

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 492**

51 Int. Cl.:

A61P 25/22 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61N 1/36 (2006.01)
A61N 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/US2014/028807**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14144409**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14762745 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019** **EP 2968997**

54 Título: **Control optogenético del estado conductual**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361789961 P
05.04.2013 US 201361808965 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
14.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIM, SUNG-YON;
DEISSEROTH, KARL A. y
ADHIKARI, AVISHEK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 742 492 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

Control optogenético del estado conductual

5 Introducción

Los animales encuentran condiciones ambientales que requieren un cambio rápido entre los diferentes estados conductuales para aumentar la probabilidad de supervivencia y reproducción. Dichos estados consisten en una constelación de cambios coordinados por distintas modalidades de salida del sistema nervioso y la comprensión de este conjunto de estado conductual desde diversas características es de fundamental interés. Un ejemplo bien estudiado es el estado de miedo, en el que se cree que la amígdala modula varias situaciones de expresión de miedo a través de objetivos distintos. Sin embargo, aún no ha sido posible probar si las proyecciones divergentes específicas causan características distintivas para ensamblar un estado conductual. "Optogenética" se refiere a la combinación de métodos genéticos y ópticos utilizados para controlar acontecimientos específicos en células específicas de tejido vivo, incluso en mamíferos y otros animales que se mueven libremente, con la precisión temporal (escala de tiempo de milisegundos) necesaria para mantener el ritmo del funcionamiento de los sistemas biológicos intactos. El documento WO2012/061690 describe la expresión de una opsina en las neuronas piramidales glutamatérgicas de la amígdala basolateral para tratar la ansiedad.

20 Sumario

En el presente documento se describen métodos para modular una característica de un estado conductual. Los métodos implican la inhibición o activación de la actividad de un núcleo del lecho de las neuronas de la estría terminal (BNST), un subnúcleo BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona BNST. La invención proporciona un polipéptido sensible a la luz activadora o un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido sensible a la luz, para usar en un método de modulación de una característica de ansiedad en un sujeto, comprendiendo el método:

- a) activar una entrada de neurona piramidal de la amígdala basolateral (BLA) a un núcleo del lecho anterodorsal de las neuronas de la estría terminal (BNST) mediante: i) expresión del polipéptido sensible a la luz activadora en la neurona BNST, en el que el polipéptido sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEQ ID NO: 5-11; y ii) exposición de la neurona BNST anterodorsal a la luz de una longitud de onda activadora, activando de este modo la neurona piramidal BLA, en el que dicha activación reduce la evitación del riesgo y reduce la frecuencia respiratoria; o
- b) en el que dicha modulación comprende activar una proyección de neurona BNST anterodorsal hacia el hipotálamo lateral mediante: i) expresión del polipéptido sensible a la luz activadora en la proyección de la neurona BNST anterodorsal, en el que el polipéptido sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEQ ID NO: 5-11; y ii) exposición de la proyección de la neurona BNST anterodorsal a la luz de una longitud de onda activadora, en el que dicha activación reduce la evitación del riesgo y no tiene un efecto sustancial sobre la frecuencia respiratoria; o
- c) en el que dicha modulación comprende activar una proyección de neurona BNST anterodorsal hacia el núcleo parabraquial mediante: i) expresión del polipéptido sensible a la luz activadora en la proyección de la neurona BNST anterodorsal, en el que el polipéptido sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEQ ID NO: 5-11; y ii) exposición de la proyección de la neurona BNST anterodorsal a la luz de una longitud de onda activadora, de modo que se activa la proyección de la neurona BNST anterodorsal, en el que dicha activación reduce la frecuencia respiratoria y no tiene un efecto sustancial sobre la conducta de evitación del riesgo.

Adicionalmente se describe un método para modular una característica de un estado conductual, comprendiendo el método inhibir o activar la actividad de un núcleo del lecho de las neuronas de la estría terminal (BNST), un subnúcleo de BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona BNST, en donde la característica es una característica de comportamiento o una característica fisiológica. En algunos casos, el estado conductual es ansiedad.

En algunos casos, la característica es la frecuencia respiratoria, evitación de riesgos o aversión. En algunos casos, la modulación comprende inhibir una neurona BNST, en el que dicha inhibición es ansiolítica. En algunos casos, la modulación comprende inhibir el núcleo oval de un BNST, en el que dicha inhibición es ansiolítica y reduce la frecuencia respiratoria. En algunos casos, la modulación comprende activar una entrada de la amígdala basolateral (BLA) a una neurona BNST activando una neurona piramidal BLA, en el que dicha activación reduce la evitación del riesgo y reduce la frecuencia respiratoria. En algunos casos, la modulación comprende estimular una proyección de neurona BNST anterodorsal hacia el hipotálamo lateral, en el que dicha estimulación reduce la evitación del riesgo y no tiene un efecto sustancial sobre la frecuencia respiratoria. En algunos casos, la modulación comprende activar una proyección de neurona BNST anterodorsal al núcleo parabraquial, en el que dicha activación reduce la frecuencia respiratoria y no tiene un efecto sustancial sobre la conducta de evitación del riesgo. En algunos casos, la modulación comprende activar una proyección de neurona BNST anterodorsal en el área tegmentaria ventral, en el que dicha activación da como resultado un comportamiento normalizado. En algunos casos, la modulación comprende expresar una proteína excitadora sensible a la luz o una proteína inhibidora sensible a la luz en la neurona BNST, un subnúcleo

de BNST o la salida neuronal hacia o desde una neurona BNST; y exponer la neurona BNST, un subnúcleo de BNST o la salida neuronal hacia o desde una neurona BNST a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz. En algunos casos, la proteína sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos representada en las Figuras 28A-D.

En el presente documento se describe adicionalmente un modelo animal no humano de un trastorno del comportamiento, en el que una proteína sensible a la luz se expresa en un núcleo del lecho de las neuronas de la estría terminal (BNST), un subnúcleo BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona BNST y en el que la exposición de la neurona BNST, el subnúcleo BNST o la salida neuronal hacia o desde una neurona BNST a la luz induce características conductuales y/o fisiológicas de un trastorno del comportamiento. En algunos casos, la proteína sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos representada en las Figuras 28A-D. En algunos casos, una proteína excitadora sensible a la luz se expresa en un soma de BNST y la exposición de la neurona BNST a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz produce un aumento de la ansiedad. En algunos casos, la proteína excitadora sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido ChR2. En algunos casos, una proteína excitadora sensible a la luz se expresa en un núcleo oval de un BNST y la exposición de la neurona del BNST a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz produce un aumento de la ansiedad y un aumento de la frecuencia respiratoria. En algunos casos, la proteína excitadora sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido ChR2. En algunos casos, una proteína inhibidora sensible a la luz se expresa en una entrada de neurona piramidal de la amígdala basolateral (BLA) a una neurona anterodorsal BNST (adBNST); y la exposición de la entrada de la neurona piramidal BLA a una adBNST a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz da como resultado un aumento de la ansiedad y un aumento de la frecuencia respiratoria. En algunos casos, la proteína inhibidora sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido NpHR.

La presente divulgación proporciona un método para identificar un agente candidato para mejorar una característica conductual o fisiológica de un trastorno del comportamiento, comprendiendo el método: a) administrar un agente de prueba a un modelo de comportamiento de roedor; y b) determinar el efecto del agente de prueba sobre una característica conductual o fisiológica de dicho trastorno del comportamiento exhibido por dicho roedor cuando la luz activa el polipéptido de opsina sensible a la luz. En algunos casos, el modelo animal no humano expresa un polipéptido excitador sensible a la luz en un soma de BNST y la exposición de la neurona BNST a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz produce un aumento de la ansiedad y en el que se evalúa el efecto sobre la ansiedad de un agente de prueba. En algunos casos, el modelo animal no humano expresa una proteína excitadora sensible a la luz que se expresa en un núcleo oval de un BNST, y la exposición de la neurona BNST a la luz de una longitud de onda a la que la proteína sensible a la luz responde aumenta la ansiedad y aumenta la frecuencia respiratoria, y en el que se evalúa el efecto sobre la ansiedad y/o la frecuencia respiratoria de un agente de prueba. En algunos casos, el modelo animal no humano expresa en el que una proteína inhibidora sensible a la luz se expresa en una entrada de neurona piramidal de la amígdala basolateral (BLA) a una neurona anterodorsal BNST (adBNST); y la exposición de la entrada de la neurona piramidal BLA a una adBNST a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz da como resultado un aumento de la ansiedad y un aumento de la frecuencia respiratoria, y en el que se evalúa el efecto sobre la ansiedad y/o la frecuencia respiratoria de un agente de prueba.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la colocación de guías de fibra óptica y cánulas dirigidas a la BNST.

La figura 2 representa la colocación de matrices de fibra óptica y estereotrodos dirigidas a la adBNST.

La figura 3 representa la colocación de fibra óptica dirigida a la ovBNST y la LH.

Las figuras 4A-H representan la heterogeneidad funcional dentro del BNST dorsal.

Las figuras 5A-J representan el efecto de las diversas manipulaciones sobre la actividad locomotora.

Las figuras 6A-F representan la heterogeneidad funcional en la BNST en paradigmas de ansiedad.

Las figuras 7A-F representan el efecto de la estimulación optogenética de los somas de las BNST sobre el comportamiento relacionado con la ansiedad.

La figura 8 representa los aumentos de la frecuencia respiratoria en un ambiente ansiogénico.

Las figuras 9A-D representan el efecto de la estimulación optogenética de la ovBNST sobre el comportamiento relacionado con la ansiedad.

Las figuras 10A-P representan distintas salidas de adBNST modulan diferentes características relacionadas con la ansiolisis.

Las figuras 11A-H representan datos que muestran que la estimulación de la proyección del adBNST al LH, pero no al PB o al VTA, es ansiolítica.

La Figura 12 representa el efecto de la estimulación optogenética de la proyección de BLA-adBNST sobre el comportamiento relacionado con la ansiedad en el EPM en los primeros 5 minutos de exposición al EPM.

Las Figuras 13A-D representan datos que muestran que la estimulación de las fibras de la BLA en la comisura anterior (aca) no afecta el comportamiento relacionado con la ansiedad.

Las figuras 14A-D muestran que las neuronas del adBNST que se proyectan al LH están inervadas por terminales de axones de la BLA.

La figura 15 representa datos que muestran que el aumento de la frecuencia respiratoria en un ambiente ansiogénico se atenúa estimulando la proyección del BNST-PB.

Las figuras 16A y 16B representan datos que muestran que las subpoblaciones de neuronas del adBNST se proyectan al LH, el PB y el VTA.

Las figuras 17A-I representan la evaluación electrofisiológica *in vivo* e *in vitro* de aferentes del adBNST.

Las figuras 18A y 18B representan el aislamiento de unidades individuales a través de estereotrodos.

Las figuras 19A-L representan evidencia de circuitos inhibitorios y excitadores de alimentación en el adBNST.

Las figuras 20A-I representan datos que muestran que la excitación recurrente puede permitir el reclutamiento coordinado de proyecciones posteriores del BNST.

Las figuras 21A-C representan adBNST que se proyectan débilmente al ovBNST.

Las figuras 22A-G representan datos que muestran que las neuronas del BNST dependen en parte de las entradas de la BLA para distinguir ubicaciones seguras y ansiogénicas.

Las figuras 23A-D representan datos que muestran que la actividad de múltiples unidades del adBNST es mayor en los compartimentos seguros de los paradigmas de ansiedad.

Las figuras 24A y 24B representan el cálculo de las puntuaciones del EPM para medir la diferenciación entre los brazos cerrados y abiertos por unidades individuales del adBNST.

Las figuras 25A-D representan datos que muestran que la actividad de múltiples unidades del adBNST depende de las entradas de la BLA para diferenciar ubicaciones seguras y aversivas en el EPM.

Las figuras 26A-C representan el efecto de inhibir la proyección del BLA-adBNST sobre las velocidades de disparo en los brazos cerrados y las puntuaciones del EPM.

La figura 27 representa esquemáticamente una posible organización funcional de los circuitos del BNST. Las figuras 28A-D proporcionan secuencias de aminoácidos de diversas proteínas sensibles a la luz.

Las figuras 29A-B proporcionan los esquemas de registro para los datos presentados en la figura 8 y la figura 15.

Definiciones

Un "individuo" puede ser un mamífero, incluyendo un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, ungulados, caninos, felinos, bovinos, ovinos, primates no humanos, lagomorfos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En un aspecto, un individuo es un ser humano. En otro aspecto, un individuo es un mamífero no humano.

Las sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína nativa pueden ser "conservadoras" o "no conservadoras" y tales restos de aminoácidos sustituidos pueden o no estar codificados por el código genético. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral químicamente similar (es decir, reemplazando un aminoácido que posee una cadena lateral básica con otro aminoácido con una cadena lateral básica). Una "sustitución de aminoácido no conservadora" es una en la que el resto de aminoácido está reemplazado con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral químicamente diferente (es decir, reemplazar un aminoácido que tiene una cadena lateral básica con un aminoácido que tiene una cadena lateral aromática). El alfabeto de veinte aminoácidos esenciales 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 no cargadas (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).

Como se usa en el presente documento, una "dosificación eficaz" o "cantidad eficaz" de fármaco, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como la eliminación o la reducción del riesgo, la disminución de la gravedad, o el retraso del inicio de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como la disminución de uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, aumentar la calidad de vida de aquellos que padecen la enfermedad, reducir la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, potenciar el efecto de otra medicación tal como dirigir, o retrasar la progresión de la enfermedad, y/o prolongar la supervivencia. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los fines de la presente invención, una dosificación eficaz de fármaco, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para llevar a cabo el tratamiento profiláctico o terapéutico tanto directa como indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto, o composición farmacéutica puede conseguirse o no junto con otro fármaco, compuesto, o composición farmacéutica. Por tanto, se puede considerar una "dosificación eficaz" en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar que un único agente se administra en una cantidad eficaz si, junto con uno o más de otros agentes, puede darse o se consigue un resultado deseable.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" es una solución para obtener resultados beneficiosos

o deseados incluyendo resultados clínicos. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: disminuir los síntomas resultantes de la enfermedad, aumentar la calidad de vida de aquellos que padecen la enfermedad, reducir la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad, y/o prolongar la supervivencia de los individuos.

Antes de describir adicionalmente la presente invención, se debe entender que la presente invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que pueden, por supuesto, variar. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento solo tiene el fin de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante, puesto que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado, está abarcado dentro de la invención. Pueden incluirse independientemente los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños y también se encuentran incluidos en la presente invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyen uno cualquiera o ambos de aquellos límites incluidos.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la materia a la cual pertenece la presente invención. Aunque también se puede usar en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento, ahora se describen los métodos y materiales preferidos. Cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "el" o "la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido activado por luz" incluye una pluralidad de dichos polipéptidos activados por luz y la referencia al "trastorno de ansiedad" incluye referencia a uno o más trastornos de ansiedad y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. Además, se observa que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta afirmación pretende servir como fundamento para el uso de dicha terminología excluyente tal como "solamente", "solo" y similares, en relación con la referencia de los elementos de las reivindicaciones o para el uso de una limitación "negativa". Se aprecia que ciertas características de la invención, que, en aras de la claridad, se han descrito en el contexto de casos separados, también se pueden proporcionar en combinación en una única realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que, por brevedad, se han descrito en el contexto de una única realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de los casos que pertenecen a la invención están abarcadas específicamente por la presente invención y se divulgan en el presente documento como si se hubiesen divulgado de manera individual y explícita todas y cada una de las combinaciones. Además, también se encuentran abarcadas por la presente invención todas las subcombinaciones de los diversos casos y elementos de las mismas y se divulgan en el presente documento como si se hubiesen divulgado de manera individual y explícita todas y cada una de dichas subcombinaciones.

Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No debe interpretarse que nada en el presente documento constituya una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteponer dicha publicación por virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes a las fechas de publicación reales, lo que puede necesitar que se confirme de manera independiente.

Descripción detallada

En el presente documento se describe un método para modular una característica de un estado conductual, implicando el método generalmente inhibir o activar la actividad de un núcleo del lecho de las neuronas de la estría terminal (BNST), un subnúcleo BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona BNST.

En algunos casos, inhibir o activar una neurona del BNST, un subnúcleo del BNST, o una salida neuronal hacia o desde una neurona del BNST implica la expresión de un polipéptido sensible a la luz en la neurona del BNST, el subnúcleo del BNST o la salida neuronal hacia o desde la neurona del BNST; y exposición de la neurona, el subnúcleo o la salida neuronal a la luz.

Las características de un estado conductual o un trastorno del comportamiento incluyen características fisiológicas y características conductuales. Las características fisiológicas pueden incluir miedo, ansiedad y similares. Las características fisiológicas pueden incluir frecuencia respiratoria (por ejemplo, frecuencia respiratoria aumentada); frecuencia cardíaca (por ejemplo, frecuencia cardíaca aumentada); apetito (por ejemplo, pérdida de apetito); y similares. Los estados y trastornos del comportamiento son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, depresión, trastornos de ansiedad y otros trastornos y estados conductuales.

En algunos casos, un polipéptido sensible a la luz se expresa en un soma del BNST. En otros casos, un polipéptido sensible a la luz se expresa en una proyección del BNST.

En algunos casos, un polipéptido inhibidor sensible a la luz se expresa en una neurona del BNST; y la exposición de

la neurona a la luz en un intervalo de longitud de onda al que responde el polipéptido sensible a la luz da como resultado la reducción de una o más características del estado conductual patológico. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido inhibidor sensible a la luz se expresa en una neurona del BNST; y la exposición de la neurona a la luz en un intervalo de longitud de onda al que responde el polipéptido inhibidor sensible a la luz da como resultado una o más de una reducción de la ansiedad, una reducción en la aversión al riesgo, etc.

En algunos casos, un polipéptido inhibidor sensible a la luz se expresa en un núcleo oval del BNST (ovBNST); y la exposición de la neurona a la luz en un intervalo de longitud de onda al que responde el polipéptido sensible a la luz da como resultado la reducción de una o más características del estado conductual patológico. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido inhibidor sensible a la luz se expresa en un ovBNST; y la exposición de la neurona a la luz en un intervalo de longitud de onda al que responde el polipéptido inhibidor sensible a la luz da como resultado una o más de una reducción de la ansiedad, una reducción en la aversión al riesgo y una reducción en la frecuencia respiratoria.

En algunos casos, un polipéptido excitador sensible a la luz se expresa en una entrada de neurona piramidal de la amígdala basolateral (BLA) a un BNST anterodorsal (adBNST); y la exposición de la entrada de la neurona piramidal de la BLA al adBNST a la luz en un intervalo de longitud de onda a la que responde el polipéptido excitador sensible a la luz da como resultado una reducción en una o más características de un estado conductual patológico. Por ejemplo, en algunos casos, un polipéptido excitador sensible a la luz se expresa en una entrada de neurona piramidal BLA a un adBNST; y la exposición de la entrada de la neurona piramidal de la BLA al adBNST a la luz en un intervalo de longitud de onda a la que responde el polipéptido excitador sensible a la luz da como resultado una o más de una reducción de la ansiedad, una reducción en la aversión al riesgo y una reducción en la frecuencia respiratoria.

En algunos casos, un polipéptido excitador sensible a la luz se expresa en una proyección neuronal del adBNST al hipotálamo lateral (LH); y la exposición de la proyección de la neurona del adBNST al LH a la luz en un intervalo de longitud de onda a la que responde el polipéptido excitador sensible a la luz da como resultado una reducción en una o más características conductuales adversas de un estado conductual patológico, por ejemplo, una reducción en la evitación del riesgo.

En algunos casos, un polipéptido excitador sensible a la luz se expresa en una salida de la neurona del adBNST al núcleo parabraquial (PB); y la exposición de la SALIDA de la neurona del adBNST al pb a la luz en un intervalo de longitud de onda a la que responde el polipéptido excitador sensible a la luz da como resultado una reducción en una o más características fisiológicas de un estado conductual patológico, por ejemplo, reducción en la frecuencia respiratoria.

En algunos casos, un polipéptido excitador sensible a la luz se expresa en una salida de la neurona del adBNST al área tegmentaria ventral (VTA); y la exposición de la proyección de la neurona del adBNST al VTA a la luz en un intervalo de longitud de onda a la que responde el polipéptido excitador sensible a la luz da como resultado una mejora en una o más características conductuales de un estado conductual patológico.

Proteínas de tipo opsina sensibles a la luz

En el presente documento se describen métodos basados en optogenética para hiperpolarizar o despolarizar selectivamente las neuronas involucradas en las características de la ansiedad, utilizando proteínas de tipo opsina sensibles a la luz para modular eficazmente las características de ansiedad en individuos afectados por un trastorno de ansiedad. La optogenética se refiere a la combinación de métodos genéticos y ópticos utilizados para controlar acontecimientos específicos en células específicas de tejido vivo, incluso en mamíferos y otros animales que se mueven libremente, con la precisión temporal (escala de tiempo de milisegundos) necesaria para mantener el ritmo del funcionamiento de los sistemas biológicos intactos. La optogenética requiere la introducción de un canal rápido que responda a la luz o proteínas de bombeo a las membranas plasmáticas de las células neuronales diana que permiten la manipulación temporal precisa del potencial de membrana neuronal mientras se mantiene la resolución de tipo celular mediante el uso de mecanismos específicos de direccionamiento. Se puede usar cualquier opsina microbiana que pueda usarse para promover la hiperpolarización o despolarización de la membrana de las células neurales en respuesta a la luz.

Por ejemplo, la familia de halorhodopsina de bombas de cloruro sensibles a la luz (por ejemplo, NpHR, NpHR2.0, NpHR3.0, NpHR3.1) y la bomba de protones GtR3 pueden usarse para promover la hiperpolarización de la membrana de las células neurales en respuesta a la luz. Como otro ejemplo, eArch (una bomba de protones) puede usarse para promover la hiperpolarización de la membrana de las células neurales en respuesta a la luz. Como otro ejemplo, se puede usar una proteína de tipo opsina ArchT o una proteína de tipo opsina Mac para promover la hiperpolarización de la membrana de las células neurales en respuesta a la luz.

Además, los miembros de la familia Channelrhodopsina de proteínas de canales de cationes sensibles a la luz (por ejemplo, ChR2, SFO, SSFO, C1V1) pueden usarse para promover la despolarización de la membrana de las células neurales o el agotamiento sináptico inducido por la despolarización en respuesta a un estímulo de luz.

Motivos de aminoácidos de transporte intracelular mejorados

En el presente documento se describe la modificación de las proteínas de tipo opsina sensibles a la luz expresadas

en una célula mediante la adición de uno o más motivos de secuencia de aminoácidos que mejoran el transporte a las membranas plasmáticas de las células de mamíferos. Las proteínas de tipo opsina sensibles a la luz que tienen componentes derivados de organismos evolutivamente más simples pueden no ser expresadas o toleradas por las células de mamíferos o pueden exhibir una localización subcelular deteriorada cuando se expresan a altos niveles en células de mamíferos.

En consecuencia, en algunos casos, las proteínas de tipo opsina sensibles a la luz expresadas en una célula pueden fusionarse con uno o más motivos de secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en un péptido señal, una señal de exportación del retículo endoplásmico (ER), una señal de tráfico de membrana y/o una señal de exportación de Golgi N-terminal. Los uno o más motivos de secuencia de aminoácidos que mejoran el transporte de proteínas sensibles a la 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-terminal de la proteína sensible a la luz. Opcionalmente, la proteína sensible a la luz y uno o más motivos de secuencia de aminoácidos pueden estar separados por un enlazador. En algunos casos, la proteína sensible a la luz se puede modificar mediante la adición de una señal de tráfico (ts) que mejora el transporte de la proteína a la membrana plasmática celular. En algunos casos, la señal de tráfico puede derivarse de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En otros casos, la señal de tráfico puede comprender la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO:16).

Las secuencias de tráfico que son adecuadas para su uso pueden comprender una secuencia de aminoácidos que tiene 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos tal como una secuencia de tráfico del canal de potasio rectificador humano interno Kir2.1 (por ejemplo, KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEC ID NO: 16)).

Una secuencia de tráfico puede tener una longitud de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 20 aminoácidos, de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 30 aminoácidos, de aproximadamente 30 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos, o de aproximadamente 40 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos.

Las secuencias señal que son adecuadas para su uso pueden comprender una secuencia de aminoácidos que tiene 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos como una de las siguientes:

- 1) el péptido señal de hChR2 (por ejemplo, MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGS (SEQ ID NO:17))
- 2) el péptido señal de la subunidad $\beta 2$ del receptor de acetilcolina nicotínico neuronal (por ejemplo, MAGHSNSMALFSFSLWLCSGVLGTEF (SEQ ID NO: 18));
- 3) una secuencia señal del receptor nicotínico de acetilcolina (por ejemplo, MGLRALMLWLLAAAGLVRESLQG (SEQ ID NO:19)); y
- 4) una secuencia señal del receptor nicotínico de acetilcolina (por ejemplo, MRGTPLLLVVSFLSLLQD (SEQ ID NO:20)).

Una secuencia señal puede tener una longitud de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 20 aminoácidos, de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 30 aminoácidos, de aproximadamente 30 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos, o de aproximadamente 40 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos.

Las secuencias de exportación del retículo endoplásmico (ER) que son adecuadas para usar en una opsina modificada de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, VXXSL (SEQ ID NO:21) (donde X es cualquier aminoácido) (por ejemplo, VKESL (SEQ ID NO:22); VLGSL (SEQ ID NO: 23); etc.); NANSFCYENEVALTSK (SEQ ID NO:24); FXYENE (SEQ ID NO: 25) (donde X es cualquier aminoácido), por ejemplo, FCYENEV (SEQ ID NO:26); y similares. Una secuencia de exportación ER puede tener una longitud de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 10 aminoácidos, de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 15 aminoácidos, de aproximadamente 15 aminoácidos a aproximadamente 20 aminoácidos, o de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos.

En algunos casos, la secuencia del péptido señal en la proteína puede eliminarse o sustituirse con una secuencia del péptido señal de una proteína diferente.

Proteínas de tipo opsina inhibitoras sensibles a la luz

En algunos casos, un método sujeto para modular una característica de comportamiento implica el uso de una proteína de tipo opsina inhibitora sensible a la luz. Las proteínas de tipo opsina inhibitoras sensibles a la luz incluyen polipéptidos que tienen similitud de secuencia (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos) con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 12, 13, 14 y 15 (Figura 28).

Bombas de cloruro sensibles a la luz

En algunas situaciones de los métodos descritos en el presente documento, uno o más miembros de la familia de Halorhodopsina de bombas de cloruro sensibles a la luz se expresan en las membranas plasmáticas de las neuronas en el BNST, por ejemplo, en una subregión del BNST, tal como en el ov-BNST.

En algunas situaciones, dichas una o más proteínas de la bomba de cloruro sensibles a la luz expresadas en las membranas plasmáticas de las neuronas descritas anteriormente pueden derivarse de *Natronomonas pharaonis*. En algunos casos, las proteínas de la bomba de cloruro sensibles a la luz pueden responder a la luz ámbar así como a la luz roja y pueden mediar en una corriente hiperpolarizante en la neurona cuando las proteínas de la bomba de cloruro sensibles a la luz se iluminan con luz ámbar o roja. La longitud de onda de la luz que puede activar las bombas de cloruro sensibles a la luz puede estar entre aproximadamente 580 y 630 nm. En algunos casos, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 589 nm o la luz puede tener una longitud de onda mayor de aproximadamente 630 nm (por ejemplo, menos de aproximadamente 740 nm). En otra realización, la luz tiene una longitud de onda de aproximadamente 630 nm. En algunos casos, la proteína de la bomba de cloruro sensible a la luz puede hiperpolarizar una membrana neural durante al menos aproximadamente 90 minutos cuando se expone a un pulso continuo de luz. En algunos casos, la proteína de la bomba de cloruro sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. Además, la proteína de la bomba de cloruro sensible a la luz puede comprender sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos nativa para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a longitudes de onda particulares de luz y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína sensible a la luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. En algunos casos, la proteína de la bomba de cloruro sensible a la luz contiene una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. En algunos casos, la proteína sensible a la luz contiene una o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras. La proteína sensible a la luz que comprende sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos nativa retiene adecuadamente la capacidad de hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal en respuesta a la luz.

Además, en otras situaciones, las proteínas de la bomba de cloruro sensibles a la luz pueden comprender una secuencia de aminoácidos del núcleo al menos aproximadamente 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y una señal de exportación al retículo endoplasmático (ER). La señal de exportación al ER se puede fusionar con el extremo C de la secuencia de aminoácidos del núcleo o se pueden fusionar con el extremo N de la secuencia de aminoácidos del núcleo. En algunos casos, la señal de exportación al ER está unida a la secuencia de aminoácidos del núcleo mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de aproximadamente 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 además una proteína fluorescente, por ejemplo, pero sin limitación, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunos casos, la señal de exportación al ER puede comprender la secuencia de aminoácidos FXYENE (SEQ ID NO:25), donde X puede ser cualquier aminoácido.

En otros casos, la señal de exportación al ER comprende la secuencia de aminoácidos FXYENE (SEQ ID NO:21), donde X puede ser cualquier aminoácido. En algunos casos, la señal de exportación al ER puede comprender la secuencia de aminoácidos FCYENEV (SEQ ID NO: 26).

Las secuencias de exportación del retículo endoplasmático (ER) que son adecuadas para usar en una opsina modificada de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, VXXSL (SEQ ID NO:21) (donde X es cualquier aminoácido) (por ejemplo, VKESL (SEQ ID NO:22); VLGSL (SEQ ID NO: 23); etc.); NANSFCYENEVALTSK (SEQ ID NO:24); FXYENE (donde X es cualquier aminoácido) (SEQ ID NO:25); FCYENEV (SEQ ID NO:26); y similares. Una secuencia de exportación ER puede tener una longitud de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 10 aminoácidos, de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 15 aminoácidos, de aproximadamente 15 aminoácidos a aproximadamente 20 aminoácidos, o de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos.

En otras situaciones, las proteínas de la bomba de cloruro sensibles a la luz descritas en el presente documento pueden comprender una proteína sensible a la luz expresada en la membrana celular, en el que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos del núcleo al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y una señal de tráfico (por ejemplo, que puede aumentar el transporte de la proteína de la bomba de cloruro sensible a la luz a la membrana plasmática). La señal de tráfico puede fusionarse con el extremo C de la secuencia de aminoácidos del núcleo o puede fusionarse con el extremo N de la secuencia de aminoácidos del núcleo. En algunos casos, la señal de tráfico se puede unir a la secuencia de aminoácidos del núcleo mediante un enlazador que puede comprender cualquiera de aproximadamente 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 además una proteína fluorescente, por ejemplo, pero sin limitación, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunos casos, la señal de tráfico puede derivarse de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En otros casos, la señal de tráfico puede comprender la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO:16).

En algunos aspectos, la proteína de la bomba de cloruro sensible a la luz pueden comprender una secuencia de aminoácidos del núcleo al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 y al menos uno (tal como uno, dos, tres, o más) motivos de secuencia de aminoácidos que mejoran el transporte a las membranas plasmáticas de las células de mamíferos seleccionadas del grupo que consiste en una señal de exportación al ER, un péptido señal y una señal de tráfico de membrana. En algunos casos, la proteína de la bomba de cloruro sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal, una señal de exportación al ER en C-terminal y la señal de tráfico en C-terminal. En algunos casos, la señal de exportación al ER de C-terminal y la señal de tráfico de C-terminal se pueden unir mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400 o 500 aminoácidos de longitud. El enlazador también puede comprender además una proteína fluorescente, por ejemplo, pero sin limitación, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunos casos, la señal de exportación al ER puede ubicarse más C-terminalmente que la señal de tráfico. En otros casos, la señal de tráfico se encuentra más C-terminalmente que la señal de exportación al ER. En algunos casos, el péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos MTETLPPVTESAVALQAE (SEQ ID NO:27). En otros casos, la proteína de la bomba de cloruro sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

Además, en otras situaciones, las proteínas de la bomba de cloruro sensibles a la luz pueden comprender una secuencia de aminoácidos del núcleo al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en la que el péptido señal N-terminal de SEQ ID NO: 1 se deletorea o sustituye. En algunos casos, se pueden usar otros péptidos señal (como los péptidos señal de otras opsinas). La proteína sensible a la luz puede comprender además una señal de transporte al ER y/o una señal de tráfico de la membrana descrita en el presente documento. En algunos casos, la proteína de la bomba de cloruro sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 3.

En algunos casos, la proteína de tipo opsina sensible a la luz es una proteína de tipo opsina NpHR que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la proteína de tipo opsina NpHR comprende además una señal de exportación al retículo endoplásmico (ER) y/o una señal de tráfico de membrana. Por ejemplo, la proteína de tipo opsina NpHR comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y una señal de exportación al retículo endoplásmico (ER). En algunos casos, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1 está unida a la señal de exportación al ER a través de un enlazador. En algunos casos, la señal de exportación al ER comprende la secuencia de aminoácidos FXYENE (SEQ ID NO:25), donde X puede ser cualquier aminoácido. En otra realización, la señal de exportación al ER comprende la secuencia de aminoácidos VXXSL, donde X es cualquier aminoácido. En algunos casos, la señal de exportación al ER comprende la secuencia de aminoácidos FCYENEV (SEQ ID NO: 26). En algunos casos, la proteína de tipo opsina NpHR comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, una señal de exportación al ER y una señal de tráfico de membrana. En otros casos, la proteína de tipo opsina NpHR comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1, la señal de exportación al ER y la señal de tráfico de membrana. En otros casos, la proteína de tipo opsina NpHR comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1, la señal de tráfico de membrana y la señal de exportación a la ER. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana deriva de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana comprende la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO: 16). En algunos casos, la señal de tráfico de membrana está unida a la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 por un enlazador. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana está unida a la señal de exportación al ER a través de 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 además una proteína fluorescente, por ejemplo, pero sin limitación, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunos casos, la proteína de tipo opsina sensible a la luz comprende además un péptido señal N-terminal. En algunos casos, la proteína de tipo opsina sensible a la luz comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunos casos, la proteína de tipo opsina sensible a la luz comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

También se describen en el presente documento polinucleótidos que codifican cualquiera de las proteínas de la bomba de iones de cloruro sensibles a la luz descritas en el presente documento, tal como una proteína sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos del núcleo al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, una señal de exportación al ER y una señal de tráfico de membrana. En otro caso, los polinucleótidos comprenden una secuencia que codifica un aminoácido al menos un 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO:3. Los polinucleótidos pueden estar en un vector de expresión (tal como, pero sin limitación, un vector viral descrito en el presente documento). Los polinucleótidos pueden usarse para la expresión de las proteínas de la bomba de iones de cloruro sensibles a la luz.

Se puede encontrar información adicional relacionada con las proteínas de la bomba de cloruro sensibles a la luz en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos: 2009/0093403 y 2010/0145418, así como en la Solicitud de Patente Internacional N.º: PCT/US2011/028893.

5 Bombas de protones sensibles a la luz

En algunas situaciones de los métodos descritos en el presente documento, una o más bombas de protones sensibles a la luz se expresan en las membranas plasmáticas de una neurona del BNST, un subnúcleo BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona BNST. En algunos casos, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz puede responder a la luz azul y puede derivarse de *Guillardia theta*, en la que la proteína de la bomba de protones puede ser capaz de mediar en una corriente hiperpolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz azul. La luz puede tener una longitud de onda entre aproximadamente 450 y aproximadamente 495 nm o puede tener una longitud de onda de aproximadamente 490 nm. En otro caso, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4.

La proteína de la bomba de protones sensible a la luz puede comprender adicionalmente sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos nativa para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a longitudes de onda particulares de luz, y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína de la bomba de protones sensible a la luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. Además, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz puede contener una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o una o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras. La proteína de la bomba de protones sensible a la luz que comprende sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos nativa retiene adecuadamente la capacidad de hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal en respuesta a la luz.

En otras situaciones de los métodos descritos en el presente documento, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos del núcleo al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4 y al menos uno (tal como uno, dos, tres, o más) motivos de secuencia de aminoácidos que mejoran el transporte a las membranas plasmáticas de células de mamífero seleccionadas del grupo que consiste en un péptido señal, una señal de exportación al ER y una señal de tráfico de membrana. En algunos casos, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal y una señal de exportación al ER en C-terminal. En algunos casos, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal y una señal de tráfico en C-terminal. En algunos casos, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal, una señal de exportación al ER en C-terminal y la señal de tráfico en C-terminal. En algunos casos, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal de exportación al ER en C-terminal y señal de tráfico en C-terminal. En algunos casos, la señal de exportación al ER de C-terminal y la señal de tráfico de C-terminal se unen mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de aproximadamente 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 además una proteína fluorescente, por ejemplo, pero sin limitación, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunos casos, la señal de exportación al ER está localizada más en C-terminal que la señal de tráfico. En algunos casos, la señal de tráfico se localiza más en C-terminal que la señal de exportación al ER.

También se describen en el presente documento polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de las proteínas de la bomba de protones sensibles a la luz descritas en el presente documento, tal como una proteína de bomba de protones sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos del núcleo al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4. También se describen en el presente documento vectores de expresión (tal como un vector viral descrito en el presente documento) que comprende un polinucleótido que codifica las proteínas descritas en el presente documento, tal como una proteína de bomba de protones sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos del núcleo al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4. Los polinucleótidos pueden usarse para la expresión de proteínas sensibles a la luz en una neurona del BNST, un subnúcleo BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona BNST.

Se puede encontrar información adicional relacionada con las proteínas de la bomba de protones sensibles a la luz en la solicitud de patente internacional No. PCT/US2011/028893.

En algunos casos, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz puede responder a la luz verde o amarilla y puede derivarse de *Halorubrum sodomense*, en la que la proteína de la bomba de protones puede ser capaz de mediar en una corriente hiperpolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz verde o amarilla. La luz puede tener una longitud de onda entre aproximadamente 560 y aproximadamente 570 nm o puede tener una longitud de onda de aproximadamente 566 nm. En otro caso, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12. La proteína de la bomba de protones sensible a

la luz puede comprender adicionalmente sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos nativa para aumentar o disminuir la sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a longitudes de onda particulares de luz, y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína de la bomba de protones sensible a la luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. Además, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz puede contener una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o una o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras. La proteína de la bomba de protones sensible a la luz que comprende sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos nativa retiene adecuadamente la capacidad de hiperpolarizar la membrana plasmática de una célula neuronal en respuesta a la luz.

En otras situaciones de los métodos descritos en el presente documento, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos del núcleo al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12 y al menos uno (tal como uno, dos, tres, o más) motivos de secuencia de aminoácidos que mejoran el transporte a las membranas plasmáticas de células de mamífero seleccionadas del grupo que consiste en un péptido señal, una señal de exportación al ER y una señal de tráfico de membrana. En algunos casos, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal y una señal de exportación al ER en C-terminal. En algunos casos, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal y una señal de tráfico en C-terminal. En algunos casos, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal N-terminal, una señal de exportación al ER en C-terminal y la señal de tráfico en C-terminal. En algunos casos, la proteína de la bomba de protones sensible a la luz comprende un péptido señal de exportación al ER en C-terminal y señal de tráfico en C-terminal. En algunos casos, la señal de exportación al ER de C-terminal y la señal de tráfico de C-terminal se unen mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de aproximadamente 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 además una proteína fluorescente, por ejemplo, pero sin limitación, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente verde o una proteína fluorescente cian. En algunos casos, la señal de exportación al ER está localizada más en C-terminal que la señal de tráfico. En algunos casos, la señal de tráfico se localiza más en C-terminal que la señal de exportación al ER.

También se describen en el presente documento polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de las proteínas de la bomba de protones sensibles a la luz descritas en el presente documento, tal como una proteína de bomba de protones sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos del núcleo al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 12. También se describen en el presente documento vectores de expresión (tal como un vector viral descrito en el presente documento) que comprende un polinucleótido que codifica las proteínas descritas en el presente documento, tal como una proteína de bomba de protones sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos del núcleo al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12. Los polinucleótidos se pueden usar para la expresión de la proteína sensible a la luz en células neuronales (por ejemplo, una neurona del BNST, un subnúcleo del BNST o una salida neuronal a o desde una neurona del BNST).

Proteínas de tipo opsina excitadoras sensibles a la luz

En algunos casos, un método sujeto para modular una característica de comportamiento implica el uso de una proteína de tipo opsina excitadora sensible a la luz. Las proteínas de tipo opsina excitadoras sensibles a la luz incluyen polipéptidos que tienen similitud de secuencia (por ejemplo, al menos aproximadamente un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos) con una de las SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 (Figura 28).

Proteínas de canales de cationes sensibles a la luz

En algunas situaciones de los métodos descritos en el presente documento, uno o más canales de cationes sensibles a la luz se pueden expresar en las membranas plasmáticas de una neurona del BNST, un subnúcleo BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona BNST.

En algunas situaciones, la proteína del canal de cationes sensible a la luz se puede derivar de *Chlamydomonas reinhardtii*, en la que la proteína del canal puede ser capaz de mediar en una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En otro caso, la proteína del canal de cationes sensible a la luz puede comprender una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:5 (ChR2). La luz usada para activar la proteínas del canal de cationes sensible a la luz derivada de *Chlamydomonas reinhardtii* puede tener una longitud de onda entre aproximadamente 460 y aproximadamente 495 nm o puede tener una longitud de onda de aproximadamente 480 nm. Además, la luz puede tener una intensidad de al menos aproximadamente 100 Hz. En algunos casos, la activación del canal de cationes sensible a la luz derivado de *Chlamydomonas reinhardtii* con luz de una intensidad de 100 Hz puede producir agotamiento sináptico inducido por despolarización de las neuronas que expresan el canal de cationes sensible a la luz. La proteína del canal de cationes sensible a la luz puede comprender adicionalmente sustituciones, deleciones y/o inserciones introducidas en una secuencia de aminoácidos nativa para aumentar o disminuir la

sensibilidad a la luz, aumentar o disminuir la sensibilidad a longitudes de onda particulares de luz y/o aumentar o disminuir la capacidad de la proteína del canal de cationes sensible a la luz para regular el estado de polarización de la membrana plasmática de la célula. Además, la proteína del canal de cationes sensible a la luz puede contener una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras y/o una o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras.

5 La proteína de la bomba de protones sensible a la luz que comprende sustituciones, delecciones y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos nativa retiene adecuadamente la capacidad de despolarizar la membrana plasmática de una neurona del BNST, un subnúcleo del BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona del BNST en respuesta a la luz.

10 En algunos casos, un canal de cationes sensible a la luz comprende una sustitución T159C de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, un canal de cationes sensible a la luz comprende una sustitución L132C de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, el canal de cationes sensible a la luz comprende una sustitución E123T de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, el canal de cationes sensible a la luz comprende una sustitución E123A de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, el canal de cationes sensible a la luz comprende una sustitución T159C y una sustitución E123T de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, el canal de cationes sensible a la luz comprende una sustitución T159C y una sustitución E123A de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, el canal de cationes sensible a la luz comprende una sustitución T159C, una sustitución L132C y una sustitución E123T de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, el canal de cationes sensible a la luz comprende una sustitución T159C, una sustitución L132C y una sustitución E123A de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, el canal de cationes sensible a la luz comprende una sustitución L132T y una sustitución E123T de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, el canal de cationes sensible a la luz comprende una sustitución L132T y una sustitución E123A de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5.

