de opsina que no se expresan bien por sí solos y en el presente documento se denomina C1V1 (FIG. 1 A, H).

Ejemplo 2: Optimización de la cinética de fotocorriente de C1V1

Se necesitarían propiedades de desactivación rápida²⁸ de la presente opsina desplazada al rojo para la separación temporal y espectral máximas de otras opsinas que se activan mediante longitudes de onda ubicadas hacia el extremo azul del espectro visible. Sin embargo, se descubrió que las fotocorrientes que mostró C1V1-ts-EYFP presentaron un descomposición > 10 veces más lento que ChR2, y un descomposición incluso más lento que el VChR1 original (FIG. 2A; T_{off} 156 ± 12 ms y 132 ± 12 ms para C1V1-ts-EYFP ($n = 4$) y VChR1-EYFP ($n = 5$), respectivamente; Tabla 1), lo que posiblemente impide el uso de C1V1 para aplicaciones que requieren velocidades de disparo rápidas. Para corregir la cinética de fotocorriente de C1V1, se realizó una búsqueda en la región cromófora usando modelos estructurales conocidos^{22, 28} (FIG. 1H) para determinar mutaciones con una cinética de fotociclo más rápida, menor inactivación y menor absorción de azul. A continuación, se mutó glutamato-122 a treonina, basándose en los estudios del motivo rico en glutamato en la hélice 2, lo que demuestra que la presente mutación reduce la inactivación³.

Materiales y métodos

Todas las mutaciones puntuales en los vectores C1V1 se generaron en los plásmidos mediante mutagénesis dirigida al sitio (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). La señal de tráfico de membrana derivó del canal Kir2.1. Las mutaciones se confirmaron mediante la secuenciación de la secuencia de codificación y los sitios de corte y empalme.

Resultados

La mutación homóloga a ChETA E162T²⁸ aceleró notablemente el fotociclo a casi el triple de T_{off} $58 \pm 4,7$ ms, $n = 7$ células; **FIG. 2A, Tabla 1**). Sorprendentemente, mientras que mutaciones análogas en ChR2 u otras opsinas microbianas han provocado un desplazamiento al rojo^{28,29}, en C1V1 esta mutación desplazó el espectro de acción en la dirección no deseada, hipocromática a 530 nm (**FIG. 1F; Tabla 1**). C1V1-E122T se desactivó solo en un 26 % en comparación con un 46 % de desactivación de ChR2 (**FIG. 2B, Tabla 1**); además, el espectro se desplazó al rojo adicionalmente a 546 nm (**FIG. 1F, Tabla 1**) y mostró una pérdida sorprendente del hombro azul problemático del espectro de acción C1V1. Por último, en el mutante doble E122T/E162T, la inactivación de la corriente fue incluso inferior que en el mutante E122T y el fotociclo fue aún más rápido en comparación con E162T T_{off} $34 \pm 4,9$ ms, $n = 7$ células; **FIG. 2A, FIG. 2C, Tabla 1**), conservando al mismo tiempo el desplazamiento al rojo y la ausencia del hombro azul del espectro de acción. Además, aunque el mutante E122 redujo gravemente la amplitud de la fotocorriente (**FIG. 2D**, el mutante doble restauró las corrientes muy altas características del C1V1-ts original. Por tanto, se conservaron múltiples propiedades sorprendentes y útiles de las mutaciones individuales en la quimera C1V1 potenciada para el tráfico doble mutante.

Tabla 1: Propiedades espectrales/cinéticas de las variantes ChR2, VChR1 y C1V1

Se registró la longitud de onda de activación máxima en células HEK usando pulsos de luz de 2 ms en la longitud de onda de activación máxima. Se registraron cinéticas de desactivación (τ_{off}) y fotocorrientes máximas en neuronas de hipocampo cultivadas usando pulsos de luz de 2 ms a la longitud de onda de activación máxima. Para identificar las variantes óptimas para la activación combinatoria con ChR2, se registró el porcentaje de respuesta a 405 nm y 560 nm en células HEK. La desensibilización de la fotocorriente se registró usando pulsos de luz de 300 ms, cuantificando la descomposición de la fotocorriente máxima ($I_{m\acute{a}x}$) al estado estable.

	Absorción máxima (nm)	Cinética T_{off} pH7,2 (ms)	Corriente pico (pA) a -60 Mv*	Relación 405/560	% de desensibilización
ChR2	460 ± 6 (N = 5)	10 ± 1 (N = 5)	816 ± 181 (N = 5)	60 %:8 % (N = 7)	65 ± 8 (N = 5)
VChR1	543 ± 7 (N = 7)	85 ± 11 (N = 6)	284 ± 54 (N = 5)	9 %:82 % (N = 7)	53 ± 10 (N = 18)
C1V1	539 ± 4 (N = 10)	60 ± 6 (N = 6)	1035 ± 158 (N = 6)	28 %:86 % (N = 10)	46 ± 12 (N = 14)
C1V1 (E162T)	530 ± 4 (N = 6)	23 ± 5 (N = 4)	1183 ± 53 (N = 6)	20 %:71 % (N = 6)	41 ± 12 (N = 7)
C1V1 (E122T)	546 ± 5 (N = 4)	55 ± 8 (N = 5)	572 ± 21 (N = 5)	14 %:94 % (N = 4)	26 ± 6 (N = 4)
C1V1 (E122T, E162T)	535 ± 5 (N = 7)	12 ± 1 (N = 5)	1072 ± 89 (N = 9)	11 %:72 % (N = 7)	11 ± 9 (N = 9)

25

Tabla 2: Sumario de valores de p de comparaciones de ensayo *t* no pareado para la amplitud de fotocorriente máxima en todas las opsinas que se muestran en la Tabla 1. Las fotocorrientes se registraron en neuronas cultivadas usando un pulso de luz de 2 ms a 540 nm (variantes VChr1 y C1V1) o 470 nm (Chr2(H134R)).

Vchr1-YFP	VChr1-TS-YFP	C1V1-YFP	C1V1-TS-YFP	C1V1 (E162T)-ts-Y	C1V1 (E162T/E122T) -ts-YFP	Chr2 (H134R)-YFP	VChr1-YFP
1,0000	0,5770	0,0188	0,0029	6,5E-06	1,1E-05	0,0448	VChr1-TS-YFP
	1,0000	0,266	0,0039	1,1E-06	0,0015	0,0579	C1V1-YFP
		1,0000	0,3372	0,0399	0,0788	0,8175	C1V1 (E162T)-ts-Y
			1,0000	0,4099	0,8442	0,4222	C1V1 (E162T)-ts-Y
				1,0000	0,3254	0,1490	C1V1 (E162T/E122T)-ts-YFP
					1,0000	0,3001	Chr2(H134R)-YFP
						1,0000	

Por tanto, se conservaron juntas múltiples propiedades útiles de las mutaciones individuales en el doble mutante.

Ejemplo 3: Uso de nuevas quimeras C1V1 en neuronas de la corteza prefrontal

5 Para someter a ensayo estos nuevos genes de opsina C1V1 en neuronas, se generaron vectores lentivíricos que codifican C1V1-ts-EYFP y las combinaciones de mutaciones puntuales anteriores. Estas opsinas se expresaron después en neuronas de hipocampo cultivadas y se registraron fotocorrientes de células completas en condiciones de estimulación idénticas (pulsos de 2 ms, luz de 542 nm, 5,5 mW mm⁻²) para determinar si la mejora en la amplitud de la fotocorriente fue resultado directamente del aumento de la expresión de C1V1 en comparación con VChR1.

10

Materiales y métodos

Animales

15 Se alojaron en grupos de tres a cinco por jaula ratones machos Parvalbumin::Cre C57/BL6J de tipo silvestre o transgénicos y se mantuvieron en un ciclo inverso de luz/oscuridad de 12 horas con alimento y agua a demanda. Los protocolos experimentales fueron aprobados por IACUC de la Universidad de Stanford y cumplen con las directrices de la guía de los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los EE.UU.

Electrofisiología de pinzamiento zonal de células enteras en hipocampo y neuronas corticales

25 Se aislaron cultivos primarios de hipocampo de ratas PO Sprague-Dawley, se colocaron en cubreobjetos de vidrio revestidos con Matrigel (Invitrogen) y se trataron con FUDR para inhibir el crecimiento excesivo de la glía. Se transfectó ADN plasmídico sin endotoxinas en neuronas cultivadas usando una mezcla de solución salina tamponada con HEPES /CaPO₄. Se obtuvieron registros electrofisiológicos de neuronas individuales identificadas por la expresión de proteínas fluorescentes en medio Tyrode ([mM] NaCl 150, KCl 4, MgCl₂ 2, MgCl₂ 2, D-glucosa 10, HEPES 10, pH 7,35 con NaOH) usando una solución interna patrón ([mM] K-gluconato 130, KCl 10, HEPES 10, EGTA 10, MgCl₂ 2, pH 7,3 con KOH) en pipetas de vidrio de 3-5 MΩ. Para la fisiología del corte cortical, se obtuvieron cortes agudos de 300 gm de corte coronal de ratones C57BL/6J o PV::Cre de 8-9 semanas de edad, anteriormente inyectados con virus, en solución de corte de sacarosa enfriada con hielo ([mM] D-glucosa 11, sacarosa 234, KCl 2,5, NaH₂PO₄ 1,25, MgSO₄ 10, CaCl₂ 0,5, NaHCO₃ 26) usando un Vibratome (Leica). Los cortes se recuperaron en líquido cefalorraquídeo oxigenado (ACSF; [mM] NaCl 124, KCl 3, MgCl₂ 1,3, CaCl₂ 2,4, NaH₂PO₄ 1,25, NaHCO₃ 26, D-glucosa 10) a 32 °C durante una hora. Se obtuvieron parches de neuronas individuales después de identificar la expresión de la proteína fluorescente de la capa cortical prefrontal indicada con una perfusión de ACSF constante. La luz filtrada de una fuente de lámpara de xenón de longitud de onda amplia (Sutter Instruments DG-4) se acopló al puerto de fluorescencia del microscopio (Leica DM-LFSA). Los filtros de paso de banda (Semrock) tenían un ancho de banda de 20 nm y se ajustaron con filtros de densidad neutra adicionales (ThorLabs) para igualar la potencia lumínica en todo el espectro.

40 Las imágenes de células cultivadas se obtuvieron en el mismo microscopio usando una cámara CCD Retiga Exi (Qimaging, Inc.) a 100 ms de exposición con 30 de ganancia. La densidad de potencia de iluminación fue de 12 mW mm⁻² a 500 nm con un conjunto de filtros EYFP convencional. La cuantificación de la fluorescencia se realizó con el software ImageJ marcando una región que contenía el soma y las neuritas proximales y calculando para cada célula la intensidad total de píxeles integrados en esa región, en lugar de la fluorescencia promedio, puesto que es probable que las fotocorrientes estén relacionadas con el número total de canales unidos a la membrana en lugar de la expresión de canales promedio por área.

45

Preparación e inyección de virus

50 Tanto la entrega de genes lentivíricos y mediada por AAV se usaron para la expresión heteróloga de opsinas en ratones. Las opsinas indicadas fueron activadas por el promotor de la proteína cinasa II alfa dependiente de calmodulina humana (CaMKIIα) para el direccionamiento a neuronas excitadoras corticales o el Factor de elongación 1a (EF-1a) en conjunto con un casete inducible por Cre y seguida del elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis Woodchuck (WPRE). El vector de AAV recombinante inducible por Cre se produjo mediante el Vector Core de la Universidad de Carolina del Norte (Chapel Hill, NC, EE.UU.) y se usó junto con ratones transgénicos parvalbúmina::Cre para el direccionamiento a interneuronas positivas a parvalbúmina. En resumen, se subclonaron construcciones de AAV en una versión modificada del pAAV2-MCS, se tomaron serotipos con proteínas de la capa de AAV5 y se empaquetaron con el núcleo del vector vírico en la Universidad de Carolina del Norte. La concentración vírica final de los vectores de AAV como 1x 10¹² copias del genoma (gc)/ml. Se generaron construcciones lentivíricas como se ha notificado. Todas las construcciones están disponibles en Deisseroth Lab (www.optogenetics.org). Las inyecciones víricas estereotácticas se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por la Universidad de Stanford. Se dispusieron ratones juveniles (4-6 semanas) mantenidos con anestesia con isoflurano en un marco estereotáctico (Kopf Instruments) y se nivelaron usando los puntos de referencia de cráneo bregma y lambda. Se realizaron craneotomías con el fin de provocar un daño mínimo al tejido cortical. La corteza prefrontal infralímbica (IL; de bregma: 1,8 mm anterior, 0,35 mm lateral, -2,85 mm ventral) se seleccionó usando una jeringa de 10 ul y una aguja biselada de 35 g (Word Precision Instruments). El virus se

65

infundió a una velocidad de 0,1 $\mu\text{l}/\text{min}$. A los sujetos a los que se inyectó virus para estudios de comportamiento se les implantó adicionalmente un dispositivo de acoplamiento de fibra óptica crónico para facilitar la entrega de luz con o sin una fibra cerebral penetrante unida para la entrega local a la región cortical diana como se indica (Doric Lenses, Canadá). Las fibras penetrantes se insertaron estereotácticamente a una profundidad de -2,5 mm desde las mismas coordenadas anteriores y laterales y se fijaron con cemento adhesivo (C&B MetaBond) antes del cierre adhesivo del cuero cabelludo (Vetbond, 3M). A los animales se les administró alivio analgésico después de la recuperación de la cirugía.

