

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2011.09.08	(73) Titular(es): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. HOFGARTENSTRASSE 8 80539 MÜNCHEN DE
(30) Prioridade(s): 2010.09.08 EP 10175832 2010.09.08 US 380793 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2013.07.17	(72) Inventor(es): ERNST BAMBERG DE CHRISTIAN BAMANN DE SONJA KLEINLOGEL DE PHILLIP WOOD DE ROBERT E. DEMPSKI US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.07.15 195/2015	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **CANALRODOPSINA 2 MUTANTE**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A CANAISRODOPSINA MUTANTES POSSUINDO PROPRIEDADES MELHORADAS, CONSTRUÇÕES DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICAM OS MESMOS, VETORES DE EXPRESSÃO PORTADORES DA CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, COMPREENDENDO AS CÉLULAS A REFERIDA CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO OU VETOR DE EXPRESSÃO, E SUAS RESPECTIVAS UTILIZAÇÕES.

RESUMO

"CANALRODOPSINA 2 MUTANTE"

A invenção refere-se a canaisrodopsina mutantes possuindo propriedades melhoradas, construções de ácido nucleico que codificam os mesmos, vetores de expressão portadores da construção de ácido nucleico, compreendendo as células a referida construção de ácido nucleico ou vetor de expressão, e suas respectivas utilizações.

DESCRIÇÃO

"CANALRODOPSINA 2 MUTANTE"

A invenção refere-se a canaisrodopsina mutantes possuindo propriedades melhoradas, construção de ácido nucleicos que codifica os mesmos, vetores de expressão portadores da construção de ácido nucleico, células compreendendo a referida construção de ácido nucleico ou vetor de expressão, e sua respetiva utilização, como definido nas reivindicações.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O canal de retificação de catiões interiormente, acionado pela luz, canalrodopsina-2 (ChR2), tornou-se um instrumento preferido para a desejada ativação por luz de neurónios *in vitro* e *in vivo*¹⁻⁴. Embora a ChR2 do tipo selvagem (WT) possa ser empregue para despolarização induzida por luz, existe uma pesquisa a decorrer de mutantes ChR2 com sensibilidade à luz aumentada para as potenciais aplicações clínicas futuras (WO 03/084994 e 5-7). Uma maior eficácia permitirá a despolarização de camadas de células distantes da fonte de luz aplicada apesar da baixa transmitância ótica de, *e.g.*, tecido cerebral. Uma sensibilidade à luz aumentada pode também resolver o problema do potencial dano na célula sob

iluminação contínua devido às elevadas intensidades de luz azul necessárias para a ativação total de ChR2 WT (10^{18} - 10^{19} ph s⁻¹ cm⁻² a 480 nm). As variantes com maior sensibilidade à luz são também cruciais para a pesquisa referente à recuperação da visão^{8,9}. Ao nível da proteína, uma maior eficiência de luz pode ser apenas conseguida por aumento do tempo de vida do estado aberto e/ou pela elevação da unidade de condutância do canal, uma vez que a sensibilidade à luz *per se* pode ser melhorada apenas marginalmente devido à natureza do cromóforo retinal ChR2. Pesquisas anteriores demonstraram que as mutações nas posições C128 e D156 na hélice 3 e 4, respectivamente, resultaram numa cinética do canal marcadamente retardada com tempos de vida de abertura até 30 minutos e mais, levando a 500-vezes ou mesmo mais a sensibilidade à luz 5,6. Estes mutantes C128 e D156 podem ser desligados por luz vermelha em vezes de abertura variáveis. Apesar da superior sensibilidade à luz, as suas cinéticas de abertura lentas permanecem um fator limitante para a sua aplicabilidade.

De acordo com o exposto, existe uma necessidade para canais de catiões indutíveis com luz exibindo uma maior sensibilidade à luz e uma cinética de resposta mais rápida.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Uma vez que se sabe que o potencial de superfície

da membrana interna é fortemente influenciado por Ca^{++} , a modificação dos níveis submembranares intracelulares de Ca^{++} levará à despolarização da membrana e em neurónios à ativação de canais de Na^+ acionados por voltagem. Deste modo, os inventores colocaram a hipótese de que a sensibilidade à luz de um neurónio pode ser indiretamente aumentada por elevação do seu potencial de superfície de membrana interna via influxo de Ca^{++} . Os inventores encontraram surpreendentemente um ChR2 mutante com uma permeabilidade ao Ca^{++} melhorada, no a seguir denominado CatCh, *i.e.* **Ca**lcium **t**ranslocating **Ch**annelrhodopsin. CatCh possui uma permeabilidade ao Ca^{++} quatro-vezes superior, uma sensibilidade à luz 70-vezes superior e cinética de resposta mais rápida quando expressa em neurónios do hipocampo em comparação com a ChR2 WT. Mostrou-se que a sensibilidade à luz melhorada e a cinética rápida resultavam do influxo de Ca^{++} relativamente elevado acionado pela luz, que eleva o potencial de superfície da membrana interna e ativa os canais de potássio (BK) de grande condutância activados por Ca^{++} . Um aumento no $[\text{Ca}^{++}]_i$ eleva o potencial de superfície interna, facilitando a ativação de canais de Na^+ acionados por voltagem e indiretamente o aumento sensibilidade à luz. A repolarização após a estimulação por luz é marcadamente acelerada pela ativação do canal BK dependente de Ca^{++} . CatCh exemplifica um novo princípio através do qual os canais acionados pela luz podem ser manipulados para aumentar a sensibilidade à luz da estimulação neuronal. As suas características tal como o desencadeamento preciso e os potenciais de acção rápidos

enquanto necessita de baixas intensidades de luz para activação, abre o caminho para a utilização de canais acionados pela luz em aplicações clínicas.

De acordo com o exposto, num primeiro aspeto, a invenção refere-se a um canal iónico indutível com luz, em que o canal iónico indutível com luz compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de homologia com a sequência de aminoácidos apresentada nas posições 1-309 de SEQ ID NO: 1 (CHOP-2), e que compreende uma mutação numa posição correspondente a L132 na SEQ ID NO: 1, como a seguir definido nas reivindicações.

Num segundo aspeto semelhante, a invenção também se refere a um canalrodopsina, compreendendo o canal iónico indutível com luz de acordo com o primeiro aspeto e um retinal ou derivado de retinal.

Além disso, num terceiro aspeto, a invenção proporciona uma construção de ácido nucleico, compreendendo uma sequência de nucleótidos codificante para o canal iónico indutível com luz de acordo com o primeiro aspeto. Ainda em outro aspeto, a invenção proporciona um vetor de expressão, compreendendo uma sequência de nucleótidos codificante para o canal iónico indutível com luz de acordo com o primeiro aspeto ou a construção de ácido nucleico de acordo com o terceiro aspeto.