25 Se puede encontrar información adicional relacionada con las proteínas del canal de cationes sensible a la luz en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/0054319 y las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO 2009/131837 y WO 2007/024391.

30 **Opsinas de función escalonada y opsinas de función escalonada estabilizadas**

En otros casos, la proteína del canal de cationes sensible a la luz puede ser una proteína de tipo opsina de función escalonada (SFO) o una proteína de tipo opsina de función escalonada estabilizada (SSFO) que puede tener sustituciones de aminoácidos específicos en posiciones clave en todo el bolsillo de unión a la retina de la proteína. En algunos casos, la proteína SFO puede tener una mutación en el resto de aminoácido C128 de la SEQ ID NO: 5. En otros casos, la proteína SFO tiene una mutación C128A en la SEQ ID NO:5. En otros casos, la proteína SFO tiene una mutación C128S en la SEQ ID NO:5. En otra realización, la proteína SFO tiene una mutación C128T en la SEQ ID NO:5. En algunos casos, la proteína SFO puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 6.

En algunos casos, la proteína SSFO puede tener una mutación en el resto de aminoácido D156 de la SEQ ID NO: 5. En otros casos, la proteína SSFO puede tener una mutación en ambos restos de aminoácidos C128 y D156 de la SEQ ID NO: 5. En un caso, la proteína SSFO tiene una mutación C128S y una mutación D156A en la SEQ ID NO:5. En otro caso, la proteína SSFO puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 7. En otro caso, la proteína SSFO puede comprender una mutación C128T en la SEQ ID NO:5. En algún caso, la proteína SSFO comprende mutaciones C128T y D156A en la SEQ ID NO:5.

50 En algunos casos, las proteínas SFO o SSFO proporcionadas en el presente documento pueden ser capaces de mediar en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz azul. En otros casos, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 445 nm. Además, la luz puede tener una intensidad de aproximadamente 100 Hz. En algunos casos, la activación de la proteína SFO o SSFO con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede causar un agotamiento sináptico inducido por la despolarización de las neuronas que expresan la proteína SFO o SSFO. En algunos casos, cada una de las proteínas de tipo opsina de función escalonada y proteínas estabilizadas de función escalonada puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una célula neuronal en respuesta a la luz.

60 Se puede encontrar información adicional relacionada con las proteínas SFO o SSFO en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2010/056970 y las solicitudes de patente provisionales n.º 61/410.704 y 61/511.905.

Canales de cationes quiméricos C1V1

65 En otros casos, la proteína del canal de cationes sensible a la luz puede ser una proteína quimérica C1V1 derivada de la proteína VChR1 de *Volvox carteri* y la proteína 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; es sensible a la luz; y es capaz de mediar en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos casos, la proteína C1V1 puede comprender además un reemplazo dentro del dominio del bucle intracelular ubicado entre la segunda y la tercera hélices transmembrana de la proteína quimérica sensible a la luz, en los que al menos una parte del dominio de bucle intracelular se reemplaza por la parte correspondiente de ChR1. En otro caso, la parte del dominio del bucle intracelular de la proteína quimérica C1V1 se puede reemplazar por la parte correspondiente de la ChR1 que se extiende hasta el resto de aminoácido A145 de ChR1. En otros casos, la proteína quimérica C1V1 puede comprender además un reemplazo dentro de la tercera hélice transmembrana de la proteína quimérica sensible a la luz, en los que al menos una parte de la tercera hélice transmembrana se reemplaza por la parte secuencia correspondiente de ChR1.
- En otro caso más, la parte del dominio del bucle intracelular de la proteína quimérica C1V1 se puede reemplazar por la parte correspondiente de la ChR1 que se extiende hasta el resto de aminoácido W163 de ChR1. En otros casos, la proteína quimérica C1V1 puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 8.
- En algunos casos, la proteína C1V1 puede mediar en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz verde. En otros casos, la luz puede tener una longitud de onda de entre aproximadamente 540 nm a aproximadamente 560 nm. En algunos casos, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 542 nm. En algunos casos, la proteína quimérica C1V1 no es capaz de mediar en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunos casos, la proteína quimérica no es capaz de mediar en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 405 nm. Además, la luz puede tener una intensidad de aproximadamente 100 Hz. En algunos casos, la activación de la proteína quimérica C1V1 con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede causar un agotamiento sináptico inducido por la despolarización de las neuronas que expresan la proteína quimérica C1V1. En algunos casos, la proteína quimérica C1V1 desvelada puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una neurona del BNST, un subnúcleo del BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona del BNST en respuesta a la luz.

Variantes mutantes quiméricas C1V1

- La presente divulgación describe además polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos sustituidas o mutadas, en las que el polipéptido mutante retiene la naturaleza característica activable por luz del polipéptido quimérico precursor C1V1, pero también puede poseer propiedades alteradas en algunas situaciones específicas. Por ejemplo, las proteínas quiméricas C1V1 sensibles a la luz mutantes descritas en el presente documento pueden exhibir un mayor nivel de expresión tanto dentro de una célula animal como en la membrana plasmática de la célula animal; una capacidad de respuesta alterada cuando se expone a diferentes longitudes de onda de luz, particularmente luz roja; y/o una combinación de rasgos por los cuales el polipéptido quimérico C1V1 posee las propiedades de baja desensibilización, desactivación rápida, baja activación de luz violeta para una mínima activación cruzada con otros canales de cationes sensibles a la luz y/o una fuerte expresión en células animales.
- En consecuencia, en el presente documento se describen proteínas de tipo opsina quiméricas sensibles a la luz C1V1 que pueden tener sustituciones de aminoácidos específicos en posiciones clave en todo el bolsillo de unión de la retina de la parte VChR1 del polipéptido quimérico. En algunos casos, la proteína C1V1 puede tener una mutación en el resto de aminoácido E122 de la SEQ ID NO: 7. En algunos casos, la proteína C1V1 puede tener una mutación en el resto de aminoácido E162 de la SEQ ID NO: 7. En otros casos, la proteína C1V1 puede tener una mutación en ambos restos de aminoácidos E162 y E122 de la SEQ ID NO: 7. En otros casos, la proteína C1V1 puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. En algunos casos, 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 neurona BNST, un subnúcleo del BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona del BNST en respuesta a la luz.

- En algunas situaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E122 es capaz de mediar en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos casos, la luz puede ser luz verde. En otros casos, la luz puede tener una longitud de onda de entre aproximadamente 540 nm a aproximadamente 560 nm. En algunos casos, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 546 nm. En otros casos, la proteína quimérica mutante C1V1-E122 puede mediar en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz roja. En algunos casos, la luz roja puede tener una longitud de onda de aproximadamente 630 nm. En algunos casos, la proteína quimérica mutante C1V1-E122 no media en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunos casos, la proteína quimérica no media en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 405 nm. Además, la luz puede tener una intensidad de aproximadamente 100 Hz. En algunos casos, la activación de la proteína quimérica mutante C1V1-E122 con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede causar agotamiento sináptico inducido por despolarización de las neuronas que expresan la proteína quimérica mutante C1V1-E122. En algunos casos, la proteína quimérica mutante C1V1-E122 desvelada puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una neurona del BNST, un subnúcleo del BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona del BNST en respuesta a la luz.

En otras situaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E162 es capaz de mediar en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos casos, la luz puede ser luz verde. En otros casos, la luz puede tener una longitud de onda de entre aproximadamente 535 nm a aproximadamente 540 nm. En algunos casos, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 542 nm. En otros casos, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 530 nm. En algunos casos, la proteína quimérica mutante C1V1-E162 no media en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunos casos, la proteína quimérica no media en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 405 nm.

Además, la luz puede tener una intensidad de aproximadamente 100 Hz. En algunos casos, la activación de la proteína quimérica mutante C1V1-E162 con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede causar agotamiento sináptico inducido por despolarización de las neuronas que expresan la proteína quimérica mutante C1V1-E162. En algunos casos, la proteína quimérica mutante C1V1-E162 desvelada puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una neurona del BNST, un subnúcleo del BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona del BNST en respuesta a la luz.

En aún otras situaciones, la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 es capaz de mediar en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos casos, la luz puede ser luz verde. En otros casos, la luz puede tener una longitud de onda de entre aproximadamente 540 nm a aproximadamente 560 nm. En algunos casos, la luz puede tener una longitud de onda de aproximadamente 546 nm. En algunos casos, la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 no media en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz violeta. En algunos casos, la proteína quimérica no media en una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 405 nm. En algunos casos, la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 puede exhibir menos activación cuando se expone a la luz violeta en relación con las proteínas quiméricas C1V1 que carecen de mutaciones en E122/E162 o en relación con otras proteínas del canal de cationes sensibles a la luz.

Además, la luz puede tener una intensidad de aproximadamente 100 Hz. En algunos casos, la activación de la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 con luz que tiene una intensidad de 100 Hz puede causar agotamiento sináptico inducido por despolarización de las neuronas que expresan la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162. En algunos casos, la proteína quimérica mutante C1V1-E122/E162 desvelada puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una neurona del BNST, un subnúcleo del BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona del BNST en respuesta a la luz.

Se puede encontrar información adicional relacionada con canales de cationes quiméricos C1V1, así como variantes mutantes de los mismos en las solicitudes de patente provisionales de Estados Unidos n.º 61/410.736, 61/410.744 y 61/511.912.

Polinucleótidos

La divulgación también describe polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína sensible a la luz descrita en el presente documento. En algunos casos, el polinucleótido comprende un casete de expresión. En algunos casos, el polinucleótido es un vector que comprende el ácido nucleico descrito anteriormente. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica una proteína sensible a la luz de la divulgación está operativamente unido a un promotor. Los promotores son bien conocidos en la técnica. Cualquier promotor que funcione en la célula huésped puede usarse para la expresión de las proteínas de tipo opsina sensibles a la luz y/o cualquier variante de las mismas de la presente divulgación. En uno caso, el promotor utilizado para dirigir la expresión de las proteínas de tipo opsina sensibles a la luz puede ser un promotor específico de una neurona particular. Las regiones de control de iniciación o promotores, que son útiles para dirigir la expresión de las proteínas de tipo opsina sensibles a la luz o una variante de las mismas en una célula animal específica son numerosas y familiares para los expertos en la técnica. Se puede usar prácticamente cualquier promotor capaz de dirigir estos ácidos nucleicos. En algunos casos, el promotor utilizado para dirigir la expresión de la proteína sensible a la luz puede ser el promotor *Thy1* (véase, por ejemplo, Llewellyn, et al., 2010, Nat. Med., 16(10):1161-1166). En otros casos, el promotor utilizado para dirigir la expresión de la proteína sensible a la luz puede ser el promotor EF1 α , un promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor CAG, un promotor de la sinapsina-I (por ejemplo, un promotor de sinapsina-I humano), un promotor humano de la sinucleína 1, un promotor *Thy1* humano, un promotor de la quinasa II alfa (CAMKII α) dependiente de calcio/calmodulina o cualquier otro promotor capaz de dirigir la expresión de las proteínas de tipo opsina sensibles a la luz en una neurona de mamífero.

También se describen en el presente documento los vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína sensible a la luz o cualquier variante de la misma descrita en el presente documento. Los vectores que pueden administrarse de acuerdo con la presente divulgación también incluyen vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un ARN (por ejemplo, un ARNm) que cuando se transcribe a partir de los polinucleótidos del vector dará como resultado la acumulación de proteínas de tipo opsina sensibles a la luz en las membranas plasmáticas de células animales diana. Los vectores que pueden usarse, incluyen, sin limitación, vectores

lentivirales, de VHS, adenovirales y adenoasociados (AAV). Los lentivirus incluyen, pero sin limitación, VIH-1, VIH-2, SIV, FIV y EIAV. Los lentivirus se pueden seudotipar con las proteínas de la envoltura de otros virus, incluyendo, pero sin limitación, VSV, rabia, Mo-MLV, baculovirus y ébola. Tales vectores pueden prepararse usando métodos estándar en la técnica.

En algunos casos, el vector es un vector AAV recombinante. Los vectores 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, morfología o diferenciación, y no parecen estar implicados en enfermedades humanas. El genoma del AAV se ha clonado, secuenciado y caracterizado. Abarca aproximadamente 4.700 bases y contiene una región de repetición terminal invertida (ITR) 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 portan las funciones de encapsidación: la parte izquierda del genoma, que contiene el gen *rep* implicado en la replicación viral y la expresión de los genes virales; y la parte derecha del genoma, que contiene el gen *cap* que codifica las proteínas de la cápside del virus.

Los vectores AAV pueden prepararse usando métodos estándar en la técnica. Los virus adenoasociados de cualquier serotipo son adecuados (véase, por ejemplo, Blacklow, pp. 165-174 of "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, London, UK (2006); and DE Bowles, JE Rabinowitz, RJ Samulski "The Genus Dependovirus" (JR Kerr, SF Cotmore. ME Bloom, RM Linden, CR Parrish, Eds.) p15-23, Hudder Arnold, London, UK (2006). Métodos para purificar vectores se pueden encontrar en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.566.118, 6.989.264, y 6.995.006 y el documento WO/1999/011764 titulado "Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors". Methods of preparing AAV vectors in a baculovirus system are described in, e.g., WO 2008/024998. AAV vectors can be self-complementary or single-stranded. La preparación de vectores híbridos se describe en, por ejemplo, la solicitud PCT n.º PCT/US2005/027091. El uso de vectores derivados de los AAV para transferir genes se ha descrito *in vitro* e *in vivo* (véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente internacional PCT n.º 91/18088 y WO 93/09239; las Patentes de Estados Unidos n.º: 4.797.368, 6.596.535 y 5.139.941; y la patente europea n.º: 0488528. Estas publicaciones describen varias construcciones derivadas de AAV en las que los genes *rep* y/o *cap* se delecionan y sustituyen con un gen de interés y el uso de estas construcciones para transferir el gen de interés *in vitro* (en células cultivadas) o *in vivo* (directamente en un organismo). Los AAV recombinantes con replicación defectuosa de acuerdo con la presente divulgación se pueden preparar cotransfeccionando 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 porta los genes de encapsidación de AAV (genes *rep* y *cap*), en una línea celular que está infectada con un virus auxiliar humano (por ejemplo, un adenovirus). Los AAV recombinantes que se producen se purifican después mediante técnicas estándar.

En algunos casos, el o los vectores para su uso en los métodos de la presente divulgación se encapsidan en una partícula de virus (por ejemplo, partícula de virus AAV, incluyendo, pero sin limitación, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 y AAV16). En consecuencia, la presente divulgación describe una partícula de virus recombinante (recombinante porque contiene un polinucleótido recombinante) que comprende cualquiera de los vectores descritos en el presente documento. Los métodos para producir tales partículas son conocidos en la técnica y se describen en la patente de Estados Unidos n.º 6.596.535.

Administración de proteínas de tipo opsina sensibles a la luz

En algunas situaciones, los polinucleótidos que codifican las proteínas de tipo opsina sensibles a la luz desveladas en el presente documento (por ejemplo, un vector AAV) pueden administrarse directamente a una neurona del BNST, un subnúcleo del BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona del BNST con una aguja, catéter o dispositivo relacionado, utilizando técnicas neuroquirúrgicas conocidas en la materia, tal como por inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Stein et al., J. Virol, 73:34243429, 1999; Davidson et al., PNAS, 97:3428 -3432, 2000; Davidson et al., Nat. Genet. 3:219 -223, 1993; y Alisky y Davidson, Hum. Gene Ther. 11: 2315-2329, 2000 o fluoroscopia.

También se pueden usar otros métodos para administrar las proteínas de tipo opsina sensibles a la luz a las neuronas de interés, tal como, pero sin limitación, transfección con lípidos o polímeros iónicos, electroporación, transfección óptica, impalefección o por medio de una pistola génica.

Fuentes de luz y electricidad

En algunas situaciones de la presente divulgación, las proteínas de tipo opsina sensibles a la luz descritas en el presente documento pueden activarse mediante una fuente de luz implantable (tal como un manguito de luz) o un electrodo implantable colocado alrededor o cerca de las neuronas que expresan las proteínas de tipo opsina sensibles a la luz. Los manguitos de electrodo y los electrodos colocados quirúrgicamente alrededor o cerca de las neuronas para su uso en la estimulación eléctrica de esas neuronas son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.602.624, 7.142.925 y 6.600.956, así como las publicaciones de patentes de EE.UU, n.º 2008/0172116 y 2010/0094372. Las fuentes de luz (tales como un manguito de luz) o los electrodos de la presente

invención pueden estar compuestas por cualquier composición útil o mezcla de composiciones, tal como platino o acero inoxidable, como se conoce en la técnica, y pueden tener cualquier configuración útil para estimular las proteínas de tipo opsina sensibles a la luz desveladas en el presente documento. La fuente de luz puede ser una fuente de luz de fibra óptica.

5 Los electrodos o la fuente de luz implantable (como un manguito de luz) se pueden colocar alrededor o cerca de una neurona que expresa una proteína sensible a la luz.

10 En algunos casos, la fuente de luz implantable (tal como un manguito de luz) no rodea completamente la región que contiene una neurona que expresa una proteína sensible a la luz, pero, más bien, puede tener forma de U. En otra realización, la fuente de luz implantable puede tener un brazo de fijación que puede usarse para guiar la fuente de luz implantable (como un manguito de luz) a la región neuronal para exponer a la luz. El brazo de fijación se puede retirar después de la implantación de la fuente de luz o se puede dejar en su lugar para fijar la posición de la fuente de luz cerca de las neuronas de interés.

15 La fuente de luz implantable (tal como un manguito de luz) puede comprender un cuerpo interno, teniendo el cuerpo interno al menos un medio para generar luz que está configurado para una fuente de alimentación. En algunos casos, la fuente de alimentación puede ser una batería interna para alimentar los medios de generación de luz. En otro caso, la fuente de luz implantable puede comprender una antena externa para recibir energía electromagnética transmitida de forma inalámbrica desde una fuente externa para alimentar los medios de generación de luz. La energía electromagnética transmitida de forma inalámbrica puede ser una onda de radio, una microonda o cualquier otra fuente de alimentación electromagnética que se pueda transmitir desde una fuente de alimentación externa para alimentar el medio de generación de luz de la fuente de luz implantable (tal como un manguito de luz). En un caso, el medio de generación luz se controla con un circuito integrado producido usando un semiconductor u otros procesos conocidos en la técnica.

25 En algunas situaciones, la fuente de luz es un diodo emisor de luz (LED). En algunos casos, el LED puede generar luz azul y/o verde. En otros casos, el LED puede generar luz ámbar y/o amarilla. En algunos casos, varios microLED están incluidos en el cuerpo interno de la fuente de luz implantable (tal como un manguito de luz). En otros casos, el medio generador de luz es un diodo láser de estado sólido o cualquier otro medio capaz de generar luz. El medio de generación de luz puede generar luz que tenga una intensidad suficiente para activar las proteínas de tipo opsina sensibles a la luz expresadas en la membrana plasmática de los nervios cercanos a la fuente de luz (tal como un manguito de luz). En algunos casos, el medio generador de luz produce luz que tiene una intensidad de aproximadamente 0,05 mW/mm², 0,1 mW/mm², 0,2 mW/mm², 0,3 mW/mm², 0,4 mW/mm², 0,5 mW/mm², 30 aproximadamente 0,6 mW/mm², aproximadamente 0,7 mW/mm², aproximadamente 0,8 mW/mm², aproximadamente 0,9 mW/mm², aproximadamente 1,0 mW/mm², aproximadamente 1,1 mW/mm², aproximadamente 1,2 mW/mm², aproximadamente 1,3 mW/mm², aproximadamente 1,4 mW/mm², aproximadamente 1,5 mW/mm², aproximadamente 1,6 mW/mm², aproximadamente 1,7 mW/mm², aproximadamente 1,8 mW/mm², aproximadamente 1,9 mW/mm², aproximadamente 2,0 mW/mm², aproximadamente 2,1 mW/mm², aproximadamente 2,2 mW/mm², aproximadamente 2,3 mW/mm², aproximadamente 2,4 mW/mm², aproximadamente 2,5 mW/mm², aproximadamente 3 mW/mm², aproximadamente 3,5 mW/mm², aproximadamente 4 mW/mm², aproximadamente 4,5 mW/mm², aproximadamente 5 mW/mm², aproximadamente 5,5 mW/mm², aproximadamente 6 mW/mm², aproximadamente 7 mW/mm², aproximadamente 8 mW/mm², aproximadamente 9 mW/mm² o aproximadamente 10 mW/mm², inclusive, incluyendo los valores entre estos números. En otros casos, el medio generador de luz produce luz que tiene una intensidad de al menos aproximadamente 100 Hz.

En algunas situaciones, el medio generador de luz puede ser activado externamente por un controlador externo. El controlador externo puede comprender un generador de energía que puede montarse en una bobina de transmisión. En algunos casos del controlador externo, se puede conectar una batería al generador de energía, para proporcionar energía al mismo. Se puede conectar un interruptor al generador de energía, permitiendo que un individuo active o desactive manualmente el generador de energía. En algunos casos, tras la activación del interruptor, el generador de energía puede proporcionar energía al medio generador luz en la fuente de luz a través de acoplamiento electromagnético entre la bobina de transmisión en el controlador externo y la antena externa de la fuente de luz implantable (tal como un manguito de luz). La bobina de transmisión puede establecer un acoplamiento electromagnético con la antena externa de la fuente de luz implantable cuando está cerca de ella, para suministrar energía al medio generador de luz y para transmitir una o más señales de control a la fuente de luz implantable. En algunos casos, el acoplamiento electromagnético entre la bobina de transmisión del controlador externo y la antena externa de la fuente de luz implantable (tal como un manguito de luz) puede ser un acoplamiento de inductancia magnética de radiofrecuencia. Cuando se usa el acoplamiento de inductancia magnética de radiofrecuencia, la frecuencia operativa de la onda de radio puede estar entre aproximadamente 1 y 20 MHz, inclusive, incluidos los valores entre estos números (por ejemplo, aproximadamente 1 MHz, aproximadamente 2 MHz, aproximadamente 3 MHz, aproximadamente 4 MHz, aproximadamente 5 MHz, aproximadamente 6 MHz, aproximadamente 7 MHz, aproximadamente 8 MHz, aproximadamente 9 MHz, aproximadamente 10 MHz, aproximadamente 11 MHz, aproximadamente 12 MHz, aproximadamente 13 MHz, aproximadamente 14 MHz, aproximadamente 15 MHz, 60 aproximadamente 16 MHz, aproximadamente 17 MHz, aproximadamente 18 MHz, aproximadamente 19 MHz o aproximadamente 20 MHz). Sin embargo, se pueden usar otras técnicas de acoplamiento, tal como un receptor óptico,

infrarrojo, o un sistema de telemetría biomédica (véase, por ejemplo, Kiourti, "Biomedical Telemetry: Communication between Implanted Devices and the External World, Opticon1826, (8): Spring, 2010).

MODELOS ANIMALES NO HUMANOS DE COMPORTAMIENTO

5

La presente divulgación describe modelos animales no humanos de trastornos del comportamiento, en los que una proteína sensible a la luz como se ha descrito anteriormente se expresa en una neurona del BNST, un subnúcleo del BNST o una salida neuronal hacia o desde una neurona del BNST; y en los que la exposición de la neurona del BNST, el subnúcleo BNST o la salida neuronal hacia o desde una neurona BNST a la luz induce características conductuales y/o fisiológicas de un trastorno del comportamiento. Los animales no humanos adecuados incluyen roedores (por ejemplo, ratas; ratones). En algunos casos, el modelo de animal no humano es una rata. En algunos casos, el modelo de animal no humano es un ratón. En algunos casos, el animal no humano es un primate no humano.

10

Por ejemplo, una proteína excitadora sensible a la luz (por ejemplo, ChR2 y otras proteínas excitadoras sensibles a la luz, como se ha descrito anteriormente) pueden expresarse en un soma del BNST; y la exposición de la neurona del BNST a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz da como resultado un aumento de la ansiedad. Como otro ejemplo, una proteína excitadora sensible a la luz se puede expresar en un ovBNST; y la exposición de la neurona del BNST a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz da como resultado un aumento de la ansiedad y un aumento de la frecuencia respiratoria.

15

20

Por ejemplo, en algunos casos, un modelo de animal no humano sujeto comprende un polipéptido excitador sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 % o un 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEC ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, en la que el polipéptido se expresa en un soma del BNST, y en la que la exposición de la neurona del BNST a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz da como resultado un aumento de la ansiedad. En algunos casos, el polipéptido excitador sensible a la luz comprende tanto señales de exportación al ER como de tráfico de membrana. Por ejemplo, en algunos casos, el polipéptido excitador sensible a la luz comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5, una señal de exportación al ER y una señal de tráfico de membrana. En otros casos, el polipéptido excitador sensible a la luz comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5, una señal de tráfico de membrana y una señal de exportación al ER. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana deriva de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana comprende la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO: 16). En algunos casos, la señal de exportación al ER comprende la secuencia FCYENEV (SEQ ID NO: 26).

25

30

35

Por ejemplo, en algunos casos, un modelo de animal no humano sujeto comprende un polipéptido excitador sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 % o un 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEC ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, en el que el polipéptido se expresa en una neurona ovBNST, y en el que la exposición de la neurona ovBNST a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz da como resultado un aumento de la ansiedad y un aumento de la frecuencia respiratoria. En algunos casos, el polipéptido excitador sensible a la luz comprende tanto señales de exportación al ER como de tráfico de membrana. Por ejemplo, en algunos casos, el polipéptido excitador sensible a la luz comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5, una señal de exportación al ER y una señal de tráfico de membrana. En otros casos, el polipéptido excitador sensible a la luz comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5, una señal de tráfico de membrana y una señal de exportación al ER. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana deriva de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana comprende la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO: 16). En algunos casos, la señal de exportación al ER comprende la secuencia FCYENEV (SEQ ID NO: 26).

40

45

50

Por ejemplo, en algunos casos, un modelo animal no humano sujeto comprende un polipéptido inhibidor sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 % o un 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEC ID NO: 1, 2, 3, 4, 12, 13, 14 y 15, en el que el polipéptido se expresa en una entrada de neurona piramidal de la BLA a una neurona del adBNST, y en el que la exposición de la entrada de la neurona piramidal de la BLA a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz da como resultado un aumento de la ansiedad y un aumento de la frecuencia respiratoria. En algunos casos, el polipéptido inhibidor sensible a la luz comprende tanto señales de exportación al ER como de tráfico de membrana. Por ejemplo, en algunos casos, el polipéptido inhibidor sensible a la luz comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1, una señal de exportación al ER y una señal de tráfico de membrana. En otros casos, el polipéptido inhibidor sensible a la luz comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos

55

60

65

al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1, una señal de tráfico de membrana y una señal de exportación al ER. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana deriva de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana comprende la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO: 16). En algunos casos, la señal de exportación al ER comprende la secuencia FCYENEV (SEQ ID NO: 26).

Como otro ejemplo, una proteína inhibidora sensible a la luz (por ejemplo, NpHR y otras proteínas inhibidoras sensibles a la luz, como se ha descrito anteriormente) pueden expresarse en una entrada de neurona piramidal de la BLA a un adBNST; y la exposición de la entrada de la neurona piramidal BLA a una adBNST a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz da como resultado un aumento de la ansiedad y un aumento de la frecuencia respiratoria.

Un ácido nucleico (por ejemplo, un vector de expresión) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína sensible a la luz se puede introducir en un animal no humano (por ejemplo, un roedor, tal como una rata o un ratón; o un primate no humano) por cualquier medio conveniente. Por ejemplo, un ácido nucleico (por ejemplo, un vector de expresión) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína sensible a la luz puede inyectarse estereotácticamente en la BLA, el BNST, el LH, el PB o el VTA.

Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero sin limitación, vectores lentivirales, de VHS, adenovirales y adenoasociados (AAV). Los lentivirus incluyen, pero sin limitación, VIH-1, VIH-2, SIV, FIV y EIAV. Los lentivirus se pueden pseudotipar con las proteínas de la envoltura de otros virus, incluyendo, pero sin limitación, VSV, rabia, Mo-MLV, baculovirus y ébola. Tales vectores pueden prepararse usando métodos estándar en la técnica. Los vectores de expresión adecuados se describen anteriormente y en los ejemplos.

Un modelo animal no humano sujeto de un trastorno del comportamiento es útil para detectar agentes que mejoren una o más características conductuales y/o fisiológicas de un trastorno del comportamiento.

MÉTODOS DE CRIBADO

La presente divulgación proporciona métodos de cribado para identificar agentes que modulan una o más características conductuales y/o fisiológicas de un trastorno del comportamiento.

Un método de cribado sujeto generalmente implica: a) administrar un agente de prueba a un modelo animal no humano de la presente divulgación; y b) determinar el efecto del agente de prueba sobre una característica conductual o fisiológica de un trastorno del comportamiento exhibido por el animal no humano cuando la luz activa el polipéptido de opsina sensible a la luz. Un agente de prueba que mejora una característica conductual o fisiológica se considera un agente candidato para mejorar una característica conductual o fisiológica de un trastorno del comportamiento.

Por ejemplo, un agente de prueba que mejora la característica conductual o fisiológica de un trastorno del comportamiento, exhibida por un modelo animal no humano sujeto, en al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 % o más de un 25% (por ejemplo, de un 25 % a un 50 %; de un 50 % a un 75 %; etc.) puede considerarse un agente candidato para mejorar (tratar) una característica conductual o fisiológica de un trastorno del comportamiento. Los agentes de prueba identificados usando un método sujeto pueden considerarse agentes candidatos para tratar cualquiera de varios trastornos de conducta y otros estados psicológicos y fisiológicos adversos.

En algunos casos, un agente de prueba se evalúa por su efecto sobre la frecuencia respiratoria. En otros casos, se evalúa a un agente de prueba por su efecto sobre la ansiedad.

Una fuente de luz implantable puede activar una proteína sensible a la luz expresada en un modelo animal no humano sujeto, donde se describen fuentes de luz adecuadas anteriormente y en los Ejemplos. Las longitudes de onda adecuadas para activar una proteína de tipo opsina inhibidora o excitadora se han descrito anteriormente.

Si un agente de prueba trata (por ejemplo, mejora) una característica conductual o fisiológica de un trastorno del comportamiento exhibido por un modelo animal no humano sujeto puede determinarse usando cualquier método apropiado, incluidos los descritos en los Ejemplos. Por ejemplo, se pueden usar la prueba del laberinto en cruz elevado (EPM), la prueba de campo abierto (OFT) y la prueba de preferencia de lugar en tiempo real (RTPP). La frecuencia respiratoria se puede medir utilizando cualquier método conveniente, incluyendo el método descrito en los ejemplos.

Por ejemplo, en algunos casos, un método de cribado sujeto comprende: a) administrar un agente de prueba a un modelo animal no humano sujeto, en el que el modelo animal no humano comprende un polipéptido excitador sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 % o un 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEC ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, en la que el polipéptido se expresa en un soma del BNST, y en la que la exposición de la neurona del BNST a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz da como resultado un aumento

de la ansiedad. En algunos casos, el polipéptido excitador sensible a la luz comprende tanto señales de exportación al ER como de tráfico de membrana; y b) determinar el efecto de un agente de prueba sobre la ansiedad cuando la proteína sensible a la luz es activada por la luz. En algunos casos, el polipéptido excitador sensible a la luz comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5, una señal de exportación al ER y una señal de tráfico de membrana. En otros casos, el polipéptido excitador sensible a la luz comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5, una señal de tráfico de membrana y una señal de exportación al ER. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana deriva de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana comprende la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO: 16). En algunos casos, la señal de exportación al ER comprende la secuencia FCYENEV (SEQ ID NO: 26).

Como otro ejemplo, en algunos casos, un método de cribado sujeto comprende: a) administrar un agente de prueba a un modelo animal no humano sujeto, en el que el modelo animal no humano comprende un polipéptido excitador sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 % o un 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEC ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, en el que el polipéptido se expresa en una neurona ovBNST, y en el que la exposición de la neurona del ovBNST a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz da como resultado un aumento de la ansiedad y un aumento de la frecuencia respiratoria; y b) determinar el efecto de un agente de prueba sobre la ansiedad y/o la frecuencia respiratoria cuando la proteína sensible a la luz es activada por la luz. En algunos casos, el polipéptido excitador sensible a la luz comprende tanto señales de exportación al ER como de tráfico de membrana. Por ejemplo, en algunos casos, el polipéptido excitador sensible a la luz comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5, una señal de exportación al ER y una señal de tráfico de membrana. En otros casos, el polipéptido excitador sensible a la luz comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5, una señal de tráfico de membrana y una señal de exportación al ER. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana deriva de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana comprende la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO: 16). En algunos casos, la señal de exportación al ER comprende la secuencia FCYENEV (SEQ ID NO: 26).

Como otro ejemplo, en algunos casos, un método de cribado sujeto comprende: a) administrar un agente de prueba a un modelo animal no humano sujeto, en el que el modelo animal no humano comprende un polipéptido inhibidor sensible a la luz que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 % o un 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 12, 13, 14 y 15, en el que el polipéptido se expresa en una entrada de neurona piramidal de la BLA a una neurona del adBNST, y en el que la exposición de la entrada de la neurona piramidal de la BLA a la luz de una longitud de onda a la que responde la proteína sensible a la luz da como resultado un aumento de la ansiedad y un aumento de la frecuencia respiratoria; y b) determinar el efecto de un agente de prueba sobre la ansiedad y/o la frecuencia respiratoria cuando la proteína sensible a la luz es activada por la luz. En algunos casos, el polipéptido inhibidor sensible a la luz comprende tanto señales de exportación al ER como de tráfico de membrana. Por ejemplo, en algunos casos, el polipéptido inhibidor sensible a la luz comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1, una señal de exportación al ER y una señal de tráfico de membrana. En otros casos, el polipéptido inhibidor sensible a la luz comprende, del N-terminal al C-terminal, la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1, una señal de tráfico de membrana y una señal de exportación al ER. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana deriva de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador interno humano Kir2.1. En algunos casos, la señal de tráfico de membrana comprende la secuencia de aminoácidos KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO: 16). En algunos casos, la señal de exportación al ER comprende la secuencia FCYENEV (SEQ ID NO: 26).

Los síntomas que pueden analizarse en un modelo animal no humano sujeto incluyen, por ejemplo, comportamiento reducido relacionado con el escape, ansiedad y estrés. Las pruebas de depresión y/o ansiedad y/o estrés incluyen la prueba de nado forzado (FST) (véase, por ejemplo, Porsolt et al. (1977) *Nature* 266:730; y Petit-Demouliere, et al. (2005) *Psychopharmacology* 177: 245); la prueba de suspensión de la cola (véase, por ejemplo, Cryan et al. (2005) *Neurosci. Behav. Rev.* 29:571; y Li et al. (2001) *Neuropharmacol.* 40:1028); aversión condicionada al lugar (véase, por ejemplo, Bechtholt-Gompfet al. (2010) *Neuropsychopharmacol.* 35:2049); la novedosa prueba de hipofagia (Dulawa, et al. (2005) *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29:771); la prueba de estrés de derrota social (véase, por ejemplo, Blanchard et al. (2001) *Physiol Behav.* 73:261-271; y Kudryavtseva et al. (1991) *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38:315); la prueba de preferencia de sacarosa (véase, por ejemplo, Kurre Nielsen, et al. (2000) *Behavioural Brain Research* 107:21-33); la prueba de campo abierto (véase, por ejemplo, Holmes (2001) *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25:261-273); la prueba del laberinto en cruz elevado (véase, por ejemplo, Holmes (2001) citado anteriormente); y similares. Cualquiera de estas pruebas se puede utilizar en un método de cribado sujeto.

Como se usa en el presente documento, el término "determinar" se refiere a determinaciones cuantitativas y

cualitativas, y como tal, el término "determinar" se usa indistintamente en el presente documento con "analizar", "medir", y similares.

Los términos "agente candidato", "agente de prueba", "agente", "sustancia" y "compuesto" se usan indistintamente en el presente documento. Los agentes candidatos abarcan numerosas clases químicas, normalmente moléculas inorgánicas u orgánicas sintéticas, semisintéticas o de origen natural. Los agentes candidatos incluyen los que se encuentran en grandes bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, las bibliotecas de compuestos sintéticos están disponibles comercialmente en Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, Reino Unido), ComGenex (South San Francisco, CA) y MicroSource (New Milford, CT). Una biblioteca química rara está disponible en Aldrich (Milwaukee, Wisconsin) y también se puede utilizar. Como alternativa, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, de plantas y animales están disponibles en Pan Labs (Bothell, WA) o son fácilmente producibles.

Los agentes candidatos pueden ser pequeños compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular de más de 50 daltons y menos de aproximadamente 2.500 daltons. Los agentes candidatos pueden comprender grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, y pueden incluir al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, y puede contener al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos pueden comprender carbono cíclico o estructuras heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes candidatos también se encuentran entre las biomoléculas, incluidos péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas y derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Los ensayos de la presente divulgación incluyen controles, donde los controles adecuados incluyen un modelo animal sujeto no humano que ha sido expuesto a luz activadora, pero al que no se le ha administrado el agente de prueba.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a aquellos expertos habituales en la materia una divulgación y descripción completas de cómo fabricar y usar la presente invención y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni pretenden representar que los experimentos, a continuación, son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados Celsius y la presión es la atmosférica o próxima a esta. Pueden emplearse abreviaturas convencionales, por ejemplo, pb, par(es) de bases; kb, kilobase(s); pl, picolitro(s); s, segundo(s); min, minuto(s); h, hora(s); aa, aminoácido(s); kb, kilobase(s); pb, par(es) de bases; nt, nucleótido(s); i.m., por vía intramuscular; i.p., por vía intraperitoneal; s.c., por vía subcutánea; y similares.

Ejemplo 1:

MATERIALES Y MÉTODOS

Sumario de métodos

Expresión génica mediada por virus. Los virus AAV5 se empaquetaron mediante el Vector Core de la Universidad de Carolina del Norte (Chapel Hill, NC, EE.UU.). Los mapas para las construcciones de AAV están disponibles en [http://www\(optogenetics.org\)](http://www.optogenetics.org). Se inyectaron 0,5 µl de reserva viral estereotácticamente en la BLA, el BNST, el LH, el PB o el VTA.

Ensayos de ansiedad y medición de la frecuencia respiratoria. Los ratones a los que se han inyectado virus e implantado con cánulas de guía o fibra óptica se probaron posteriormente en el laberinto en cruz elevado (EPM), la prueba de campo abierto (OFT) y la prueba de preferencia de lugar en tiempo real (RTPP). Una sesión de prueba en el EPM fue de 15 minutos de duración, y consiste en 5 minutos de periodos de luz apagada-encendida-apagada; la OFT era de 20 minutos de duración, y consiste en periodos de 5 minutos de luz apagada-encendida-apagada-encendida. En la prueba RTPP, el sujeto podía explorar libremente dos cámaras y la entrada o salida de una de las cámaras activaba o desactivaba la estimulación optogenética, respectivamente. Los datos de comportamiento fueron recopilados y analizados automáticamente con el software BIOBSERVE. La frecuencia respiratoria se midió con un pulsioxímetro en ratones despiertos que se comportan bien durante 3 minutos. La luz amarilla se suministró como iluminación constante, mientras que la luz azul se suministró como un tren de pulsos de 10 Hz, 5 ms.

Fisiología *in vivo*. Microdiscos a medida que contenían 8 estereotrodos rodeando a una fibra óptica se implantaron en el BNST, permitiendo la liberación de luz y el registro de las neuronas del BNST en animales que se comportan despiertos. A continuación se proporcionan más detalles sobre el análisis y el cálculo de las puntuaciones en el EPM.

Electrofisiología *ex vivo*. Se prepararon cortes agudos para registros de pinzamiento zonal. Se realizaron registros de células enteras a partir de neuronas del BNST y se administraron pulsos de luz azul a 10 Hz en secciones coronales

a través del objetivo del microscopio.

Estadísticas. Todos los gráficos y valores numéricos en las figuras se presentan como la media $\pm$ s.e.m. Más detalles de los análisis estadísticos se proporcionan a continuación.

5

Sujetos

Ratones macho C57BL/6, 6-8 semanas de edad al comienzo de los experimentos, se alojaron en un ciclo inverso de luz/oscuridad de 12 horas. Se les ofreció alimento y agua *ad libitum*. Los ratones transgénicos Cre-receptor de dopamina receptor D1a (Drd1a) (línea del fundador: EY266) se obtuvieron de GENSAT. Todos los ratones utilizados para los experimentos de comportamiento se alojaron individualmente para reducir la variabilidad del comportamiento de referencia, a excepción de los ratones soma eNpHR3.0:BLA-adBNST and Chr2:BNST, que se alojaron en grupo para disminuir los niveles de ansiedad basales. Además, una cohorte de ratones Chr2: BLA-adBNST (utilizada para producir los datos presentados en la **Figura 10d y la Figura 12**) se alojó en grupo para demostrar que la estimulación de la proyección BLA-adBNST es ansiolítica se alojó en grupo, en animales basales de baja ansiedad alojados en grupo. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Stanford y estaban de acuerdo con las pautas del Instituto Nacional de Salud.

Producción de virus

20

Los vectores de virus adenoasociados (AAV) se serotiparon con proteínas de recubrimiento de AAV5 y se empaquetaron mediante el Vector Core de la Universidad de Carolina del Norte (Chapel Hill, NC, EE.UU.). Los títulos víricos fueron:

25 4 x 10¹² partículas/ml para AAV5:CaMKIIa::hChr2(H134R)-eYFP
 3 x 10¹² partículas/ml para AAV5:CaMKIIa::eYFP
 4 x 10¹² partículas/ml para AAV5:CaMKIIa::eNpHR3.0-eYFP
 4 x 10¹² partículas/ml para AAV5:hSyn::hChr2(H134R)-eYFP
 4 x 10¹² partículas/ml para AAV5:hSyn::eYFP
 30 4 x 10¹² partículas/ml para AAV5:hSyn::eNpHR3.0-eYFP
 2 x 10¹² partículas/ml para AAV5:EF1a::DIO-eNpHR3.0-eYFP
 2 x 10¹² partículas/ml para AAV5:EF1a::DIO-Chr2(H134R)-eYFP

Los mapas para estas construcciones están disponibles en [www\(dot\)optogenetics\(dot\)org](http://www(dot)optogenetics(dot)org). El virus del herpes simple (VHS) fue derivado por R.N. de la cepa 17+ del HSV y era incompetente para la replicación. El título funcional de este virus amplicón del HSV, que permite la expresión persistente *in vivo*, fue 3 x 10⁸ unidades infecciosas (u.i.) / ml. El virus de la rabia (RV) se produjo como se ha descrito anteriormente². La glicoproteína del virus de la rabia (RVG) se reemplazó por eGFP o tdTomato para generar el virus que expresa eGFP (RV:eGFP) o tdTomato (RV:tdTomato).