Resultados

Se obtuvieron registros de neuronas del hipocampo cultivadas que expresaban construcciones individuales y una lectura de fluorescencia integrada de cada célula individual. En células individuales, los niveles de fluorescencia se correlacionaron estrechamente con las amplitudes de fotocorriente medidas en las construcciones (FIG. 3A). Por tanto, se llegó a la conclusión de que la fotocorriente potenciada de C1V1 se debía principalmente a una mejor expresión de las neuronas. Puesto que el doble mutante C1V1-E122T/E162T mostró un rendimiento superior en todas las dimensiones sometidas a ensayo (tamaño de fotocorriente, cinética de inactivación y espectro de acción), el rendimiento en ChR2(H134R) también se comparó directamente midiendo la fluorescencia de YFP somática integrada y las fotocorrientes de pico. Sorprendentemente, las células C1V1-E122T/E162T mostraron fotocorrientes más fuertes que las células ChR2-H134R a niveles de fluorescencia equivalentes (FIG. 3B), lo que potencialmente sugiere un aumento de la conductancia unitaria.

Para examinar si C1V1-E122T/E162T sería adecuado para la activación óptica del aumento en las neuronas piramidales, se generaron vectores víricos adeno-asociados que albergaban el gen C1V1-E122T/E162T-ts-EYFP con el promotor CaMKIIa (AAV5-CaMKIIa-C1V1-E122T/E162T-ts-EYFP) y se inyectó el virus en la corteza prefrontal de los ratones. Las respuestas se registraron a partir de neuronas expresadas en cortes agudos con series de pulsos de luz de 2 ms y se compararon con las respuestas a series de inyecciones de corriente (10 ms, 200 pA) a frecuencias idénticas. Se descubrió que la respuesta de frecuencia de las neuronas a las series de pulsos de 560 nm era indistinguible de la respuesta a las inyecciones de corriente en las mismas frecuencias (FIG. 3C; $n = 6$ células en 2 cortes), lo que sugiere que las propiedades intrínsecas de la célula y no la cinética de C1V1 limitan el rendimiento de aumento a velocidades altas. Se observaron propiedades de rendimiento similares en un intervalo de condiciones de iluminación verde, amarilla y ámbar, con un rendimiento fuerte en las intensidades de luz moderadas ($<10 \text{ mW}/\text{mm}^2$) adecuadas para aplicaciones *in vivo* en mamíferos (FIG. 3D). De hecho, las respuestas a 540 nm y 590 nm fueron igualmente eficaces al provocar potenciales de acción precisos, con una fidelidad más baja en las potencias lumínicas más bajas como se esperaba (FIG. 3D).

Con el espectro de acción desplazado al rojo prominentemente, se consideró la posibilidad de que el C1V1 incluso pudiera usarse para impulsar el aumento con luz roja, no notificado anteriormente con ninguna opsina y potencialmente importante para permitir una mejor separación espectral y el control de las neuronas en el tejido más profundo. Por tanto, se examinó si se podía usar alguna variante de C1V1 para impulsar picos usando luz roja lejana. Aunque la cinética de C1V1-E122T fue más lenta que la de C1V1E122T/E162T, su espectro de acción fue el más desplazado al rojo de todas las variantes (FIG. 1F) y de hecho se descubrió que las células que expresaban C1V1-E122T respondían con más fuerza a la luz roja (630 nm) que las células que expresaban el mutante doble (FIG. 3E, *parte superior*). Aunque las cinéticas en el mutante E122T a 630 nm fueron más lentas que a 545 nm (FIG. 3F), las fotocorrientes se reclutaron usando pulsos más largos de luz de 630 nm a intensidad moderada (FIG. 3G) que bastaron para obtener series de picos definidos (FIG. 3H; FIG. 3E, *parte inferior*).

Ejemplo 4: Uso de nuevas quimeras C1V1 en cortes de cerebro vivo de las neuronas de la corteza prefrontal de ratones

El estudio buscó determinar si las neuronas inhibitoras y excitadoras que se encuentran en el mismo microcircuito podrían dirigirse con la introducción de las variantes C1V1. Se exploró la activación independiente de dos poblaciones neuronales dentro de cortes de cerebro vivo; en este caso, CaMKII α -C1V1-E122T/E162Ts e YFP y EF1a-DIO-ChR2-H134R-EYFP se expresaron en mPFC de ratones PV::Cre.

Materiales y métodos

Se obtuvieron cortes coronarios agudos de 300 μm aislados de ratones C57BL/6J o PV::Cre de tipo silvestre de 8-9 semanas de edad anteriormente inyectados con virus en solución de corte de sacarosa enfriada con hielo ([mM] D-glucosa 11, sacarosa 234, KCl 2,5, NaH_2PO_4 1,25, MgSO_4 10, CaCl_2 0,5, NaHCO_3 26) usando un Vibratome (Leica). Se recuperaron cortes en líquido cefalorraquídeo oxigenado (ACSF; [mM] NaCl 124, KCl 3, MgCl_2 1,3, CaCl_2 2,4, NaH_2PO_4 1,25, NaHCO_3 26, D-glucosa 10) a 32 $^\circ\text{C}$ durante una hora. Se obtuvieron parches de neuronas individuales después de identificar la expresión de la proteína fluorescente de la capa cortical prefrontal indicada con una perfusión de ACSF constante. Se acopló una luz filtrada de una fuente de lámpara de xenón de longitud de onda amplia (Sutter Instruments DG-4) al puerto de fluorescencia del microscopio (Leica DM-LFSA). Los datos de la fisiología de los cortes se importaron a Matlab y se analizaron usando un software personalizado. Los espectros de potencia se calcularon usando el método de wavelet descrito por Sohal et al.⁵⁵ En resumen, para cada frecuencia f ,

los trazos registrados se filtraron en primer lugar con un filtro de paso de banda de entre $f \pm 5$ Hz. Los trazos filtrados se convirtieron en la función de wavelet:

$$W(f, t) = s(t) * g(f, t)$$

5

$$G(f, t) = e^{-(t^2)/(2\sigma^2)} e^{-\pi i f t}$$

10

donde * denota convolución, $\sigma = 5/(6f)$. La amplitud al cuadrado de $W(f, t)$ en una ventana de 500 ms se usó después para medir la potencia a diversas frecuencias. Todos los espectros de potencia de los registros de corte se normalizaron a $1/f$.

15

Las imágenes de células cultivadas se obtuvieron en el mismo microscopio usando una cámara CCD Retiga Exi (Qimaging inc.) a 100 ms de exposición con la ganancia de 30. La densidad de potencia de iluminación fue de 12 mW mm^{-2} a 500 nm con un conjunto de filtros EYFP convencionales. La cuantificación de la fluorescencia se realizó con el software ImageJ marcando una región que contenía el soma y la neuritis proximal y calculando para cada célula la intensidad total de píxeles integrados en esa región, en lugar de la fluorescencia promedio, puesto que es probable que las fotocorrientes estén relacionadas con el número total de canales unidas a la membrana en lugar de la expresión de canales promedio por área.

20

Usando el pinzamiento de corriente, se estimuló una única célula piramidal con una serie de formas de onda de CPSE simuladas. Los eventos de CPSEs individuales tuvieron magnitudes de pico de corriente de 200 pA y decayeron con una constante de tiempo de 2 ms. Cada experimento se dividió en 10 barridos, cada 10 segundos de duración y se separaron por 5 segundos para minimizar la reducción. Cada barrido se dividió en segmentos de 500 ms. El número total de CPSEs en cada segmento de 500 ms se eligió al azar de entre una distribución uniforme de entre 0 y 250. Después, los tiempos de las CPSEs dentro del segmento de 500 ms se seleccionaron al azar de entre una distribución uniforme que se extiende a lo largo de todo el segmento, simulando una entrada excitadora de una población de neuronas no sincronizadas. Empíricamente, estos parámetros de estimulación condujeron de manera confiable a las neuronas piramidales a velocidades de disparo de 0 a 30 Hz. En condiciones marcadas como línea de base, se administró un pulso de 10 segundos de luz de 590 nm para desactivar completamente la opsina antes de ejecutar el protocolo de CPSEs. En condiciones donde se activó la opsina, un pulso de 1 segundo de luz de 470 nm precedió al protocolo de CPSEs.

25

30

35

40

Para comprender el efecto neto del equilibrio E/I alterado en el procesamiento de la información, se calculó la información mutua entre la velocidad de las CPSEs de entrada de cada neurona y la velocidad de picos de salida, que captura los cambios relevantes en forma de la curva I-O y en la variabilidad de la respuesta. En primer lugar, se estimó la distribución conjunta de la velocidad de las CPSEs y la velocidad de aumento puntual, la velocidad de las CPSEs y la velocidad de aumento y la construcción de un histograma conjunto. Los intervalos de tiempo tenían 125 ms de ancho y la velocidad de las CPSEs se dividió en 10 intervalos igualmente espaciados de 0 a 500 Hz, aunque los resultados de información mutua fueron uniformes en una amplia gama de parámetros de agrupación. La velocidad de aumento se dividió usando el menor ancho significativo del intervalo dado el ancho de la bandeja de tiempo (por ejemplo, el ancho del intervalo de 8 Hz para los intervalos de tiempo de 125 ms) A partir de este histograma conjunto, se computó la información mutua, como se ha descrito anteriormente, igual a la diferencia entre la entropía de respuesta y la entropía de ruido.

45

50

La entropía de respuesta cuantifica la cantidad total de incertidumbre en la velocidad de aumento de salida de la neurona. La entropía de ruido cuantifica la incertidumbre que permanece en la velocidad de aumento de salida dada la velocidad de entrada. Obsérvese que la información máxima que las respuestas neuronales pueden transmitir sobre el estímulo de entrada es la entropía del conjunto de estímulos. Para 10 intervalos de velocidad de las CPSEs de entrada igualmente espaciados y una distribución uniforme de la velocidad de entrada en estos intervalos, la entropía de la velocidad de entrada es $\log_2(10) = 3,322$ bits.

55

La información mutua calculada a partir de distribuciones de probabilidad submuestreadas puede sesgarse ascendenetemente. En consecuencia, todos los valores notificados de información mutua, entropía de respuesta y entropía de ruido se corrigieron por el sesgo debido al submuestreo. Esta corrección se realiza calculando valores de fracciones más pequeñas (de la mitad a una octava parte) de los datos completos y extrapolando al límite de datos infinitos. Usando ventanas de tiempo de 125 ms, los factores de corrección fueron siempre inferiores a 0,07 bits.

60

Se crearon vectores y se realizaron inyecciones como anteriormente.

Resultados

65

Usando esta agrupación de genes de opsina modificados por ingeniería genética múltiples veces, se exploraron las posibilidades para el control combinatorio de células y proyecciones dentro de sistemas de mamíferos intactos. En primer lugar, se preguntó si las neuronas excitadoras e inhibitoras que se encuentran en el mismo microcircuito

podrían abordarse de forma separada mediante la respectiva introducción de variantes C1V1 y ChR convencionales en estas dos poblaciones de células. Se descubrió que las neuronas del hipocampo cultivadas que expresaban C1V1E122T/E162T se dispararon en respuesta a pulsos de luz verde de 2 ms (560 nm) pero no a pulsos de luz violeta. Por el contrario, las células que expresaban ChR2-H134R se disparaban en respuesta a pulsos de luz de 2 ms a 405 nm, pero no en respuesta a pulsos de luz de 2 ms a 561 nm (FIG. 4A). Por tanto, este principio se sometió a ensayo dentro de cortes de cerebro vivo; en el presente documento, AAV5-CaMKII α ::C1V1-EI22T/E162T-ts-mCherry junto con AAV5-EFla-DIO::ChR2-H134R-EYFP se expresó en mPFC de ratones PV::Cre (FIG. 4B). En las neuronas piramidales que no expresaban ninguna opsina, los pulsos de luz de 405 nm disparaban corrientes postsinápticas inhibitorias robustas y rápidas debido a la activación directa de células PV (FIG. 4C), mientras que los pulsos de luz de 561 nm disparaban tanto CPSE de latencia corta (FIG. 4D) como CPSI polisinápticas de larga latencia esperadas que surgían del impulso de células piramidales que expresaban C1V1 de neuronas inhibitorias locales (FIG. 4C).