Além disso, é proporcionada uma célula, compre-

endendo o canalrodopsina de acordo com o segundo aspeto, a construção de ácido nucleico de acordo com o terceiro aspeto, ou o vetor de expressão de acordo com o quarto aspeto.

Adicionalmente, a invenção diz respeito à utilização do canal de iões indutível com luz de acordo com o primeiro aspeto, o canalrodopsina do segundo aspeto, a construção de ácido nucleico ou o vetor de expressão de acordo com a invenção, e a célula de acordo com a invenção como um medicamento. Em particular, uma utilização do vetor de expressão de acordo com a invenção em terapia génica está contemplada.

Mais especificamente, está contemplada a utilização do canal iónico indutível com luz, canalrodopsina, construção de ácido nucleico, vetor de expressão, ou célula de acordo com a invenção no tratamento de cegueira ou vista reduzida.

Ainda em outro aspeto, a invenção proporciona a utilização do canal de iões indutível com luz de acordo com o primeiro aspeto, possuindo adicionalmente treonina, serina, ou alanina numa posição correspondente à posição 128 da SEQ ID NO: 1; e/ou alanina numa posição correspondente à posição 156 da SEQ ID NO: 1, na ablação de células de cancro.

Num aspeto final, a invenção refere-se à

utilização de um canal iônico indutível com luz de acordo com o primeiro aspeto, ou um canalrodopsina de acordo com o segundo aspeto, ou uma célula de acordo com a invenção num rastreio de elevado processamento.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

Num primeiro aspeto, a invenção refere-se a um canal iônico indutível com luz, em que o canal iônico indutível com luz compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade com a sequência de aminoácidos apresentada nas posições 1-309 da SEQ ID NO: 1 (CHOP-2), de um modo mais preferido, com a sequência de aminoácidos apresentada nas posições 1-315 da SEQ ID NO: 1, ou ainda com a sequência de aminoácidos apresentada nas posições 1-737 da SEQ ID NO: 1, e que compreende uma mutação numa posição correspondente a L132 na SEQ ID NO: 1.

CHOP2 do tipo selvagem tem a sequência de aminoácidos que se segue:

MDYGGALSAV	GRELLEVTNP	VVNGSVLVP	EDQCYCAGWI
ESRGTNGAQT	ASNVLQWLAA	GFSILLMFY	AYQTWKSTCG
WEEIYVCAIE	MVKVILEFFF	EKFNPSMLYL	ATGHRVQWLR
YAEWLLTCPV	ILIHLSNLTG	LSNDYSRRTM	GLLVSDIGTI
VWGATSAMAT	GYVKVIFFL	GLCYGANTFF	HAAKAYIEGY
HTVPKGRCRQ	VVTGMAWLFF	VSWGMPILF	ILGPEGFGVL
SVYGSTVGHT	IIDLMSKNCW	GLLGHYLRVL	IHEHILIHGD
IRKTTKLNIG	GTEIEVETLV	EDEABAGAVN	KGTGKYASRE
SFLVMRDKMK	EKGIDVRASL	DNSKEVEQEQ	AARAAMMMMN
GNGMGMGMM	NGMNGMGGMN	GMAGGAKPGL	ELTPQLQPGR
VILAVPDISM	VDFFREQFAQ	LSVTYELVPA	LGADNTLALV

TQAQNLGGVD	FVLIHPEFLR	DRSSTSILSR	LRGAGQRVAA
FGWAQLGPMR	DLIESANLDG	WLEGPSFGQG	ILPAHIVALV
AKMQQMRKMQ	QMQQIGMMTG	GMNGMGGGMG	GGMNGMGGGN
GMNNMGNMG	GGMNGMGGGN	GMNGMGGGNG	MNNMGNGMA
GNGMGGGMG	NGMGGSMMGM	SSGVVANVTP	SAAGGMGMM
NGGMAAPQSP	GMNGGRLGTN	PLFNAAPSPL	SSQLGAEAGM
GSMGGMGGMS	GMGGMGGMG	MGGAGAATTQ	AAGGNAEAEM
LQNLMEINR	LKRELGE	(SEQ ID NO: 1)	

O canal de iões indutível com luz da invenção é uma proteína de membrana com pelo menos 5 hélices transmembranares, que é capaz de se ligar a um polieno sensível à luz. As proteínas transmembranares com 6 ou 7 hélices transmembranares são preferíveis. As proteínas transmembranares com mais do que 7 hélices, por exemplo 8, 9 ou 10 hélices transmembranares, estão contudo também cobertas pela invenção. Além disso, a invenção cobre proteínas transmembranares que adicionalmente à parte transmembranar incluem sequências C- e/ou N-terminais, em que as sequências C terminais podem estender-se para o interior do lúmen delimitado pela membrana, por exemplo o citoplasma de uma célula ou o interior de um lipossoma, ou pode ser também arranjado na superfície externa da membrana. O mesmo aplica-se para as sequências N-terminais opcionalmente presentes, que podem ser arranjadas do mesmo modo no lúmen e também na superfície externa na membrana. O comprimento das sequências C e/ou N terminais não está, em princípio sujeito a restrição; no entanto, os canais iónicos indutíveis com luz com sequências C terminais não incrustadas na membrana, com 1 a 1000 aminoácidos, de um modo preferido 1 a 500, especificamente de um modo preferido 5 a 50 aminoácidos, são preferidos. Independentemente do com-

primento das sequências C terminais, as sequências localizadas no terminal N não incrustadas na membrana compreendem, de um modo preferido, de 1 a 500 aminoácidos, especificamente, de um modo preferido 5 a 50 aminoácidos. O conceito de hélice transmembranar é bem conhecido do especialista da técnica. Estas são geralmente estruturas de proteína em α -hélice, que conforme a regra compreendem 20 a 25 aminoácidos. Contudo, dependendo da natureza da membrana, que pode ser uma membrana natural, por exemplo uma célula ou plasma membrana, ou também uma membrana sintética, os segmentos transmembranares podem também ser mais curtos ou longos. Por exemplo, os segmentos transmembranares em membranas artificiais podem compreender até 30 aminoácidos, mas por outro lado também apenas alguns aminoácidos, por exemplo 12 a 16.

Numa forma de realização preferida, o canal iônico indutível com luz compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade, de um modo preferido pelo menos 75% de identidade, de um modo mais preferido pelo menos 80% de identidade, de um modo ainda mais preferido pelo menos 85% de identidade, tal como pelo menos 90% de identidade, e de um modo mais preferido pelo menos 95% de identidade com a sequência de aminoácidos apresentada nas posições 1-309 da SEQ ID NO: 1.