40 Inyección de virus estereotáctico e implantación de cánula de guía/cánula de fibra óptica

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron asépticamente. Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 1,5-3,0 % y se colocaron en un aparato estereotáctico (Kopf Instruments, Tujunga, CA, EE.UU.) mientras descansan sobre una almohadilla térmica. Para los ratones utilizados en experimentos de inyección de fármacos, se realizó una craneotomía pequeña y se colocó una cánula guía (calibre 22 C313G/SPC GUIDE 38172; Plásticos Uno, Roanoke VA, EE. UU.) unilateralmente en la parte superior del BNST (AP +0,2 mm, ML1,0 mm, DV-3,9 mm). Todas las coordenadas son relativas al bregma en mm³. Primero se aplicó cemento adhesivo (C&B metabond; Parkell, Edgewood, NY, EE. UU.) y se añadió cemento dental (Stoelting, Wood Dale, EE.UU.) para asegurar la cánula al cráneo. La incisión se cerró usando adhesivo tisular (Vetbond; Fisher, Pittsburgh, PA, Estados Unidos). Se insertó una tapa simulada (C313DC/1/SPC DUMMY.014/.36MM; PlásticosOne) para mantener la guía de la cánula libre de obstrucciones.

Para todos los ratones utilizados en manipulaciones optogenéticas conductuales, Se inyectaron 0,5 μ l de virus por sitio. Los ratones Chr2 recibieron infusión viral unilateral e implante de cánula de fibra óptica (0,22 NA, 200 μ m de diámetro; Doric Lenses, Quebec, Canadá), mientras que a todos los ratones eNpHR3.0 se les inyectó e implantó bilateralmente ya que la pérdida de función unilateral puede ser compensada por el otro hemisferio. Todas las manipulaciones unilaterales, incluida la inyección de fármacos, la inyección viral y la implantación de la cánula se equilibraron en los hemisferios. Para manipulaciones optogenéticas de somas del BNST, después de una pequeña craneotomía, se inyectó AAV5:hSyn::eNpHR3.0-eYFP o AAV5:hSyn::Chr2-eYFP en el centro del BNST dorsal (AP +0,2 mm, ML $\pm$ 1,0 mm, DV -4,3 mm) con una jeringa de 10 μ l y una aguja de metal biselado de calibre 33 (Nanofil, WPI, Sarasota, FL, EE.UU.), con el bisel orientado anteriormente. hSyn (sinapsina humana) es un promotor pan-neuronal⁴ que permite la expresión de transgenes en todas las neuronas en el BNST. Las inyecciones se realizaron a través de una bomba de jeringa (UMP3; WPI) y el controlador estableció la velocidad en 0,1 μ l/min (Micro4; WPI). Después de la inyección, la aguja se levantó lentamente 100 μ m y luego se dejó en su lugar durante 5 minutos adicionales antes de la extracción lenta para evitar el flujo ascendente del líquido a lo largo de la aguja. Los grupos de control se inyectaron con AAV5:hSyn::eYFP. A continuación, se colocaron dos cánulas de fibra óptica en la parte

superior del BNST bilateral (AP +0,2 mm, ML 1,0 mm, DV -4,0 mm) y se fijaron al cráneo como se ha descrito anteriormente. Los ratones se recuperaron de la anestesia en una jaula tibia. Los experimentos conductuales y electrofisiológicos se realizaron dentro de una ventana de 4-6 semanas (para todas las manipulaciones del cuerpo celular) u 8-12 semanas (para todas las manipulaciones terminales) después de la inyección, para permitir la expresión de opsina.

Para estimulaciones optogenéticas de terminales del BNST en el LH, el PB o el VTA, todos los procedimientos fueron iguales, excepto que AAV5:hSyn::ChR2-eYFP se liberó en el BNST y las cánulas de fibra óptica se colocaron por encima del LH (AP -1,0 mm, ML 1,3 mm, DV -5,0 mm), PB (AP -5,2 mm, ML 1,5 mm, DV -3,2 mm) o VTA (AP -3,4 mm, ML 0,3 mm, DV -3,9 mm). Para manipulaciones optogenéticas de terminales del BLA en el BNST, AAV:CaMKIIa::hChR2(H134R)-eYFP, AAV:CaMKIIa::eNpHR3.0-eYFP o (para control) AAV:CaMKIIa::eYFP se liberaron en la BLA (AP -1,6 mm, ML $\pm$ 3,1 mm, DV -4,9 mm) y las cánulas de fibra óptica se colocaron en la parte superior del BNST. Como CaMKIIa es un marcador de neuronas piramidales glutamatérgicas en la BLA⁵, el uso del promotor de CaMKIIa permite la expresión del transgén, lo que favorece las neuronas piramidales de la BLA. Para estimular las fibras de la BLA en la comisura anterior se inyectó AAV:CaMKIIa::hChR2(H134R)-eYFP en la BLA y la cánula de fibra óptica se implantó justo encima de la comisura anterior (AP +0,14 mm, ML 1,5 mm, DV -4,4 mm). Para la inhibición optogenética del ovBNST, se inyectó AAV:EF1a::D10-eNpHR3.0-eYFP a ratones DrdlaCre en la parte superior del BNST y las cánulas de fibra óptica se colocaron en la parte superior del BNST.

Para sondear las regiones que se proyectan al ovBNST, se inyectaron 0,3 μ l de RV:eGFP en el ovBNST (AP +0,2 mm, ML 1,0 mm, DV -4,1 mm). Para las inyecciones dobles del virus de la rabia, se inyectaron 0,5 μ l de RV:eGFP, 0,5 μ l de RV:tdTomato o 0,5 μ l de la mezcla de dos virus en el LH (AP -1,5 mm, ML 1,0 mm, DV -5,6 mm), PB (AP -5,2 mm, ML 1,0 mm, DV -3,8 mm) o VTA (AP -3,5 mm, ML 0,35 mm, DV -4,5 mm).

Administración de fármaco

Para la infusión del antagonista del receptor de glutamato en el BNST, una solución de antagonista de glutamato consistente en 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoyl-benzof[quinoxalina-2,3-diona 10 mM (NBQX; Tocris, Ellisville MO, EE.UU.) y ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico 50 mM (D-APV; Tocris) se disolvió en solución salina (0,9 % de NaCl). Treinta minutos antes de los ensayos de ansiedad, se infundieron 0,3 μ l de la solución de antagonista de glutamato en el BNST a través de una aguja de infusión interna (calibre 28 C313I/SPC INTERNAL38799; PlasticsOne), insertada en la misma cánula de guía utilizada para introducir las cánulas de fibra óptica para el suministro de luz. La aguja interna se conectó a una jeringa Hamilton de 10 μ l (Nanofil; WPI). El caudal (0,1 μ l/min) se reguló mediante una bomba de jeringa (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EE.UU.). La aguja de infusión interna sobresalía más de la guía de la cánula en aproximadamente 500 μ m, para penetrar la posible coagulación de la sangre en la punta de la guía de la cánula y llegar al centro del BNST dorsal. La aguja de infusión se retiró 2 minutos después de la finalización de la inyección para evitar el derrame de la cánula guía.

Suministro de luz

Para todos los experimentos de inhibición optogenética utilizando eNpHR3.0, se generó 5 mW (159 mW/mm² en la punta de la fibra óptica) de luz amarilla mediante un láser DPSS de 593,5 nm (MGLF593.5; OEM Laser Systems, East Lansing, MI, EE. UU.), y se suministró bilateralmente a los ratones a través de dos cables de conexión de fibra óptica (0,22 NA, 200 μ m de diámetro; Doric Lenses) que se fijaron a las cánulas de fibra óptica implantadas usando una funda de plástico de conexión. Para todos los experimentos de estimulación optogenética con ChR2, se generaron 3-5 mW de luz azul (95-159 mW/mm² en la punta de la fibra óptica) mediante láser DPSS de 473 nm (MBL-111473; OEM Laser Systems) y se suministró unilateralmente. Se usó un láser amarillo constante para el suministro de luz amarilla a todos los ratones eNpHR3.0, mientras que la salida del láser azul se controló usando un generador de impulsos (Master-8; AMPI, Jerusalén, Israel) para suministrar trenes de impulso de luz de 5 ms a 10 Hz (para todos los ratones ChR2 excepto para los ratones ChR2:adBNST-VTA) o a 20 Hz (para ratones ChR2: adBNST-VTA).

Ensayos de comportamiento

Todos los ratones fueron manipulados durante tres días antes de los ensayos de comportamiento durante 5 minutos al día para reducir el estrés introducido por el contacto con el experimentador. Se permitieron de 1 a 5 minutos para la recuperación en la jaula de la manipulación para conectar la cánula de fibra óptica y el cable de conexión, antes de iniciar la sesión. El laberinto en cruz elevado era de plástico y consistía en dos brazos abiertos de color gris claro (30 x 5 cm) y dos brazos cerrados de color gris (30 x 5 x 30 cm) que se extendían desde una plataforma central (5 x 5 x 5 cm) a 90 grados en forma de cruz. Los brazos del mismo tipo estaban orientados uno en frente del otro. El laberinto se colocó a 30 cm del suelo. Los ratones fueron colocados individualmente en el centro, con la cabeza frente a un brazo cerrado. La prueba del laberinto en cruz elevado consistió en una sesión de 15 minutos dividida en tres periodos de 5 minutos: el periodo de pre-estimulación con la luz apagada, el periodo de luz encendida y el periodo de postestimulación con luz apagada, en orden (periodos apagada-encendida-apagada). La cámara de campo abierto (50 x 50 cm) estaba hecha de plástico y se dividía en un campo central (centro, 25 x 25 cm) y un campo externo (periferia). Se colocaron ratones individuales en la periferia del campo al comienzo de la prueba. La prueba de campo abierto consistió en una sesión de 20 minutos en la que hubo cuatro periodos de 5 min (periodos de apagada-

encendida-apagada-encendida). Los periodos alternaban entre periodos sin luz y de estimulación con luz, comenzando con el periodo basal con luz apagada. Para todos los análisis y gráficos donde solo se muestran las condiciones de luz apagada y encendida, los dos periodos se agruparon y los dos se combinaron. La prueba de preferencia de lugar en tiempo real se realizó en una arena de plástico negro hecha a medida (50 x 50 x 25 cm) consistente en dos cámaras indistinguibles durante 15 minutos. Una cámara se combinó con estimulación con luz. La elección de la cámara emparejada se contrarrestó en los ratones. Los animales se colocaron en la cámara no estimulada al comienzo de la sesión y recibieron estimulación con luz iniciada en cada entrada en la cámara emparejada. La prueba de la caja de luz y oscuridad se realizó en una arena de plástico gris hecha a medida (50 x 25 cm) consistente en compartimentos de luz y oscuridad durante 15 minutos. El ratón se colocó en el compartimento oscuro al comienzo del experimento. Para todos los ensayos de comportamiento, se usó software de seguimiento en video (Viewer²; BIOBSERVAR St. Augustin, Alemania) para rastrear automáticamente la ubicación y la velocidad.

Medición de la frecuencia respiratoria y la frecuencia cardíaca

La frecuencia respiratoria y la frecuencia cardíaca se midieron con un pulsioxímetro (MouseOx Plus; Starr Life Sciences, Allison Park, PA, EE. UU.) conectado a un ordenador equipado con el software MouseOx Plus. Para los registros de ratones despiertos, se usó un sensor de collar. Se afeitó a los ratones alrededor del cuello y se les aclimató al sensor del collar (Starr Life Sciences, Allison Park, PA, EE.UU.) durante la noche. Además, el experimentador habituó a los ratones a la manipulación durante tres días antes de las mediciones. Todas los registros se hicieron encima de la jaula, a menos que se indique otra cosa. Los ratones recibieron 5 minutos para aclimatación en la jaula y se registraron durante 3 minutos como medida de referencia y se suministró luz durante los siguientes 3 minutos. La frecuencia respiratoria como un promedio móvil de 10 mediciones se obtuvo cada 1,7 segundos. La frecuencia cardíaca se registró como un promedio móvil durante 5 latidos cardíacos. El registro a menudo se interrumpió debido a la pérdida de señal o artefactos de movimiento; por lo tanto, todos los parámetros se monitorizaron cuidadosamente en tiempo real y los registros se descartaron cuando se observaron valores fisiológicamente poco realistas debido a un muestreo insuficiente (por ejemplo, frecuencia respiratoria de <100 lrpm o frecuencia cardíaca de <600 lpm). Para garantizar la calidad del registro, se realizaron y promediaron al menos dos registros por ratón, y se descartaron los registros que no pudieron monitorizar las frecuencias cardíacas y respiratorias durante más del 30 % del tiempo. Todos los datos de frecuencia respiratoria se obtuvieron con el protocolo descrito anteriormente, a excepción de los datos que se muestran en las **Figuras 9 y 15**. El procedimiento utilizado en estas figuras se detalla a continuación.

Para comparar las frecuencias respiratorias entre la jaula y el campo abierto, las frecuencias respiratorias se midieron en estos dos ambientes en los mismos ratones. Los ratones se registraron en la jaula o en el campo abierto durante 3 minutos, se les dio 5 minutos para la recuperación en una nueva jaula limpia y se les grabó en el otro ambiente durante 3 minutos. Los registros se iniciaron inmediatamente después de colocar a los ratones en cada ambiente. Para contrarrestar el orden de grabación, en la mitad de los ratones, la grabación se realizó primero en la jaula y luego en campo abierto (Grupo A, en la figura a continuación). Para la otra mitad se cambió el orden de grabación (Grupo B). Entre dos registros, se dejó recuperar a cada ratón en una nueva jaula limpia. Los datos que se muestran en la **Figura 8** se registraron de acuerdo con el esquema proporcionado en la **Figura 29A**.

Las frecuencias respiratorias del campo abierto se dividieron por las frecuencias respiratorias de la jaula casera y el valor resultante se comparó entre los grupos ChR2 y eYFP. Por tanto, las frecuencias respiratorias en la jaula se utilizaron como valor basal para todos los ratones, tanto en el grupo A como en el B. La manipulación y el transporte de ratones a través de los ambientes se realizó antes del registro en la jaula y antes de registrar en campo abierto. Por lo tanto, la manipulación en sí misma no pudo sustentar las diferencias en la frecuencia respiratoria entre los ambientes (además, todos los animales fueron manipulados ampliamente tres días antes de los registros para habitar a los animales tanto a la manipulación como al movimiento con el sensor del collar colocado). Para demostrar aún más que la manipulación y la transferencia de los ratones a través de los ambientes no pueden ser responsables del efecto observado, los inventores compararon las frecuencias respiratorias del Grupo A en campo abierto con el Grupo B en la jaula. Aunque ambos grupos de ratones se manipularon/transportaron por igual antes de la grabación, los ratones colocados en el campo abierto exhibieron frecuencias respiratorias estadísticamente significativas más altas que los de la jaula ($233,1 \pm 12,8$ lrpm, $n = 3$ para el campo abierto; $170,3 \pm 7,4$ lrpm, $n = 4$ para la jaula; $p < 0,05$), que muestra que la frecuencia respiratoria aumentada está causada por el campo abierto y no puede atribuirse al transporte y manipulación previos. Para el experimento que se muestra en la **Figura 15**, la luz se suministró cuando se colocó a los ratones en campo abierto. El protocolo utilizado para obtener los datos que se muestran en la **Figura 15** fue idéntico al utilizado en la **Figura 8**, con la diferencia de que se suministró luz azul durante la exploración del campo abierto, como se muestra en el esquema proporcionado en la **Figura 29B**.

Registro electrofisiológico ex vivo

Para la fisiología de corte en combinación con optogenética, se inyectó a los ratones salvajes macho de 3-4 semanas AAV-CaMKIIa::ChR2-eYFP en la BLA o a ratones Drdla-Cre macho AAV-EF1a::DIO-ChR2(H134R)-eYFP en el ovBNST. Después de un mes, se obtuvieron cortes coronales agudos de 300 μ m mediante perfusión transcardial de solución de corte de sacarosa helada (en mM; 11 de D-glucosa, 234 de sacarosa, 2,5 de KCl, 1,25 de NaH_2PO_4 , 10 de MgSO_4 , 0,5 de CaCl_2 , 26 de NaHCO_3) y se laminó en la misma solución usando un vibratomo (VT1000S; Leica, Buffalo Grove, IL, EE.UU.). Las láminas se recuperaron en líquido cefalorraquídeo artificial oxigenado (LCRa; en mM,

123 de NaCl, 26 de NaHCO₃, 3 de KCl, 1,25 de NaH₂PO₄, **1 de** MgCl₂, 2 de CaCl₂ y 11 de glucosa) a 32 °C durante una hora. Todos los registros electrofisiológicos se realizaron bajo la perfusión constante de LCRa burbujeado con 95 % de O₂/5 % de CO₂ y calentado a 32 °C. Las neuronas se visualizaron con un microscopio vertical (DMLFSA; Leica) equipado con óptica DIC y un conjunto de filtros para visualizar eYFP, utilizando un objetivo de inmersión en agua 40x y una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD) (RetigaExi FAST; QImaging, Surrey, Canadá). Las láminas que contenían la BLA se usaron para verificar la expresión de ChR2 en la BLA y solo se usaron las láminas de los ratones con expresión de ChR2 restringida a la BLA. Los registros de células enteras se realizaron a partir de neuronas del adBNST (véase más adelante), utilizando electrodos de parche (3-6 MΩ) llenos de una solución interna a base de potasio (en mM; 10 de HEPES, 4 de Mg-ATP, 0,5 de MgCl₂, 0,4 de Na₃-GTP, 10 de NaCl, 0,5 de EGTA y 140 de gluconato de potasio) o solución interna a base de cesio (en mM; 10 de HEPES, 4 de Mg-ATP, 0,3 de Na₃-GTP, 2 de NaCl, 8 de CsCl, 4 de EGTA, 1 de QX314 y 130 de gluconato de cesio). La mayoría de los experimentos de fijación de voltaje y todos los experimentos de fijación de corriente se realizaron con solución interna a base de potasio y algunos experimentos de fijación de voltaje se realizaron con solución interna a base de cesio para mejorar la fijación espacial. Las resistencias en serie fueron, normalmente, de 10-20 mΩ.

Para el suministro de luz azul, la luz se emitió desde una fuente de lámpara de xenón de 300 W de longitud de onda ancha (DG-4, Sutter Instruments, Novato, CA, EE. UU.), paso de banda filtrado a 470 ± 20 nm (Semrock; Rochester, NY, EE.UU.), pasado a través de filtros adicionales de densidad neutra (ThorLabs; Newton, NJ, EE.UU.) y acoplado al puerto de fluorescencia del microscopio. Para todos los experimentos, se suministraron 5-15 mW/mm² de luz a las láminas a través de objetivos de 40x, 0,8 NA. Las señales de entrada pulsadas se generaron a partir de pClamp (Molecular Devices; Sunnyvale, CA, EE.UU.) y se emitieron a la DG-4 a través de BNC.

Se realizaron registros de fijación de voltaje tanto a -70 mV para aislar las EPSC como a 0 mV para aislar las IPSC. Las EPSC e IPSC evocados por la luz se abolieron mediante la aplicación en baño de antagonistas de los receptores de glutamato (NBQX 10 μM y APV 50 μM; *n*= 4; **Figura 19e**). Las IPSC se confirmaron mediante la aplicación en baño de picrotoxina 100 μM (10 μM; *n*= 4; **Figura 19f**), respectivamente. También se realizaron registros de fijación de corriente con la célula en reposo a aproximadamente -60 mV. Las corrientes se filtraron a 2 kHz, se digitalizaron a 50 kHz y se registraron en disco utilizando el software pClamp10 (Molecular Devices).

Para los experimentos de estimulación de las fibras axónicas en la BLA, los registros de pinzamiento zonal procedían del adBNST. Aunque no hay un límite anatómico claro entre el ovBNST y el adBNST observados con la óptica DIC, los inventores realizaron registros en la región donde las fibras que expresan eYFP estaban presentes, ya que el ovBNST no recibe proyecciones de la BLA (**Figura 4f y 10a**). De acuerdo con esto, las supuestas neuronas del ovBNST en la región dorsal del BNST no exhibieron ninguna respuesta evocada por la luz. Para los experimentos de registro de las neuronas del adBNST que se proyectan al LH, se inyectó HSV:EF1a::GFP en el LH (AP -1,5 mm, ML 1,2 mm, DV -6,0 mm) 3-4 días antes de los experimentos de fisiología de la lámina para marcar las neuronas del adBNST que se proyectan al LH. Se realizaron registros de pinzamiento zonal en las neuronas del BNST que expresan GFP después de identificar visualmente la expresión de GFP en células individuales.

Construcción e implantación del microdisco

Los microdiscos a medida con ocho estereotrodos rodeando a una cánula de fibra óptica (0,22 NA, 200 μm de diámetro Doric Lenses) se construyeron en base a placas de interfaz (EIB-16; Neuralynx; Bozeman, MT, EE.UU.) conectadas a una plataforma de teflón (modificada de Adhikari *et al.*, 2011⁷). Los estereotrodos se construyeron con microhilos de tungsteno recubiertos con Formvar 25 mM (M165260; California Fine Wire; Grover Beach, CA, EE.UU.) Y se aseguraron a una cánula conectada a la placa de interfaz. Una cánula de fibra óptica se fijó a la placa de interfaz y se pegó a los microhilos de tal manera que los microhilos sobresalían aproximadamente 0,5 mm de la punta de la fibra óptica. Toda la plataforma se fijó a los manguitos de teflón a través de tres tornillos para máquinas finas (SHCX-080-6; Small Parts; Miramar, FL, EE.UU.), permitiendo que la plataforma avance girando los tornillos en los manguitos. Para la implantación se implantaron tornillos adicionales en las porciones posterior y anterior del cráneo para servir como soporte físico y de suelo, respectivamente. Después de colocar cuidadosamente el microdisco en el BNST, los manguitos de teflón se fijaron al cráneo con cemento (Grip Dental Cement; Dentsply, York, PA, EE. UU.) y el tornillo de puesta a tierra estaba conectado a la placa de interfaz.

Grabaciones *in vivo* de una sola unidad

Se permitió que los animales se recuperaran durante al menos una semana y, a continuación, se les restringió el alimento al 85 % del peso corporal. Durante la restricción de alimentos, los animales se familiarizaron con la configuración de la grabación y la manipulación fijándolos al escenario principal en sus jaulas. Para la grabación *in vivo* se eligió el EPM en lugar de la OFT, porque tiene límites bien definidos entre las áreas más ansiogénicas (brazos abiertos) y las áreas seguras (brazos cerrados). Además, normalmente, los ratones exploran todo el EPM, mientras que la mayor parte del área del centro de la OFT no se visita. Esto aumenta la precisión en la estimación de las velocidades de disparo en cada brazo del EPM. Como ensayo independiente de ansiedad, la prueba de la caja de luz y oscuridad se realizó en una arena de plástico gris hecha a medida (50 x 25 cm) consistente en compartimentos claros y oscuros durante 15 minutos. Se colocó a los ratones en el compartimento oscuro al comienzo del experimento.

Se hicieron avanzar los estereotrodos hasta que al menos cuatro unidades individuales bien aisladas pudieran registrarse en el BNST. La activación o inhibición de las fibras de la BLA que expresan ChR2 o eNpHR3.0 aumentaron o disminuyeron, respectivamente, la actividad en el área registrada. Esto indica que el registro estaba en el adBNST, ya que no se espera que el suministro de luz cambie la actividad en el ovBNST que carece de fibras de la BLA.

Además, las lesiones eléctricas hechas para marcar la punta de los electrodos solo se observaron en el adBNST (**Figura 2**). Los registros se obtuvieron a través de un preamplificador en el escenario principal de ganancia unitaria (HS-16; Neuralynx; Bozeman, MT, EE.UU.) fijado a un cable de alambre fino. Las espigas superiores a 40 μV se filtraron con paso de banda (600-6.000 Hz) y se registraron a 32 kHz. Los datos de las espigas se adquirieron con el software de adquisición de datos Cheetah (Neuralynx). La posición del animal se obtuvo mediante el seguimiento de vídeo por encima de la cabeza (30 Hz) de dos diodos emisores de luz fijados al escenario principal.

Clasificación y análisis de las espigas de una sola unidad

Los datos se importaron a Matlab para su análisis mediante software escrito a medida. La agrupación de las espigas se realizó sin conexión manualmente con SpikeSort 3D (Neuralynx). Para clasificar la respuesta *in vivo* de unidades individuales del adBNST a la estimulación de terminales de la BLA que expresan ChR2, los inventores registraron respuestas en 400 presentaciones de un impulso de luz azul de 5 ms. Las velocidades de disparo se analizaron en un periodo de 100 ms centrada en el inicio del impulso láser (-50 a 50 ms, con el impulso a 0 ms). Si las velocidades de disparo con puntuación *z* fueron significativamente diferentes entre el valor basal (de -50 a 0 ms) y después del impulso (de 0 a 35 ms), las unidades se clasificaron como "sensibles" al impulso. Entre las "unidades receptivas", si la velocidad de disparo media con puntuación *z* fue mayor después del impulso, las unidades se clasificaron como "significativamente excitadas". De otro modo, se clasificaron como inhibidas. Las unidades excitadas se dividieron además en unidades que exhiben "solo respuestas transitorias" (velocidades de disparo de 0 a 10 ms significativamente más altas que las basales y las tasas de 10 a 35 ms no significativamente diferentes de las basales) o unidades que exhiben "respuestas transitorias y sostenidas" (tasas de 0 a 35 ms después del inicio son significativamente más altas que las tasas basales). La actividad persistente de múltiples unidades se definió como velocidades de disparo (medidas como puntuaciones *z*) significativamente más altas en los segundos 30 a 40 en comparación con los valores basales (segundos -30 a 0). La prueba de suma de rangos de Wilcoxon se utilizó para comparar las respuestas al impulso láser.

Cálculo de la puntuación del EPM

Solo se usaron datos de ratones que exploraron todos los brazos del laberinto. Las puntuaciones de **EPM** se calcularon para cuantificar el grado en que las unidades individuales pueden diferenciar consistentemente la estructura del brazo abierto frente a la del brazo cerrado del laberinto. Las puntuaciones de **EPM** se calcularon mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Puntuación} = (A - B) / (A + B),$$

donde

$$A = 0,25 \times (|FL - FU| + |FL - FD| + |FR - FU| + |FR - FD|)$$

y

$$B = 0,5 \times (|FL - FR| + |FU - FD|).$$

FL, FR, Fu y Fp son el % de diferencia de la velocidad de disparo media en los brazos de la izquierda, derecha, arriba y abajo, respectivamente. "A" es la diferencia media en la velocidad de disparo normalizada entre brazos de diferentes tipos, mientras que "B" es la diferencia media para brazos del mismo tipo. Aunque los inventores usaron tasas en cada ubicación como el "% de cambio respecto a la velocidad de disparo media", también se pudo usar el "incremento con respecto a la velocidad de disparo media", dado que esta elección no afecta a la puntuación final del **EPM**. Las células con patrones de disparo relacionados con la tarea tienen velocidades de disparo similares en brazos del mismo tipo (lo que resulta en una B pequeña) y grandes diferencias en las tasas entre brazos de tipos diferentes (lo que resulta en un valor grande para A). De manera importante, se asignaría una puntuación positiva tanto a una célula que dispara selectivamente en ambos brazos abiertos, como a una célula que dispara selectivamente en ambos brazos cerrados. La puntuación máxima de 1,0 indica que no hay diferencia en las velocidades de disparo en los brazos del mismo tipo ($B = 0$). Por otro lado, se asignaría una puntuación de cero a la célula que tiene la misma velocidad de disparo en todos los brazos del laberinto. Finalmente, las puntuaciones negativas indican que las velocidades de disparo son más similares en los brazos de tipos diferentes que en los brazos del mismo tipo (por ejemplo, la célula que tiene velocidades de disparo altas selectivamente en un solo brazo cerrado y un brazo abierto).

Para calcular las puntuaciones del EPM durante el periodo de luz APAGADA, todas las espigas de una sola unidad dada durante los 10 periodos de luz APAGADA se agruparon. Cada periodo tiene 60 segundos (véase la **Figura 22e**). El número total de espigas en el periodo de APAGADO dividido por el número total de segundos en el periodo de APAGADO (60 segundos/periodos $\times$ 10 periodos = 600 segundos) dio la velocidad de disparo media en el periodo de

APAGADO. Las velocidades de disparo en cada brazo se calcularon como el % de cambio de esta velocidad de disparo media en APAGADO. Estas velocidades de disparo se usaron para calcular las puntuaciones de APAGADO en el EPM, como se muestra en la fórmula anterior.

- 5 De manera análoga, para calcular las puntuaciones del EPM durante el periodo de luz ENCENDIDA, todas las espigas de una sola unidad dada que ocurrieron en el periodo de ENCENDIDO se agruparon para calcular la velocidad de disparo media de ENCENDIDO. Obsérvese que la actividad de formación de espigas en el periodo de APAGADO no tiene influencia en el cálculo de la velocidad de disparo media o la velocidad de disparo en un brazo específico en el periodo de ENCENDIDO. Los esquemas que se muestran en las Tablas 1 y 2 ilustran paso a paso cómo calcular las puntuaciones del EPM durante los periodos de luz ENCENDIDA y APAGADA a partir de datos no procesados.

Tabla 1
Periodo de luz APAGADA

Localización	n.º de espigas	n.º de segundos	Velocidad (Hz)	Tasa (% de cambio de la media)
Brazo arriba (brazo abierto 1)	40	70	40/70=0,57	$F_U = 100 \times ((0,57-0,687/0,87) F_U = -34$
Brazo abajo (brazo abierto 2)	30	76	0,39	$F_D = -55$
Brazo izquierdo (brazo cerrado 1)	209	191	1,09	$F_L = +25$
Brazo derecho (brazo cerrado 2)	215	217	0,99	$F_R = +13$
Centro	30	46	0,65	$F_C = -25$

Número total de espigas = 40 + 30 + 209 + 215 + 30

Número total de espigas = 524

Número total de segundos = 70 + 76 + 191 + 217 + 46

Número total de segundos = 600

Tasa media = 524/600 = 0,87 Hz

Puntuación EPM = (A-B)/(A + B),

donde

$A = 0,25 \times (|F_L - F_U| + |F_L - F_D| + |F_R - F_U| + |F_R - F_D|)$

y

$B = 0,5 \times (|F_L - F_R| + |F_U - F_D|)$

A = 64 y B = 16

Puntuación EPM (luz APAGADA) = 0,60

Tabla 2
Periodo de luz ENCENDIDA

Localización	n.º de espigas	n.º de segundos	Velocidad (Hz)	Tasa (% de cambio de la media)
Brazo arriba (brazo abierto 1)	20	50	20/50=0,4	$F_U = 11 \times ((0,4-0,62)/0,62) F_U = -35$
Brazo abajo (brazo abierto 2)	36	80	0,45	$F_D = -27$
Brazo izquierdo (brazo cerrado 1)	157	219	0,72	$F_L = +15$
Brazo derecho (brazo cerrado 2)	112	197	0,56	$F_R = -8$
Centro	48	54	0,88	$F_C = 42$

Número total de espigas = 373

Número total de segundos = 600

Tasa media = 373/600 = 0,62

Puntuación EPM = (A-B)/(A + B),

donde

$$A = 0,25 \times (|F_L - F_U| + |F_L - F_D| + |F_R - F_U| + |F_R - F_D|)$$

y

$$B = 0,5 \times (|F_L - F_R| + |F_U - F_D|)$$

A = 35 y B = 16

Puntuación EPM (luz ENCENDIDA) = 0,37

Cálculo de puntuaciones EPM con datos simulados

Para calcular si la población de puntuaciones EPM observadas experimentalmente era significativamente diferente de lo esperado por casualidad, se generó una distribución simulada de las puntuaciones. Para cada unidad con n espigas, se generaron 500 puntuaciones simuladas calculando la puntuación EPM de n marcas de tiempo elegidas al azar 500 veces. Esto generó una distribución con 500 x 38 puntuaciones de EPM simuladas. Entre estas 19000 puntuaciones de EPM simuladas, 12730 (67 %) valores fueron negativos. La población de puntuaciones simuladas positivas (33 %) se dividió de manera casi perfecta entre las células preferidas de brazo cerrado y abierto (valores 3129 y 3141, respectivamente). La importancia de la población de las puntuaciones EPM observadas experimentalmente de todas las células se calculó en comparación con la distribución simulada de puntuaciones usando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

Verificación histológica y microscopia confocal

Se anestesió a los ratones profundamente y se perfundieron transcardialmente con paraformaldehído al 4 % (PFA) helado en PBS (pH 7,4). Los cerebros se fijaron durante la noche en solución de PFA al 4 % y luego se equilibraron en sacarosa al 30 % en PBS. Después de sumergir los cerebros en la solución de sacarosa, se cortaron láminas coronales de 40 µm de grosor en un microtomo de congelación. La colocación de la cánula guía, la fibra óptica y las matrices de estereotrodo fueron fácilmente visibles después del corte (**Figuras 1-3**). Las láminas se almacenaron en una solución crioprotectora (una mezcla 5:6:9 de glicerol, etilenglicol y PBS) a 4 °C hasta su posterior procesamiento. Las secciones flotantes libres se lavaron en PBS, se incubaron durante 25 minutos en una solución DAPI 1: 50.000, se lavaron nuevamente en PBS y montaron en portaobjetos de microscopio con PVD-DABCO. Se obtuvieron imágenes confocales en un microscopio láser de barrido Leica TCS SP5 utilizando un objetivo de inmersión en aceite 20X/0,70 NA o 40X/1,25 NA. Las imágenes se analizaron con el software Leica Microsystems LAS AF.

Imágenes y análisis de calcio

Se prepararon láminas cerebrales coronales que incluían el BNST de ratones jóvenes (n= 4 láminas, P8-P10, 300 µm de espesor) y se tiñeron con Oregon Green Bapta-1 AM (OGB). En resumen, se cortaron láminas en un vibratomo en LCRa helado (en mM: 110 de cloruro de colina, 25 de NaHCO₃, 10 de D-glucosa, 7 de MgCl₂ 3,1 de piruvato de sodio, 2,5 de KCl, 1,25 de NaH₂PO₄, 0,5 de CaCl₂), y se transfirieron inmediatamente para recuperar una solución de LCRa (en mM: 125 de NaCl, 26 de NaHCO₃, 10 de D-glucosa, 3 de KCl, 2,5 de MgCl₂, 1,6 de CaCl₂, 1,25 de NaH₂PO₄) a temperatura ambiente durante una hora. Después, las láminas se trasladaron a una cámara de incubación a 32 °C que contenía 2,5 ml de ACSF de recuperación. Se aplicaron directamente 10 µl de solución de OGB (50 µg de OGB disuelto en 9 µl de DMSO y 1 µl de ácido plurónico al 20 % en DMSO) a las láminas. Después de 20-25 minutos de incubación en solución de OGB, las láminas se movieron a LCRa experimental (en mM: 125 de NaCl, 26 de NaHCO₃, 10 de D-glucosa, 3 de KCl, 1,5 de MgCl₂, 1,6 de CaCl₂, 1,25 de NaH₂PO₄) a temperatura ambiente. Después de una hora, comenzó la sesión de obtención de imágenes. Las imágenes se adquirieron usando un microscopio de epifluorescencia y una cámara CCD (50 ms de tiempo de integración, -400 marcos por prueba a -4 Hz). En una prueba de estimulación, se aplicó un impulso de corriente de 0,2 ms a un electrodo bipolar colocado en la lámina del adBNST y dentro del campo de visión del microscopio. Para un conjunto de condiciones de estimulación, la amplitud del impulso de la corriente se varió entre ensayos en orden creciente o decreciente en pasos de 10 µA entre 10 y 50 µA. Después, se aplicó APV 100 µM al baño de perfusión y se repitió el experimento de estimulación. Después, se aplicó NBQX 10 µM al baño (mientras se mantenía la concentración de APV) y la estimulación se repitió nuevamente. Para el análisis de las películas de fluorescencia OGB, se dibujaron regiones de interés (ROI) alrededor de cada célula y alrededor del neuropilo utilizando un procedimiento semiautomático. Los píxeles dentro de cada ROI se promediaron para cada marco y se generó una serie de tiempo para cada célula. Para corregir el fotoblanqueo del fluoróforo se realizó un ajuste biexponencial a la serie de tiempo de referencia de cada célula (antes de la estimulación), suponiendo una disminución del valor mínimo de fluorescencia de la célula y la curva ajustada se restó de la serie temporal de la célula. Se sustrajo una serie temporal escalada del neuropilo de la serie temporal de cada célula para eliminar los acontecimientos globales (la escala se determinó por la diferencia de mínimos cuadrados entre la serie temporal del neuropilo y cada célula). El cambio en la fluorescencia respecto al valor basal se calculó para cada célula para cada ensayo ($AF/F = (F_1 - F)/F$, donde F_1 es la fluorescencia instantánea y F es la fluorescencia media durante el momento basal). Se calculó una puntuación z para cada serie de tiempo basada en la desviación estándar y la media del valor basal (de -40 a 0 s en relación con la estimulación). La actividad estadísticamente significativa en una neurona se definió como cualquier modulación que ocurriera al menos 5 segundos después de la estimulación eléctrica (porque

las respuestas de los neuropilos decayeron de nuevo al valor basal durante aproximadamente 5 segundos) y que excedió la puntuación z de 3,43 ($p < 0,05$; Corrección de Bonferroni).

Estadística

Todos los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism (software GraphPad; La Jolla, CA, Estados Unidos). Para datos de EPM y OFT, se utilizaron medidas repetidas de ANOVA bidireccional, seguido de pruebas post-hoc corregidas por Bonferroni. Los valores de P en el texto principal indican los valores de p para la interacción entre el tratamiento con opsina y los periodos, y los asteriscos (*) en las figuras indican los valores de p para la prueba post-hoc en el periodo dado. Para las comparaciones de dos muestras de una sola variable (como el % de cambio de la frecuencia respiratoria de grupos experimentales y controles o latencias de inicio de EPSC e IPSC), e utilizó la prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon. Todas las pruebas fueron de dos colas y tuvieron un nivel alfa de 0,05. Se usaron correlaciones de Spearman en lugar de la correlación de Pearson porque la correlación de Spearman no es paramétrica, es menos sensible a los valores atípicos y es capaz de detectar cualquier relación monotónica entre dos variables. Los errores estándar de las medias (s.e.m.) se representaron en gráficos para mostrar la precisión de la estimación de la media de la población.

YFP

La secuencia de aminoácidos de YFP en las construcciones fue:

VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLP
VPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEV
KFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIE
DGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYSYQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGIT
LGMDELYK (SEQ ID NO:28)

RESULTADOS

Las pruebas de los estudios anatómicos, de comportamiento y de neuroimagen han implicado al BNST en la ansiedad patológica y adaptativa; por ejemplo, se ha notificado que las lesiones del BNST dorsal, en adelante denominado BNST, disminuyen el comportamiento de tipo ansiedad. Para analizar adicionalmente este hallazgo, los inventores infundieron antagonistas del receptor de glutamato en el BNST antes de la prueba del laberinto en cruz elevado (EPM) (**Figura 4a**; histología en las **Figuras 1-3**). Esta intervención aumentó la exploración en el brazo abierto ($p < 0,01$, véase el análisis estadístico; **Figura 4a**) sin alterar la locomoción (**Figura 5**; se piensa que dicha exploración alimentada de los espacios abiertos, a los que los ratones muestran una aversión innata, representa un comportamiento de tipo ansiedad reducida). A continuación, los inventores inhibieron optogenéticamente el BNST usando la halorhodopsina inhibidora eNpHR3.0 y el suministro de luz amarilla al BNST (somas eNpHR3.0:BNST; **Figura 4b**); se observó una exploración aumentada de los espacios abiertos en el EPM y OFT (**Figura 4b**; **Figuras 6a y 6b**), lo indica ansiolisis. Por el contrario, la estimulación de los somas del BNST con canalrodopsina excitatoria ChR2 aumentó las medidas conductuales de ansiedad en ambos ensayos (ChR2: somas del BNST; **Figura 7**). Para comprobar si esta manipulación modula las manifestaciones fisiológicas de la ansiedad, los inventores estimularon los somas del BNST mientras se monitorizaba la frecuencia respiratoria; la hiperventilación está relacionada con un aumento de la ansiedad en seres humanos y roedores (**Figura 8**) y se sabe que el BNST se proyecta a los centros respiratorios. De hecho, se observó un aumento de la frecuencia respiratoria (**Figura 7d**). Juntos, estos resultados sugieren que la actividad en el BNST conduce a un estado similar a la ansiedad, consistente con la mayoría de los estudios previos.

Figura 1. Se indica la colocación unilateral (izquierda) de las puntas de fibra óptica para ChR2: somas del BNST y los controles eYFP (cian y gris, respectivamente). Las ubicaciones de las puntas de las cánulas guía se indican en rojo. Todas las cirugías unilaterales se equilibraron para el hemisferio. Se indica las colocaciones bilaterales (derecha) de las puntas de fibra óptica para los ratones eNpHR3.0: somas del BNST y los controles eYFP (naranja y negro, respectivamente). Los números indican las coordenadas anteroposteriores del bregma.

Figura 2. Se indica las colocaciones unilaterales (izquierda) de las puntas de fibra óptica para ratones ChR2:BLA-adBNST y los controles eYFP (cian y gris, respectivamente). Las puntas de las matrices de estereotrodos para el registro *in vivo* se indican en rojo. Todas las cirugías unilaterales se equilibraron para el hemisferio. Se indican las colocaciones bilaterales (derecha) de las puntas de fibra óptica para los ratones eNpHR3.0:BLA-adBNST y los controles (amarillo y negro, respectivamente). Los números indican las coordenadas anteroposteriores del bregma.

Figura 3. Se indican las colocaciones unilaterales (izquierda) de la fibra óptica para ratones ChR2:adBNST-LH y los controles eYFP (azul y gris, respectivamente). Todas las cirugías unilaterales se equilibraron para el hemisferio. Se

indica las colocaciones bilaterales (**derecha**) de las puntas de fibra óptica para los ratones eNpHR3.0:ovBNST y los controles eYFP (símbolos amarillo y negro, respectivamente). Los números indican las coordenadas anteroposteriores del bregma.