Después se exploró la excitación de estos elementos celulares independientes *in vivo* con registros de Optrode (FIG. 4E, izquierda). Para examinar el efecto inhibitorio de la actividad de las células PV en la activación de las neuronas piramidales, se diseñó un protocolo experimental en el que los pulsos de luz violeta de 5 Hz (para activar ChR2 en células PV) precedió a los pulsos de luz verde de 5 Hz (para activar C1V1 en las neuronas piramidales excitadoras) con intervalos entre pulsos variables. Cuando los pulsos de luz violeta y verde se separaron por 100 ms (FIG. 4E, trazo superior), las respuestas a los pulsos de luz verde no se vieron afectadas por los pulsos violetas. Sin embargo, a medida que se redujeron los retrasos entre los pulsos violeta y verde, los eventos inducidos por luz verde se inhibieron más fácilmente y se suprimieron completamente cuando los pulsos de luz se presentaron con suficiente sincronía (FIG. 4E, trazo inferior; datos de sumario en la FIG. 4F). Estos datos demuestran la activación optogenética combinatoria dentro de un mamífero intacto (impulsando una población sola o en combinación temporal precisa con otra), aprovechando la velocidad de las opsinas y las propiedades de los pulsos de luz entregados.

Ejemplo 5: Efecto de la activación independiente de los axones glutamatérgicos corticotálámicos (CT) y talamocorticales (TC) que inciden en las neuronas del núcleo talámico reticular

Para validar la propiedad de control combinatorio para proyecciones axonales en lugar de la estimulación somática celular directa, el efecto de la activación independiente de axones glutamatérgicos corticotálámicos (CT) y talamocorticales (TC) que inciden en las neuronas del núcleo talámico reticular (nRT) (FIG. 5A) se examinó en cortes talámicos.

Materiales y métodos

Se anestesiaron ratones C57BL/6J de tipo silvestre (días postnatales 90-120) con pentobarbital (100 mg/kg, i.p.) y se decapitaron. Se realizó la preparación de corte talámico y los registros de pinzamiento zonal de células completas. Se obtuvieron registros de neuronas nRT (talámicas reticulares) y TC (talamocorticales de relevo) identificadas visualmente usando ópticas de contraste diferencial con un Zeiss (Oberkochen, Alemania), un microscopio Axioskop y una cámara de video infrarroja. Para los registros de CPSEs y pinzamiento de corriente, la solución interna contenía (en mM): K-gluconato 120, KCl 11, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, Hepes 10, EGTA 1. El pH se ajustó a 7,4 con KOH (290 mOsm). Se estimó E_{Cl}⁻ ~ -60 mV basándose en la ecuación de Nernst. Los potenciales se corrigieron para un potencial de unión líquida de -15 mV. Para experimentos de pinzamiento de voltaje, las neuronas se pinzaron a -80 mV y las EPSE se aislaron farmacológicamente mediante la aplicación en baño del antagonista del receptor GABAA picrotoxina (50 μ M, Tocris). En todas las condiciones de registro, se controló la resistencia de acceso y se incluyeron células para el análisis solo si la resistencia de acceso era < 18 M Ω y el cambio de resistencia era < 25 % en el transcurso del experimento.

Se inyectaron 600 nl de rAAV5/CaMKII α -hChR2(H134R)-EYFP o 900 nl de rAAV5-CaMKII α C1V1(E122T/E162T)-TS-mCherry estereotáxicamente en el tálamo ventrobasal (VB) o la corteza de barril, respectivamente, de ratones C57/6J de tipo silvestre *in vivo*, entre los días postnatales 30-35. Las inyecciones intra-corticales e intra-tálamicas (VB) se realizaron en los mismos ratones (n = 6). Las inyecciones intra-corticales se realizaron (desde bregma) 1,3 mm posteriores, 3 mm laterales, 1,15 mm por debajo de la superficie cortical. Las inyecciones intra-tálamicas fueron 1,7 mm posteriores, 1,5 mm laterales, 3,5 mm por debajo de la superficie cortical. Los ratones se sacrificaron ~2-3 meses después de las inyecciones y se hicieron corte s talámicos cerebrales horizontales para la estimulación óptica y los registros *in vitro* como se ha descrito anteriormente. Se retiró el tálamo VB para evitar la activación disináptica de las neuronas nRT a través de la vía CT-TC-nRT. El corte del tálamo VB a partir de los cortes retiró todos los cuerpos celulares fotosensibles de la preparación, permitió el examen directo de las proyecciones CTnRT y TC-nRT y no afectó a las propiedades de la membrana eléctrica de las neuronas nRT (no se muestra). La activación óptica de TC que expresaba ChR2 y los axones de TC que expresaban C1V1 se realizaron con estímulos láser de 405 nm y 560 nm, respectivamente (pulsos de luz de 5 ms de duración, 2-3 mW) (OEM Laser Systems, MI) entregados con fibra óptica (BFL 37-300, ThorLabs) en sentido ascendente a lo largo de las vías CT y TC que se proyectan a nRT. Se usó una intensidad de estimulación mínima, definida como la potencia luminica que dio como resultado fallos del 50 al 70 % (30-50 % de éxitos), cinética de respuesta fija y variabilidad de amplitud de respuesta baja. Consecuentemente, las CPSE provocadas mínimas fueron resultado presumiblemente de la activación óptica

selectiva de axones de TC o TC únicos presinápticos a la célula registrada. La potencia lumínica de estimulación se incrementó ligeramente (~5 % por encima de la estimulación mínima) hasta que el número de fallos se convirtió en 0. Las entradas de CT y TC se estimularon (simultáneamente) y se registraron las CPSE y PPSE provocadas mínimas (cada una por debajo del umbral individualmente para el disparo del potencial de acción) en células nRT.

5 La significación estadística se calculó usando ensayos *t* de dos colas pareados o no pareados, según corresponda. Los datos se analizaron usando el conjunto de herramientas Matlab Statistics o Microsoft Excel

Resultados

10 La estimulación mínima de axones TC provocó corrientes post-sinápticas excitadoras grandes y rápidas (CPSE) en las neuronas nRT, mientras que la estimulación mínima de axones CT provocó CPSEs pequeñas y lentas en las neuronas nRT (FIG. 5B), ambas son típicas de estas vías.

15 A continuación, se examinó la integración sináptica de las entradas CT y TC en condiciones de retardo variable entre estas dos entradas. Los PPSE por debajo de los umbrales de cada vía se convirtieron en un umbral superior para el disparo del potencial de acción solo cuando coincidían en 5 ms (FIG. 5C-D). La precisión temporal de la activación de C1V1 y ChR2 permitió un control fiable del retardo entre las entradas TC y CT y, por tanto, permitió la determinación de una ventana estrecha (-5 ms) de integración sináptica eficaz en las células nRT, no observable anteriormente con las características eléctricas, farmacológicas o técnicas optogenéticas existentes debido a la conectividad recíproca de la corteza y el tálamo, así como la estrecha aproximación de los axones CT y TC. Estos resultados demuestran por primera vez, en la misma preparación intacta, la activación independiente de distintas proyecciones axonales para examinar sus efectos combinatorios en la misma célula diana.

25 Ejemplo 6: Uso de C1V1 y SSFO para conseguir la separación espectral de la activación neural dentro del mismo circuito

30 En las dos preparaciones anteriores, se usaron láseres de espectro visible violeta (405 nm) y verde (560 nm) para conseguir la activación separable del dos opsinas. Aunque los láseres de 405 nm entregan luz no UV segura, para muchas aplicaciones puede ser preferible usar luz láser de 470 nm para la opsina que responde al azul, puesto que la luz de 470 nm penetrará en el tejido más profundamente, se dispersará menos y se entregará más fácil y económicamente desde fuentes de luz azul comunes. Aunque esto puede parecer imposible, puesto que la luz de 470 nm activará parcialmente C1V1 (FIG. 1G) así como ChR2, el control combinatorio podría conseguirse incluso con luz de 470 nm, aprovechando tanto las propiedades temporales de SSFO como la naturaleza de desplazamiento al rojo de C1V1 para conseguir la "separación espectral" dentro del tejido de mamífero intacto. Para someter a ensayo la presente posibilidad, se decidió comparar directamente, dentro de la misma preparación, los efectos sobre la actividad rítmica de potenciar de manera estable células excitadoras o inhibitorias (FIG. 6A).

Materiales y métodos

40 Se generaron ChR2-D156A y SSFO insertando mutaciones puntuales en el vector pLenti-CaMKII α -ChR2-EYFP-WPRE usando mutagénesis dirigida al sitio (Quikchange II XL; Stratagene). La entrega de genes víricos, el corte cerebral coronal y el registro de pinzamientos zonal se realizaron como se ha indicado anteriormente. Se realizaron inyecciones de virus dobles para expresar CaMKII α ::C1V1 y DIO-SSFO en mPFC de ratones PV::Cre.

45 Mientras se manipulaban células o tejidos que expresaban SSFO, se tuvo cuidado de minimizar la exposición a la luz para evitar la activación por la luz ambiental. Antes de cada experimento, se aplicó un pulso de 20 s de luz de 590 nm para convertir todos los canales de SSFO en el estado oscuro y evitar la reducción de las fotocorrientes. Para la adquisición de espectros de activación y desactivación de SSFO, se realizaron registros de neuronas cultivadas en modo de pinzamiento de voltaje. Para registrar espectros de activación, se aplicó un pulso de 1 s de longitud de onda variable, seguido de un pulso de 10 s de 590 nm. Los espectros de desactivación se adquirieron aplicando en primer lugar un pulso de 1 s de 470 nm para activar SSFO, seguido de un pulso de 10 s de longitud de onda variable. La activación o desactivación de la red se calculó dividiendo el cambio de fotocorriente después del primer o segundo pulso, respectivamente, por el cambio máximo de fotocorriente inducido por la longitud de onda máxima para esa célula. Los valores negativos en los espectros de desactivación fueron resultado de trazos en los que, por ejemplo, un pulso de 10 s a 470 nm condujo a un ligero aumento de la fotocorriente en lugar de desactivar los canales. Esto podría ser el resultado del ancho del filtro de paso de banda relativamente amplio (20 nm) utilizado para estos registros con el Sutter DG-4. Se espera que las longitudes de onda intermedias (entre 470 nm y 520 nm) tengan un efecto mixto sobre la población del canal por las mismas razones.

60 Se realizaron cálculos de flujo de fotones para las propiedades de integración de SSFO calculando el flujo de fotones a través del objetivo del microscopio a cada potencia lumínica y después dividiéndolo para alcanzar el flujo de fotones a través de la superficie celular, según el diámetro de las células registradas y aproximando la forma aproximada de la célula a un esferoide.

65

Resultados

SSFO es una nueva canalrodopsina modificada por ingeniería genética múltiple con una constante de descomposición de 29 minutos que puede desactivarse de manera eficaz en las mismas longitudes de onda que activan C1V1 y permite una excitación biestable de las neuronas durante muchos minutos con una mayor sensibilidad a la luz. Puede encontrarse información sobre SSFO en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2010/056970 y en la Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 61/410.704 y 61/410.711. Se realizaron inyecciones dobles de virus para expresar CaMKIIa::C1V1 y DIO::SSFO en cortes agudos de mPFC de ratones PV::Cre. En estas condiciones, las células piramidales excitadoras deben responder a la luz de desplazamiento al rojo y las células PV inhibitoras a la luz azul. De hecho, en respuesta a un pulso de luz de 1 s de 470 nm para activar SSFO en las células PV, la velocidad de las CPSI en curso aumentó de manera estable de $8,5 \pm 1,2$ Hz en el momento basal (período 3, **FIG. 6B**) a $16,8 \pm 2,1$ Hz después del pulso de luz azul (período 2; $n = 4$ registros, $p < 0,005$, ensayo t pareado; **FIG. 6C**), demostrando la activación persistente de las células inhibitoras que expresan SSFO. A pesar de que la luz de 470 nm también activará de forma transitoria C1V1, la presente activación solo puede ocurrir durante el pulso de luz debido a la desactivación muy rápida de C1V1 después del apagado de la luz; el período posterior a la luz prolongado se caracteriza solamente por la actividad de SSFO (**FIG. 6B**), que ilustra la separación temporal de los modos de control optogenético. Curiosamente, durante este período prolongado de actividad elevada de la neurona PV, no se produjo ningún pico significativamente elevado en el espectro de potencia de la CPSI, lo que sugiere que la activación directa de las neuronas PV solas en esta preparación reducida es insuficiente para desencadenar la sincronía gamma en la red. Sin embargo, en marcado contraste, durante el pulso de luz de 470 nm cuando se espera el mismo nivel de activación de la neurona PV, pero también la activación parcial de células piramidales que expresan C1V1, se observó un pico gamma pronunciado (frecuencia máxima $39,2 \pm 3,5$ Hz; $n = 4$ registros) que se extendieron al intervalo gamma alto (> 60 Hz).