Em outra forma de realização preferida, o canal iônico indutível com luz compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade, de um

modo preferido pelo menos 75% de identidade, de um modo mais preferido pelo menos 80% de identidade, de um modo ainda mais preferido pelo menos 85% de identidade, tal como pelo menos 90% de identidade, e de um modo ainda mais preferido pelo menos 95% de identidade com a sequência de aminoácidos apresentada nas posições 1-315 da SEQ ID NO: 1.

Geralmente, uma sequência de aminoácidos tem "pelo menos x% de identidade" com outra sequência de aminoácidos ou SEQ ID NO: 1 acima, quando a identidade de sequência entre estas com as sequências alinhadas é pelo menos x%. Este alinhamento pode ser efetuado utilizando por exemplo programas de computador para homologia disponíveis publicamente tal como o programa "BLAST" proporcionado na página do NCBI em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>, utilizando as configurações por defeito aí proporcionadas. Além disso os métodos de cálculo das percentagens de identidade de sequência de conjuntos de sequências de ácidos nucleicos são conhecidos na técnica.

Exemplos destes canais iónicos indutíveis com luz compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% identidade com a sequência de aminoácidos apresentada nas posições 1-309 ou 1-315 da SEQ ID NO: 1 é CHOP1 de *C. reinhardtii* (gi:15811379), CHOP2 (gi:167650748) e CHOP1 (gi:167650744) de *Volvox carteri*, ou qualquer outro ortólogo ou variante alélica de CHOP2 ou CHOP1.

Ainda numa forma de realização mais preferida, o

canal iônico indutível com luz compreende, consiste, de um modo preferido, na sequência de aminoácidos apresentada nas posições 1-309 da SEQ ID NO: 1 (CHOP-2), exceto para uma mutação na posição L132.

Em outra forma de realização ainda mais preferida, o canal iônico indutível com luz compreende, consiste, de um modo preferido, na sequência de aminoácidos apresentada nas posições 1-315 da SEQ ID NO: 1 (CHOP-2), exceto para uma mutação na posição L132.

A mutação na posição L132, ou na posição correspondente a L132 na SEQ ID NO: 1 é uma substituição, de um modo mais preferido, selecionada a partir de L132C, L132S, L132E, L132D, e L132T, de um modo mais preferido em que a substituição é L132C. Embora os dados experimentais sejam limitados para L132C, está contemplado que as substituições L132S, L132E, L132D, e L132T exibirão propriedades semelhantes, uma vez que todas estas substituições aumentarão a polaridade do canal.

Adicionalmente, o canal iônico indutível com luz compreende ainda substituições (semi-)conservadoras. As substituições conservadoras são as que têm lugar na família de aminoácidos que estão relacionados pelas suas cadeias laterais e propriedades químicas. Exemplos destas famílias são aminoácidos com cadeias laterais básicas, com cadeias laterais acídicas, com cadeias laterais alifáticas não polares, com cadeias laterais aromáticas não polares, com

cadeias laterais polares não carregadas, com cadeias laterais pequenas, com cadeias laterais grandes etc. As substituições típicas semi-conservadoras e conservadoras são:

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

Além disso, o especialista considerará que as glicinas em posições estericamente exigentes não devem ser substituídas e que a prolina não deverá ser introduzida em partes da proteína que têm uma estrutura em alfa-hélice ou folha beta.

Em outra forma de realização preferida, o canal iônico indutível com luz compreende o motivo de consenso L(I)DxxxKxxW(F,Y). Os aminoácidos dados entre parêntesis podem em cada caso substituir os aminoácidos anteriores. Esta sequência de consenso é o motivo circundante do aminoácido lisina que se liga ao retinal.

A possibilidade de ativar CatCh com intensidades de luz que ocorrem naturalmente embora mantendo uma elevada precisão temporal torna-a uma candidata única particularmente para esforços de restauro visual com terapia de genes mas também outras aplicações biomédicas. Devido às suas reduzidas necessidades de luz, a ativação de CatCh pode ser iniciada mesmo por excitação distante do seu espectro máximo de 474 nm, e.g. com luz verde (532 nm - ver Fig. 4d). É possível trabalhar nos flancos externos do espectro de ação devido às suas reduzidas necessidades de luz e facilita a penetração do tecido.

Deste modo, a sensibilidade à luz do canal iônico mutante indutível com luz da invenção é, de um modo preferido, aumentada em mais do que 5 vezes, de um modo preferido em mais do que 10 vezes, de um modo mais

preferido em mais do que 20 vezes, tal como 30 vezes, de um modo ainda mais preferido em mais do que 40 vezes, tal como 50 vezes, e de um modo mais preferido em mais do que 60 vezes, ou mesmo em mais do que 70 vezes, em comparação com WT CHOP-2 em neurónios do hipocampo. Além disso, o canal iónico mutante indutível com luz da invenção exibe uma frequência de estimulação que é aumentada pelo menos 1,5-vezes, de um modo mais preferido 2-vezes, ou de um modo ainda mais preferido 2,5 vezes, em comparação com WT CHOP-2 como determinado por registos eletrofisiológicos de células completas em neurónios do hipocampo. Como apresentado nos exemplos, WT-Chop2 exibe uma frequência de estimulação em neurónios do hipocampo de cerca de 10 Hz até cerca de 20 Hz, em que a uma sinalização de 20 Hz é já imprecisa. Além disso, o especialista reconhecerá que a frequência de ativação intrínseca é também dependente do tipo de célula. Por exemplo, as células auditivas têm uma frequência de ativação intrínseca até 500 Hz. Além disso, as experiências foram conduzidas *in vitro*, i.e. à temperatura ambiente. No entanto, o especialista esperará que a frequência de estimulação seja ainda maior em animais de sangue quente, tais como mamíferos, uma vez que a cinéticas é também dependente da temperatura. Deste modo, dependendo do tipo de célula e da temperatura, deve ser esperado que o canal iónico mutante indutível com luz da invenção pode também exibir uma frequência de estimulação que é aumentada pelo menos 5-vezes, de um modo preferido pelo menos 10-vezes, tal como pelo menos 20-vezes, ou pelo menos 30-vezes, ou de um modo mais preferido pelo menos 40-vezes, pelo menos 50-

vezes, tal como pelo menos 60-vezes, ou pelo menos 70-vezes, de um modo ainda mais preferido pelo menos 80-vezes, pelo menos 90-vezes, ou pelo menos 100-vezes, de um modo mais preferido pelo menos 125-vezes, tal como pelo menos 150-vezes, ou pelo menos 175-vezes, e ainda de um modo mais preferido, pelo menos 200-vezes, em comparação com WT CHOP-2 conforme determinado por registos eletrofisiológicos de célula completa. A cultura de neurónios do hipocampo e registos eletrofisiológicos dos neurónios do hipocampo é exemplificado nos exemplos a seguir.