- 5 **Figuras 4a-h. Heterogeneidad funcional dentro del BNST dorsal.** (a) Cánula para la infusión de fármaco; NBQX + D-APV aumentó el tiempo de brazo abierto en el EPM ($n = 5$ para cada uno). (b) Se implantó a los ratones de somas eNpHR3.0:BNST bilateralmente la fibra óptica encima del BNST. La luz aumentó el tiempo del brazo abierto en el EPM ($n=8$ eNpHR3.0, $n=7$ eYFP). (c) Los ratones eNpHR3.0:ovBNST recibieron luz bilateral. La expresión restringida a ovBNST se obtuvo con eNpHR3.0-AAV dependiente de Cre en ratones DIR-Cre. (d) El suministro de luz a ovBNST de ratones eNpHR3.0:ovBNST aumentaron el tiempo de brazo abierto en el EPM ($n = 7$ eNpHR3.0, $n=8$ eYFP) y (e) disminuyó la frecuencia respiratoria ($n = 7$ eNpHR3.0, $n=8$ eYFP). (f) Los ratones eNpHR3.0:BLA-adBNST que expresan eNpHR3.0 en la BLA recibieron iluminación bilateral de fibras de la BLA en el adBNST. (g) La luz en los ratones eNpHR3.0:BLA-adBNST redujo el tiempo de brazo abierto ($n = 11$ eNpHR3.0, $n=15$ eYFP) y (h) aumentó la frecuencia respiratoria ($n = 8$ eNpHR3.0, $n=8$ eYFP). Escala: 200 pm. Se muestran las medias s.e.m.; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Estadísticas. Figura 4a. $n = 5$ para cada grupo. $p < 0,01$. Prueba de la suma de rangos de Wilcoxon. Figura 4b. $n = 8$ para el grupo de somas eNpHR3.0:BNST, $n = 8$ para el grupo de somas eYFP:BNST. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{2,28} = 10,74$, $p < 0,001$. Dos grupos mostraron diferencias significativas en el periodo de luz encendida: $p < 0,05$, prueba t post-hoc de Bonferroni. Figura 4d. $n = 7$ para el grupo eNpHR3.0:ovBNST, $n = 8$ para el grupo eYFP:ovBNST. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{2,26} = 14,66$, $p < 0,0001$. Dos grupos mostraron diferencias significativas en el periodo de luz encendida: $p < 0,01$, prueba t post-hoc de Bonferroni. Figura 4e. $n = 7$ para el grupo eNpHR3.0:ovBNST, $n = 8$ para el grupo eYFP:ovBNST. $p < 0,05$. Prueba de la suma de rangos de Wilcoxon. Figura 4g. $n = 11$ para el grupo eNpHR3.0:BLA-adBNST, $n = 15$ para el grupo eYFP:BLA-adBNST. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{2,48} = 5,58$, $p < 0,01$. Dos grupos mostraron diferencias significativas en el periodo de luz encendida: $p < 0,01$, prueba t post-hoc de Bonferroni. Figura 4h. $n = 8$ para el grupo eNpHR3.0:BLA-adBNST, $n = 8$ para el grupo eYFP:BLA-adBNST. $p < 0,01$. Prueba de la suma de rangos de Wilcoxon.

- 30 **Figuras 5a-j.** La actividad locomotora no se alteró por ninguna de las manipulaciones realizadas. (a) Infundir localmente NBQX y APV en el BNST ($n = 5$ para exp., $n = 5$ para los controles; $p > 0,05$), (b) inhibir los somas del BNST ($n = 10$ para exp.; $n = 11$ para los controles; $p > 0,05$), (c) estimular los somas del BNST ($n = 6$ para exp.; $n = 6$ para los controles; $p > 0,05$), (d) inhibir el ovBNST ($n = 8$ para exp.; $n = 8$ para los controles; $p > 0,05$), (e) estimular el ovBNST ($n = 7$ para exp.; $n = 7$ para los controles; $p > 0,05$), (f) inhibir las fibras de la BLA en el adBNST ($n = 11$ para exp.; $n = 11$ para los controles; $p > 0,05$), (g) estimular las fibras de la BLA en el adBNST ($n = 8$ para exp.; $n = 8$ para los controles; $p > 0,05$), (h) estimular las fibras del adBNST en el LH ($n = 11$ para exp.; $n = 8$ para los controles; $p > 0,05$), (i) estimular las fibras de la BLA en el PB ($n = 8$ para exp.; $n = 7$ para los controles; $p > 0,05$) o a) estimular las fibras del adBNST en el VTA ($n = 8$ para exp.; $n = 7$ para los controles; $p > 0,05$) no tuvo un efecto detectable sobre la velocidad media de locomoción. Los valores son la media $\pm$ s.e.m.

- 45 **Figuras 6a-f.** Heterogeneidad funcional en el BNST en los paradigmas de ansiedad. La luz amarilla en los ratones somas eNpHR3.0:BNST aumentó el tiempo central en la OFT (a) y la probabilidad de entrada en el brazo abierto en el EPM (b). La luz amarilla en ratones eNpHR3.0:ovBNST aumentó el tiempo central en la OFT (c) y la probabilidad de entrada en el brazo abierto en el EPM (d). La luz amarilla en ratones eNpHR3.0:adBNST aumentó el tiempo central en la OFT (e) y la probabilidad de entrada en el brazo abierto en el EPM (f). Los valores son la media $\pm$ s.e.m. *, ** y *** indican $p < 0,05$, $0,01$ y $0,001$, respectivamente. Los datos en esta figura representan resultados de comportamiento adicionales de las mismas cohortes que se muestran en la Fig. 4.

- 50 **Figura 6 Estadística. Fig. 6a.** $n = 10$ para el grupo de somas eNpHR3.0:BNST, $n = 11$ para el grupo de somas eYFP:BNST. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional no detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz. **(Recuadro)** Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{1,13} = 8,34$, $p < 0,05$. Dos grupos mostraron una diferencia significativa en el periodo de luz encendida: $p < 0,05$, prueba t post-hoc de Bonferroni. **Fig. 6b.** $n = 10$ para el grupo de somas eNpHR3.0:BNST, $n = 11$ para el grupo de somas eYFP:BNST. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{2,26} = 4,70$, $p < 0,05$. Dos grupos mostraron una diferencia significativa en el periodo de luz encendida: $p < 0,05$, prueba t post-hoc de Bonferroni. **Fig. 6c.** $n = 7$ para el grupo eNpHR3.0:ovBNST, $n = 8$ para el grupo eYFP:ovBNST. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{3,42} = 7,93$, $p < 0,001$. **(Recuadro)** Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{1,14} = 31,03$, $p < 0,05$. Dos grupos mostraron una diferencia significativa en el periodo de luz encendida: $p < 0,05$, prueba t post-hoc de Bonferroni. **Fig. 6d.** $n = 7$ para el grupo eNpHR3.0:ovBNST, $n = 8$ para el grupo eYFP:ovBNST. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{2,26} = 6,67$, $p < 0,01$. Dos grupos mostraron una diferencia significativa en el periodo de luz encendida: $p < 0,01$, prueba t post-hoc de Bonferroni. **Fig. 6e.** $n = 13$ para el grupo eNpHR3.0:BLA-adBNST, $n = 15$ para el grupo eYFP:BLA-adBNST. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{3,78} = 4,35$, $p < 0,01$.

(Recuadro) Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{1,26} = 12,56$, $p < 0,01$. Dos grupos mostraron una diferencia significativa en el periodo de luz encendida: $p < 0,05$, prueba t post-hoc de Bonferroni. **Fig. 6f.** $n = 13$ para el grupo eNpHR3.0:BLA-adBNST, $n = 15$ para el grupo eYFP:BLA-adBNST. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{2,48} = 6,24$, $p < 0,01$. Dos grupos mostraron una diferencia significativa en el periodo de luz encendida: $p < 0,001$, prueba t post-hoc de Bonferroni.

Figuras 7a-f. La estimulación optogenética de los somas del BNST aumenta el comportamiento relacionado con la ansiedad. **(a)** Los ratones de 6-8 semanas de edad recibieron una inyección unilateral de 0,5 μ l de AAV5:hSyn::ChR2-eYFP (ChR2: somas BNST; $n = 6$) o AAV5:hSyn::eYFP (somas eYFP:BNST; $n = 6$) en el BNST y se implantó la fibra óptica directamente encima del BNST. Los ensayos de comportamiento se realizaron 4 semanas después de la inyección. La imagen confocal muestra la expresión de ChR2-eYFP en cuerpos celulares del BNST (objetivo 40X, 3X Zoom óptico, plano único). **(b)** Los ratones se introdujeron en el laberinto en cruz elevado más para una sesión de 15 minutos, que consiste en periodos de 5 minutos de luz APAGADA/ENCENDIDA/APAGADA. El suministro de estimulación con luz azul durante el periodo ENCENDIDO (5 ms de ancho de impulso, 10 Hz) en el grupo de somas ChR2: BNST disminuyó el tiempo de brazo abierto y la probabilidad de entrada en el brazo abierto (recuadro) en relación con los controles eYFP ($F_{2,18} = 5,04$, $p < 0,05$; recuadro: **F2,18** = 3,94, $p < 0,05$). **(c)** Una semana después, se introdujo a los ratones en el campo abierto para una sesión de 20 minutos, consistente en periodos de 5 minutos de APAGAD/ENCENDIDO/APAGADO/ENCENDIDO. La estimulación con luz azul disminuyó el tiempo central en la OFT durante la luz en periodos en comparación con los controles eYFP (izquierda, $F_{3,30} = 3,89$, $p < 0,05$; derecha, $F_{1,10} = 16,02$, $p < 0,01$). **(d)** Una semana después, se midió la frecuencia respiratoria de los mismos ratones durante 6 minutos y se administró estimulación con luz durante los últimos 3 minutos. La estimulación con luz aumentó la frecuencia respiratoria ($p < 0,05$, prueba de rangos con signo de Wilcoxon). **(e-f)** Para comparar con **(a)**, se muestran imágenes de alta resolución de fibras de la BLA que expresan ChR2-eYFP en el adBNST **(e)** y fibras del adBNST que expresan ChR2-eYFP en el LH **(f)**. Para el análisis estadístico, se utilizaron medidas repetidas de ANOVA bidireccional, a menos que se indicara lo contrario. Los valores son la media $\pm$ s.e.m. * y ** indican $p < 0,05$ y $< 0,01$, respectivamente.

Figura 8. La frecuencia respiratoria aumenta en un ambiente ansiogénico. Se manipularon ratones intactos de 12-16 semanas de edad ($n = 7$) durante 3 días y se aclimataron al clip de collar utilizado para la medición de la frecuencia respiratoria. La frecuencia respiratoria se registró primero en la jaula o en el campo abierto durante 3 minutos (min). Los ratones recibieron 5 minutos de descanso en una nueva jaula limpia y luego se registraron en el otro ambiente durante 3 minutos. El orden de los registros se equilibró entre los animales. Tenga en cuenta que la frecuencia respiratoria se incrementó significativamente colocando a los animales en un aparato de campo abierto, en un ambiente ansiogénico, en comparación con los valores medidos en la jaula ($p < 0,05$, prueba de rangos con signo de Wilcoxon $0 > *$, $p < 0,05$).

Sin embargo, Es posible que estos resultados no proporcionen una imagen completa del BNST, que contiene múltiples subregiones. El núcleo oval del BNST (ovBNST) se tomó como objetivo mediante la introducción de un virus eNpHR3.0 dependiente de Cre en el BNST del receptor de dopamina de ratones la::Cre(Drdl a::Cre) que muestran expresión restringida de Cre en el ovBNST (eNpHR3.0: ovBNST; **Figura 4c**). El suministro de luz amarilla en ratones eNpHR3.0:ovBNST disminuyó la evitación de los brazos abiertos en el EPM ($p < 0,0001$; **Figura 4d**) y el centro de la OFT ($p < 0,001$; **Figura 6c**). La misma manipulación también disminuyó la frecuencia respiratoria ($p < 0,05$; **Figura 4e**). Por el contrario, la estimulación del ovBNST con ChR2 aumentó las medidas conductuales y fisiológicas de ansiedad (ChR2: ovBNST; **Figura 9**). Estos resultados sugirieron un papel ansiogénico para el ovBNST y fueron consistentes con los resultados obtenidos al modular todo el BNST (**Figuras 4a-c**).

A continuación, los autores investigaron la función de las entradas de la amígdala basolateral (BLA) al BNST, dado que la BLA es una región implicada en la ansiedad que proyecta al BNST. Los ratones que expresan eNpHR3.0-eYFP en las neuronas piramidales de la BLA exhibieron fibras eYFP+ que se proyectan a la región del BNST que rodea al ovBNST, que se denominará BNST anterodorsal o adBNST (eNpHR3.0: BLA-adBNST; **Figura 4f**). Sorprendentemente, la inhibición de la proyección BLA-adBNST aumentó la evitación de los brazos abiertos del EPM ($p < 0,01$; **Figura 4g**) y el centro de la OFT ($p < 0,01$; **Figura 6e**) y también aumentó la frecuencia respiratoria ($p < 0,01$; **Figura 4h**). Por el contrario, la estimulación de las entradas de la BLA con ChR2 (ChR2: BLA-adBNST; **Figura 10a**) disminuyó las medidas de ansiedad conductual (**Figura 10b**, **Figuras 11a**, **11b** y **12**) y la frecuencia respiratoria ($p < 0,05$; **Figura 10c**). Dado que se cree que la proyección de la BLA es excitadora, como se confirma a continuación, estos datos sugieren que el reclutamiento del adBNST es ansiolítico, en contraste con la naturaleza ansiogénica de la actividad del ovBNST. De manera importante, estos efectos no fueron atribuibles a la excitación de las fibras de la BLA en la comisura anterior (**Figura 13**). Como prueba adicional, considerando que una característica clínicamente relevante de la ansiólisis puede ser una valencia subjetiva positiva, los autores preguntaron si la estimulación de las proyecciones de BLA-adBNST podría provocar una valencia condicionante positiva (utilizando la tarea de preferencia de lugar en tiempo real; RTPP, véase Métodos), pero no observaron preferencia de lugar obtenida (**Figura 10d**).

Habiendo descubierto que la actividad del adBNST disminuye la evitación de espacios abiertos y frecuencia respiratoria, a continuación investigaron qué salidas del adBNST podrían mediar en estos efectos distintos. La proyección del adBNST al hipotálamo lateral (LH) fue un candidato para mediar en las disminuciones en la expresión conductual de ansiedad, dado que el LH recibe proyecciones del adBNST, pero no del ovBNST (**Figura 14a**) y se

requiere para el comportamiento normal en el EPM. De acuerdo con esta hipótesis, los autores descubrieron que las neuronas del adBNST que se proyectan hacia el LH reciben la entrada de la BLA (**Figuras 14b-d**) y que la estimulación de la proyección del adBNST-LH disminuyó la evitación de espacios abiertos tanto en el EPM ($p < 0,01$; **Figura 10f**) y la OFT ($p < 0,05$; **Figura 11c**). Sin embargo, no se observaron efectos sobre la frecuencia respiratoria (**Figura 10g**) o RTPP (**Figura 10h**), lo que sugiere que la vía del adBNST-LH modula selectivamente las características de comportamiento, pero no fisiológicas ni de apetito, de la ansiolisis.

Los inventores hipotizaron que la salida del adBNST al núcleo parabraquial (PB) podría mediar la disminución en la frecuencia respiratoria observada en ratones Chr2: BLA-adBNST (**Figura 10c**), ya que el PB modula la respiración^{2, 1726}. De hecho, en ratones Chr2:BNST-PB (**Figura 10i**), la luz azul disminuyó la frecuencia respiratoria ($p < 0,05$; **Figura 10k**). Además, la estimulación de la proyección del adBNST-PB, atenuó los incrementos de la frecuencia respiratoria en un ambiente ansiogénico (**Figura 15**), pero no cambió el comportamiento en el EPM o en el RTPP (**Figura 10j** y **10l**). Aunque tanto el adBNST como el ovBNST se proyectan al PB, la disminución de la frecuencia respiratoria en los ratones Chr2: BNST-PB probablemente fue impulsada por las fibras del adBNST-PB, dado que la actividad del ovBNST aumentó la frecuencia respiratoria (**Figura 4e**, **Figura 9**). Finalmente, los inventores probaron la salida del adBNST al área tegmentaria ventral (VTA). De manera destacable, los ratones Chr2:adBNST-VTA (**Figura 10m**) exhibieron RTPP en la cámara estimulada ($p < 0,001$; **Figura 10p**), sin afectar a la evitación de riesgos relacionados con la ansiedad (**Figura 10n**) o la frecuencia respiratoria (**Figura 10o**). Estos datos que muestran papeles complementarios de diferentes proyecciones del adBNST apoyan un modelo en el que las poblaciones de neuronas del adBNST se proyectan a distintas estructuras aguas abajo (LH, PB y VTA; **Figura 16**), modulando diferentes características de la ansiolisis.

Figuras 9a-d. La estimulación optogenética del ovBNST aumenta el comportamiento relacionado con la ansiedad. **Figura 9a** Los ratones Drdla-Cre de 6-8 semanas de edad recibieron una inyección unilateral de 0,5 μ l de AAV5:EF1 α ::DIO-ChR2-eYFP (Chr2:ovBNST; $n = 7$) o AAV5:EF1 α ::DIO-eYFP (eYFP:ovBNST; $n = 7$) en el ovBNST y se implantó la fibra óptica directamente encima del BNST. Los ensayos de comportamiento se realizaron 4 semanas después de la inyección. (b) Los ratones se introdujeron en el laberinto en cruz elevado más para una sesión de 15 minutos, consistente en tres periodos de 5 min de luz APAGADA/ENCENDIDA/APAGADA. El suministro de estimulación con luz azul durante el periodo ENCENDIDO (5 ms de ancho de impulso, 10 Hz) en el grupo de somas Chr2: BNST disminuyó el tiempo de brazo abierto y la probabilidad de entrada en el brazo abierto (recuadro) en relación con los controles eYFP ($F_{2,24} = 6,208$, $p < 0,05$; recuadro: $F_{2,24} = 4,078$, $p < 0,05$). (c) Una semana después, se introdujo a los ratones en el campo abierto para una sesión de 20 minutos, consistente en periodos de 5 minutos de APAGAD/ENCENDIDO/APAGADO/ENCENDIDO. La estimulación con luz azul disminuyó el tiempo central en la OFT durante los periodos de luz ENCENDIDA en comparación con los controles eYFP (izquierda, $F_{3,36} = 2,311$, $p = 0,927$; derecha, $F_{1,12} = 6,206$, $p < 0,05$). (d) Una semana después, se midió la frecuencia respiratoria de los mismos ratones durante 6 minutos y se administró la estimulación con luz durante los últimos 3 minutos. La estimulación con luz aumentó la frecuencia respiratoria ($p < 0,001$, prueba de rangos con signo de Wilcoxon). Los valores son $\pm$ s.e.m. *, ** y *** indican $p < 0,05$, $0,01$ y $0,001$, respectivamente.

Figuras 10a-p. Las distintas salidas de adBNST modulan diferentes características relacionadas con la ansiolisis. (a-d) Los ratones Chr2:BLA-adBNST se transdujeron en la BLA y se implantaron fibras unilaterales por encima de las fibras de la BLA en el adBNST. (a) La luz al adBNST aumentó el tiempo de brazo abierto en el EPM ($n = 11$ Chr2, $n = 12$ eYFP) (b) y disminuyó la frecuencia respiratoria ($n = 7$ Chr2, $n = 8$ eYFP) (c), pero no provocó preferencia de lugar ($n = 8$ Chr2, $n = 6$ eYFP) (d). (e-h) Los ratones Chr2:adBNST-LH se transdujeron en el BNST y se implantó la fibra óptica unilaterales por encima del LH (e). En ratones Chr2:adBNST-LH, la luz aumentó el tiempo del brazo abierto en el EPM ($n = 11$ Chr2, $n = 8$ eYFP) (f) pero no afectó a la frecuencia respiratoria ($n = 9$ Chr2, $n = 10$ eYFP) (g) o preferencia de lugar ($n = 7$ Chr2, $n = 7$ eYFP) (h). (i-l) Los ratones Chr2:BNST-PB se transdujeron en el BNST y se implantó la fibra óptica unilaterales en el PB (i). La luz en ratones Chr2: BNST-PB no influyó en el EPM ($n = 7$ Chr2, $n = 7$ eYFP) (j) pero disminuyó la frecuencia respiratoria ($n = 8$ Chr2, $n = 7$ eYFP) (k); no se observó ningún efecto sobre la preferencia de lugar ($n = 7$ Chr2, $n = 5$ eYFP) (l). (m-p) Los ratones Chr2: se transdujeron en el BNST y se implantó la fibra óptica unilaterales directamente por encima del VTA (m). La luz no afectó al EPM ($n = 7$ Chr2, $n = 7$ eYFP) (n) o la frecuencia respiratoria ($n = 8$ Chr2, $n = 7$ eYFP) (o), pero indujo una sólida preferencia de lugar ($n = 8$ Chr2, $n = 7$ eYFP) (p). Escala: 200 μ m. Medias s.e.m.; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Estadísticas. Figura 10b. $n = 11$ para el grupo Chr2:BLA-adBNST, $n = 12$ para el grupo eYFP:BLA-adBNST. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodos de luz: $F_{2,42} = 5,58$, $p < 0,01$. Dos grupos mostraron diferencias significativas en el periodo de luz encendida: $p < 0,01$, prueba t post-hoc de Bonferroni. Figura 10c. $n = 7$ para el grupo Chr2:BLA-adBNST, $n = 8$ para el grupo eYFP: BLA-adBNST. $p < 0,05$. Prueba de la suma de rangos de Wilcoxon. Figura 10d. $n = 8$ para el grupo Chr2:BLA-adBNST, $n = 6$ para el grupo eYFP:BLA-adBNST. $p > 0,05$. Prueba de la suma de rangos de Wilcoxon. Figura 10f. $n = 11$ para el grupo Chr2: adBNST-LH, $n = 8$ para el grupo eYFP:adBNST-LH. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodos de luz: $F_{2,34} = 8,51$, $p = 0,0010$. Dos grupos mostraron diferencias significativas en el periodo de luz encendida: $p < 0,001$, prueba t post-hoc de Bonferroni. Figura 10g. $n = 9$ para el grupo Chr2: adBNST-LH, $n = 10$ para el grupo eYFP:adBNST-LH. $p > 0,05$. Prueba de la suma de rangos de Wilcoxon. Figura 10h. $n = 7$ para el grupo Chr2: adBNST-LH, $n = 7$ para el grupo eYFP:adBNST-LH. $p > 0,05$. Prueba de la suma de rangos de Wilcoxon. Figura 10j. $n = 7$ para el grupo Chr2:BNST-PB, $n = 7$ para el grupo eYFP:BNST-PB. Las medidas

repetidas de ANOVA bidireccional no pudieron detectar una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $p > 0,05$. Figura 10k. $n = 8$ para el grupo Chr2:BNST-PB, $n = 7$ para el grupo eYFP:BNST-PB. $p < 0,05$. Prueba de la suma de rangos de Wilcoxon. Figura 10l. $n = 7$ para el grupo Chr2:BNST-PB, $n = 5$ para el grupo eYFP:BNST-PB. $p > 0,05$. Prueba de la suma de rangos de Wilcoxon. Figura 10m. $n = 7$ para el grupo Chr2:adBNST-VTA, $n = 7$ para el grupo eYFP:adBNST-VTA. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional no pudieron detectar una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $p > 0,05$. Figura 10o. $n = 8$ para el grupo Chr2:adBNST-VTA, $n = 7$ para el grupo eYFP:adBNST-VTA. $p > 0,05$. Prueba de la suma de rangos de Wilcoxon. Figura 10p. $n = 8$ para el grupo Chr2:adBNST-VTA, $n = 7$ para el grupo eYFP:adBNST-VTA. $p < 0,001$. Prueba de la suma de rangos de Wilcoxon.

Figura 11. La estimulación de la proyección del adBNST al LDH, pero no al PB o al VTA, es ansiolítica.

La luz azul en los ratones Chr2:BLA-adBNST aumentó el tiempo central en la OFT (a) y la probabilidad de entrada de brazo abierto en el EPM (b). La luz azul en ratones Chr2:adBNST-LH aumentó el tiempo central en la OFT (c) y la probabilidad de entrada en el brazo abierto en el EPM (d). La luz azul en ratones Chr2:BNST-PB no tuvo ningún efecto en el tiempo central en la OFT (e) y la probabilidad de entrada en el brazo abierto en el EPM (f). La luz azul en ratones Chr2:adBNST-VTA no tuvo ningún efecto en el tiempo central en la OFT (g) y la probabilidad de entrada en el brazo abierto en el EPM (h). Los valores son la media $\pm$ s.e.m. *, ** y ***, indican $p < 0,05$, $0,01$ y $0,001$, respectivamente. Análisis estadístico a continuación. Los datos en esta figura son resultados de comportamiento adicionales de las mismas cohortes que se muestran en la Fig. 10.

Estadísticas. Fig. 11a. $n = 11$ para el grupo Chr2:BLA-adBNST, $n = 11$ para el grupo eYFP:BLA-adBNST. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{3,60} = 2,89$, $p < 0,05$. Dos grupos mostraron diferencias significativas en el primer periodo de luz encendida: $p < 0,05$, prueba t post-hoc de Bonferroni. **(Recuadro)** Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{1,20} = 9,72$, $p < 0,01$. Dos grupos mostraron una diferencia significativa en el periodo de luz encendida: $p < 0,05$, prueba t post-hoc de Bonferroni. **Fig. 11b.** $n = 11$ para el grupo Chr2:BLA-adBNST, $n = 11$ para el grupo eYFP:BLA-adBNST. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{2,42} = 4,21$, $p < 0,05$. Dos grupos mostraron una diferencia significativa en el periodo de luz encendida: $p < 0,01$, prueba t post-hoc de Bonferroni. **Fig. 11c.** $n = 11$ para el grupo Chr2:adBNST-LH, $n = 8$ para el grupo eYFP:adBNST-LH. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional no detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz. **(Recuadro)** Sin embargo, cuando se promediaron los periodos de luz apagada y luz encendida, las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{1,17} = 5,59$, $p < 0,05$. Dos grupos mostraron una diferencia significativa en el periodo de luz encendida: $p < 0,001$, prueba t post-hoc de Bonferroni. **Fig. 11d.** $n = 11$ para el grupo Chr2:adBNST-LH, $n = 8$ para el grupo eYFP:adBNST-LH. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional detectaron una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $F_{2,34} = 4,41$, $p < 0,05$. Dos grupos mostraron una diferencia significativa en el periodo de luz encendida: $p < 0,001$, prueba t post-hoc de Bonferroni. **Fig. 11e.** $n = 7$ para el grupo Chr2:BNST-PB, $n = 7$ para el grupo eYFP:BNST-PB. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional no pudieron detectar una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $p > 0,05$. **(Recuadro)** Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional no pudieron detectar una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $p > 0,05$. **Fig. 11f.** $n = 7$ para el grupo Chr2:BNST-PB, $n = 7$ para el grupo eYFP:BNST-PB. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional no pudieron detectar una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $p > 0,05$. **Fig. 11g.** $n = 8$ para el grupo Chr2:adBNST-VTA, $n = 7$ para el grupo eYFP:adBNST-VTA. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional no pudieron detectar una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $p > 0,05$. **(Recuadro)** Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional no pudieron detectar una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $p > 0,05$. **Fig. 11h.** $n = 8$ para el grupo Chr2:adBNST-VTA, $n = 7$ para el grupo eYFP:adBNST-VTA. Las medidas repetidas de ANOVA bidireccional no pudieron detectar una interacción significativa del grupo x periodo de luz: $p > 0,05$.

Figura 12. La estimulación optogenética de la proyección del BLA-adBNST reduce el comportamiento relacionado con la ansiedad en el EPM en los primeros 5 minutos de exposición al EPM. Para demostrar que la estimulación optogenética de la proyección BLA-adBNST reduce el comportamiento similar a la ansiedad en la prueba del laberinto en cruz elevado de 5 minutos más utilizada, Se generó una cohorte separada de ratones Chr2:BLA-adBNST alojados en grupos. Los ratones de 6-8 semanas de edad recibieron una inyección unilateral de $0,5 \mu\text{l}$ de AAV5:CaMKII α :Chr2-eYFP (Chr2:BLA-adBNST; $n = 8$) o AAV5:CaMKII α :eYFP (eYFP:BLA-adBNST; $n = 6$) en la BLA y se implantó la fibra óptica directamente encima del BNST. Los ensayos de comportamiento se realizaron 8 semanas después de la inyección. (b) Los ratones se introdujeron en el laberinto en cruz elevado más para una sesión de 10 minutos, que consiste en periodos de 5 minutos de luz ENCENDIDA/APAGADA. El suministro de estimulación con luz azul durante el periodo ENCENDIDO (5 ms de ancho de impulso, 10 Hz) en el grupo Chr2:BLA-adBNST disminuyó el tiempo de brazo abierto en relación con los controles eYFP (medidas repetidas de ANOVA bidireccional, $F_{1,12} = 8,347$, $p < 0,05$; prueba t post-hoc de Bonferroni, $p < 0,05$ en el periodo de luz ENCENDIDA). Tenga en cuenta la presencia de un efecto ansiolítico en los primeros 5 minutos (periodo de ENCENDIDO). Los valores son la media $\pm$ s.e.m.

Figura 13. La estimulación de las fibras de LA BLA en la comisura anterior (aca) no afecta al comportamiento relacionado con la ansiedad. (a) Los ratones de 6-8 semanas de edad recibieron una inyección unilateral de $0,5 \mu\text{l}$ de AAV5:CaMKII α :hChr2(H134R)-eYFP (Chr2:BLA-aca; $n = 5$) o AAV5:CaMKII α :eYFP (eYFP:BLA-aca; $n = 5$) en la

BLA y se implantó la fibra óptica directamente encima del BNST. Los experimentos de comportamiento se realizaron 8 semanas después de la inyección. La imagen confocal muestra una expresión robusta de ChR2-eYFP en las fibras de la BLA que pasan a través de la comisura anterior. La estimulación con luz azul (5 ms de anchura del impulso, 10 Hz) en el grupo ChR2: BLA-aca ($n=5$) no afectó al tiempo del brazo abierto y la probabilidad de entrada en el brazo abierto en la prueba del laberinto en cruz elevado (sesión de 15 minutos dividida en periodos de 5 minutos de APAGADO/ENCENDIDO/APAGADO) (**b**), tiempo central (**c**) y actividad locomotora en la prueba de campo abierto (sesión de 20 minutos que consiste en periodos de 5 min de APAGADO/ENCENDIDO/APAGADO/ENCENDIDO) (**d**) durante periodos de luz ENCENDIDA. Todas las $p > 0,05$, medidas repetidas de ANOVA bidireccional. Los valores son la media $\pm$ s.e.m.

Figura 14. Las neuronas del adBNST que se proyectan al LH están invadas por terminales axónicos de la BLA. (a) Se inyectaron tres ratones de 6 semanas de edad en el LH con 0,5 μ l de virus del herpes simple (VHS), un virus de propagación retrógrada, que codifican GFP bajo el promotor de EF1 α (HSV:EF1 α ::GFP). 5 días después de la inyección, se perfundió a los ratones y se prepararon secciones coronales de 40 μ m que contenían el BNST para microscopia confocal. Las neuronas marcadas retrógradamente positivas para GFP se observaron solo en el adBNST, pero no en el ovBNST, en todos los ratones. La imagen confocal representativa muestra la proyección zmax de una sección de 12 μ m. Barra de escala, 200 μ m. (b) Se inyectó a tres ratones de 6 semanas de edad con 0,5 μ l de HSV:EF1 α ::GFP en el LH y con 0,5 μ l AAV5:CaMKII α ::ChR2-eYFP en la BLA. 3-5 días después de la inyección, se prepararon láminas agudas que contenían el BNST para el registro del pinzamiento zonal. (c) Las neuronas que expresan GFP en el adBNST se registraron durante la estimulación óptica de terminales de la BLA en el BNST. En la parte inferior se muestra la traza representativa del pinzamiento zonal de una neurona adFPST GFP (+) ($V_m = \sim -60$ mV). (d) La mayoría de las neuronas estaban excitadas al potencial de reposo en el modo de pinzamiento actual (8/9 neuronas). De manera destacable, cada neurona marcada mostró respuestas evocadas por la luz ($n=9$ neuronas adBNST).

Figura 15. El aumento de la frecuencia respiratoria en un ambiente ansiogénico se atenúa estimulando la proyección del BNST-PB. Los ratones de 10 semanas de edad recibieron una inyección unilateral de 0,5 μ l de AAV5:hSyn::ChR2-eYFP (ChR2:BNST-PB; $n=7$) o AAV5:hSyn::eYFP (eYFP:BNST-PB; $n=5$) en el BNST y se implantó la fibra óptica directamente encima del PB. El experimento comenzó 16 semanas después de la inyección. Los ratones se manipularon durante 3 días y se aclimataron al clip del collar para la medición de la frecuencia respiratoria. La frecuencia respiratoria se registró por primera vez en la jaula o en el campo abierto durante 3 minutos. A los ratones se les permitió descansar en una nueva jaula limpia durante 5 minutos y luego se registraron en el otro ambiente durante 3 minutos. Se administró estimulación con láser azul (5 ms de anchura de impulso, 10 Hz) en campo abierto. El orden de los ambientes de grabación se equilibró entre los animales. La frecuencia respiratoria se incrementó significativamente colocando a los animales en un campo abierto emparejado con estimulación de luz en ratones eYFP:BNST-PB en comparación con los valores medidos en la jaula. Este aumento se atenuó significativamente en ratones ChR2:BNST-PB ($p < 0,01$, prueba de suma de rangos de Wilcoxon), lo que indica que estimular la proyección BNST-PB es suficiente para reducir un aumento de la frecuencia respiratoria provocado por un estímulo ansiogénico.

Figura 16. Las subpoblaciones de neuronas adBNST se proyectan al LH, al PB y al VTA. (a-b) Para examinar el grado de superposición entre subpoblaciones de neuronas BNST que se proyectan al LH, el PB y el VTA, Se inyectaron 0,5 μ l de virus de la rabia que codifica eGFP (RV:eGFP) y tdTomato (RV:tdTomato) en las regiones indicadas de ratones de 6 semanas de edad. Cuatro días después de la inyección, se perfundieron ratones y se prepararon secciones coronales de 40 μ m para microscopia confocal. (a) Gráfico resumen del % de neuronas adBNST marcadas. La inyección de una mezcla de virus RV-eGFP y RV-tdTomato en el VTA produjo un 8,3 % de neuronas doblemente marcadas en la habénula (Hb). Sin embargo, inyectando RV:eGFP y RV:tdTomato en dos cualquiera del LH, el PB o el VTA se marcaron en conjunto muy pocas neuronas BNST (1,7 % para PB/LH, 0,5 % para VTA/LH, 0,0 % para VTA/PB). Todos los grupos mostraron una fracción significativamente menor de células comarcadas que el grupo de control positivo VTA-VTA ($p < 0,0001$), lo que sugiere que las subpoblaciones de neuronas adBNST que se proyectan al LH, el PB y el VTA no se superponen completamente. Los números indican recuentos celulares. (b) Imágenes representativas que muestran la expresión de fluoróforo en las regiones indicadas (verde: eGFP, rojo, tdTomato, amarillo: doble marcaje). (1), plano único; (2-4) proyecciones z-max de secciones de 20 μ m. Barra de escala, 100 μ m. Obsérvese que se puede encontrar otro control positivo que muestra que las neuronas pueden infectarse dos veces con estas mismas preparaciones de virus de la rabia en Lammel et al. Nature, 2012 Nov 8;491(7423):212-7 (2012). Análisis estadístico a continuación.

Figura 16 Estadística: La prueba de chi-cuadrado detectó diferencias significativas entre: (1)(2) ($X^2(1, n=347)=19,132$, $p < 0,0001$), (1)(3) ($X^2(1, n=376)=29,567$, $p < 0,0001$) y (1)(4) ($X^2(1, n=215)=17,287$, $p < 0,0001$).

A continuación, los autores investigaron el microcircuito intrínseco del adBNST. Para examinar la conectividad entre la BLA y el adBNST, en los ratones que expresan ChR2 en la BLA se implantó un microdisco que contenía estereotrodos que rodean una fibra óptica en el adBNST (**Figura 17a**, **Figura 18**), lo que permite la excitación y grabación simultánea en animales despiertos. Como cabía esperar, la excitación de los terminales glutamatérgicos de la BLA aumentó el enriquecimiento de las unidades individuales del adBNST (**Figuras 17b y 17c**), y los registros correspondientes de parches de células enteras de láminas agudas revelaron que el 84 % de las neuronas adBNST que exhiben EPSC e IPSC evocados en la fijación de voltaje (Métodos; **Figura 19**) mostraron excitación neta en

respuesta a la estimulación de entrada en la BLA en la fijación de corriente (**Figuras 17d-f**). Por tanto, la electrofisiología *in vivo* y *in vitro* fueron concordantes a la hora de demostrar que la estimulación de la proyección de BLA-adBNST aumenta la actividad del adBNST, que puede mejorarse mediante la excitación recurrente local de adBNST (**Figuras 19 y 20**). Asimismo, los autores caracterizaron las entradas locales al adBNST, registrando desde las neuronas adBNST mientras estimula ópticamente las entradas del ovBNST (**Figura 17 g**). Curiosamente, el 79 % de las neuronas mostraron inhibición neta (**Figuras 17h y 17i**), consistente con el hecho de que las neuronas ovBNST son principalmente GABAérgicas; por el contrario, los experimentos de rastreo retrógrado demostraron que el adBNST solo se proyecta débilmente hacia el ovBNST (**Figura 21**). Juntos, estos datos respaldan la conclusión de que ovBNST y adBNST exhiben funciones opuestas en la modulación de la ansiedad.

Figuras 17a-i. Evaluación electrofisiológica *in vivo* e *in vitro* de aferentes del adBNST. (a-f) Evaluación de las aferentes de la BLA al adBNST. (a) Se implantó a ratones Chr2 BLA-adBNST un microdisco que contenía 8 estereotrodos y una fibra óptica en adBNST para permitir la estimulación/grabación optogenética simultánea de neuronas adBNST. (b) PSTH representativas de unidades individuales de adBNST en ratones que se comportan, mostrando una respuesta típica al impulso de luz de 5 ms (arriba) y a un tren de impulsos de luz de 10 Hz durante 20 segundos (abajo). La excitación se observó con mayor frecuencia ($n=55$). (d) Chr2 se expresó en la BLA; se prepararon láminas agudas a partir de BNST, y las neuronas BNST se registraron en fijación de corriente mientras estimulaban ópticamente aferentes de la BLA. (e) Trazas representativas de las neuronas adBNST ($V_m = -60\text{mV}$), que muestran respuestas excitadoras (arriba) e inhibitorias (abajo). (f) Entre las neuronas adBNST que mostraron EPSC e IPSC, la mayoría estaban excitadas al potencial de reposo ($n=16/19$ neuronas; véase la **Figura 19** para ver la fijación de voltaje). (**g-i**) La conectividad funcional evaluada electrofisiológicamente de ovBNST a adBNST (**Figura 21**) ilustra una conectividad mínima en la dirección inversa. (**g**) Chr2 se expresó en ovBNST usando ratones de la línea Drdla-Cre; las neuronas adBNST se registraron mientras se estimulaban las fibras del ovBNST. (h) Trazas representativas de la fijación de la corriente de las neuronas adBNST ($V_m = -60\text{mV}$), que muestran respuestas excitadoras (arriba) e inhibitorias (abajo). (i) Entre las neuronas adBNST que mostraron EPSC e IPSC, la mayoría fueron inhibidas al potencial de reposo ($n=11/14$ neuronas). Medias s.e.m.; Estadísticas. Figura 3c. $n=55$ unidades individuales de adBNST. Figura 3f. $n=19$ neuronas adBNST. Figura 17i. $n=14$ neuronas adBNST.

Figura 18. Aislamiento de unidades individuales a través de estereotrodos. En los ratones se implantaron microdiscos que contenían 8 estereotrodos de tungsteno. (**a**) Ejemplos de espigas de dos unidades individuales de adBNST registradas simultáneamente por el mismo estereotrodo. (**b**) Diagrama de dispersión del pico en el electrodo 1 contra el pico en el electrodo 2. Las espigas de estas dos unidades individuales forman grupos bien aislados. Las espigas se ordenaron sin conexión utilizando el software SpikeSort3D (Neuralynx).

Figura 19. Evidencia de circuitos inhibitorios y excitadores de avance en el adBNST. Para examinar la conectividad entre la BLA y el BNST, (**a**) en ocho ratones de 4 semanas de edad se inyectaron 0,5 μl de AAV5:CaMKII α ::Chr2-eYFP en la BLA. 4 semanas después de la inyección, se prepararon láminas agudas que contenían fibras axónicas del BNST y la BLA para el registro del pinzamiento zonal de las láminas. Véase la **Fig. 3** para experimentos relacionados con fijación de corriente y registro *in vivo*. (**b**) Rastros representativos de fijación de voltaje de una neurona adBNST mantenida a 0 mV (arriba) y -70 mV (abajo), mostrando IPSC y EPSC en respuesta a impulsos de luz azul de 10 Hz de 5 ms. (**c**) La mayoría de las neuronas sensibles a la luz exhibieron EPSC e IPSC ($n=48$ neuronas adBNST). Es probable que estas IPSC no sean monosinápticas, sino que estén dirigidas indirectamente por neuronas adBNST locales, ya que: 1) los autores estimularon optogenéticamente una proyección excitatoria, 2) las EPSC tenían latencias más cortas que las IPSC ($p<0,001$; véase (d) a continuación), y 3) aplicación en baño de los antagonistas del receptor excitador de glutamato NBQX (2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxalina-2,3-diona) y APV (2R)-amino-5-fosfonopentanoato bloqueó tanto las EPSC como las IPSC, mientras que la aplicación en el baño del antagonista del receptor GABA A picrotoxina bloqueó solo las IPSC (véase (e, f) a continuación). (**d**) La latencia de inicio de las EPSC fue más corta que la de las IPSC ($n=14$ para las EPSC, $n=16$ para las IPSC. $p<0,001$, prueba de suma de rangos de Wilcoxon). (**e**) La aplicación en baño de 10 μM de NBQX y 50 μM de APV abolió tanto las IPSC como las EPSC ($n=4$) (arriba), mientras que (**f**) 100 μM de picrotoxina bloquearon las IPSC pero no las EPSC ($n=4$) (abajo). Rastros representativos de fijación de voltaje de neuronas adBNST mantenidas a -70 mV, que muestran un pico único (**g**) o picos dobles (**h**) en respuesta a un impulso de luz azul de 5 ms. (**i**) Resumen de las respuestas observadas en las neuronas adBNST que exhibieron EPSC ($n=31$). En cuatro ratones de 6 semanas de edad se inyectaron 0,5 μl de AAV5:CaMKII α ::Chr2-eYFP en la BLA y se implantaron un microdisco manejable que contenía 8 estereotrodos y una fibra óptica en el adBNST para permitir la estimulación optogenética simultánea y el registro de neuronas adBNST. Las PSTH representativas de los registros de una sola unidad del adBNST que muestran una mayor actividad bloqueada en el tiempo a un impulso láser de 5 ms (**j**) o actividad persistente incluso después del final del impulso láser (**k**). (**l**) Resumen de unidades individuales de adBNST que exhibieron respuestas excitatorias a la luz azul ($n=20$). Junto con los resultados de la Figura 3, estos datos demuestran que las neuronas adBNST reciben tanto entradas excitadoras directas como entradas inhibitorias indirectas de la BLA, pero la respuesta neta más común es la excitación.