Además, en los mismos experimentos (de hecho, más tarde en los mismos barridos registrados), la activación directa en este caso de células piramidales de C1V1 solas con luz de 590 nm (que activa simultáneamente C1V1 en células PY y desactiva el SSFO en células PV) condujo a una sincronía gamma robusta, con un pico de frecuencia más bajo ($26,6 \pm 1$ Hz, $n = 6$ registros). Demostrar que no fue necesaria ninguna actividad residual de la neurona PV asociada a la historia previa de activación de SSFO en células PV para este efecto, de lo contrario, barridos idénticos con solo una historia de activación de C1V1 en las células piramidales y ninguna historia previa de velocidad de CPSI elevada provocaron el mismo resultado). Estos resultados ilustran el principio integrado del control combinatorio espectrot temporal y también sugieren que la actividad elevada en las neuronas piramidales puede dar origen a oscilaciones gamma a través de las propiedades de red³¹. Curiosamente, durante el pulso de luz de 470 nm, cuando se esperaba la activación de células tanto PV como piramidales, se observó uniformemente sincronía gamma a frecuencias más altas que cuando solo se activaron neuronas excitadoras, apoyando y ampliando la información sobre la importancia coordinada de las células PV y piramidales en provocar oscilaciones gamma.³¹⁻³³

Conclusión

En el curso de este trabajo, se generó una familia de nuevas herramientas que se denominan variantes C1V1. C1V1 es un gen de opsina desplazada al rojo ensamblado, en particular, a partir de fragmentos de otros genes de opsina que no se expresan bien solo en las neuronas, pero que se identificaron en búsquedas genómicas anteriores (VChR1 y RCP). C1V1 no contiene ninguna secuencia de ChR2 en absoluto, sin embargo, sus variantes modificadas por ingeniería genética múltiple notificadas en el presente documento ahora representan las canalrodopsinas más potentes, más desplazadas al rojo y más estables conocidas. La mutagénesis en posiciones clave de aminoácidos a lo largo del bolsillo de unión retiniano condujo a la generación de (1) C1V1(E162T), un gen de opsina desplazado al rojo de alta expresión generado como un homólogo rápido de la mutación ChETA; (2) C1V1(E122T) que muestra el hombro del espectro de acción más rojo e incluso puede usarse para disparar potenciales de acción con luz roja (3) C1V1(E122T/E162T) -un mutante combinado con la desensibilización inferior, la desactivación más rápida, la menor activación por luz violeta para la activación cruzada mínima con ChR2 y la expresión fuerte. De hecho, pueden seleccionarse variantes de C1V1 para diferentes aplicaciones basadas en las consideraciones del tamaño actual, la cinética de desactivación y el espectro de acción (**Tabla 1**), por ejemplo, en el trabajo con dos fotones, puesto que la activación de ChR2 por 2P ha sido difícil debido al tamaño de corriente y la cinética rápida del cierre del canal, es probable que C1V1(E162T) sea de interés. Las variantes de C1V1 permitieron el ensayo directo de la hipótesis de que niveles crecientes de equilibrio E/I celular elevado darían origen a intensidades crecientes del ritmo gamma, un fenómeno anteriormente vinculado a la esquizofrenia y al autismo. Por supuesto, las diferentes herramientas también son sinérgicas; el uso de variantes de C1V1 junto con ChR2 permitió el impulso fiable y separado de la propagación en las dos poblaciones neuronales distintas abordadas en este estudio, las neuronas piramidales excitadoras y las interneuronas inhibitoras que expresan parvalbúmina de aumento rápido, y confirman que el equilibrio constante de E/I celular fue eficaz en la generación de actividad de circuito de banda gamma, aprovechando las diferencias tanto cinéticas como espectrales en las herramientas optogenéticas. Este tipo de activación combinatoria puede extenderse más allá de múltiples tipos celulares a múltiples tipos de vías neurales, por ejemplo, la activación separable de los picos, dentro de una única región del cerebro, en dos vías aferentes axonales convergentes que surgen de distintas ubicaciones, un objetivo largamente buscado de sistemas de neurociencia.

Los ejemplos, que tienen por objeto ser puramente de ejemplo de la invención y, por tanto, no han de considerarse limitantes de la invención de ninguna manera, también describen y detallan aspectos y realizaciones de la invención analizada anteriormente. Los ejemplos anteriores y la descripción detallada se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación. Pueden implementarse juntas y/o de otras maneras diversas realizaciones descritas anteriormente y analizadas en los Apéndices adjuntos. También pueden implementarse uno o más de los aspectos de la presente divulgación y de los Apéndices de manera más separada o integrada, como debería ser evidente y es útil de acuerdo con aplicaciones específicas de destino. En particular, todas las publicaciones y apéndices citados en el presente documento tienen el fin de describir y desvelar composiciones y metodologías que podrían usarse en relación con la invención. Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y con fines de claridad de comprensión, será evidente para los expertos en la materia a la luz de contenido de la presente invención que pueden hacerse determinados cambios y modificaciones.

REFERENCIAS

- 15 Deisseroth, K. *Optogenetics. Nat Methods* 8, 26-29 (2011).
 Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. y Deisseroth, K. *Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. Nat Neurosci* 8, 1263-1268 (2005).
 Nagel, G. et al. *Light activation of canalrodopsina-2 in excitable cells of Caenorhabditis elegans triggers rapid behavioral responses. Curr Biol* 15, 2279-2284 (2005).
- 20 Li, X. et al. *Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae canalrodopsina. Proc Natl Acad Sci USA* 102, 17816-17821 (2005).
 Bi, A. et al. *Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. Neuron* 50, 23-33 (2006).
 Schroll, C. et al. *Light-induced activation of distinct modulatory neurons triggers appetitive or aversive learning in Drosophila larvae. Curr Biol* 16, 1741-1747 (2006).
- 25 Zhang, F. et al. *Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. Nature* 446, 633-639 (2007).
 Douglass, A.D., Kraves, S., Deisseroth, K., Schier, A.F. y Engert, F. *Escape behavior elicited by single, canalrodopsina-2-evoked spikes in zebrafish somatosensory neurons. Curr Biol* 18, 1133-1137 (2008).
 Hagglund, M., Borgius, L., Dougherty, K.J. y Kiehn, O. *Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion. Nature neuroscience* 13, 246-252, doi:10.1038/nn.2482 (2010).
- 30 Huber, D. et al. *Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. Nature* 451, 61-64 (2008).
 Hira, R. et al. *Transcranial optogenetic stimulation for functional mapping of the motor cortex. J Neurosci Methods* 179, 258-263 (2009).
- 35 Higley, M.J. y Sabatini, B.L. *Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. Nature neuroscience* 13, 958-966, doi:10.1038/nn.2592 (2010).
 Petreanu, L., Huber, D., Sobczyk, A. y Svoboda, K. *Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. Nat Neurosci* 10, 663-668 (2007).
- 40 Ishizuka, T., Kakuda, M., Araki, R. y Yawo, H. *Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. Neurosci Res* 54, 85-94 (2006).
 Nagel, G. et al. *Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. Proc Natl Acad Sci USA* 100, 13940-13945 (2003).
 Rickgauer, J.P. y Tank, D.W. *Two-photon excitation of canalrodopsina-2 at saturation. Proc Natl Acad Sci USA* 106, 15025-15030 (2009).
- 45 Yonehara, K. et al. *Spatially asymmetric reorganization of inhibition establishes a motion-sensitive circuit. Nature* 469, 407-410, doi:10.1038/nature09711 (2011).
 Yaroslavsky, A.N. et al. *Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range. Phys Med Biol* 47, 2059-2073 (2002).
- 50 Wang, H. et al. *Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two canalrodopsinas from Chlamydomonas. J Biol Chem* 284, 5685-5596 (2009).
 Wen, L. et al. *Opto-current-clamp actuation of cortical neurons using a strategically designed canalrodopsina. PLoS One* 5, e12893 (2010).
- 55 Zhang, F. et al. *Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from Volvox carteri. Nat Neurosci* 11, 631-633 (2008).
 Berndt, A., Yizhar, O., Gunaydin, L.A., Hegemann, P. y Deisseroth, K. *Bi-stable neural state switches. Nat Neurosci* 12, 229-234 (2009).
- 60 Barnann, C., Gueta, R., Kleinlogel, S., Nagel, G. y Bamberg, E. *Structural guidance of the photocycle of canalrodopsina-2 by an interhelical hydrogen bond. Biochemistry* 49, 267-278 (2010).
 Schoenenberger, P., Gerosa, D. y Oertner, T.G. *Temporal control of immediate early gene induction by light. PLoS One* 4, e8185 (2009).
- 65 Stehfest, K., Ritter, E., Berndt, A., Bartl, F. y Hegemann, P. *The branched photocycle of the slow-cycling canalrodopsina-2 mutant C128T. J Mol Biol* 398, 690-702 (2010).
 Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O. y Deisseroth, K. *Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. Nature* 459, 698-702 (2009).
 Lin, J.Y., Lin, M.Z., Steinbach, P. y Tsien, R.Y. *Characterization of engineered canalrodopsina variants with*

improved properties and kinetics. Biophys J 96, 1803-1814 (2009).
 Gunaydin, L.A. et al. *Ultrafast optogenetic control. Nat Neurosci* 13, 387-392 (2010).
 Tittor, J., Schweiger, U., Oesterhelt, D. y Bamberg, E. *Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N. Biophys J* 67, 1682-1690 (1994).
 5 Sugiyama, Y. et al. *Photocurrent attenuation by a single polar-to-nonpolar point mutation of canalrodopsina-2. Photochem Photobiol Sci* 8, 328-336 (2009).
 Adesnik, H. y Scanziani, M. *Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits. Nature* 464, 1155-1160 (2010).
 Colgin, L.L. et al. *Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. Nature* 462, 353-357 (2009).
 10 Cardin, J.A. et al. *Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. Nature* 459, 663-667 (2009).
 Bamann, C., Kirsch, T., Nagel, G. y Bamberg, E. *Spectral characteristics of the photocycle of canalrodopsina-2 and its implication for channel function. J Mol Biol* 375, 686-694 (2008).

15

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 (secuencia de aminoácidos de C1V1 humanizado)

20

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLENNGSVI
 CIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWEEIYVATIEMI
 KFIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKTWVWLRVYAEWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGC
 IVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSYGMYYTFHAAKVIYIEAFHTVPKICRELVRVMAWTFVAVW
 MFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDIAKNMVGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQ
 EMEVETLVAEEED

SEQ ID NO: 2 (secuencia de nucleótido de C1V1 humanizado)

25

atgtcgcgacgccctgctgctcctgctcattggcggggcggcgtgcagcgggcatggcaggagcgcaaccggaagcgatgacgaccgtcccgtggct
 acgcaagacggaccagattacgtgtccacagagcccacgagcggtgtgttcagacatcatacacactgaaaacaatgtagcgtcattgcatccctaac
 aatgggcagtggtttcctggcctggttgaaatcgaacggtacgaacgccgagaagctggcggcgaacattctgagtgatcacattgcactctcggcgct
 ctgacctatgtctatgctaccagacttgaaatccacgtgtggtgggaagagatctacgtagcaaccattgaaatgatcaagttatcattgagtattccatgagt
 ttgacgaaccggcctgaatcactcatcgaatgggaataagacagctctggttgaggtatgaggagtgctcctcacctgccccgtccttctgatccatctgagcaa
 cctcacaggcctgaaggacgattatagaaaaggactatggcctgtggtttctgatgtggatgcatcgtgtggggcgcaaccagcgccatgtgtacggggt
 ggacgaagatcctgtctctcctcattcattgagctatgtgtatatacctatttctgctgctgataaagtattatcgaagcattccacacagttccaaagggattgtc
 gagaactgttcgagtgatggcctggacattctttgtgcttgggaatggtccagcctgtttctgctgggcacggaaggattcgggtcatatcagcccttatggat
 ctgcccattgggcactccatcctcgacctgattgcaaagaacatgtggggtgctgctgggaattacctgctgctgcaaatccacgagacacatctgtgtatggcg
 acatcagaagaagcagaaaattacgatcgccggccaagagatggaggtgagacactggtggctgaagaggaggactaa

SEQ ID NO: 3 (secuencia de aminoácidos de C1V1 E122T humanizado)