Resumidamente, os hipocampos são isolados a partir de ratos Sprague-Dawley P1 recém nascidos (Jackson Laboratory) e tratados com papaína (20 U ml⁻¹) durante 20 min a 37 °C. os hipocampos são lavados com DMEM (Invitrogen/Gibco, glucose elevada) suplementado com 10% de soro de bovino fetal e triturado num pequeno volume desta solução. ~ 75 000 células são plaqueadas em lamelas de vidro revestidas com poli-D-lisina/laminina em placas de 24-poços. Após 3 horas o meio de plaqueamento é substituído por meio de cultura (Neurobasal A contendo 2% de suplemento B-27, 2 mM de Glutamax-I e 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). ChR2(L132C)-YFP mutante e ChR2 (WT)-YFP são transfetados 5-10 dias após plaqueamento utilizando o reagente lipofectamina 2000 (Invitrogen). Alternativamente, 2-5 x 10⁹ GC/mL de vírus (AAV2/7-CAG-ChR2(L132C)-2A-EGFPWPRES-bGH) podem ser adicionados a cada poço 4-9 dias após plaqueamento. A construção representativa da construção do vetor viral Adeno-associado é

descrita em detalhe nos exemplos a seguir. A expressão torna-se visível 5 dias pós-tradução. Nenhum retinal trans é adicionado ao meio de cultura ou meio de registo para qualquer das experiências.

Para os registos de célula completa em neurónios do hipocampo em cultura, pipetas patch com resistências de 5-10 MΩ são preenchidas com 129 mM de gluconato de potássio, 10 mM de HEPES, 10 mM de KCl, 4 mM de MgATP e 0,3 mM de Na₃GTP, titulado até pH 7,2. A solução de Tyrode é empregue como a solução extracelular (125 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 2 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 30 mM de glucose e 25 mM HEPES, titulados até pH 7,4). A solução extracelular nominalmente isenta de Ca⁺⁺ contém esta mesma solução exceto tendo 0 mM Ca⁺⁺ e 3 mM de Mg⁺⁺. Os registos são conduzidos na presença dos bloqueadores de transmissão sináptica excitatória, 1,2,3,4-tetra-hidro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxalino-7-sulfonamida (NBQX, 10 mM, Sigma) e ácido D(-)-2-Amino-5-fosfonopentanóico (AP-5, 50 mM, Sigma). Para os registos de tensão em fixação, 1 mM de tetrodotoxina é adicionado à solução extracelular. Para inibir a atividade do Canal BK, é adicionado 1 mM de TEA. Os registos são conduzidos num microscópio invertido Zeiss Axiovert 25 equipado com uma lâmpada fluorescente. A expressão de proteína bem sucedida é provada por fluorescência mediada por EGFP ou YFP. A resistência neuronal de acesso é 15-40 MΩ e é monitorizada quanto a estabilidade através da experiência. Os sinais electrofisiológicos são amplificados utilizando um amplificador Axopatch 200A (Axon

Instruments, Union City, CA), filtrado a 10 kHz, digitalizado com um Axon Digidata 1600 (50 Hz) e adquirido e analisado utilizando o programa pClamp9 (Axon Instruments). As fotocorrentes são evocadas utilizando pulsos de luz de vários comprimentos a partir de lasers de estado sólido bombeados por diodo (Pusch Opto Tech GmbH; λ_1 = 473 nm, P_1 = 100 mW, λ_2 = 532 nm, P_2 = 50 mW) ou 10 ns flashes de um laser excímero com corante bombeado (Coumarina 2, λ = 450 nm). As intensidades de luz específicas são intensidades na extremidade de uma fibra ótica de quartzo de 400 mm de diâmetro (STE-F100/400-Y-VIS/NIR; Laser 2000, Wessling, Alemanha) a uma distância de ~500 mm da célula. As correntes medidas em neurónios que expressam ChR2(L132C)-YFP e ChR2(L132C)-2A-EGFP são idênticas.

Adicionalmente, a condutividade do cálcio do canal iónico mutante indutível com luz da invenção é aumentada pelo menos duas vezes, de um modo preferido pelo menos três-vezes, de um modo mais preferido pelo menos quatro-vezes em comparação com WT CHOP-2, como determinado por imagiologia Fura-2 em células HEK293. De modo a determinar a condutividade do cálcio, Fura-2 AM (5 mM; Invitrogen) é aplicado à temperatura ambiente durante 30 min a 1 hora. Após aplicação, as células são recuperadas numa solução a 140 mM de NaCl sem Ca^{++} (140 mM de NaCl, 7 mM de EGTA, 2 mM de MgCl_2 e 10 mM de HEPES). A proteína amarelo fluorescente é excitada aos 500 ms de exposição à luz utilizando um filtro 460/40 nm (Visitron Systems,

Puchheim, Alemanha) para estimar cada nível de expressão das células a partir da sua fluorescência de YFP. A solução é então substituída por uma solução extracelular de Ca^{++} que consiste em 90 mM de CaCl_2 , 7 mM de EGTA, 2 mM de MgCl_2 e 10 mM de HEPES. Após 15 min no escuro, os canais acionados pela luz são estimulados durante 10 s com luz azul (460/40 nm). Fura-2 é excitada com 340 nm (340/20) e 380 nm (380/20) e a luz emitida (540/80 nm) detetada com uma câmara CCD (todos os filtros de Visitron Systems, Puchheim, Alemanha).

Como implicado acima, o canal iônico mutante indutível com luz pode adicionalmente compreender outras mutações, de um modo preferido substituições. Numa forma de realização preferida, o canal iônico indutível com luz pode adicionalmente compreender pelo menos um dos seguintes resíduos de aminoácidos: ácido aspártico numa posição correspondente à posição 253 da SEQ ID NO: 1; lisina numa posição correspondente à posição 257 da SEQ ID NO: 1; triptofano numa posição correspondente à posição 260 da SEQ ID NO: 1; ácido glutâmico numa posição correspondente à posição 123 da SEQ ID NO: 1; histidina ou arginina, de um modo preferido arginina, numa posição correspondente à posição 134 da SEQ ID NO: 1; treonina, serina, ou alanina numa posição correspondente à posição 128 da SEQ ID NO: 1; e/ou alanina numa posição correspondente à posição 156 da SEQ ID NO: 1. De acordo com o exposto, o canal iônico mutante indutível com luz pode compreender uma das combinações seguintes de resíduos de aminoácidos nas posições indicadas, posições que correspondem a SEQ ID NO: 1:

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

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

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

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

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

Cys 132 + His 134 + Thr 128; Cys 132 + His 134 +

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

No entanto, na lista acima, Cys 132 pode também ser substituído por Ser 132, Glu 132, Asp 132, ou Thr 132.