Figura 20. La excitación recurrente puede permitir el reclutamiento coordinado de proyecciones posteriores de BNST. (**a-c**) Mismo experimento que la **Fig. 3a-c**. Los ratones Chr2:BLA-adBNST a los que se implantó con una matriz de estereotrodo de fibra óptica en el adBNST recibieron un tren de impulsos de luz de 10 Hz (anchura del impulso de 5 ms) durante un período de 30 s (parte inferior). El reclutamiento de diferentes poblaciones de neuronas de proyección

de adBNST podría involucrar excitación recurrente en el adBNST, consistente con los hallazgos de estas registros de múltiples unidades *in vivo*; se observó actividad persistente en el 28 % de los registros después del final de la estimulación con fibra de la BLA. Se muestran las PSTH representativas de los registros de múltiples unidades adBNST que muestran una mayor actividad bloqueada en el tiempo para un tren de impulsos láser. El ejemplo en (b) pero no en (a), exhibe actividad persistente incluso después del final de la estimulación con láser. (c) Resumen de registros de múltiples unidades de adBNST ($n=103$). (d) Para probar la actividad persistente en una lámina de BNST reducida, los autores realizaron imágenes de Ca^{2+} y encontraron actividad persistente en el segmento de adBNST después de un breve estímulo breve de 0,2 ms. Las neuronas adBNST cargadas con Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1) (imagen) se monitorizaron en respuesta a los niveles actuales variables de estimulación eléctrica. (e) Traza representativa de células que muestran actividad persistente inducida por estimulación eléctrica de 0,2 ms, incluida la activación de inicio tardío para neuronas a más de 100 μm del electrodo. La ubicación de cada célula codificada por colores se indica en (d). La línea vertical indica el tiempo de estimulación eléctrica. (f) La fracción de células activadas aumentó con la amplitud ascendente de la estimulación eléctrica y se redujo en más del 40 % después de la aplicación en el baño de APV 100 μM solo o NBQX 10 μM y APV 100 μM . (Tamaño del contenedor de histograma: 234 ms = 1 marco). (g) La duración de la activación de las neuronas se mejoró al aumentar la amplitud de la estimulación eléctrica que indica el reclutamiento de actividad persistente. Curiosamente, mientras que la fracción de neuronas activadas se redujo después de la aplicación de NBQX y APV, la duración de la activación de las neuronas activadas fue similar a la condición de control (50 μA), lo que sugiere que la reducción de la transmisión excitadora en las condiciones APV y NBQX no bloqueó completamente la actividad persistente. (h) Diagrama de dispersión del inicio de la actividad provocada por el estímulo de 50 μA contra la distancia de la célula desde la punta del electrodo. Se muestran líneas regresivas para diferentes intensidades de estimulación, lo que indica una propagación del inicio de actividad a lo largo de la distancia ($p < 0,001$ para condiciones de estímulo de 30, 40 y 50 μA). (i) Media $\Delta F/F$ de células activadas después de la estimulación eléctrica. La actividad promedio de las células durante el período posterior a la estimulación (% $\Delta F/F$) que se activaron mediante estimulación eléctrica muestra una tendencia creciente a medida que aumenta la intensidad de la estimulación. Los valores son la media $\pm$ s.e.m. * y *** indican $p < 0,05$ y 0,001, respectivamente. El análisis estadístico se proporciona a continuación.

Tabla 3: Figura 20 Estadística. Fig. 20f-i. n para cada condición se enumera en la tabla a continuación

Condición	N (número de células activadas después de la estimulación)	N (todas las células)
0 μA	37	220
10 μA	109	370
20 μA	127	370
30 μA	130	369
40 μA	129	372
50 μA	148	371
APV	61	277
NBQX + APV	59	279

Fig. 20f. La prueba de chi-cuadrado detectó diferencias significativas entre: 0 μA -50 μA ($X^2(1, n=220)=49,26$, $p < 0,0001$), 50 μA -APV ($X^2(1, n=277)=37,31$, $p < 0,0001$) y 50 μA -NBQX+APV ($X^2(1, n=279)=41,32$, $p < 0,0001$). **Fig. 20 g.** OneOne ANOVA detectó un efecto principal significativo de la condición de estimulación: $F_{7,792} = 8,512$, $p < 0,001$. La prueba post-hoc de Tukey reveló diferencias significativas entre: 0 μA -50 μA ($p = 0,001$), 10 μA -30 μA ($p = 0,019$), 10 μA -40 μA ($p = 0,001$), 10 μA -50 μA ($p < 0,001$), 10 μA -APV ($p = 0,001$), 10 μA -NBQX + APV ($p = 0,003$), 20 μA -50 μA ($p < 0,001$) y 30 μA -50 μA ($p = 0,022$). **Fig. 20 h.** $n = 137$ neuronas adBNST. Los valores rho y p de Spearman:

Tabla 4			
Condición	N	Rho de Spearman	p
0 μA	84	-0,2542	0,1289
10 μA	96	-0,1326	0,1692
20 μA	119	0,12	0,1791
30 μA	133	0,3901	$4,48 \times 10^{-6}$
40 μA	126	0,457	$5,22 \times 10^{-8}$
50 μA	137	0,5729	$2,76 \times 10^{-14}$

Fig. 20i. El ANOVA unidireccional detectó un efecto principal significativo de la condición de estimulación: $F_{7,792} = 2,222$, $p = 0,031$. La prueba post hoc de Tukey no pudo detectar diferencias significativas entre las condiciones.

Figura 21. El adBNST se proyecta débilmente al ovBNST. (a) Para examinar la conectividad entre el ovBNST y el adBNST, se inyectó en el ovBNST el virus de la rabia en el que la glucoproteína es reemplazada por una proteína verde fluorescente mejorada (RV-eGFP). (b) Imagen de fluorescencia representativa que muestra la expresión de eGFP en neuronas locales ovBNST. Obsérvese la escasez de neuronas que expresan eGFP en el adBNST, lo que indica proyecciones débiles del adBNST al ovBNST. (c) Imagen de fluorescencia que muestra la expresión restringida

de eGFP en el CeA en la amígdala. Dado que el CeA proyecta tanto al ovBNST como al adBNST mientras que la BLA se proyecta solo al adBNST pero no al ovBNST, Este resultado indica que la inyección de RV-eGFP en el ovBNST no se extendió al adBNST. Todas las barras de escala son de 200 μm . Todas las imágenes son una proyección z-max de una sección de 20 μm .

A continuación, los autores preguntaron si las velocidades de disparo nativas de las neuronas adBNST en ratones que se mueven libremente codificaban aspectos de seguridad ambiental, mediante el registro de la actividad con matrices de estereotrodos en el adBNST durante la exploración (**Figura 22a y 22b**). De hecho, se observó una mayor actividad de múltiples unidades adBNST en ubicaciones más seguras en dos paradigmas (brazos cerrados del EPM y compartimento oscuro de la caja de prueba de luz-oscuridad, **Figura 23**). Para cuantificar en qué medida las unidades individuales de adBNST diferencian entre los brazos cerrados y abiertos en el EPM, los inventores definieron una puntuación EPM (véase Métodos; **Figura 24**), en la que una puntuación positiva indica que las velocidades de disparo son similares entre los brazos del mismo tipo (como un par de brazos cerrados), pero diferente en brazos abiertos y cerrados (por ejemplo, **Figura 22c**). Esta métrica permitió el cálculo de la actividad específica relacionada con el rendimiento de EPM para cada unidad individual, tanto en periodos de encendido como de apagado. Sin iluminación, un subconjunto de unidades individuales adBNST disparadas preferentemente en los brazos cerrados del EPM, mientras que otras unidades no exhibieron preferencia (**Figura 22c**). De hecho, cada unidad individual del adBNST con una puntuación EPM positiva (66 % de las unidades) tuvo velocidades de disparo más altas en los brazos cerrados que en los brazos abiertos, mientras que las simulaciones predicen que si no hubiera dependencia de la condición ambiental, solo el 33 % de las células tendrían una puntuación EPM positiva y se dividirían de manera equitativa entre las unidades preferidas de brazo cerrado y abierto (Métodos).

A continuación, los autores implantaron estereotrodos y una fibra óptica en el adBNST de ratones eNpHR3.0: BLA-adBNST (**Figura 22a**), lo que permite el registro simultáneo y el suministro de luz amarilla al adBNST. La iluminación en estos ratones redujo la actividad de múltiples unidades en el adBNST (**Figura 22d; Figura 25**). Finalmente, los autores registraron de unidades individuales de adBNST en ratones eNpHR3.0:BLA-adBNST durante la prueba del EPM durante 20 minutos, con alternancia de 1 minuto de luz apagada y encendida en periodos (**Figura 22e**), para permitir el cálculo de las puntuaciones de EPM para cada unidad individual en presencia o ausencia de inhibición de aferentes de la BLA. La sugerencia de que la representación de características relacionadas con la ansiedad en el adBNST puede depender de la entrada de la BLA, los autores observaron que la inhibición optogenética de la proyección de BLA-adBNST disminuyó las puntuaciones de EPM de una sola unidad ($p < 0,01$; **Figuras 22f y 22g**) y la disminución en las puntuaciones de EPM fue mayor en las células que tenían una disminución en la velocidad de disparo durante los periodos iluminados (**Figura 26**). Estos datos indican que la codificación nativa relacionada con la ansiedad nativa del ambiente del EPM en el adBNST depende en parte de las entradas de la BLA; obsérvese que esta misma manipulación (inhibición de la proyección BLA-adBNST) aumentó el comportamiento de EPM similar a la ansiedad (**Figura 4g**), de una manera consistente con causar una mayor ansiedad general que podría disuadir las transiciones al brazo abierto.

En este caso, los autores han mapeado el papel de los elementos del circuito de BNST en el ensamblaje y la modulación del estado de comportamiento ansioso. Los autores han demostrado que el ovBNST y el adBNST aumentan y disminuyen el comportamiento relacionado con la ansiedad, respectivamente; el ovBNST podría promover la ansiedad al suprimir el adBNST (véase en la **Figura 27** el diagrama resumen) o mediante proyecciones directas a estructuras como la amígdala central. A continuación, los inventores encontraron que distintas proyecciones de adBNST modulan diferentes características del estado conductual asociado con la frecuencia respiratoria disminuida por ansiolisis, valencia de condicionamiento positivo y comportamiento de evitación de riesgo disminuido que están mediados por proyecciones del adBNST al PB, al VTA y al LH, respectivamente. Este arreglo puede facilitar la adaptación modular del propio estado sobre el desarrollo y la experiencia; en principio, ajustando la fuerza de las proyecciones divergentes, características distintas pueden ajustarse independientemente mientras se mantiene la coordinación aguas arriba del estado de comportamiento. Se necesitará trabajo adicional para determinar los mecanismos de circuito por los cuales se origina la diferenciación funcional de estas vías, así como cómo ocurre la coordinación en última instancia. El reclutamiento coordinado de las diferentes poblaciones de neuronas de proyección de adBNST podría involucrar excitación recurrente (**Figuras 19 y 20**); de hecho, los registros de múltiples unidades *in vivo* apoyan la existencia de excitación recurrente en el adBNST, ya que se observó actividad persistente en el 28 % de los registros después de la terminación de la estimulación de la fibra de la BLA (**Figuras 20a-c**) y las imágenes de Ca^{2+} en la lámina aguda de BNST revelaron actividad persistente en el adBNST después de un breve estímulo breve (**Figuras 20d-i**).

Figuras 22a-g. Las neuronas BNST dependen en parte de las entradas a la BLA para distinguir ubicaciones seguras y ansiogénicas. (a) Esquema de la configuración de grabación *in vivo*. (b) Rastreo de seguimiento de comportamiento representativo del EPM. Para todas las figuras de EPM, brazos horizontales/verticales representan brazos cerrados/abiertos, respectivamente. (c) *Arriba*, mapas de la velocidad de disparo espacial de dos unidades individuales de adBNST representativas. Una unidad mostró mayor actividad en brazos cerrados (izquierda), mientras que el otro no exhibió preferencia (derecha); las velocidades de disparo normalizadas promedio están codificadas por color para cada píxel de ubicación espacial. *Abajo*, tasas normalizadas ($/$,) 0 cambio desde la velocidad de disparo media) para cada brazo para unidades de ejemplo. Estas tasas se usaron para calcular las puntuaciones de EPM (Métodos y **Figura 24**); las puntuaciones más altas de EPM indican una mayor diferenciación de los brazos cerrados

y abiertos. La luz para inhibir la proyección BLA-adBNST suprimió moderadamente la actividad de múltiples unidades en adBNST. **(e)** Se introdujo a los ratones eNpHR3.0:BLA-adBNST en el EPM durante 20 minutos con periodos alternos de 1 min de encendido y apagado. **(f)** *Izquierda*, diagrama de dispersión de puntuaciones de EPM en condiciones de apagado y encendido. *Derecha*, mapas de disparo espacial que ilustran el cambio en la puntuación EPM de una sola unidad (punto rojo en el diagrama de dispersión) en respuesta a la luz amarilla, que disminuyó la puntuación EPM de la mayoría de las unidades ($n=28/38$). **(g)** Datos resumen en unidades individuales ($n=38$): cambio medio en la puntuación EPM con inhibición de la proyección -adBNST. De forma notable, las puntuaciones de EPM incluso en periodos de luz encendida fueron significativamente más altas que las puntuaciones de EPM generadas a partir de espigas simuladas aleatorias ($p<0,01$), lo que indica que incluso con la luz encendida, las unidades BNST podrían diferenciar los brazos cerrados y abiertos, aunque menos sólidamente que con la luz apagada. Media + s.e.m.; * $p<0,05$; *** $p<0,001$. Estadísticas. Figura 22f. $n=38$ unidades individuales de adBNST. Rho de Spearman = 0,57, $p<0,0001$. Figura 22 g. $n=38$ unidades individuales de adBNST. La puntuación EPM en el periodo de luz encendida fue menor que la puntuación EPM en el periodo de luz apagada: $p<0,05$, Prueba de la suma de rangos de Wilcoxon. la puntuación EPM generada a partir de espigas nerviosas fue menor que las puntuaciones de EPM en periodos de encendido y apagado: $p<0,001$ para ambos, Prueba de la suma de rangos de Wilcoxon.

Figura 23. La actividad de múltiples unidades del adBNST es mayor en los compartimentos seguros de los paradigmas de ansiedad. Se implantó a los ratones un microdisco manejable que contenía 8 estereotrodos en el adBNST para permitir el registro de la actividad de múltiples unidades de adBNST. Los ratones se introdujeron en el EPM **(a-b)** y la caja de luz y oscuridad **(c-d)**. **(a)** Se muestra el mapa de la velocidad de disparo espacial (*izquierda*) y las velocidades de disparo normalizadas (% de diferencia con respecto a la tasa media) de cada brazo para un registro representativo de múltiples unidades en el adBNST de un ratón que explora el EPM durante 15 minutos. Obsérvese que la actividad es mayor en ambos brazos cerrados del laberinto. *Izquierda*: los colores más cálidos corresponden a velocidades de disparo más altas. **(b)** Diagrama de dispersión que muestra la velocidad en los brazos cerrados y en los brazos abiertos para todos los registros de múltiples unidades ($n=32$ registros de múltiples unidades de 4 ratones). Las tasas fueron significativamente más altas en los brazos cerrados ($p<10^{-5}$, prueba de rangos con signo de Wilcoxon). Obsérvese que la actividad de múltiples unidades de adBNST de todos los canales en todos los ratones fue mayor en los brazos cerrados. Los datos se trazaron como transformaciones de logaritmo natural de velocidades de disparo sin procesar en Hz para permitir una visualización más fácil. **(c)** Mapa de la velocidad de disparo espacial de un registro representativo de múltiples unidades en el adBNST de un ratón que explora la prueba de luz oscura durante 15 minutos. Obsérvese que la actividad es mayor en el compartimento oscuro de la caja de prueba luz-oscuridad. La protuberancia en la esquina superior de la cámara izquierda estaba causada por el LED de seguimiento de posición que se refleja en una de las paredes. Los colores más cálidos representan velocidades de disparo más altas. **(d)** Histograma de la velocidad de disparo de múltiples unidades en el compartimento oscuro representado como aumento desde el compartimento de luz. Obsérvese que la media de esta distribución es significativamente mayor que 1 (media = 1,16, $p<0,005$, prueba de rangos con signo de Wilcoxon).

Figura 24. Cálculo de las puntuaciones de EPM para medir la diferenciación entre los brazos cerrados y abiertos por unidades individuales de adBNST. Se registraron dos unidades individuales representativas del mismo ratón simultáneamente durante una sesión de exploración de EPM de 15 minutos. **(a)** Panel izquierdo: pista de comportamiento que muestra el camino tomado por el ratón en el EPM. Panel central: mapa de la velocidad de disparo espacial para una sola unidad que diferencia los brazos cerrados y abiertos (las tasas más altas se indican con colores más cálidos). Esta unidad fue más activa en los brazos cerrados. Panel derecho: Gráfico de barras que muestra las velocidades de disparo normalizadas (representadas como el % de cambio respecto a la tasa media) para cada sububicación en el EPM. Obsérvese que esta unidad disparó más en ambos brazos cerrados. La puntuación del EPM de esta unidad, que se calculó de acuerdo con la fórmula debajo de la figura, se muestra encima de su mapa de velocidad de disparo espacial. FL, FR, FU, FD y FC indican, respectivamente, velocidades de disparo normalizadas (% de cambio respecto a la tasa media) en el brazo izquierdo, el brazo derecho, el brazo superior, el brazo inferior y el centro del EPM. **(b)** Igual que **(a)**, pero para una sola unidad grabada en la misma sesión que no mostró actividad relacionada con la tarea en el EPM. Obsérvese que aunque la unidad disparó de manera diferente en los brazos diferentes, la unidad no diferenciaba consistentemente los brazos cerrados de los brazos abiertos, lo que da como resultado una puntuación EPM (véase Métodos). Por el contrario, una puntuación EPM alta indica que una unidad tiene velocidades de disparo similares en los brazos del mismo tipo y velocidades de disparo diferentes en los brazos de tipos diferentes. La unidad en **(a)** tiene velocidades de disparo similares en los brazos del mismo tipo, pero las tasas en cerrado y abierto son muy diferentes entre sí.

Figura 25. La actividad de múltiples unidades de adBNST depende de las entradas de la BLA para diferenciar ubicaciones seguras y aversivas en el EPM. **(a)** Diagrama de dispersión de velocidades de disparo de múltiples unidades durante los periodos de luz amarilla APAGADA y ENCENDIDA en ratones eNpHR3.0: BLA-adBNST. **(b)** Los ratones eNpHR3.0:BLA-adBNST se introdujeron en el EPM durante 20 minutos con periodos alternos de 1 minuto de láser apagado y láser encendido (mismo experimento que la **Fig. 4**). La inhibición de la proyección BLA-adBNST disminuyó la puntuación EPM de los registros de múltiples unidades ($n=32$ registros, $p<0,05$, prueba de rangos con signo de Wilcoxon), conforme a los datos de una sola unidad. Los valores son la media $\pm$ s.e.m. **(c)** Diagrama de dispersión que muestra la distribución de los cambios en la puntuación EPM. Los registros 25/32 mostraron puntuaciones EPM más bajas en la luz ENCENDIDA en comparación con el periodo con la luz APAGADA. Las puntuaciones EPM fueron significativamente más altas en el periodo de luz APAGADA ($p<0,01$, prueba de rangos

con signo de Wilcoxon). **(d)** El número de registros de múltiples unidades con puntuaciones EPM positivos también disminuyó con la luz amarilla ($p < 0,05$, prueba exacta de Fisher).

Figura 26. La inhibición de la proyección BLA-adBNST disminuye las velocidades de disparo en los brazos cerrados y las puntuaciones EPM. Los ratones eNpHR3.0:BLA-adBNST se introdujeron en el EPM durante 20 minutos con periodos de 1 minuto alternos con láser apagado y láser encendido (el mismo experimento que en la **Fig. 4**). **(a)** La inhibición de la proyección BLA-adBNST tendía a disminuir las velocidades de disparo de las unidades individuales adBNST, pero este efecto no alcanzó significación estadística al agrupar todas las neuronas ($p < 0,68$, prueba de Wilcoxon, $n = 38$ unidades individuales de 4 ratones). **(b)** Sin embargo, las unidades individuales adBNST que exhibieron una disminución significativa en la velocidad de disparo durante los periodos de luz ENCENDIDA ($n = 20$ de 38 unidades individuales) mostraron una disminución significativa en la tasa en los brazos cerrados ($p < 0,05$, prueba de rangos con signo de Wilcoxon), pero no en los brazos abiertos ($p < 0,34$, prueba de rangos con signo de Wilcoxon). La importancia de las disminuciones inducidas por la luz en el disparo se evaluó comparando las tasas en 10 periodos de un minuto de duración de luz APAGADA y 10 de luz ENCENDIDA para cada unidad individual. **(c)** Las disminuciones en las puntuaciones EPM fueron más altas en las unidades individuales adBNST con disminuciones significativas en la velocidad de disparo durante la luz ENCENDIDA ($n = 38$ para todas las células, $n = 20$ para células con disparo disminuido con luz ENCENDIDA, $p < 0,05$, prueba de rangos con signo de Wilcoxon). Los valores son la media $\pm$ s.e.m.

Figura 27. Diagrama resumen. Esquema que ilustra la posible organización funcional de los circuitos BNST. El ovBNST inhibe el adBNST, mientras que el adBNST solo envía una proyección débil al ovBNST. El adBNST proyecta al LH, al PB y al VTA. Cada una de estas proyecciones disminuye aspectos distintos de la expresión de ansiedad. El reclutamiento coordinado de estas subpoblaciones puede implementarse mediante circuitos recurrentes en el adBNST. Las entradas de la BLA probablemente reclutan neuronas de salida del BNST al LH y al PB, pero no al VTA en ciertas circunstancias. El ovBNST puede actuar para aumentar la ansiedad al inhibir el adBNST o influyendo de forma independiente en las estructuras posteriores, tales como la amígdala central (CeA), la sustancia innominada (SI), el núcleo PB o la formación reticular mesencefálica (mRT). Las flechas rojas y azules indican proyecciones excitatorias e inhibitorias, respectivamente. Las flechas de color púrpura indican proyecciones con identidad neurotransmisora desconocida. Las líneas continuas indican las proyecciones directamente objetivo e investigadas en este estudio, y las líneas discontinuas indican las proyecciones sugeridas por los datos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Kim, Sung-Yon
Deisseroth, Karl A
Adhikari, Avishek

<120> CONTROL OPTOGENÉTICO DEL ESTADO CONDUCTUAL

<130> STAN-1017WO

<150> US 61/789.961
<151> 15/03/2013

<150> US 61/808.965
<151> 05/04/2013

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 273
<212> PRT

<213> Natronomonas pharaonis

<400> 1

ES 2 742 492 T3

Val	Thr	Gln	Arg	Glu	Leu	Phe	Glu	Phe	Val	Leu	Asn	Asp	Pro	Leu	Leu	1	5	10	15
Ala	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Asn	Ile	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser	Ile	Leu	20	25	30	
Leu	Phe	Val	Phe	Met	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Asp	Pro	Arg	Ala	Lys	Leu	35	40	45	
Ile	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Leu	Val	Pro	Val	Val	Ser	Ile	Ala	Ser	Tyr	50	55	60	
Thr	Gly	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr	Ile	Ser	Val	Leu	Glu	Met	Pro	Ala	65	70	75	80
Gly	His	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Met	Leu	Gly	Gly	Glu	Glu	Val	85	90	95	
Asp	Gly	Val	Val	Thr	Met	Trp	Gly	Arg	Tyr	Leu	Thr	Trp	Ala	Leu	Ser	100	105	110	
Thr	Pro	Met	Ile	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Gly	Ser	Asn	Ala	115	120	125	
Thr	Lys	Leu	Phe	Thr	Ala	Ile	Thr	Phe	Asp	Ile	Ala	Met	Cys	Val	Thr	130	135	140	

ES 2 742 492 T3

Gly Leu Ala Ala Ala Leu Thr Thr Ser Ser His Leu Met Arg Trp Phe
145 150 155 160

Trp Tyr Ala Ile Ser Cys Ala Cys Phe Leu Val Val Leu Tyr Ile Leu
165 170 175

Leu Val Glu Trp Ala Gln Asp Ala Lys Ala Ala Gly Thr Ala Asp Met
180 185 190

Phe Asn Thr Leu Lys Leu Leu Thr Val Val Met Trp Leu Gly Tyr Pro
195 200 205

Ile Val Trp Ala Leu Gly Val Glu Gly Ile Ala Val Leu Pro Val Gly
210 215 220

Val Thr Ser Trp Gly Tyr Ser Phe Leu Asp Ile Val Ala Lys Tyr Ile
225 230 235 240

Phe Ala Phe Leu Leu Leu Asn Tyr Leu Thr Ser Asn Glu Ser Val Val
245 250 255

Ser Gly Ser Ile Leu Asp Val Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Ala Asp
260 265 270

Asp

<210> 2
<211> 559
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética de aminoácidos

<400> 2

Met Thr Glu Thr Leu Pro Pro Val Thr Glu Ser Ala Val Ala Leu Gln
1 5 10 15

Ala Glu Val Thr Gln Arg Glu Leu Phe Glu Phe Val Leu Asn Asp Pro
20 25 30

Leu Leu Ala Ser Ser Leu Tyr Ile Asn Ile Ala Leu Ala Gly Leu Ser
35 40 45

Ile Leu Leu Phe Val Phe Met Thr Arg Gly Leu Asp Asp Pro Arg Ala
50 55 60

Lys Leu Ile Ala Val Ser Thr Ile Leu Val Pro Val Val Ser Ile Ala

ES 2 742 492 T3

65				70				75				80			
Ser	Tyr	Thr	Gly	Leu 85	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr	Ile	Ser	Val	Leu	Glu	Met
								90							
Pro	Ala	Gly	His	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Met	Leu	Gly	Gly	Glu
				100				105				110			
Glu	Val	Asp	Gly	Val	Val	Thr	Met	Trp	Gly	Arg	Tyr	Leu	Thr	Trp	Ala
				115				120				125			
Leu	Ser	Thr	Pro	Met	Ile	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Gly	Ser
				130				135				140			
Asn	Ala	Thr	Lys	Leu	Phe	Thr	Ala	Ile	Thr	Phe	Asp	Ile	Ala	Met	Cys
145				150				155				160			
Val	Thr	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Thr	Ser	Ser	His	Leu	Met	Arg
				165				170				175			
Trp	Phe	Trp	Tyr	Ala	Ile	Ser	Cys	Ala	Cys	Phe	Leu	Val	Val	Leu	Tyr
				180				185				190			
Ile	Leu	Leu	Val	Glu	Trp	Ala	Gln	Asp	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala
				195				200				205			
Asp	Met	Phe	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu	Leu	Thr	Val	Val	Met	Trp	Leu	Gly
				210				215				220			
Tyr	Pro	Ile	Val	Trp	Ala	Leu	Gly	Val	Glu	Gly	Ile	Ala	Val	Leu	Pro
225				230				235				240			
Val	Gly	Val	Thr	Ser	Trp	Gly	Tyr	Ser	Phe	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Lys
				245				250				255			
Tyr	Ile	Phe	Ala	Phe	Leu	Leu	Leu	Asn	Tyr	Leu	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser
				260				265				270			
Val	Val	Ser	Gly	Ser	Ile	Leu	Asp	Val	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro
				275				280				285			
Ala	Asp	Asp	Ala	Ala	Ala	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ser	Glu	Gly	Glu	Tyr
				290				295				300			
Ile	Pro	Leu	Asp	Gln	Ile	Asp	Ile	Asn	Val	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu
305				310				315				320			

ES 2 742 492 T3

Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val
 325 330 335
 Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr
 340 345 350
 Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro
 355 360 365
 Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys
 370 375 380
 Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser
 385 390 395 400
 Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp
 405 410 415
 Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr
 420 425 430
 Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly
 435 440 445
 Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val
 450 455 460
 Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys
 465 470 475 480
 Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr
 485 490 495
 Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn
 500 505 510
 His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys
 515 520 525
 Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr
 530 535 540
 Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val
 545 550 555

<210> 3
 <211> 542
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 742 492 T3

<220>

<223> secuencia sintética de aminoácidos

5

<400> 3

```

Met Val Thr Gln Arg Glu Leu Phe Glu Phe Val Leu Asn Asp Pro Leu
1          5          10          15

Leu Ala Ser Ser Leu Tyr Ile Asn Ile Ala Leu Ala Gly Leu Ser Ile
20        25        30

Leu Leu Phe Val Phe Met Thr Arg Gly Leu Asp Asp Pro Arg Ala Lys
35        40        45

Leu Ile Ala Val Ser Thr Ile Leu Val Pro Val Val Ser Ile Ala Ser
50        55        60

Tyr Thr Gly Leu Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser Val Leu Glu Met Pro
65        70        75        80

Ala Gly His Phe Ala Glu Gly Ser Ser Val Met Leu Gly Gly Glu Glu
85        90        95

Val Asp Gly Val Val Thr Met Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Trp Ala Leu
100       105       110

Ser Thr Pro Met Ile Leu Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ser Asn
115       120       125

Ala Thr Lys Leu Phe Thr Ala Ile Thr Phe Asp Ile Ala Met Cys Val
130       135       140

Thr Gly Leu Ala Ala Ala Leu Thr Thr Ser Ser His Leu Met Arg Trp
145       150       155       160

Phe Trp Tyr Ala Ile Ser Cys Ala Cys Phe Leu Val Val Leu Tyr Ile
165       170       175

Leu Leu Val Glu Trp Ala Gln Asp Ala Lys Ala Ala Gly Thr Ala Asp
180       185       190

Met Phe Asn Thr Leu Lys Leu Leu Thr Val Val Met Trp Leu Gly Tyr
195       200       205

Pro Ile Val Trp Ala Leu Gly Val Glu Gly Ile Ala Val Leu Pro Val
210       215       220

```

ES 2 742 492 T3

Gly	Val	Thr	Ser	Trp	Gly	Tyr	Ser	Phe	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Lys	Tyr	225	230	235	240
Ile	Phe	Ala	Phe	Leu	Leu	Leu	Asn	Tyr	Leu	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser	Val	245	250	255	
Val	Ser	Gly	Ser	Ile	Leu	Asp	Val	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Ala	260	265	270	
Asp	Asp	Ala	Ala	Ala	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ser	Glu	Gly	Glu	Tyr	Ile	275	280	285	
Pro	Leu	Asp	Gln	Ile	Asp	Ile	Asn	Val	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	290	295	300	
Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	305	310	315	320
Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	325	330	335	
Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	340	345	350	
Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe	Gly	Tyr	Gly	Leu	Gln	Cys	Phe	355	360	365	
Ala	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	370	375	380	
Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	385	390	395	400
Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	405	410	415	
Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	420	425	430	
Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	435	440	445	
Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	450	455	460	
Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	465	470	475	480

ES 2 742 492 T3

Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
485 490 495

Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
500 505 510

Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
515 520 525

Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val
530 535 540

<210> 4
<211> 223
<212> PRT
<213> Guillardia theta

<400> 4

Ala Ser Ser Phe Gly Lys Ala Leu Leu Glu Phe Val Phe Ile Val Phe
1 5 10 15

Ala Cys Ile Thr Leu Leu Leu Gly Ile Asn Ala Ala Lys Ser Lys Ala
20 25 30

Ala Ser Arg Val Leu Phe Pro Ala Thr Phe Val Thr Gly Ile Ala Ser
35 40 45

Ile Ala Tyr Phe Ser Met Ala Ser Gly Gly Gly Trp Val Ile Ala Pro
50 55 60

Asp Cys Arg Gln Leu Phe Val Ala Arg Tyr Leu Asp Trp Leu Ile Thr
65 70 75 80

Thr Pro Leu Leu Leu Ile Asp Leu Gly Leu Val Ala Gly Val Ser Arg
85 90 95

Trp Asp Ile Met Ala Leu Cys Leu Ser Asp Val Leu Met Ile Ala Thr
100 105 110

Gly Ala Phe Gly Ser Leu Thr Val Gly Asn Val Lys Trp Val Trp Trp
115 120 125

Phe Phe Gly Met Cys Trp Phe Leu His Ile Ile Phe Ala Leu Gly Lys
130 135 140

Ser Trp Ala Glu Ala Ala Lys Ala Lys Gly Gly Asp Ser Ala Ser Val
145 150 155 160

ES 2 742 492 T3

Tyr Ser Lys Ile Ala Gly Ile Thr Val Ile Thr Trp Phe Cys Tyr Pro
165 170 175

Val Val Trp Val Phe Ala Glu Gly Phe Gly Asn Phe Ser Val Thr Phe
180 185 190

Glu Val Leu Ile Tyr Gly Val Leu Asp Val Ile Ser Lys Ala Val Phe
195 200 205

Gly Leu Ile Leu Met Ser Gly Ala Ala Thr Gly Tyr Glu Ser Ile
210 215 220

<210> 5
<211> 310
<212> PRT
<213> Chlamydomonas reinhardtii
<400> 5

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 742 492 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ala Gly Ala Val Pro
305 310

<210> 6
<211> 310
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética de aminoácidos

<400> 6

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

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

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

ES 2 742 492 T3

Gln	Thr	Ala	Ser	Asn	Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Ala	Ala	Gly	Phe	Ser	Ile	50	55	60	
Leu	Leu	Leu	Met	Phe	Tyr	Ala	Tyr	Gln	Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Cys	Gly	65	70	75	80
Trp	Glu	Glu	Ile	Tyr	Val	Cys	Ala	Ile	Glu	Met	Val	Lys	Val	Ile	Leu	85	90	95	
Glu	Phe	Phe	Phe	Glu	Phe	Lys	Asn	Pro	Ser	Met	Leu	Tyr	Leu	Ala	Thr	100	105	110	
Gly	His	Arg	Val	Gln	Trp	Leu	Arg	Tyr	Ala	Glu	Trp	Leu	Leu	Thr	Ser	115	120	125	
Pro	Val	Ile	Leu	Ile	His	Leu	Ser	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Ser	Asn	Asp	130	135	140	
Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Met	Gly	Leu	Leu	Val	Ser	Asp	Ile	Gly	Thr	Ile	145	150	155	160
Val	Trp	Gly	Ala	Thr	Ser	Ala	Met	Ala	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Val	Ile	165	170	175	
Phe	Phe	Cys	Leu	Gly	Leu	Cys	Tyr	Gly	Ala	Asn	Thr	Phe	Phe	His	Ala	180	185	190	
Ala	Lys	Ala	Tyr	Ile	Glu	Gly	Tyr	His	Thr	Val	Pro	Lys	Gly	Arg	Cys	195	200	205	
Arg	Gln	Val	Val	Thr	Gly	Met	Ala	Trp	Leu	Phe	Phe	Val	Ser	Trp	Gly	210	215	220	
Met	Phe	Pro	Ile	Leu	Phe	Ile	Leu	Gly	Pro	Glu	Gly	Phe	Gly	Val	Leu	225	230	235	240
Ser	Val	Tyr	Gly	Ser	Thr	Val	Gly	His	Thr	Ile	Ile	Asp	Leu	Met	Ser	245	250	255	
Lys	Asn	Cys	Trp	Gly	Leu	Leu	Gly	His	Tyr	Leu	Arg	Val	Leu	Ile	His	260	265	270	
Glu	His	Ile	Leu	Ile	His	Gly	Asp	Ile	Arg	Lys	Thr	Thr	Lys	Leu	Asn	275	280	285	
Ile	Gly	Gly	Thr	Glu	Ile	Glu	Val	Glu	Thr	Leu	Val	Glu	Asp	Glu	Ala	290	295	300	
Glu Ala Gly Ala Val Pro																305	310		

<210> 7
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintética de aminoácidos

<400> 7

10

Met	Asp	Tyr	Gly	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Leu	Leu	Phe	1	5	10	15
Val	Thr	Asn	Pro	Val	Val	Val	Asn	Gly	Ser	Val	Leu	Val	Pro	Glu	Asp	20	25	30	
Gln	Cys	Tyr	Cys	Ala	Gly	Trp	Ile	Glu	Ser	Arg	Gly	Thr	Asn	Gly	Ala	35	40	45	
Gln	Thr	Ala	Ser	Asn	Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Ala	Ala	Gly	Phe	Ser	Ile	50	55	60	
Leu	Leu	Leu	Met	Phe	Tyr	Ala	Tyr	Gln	Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Cys	Gly	65	70	75	80
Trp	Glu	Glu	Ile	Tyr	Val	Cys	Ala	Ile	Glu	Met	Val	Lys	Val	Ile	Leu	85	90	95	
Glu	Phe	Phe	Phe	Glu	Phe	Lys	Asn	Pro	Ser	Met	Leu	Tyr	Leu	Ala	Thr	100	105	110	
Gly	His	Arg	Val	Gln	Trp	Leu	Arg	Tyr	Ala	Glu	Trp	Leu	Leu	Thr	Ser	115	120	125	
Pro	Val	Ile	Leu	Ile	His	Leu	Ser	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Ser	Asn	Asp	130	135	140	
Tyr	Ser	Arg	Arg	Thr	Met	Gly	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Ile	Gly	Thr	Ile	145	150	155	160
Val	Trp	Gly	Ala	Thr	Ser	Ala	Met	Ala	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Val	Ile	165	170	175	
Phe	Phe	Cys	Leu	Gly	Leu	Cys	Tyr	Gly	Ala	Asn	Thr	Phe	Phe	His	Ala	180	185	190	

ES 2 742 492 T3

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ala Gly Ala Val Pro
305 310

<210> 8

<211> 349

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética de aminoácidos

<400> 8

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
20 25 30

Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
35 40 45

Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
50 55 60

Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
65 70 75 80

Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp

ES 2 742 492 T3

				85					90					95					
Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Cys	Leu	Met	Phe	Tyr	Gly	Tyr	Gln				
			100					105					110						
Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Cys	Gly	Trp	Glu	Glu	Ile	Tyr	Val	Ala	Thr	Ile				
		115					120					125							
Glu	Met	Ile	Lys	Phe	Ile	Ile	Glu	Tyr	Phe	His	Glu	Phe	Asp	Glu	Pro				
	130					135					140								
Ala	Val	Ile	Tyr	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Lys	Thr	Val	Trp	Leu	Arg	Tyr				
145					150					155					160				
Ala	Glu	Trp	Leu	Leu	Thr	Cys	Pro	Val	Leu	Leu	Ile	His	Leu	Ser	Asn				
			165						170					175					
Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Asp	Asp	Tyr	Ser	Lys	Arg	Thr	Met	Gly	Leu	Leu				
		180						185					190						
Val	Ser	Asp	Val	Gly	Cys	Ile	Val	Trp	Gly	Ala	Thr	Ser	Ala	Met	Cys				
		195					200					205							
Thr	Gly	Trp	Thr	Lys	Ile	Leu	Phe	Phe	Leu	Ile	Ser	Leu	Ser	Tyr	Gly				
	210					215					220								
Met	Tyr	Thr	Tyr	Phe	His	Ala	Ala	Lys	Val	Tyr	Ile	Glu	Ala	Phe	His				
225					230					235					240				
Thr	Val	Pro	Lys	Gly	Ile	Cys	Arg	Glu	Leu	Val	Arg	Val	Met	Ala	Trp				
				245					250					255					
Thr	Phe	Phe	Val	Ala	Trp	Gly	Met	Phe	Pro	Val	Leu	Phe	Leu	Leu	Gly				
			260				265						270						
Thr	Glu	Gly	Phe	Gly	His	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ile	Gly	His				
		275					280					285							
Ser	Ile	Leu	Asp	Leu	Ile	Ala	Lys	Asn	Met	Trp	Gly	Val	Leu	Gly	Asn				
	290					295					300								
Tyr	Leu	Arg	Val	Lys	Ile	His	Glu	His	Ile	Leu	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ile				
305					310					315					320				
Arg	Lys	Lys	Gln	Lys	Ile	Thr	Ile	Ala	Gly	Gln	Glu	Met	Glu	Val	Glu				
				325					330					335					

ES 2 742 492 T3

Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp Ser Glu Gln Ile Asp
340 345

<210> 9
<211> 344
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética de aminoácidos

<400> 9

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
20 25 30

Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
35 40 45

Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
50 55 60

Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
65 70 75 80

Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
85 90 95

Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
100 105 110

Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Thr Ile Tyr Val Ala Thr Ile
115 120 125

Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
130 135 140

Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
145 150 155 160

Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn
165 170 175

Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
180 185 190

Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys

ES 2 742 492 T3

195

200

205

Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
210 215 220

Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
225 230 235 240

Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp
245 250 255

Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
260 265 270

Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His
275 280 285

Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn
290 295 300

Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
305 310 315 320

Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
325 330 335

Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp
340

<210> 10

<211> 349

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética de aminoácidos

<400> 10

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
20 25 30

Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
35 40 45

Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
50 55 60

ES 2 742 492 T3

Ile	Cys	Ile	Pro	Asn	Asn	Gly	Gln	Cys	Phe	Cys	Leu	Ala	Trp	Leu	Lys	65	70	75	80
Ser	Asn	Gly	Thr	Asn	Ala	Glu	Lys	Leu	Ala	Ala	Asn	Ile	Leu	Gln	Trp	85	90	95	
Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Cys	Leu	Met	Phe	Tyr	Gly	Tyr	Gln	100	105	110	
Thr	Trp	Lys	Ser	Thr	Cys	Gly	Trp	Glu	Glu	Ile	Tyr	Val	Ala	Thr	Ile	115	120	125	
Glu	Met	Ile	Lys	Phe	Ile	Ile	Glu	Tyr	Phe	His	Glu	Phe	Asp	Glu	Pro	130	135	140	
Ala	Val	Ile	Tyr	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Lys	Thr	Val	Trp	Leu	Arg	Tyr	145	150	155	160
Ala	Thr	Trp	Leu	Leu	Thr	Cys	Pro	Val	Leu	Leu	Ile	His	Leu	Ser	Asn	165	170	175	
Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Asp	Asp	Tyr	Ser	Lys	Arg	Thr	Met	Gly	Leu	Leu	180	185	190	
Val	Ser	Asp	Val	Gly	Cys	Ile	Val	Trp	Gly	Ala	Thr	Ser	Ala	Met	Cys	195	200	205	
Thr	Gly	Trp	Thr	Lys	Ile	Leu	Phe	Phe	Leu	Ile	Ser	Leu	Ser	Tyr	Gly	210	215	220	
Met	Tyr	Thr	Tyr	Phe	His	Ala	Ala	Lys	Val	Tyr	Ile	Glu	Ala	Phe	His	225	230	235	240
Thr	Val	Pro	Lys	Gly	Ile	Cys	Arg	Glu	Leu	Val	Arg	Val	Met	Ala	Trp	245	250	255	
Thr	Phe	Phe	Val	Ala	Trp	Gly	Met	Phe	Pro	Val	Leu	Phe	Leu	Leu	Gly	260	265	270	
Thr	Glu	Gly	Phe	Gly	His	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ile	Gly	His	275	280	285	
Ser	Ile	Leu	Asp	Leu	Ile	Ala	Lys	Asn	Met	Trp	Gly	Val	Leu	Gly	Asn	290	295	300	
Tyr	Leu	Arg	Val	Lys	Ile	His	Glu	His	Ile	Leu	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ile				

ES 2 742 492 T3

305 310 315 320

Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
 325 330 335

Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp Ser Glu Gln Ile Asp
340 345

<210> 11
<211> 349
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia sintética de aminoácidos
<400> 11

Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro
20 25 30

Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu
35 40 45

Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val
50 55 60

Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys
65 70 75 80

Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
85 90 95

Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
100 105 110

Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Thr Ile Tyr Val Ala Thr Ile
115 120 125

Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
130 135 140

Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
145 150 155 160

Ala Thr Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn
165 170 175

ES 2 742 492 T3

Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
180 185 190

Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys
195 200 205

Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
210 215 220

Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
225 230 235 240

Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp
245 250 255

Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
260 265 270

Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His
275 280 285

Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn
290 295 300

Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
305 310 315 320

Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
325 330 335

Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp Ser Glu Gln Ile Asp
340 345

<210> 12

<211> 258

<212> PRT

<213> Halorubrum sodomense

<400> 12

Met Asp Pro Ile Ala Leu Gln Ala Gly Tyr Asp Leu Leu Gly Asp Gly
1 5 10 15

Arg Pro Glu Thr Leu Trp Leu Gly Ile Gly Thr Leu Leu Met Leu Ile
20 25 30

Gly Thr Phe Tyr Phe Leu Val Arg Gly Trp Gly Val Thr Asp Lys Asp
35 40 45

5

10

ES 2 742 492 T3

Ala Arg Glu Tyr Tyr Ala Val Thr Ile Leu Val Pro Gly Ile Ala Ser
50 55 60

Ala Ala Tyr Leu Ser Met Phe Phe Gly Ile Gly Leu Thr Glu Val Thr
65 70 75 80

Val Gly Gly Glu Met Leu Asp Ile Tyr Tyr Ala Arg Tyr Ala Asp Trp
85 90 95

Leu Phe Thr Thr Pro Leu Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Leu Ala Lys
100 105 110

Val Asp Arg Val Thr Ile Gly Thr Leu Val Gly Val Asp Ala Leu Met
115 120 125

Ile Val Thr Gly Leu Ile Gly Ala Leu Ser His Thr Ala Ile Ala Arg
130 135 140

Tyr Ser Trp Trp Leu Phe Ser Thr Ile Cys Met Ile Val Val Leu Tyr
145 150 155 160

Phe Leu Ala Thr Ser Leu Arg Ser Ala Ala Lys Glu Arg Gly Pro Glu
165 170 175

Val Ala Ser Thr Phe Asn Thr Leu Thr Ala Leu Val Leu Val Leu Trp
180 185 190

Thr Ala Tyr Pro Ile Leu Trp Ile Ile Gly Thr Glu Gly Ala Gly Val
195 200 205

Val Gly Leu Gly Ile Glu Thr Leu Leu Phe Met Val Leu Asp Val Thr
210 215 220

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

Gly Asp Thr Glu Ala Pro Glu Pro Ser Ala Gly Ala Asp Val Ser Ala
245 250 255

Ala Asp

<210> 13

<211> 534

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética de aminoácidos

<400> 13

ES 2 742 492 T3

Met	Asp	Pro	Ile	Ala	Leu	Gln	Ala	Gly	Tyr	Asp	Leu	Leu	Gly	Asp	Gly	1	5	10	15
Arg	Pro	Glu	Thr	Leu	Trp	Leu	Gly	Ile	Gly	Thr	Leu	Leu	Met	Leu	Ile	20	25	30	
Gly	Thr	Phe	Tyr	Phe	Leu	Val	Arg	Gly	Trp	Gly	Val	Thr	Asp	Lys	Asp	35	40	45	
Ala	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Ala	Val	Thr	Ile	Leu	Val	Pro	Gly	Ile	Ala	Ser	50	55	60	
Ala	Ala	Tyr	Leu	Ser	Met	Phe	Phe	Gly	Ile	Gly	Leu	Thr	Glu	Val	Thr	65	70	75	80
Val	Gly	Gly	Glu	Met	Leu	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Arg	Tyr	Ala	Asp	Trp	85	90	95	
Leu	Phe	Thr	Thr	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Lys	100	105	110	
Val	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Gly	Thr	Leu	Val	Gly	Val	Asp	Ala	Leu	Met	115	120	125	
Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Ile	Gly	Ala	Leu	Ser	His	Thr	Ala	Ile	Ala	Arg	130	135	140	
Tyr	Ser	Trp	Trp	Leu	Phe	Ser	Thr	Ile	Cys	Met	Ile	Val	Val	Leu	Tyr	145	150	155	160
Phe	Leu	Ala	Thr	Ser	Leu	Arg	Ser	Ala	Ala	Lys	Glu	Arg	Gly	Pro	Glu	165	170	175	
Val	Ala	Ser	Thr	Phe	Asn	Thr	Leu	Thr	Ala	Leu	Val	Leu	Val	Leu	Trp	180	185	190	
Thr	Ala	Tyr	Pro	Ile	Leu	Trp	Ile	Ile	Gly	Thr	Glu	Gly	Ala	Gly	Val	195	200	205	
Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Glu	Thr	Leu	Leu	Phe	Met	Val	Leu	Asp	Val	Thr	210	215	220	
Ala	Lys	Val	Gly	Phe	Gly	Phe	Ile	Leu	Leu	Arg	Ser	Arg	Ala	Ile	Leu	225	230	235	240

ES 2 742 492 T3

Gly Asp Thr Glu Ala Pro Glu Pro Ser Ala Gly Ala Asp Val Ser Ala
 245 250 255
 Ala Asp Arg Pro Val Val Ala Val Ser Lys Ala Ala Ala Lys Ser Arg
 260 265 270
 Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr Ile Pro Leu Asp Gln Ile Asp Ile Asn
 275 280 285
 Val Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 290 295 300
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 305 310 315 320
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 325 330 335
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 340 345 350
 Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 355 360 365
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 370 375 380
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 385 390 395 400
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 405 410 415
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 420 425 430
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 435 440 445
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 450 455 460
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 465 470 475 480
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu

ES 2 742 492 T3

485

490

495

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
500 505 510

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Phe
515 520 525

Cys Tyr Glu Asn Glu Val
530

<210> 14

5 <211> 248

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia sintética de aminoácidos

<400> 14

Met Asp Pro Ile Ala Leu Gln Ala Gly Tyr Asp Leu Leu Gly Asp Gly
1 5 10 15

Arg Pro Glu Thr Leu Trp Leu Gly Ile Gly Thr Leu Leu Met Leu Ile
20 25 30

Gly Thr Phe Tyr Phe Ile Val Lys Gly Trp Gly Val Thr Asp Lys Glu
35 40 45

Ala Arg Glu Tyr Tyr Ser Ile Thr Ile Leu Val Pro Gly Ile Ala Ser
50 55 60

Ala Ala Tyr Leu Ser Met Phe Phe Gly Ile Gly Leu Thr Glu Val Thr
65 70 75 80

Val Ala Gly Glu Val Leu Asp Ile Tyr Tyr Ala Arg Tyr Ala Asp Trp
85 90 95

Leu Phe Thr Thr Pro Leu Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Leu Ala Lys
100 105 110

Val Asp Arg Val Ser Ile Gly Thr Leu Val Gly Val Asp Ala Leu Met
115 120 125

Ile Val Thr Gly Leu Ile Gly Ala Leu Ser His Thr Pro Leu Ala Arg
130 135 140

Tyr Ser Trp Trp Leu Phe Ser Thr Ile Cys Met Ile Val Val Leu Tyr
145 150 155 160

15

ES 2 742 492 T3

Phe Leu Ala Thr Ser Leu Arg Ala Ala Ala Lys Glu Arg Gly Pro Glu
165 170 175

Val Ala Ser Thr Phe Asn Thr Leu Thr Ala Leu Val Leu Val Leu Trp
180 185 190

Thr Ala Tyr Pro Ile Leu Trp Ile Ile Gly Thr Glu Gly Ala Gly Val
195 200 205

Val Gly Leu Gly Ile Glu Thr Leu Leu Phe Met Val Leu Asp Val Thr
210 215 220

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

Gly Asp Thr Glu Ala Pro Glu Pro
245

<210> 15

<211> 321

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética de aminoácidos

<400> 15

Met Ile Val Asp Gln Phe Glu Glu Val Leu Met Lys Thr Ser Gln Leu
1 5 10 15

Phe Pro Leu Pro Thr Ala Thr Gln Ser Ala Gln Pro Thr His Val Ala
20 25 30

Pro Val Pro Thr Val Leu Pro Asp Thr Pro Ile Tyr Glu Thr Val Gly
35 40 45

Asp Ser Gly Ser Lys Thr Leu Trp Val Val Phe Val Leu Met Leu Ile
50 55 60

Ala Ser Ala Ala Phe Thr Ala Leu Ser Trp Lys Ile Pro Val Asn Arg
65 70 75 80

Arg Leu Tyr His Val Ile Thr Thr Ile Ile Thr Leu Thr Ala Ala Leu
85 90 95

Ser Tyr Phe Ala Met Ala Thr Gly His Gly Val Ala Leu Asn Lys Ile
100 105 110

ES 2 742 492 T3

Val Ile Arg Thr Gln His Asp His Val Pro Asp Thr Tyr Glu Thr Val
115 120 125

Tyr Arg Gln Val Tyr Tyr Ala Arg Tyr Ile Asp Trp Ala Ile Thr Thr
130 135 140

Pro Leu Leu Leu Leu Asp Leu Gly Leu Leu Ala Gly Met Ser Gly Ala
145 150 155 160

His Ile Phe Met Ala Ile Val Ala Asp Leu Ile Met Val Leu Thr Gly
165 170 175

Leu Phe Ala Ala Phe Gly Ser Glu Gly Thr Pro Gln Lys Trp Gly Trp
180 185 190

Tyr Thr Ile Ala Cys Ile Ala Tyr Ile Phe Val Val Trp His Leu Val
195 200 205

Leu Asn Gly Gly Ala Asn Ala Arg Val Lys Gly Glu Lys Leu Arg Ser
210 215 220

Phe Phe Val Ala Ile Gly Ala Tyr Thr Leu Ile Leu Trp Thr Ala Tyr
225 230 235 240

Pro Ile Val Trp Gly Leu Ala Asp Gly Ala Arg Lys Ile Gly Val Asp
245 250 255

Gly Glu Ile Ile Ala Tyr Ala Val Leu Asp Val Leu Ala Lys Gly Val
260 265 270

Phe Gly Ala Trp Leu Leu Val Thr His Ala Asn Leu Arg Glu Ser Asp
275 280 285

Val Glu Leu Asn Gly Phe Trp Ala Asn Gly Leu Asn Arg Glu Gly Ala
290 295 300

Ile Arg Ile Gly Glu Asp Asp Gly Ala Arg Pro Val Val Ala Val Ser
305 310 315 320

Lys

<210> 16
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16

ES 2 742 492 T3

Lys Ser Arg Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr Ile Pro Leu Asp Gln Ile
1 5 10 15

Asp Ile Asn Val
20

<210> 17
<211> 26
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser
20 25

<210> 18
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Ala Gly His Ser Asn Ser Met Ala Leu Phe Ser Phe Ser Leu Leu
1 5 10 15

Trp Leu Cys Ser Gly Val Leu Gly Thr Glu Phe
20 25

<210> 19
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Gly Leu Arg Ala Leu Met Leu Trp Leu Leu Ala Ala Ala Gly Leu
1 5 10 15

Val Arg Glu Ser Leu Gln Gly
20

<210> 20
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Arg Gly Thr Pro Leu Leu Leu Val Val Ser Leu Phe Ser Leu Leu
1 5 10 15

Gln Asp

5 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia sintética de aminoácidos

 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(3)
 <223> el aminoácido en esta posición puede ser cualquier aminoácido

 15 <400> 21

 Val Xaa Xaa Ser Leu
 1 5

 20 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> secuencia sintética de aminoácidos

 <400> 22

 Val Lys Glu Ser Leu
 1 5

 30 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> secuencia sintética de aminoácidos

 40 <400> 23

 Val Leu Gly Ser Leu
 1 5

 45 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> secuencia sintética de aminoácidos

 <400> 24

 Asn Ala Asn Ser Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val Ala Leu Thr Ser Lys
 1 5 10 15

 55 <210> 25
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética de aminoácidos

5

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2).. (2)

<223> el aminoácido en esta posición puede ser cualquier aminoácido

10

<400> 25

Phe Xaa Tyr Glu Asn Glu
1 5

15

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> secuencia sintética de aminoácidos

<400> 26

Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val
1 5

25

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> secuencia sintética de aminoácidos

35

<400> 27

Met Thr Glu Thr Leu Pro Pro Val Thr Glu Ser Ala Val Ala Leu Gln
1 5 10 15

Ala Glu

40

<210> 28

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> secuencia sintética de aminoácidos

<400> 28

ES 2 742 492 T3

Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	
1				5					10					15		
Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	
			20					25					30			
Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	
		35					40					45				
Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe	
	50					55					60					
Gly	Tyr	Gly	Leu	Gln	Cys	Phe	Ala	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	
65					70					75					80	
His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	
				85					90					95		
Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	
			100					105					110			
Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	
		115					120					125				
Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	
		130				135					140					
Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	
145				150						155					160	
Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	
			165					170						175		
Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	
			180					185					190			
Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	
	195					200					205					
Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	
	210					215					220					
Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys			
225					230					235						

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido sensible a la luz activadora o un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido sensible a la luz, para usar en un método de modulación de una característica de ansiedad en un sujeto, comprendiendo el método:

a) activar una entrada de neurona piramidal de la amígdala basolateral (BLA) a un núcleo del lecho anterodorsal de las neuronas de la estría terminal (BNST) mediante: i) expresión del polipéptido sensible a la luz activadora en la neurona BNST, en donde el polipéptido sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEQ ID NO: 5-11; y ii) exposición de la neurona BNST anterodorsal a la luz de una longitud de onda activadora, activando de este modo la neurona piramidal BLA, en donde dicha activación reduce la evitación del riesgo y reduce la frecuencia respiratoria; o
b) en donde dicha modulación comprende activar una proyección de neurona BNST anterodorsal hacia el hipotálamo lateral mediante: i) expresión del polipéptido sensible a la luz activadora en la proyección de la neurona BNST anterodorsal, en donde el polipéptido sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEQ ID NO: 5-11; y ii) exposición de la proyección de la neurona BNST anterodorsal a la luz de una longitud de onda activadora, en donde dicha activación reduce la evitación del riesgo y no tiene un efecto sustancial sobre la frecuencia respiratoria; o
c) en donde dicha modulación comprende activar una proyección de neurona BNST anterodorsal hacia el núcleo parabraquial mediante: i) expresión del polipéptido sensible a la luz activadora en la proyección de la neurona BNST anterodorsal, en donde el polipéptido sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEQ ID NO: 5-11; y ii) exposición de la proyección de la neurona BNST anterodorsal a la luz de una longitud de onda activadora, de modo que se activa la proyección de la neurona BNST anterodorsal, en donde dicha activación reduce la frecuencia respiratoria y no tiene un efecto sustancial sobre la conducta de evitación del riesgo.

2. El polipéptido o el ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la característica es la frecuencia respiratoria, la evitación de riesgos o la aversión.

3. El polipéptido o el ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la modulación comprende además activar una proyección de neurona BNST anterodorsal en el área tegmentaria ventral, en donde dicha activación da como resultado un comportamiento normalizado.

4. El polipéptido o el ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende activar una entrada de neurona piramidal de la BLA a una neurona del BNST anterodorsal mediante: i) expresión del polipéptido sensible a la luz activadora en la neurona BNST, en donde el polipéptido sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEQ ID NO: 5-11; y ii) exposición de la neurona BNST anterodorsal a la luz de una longitud de onda activadora, activando de este modo la neurona piramidal BLA, en donde dicha activación reduce la evitación del riesgo y reduce la frecuencia respiratoria.

5. El polipéptido o el ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende activar una proyección de neurona BNST anterodorsal hacia el hipotálamo lateral mediante: i) expresión del polipéptido sensible a la luz activadora en la proyección de la neurona BNST anterodorsal, en donde el polipéptido sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEQ ID NO: 5-11; y ii) exposición de la proyección de la neurona BNST anterodorsal a la luz de una longitud de onda activadora, en donde dicha activación reduce la evitación del riesgo y no tiene un efecto sustancial sobre la frecuencia respiratoria.

6. El polipéptido o el ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende activar una proyección de neurona BNST anterodorsal hacia el núcleo parabraquial mediante: i) expresión del polipéptido sensible a la luz activadora en la proyección de la neurona BNST anterodorsal, en donde el polipéptido sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEQ ID NO: 5-11; y ii) exposición de la proyección de la neurona BNST anterodorsal a la luz de una longitud de onda activadora, de modo que se activa la proyección de la neurona BNST anterodorsal, en donde dicha activación reduce la frecuencia respiratoria y no tiene un efecto sustancial sobre la conducta de evitación del riesgo.

7. Un método para identificar un agente candidato para el tratamiento de un trastorno del comportamiento, comprendiendo el procedimiento

a) administrar un agente de prueba a un modelo de comportamiento de roedor; y
b) determinar el efecto del agente de prueba en una o más características conductuales y/o fisiológicas de un trastorno del comportamiento; en donde el roedor comprende:
un polipéptido inhibidor sensible a la luz expresado en una entrada de neurona piramidal de la amígdala basolateral (BLA) a una neurona BNST anterodorsal, en donde el polipéptido inhibidor sensible a la luz comprende una

secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEQ ID NO: 1, 4, 12, 14 o 15, y en donde la exposición de la neurona piramidal de la BLA a la luz de una longitud de onda activadora induce ansiedad y aumenta la frecuencia respiratoria en el roedor.

- 5 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el roedor comprende un polipéptido inhibidor sensible a la luz expresado en una entrada de neurona piramidal amígdala basolateral (BLA) a una neurona BNST anterodorsal, en donde el polipéptido inhibidor sensible a la luz comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una de las SEQ ID NO: 1, 4, 12, 14 o 15, y en donde la exposición de la neurona piramidal de la BLA a la luz de una longitud de onda activadora induce ansiedad y aumenta la frecuencia
- 10 respiratoria en el roedor.

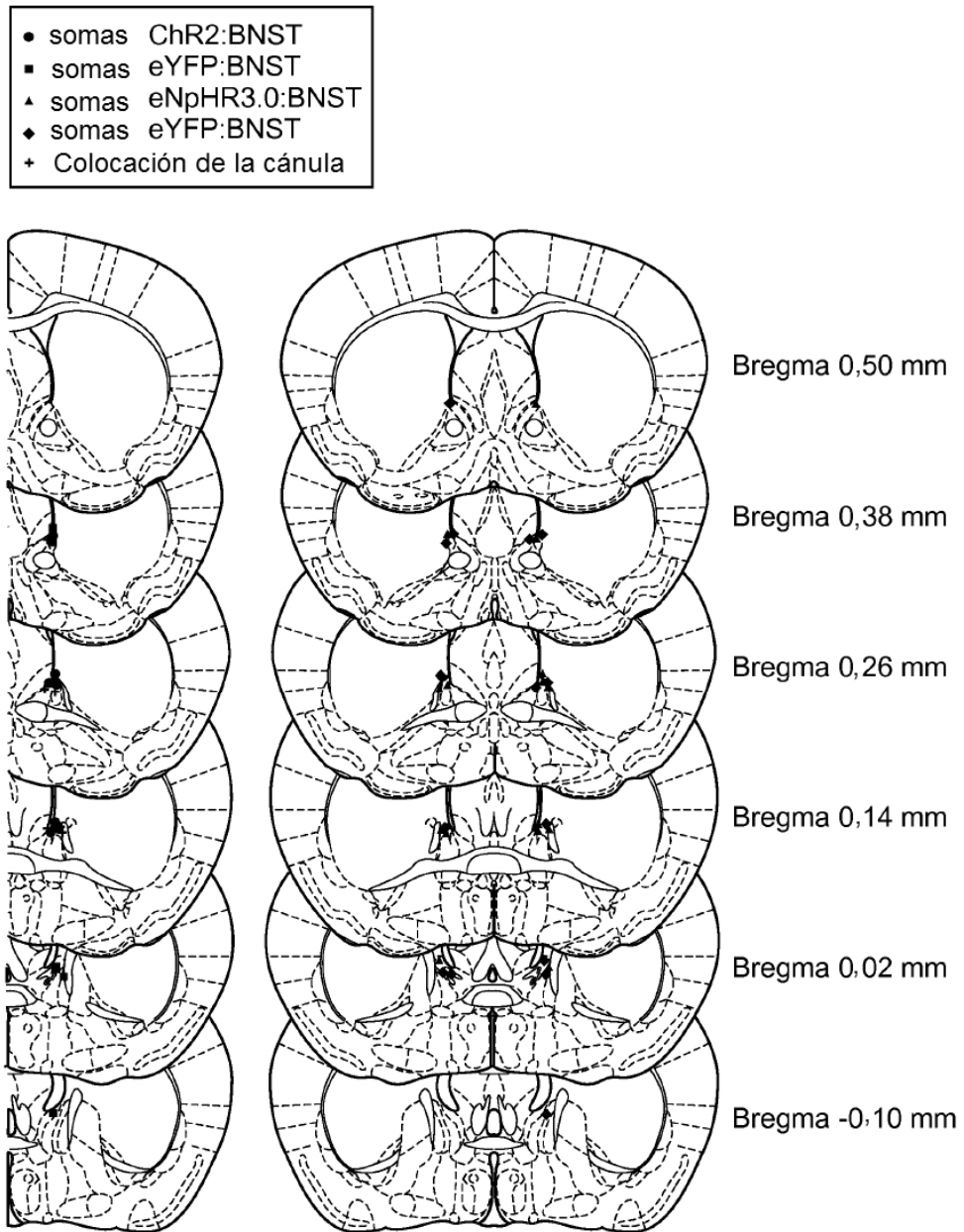


FIG. 1

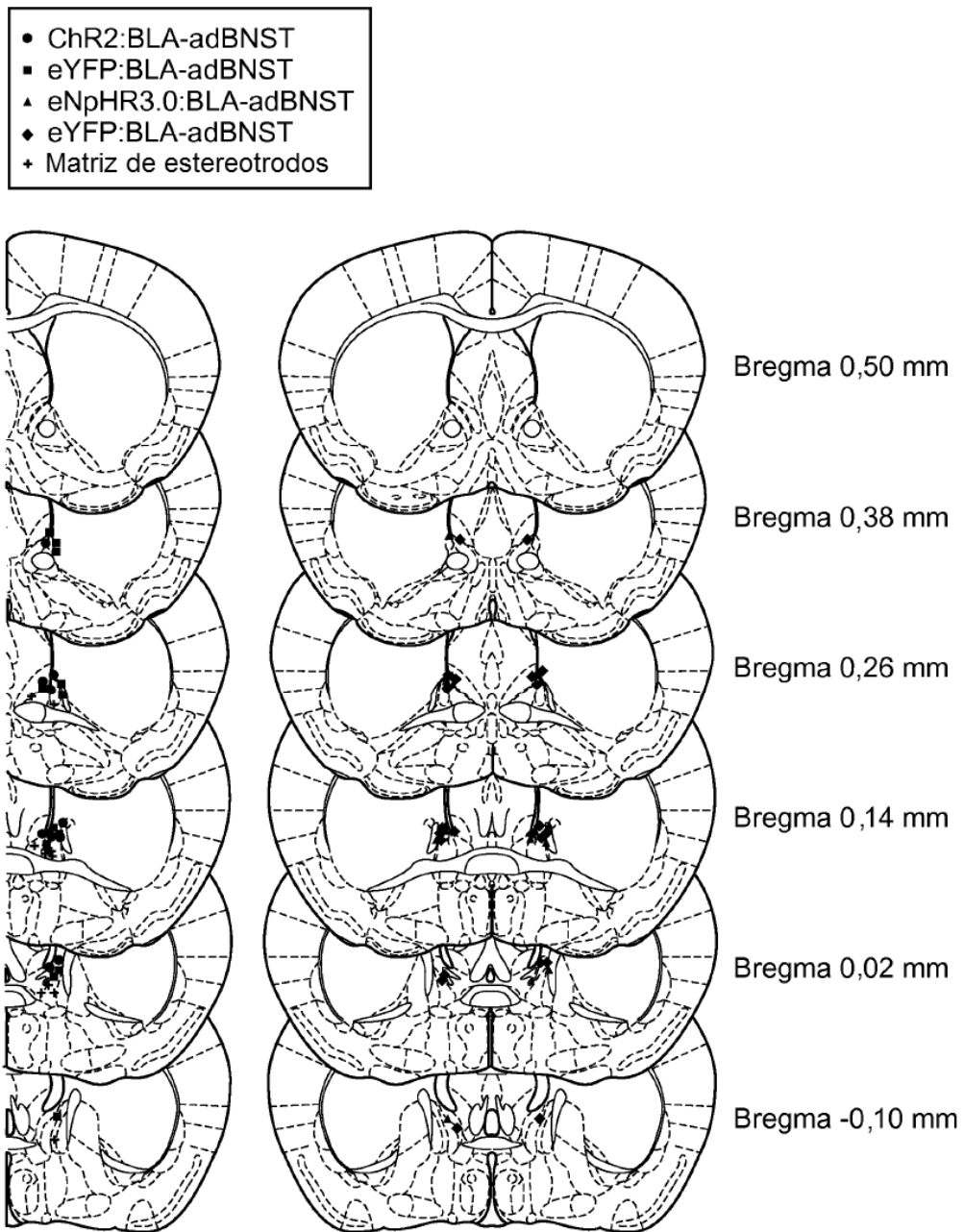


FIG. 2

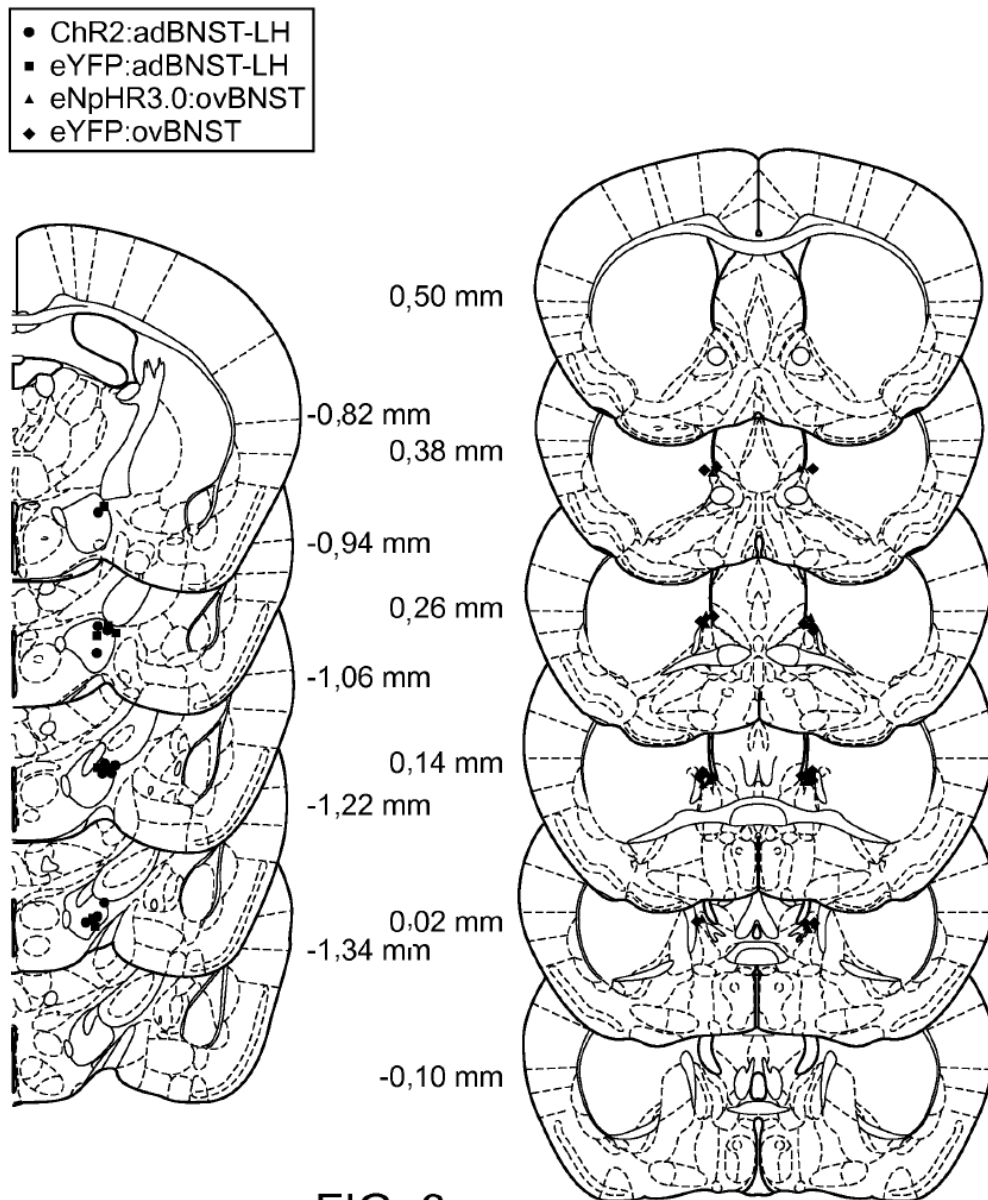
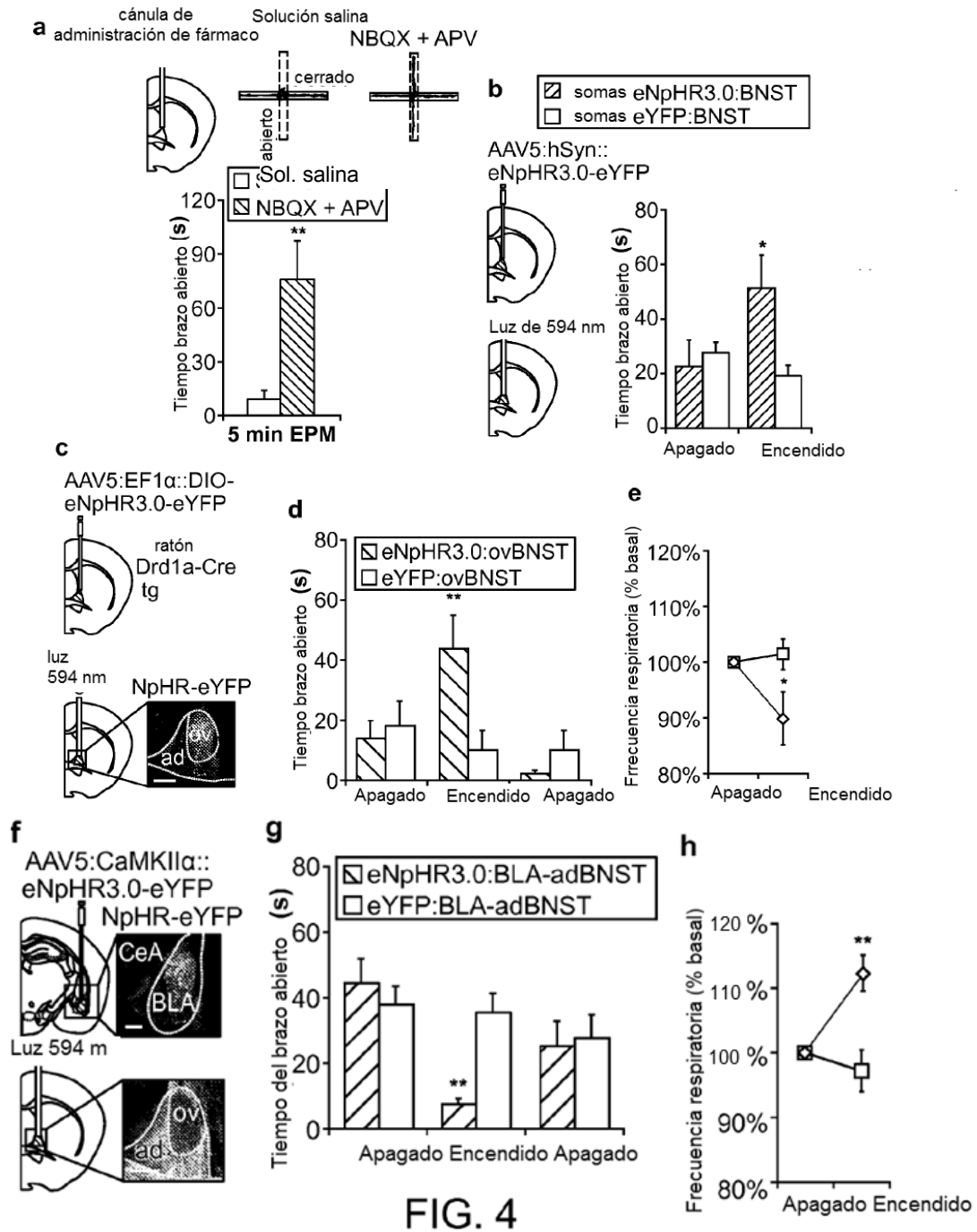