30

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLENNGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWETIYVATIEMIKFIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKTWVWLRVYAEWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSYGMYYTFHAAKVIYIEAFHTVPKICRELVRVMAWTFVAVWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDIAKNMVGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVEVETLVAEEED

SEQ ID NO: 4 (secuencia de nucleótido de C1V1 E122T humanizado)

atgtcgcgacgccctggctccttgcctcgcattggcggtggccttgcagcgggatcggcaggagcgtcaaccggaagc gatcgcaccgtccccgtggc
tacgcaagacggaccagattacgtgtccacagagcccacgagcggatgtgttcagacatcatacacactgaaaacaatggtagcgtcattgcatccctaa
caatgggcagtggtttgcctggcctggtgaaatcgaacgggtacgaacgccgagaagctggcggcgaacattctgcagtggtacacattcgcactctcggcg
ctctgccttatgttctatggctaccagactggaaatccacgtgtggttgggaacatctacgtagcaaccattgaaatgatcaagttatcattgagtattccatg
agtttgacgaaccggcgtaatctactatcgaatgggaataagacagtctggtgaggtatgcggagtgctcctcacctgcccggctctctgatccatctga
gcaacctcacagcctgaaggacgattatagcaaaaggactatggcctgtgtgttctgatgtgggatgcatcgtgtgggcgcaaccagcgcctatgttac
ggggtggacgaagatcctgtctcctcatctcattgagctatggtatgtatacctatcttcatgctgctaaagttatcgaagcattccacacagttccaaaaggg
atgtgcgagaactggcagtgatggcctggacattcttggcctggggaatgttccagctctgttctgctgggcacgggaaggattcggcatatcagccc
ttatggatctccattggcactccatcctcgacctgattgcaagaacatgtggggtgtctgggaattacctgcgctcaaaatccacgagcacatcctgtt
gtatggcgacatcagaagaagcagaaaattacgatcggccgccaagagatggaggtgagacactggtggctgaagaggaggactaa

5 **SEQ ID NO: 5 (secuencia de aminoácidos de C1V1 E162T humanizado)**

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVI
CIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKWSTCGWEEIYVATIEMI
KFHIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKT VWLRYATWLLTCPVLLIHL SNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGC
IVWGATSAMCTGWT KILFFLISLSYGM TYFHAAKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVAVG
MFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQ
EMEVETLVAAEEED

10 **SEQ ID NO: 6 (secuencia de nucleótido de C1V1 E162T humanizado)**

atgtcgcgacgccctggctccttgcctcgcattggcggtggccttgcagcgggatcggcaggagcgtcaaccggaagc gatcgcaccgtccccgtggc
acgcaagacggaccagattacgtgtccacagagcccacgagcggatgtgttcagacatcatacacactgaaaacaatggtagcgtcattgcatccctaac
aatgggcagtggtttgcctggcctggtgaaatcgaacgggtacgaacgccgagaagctggcggcgaacattctgcagtggtacacattcgcactctcggcgct
ctgccttatgttctatggctaccagactggaaatccacgtgtggttgggaagagatctacgtagcaaccattgaaatgatcaagttatcattgagtattccatgag
ttgacgaaccggcgtaatctactatcgaatgggaataagacagtctggtgaggtatgcgacgtggctcctcacctgcccggctctctgatccatctgagcaa
cctcacaggcctgaaggacgattatagcaaaaggactatggcctgtgtgttctgatgtgggatgcatcgtgtgggcgcaaccagcgcctatgttacggggt
ggacgaagatcctgttctcctcatctcattgagctatggtatgtatacctatcttcatgctgctaaagttatcgaagcattccacacagttccaaaagggattgtc
gagaactgtgccagtgatggcctggacattcttggcctggggaatgttccagctctgttctgctgggcacgggaaggattcggcatatcagccctatggat
ctgccattggcactccatcctcgacctgattgcaagaacatgtggggtgtctggggaattacctgcgctcaaaatccacgagcacatcctgttgtatggcg
acatcagaagaagcagaaaattacgatcggccgccaagagatggaggtgagacactggtggctgaagaggaggactaa

SEQ ID NO: 7 (secuencia de aminoácidos de C1V1 E122T/E162T humanizado)

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVI
CIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKWSTCGWETIYVATIEMI
KFHIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKT VWLRYATWLLTCPVLLIHL SNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGC
IVWGATSAMCTGWT KILFFLISLSYGM TYFHAAKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVAVG
MFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQ
EMEVETLVAAEEED

15

SEQ ID NO: 8 (secuencia de nucleótido de C1V1 E122T/E162T humanizado)

atgtcgcgacgcccgtggctcctgctctcgattggcggtggcgcttcagcgggatcggcaggagcgtcaaccggaagcgatgcgaccgtccccgtggct
 acgcaagacggaccagattacgtgtccacagagcccacgagcggatgtgttcagacatcatacacactgaaaacaatgtagcgtcattgcatccctaac
 aatgggcagtgttttgacctggcctgggtgaaatcgaacgggtacgaacgccgagaagctggcggcgaacattctgcagtggtacacattcgcactctcggcgct
 ctgcccttatgtctatggctaccagactggaaatccacgtgtggtgggaaacctctacgtagcaaccattgaaatgatcaagttatcattgagatttccatgagt
 ttgacgaaccggccgtaactactcatcgaatgggaaataagacagtctggttgaggtatgcgacgtggctcctcacctgcccggctctctgatccatctgagcaa
 cctcacaggcctgaaggacgattatagcaaaaggactatggcctgtgtttctgatgtgggatgcatcgtgtggggcgcaaccagcggcatgtgtacgggg
 ggacgaagatcctgttctctcatctcattgagctatggtatgtatacctatcttcatgctgctaaagtttatcgaagcattccacacagttcaaaaggattgtc
 gagaactgtcggagtgatggcctggacattcttggcctggggatgttccagctctgttctgctgggcacggaaggattcggctatcatcagcccttatggat
 ctgccattgggcactccatcctgacctgattgcaaaacatgtggggtgtgctggggaattacctgctgcaaaatccacgagcacatcctgtgtatggcg
 5 acatcagaagaagcagaaaattacgatcggccgcaagagatggaggttgagacactgggtggctgaagaggaggactaa

SEQ ID NO: 9 (secuencia de aminoácidos de C1V1 humanizado alternativo (C1V1_25))

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVICIPNNGQCF
 CLAWLKSNGTNAEKLAANILQWTFALSALCLMFYGYQTKWSTCGWEEIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPATLWLS
 SGNVWVMRYGEWLLTCPVLLIHLNLGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSYG
 MYTYFHAAKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVAVGMPFVLLGTEGFGHISPYGSAIGHSLDLIAKNM
 10 WGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVETLVAEEED

SEQ ID NO: 10 (secuencia de nucleótido de C1V1 humanizado alternativo (C1V1_25))

Atgagcagacggccctggctgctggccctgctctcgtgtggccctggccgccggcagcggcggagccagcaccggcagcggcaccctgcccgtt
 gccacacaggacggccccgactacgtgtccaccgggcccacgagcggatgctgtccagaccagctacaccctgaaaacaacggcagcgtgatctgcatc
 cccaacaacggcagtgcttctgctggcctggctgaagtcaacggcaccacgccgagaagctggcccaacatctgcagtggtacacctcgcacctg
 tctgccctgtgctgatgttctacggctaccagacctggaagtccacctgcccgtgggaggaaatctacgtggccaccatcagatgatcaagttcatcagag
 tactccacagagttcagagagcccaccctgtggctgtccagcggaaacggcgtggtgtggatgagatacggcgagtgctgctgacctgacctgctgctg
 tgatccacctgagcaacctgaccggactgaaggatgactacagcaagagaacatgggactgctggtgtccgatgtgggatgcatcgtgtggggagccacct
 ccgcatgtgaccggatggaccaagatcctgttctctgatcagcctgagctacggaatgtacaccttccacgcccaaggtgtacattgaggcctttca
 caccgtgcctaagggaatctgcagagaactggtcagagtgatggcctggaccttctctgctggcctggggaatgttccctgtgctgttctgctgggaaccgagg
 gattcggacacatcagcccttacggaagcggcatcggacacagcatcctggtatctgatcggcaagaacatgtggggagtgctgggaaactacctgagagtga
 agatccacgagcacatcctgctgtacggcgacatcagaagaagcagaagatcaccatcggcgacaggaatggaagtgcgacctggtggccgagga
 15 agaggat

SEQ ID NO: 11 secuencia de aminoácidos de Chr2

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAA
 GFSILLMFYAYQTKWSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLR
 YAEWLLTCPVILHLNLGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFL
 GLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFVSWGMFPILFILGPEGFVL
 SVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV
 EDEAEAGAVP

SEQ ID NO: 12 Chr2(H134R)

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAA
GFSILLLMFYAYQTKWSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLR
YAEWLLTCPVILIRLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFL
GLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPGRCRQVVTGMAWLVFFVSWGMFPILFILGPEGFGVL
SVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV
EDEAEAGAVP

5 **SEQ ID NO: 13 SFO**

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAAGFSILL
LMFYAYQTKWSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLR
YAEWLLTSPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFL
GLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPGRCRQVVTGMAWLVFFVSWGMFPILFILGPEGFGVL
SVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV
EDEAEAGAVP

10 **SEQ ID NO: 14 (SSFO)**

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAAGFSILL
LMFYAYQTKWSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLR
YAEWLLTSPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSAIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFL
GLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPGRCRQVVTGMAWLVFFVSWGMFPILFILGPEGFGVL
SVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLV
EDEAEAGAVP

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido quimérico activado por luz que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene más del 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido es sensible a la luz y es capaz de mediar una corriente de despolarización en una célula cuando la célula se ilumina con luz.
2. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una señal de tráfico C-terminal.
- 10 3. El polipéptido quimérico de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el polipéptido quimérico activado por luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene más del 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 1.
- 15 4. El polipéptido quimérico de la reivindicación 3, que comprende la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 7.
5. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Una célula de mamífero que expresa el polipéptido quimérico activado por luz de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polipéptido quimérico activado por luz está presente en la membrana celular.
7. Un método *in vitro* de uso de la célula de la reivindicación 6, que comprende activar con luz la proteína activada por luz.
- 25

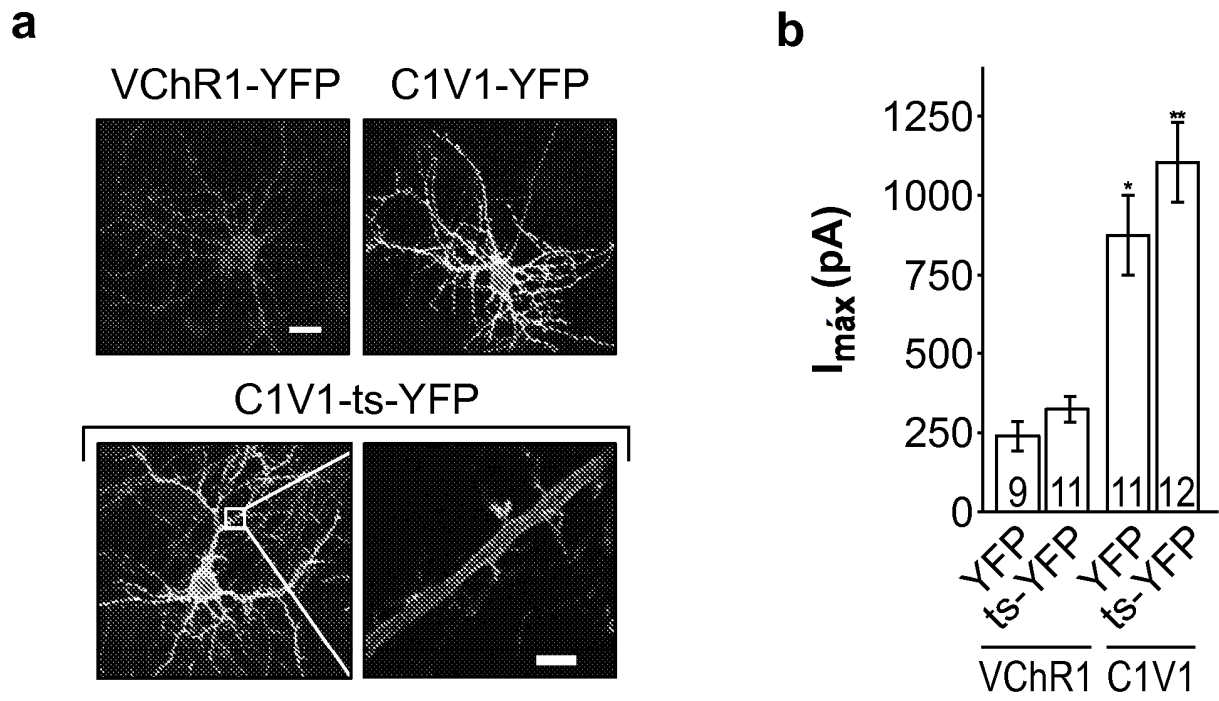


FIG. 1

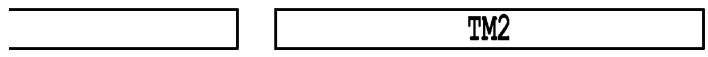
C

ChR1 MSRRPWLAL ALAVALAAGS AGASTGSDAT VPVATQDGPD YVFHRAHERM 60
 ChR2MDYGG ALSAVG.....REL 14
 VChR1MDYPPVARS 8

ChR1 LFQTSYTLN NGSVICIPNN GQCFCLAWLK SNGTNAEKLA ANILQWITFA 100
 ChR2 LFTVNPVVVN .GSVLVP..E DQCYCAGWIE SRGTNGAQT A SNVLQWLAAG 61
 VChR1 LIVRYPTDLG NGTVCMP..R GQCYCEGWLR SRGTSIEKTI AITLQWVFA 56