Em geral, o retinal ou derivado de retinal necessário para o funcionamento do canal iônico indutível com luz é produzido pela célula a ser transfetada com o

referido canal de iões. Dependendo da sua conformação, o retinal pode ser todo retinal trans, 11-cis-retinal, 13-cis-retinal, ou 9-cis-retinal. No entanto, está também contemplado que o canal iónico mutante indutível com luz da invenção pode ser incorporado em vesículas, lipossomas ou outras membranas artificiais de células. De acordo com o exposto, num segundo aspeto, a invenção proporciona um canalrodopsina, compreendendo o canal iónico indutível com luz de acordo com o primeiro aspeto e um retinal ou derivado de retinal. De um modo preferido, o derivado de retinal é selecionado a partir do grupo consistindo em 3,4-desidroretinal, 13-etilretinal, 9-dm-retinal, 3-hidroxirretinal, 4-hidroxirretinal, naftilretinal; 3,7,11 -trimetildodeca-2,4,6,8,10-pentaenal; 3,7-dimetil-deca-2,4,6,8-tetraenal; 3,7-dimetil-octa-2,4,6-trienal; e retinais com rotação bloqueada em 6-7, retinais com rotação bloqueada em 8-9, e retinais com rotação bloqueada em 10-11. Adicionalmente, as formas de realização preferida do primeiro aspeto correspondem às formas de realização preferidas do segundo aspeto.

Num terceiro aspeto, a invenção também se refere a uma construção de ácido nucleico, compreendendo uma sequência de nucleótidos codificante para o canal iónico indutível com luz de acordo com o primeiro aspeto. Para assegurar expressão ótima, o DNA codificante pode também ser adequadamente modificado, por exemplo por adição de adequadas sequências reguladoras e/ou sequências de direcionamento e/ou por coincidência da sequência de DNA

codificante com a utilização de códons preferida do hospedeiro selecionado. A sequência de direcionamento pode codificar uma extensão C-terminal que direcciona para o canal iónico indutível com luz num sítio particular ou compartimento na célula, tal como o sítio da sinapse ou pós-sinapse, no na base do axónio, ou no retículo endoplasmático. O ácido nucleico pode ser combinado com outros elementos, e.g., um promotor e um sinal de início e interrupção de transcrição e um sinal de início e interrupção de tradução e um sinal de poliadenilação de modo a proporcionar a expressão da sequência da proteína da invenção. O promotor pode ser indutível ou constitutivo, um promotor geral ou específico para a célula. Um exemplo de um promotor específico para a célula é o promotor mGlu6 específico para células bipolares. Seleção de promotores, vetores e outros elementos é uma questão de conceção de rotina ao nível do normal especialista na técnica. Muitos destes elementos são descritos na literatura e estão disponíveis em fornecedores comerciais.

De acordo com o exposto, num quarto aspeto, a invenção proporciona um vetor de expressão, compreendendo uma sequência de nucleótidos codificante para o canal iónico indutível com luz de acordo com o primeiro aspeto ou a construção de ácido nucleico de acordo com o terceiro aspeto. Numa forma de realização preferida, o vetor é adequado para terapia génica, em particular em que o vetor é adequado para transferência de genes mediada por vírus. O termo "adequado para transferência de genes mediada por

vírus" significa aqui que o referido vetor pode ser empacotado num vírus e depois ser distribuído no sítio ou nas células de interesse. Exemplos de vírus adequados para terapia génica são retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados, lentivírus, pox vírus, alfavírus, vírus da raiva, vírus da floresta de Semlikie, vírus herpes. Estes vírus diferem em como transferem genes para as células que reconhecem e são capazes de infetar, e se estes alteram o DNA das células permanentemente ou temporariamente. No entanto, a terapia génica também inclui métodos não virais, tais como aplicação de DNA nu, lipoplexos e poliplexos, e dendrímeros.

Como descrito acima, a sequência de ácido nucleico resultante pode ser introduzida nas células e.g. utilizando um vírus como um veículo ou por transfeção incluindo e.g. por transfetantes químicos (tal como Lipofectamina, Fugene, etc.), electroporação, co-precipitação com fosfato de cálcio e difusão direta de DNA. Um método para transfetar uma célula é detalhado nos exemplos e pode ser adaptado à respectiva célula recipiente. A transfeção com DNA produz células estáveis ou linhas de células, se o DNA transfetado for integrado no genoma, ou células instáveis (transientes) ou linhas de células, em que o DNA transfetado existe numa forma extracromossómica. Além disso, as linhas de células estáveis podem ser obtidas utilizando plasmídeos de replicação epissómica, o que significa que a herança do plasmídeo extracromossómico é controlada por elementos de controlo que são integrados no

genoma da célula. Em geral, a seleção de um vetor ou plasmídeo adequado depende da célula hospedeira pretendida.

Deste modo, num quinto aspeto, a invenção refere-se a uma célula compreendendo o canalrodopsina de acordo com o segundo aspeto, a construção de ácido nucleico de acordo com o terceiro aspeto ou o vetor de expressão de acordo com o quarto aspeto.

Como será descrito a seguir, uma aplicação do canal iónico mutante indutível com luz de acordo com a presente invenção é o tratamento de indivíduos cegos tal como humanos ou animais. Existem várias doenças em que as células naturais da visão já não funcionam, mas todas as conexões nervosas são capazes de continuar a operar. Actualmente, estão a ser feitas tentativas em vários centros de investigação para implantar filmes finos com fotocélulas artificiais cerâmicas na retina. Estas fotocélulas são necessárias para despolarizar as células secundárias, ainda intactas do retinal e deste modo desencadear um impulso nervoso (olhos biónicos). A expressão deliberada de canais de iões controlados pela luz de acordo com a invenção nestas células ganglionares, células amácrinas ou células bipolar seria uma solução muito mais elegante e permitiria uma resolução visual tridimensional superior.

A incorporação do canal iónico mutante indutível com luz na membrana de células que não expressam os canais

correspondentes na natureza pode, por exemplo, ser simplesmente efetuada nestas, utilizando procedimentos conhecidos da tecnologia do DNA recombinante, o DNA codificante para este canal de iões é primeiramente incorporado num vetor de expressão adequado, e.g. um plasmídeo, a cosmídeo ou um vírus, as células alvo são então transformadas com isto, e a proteína é expressa neste hospedeiro. A seguir, as células são tratadas de uma forma adequada, e.g. com retinal, de modo a permitir a ligação de uma base de Schiff entre a proteína e o retinal.

Numa forma de realização preferida, isto ocorre em várias leveduras tal como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ou *Pichia pastoris* como já efectuado com sucesso para as rodopsinas tais como bacteriorrodopsina e/ou rodopsina bovina.