FIG. 3



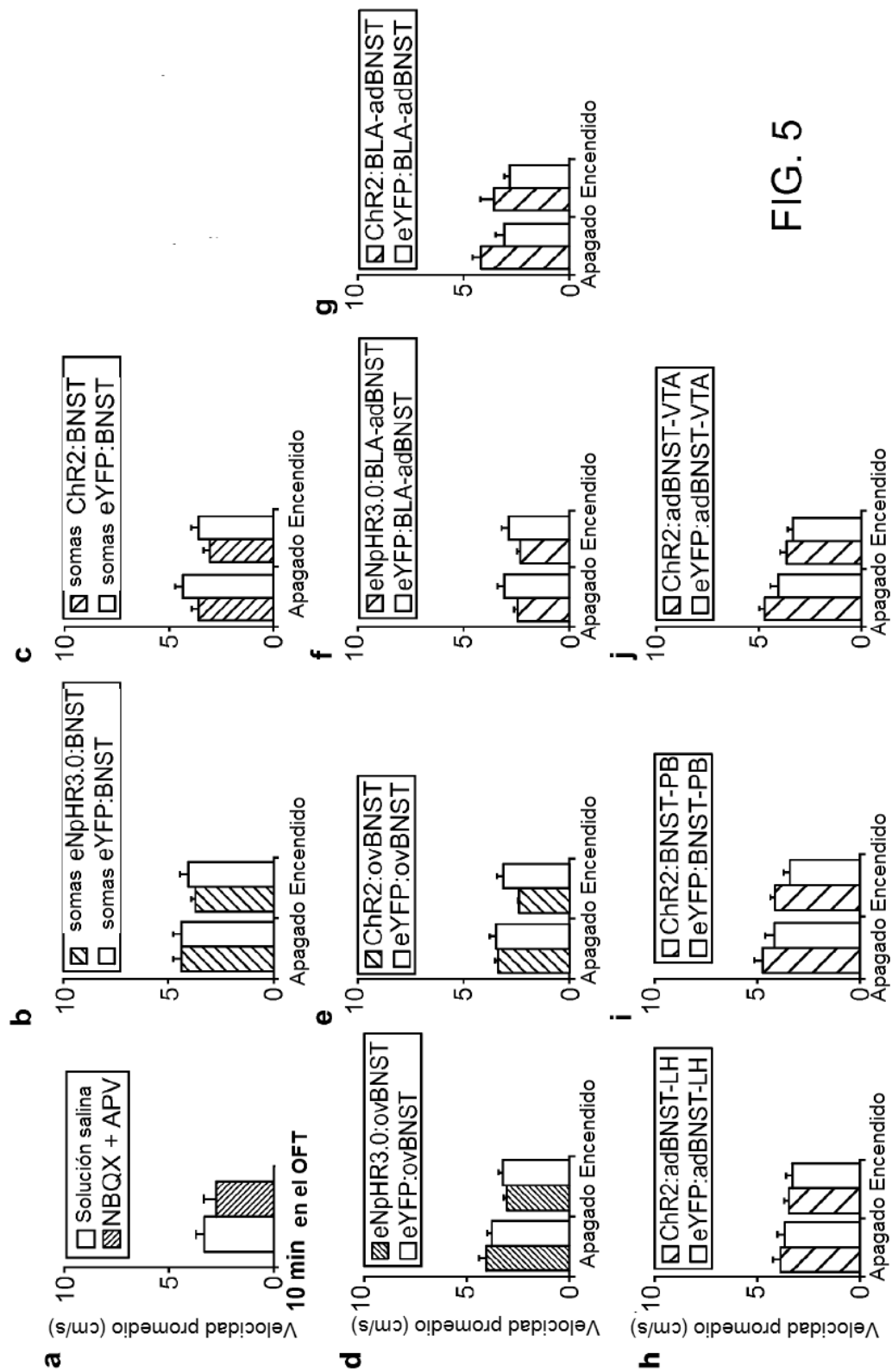


FIG. 5

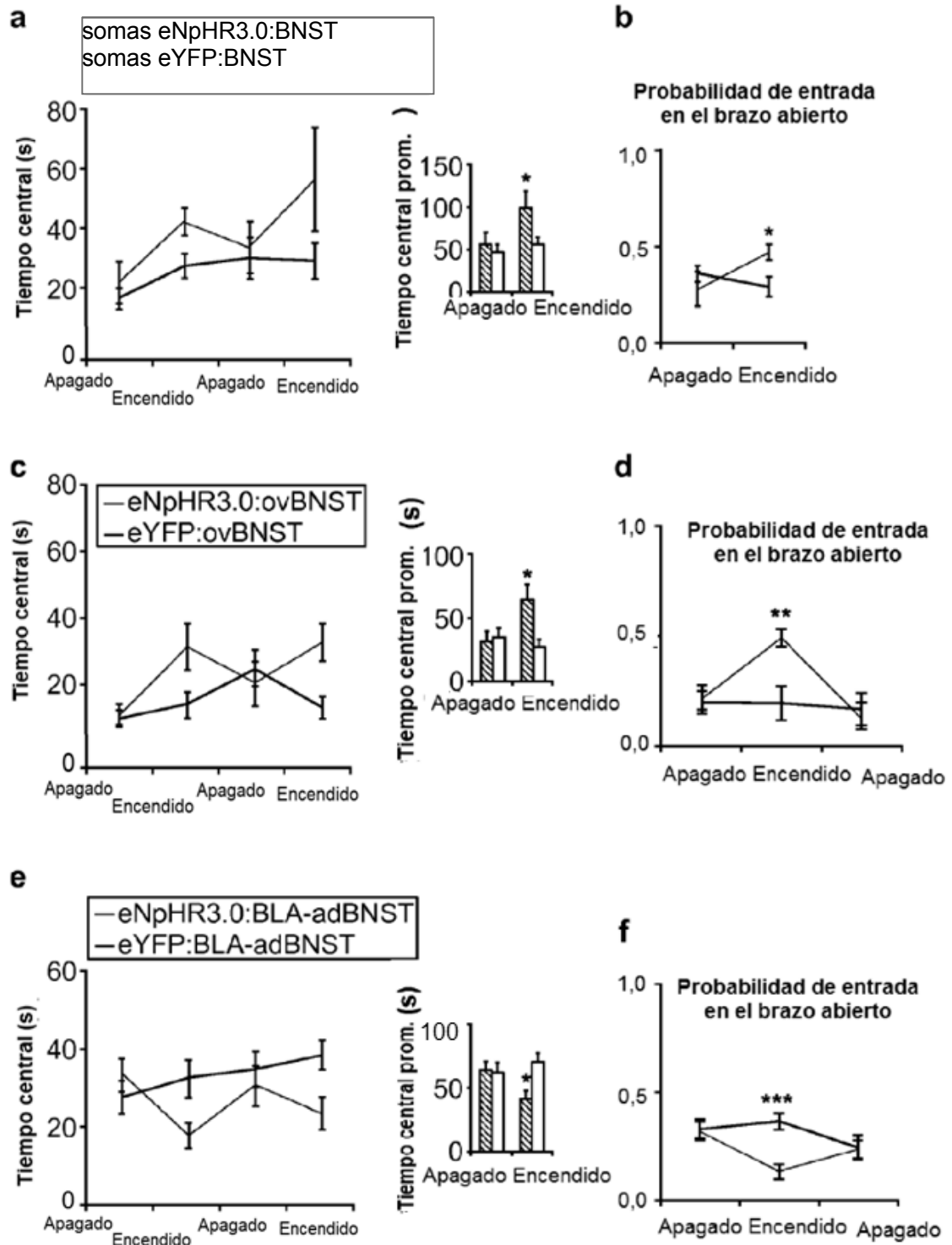


FIG. 6

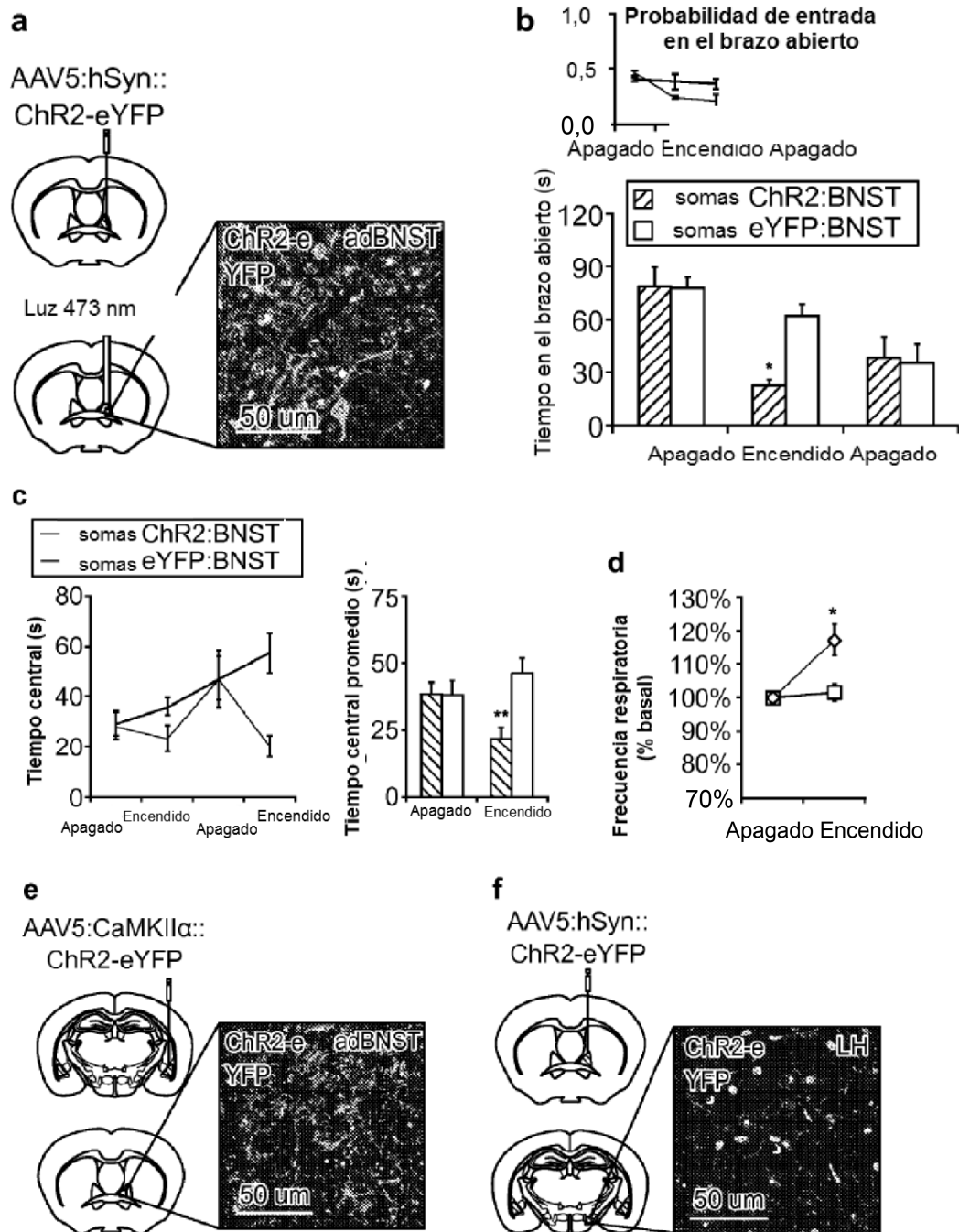


FIG. 7

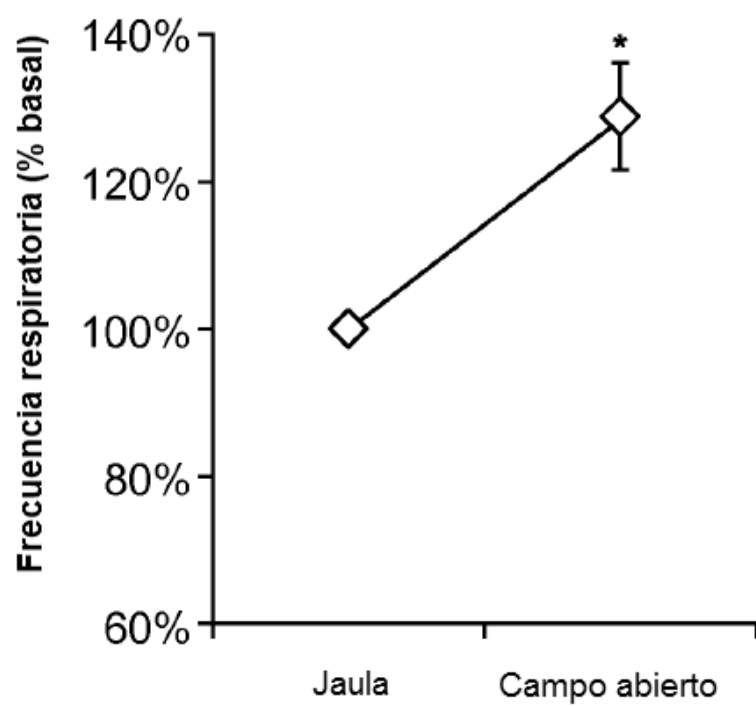


FIG. 8

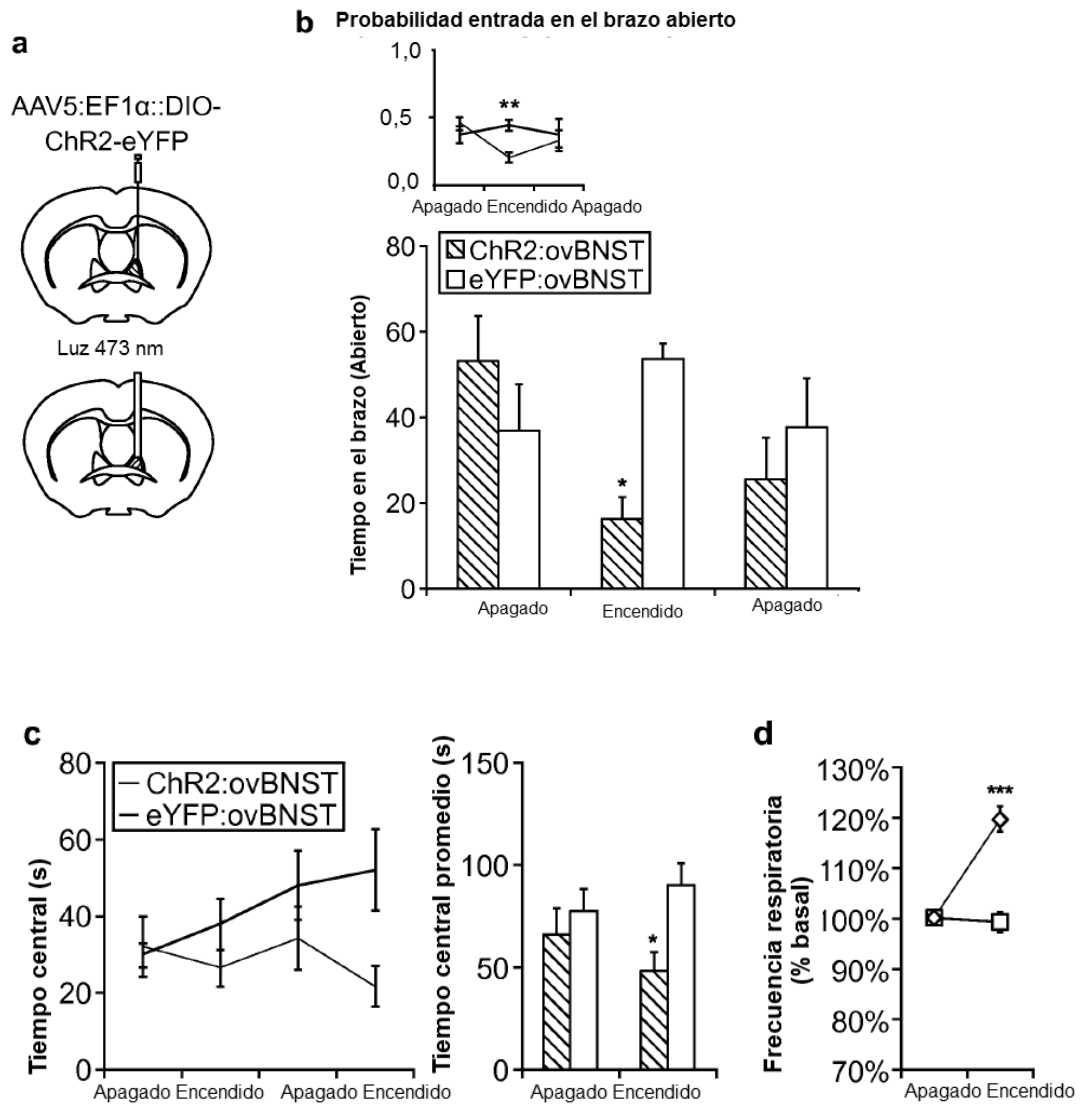


FIG. 9

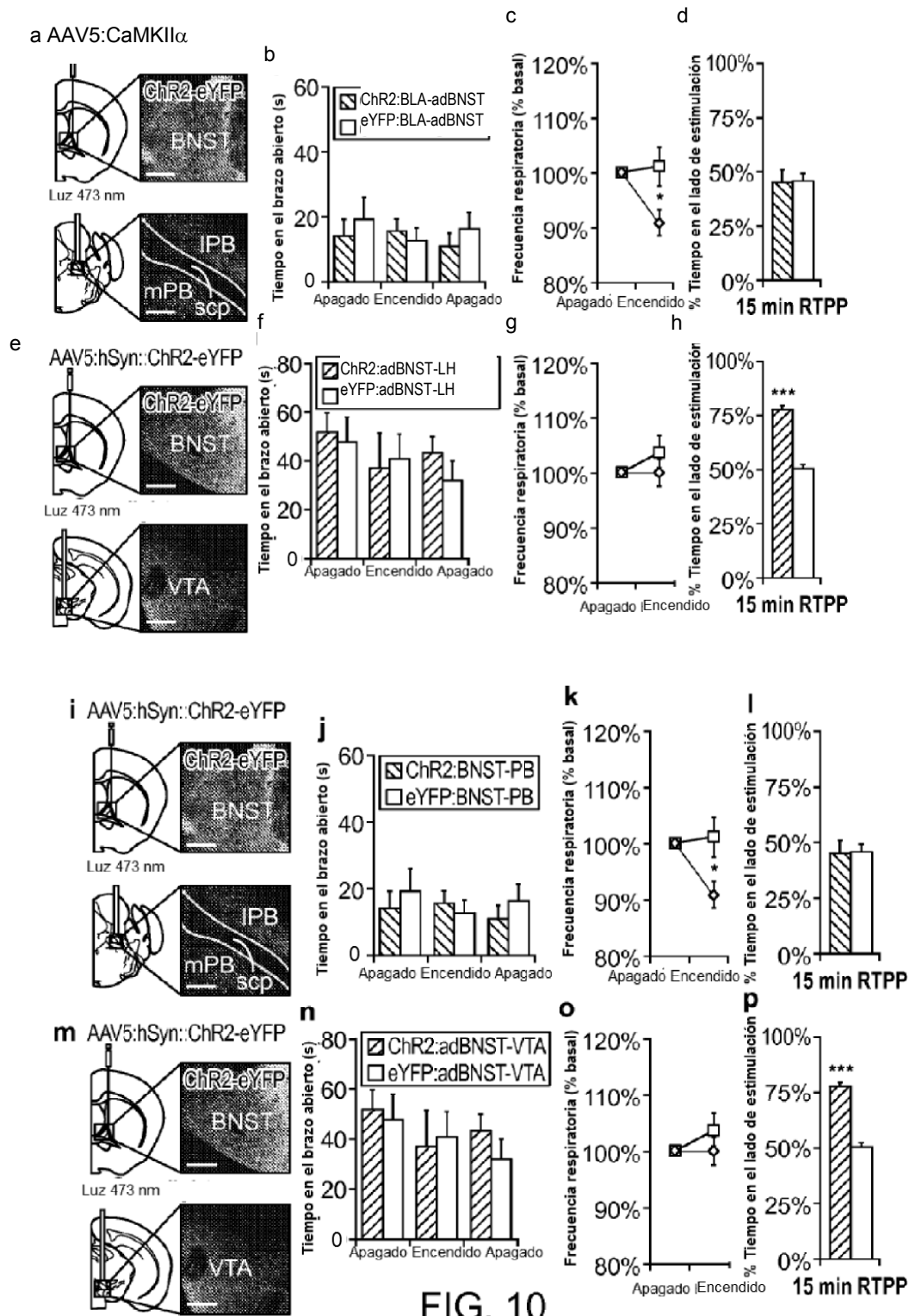


FIG. 10

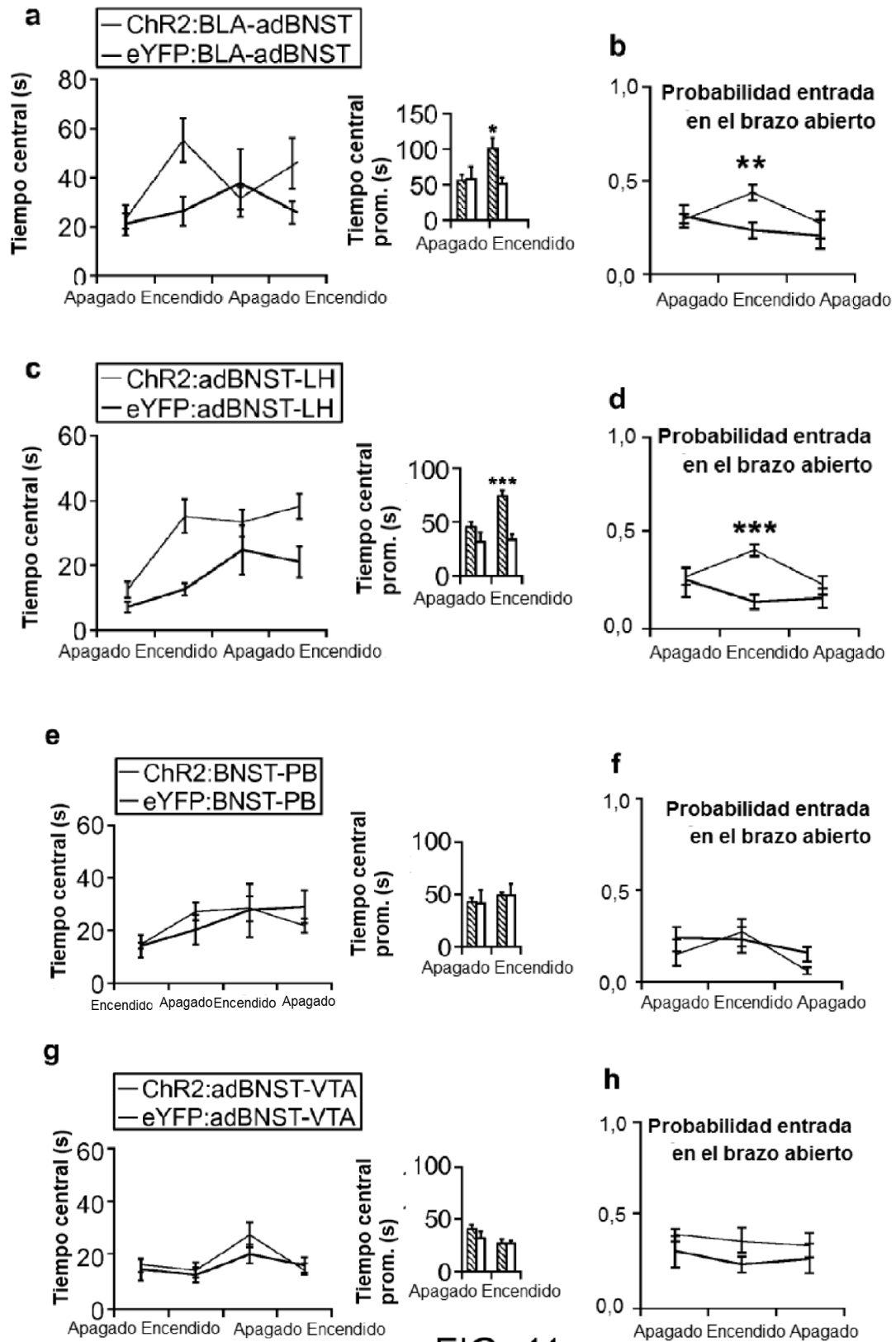


FIG. 11

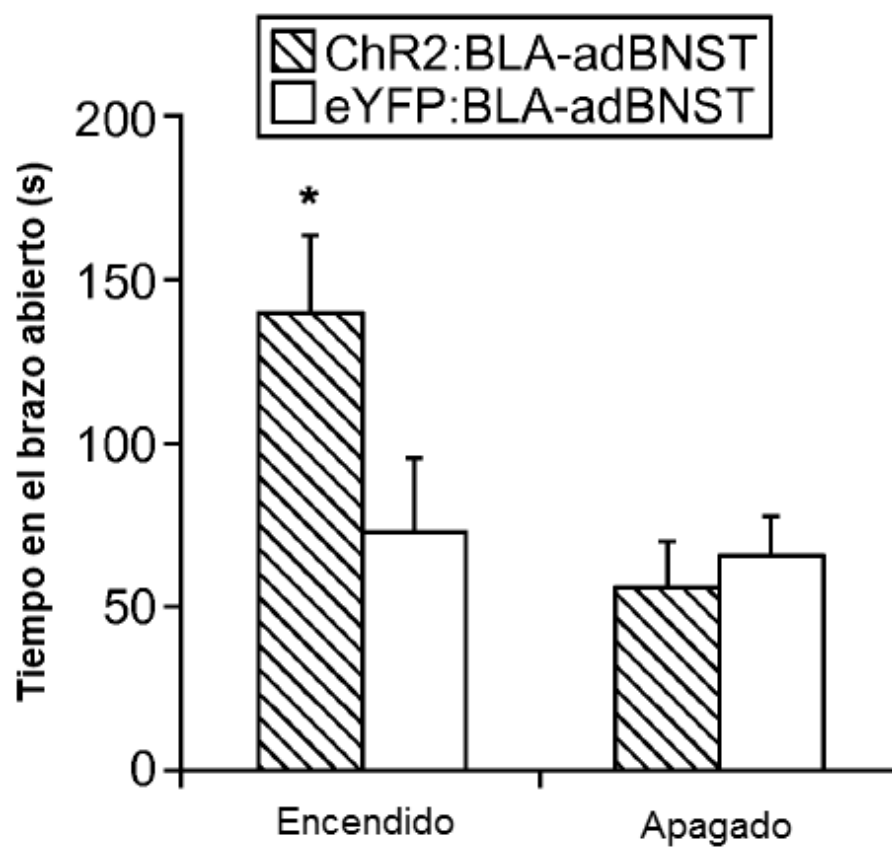


FIG. 12

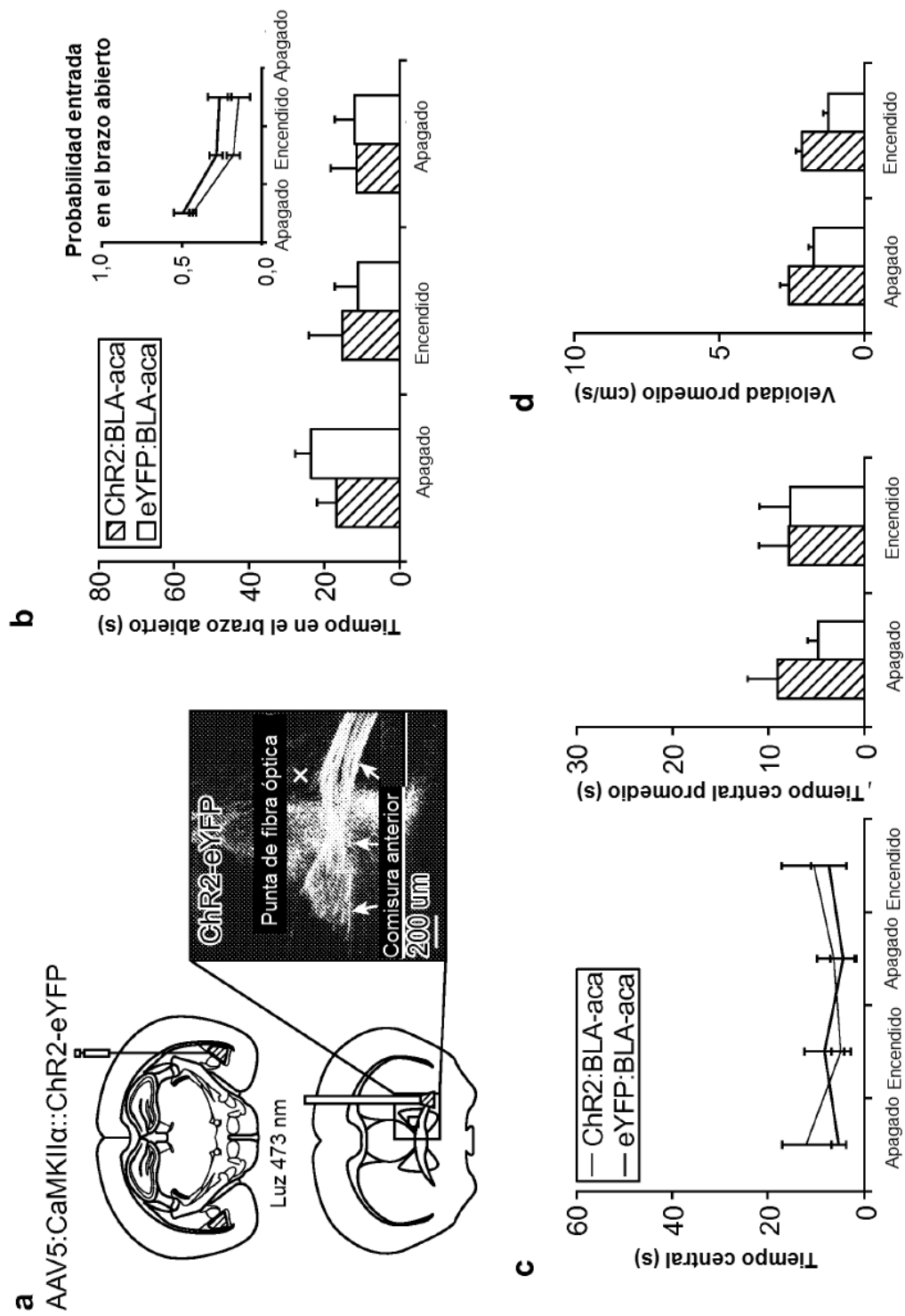


FIG. 13

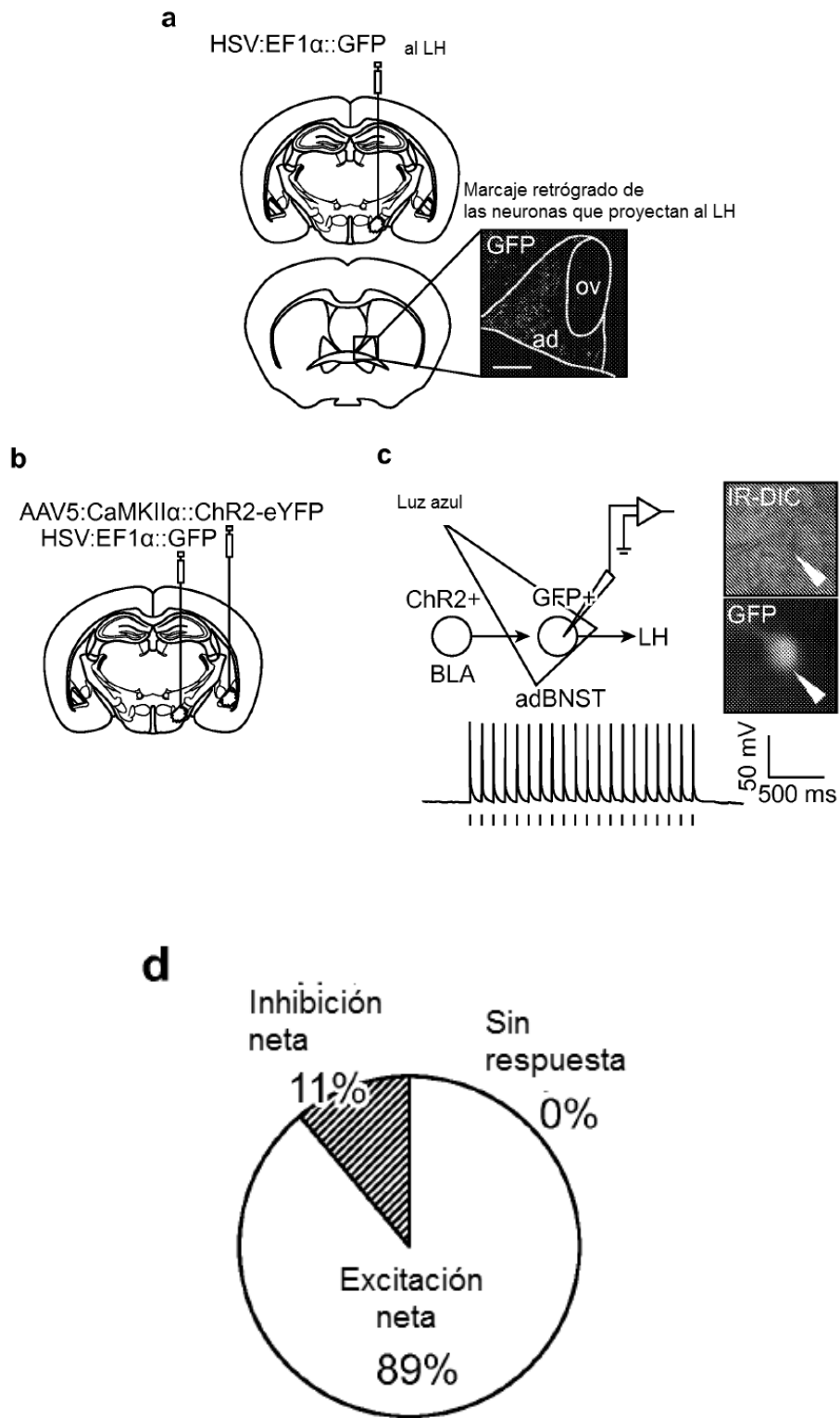


FIG. 14

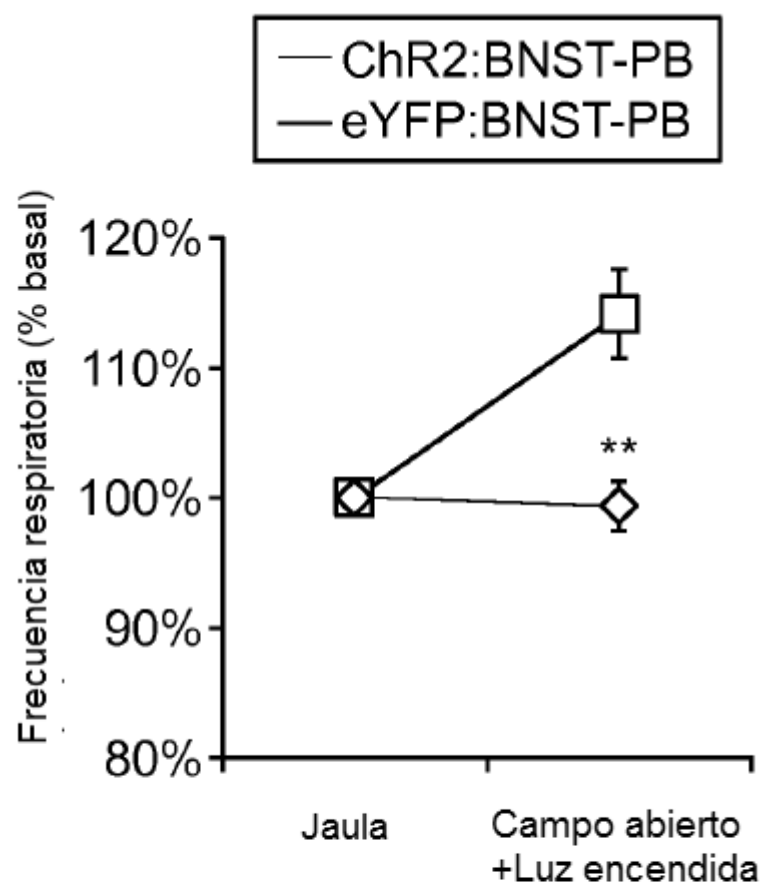


FIG. 15

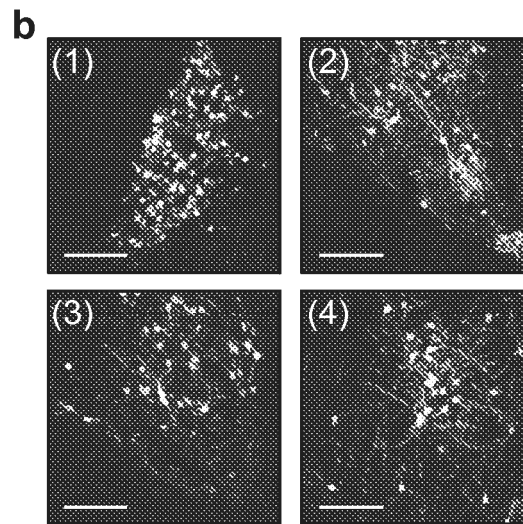
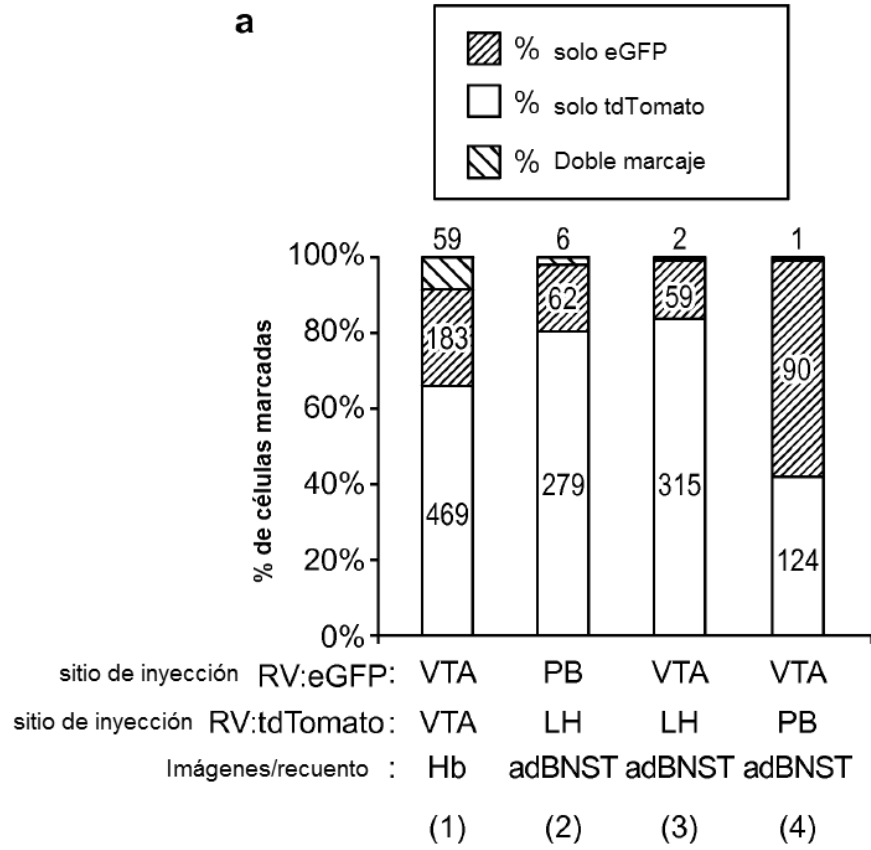


FIG. 16

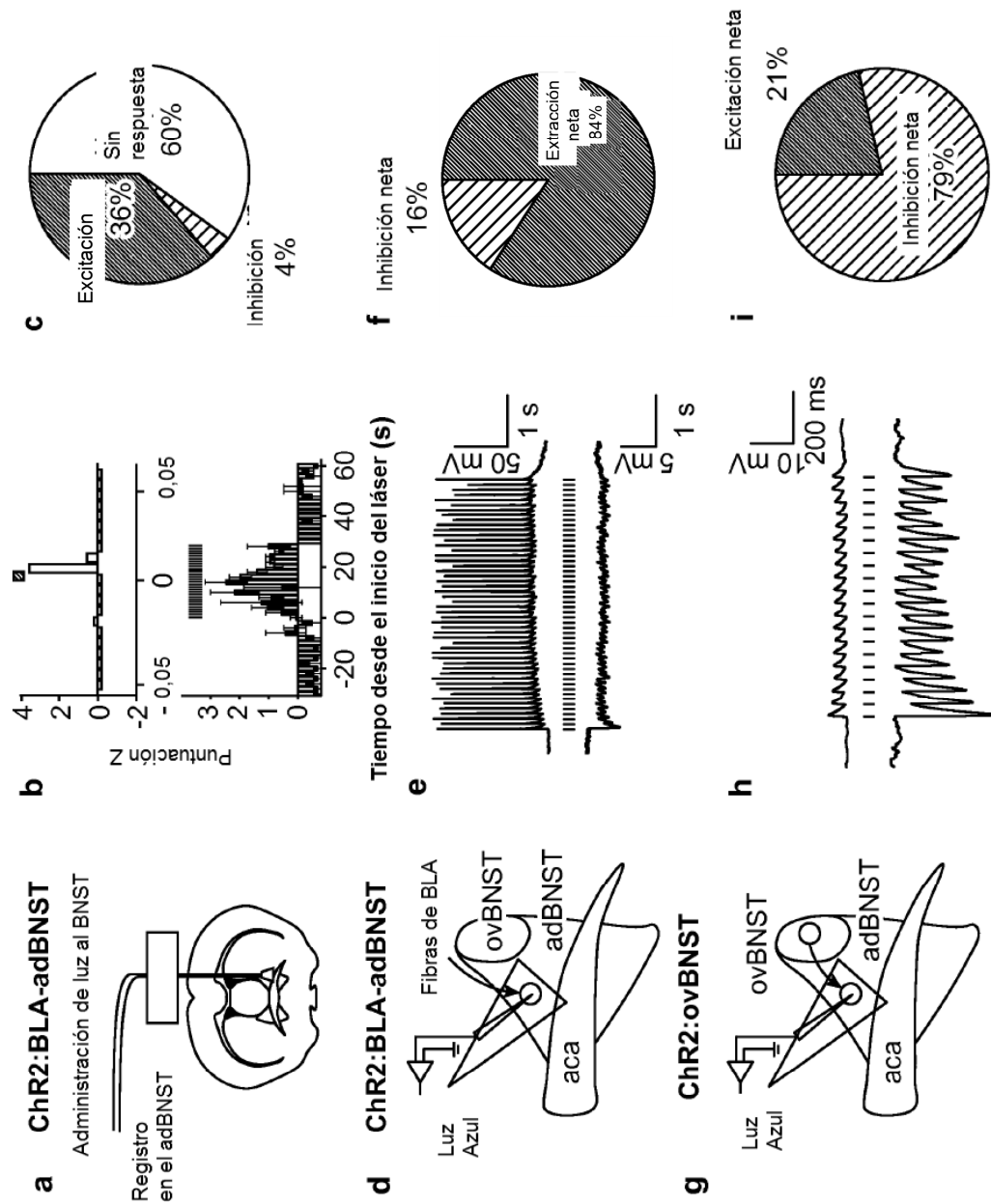


FIG. 17

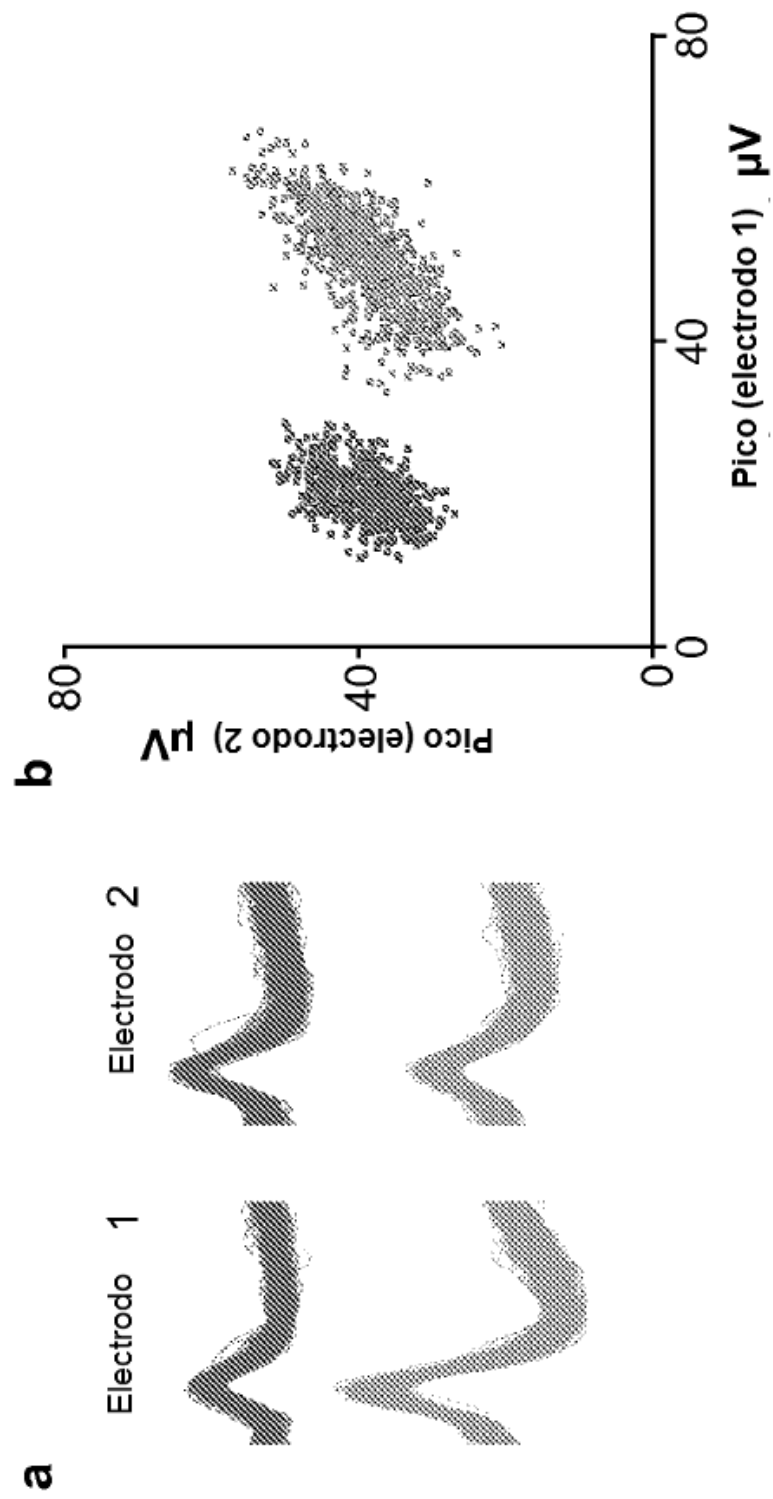


FIG. 18

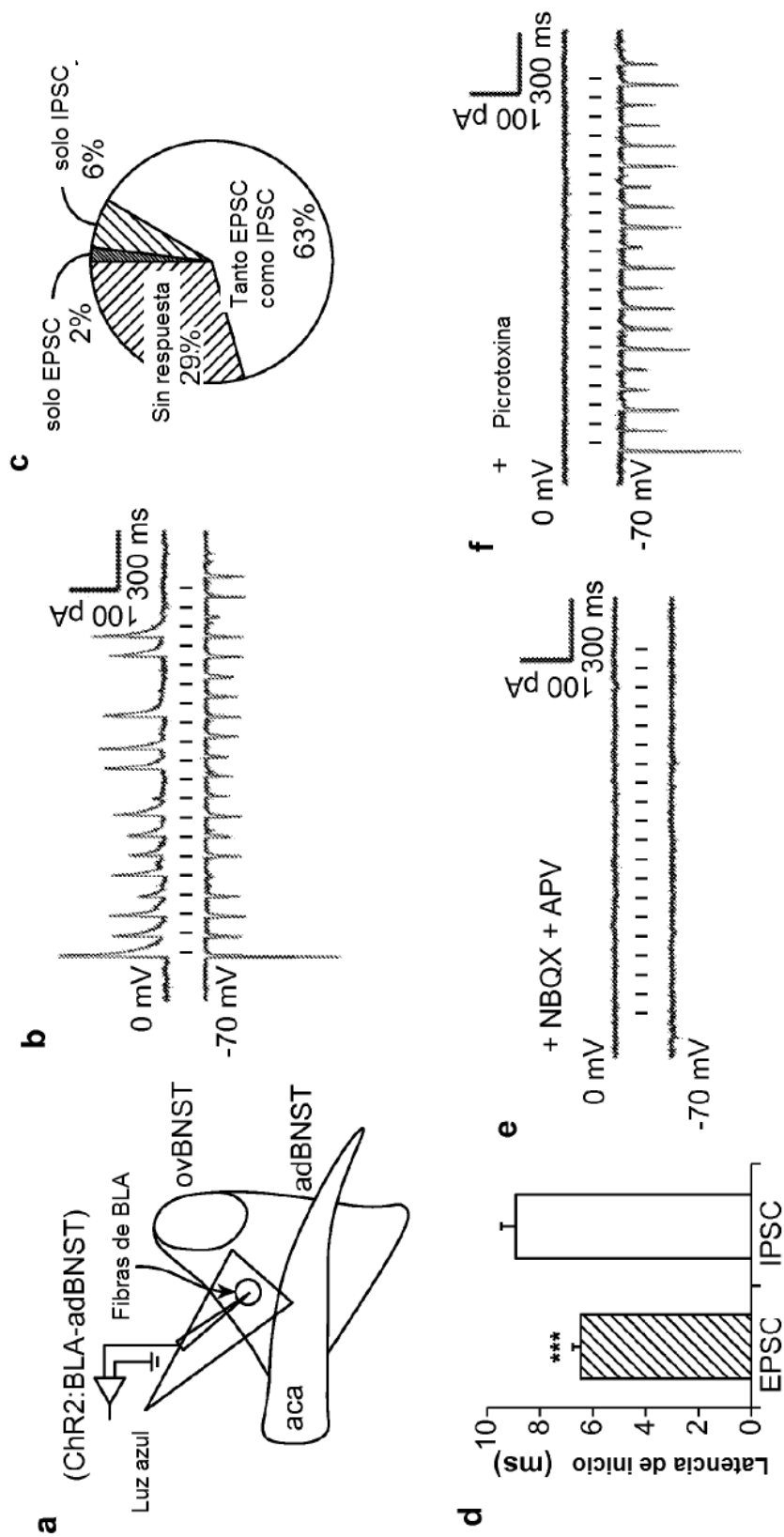


FIG. 19

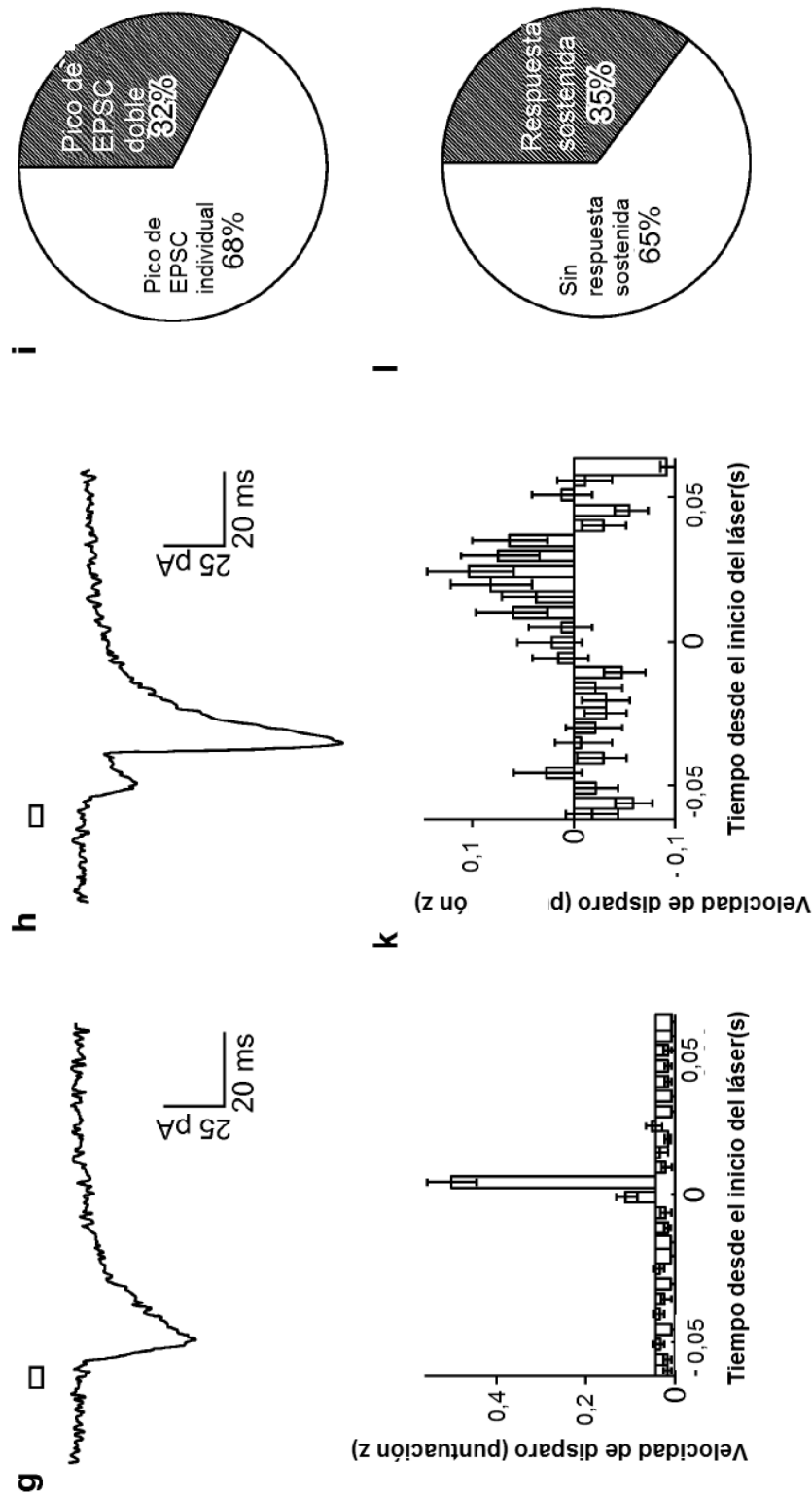


FIG. 19 (Cont.)