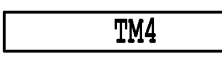
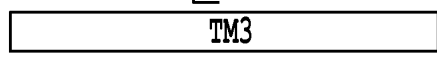
ChR1 LSALCLMFYQ YQTKWSTCGW EEIYVATIEM IKFIEYFHE FDEPAVIYSS 150
 ChR2 FSILLMFYA YQTKWSTCGW EEIYVCAIEM VKVILEFFFE FKNPSMLYLA 111
 VChR1 LSVACLGWYA YQAWRATCGW EEVYVALIEM MKSIIIEAFHE FDSPATLWLS 106



Corte y empalme 1

Corte y empalme 2

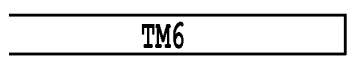
ChR1 NGNKTVWLRV AEWLLTCRVI LIHLSNLTGL ANDYNKRTMG LLVSDIGTIV 200
 ChR2 TGHVQWLRV AEWLLTCPVI LIHLSNLTGL SNDYSRRTMG LLVSDIGTIV 161
 VChR1 SGNVVMRY GEWLLTCPVL LIHLSNLTGL KDDYSKRTMG LLVSDVGCIV 156



ChR1 WGTAAALSKG YVRVIFFLMG LCGIYTFN AAKVIEAYH TVPKGICRDL 250
 ChR2 WGATSAMATG YVKVIFCLG LCGANTFFH AAKAYIEGYH TVPKGRCRQV 211
 VChR1 WGATSAMCTG WTKILFFLIS LSYGMYTFH AAKVIEAFH TVPKGICREL 206



ChR1 VRYLAWLYFC SWAMFPVFLF LGPEGFGHIN QFNSAIAHAI LDLASKNAWS 300
 ChR2 VTGMALFFV SWGMFPILFI LGPEGFVLS VYGSTVGTI IDLMSKNCWG 261
 VChR1 VRVMAWTFV AWGMFPVFLF LGTEGFGHIS PYGSAIGHSI LDLIAKNMWG 256



ChR1 MMGHFLRVKI HEHILLYGDI RKKQKVNAG QEMEVEVMVH EEDD 344
 ChR2 LLGHYLRVLI HEHILIHGDI RKTTLNIGG TEIEVETLVE DEAEAGAVP 310
 VChR1 VLGNYLRVKI HEHILLYGDI RKKQKITIAG QEMEVELVA EEED 300

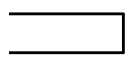
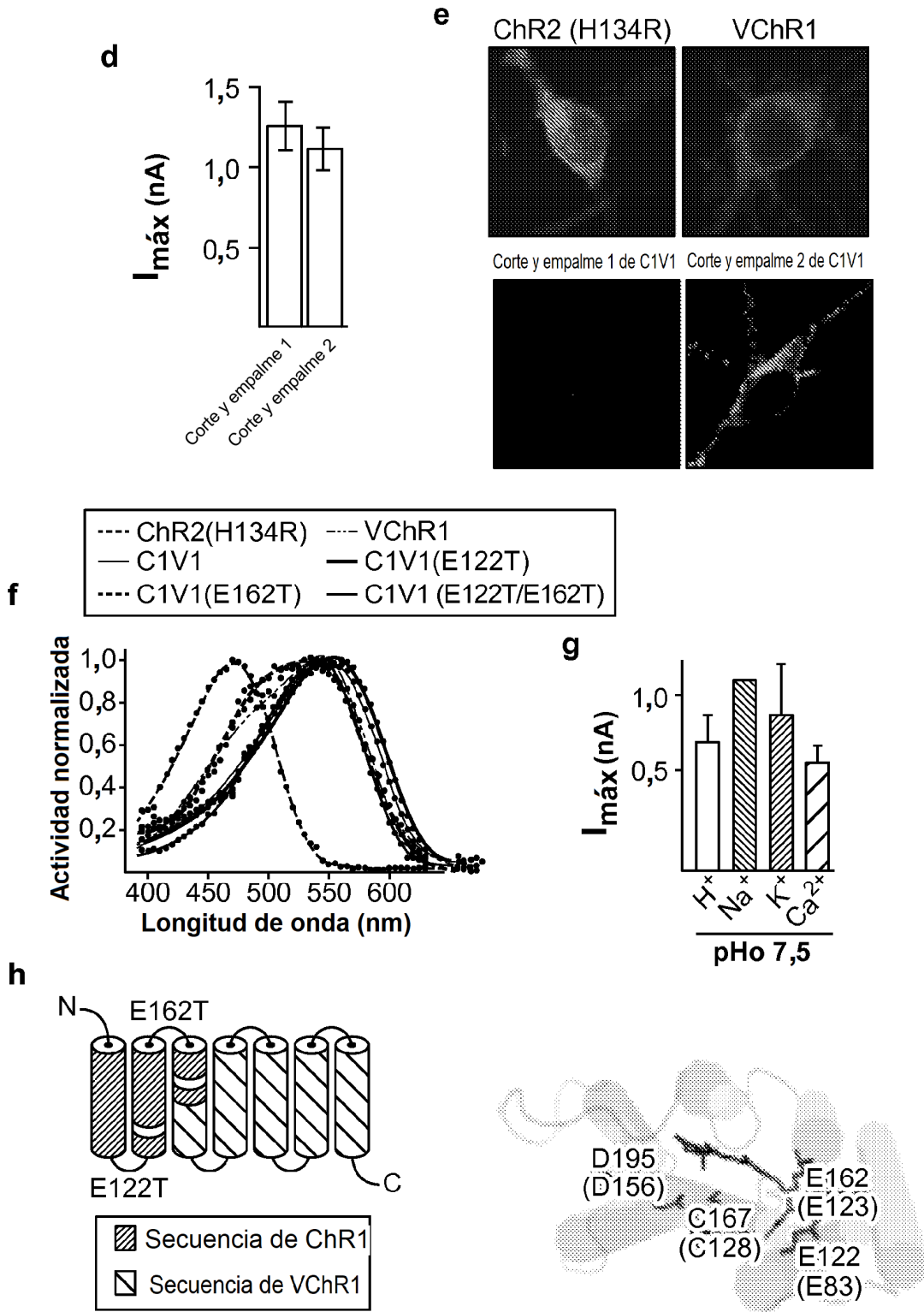


FIG. 1 (Cont. 1)