A expressão pode também ser efetuada em certos sistemas de células de mamífero ou sistemas de células de inseto. Deste modo, numa forma de realização preferida, a célula é uma célula de mamífero ou uma célula de inseto. A expressão é efetuada com vetores epissómicos como a expressão transiente, de um modo preferido em células de melanoma (e.g., A linha de células BLM), células COS (produzidas por infecção de células "CV1 de rim de macaco verde Africano") ou células HEK ("células de rim embrionário humano", e.g. células HEK293), ou células BHK ("células de rim de hamster bebé"), ou na forma de expressão estável (por integração no genoma) em células CHO

("células de ovário de hamster Chinês"), células de mieloma ou células MDCK ("células de rim de canino Madine-Darby") ou em células de inseto Sf9 infetadas com baculovírus. De acordo com o exposto, numa forma de realização mais preferida a célula de mamífero é uma célula COS; uma célula BHK; uma célula HEK293; uma célula CHO; uma célula de mieloma; ou uma célula MDCK.

No contexto da restauração da visão, numa forma de realização mais preferida, a célula de mamífero é uma célula fotorrecetora; uma célula retinal em bastonete; uma célula retinal em cone; uma célula retinalganglionar; um neurónio bipolar; uma célula ganglionar; um neurónio pseudounipolar; um neurónio multipolar; um neurónio piramidal, uma célula de Purkinje; ou uma célula granular.

Um neurónio é uma célula eletricamente excitável que processa e transmite informação por sinalização elétrica e química, em que a sinalização química ocorre através de sinapses, conexões especializadas com outras células. Existem vários tipos de células especializadas de neurónios tais como neurónios sensoriais que respondem ao toque, som, luz e vários outros estímulos que afetam as células dos órgãos sensoriais, neurónios motores que recebem sinais a partir do cérebro e medula espinal e causam contrações musculares e afetam glândulas, e interneurónios que ligam neurónios a outros neurónios na mesma região do cérebro ou medula espinal. Geralmente, um neurónio possui um soma, dendrites, e um axónio. As

dendrites são filamentos que provêm do corpo da célula, frequentemente estendido por centenas de microns e que ramifica múltiplas vezes. Um axónio é um filamento celular especial que provém do corpo da célula num sítio denominado o cone do axónio. O corpo celular de um neurónio origina frequentemente múltiplas dendrites, mas nunca mais do que um axónio, embora o axónio possa ramificar centenas de vezes antes de terminar. Na maioria das sinapses, os sinais são enviados do axónio de um neurónio para uma dendrite de outro. Existem, no entanto, muitas exceções a estas regras: neurónios que não possuem dendrites, neurónios que não têm axónio, sinapses que conectem um axónio a outro axónio ou uma dendrite a outra dendrite, etc. A maioria dos neurónios pode ser ainda anatomicamente caracterizada como unipolar ou pseudounipolar (dendrite e axónio emergem do mesmo processo), bipolar (axónio e dendrite únicos em extremidades opostas do soma), multipolar (possuindo mais do que duas dendrites e pode ser ainda classificado como (i) neurónios Golgi I com processos axonais de projeção longa, tais como as células piramidais, células de Purkinje, e células pituitárias anteriores, e (ii) Golgi II: neurónios cujo processo axonal se projeta localmente, e.g., células granulares.

A célula fotorrecetora é um neurónio especializado encontrado na retina que é capaz de fototransdução. Os dois fotorrecetores clássicos são bastonetes e cones, cada um contribuindo com informação utilizada pelo sistema visual. Uma célula do gânglio retinal é um tipo de neurónio

localizado na superfície interna da retina do olho. Estas células têm dendrites e longos axónios que se projetam para o *protectum* (mesencéfalo), o núcleo supraquiasmático no hipotálamo, e o geniculato lateral (tálamo). Uma pequena percentagem contribui pouco ou nada para a visão, mas são eles próprios fotossensíveis. Os seus axónios formam o trato retino-hipotalâmico e contribuem para os ritmos circadianos e reflexo pupilar à luz, o redimensionamento da pupila. Estes recebem informação visual dos fotorrecetores via dois tipos de neurónios intermediários: células bipolares e células amácrinas. As células amácrinas são interneurónios na retina, e responsáveis por 70% da entrada das células ganglionares retiniais. As células bipolares, que são responsáveis pelos outros 30% da entrada nos gânglios retiniais, são reguladas por células amácrinas. Como uma parte da retina, a célula bipolar existe entre os fotorrecetores (células bastonetes e células cone) e células ganglionares. Estas atuam, diretamente ou indiretamente, para transmitir sinais dos fotorrecetores para as células ganglionares.

A célula pode ser isolada (e geneticamente modificada), mantida e cultivada a uma temperatura apropriada e mistura de gases (tipicamente, 37 °C, 5% de CO₂), opcionalmente num incubador de células como conhecido do especialista e como exemplificado para certas linhas de células ou tipos de células nos exemplos. As condições de cultura podem variar para cada tipo de célula, e a variação de condições para um particular tipo de célula pode

resultar em diferentes fenótipos. Para além da temperatura e mistura de gás, o fator normalmente mais variado em sistemas de cultura de células é o meio de cultura. As receitas para os meios de crescimento podem variar no pH, concentração de glucose, fator de crescimento e na presença de outros componentes nutrientes entre outros. Os meios e crescimento são comercialmente disponíveis, ou podem ser preparados de acordo com composições, que são obtíveis de American Tissue Culture Collection (ATCC). Os fatores de crescimento utilizados para suplemento de meios são frequentemente derivados de sangue animal tal como soro de vitela. Adicionalmente, os antibióticos podem ser adicionados aos meios de cultura. Entre as comuns manipulações efetuadas em células em cultura estão as alterações de meios e passagem das células.

Existem potenciais campos adicionais para a aplicação de CatCh. Uma vez que o Ca^{++} é um importante regulador intracelular, CatCh abre as portas a intervenção ótica na homeostase afinada por Ca^{++} da célula, modulando o seu estado e atividade. Na investigação básica, CatCh pode ser utilizada para controlar óticamente a exocitose dependente de Ca^{++} como uma alternativa a Ca^{++} aprisionado (e.g. libertação de transmissor na sinapse), para ativar óticamente a jusante processos intracelulares através de cinases ativadas por cálcio e fosfatases ou para induzir apoptose direcionando CatCh para compartimentos intracelulares tais como o aparelho de Golgi ou o retículo endoplasmático.

Deste modo, um outro aspecto da invenção é uma utilização do canal iônico indutível com luz de acordo com o primeiro aspecto ou canalrodopsina de acordo com o segundo aspecto, ou a construção de ácido nucleico de acordo com o terceiro aspecto, ou a célula de acordo com a invenção como um medicamento. Em particular, o vetor de expressão da invenção pode ser utilizado em terapia génica. Mais especificamente, o canal iônico indutível com luz de acordo com o primeiro aspecto, canalrodopsina de acordo com o segundo aspecto, construção de ácido nucleico de acordo com o terceiro aspecto, ou a célula de acordo com a invenção pode ser utilizada no tratamento de cegueira ou vista reduzida. No entanto, devido ao seu rápido início da ação de ativação até 300 Hz e repolarização acelerada, uma utilização do canal iônico indutível com luz no restabelecimento da audição ou tratamento da surdez está também contemplado.