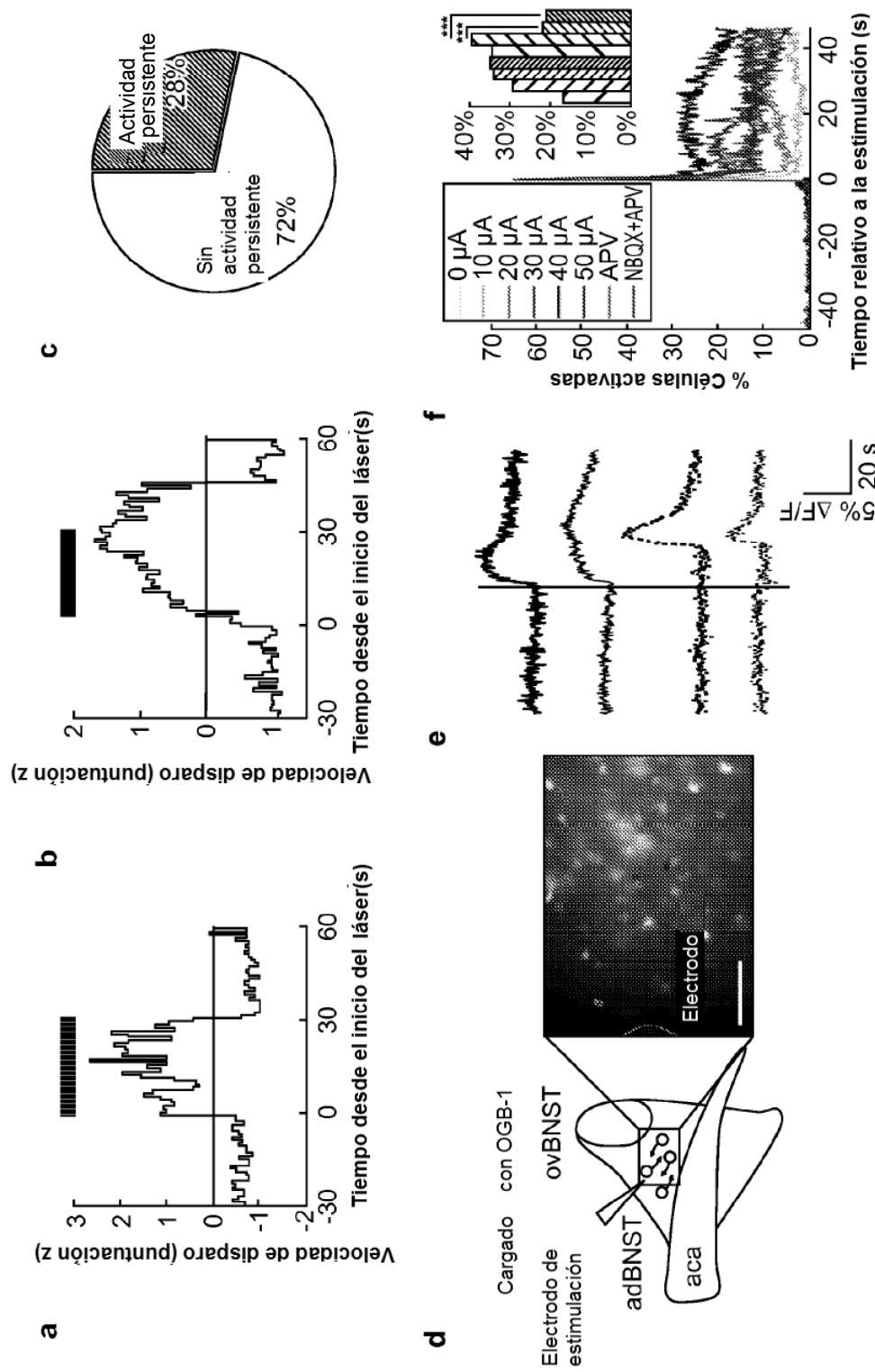


FIG 20

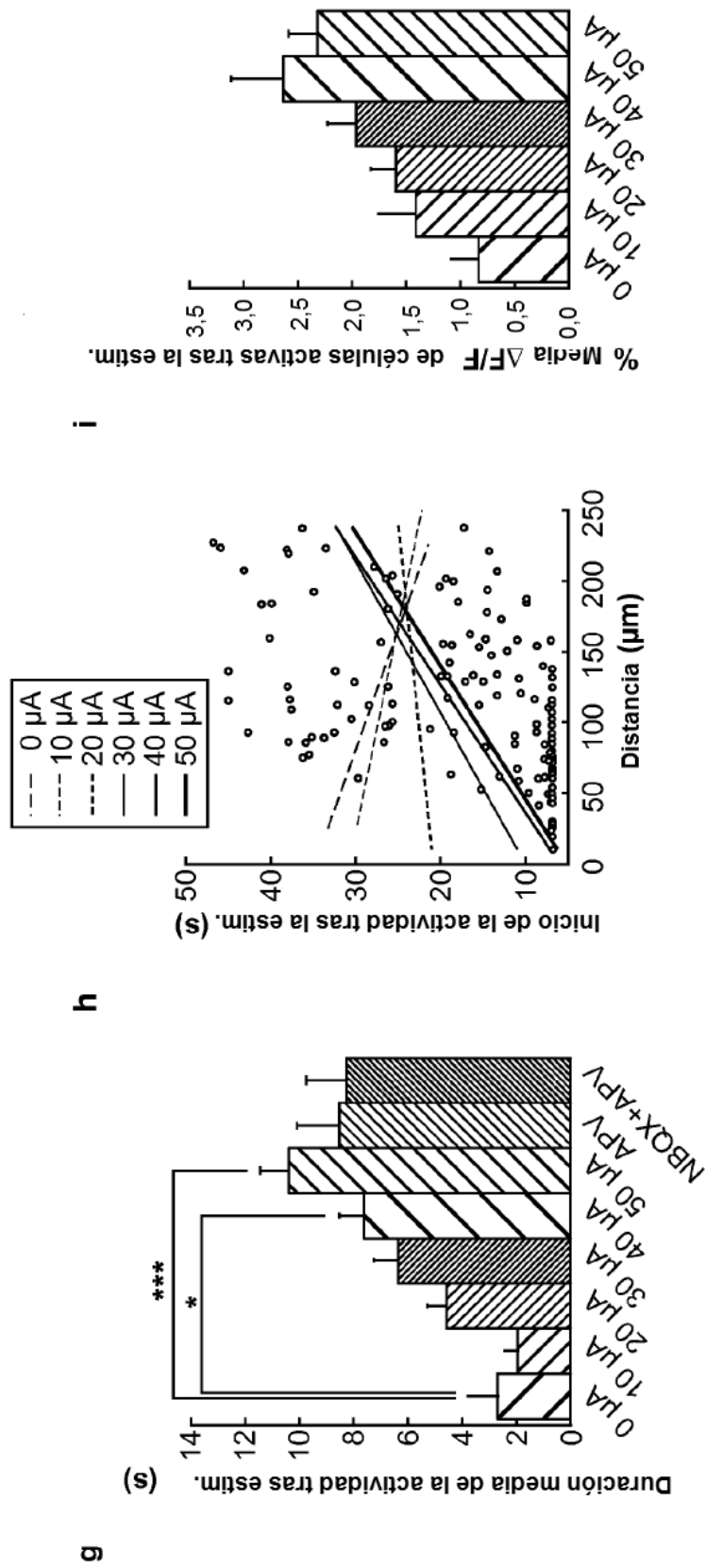


FIG. 20 (Cont.)

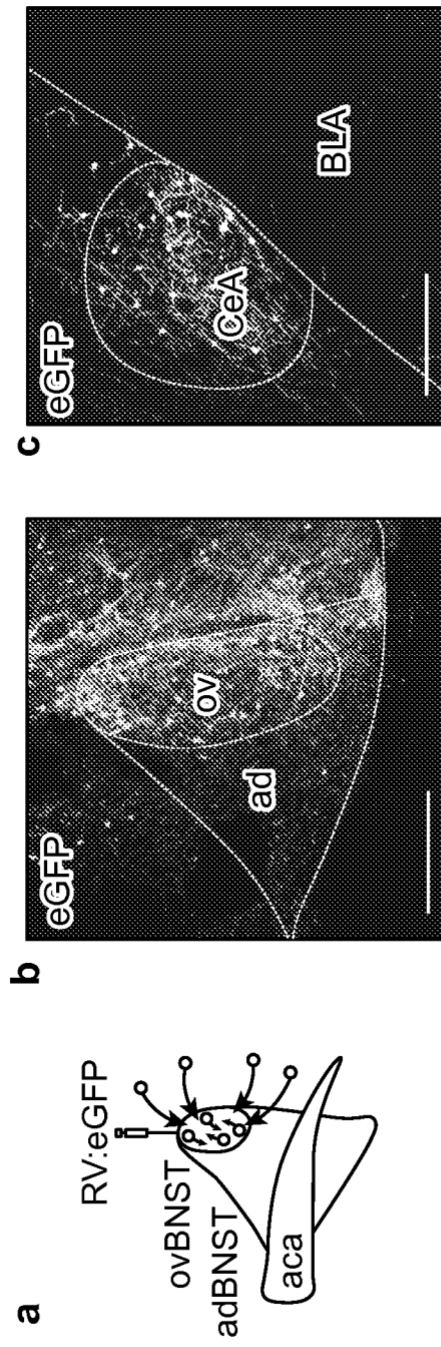


FIG. 21

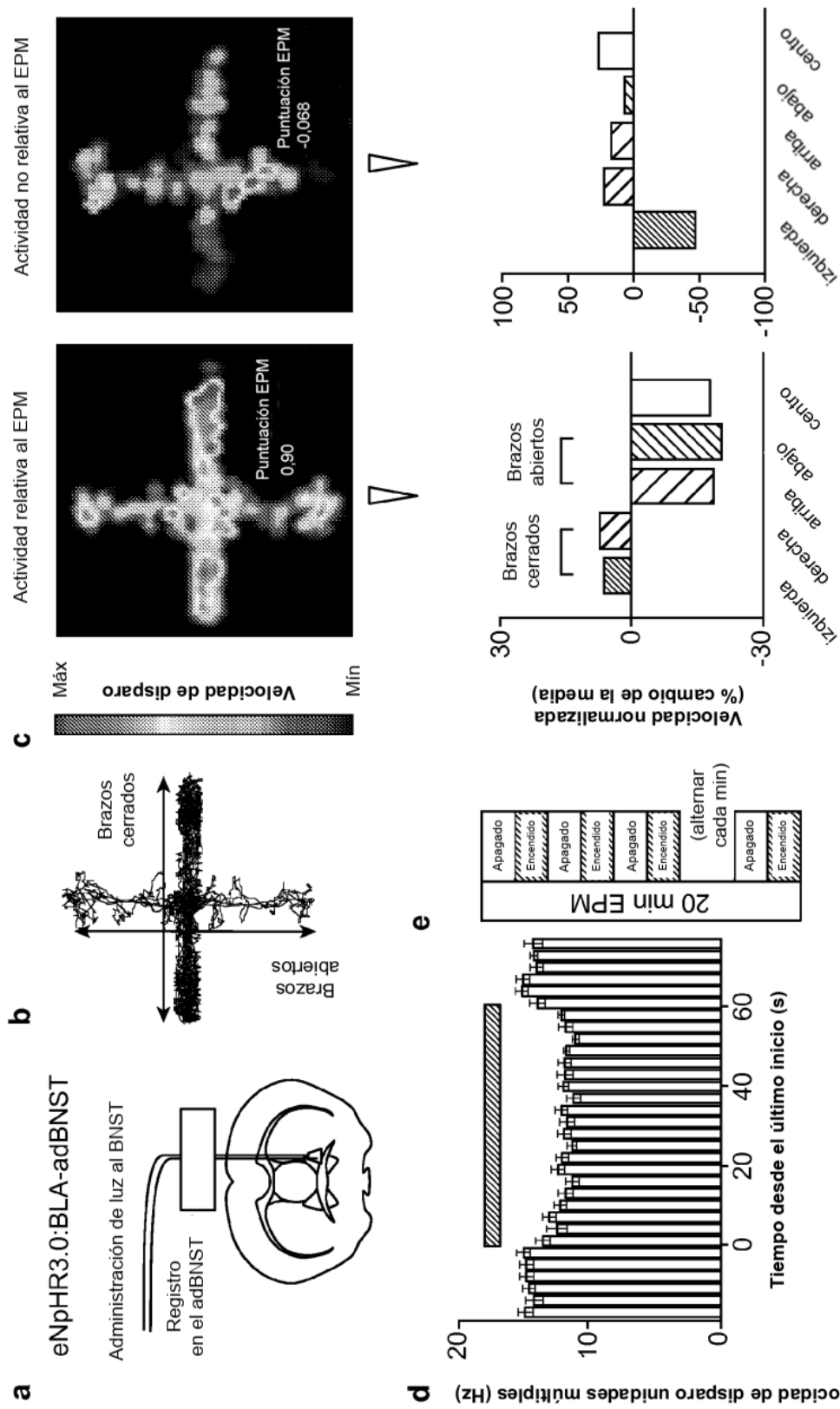


FIG. 22

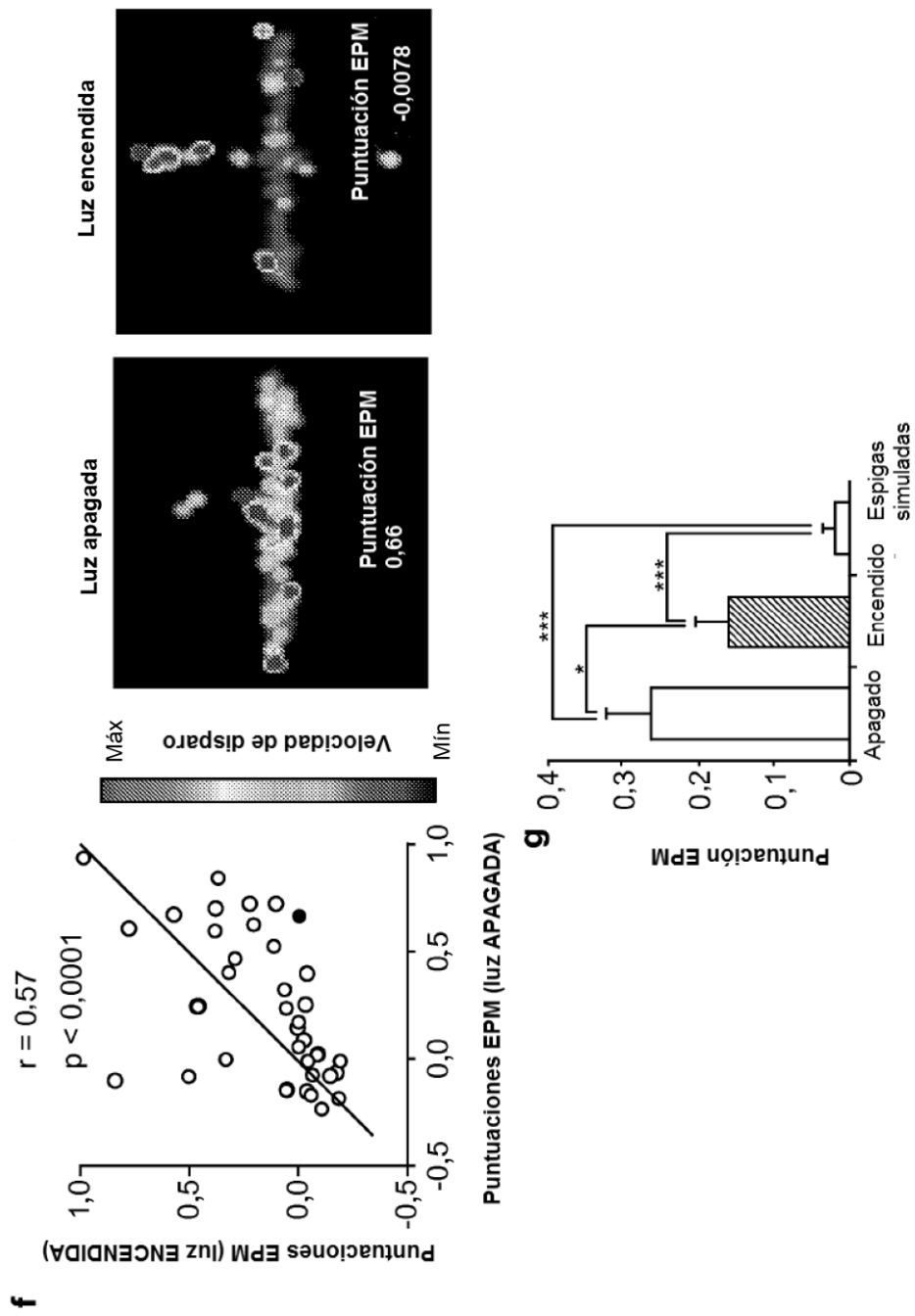


FIG. 22 (Cont.)

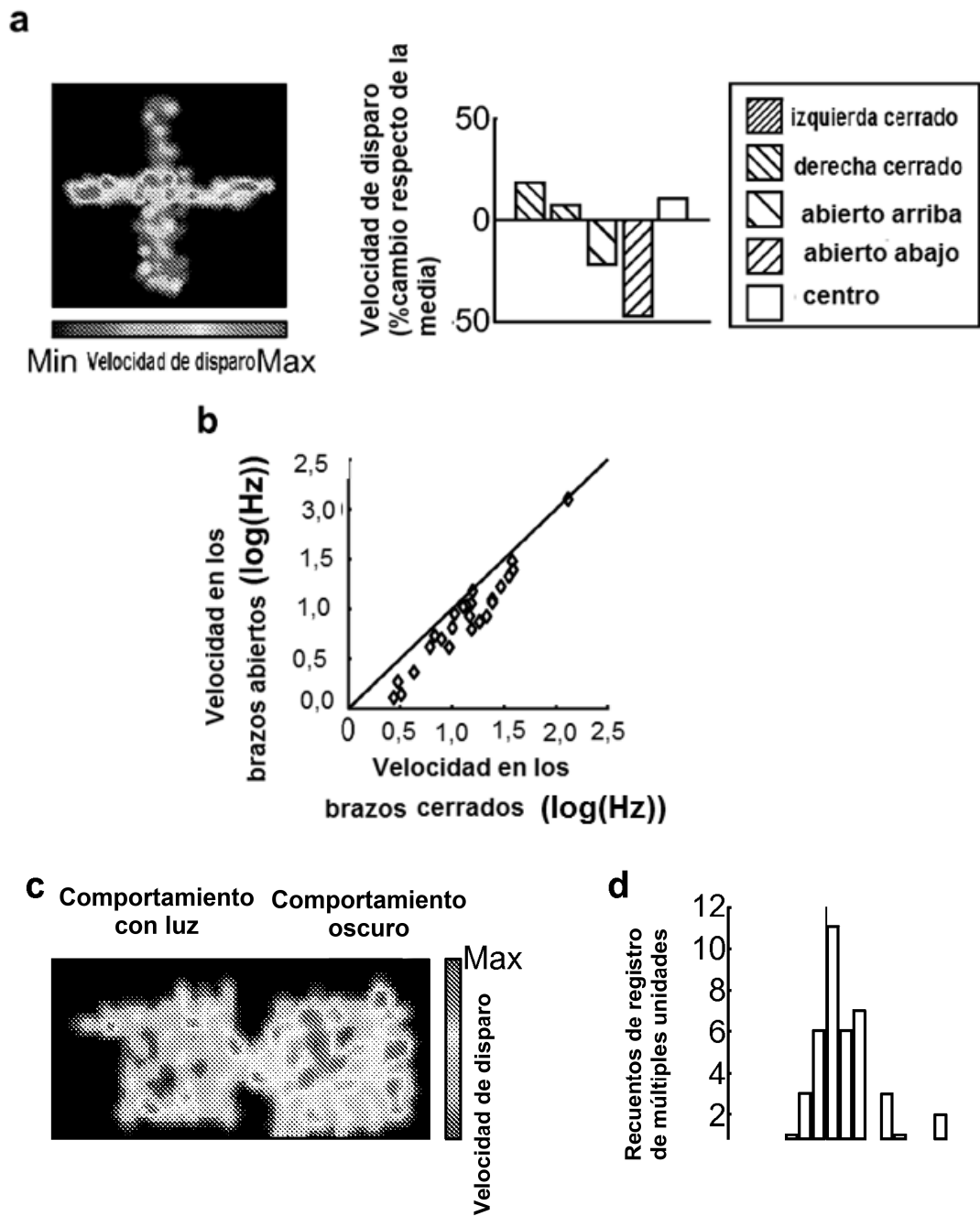


FIG. 23

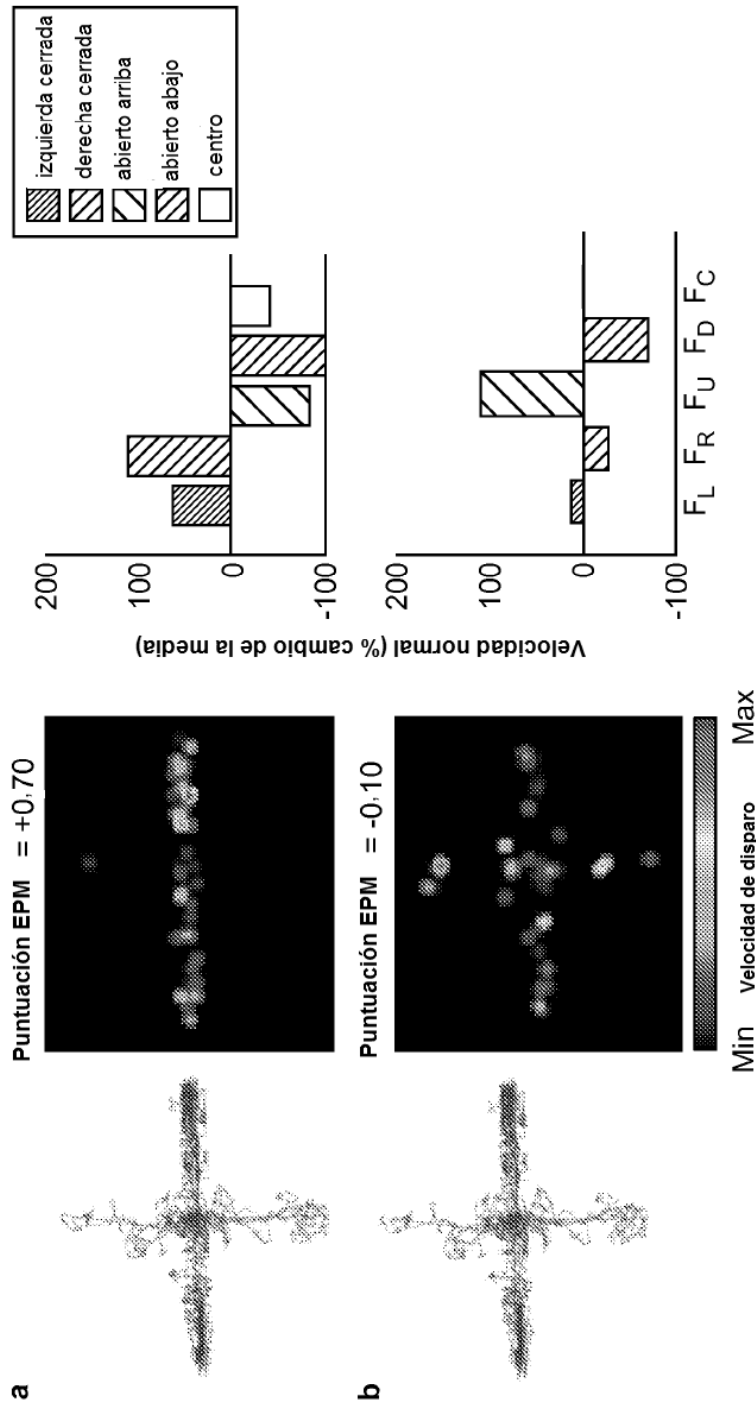


FIG. 24

Puntuación EPM = $(A - B) / (A + B)$, donde

$$A = 0,25 * (|F_L - F_U| + |F_L - F_D| + |F_R - F_U| + |F_R - F_D|) \text{ y}$$

$$B = 0,5 * (|F_L - F_R| + |F_U - F_D|)$$

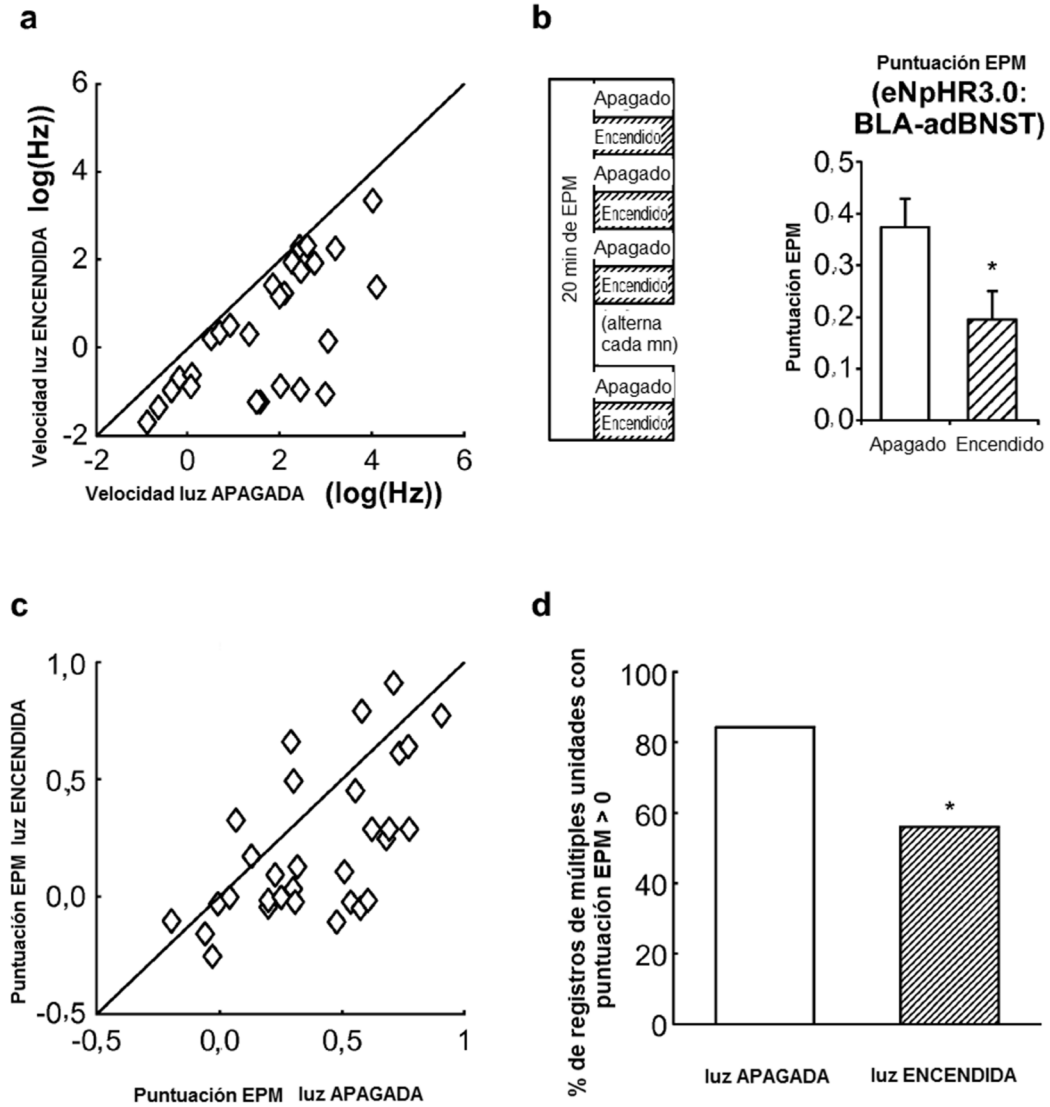


FIG. 25

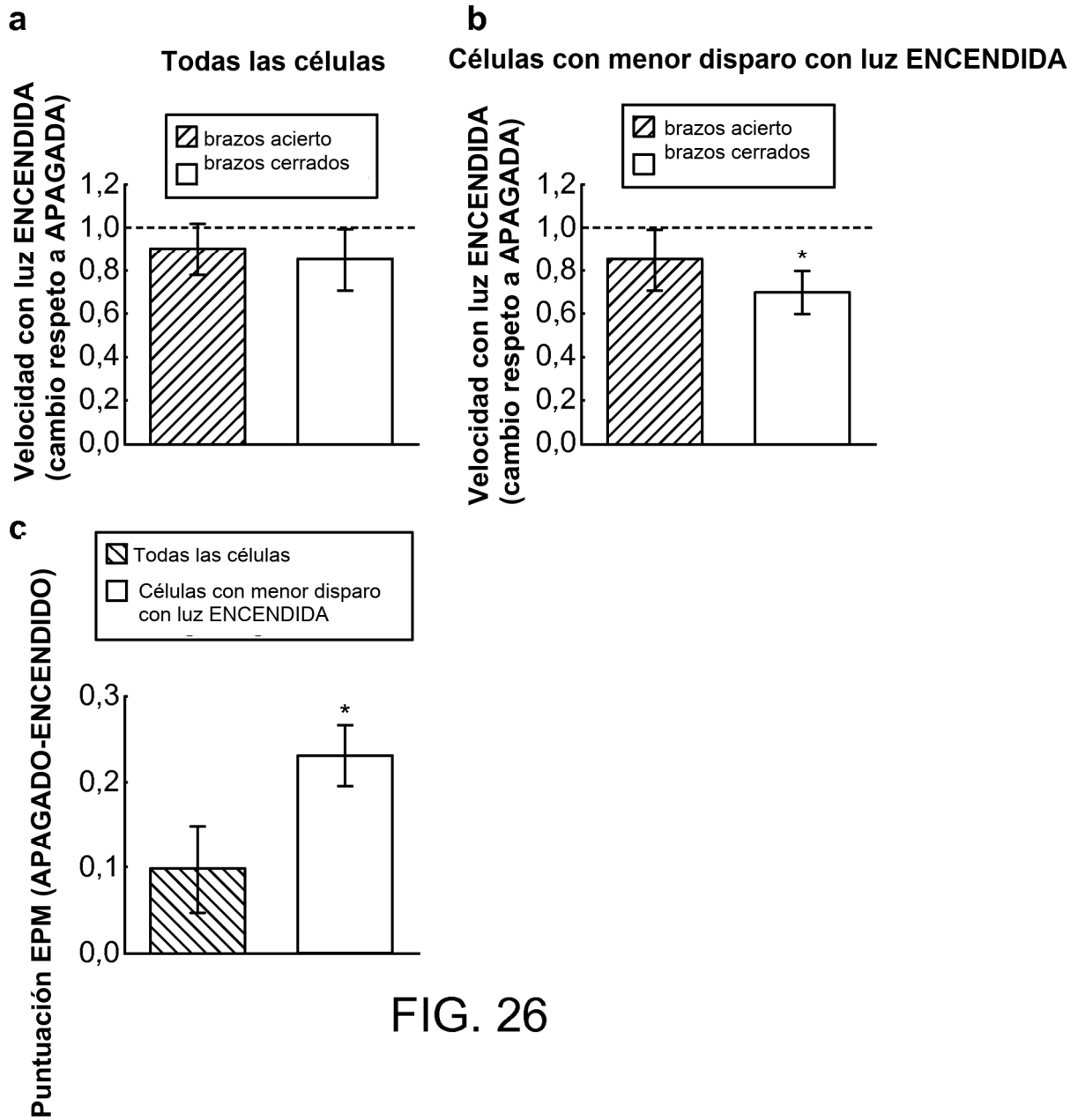


FIG. 26

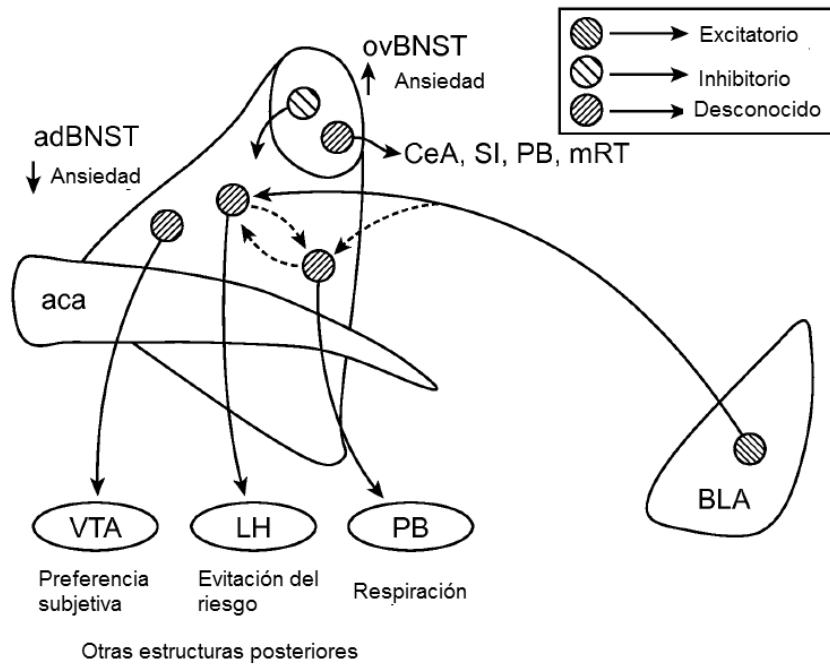


FIG. 27

INHIBITORIA

La secuencia de aminoácidos de NpHR sin el péptido señal:

VTQRELFEFVLNDPLLASSLYINIALAGLSILLFVFMTRGLDDPRAKLIIVSTILVPVVSIA
YTGLASGLTISVLEMPAGHFAEGSSVMLGGEVDGVVTMWGRYLTWALSTPMILLALG
LLAGSNATKLFTAITFDIAMCVTGLAAALTSSHLMRWFYAIACACFLVVLYILLVEW
AQDAKAAGTADMFTNLKLLTVVMWLGYPVWALGVEGIAVLPVGVTSWGYSFLDIVA
KYIFAFLLLNYLTSNESVVSILDVPSASGTPADD (SEQ ID NO:1).

La secuencia de aminoácidos de eYFP-NpHR3.0:

MTETLPPVTESAVALQAEVTQRELFEFVLNDPLLASSLYINIALAGLSILLFVFMTRGLDD
PRAKLIIVSTILVPVVSIA SYTGLASGLTISVLEMPAGHFAEGSSVMLGGEVDGVVTMW
GRYLTWALSTPMILLALG LLAGSNATKLFTAITFDIAMCVTGLAAALTSSHLMRWFY
AISCACFLVVLYILLVEWAQDAKAAGTADMFTNLKLLTVVMWLGYPVWALGVEGIAV
LPVGVTSWGYSFLDIVAKYIFAFLLLNYLTSNESVVSILDVPSASGTPADDAAAKSRIT
SEGEYIPLDQIDINVVS KGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT
ICTTGKLPVPWPPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGN
YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVN
FKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSYQSALSKDPNEKRDHMLLEF
VTAAGITLGMDELYKFCYENEV (SEQ ID NO:2).

La secuencia de aminoácidos de eYFP-NpH3.1:

MVTQRELFEFVLNDPLLASSLYINIALAGLSILLFVFMTRGLDDPRAKLIIVSTILVPVSI
ASYTGLASGLTISVLEMPAGHFAEGSSVMLGGEVDGVVTMWGRYLTWALSTPMILLA
LGLLAGSNATKLFTAITFDIAMCVTGLAAALTSSHLMRWFYAIACACFLVVLYILLVE
WAQDAKAAGTADMFTNLKLLTVVMWLGYPVWALGVEGIAVLPVGVTSWGYSFLDIV
AKYIFAFLLLNYLTSNESVVSILDVPSASGTPADDAAAKSRITSEGEYIPLDQIDINVVS
KGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT
FICTTGKLPVPWPPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV
NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD
HYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSYQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKF
CYENEV (SEQ ID NO:3).

La secuencia de aminoácidos de GtR3:

ASSFGKALLEFVFVIFACITLLLGINAAKSKAASRVLPATFVTGIAIAYFSMASGGGWVI
APDCRQLFVARYLDWLITPLLLIDLGLVAGVSRWDIMALCLSDVLMATGAFGSLTVG
NVKWWWWFFGMCWFLHIIIFALGKSWAEAAKAGGDSASVYSKIAGITVITWFCYPVV
WVFAEGFGNFSVTFEVLIYGVLDVISKAVFGLILMSGATGYESI (SEQ ID NO:4).

FIG. 28A

La secuencia de aminoácidos de eArch:

MDPIALQAGYDLLGDGRPETLWLGIGTLLMLIGTFYFLVRGWGVTDKDAREYYAVTIL
VPGIASAAYLSMFFGIGLTEVTVGEMLDIYYARYADWLFTTPLLALLAKVDRV
TIGTLVGVDALMIVTGLIGALSHTAIARYSWWLFSTICMIVVLYFLATSLRSAAKERGPE
VASTFNTLTALVVLWTAYPILWIIIGTEGAGVVGLGIETLLFMVLDVTAKVGF GFILLR
SRAILGDTEAPEPSAGADVSAAD (SEQ ID NO:12).

La secuencia de aminoácidos de eArch3.0-EYFP:

MDPIALQAGYDLLGDGRPETLWLGIGTLLMLIGTFYFLVRGWGVTDKDAREYYAVTIL
VPGIASAAYLSMFFGIGLTEVTVGEMLDIYYARYADWLFTTPLLALLAKVDRV
TIGTLVGVDALMIVTGLIGALSHTAIARYSWWLFSTICMIVVLYFLATSLRSAAKERGPE
VASTFNTLTALVVLWTAYPILWIIIGTEGAGVVGLGIETLLFMVLDVTAKVGF GFILLR
SRAILGDTEAPEPSAGADVSAADRPVAVSKAAAKSRITSEGEYIPLDQIDINVVSKGEE
LFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFG
YGLQCFARYPDHMKQHDFKFSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNR
IELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD
HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELY
KFCYENEV (SEQ ID NO:13).

ArchT 3.0

MDPIALQAGYDLLGDGRPETLWLGIGTLLMLIGTFYFIVKGWGVTDKEAREYYSITILVP
GIAAAYLSMFFGIGLTEVTVAGEVLDIYYARYADWLFTTPLLALLAKVDRVSIGT
LVGVDALMIVTGLIGALSHTPLARYSWWLFSTICMIVVLYFLATSLRAAAKERGPEVAST
FNTLTALVVLWTAYPILWIIIGTEGAGVVGLGIETLLFMVLDVTAKVGF GFILLRSAIL
GDTEAPEP (SEQ ID NO:14)

Mac 3.0

MIVDQFEEVLMKTSQLFPLPTATQSAQPTHVAPVPTVLPDTPITYETVGDSGSKTLWVVFV
LMLIASAAFTALSWKIPVNRRLYHVITTIITLTAALSYFAMATGHGVALNKIVIRTQHDH
VPDITYETVYRQVYYARYIDWAITTPLLLALLGMSGAHIFMAIVADLIMVLTGLFAA
FGSEGTPQKWGWYTIACIAYIFVVVHVLNNGGANARVKGEKLSFFVAIGAYTLILWTAY
PIVWGLADGARKIGVDGEIIAYAVLDVLAKGVFGAWLLVTHANLRESDELNGFWANLN
REGAIRIGEDDGARPVAVSK (SEQ ID NO:15)

FIG. 28B

EXCITATORIA

La secuencia de aminoácidos de ChR2:

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQW
LAAGFSILLMFYAYQTKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQ
WLRyAEWLLTCPVILHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIF
FCLGLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPILFILGPEG
FGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVET
LVEDEAEAGAVP (SEQ ID NO:5).

La secuencia de aminoácidos de SFO:

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQW
LAAGFSILLMFYAYQTKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQ
WLRyAEWLLTSPVILHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIF
FCLGLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPILFILGPEG
FGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVET
LVEDEAEAGAVP (SEQ ID NO:6).

La secuencia de aminoácidos de SSFO:

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQW
LAAGFSILLMFYAYQTKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQ
WLRyAEWLLTSPVILHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSAIGTIVWGATSAMATGYVKVIF
FCLGLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPILFILGPEG
FGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVET
LVEDEAEAGAVP (SEQ ID NO:7).

La secuencia de aminoácidos de C1V1:

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSY
TLENNGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKW
KSTCGWEEIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAVYSSNGNKTWLRyAEWLLTCPVLLIHL
SNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSYGMYYTFHA
AKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVAVGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSI
LDLIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVEVETLVAEEED (SEQ
ID NO:8).

La secuencia de aminoácidos de C1V1 (E122T):

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTL
ENNGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTKWST
CGWETIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAVYSSNGNKTWLRyAEWLLTCPVLLIHL
GLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSYGMYYTFHAAKVYIE
AFHTVPKGICRELVRVMAWTFVAVGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDLIAKN
MWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVEVETLVAEEED (SEQ ID NO:9).

FIG. 28C

La secuencia de aminoácidos de C1V1 (E162T):

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSY
TLENNGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTW
KSTCGWEEIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKT VWLRYATWLLTCPVLLIHL
SNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWT KILFFLISLSYGMYYFHA
AKVYIEAFHTVPGICRELVRVMAWTFFVAWGMFPVL FLLGTEGFGHISPYGSAIGHSI
LDLIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVE TLVAEEED (SEQ
ID NO:10).

La secuencia de aminoácidos de C1V1 (E122T/E162T):

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSY
TLENNGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTW
KSTCGWETIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKT VWLRYATWLLTCPVLLIHL
SNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWT KILFFLISLSYGMYYFHA
AKVYIEAFHTVPGICRELVRVMAWTFFVAWGMFPVL FLLGTEGFGHISPYGSAIGHSI
LDLIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVE TLVAEEED (SEQ
ID NO:11).

FIG. 28D