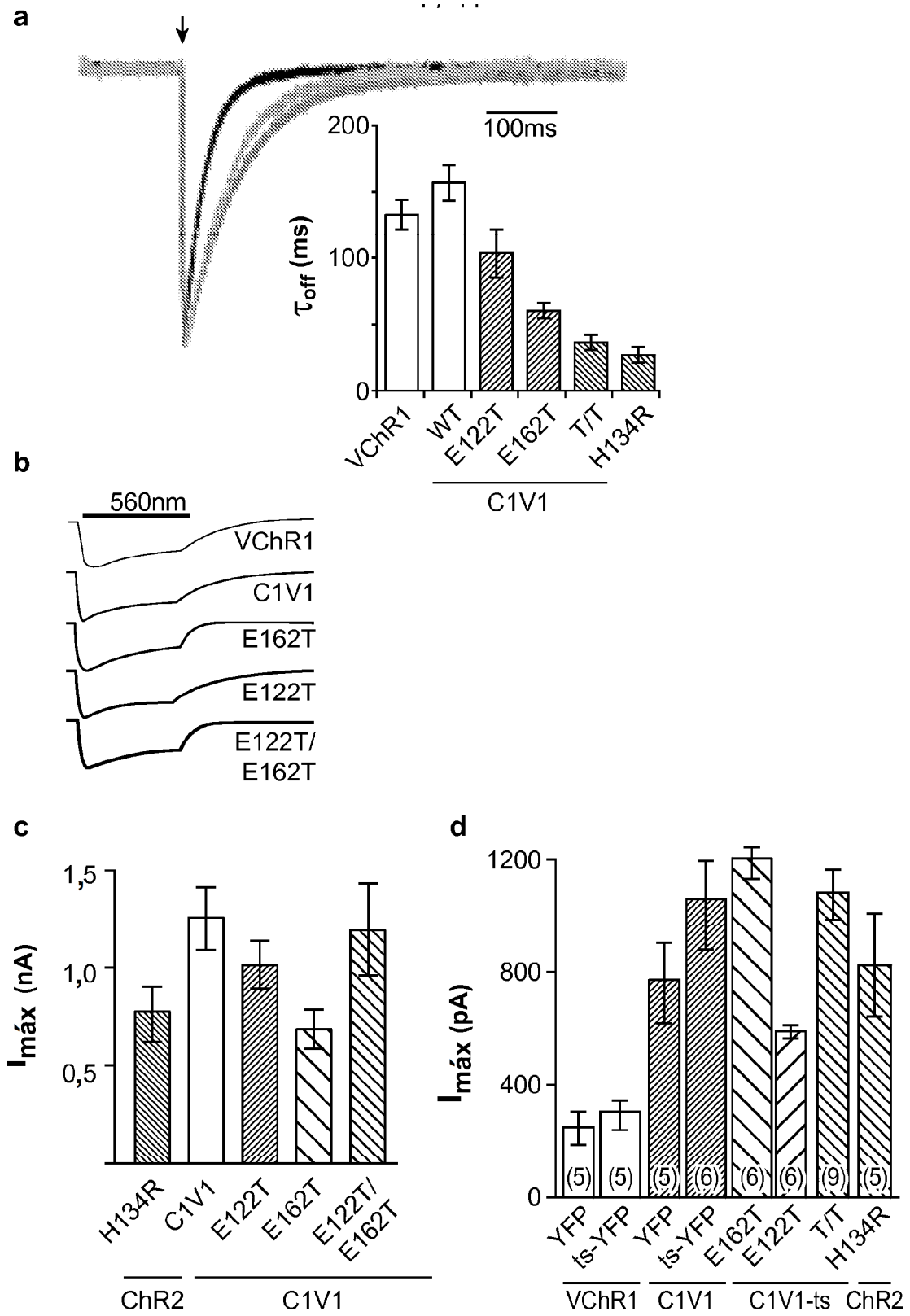


FIG. 2

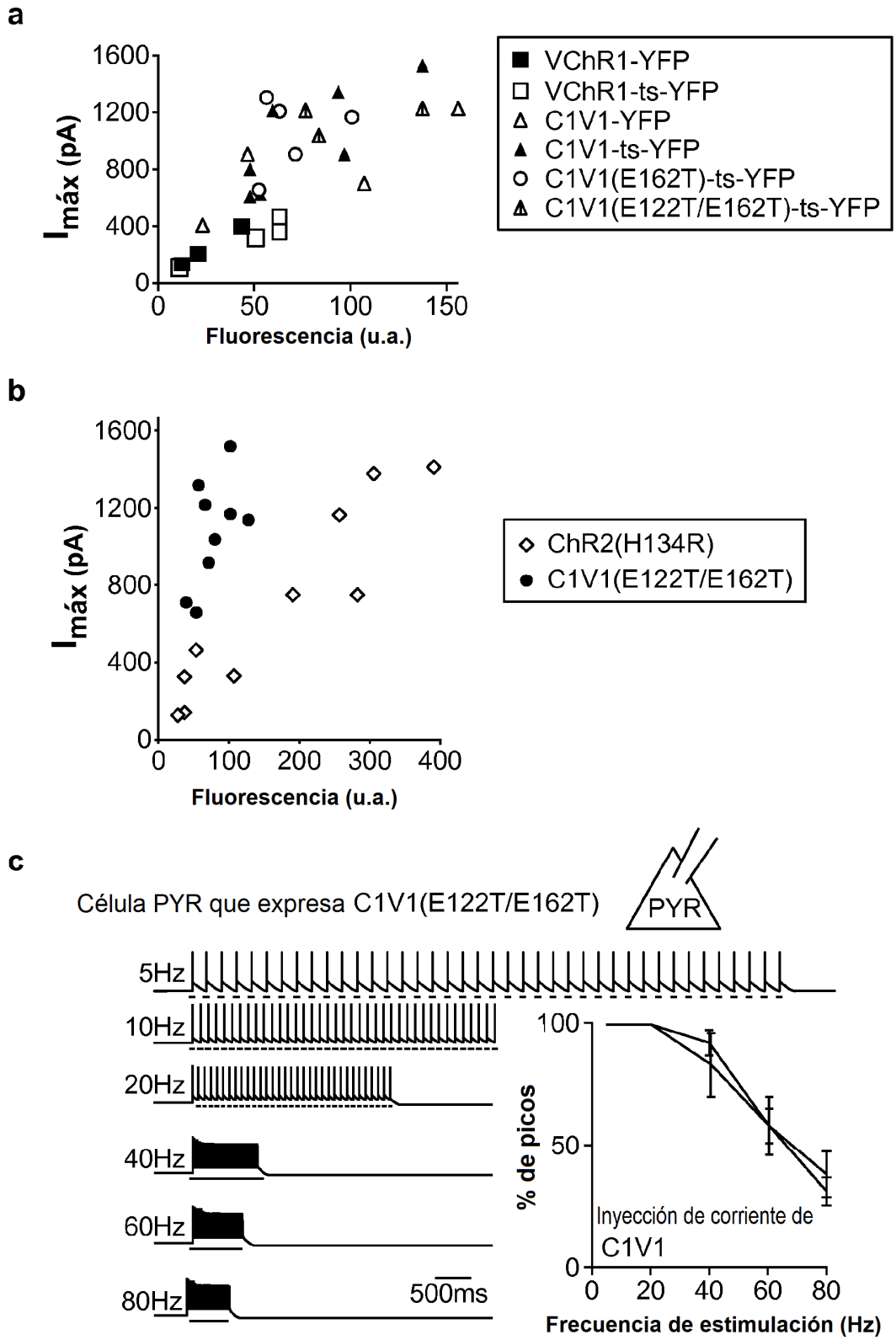


FIG. 3

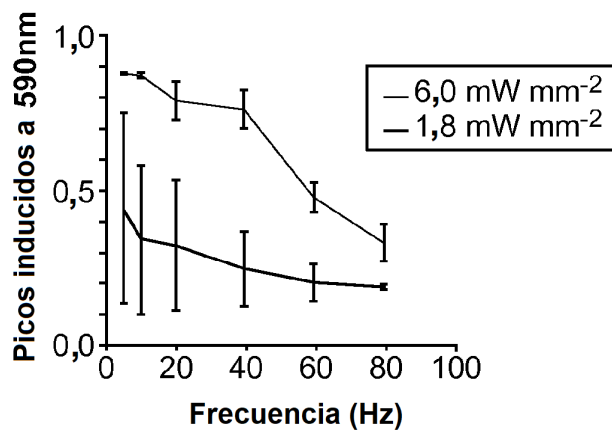
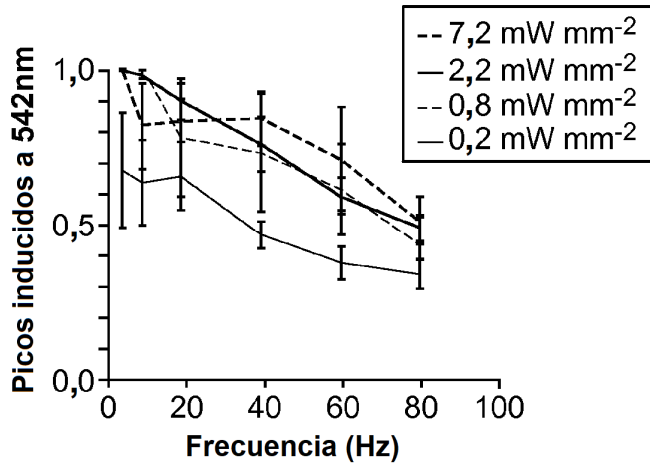
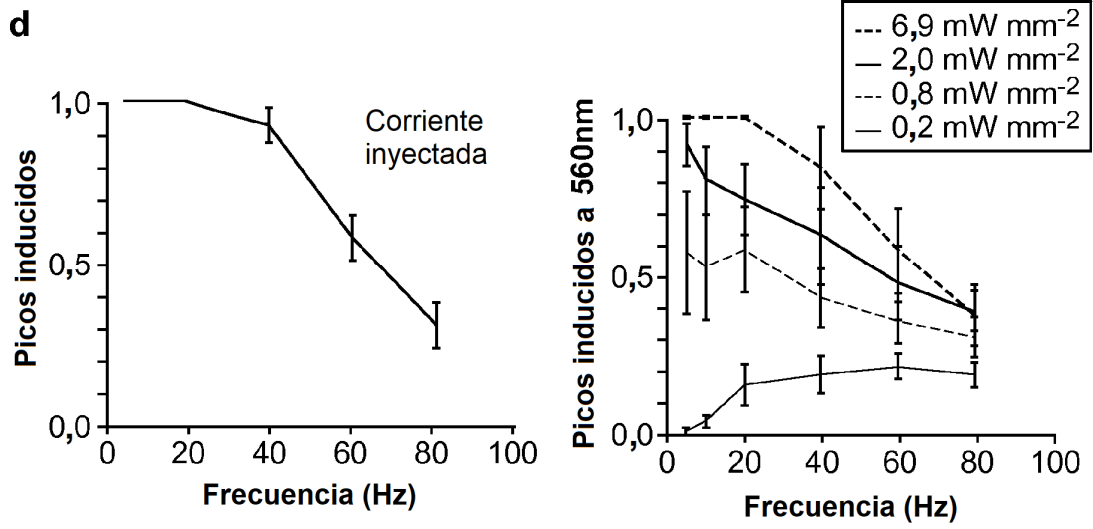


FIG. 3 (Cont. 1)

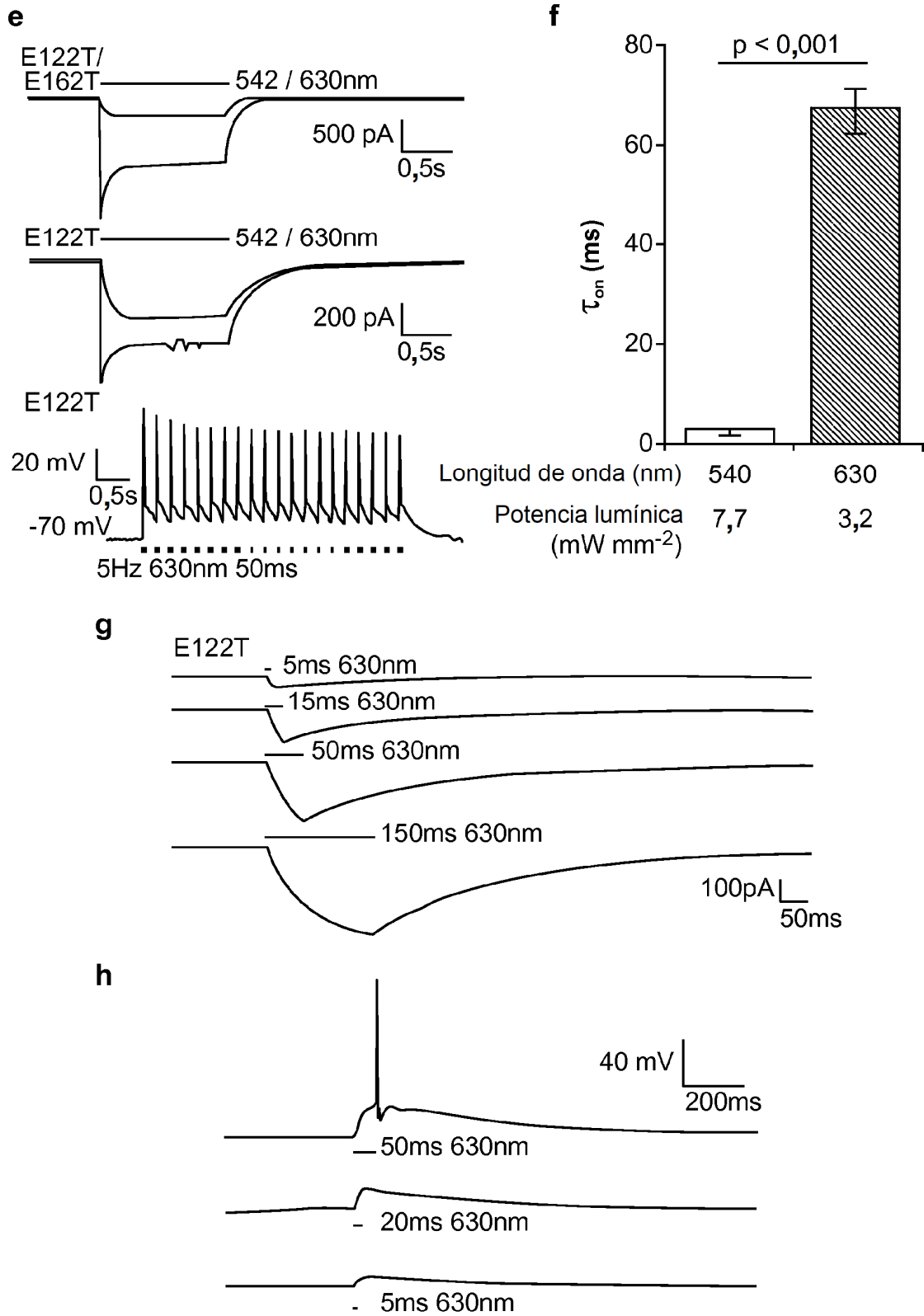


FIG. 3 (Cont. 2)