Adicionalmente, o canal iônico mutante indutível com luz de acordo com o primeiro aspecto pode compreender substituições adicionais (denominadas SFO, ou mutantes lentos, ver Tabela 1), que leva a um influxo de cálcio induzido pela luz permanente, que por sua vez leva a morte da célula. De acordo com o exposto, uma utilização do canal de iões indutível com luz de acordo com a invenção adicionalmente possuindo treonina, serina, ou alanina numa posição correspondente à posição 128 da SEQ ID NO: 1; e/ou alanina numa posição correspondente à posição 156 da SEQ ID

NO: 1 na ablação de células de cancro está contemplada. Por exemplo, o vetor de expressão de acordo com a invenção podia ser direcionado por transferência de genes mediada por vírus através de um marcador de superfície de células de cancro até às células de cancro. Além disso, é notado que em particular o retrovírus integra, de um modo preferido, em células de divisão rápida, tal como as células de cancro. Como uma consequência, o canal iónico indutível com luz de acordo com a presente invenção é predominantemente expressa e incorporada na membrana celular de células de cancro. Após estimulação pela luz, estes canais de iões abrem e induzem um influxo de cálcio permanente, levando deste modo à morte da célula de cancro. Esta utilização é particularmente vantajosa na ablação de células de cancro que estão naturalmente expostas à luz, tais como as células de cancro de melanoma. Deste modo, numa forma de realização preferida, cancro é um cancro de melanoma.

Num aspeto final, a invenção pertence a uma utilização de um canal iónico indutível com luz de acordo com o primeiro aspeto, ou um canalrodopsina de acordo com o segundo aspeto, ou uma célula de acordo com a invenção numa pesquisa com elevado processamento. Uma pesquisa de elevado processamento (HTS), é um método para experimentação científica especificamente utilizado na descoberta de fármacos e relevante para os campos da biologia e química. A HTS permite que um investigador conduza eficazmente milhões de testes bioquímicos, genéticos ou farmacológicos

num curto período de tempo, frequentemente através de uma combinação de robótica moderna, processamento de dados e software de controlo, dispositivos de manipulação de líquidos, e detetores sensíveis. Através deste processo, pode-se rapidamente identificar agentes ativos que modulam uma particular via biomolecular; particularmente uma substância que modifica um canal de iões, tal como o canal iónico indutível com luz de acordo com a invenção, um canal de potássio induzido por Ca^{++} , ou um canal BK. Por exemplo, pode-se co-expressar o canal de potássio indutível com Ca^{++} e o canal iónico indutível com luz numa célula hospedeira. Após estimulação por luz, o canal indutível por luz abre e a concentração intracelular de Ca^{++} aumenta, ativando deste modo o canal de potássio. Assim, receberá uma alteração no potencial de membrana, que pode ser monitorizado por corantes sensíveis ao potencial tal como o RH 421 (N-(4-Sulfobutil)-4-(4-(4-(dipentilamino)fenil)butadienil)piridínio, sal interno). Esta HTS pode deste modo compreender os passos que se seguem: (i) colocar em contacto uma célula que expressa um canal (potássio) indutível por Ca^{++} e o canal iónico indutível com luz de acordo com a invenção com um agente candidato direcionado contra o canal indutível por Ca^{++} , (ii) aplicação de um estímulo de luz de modo a induzir o canal sensível à luz, (iii) determinação da alteração do potencial de membrana (sinal misto), e (iv) comparação do sinal determinado no passo (iii) com o sinal determinado numa célula que apenas expressa o canal iónico indutível com luz de acordo com a invenção sujeita ao passo (ii) (sinal único). Uma redução na alteração do potencial

de membrana pode ser indicativa de um promissor modulador do canal (potássio) indutível por Ca^{++} . Esta abordagem produz supostamente uma proporção de sinal:ruído de aproximadamente 5:1, que está bastante melhorada em comparação com medições diretas conduzidas numa célula que apenas expressa o canal indutível com Ca^{++} . Devido à proporção melhorada de sinal:ruído, o referido método, em particular utilizando o canal iónico indutível com luz, pode ser particularmente adequado para HTS.

Na sua essência, o HTS utiliza uma abordagem para recolher uma grande quantidade de dados experimentais no efeito de uma multitude de substâncias num alvo particular num tempo relativamente curto. Um rastreio, neste contexto, é a maior experiência, com uma única célula (normalmente a testar uma hipótese científica), a que todos os dados podem ser subsequentemente aplicados. As células HTS de acordo com a invenção podem ser semeadas numa placa de tecidos, tal como uma placa multipoço, e.g. uma placa de 96 poços. Depois as células na placa são colocadas em contacto com a substância de teste durante um tempo suficiente para interagir com o canal de iões alvo. A substância de teste pode ser diferente de poço para poço ao longo da placa. Após ter passado o tempo de incubação, as medições são realizadas ao longo de todos os poços da placa, manualmente ou através de uma máquina e opcionalmente em comparação com as medições de uma célula que não foi colocada em contacto com a substância de teste. As medições manuais podem ser necessárias quando o investigador utiliza fixação de

membranas, procurando efeitos ainda não implementados em rotinas automatizadas. Por outro lado, uma máquina de análise automatizada especializada pode analisar experiências nos poços (tal como analisar a luz de uma frequência particular ou uma medição de elevado processamento de fixação de membranas). Neste caso, a máquina apresenta o resultado de cada experiência e.g. como uma grelha de valores numéricos, com cada número a mapear o valor obtido a partir de uma única célula. Dependendo dos resultados deste primeiro ensaio, o investigador pode realizar ensaios sucessivos no mesmo rastreio utilizando substâncias semelhantes às identificadas como ativas (i.e. uma modificação de um nível intracelular de nucleótido cíclico) em novas placas de ensaio, e depois repetir a experiência para recolher outros dados, otimizar a estrutura do agente químico para melhorar o efeito do agente na célula. O automatismo é um importante elemento na utilidade de HTS. Um robot especializado é frequentemente responsável pela maior parte do processo ao longo do tempo de vida de uma única placa de ensaio, desde a sua criação até à análise final. Um robot HTS pode normalmente preparar e analisar muitas placas simultaneamente, aumentando assim a velocidade do processo de recolha de dados. Exemplos de dispositivos adequados para HTS de acordo com a presente invenção compreendem um Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPRTM; Molecular Devices), FLEXstationTM (Molecular Devices), Voltage Ion Probe Reader (VIPR, Aurora Biosciences), Attofluor® Ratio Vision® (ATTO).