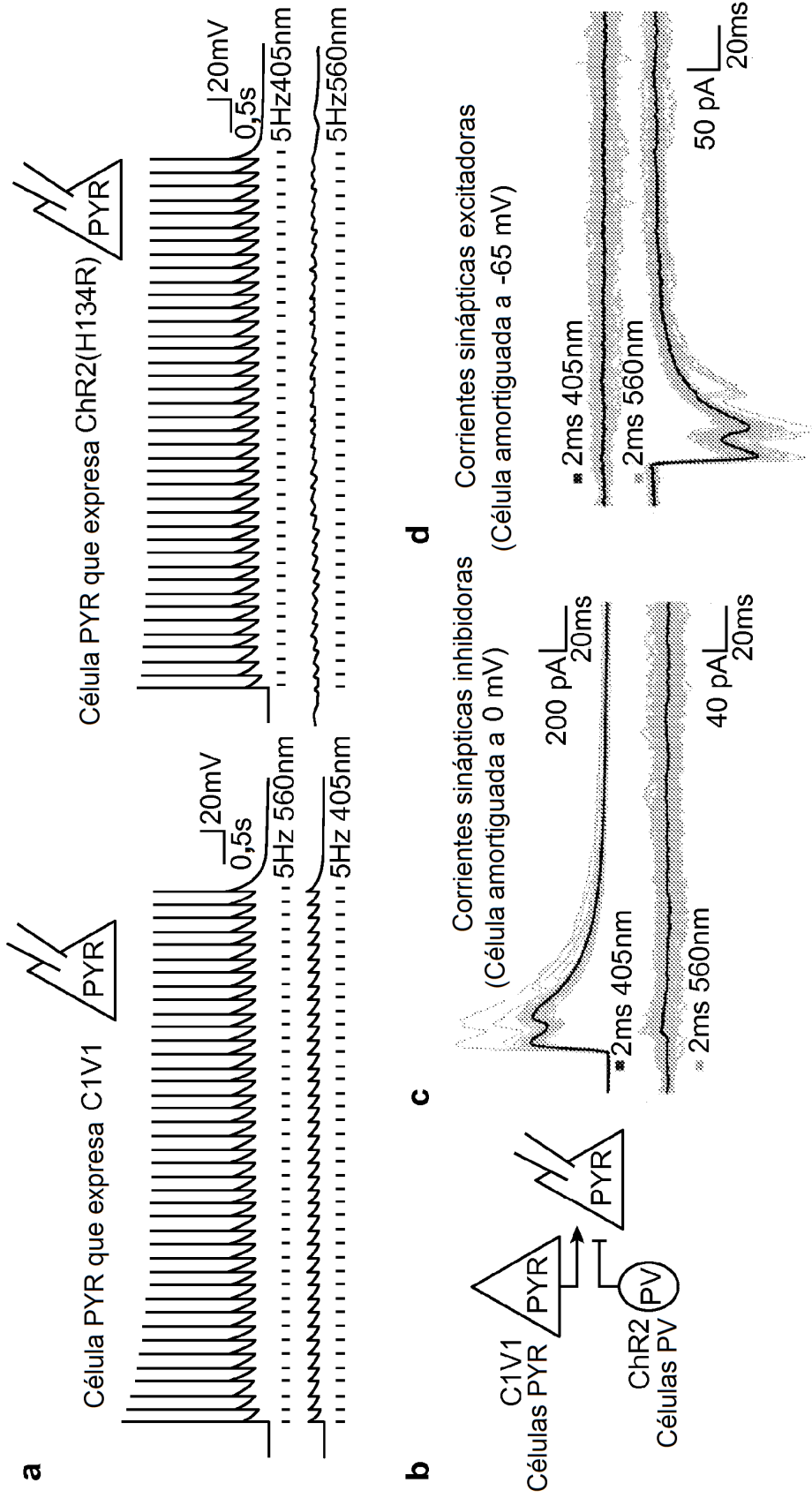


FIG. 4

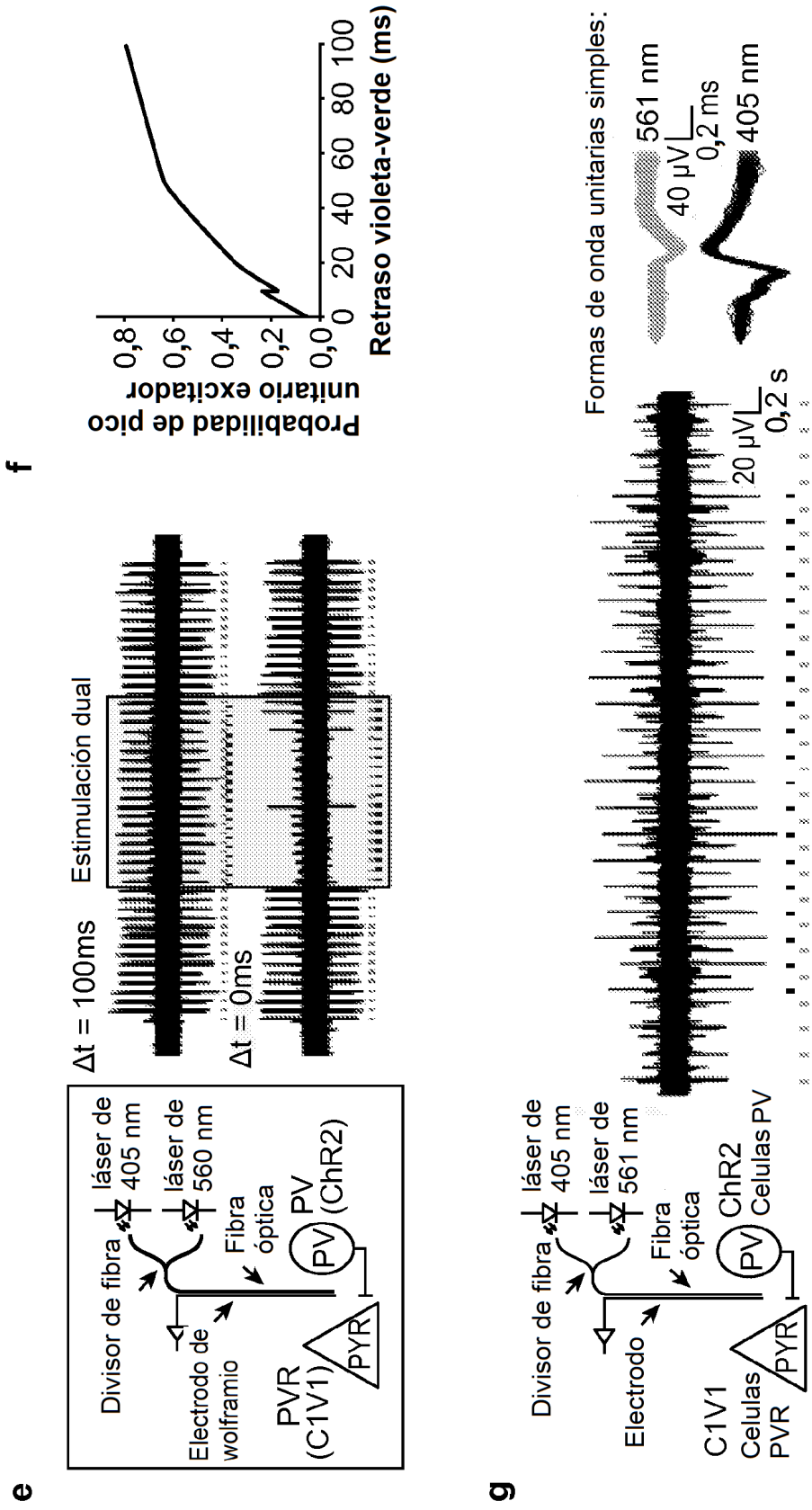


FIG. 4 (Cont.)

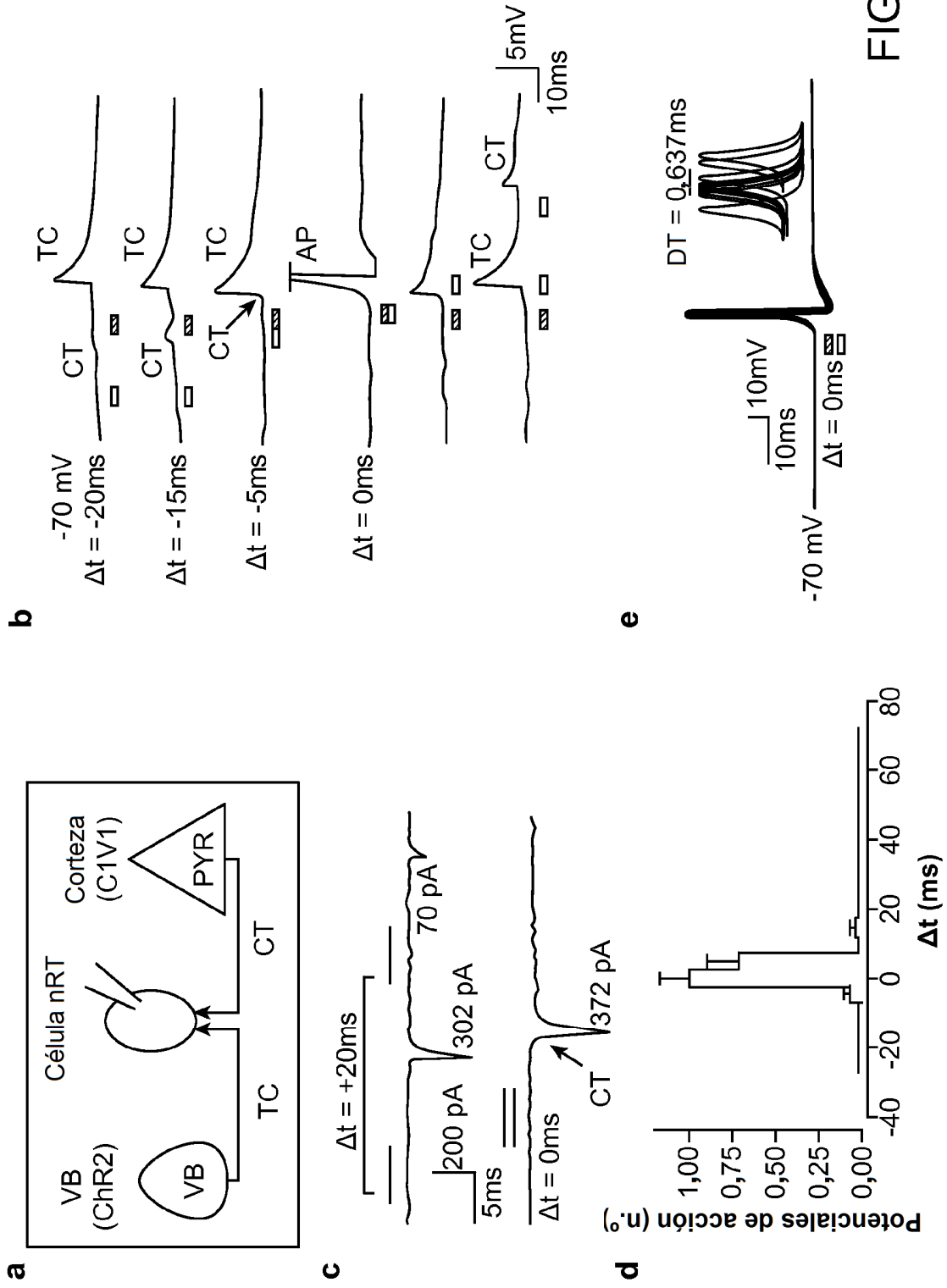


FIG. 5

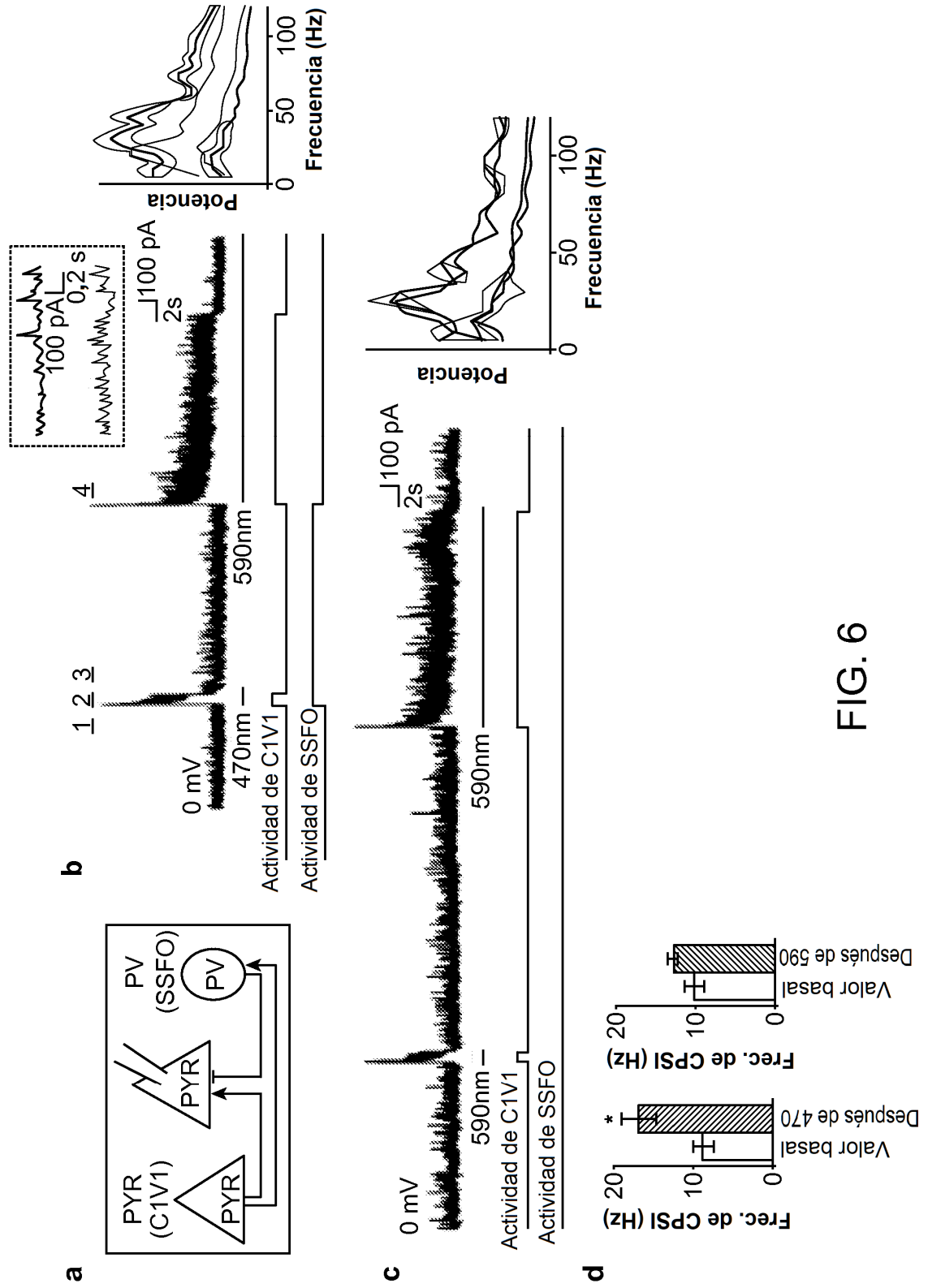


FIG. 6