No que se segue, a presente invenção é ilustrada por figuras e exemplos que não pretendem limitar o âmbito da presente invenção.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 Modelo de homologia Chr2 com base na estrutura Sensory Rhodopsin 2 (PDB code 1H2S). A região alvo para a pesquisa de cisteína (R115 a T139) está localizada na hélice transmembranar 3 (TM3) e está assinalada a vermelho. A inserção mostra a presumível localização do L132C mutado, os C128 e D156 ligados por hidrogénio, ligando as TM3 e TM4 como indicado pela linha a ponteadado, e os resíduos homólogos para o dador de protões (H134) e aceitador de protões (E123), respetivamente. O cromóforo é formado por todos os *trans* retinal (ATR) e K257 covalentemente ligados por uma base de Schiff. A cavidade formada pela remoção dos grupos metilo das leucinas é apresentada como esferas e sobreposta no grupo sulfidrilado mutado do resíduo de cisteína (bola amarela). A figura foi preparada com VMD 30

Figura 2 Caracterização biofísica de CatCh em células HEK293 e oócitos de *Xenopus*. **(a)** Esquerda, sumário das amplitudes de corrente estacionária em response a 500 ms pulsos de luz azul medidos em células HEK293 a -60 mV que expressam CatCh (preto) e Chr2 WT (vermelho), apresentadas como a média \pm d.p. (n=6). Direita, comparação de cinética de desaparecimento de fotocorrentes normalizadas para correntes estacionárias. **(b)** Esquerda, as fotocorrentes

atuais em resposta a pulsos de luz azul 473-nm 1-s. os traços são normalizados para a amplitude do pico da fotocorrente para ilustrar o aumento na proporção da corrente estacionária para pico em CatCh (preto) em comparação com WT (vermelho). Direita, comparação da cinética de aparecimento das fotocorrentes normalizadas para os picos de corrente. **(c)** resposta a luz de 473-nm de oócitos de *Xenopus* que expressam CatCh e ChR2 WT em 80 mM de Ca^{++} extracelular (pH 9) a -120 mV (traços contínuos inferiores). Injeção do quelante de Ca^{++} BAPTA para uma concentração final citossólica de 1 mM aboliu as correntes sobrepostas dos canais intrínsecos de cloreto ativados por Ca^{++} , enquanto as correntes residuais de Ca^{++} no canalrodopsina permaneceram (traços ponteados superiores). As correntes foram normalizadas para o pico de corrente de ChR2 WT e são típicas de outras seis experiências. Note-se a maior diferença de amplitude de fotocorrente antes e depois da injeção de BAPTA de CatCh, indicando a sua aumentada permeabilidade ao Ca^{++} em comparação com ChR2 WT. **(d)** As características de fluxo de íões de CatCh em células HEK293 a -80 mV (n=6, ver métodos). **(e)** Relações corrente-voltagem de ChR2 WT (-■-) e CatCh (-▲-) em 90 mM de CaCl_2 em comparação com 140 mM de NaCl (-●-, ChR2 WT e CatCh sobrepostas). As correntes normalizadas para a corrente de ChR2 WT a -100 mV. O potencial de reversão de CatCh em CaCl_2 é deslocada para potenciais positivos, indicando uma permeabilidade aumentada ao Ca^{++} (média \pm d.p., n=5). **(f)** medições do influxo de Ca^{++} de Fura-2 em células HEK293 que expressam ChR2 WT (●) e CatCh (■) a 10 s de luz de 460 nm

(barra azul) na presença de 90 mM de Ca^{++} extracelular ($n=10$) mostrando uma elevação com aumento de quatro-vezes no Ca^{++} intracelular em CatCh (células HEK293 controlo não transfectadas, ▲).

Figura 3 Expressão de CatCh em neurónios do hipocampo em cultura, **(a)** Imagem confocal de um neurónio do hipocampo em cultura que expressa ChR2(L132C)-2A-EGFP sob o promotor CAG. Escala da barra 20 μm . **(b)** Comparação das fotocorrentes típicas de CatCh (preto) e WT (vermelho) suscitadas por um pulso de 600 ms de luz azul de 473-nm ($J_{473\text{nm}} 1 \times 10^{19}$ fotões $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$). **(c)** Sumário das amplitudes de corrente estacionária (-60 mV, $n=6$).

Figura 4 Fotoestimulação neural de sensibilidade rápida e elevada. **(a-d)** Registo de corrente em fixação de membrana representativo de célula total de um neurónio do hipocampo que expressa CatCh em resposta a pulsos de luz de 2-s. **(a)** A intensidade de luz de 473-nm requerida pela WT induz um bloco de despolarização ($J_{473 \text{ nm}} 2,5 \times 10^{17}$ fotões $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$). **(b)** Reduzir a intensidade de luz restabelece o acendimento ($J_{473 \text{ nm}} 2,5 \times 10^{16}$ fotões $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$). **(c)** Curva de afinação de luz representativa para ativação da ação ($J_{\text{max}} 9,7 \times 10^{16}$ fotões $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$, média \pm d.p., 2 vezes). **(d)** Iluminação verde moderada de 532-nm também evoca sequências de potenciais de ação ($J_{532 \text{ nm}} 2,5 \times 10^{17}$ fotões $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$). **(e)** A latência do pico do pulso de luz para a ativação ao longo das sequências de pulso de luz consistindo em 25 pulsos de luz de 473-nm de 1-ms ($J_{473 \text{ nm}} \times 3 \times 10^{18}$ fotões $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$, média

\pm d.p. [jitter]), em 2 mM de Ca^{++} extracelular (■) e como controle a 5 Hz em 3 mM de Mg^{++} extracelular (■), que aumenta a latência para valores semelhantes aos de ChR2 WT. **(f)** o início de ativação em resposta a pulsos de 1-ms de 473-nm a uma taxa de 50 Hz ($J_{473 \text{ nm}} 2,8 \times 10^{19}$ fótons $\text{s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) e **(g)** em resposta a pulsos de luz de 473-nm de 10 ns a 10 Hz ($J_{473 \text{ nm}} 1,1 \times 10^{25}$ fótons $\text{s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$). **(h)** A repolarização de membrana incompleta (seta com duas cabeças) devido à inibição de canais BK por 1 mM de TEA. A sobreposição da 3ª sequência de pulso de ativação (preto), 1ª ativação (vermelho) e 3ª ativação (azul) após aplicação de TEA ($J_{473 \text{ nm}} 1,8 \times 10^{18}$ fótons $\text{s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$). **(i)** Substituição de Ca^{++} por Mg^{++} na solução extracelular abrandando a ativação da repolarização e causa a despolarização prolongada (5 Hz, Esquerda) e a formação de múltiplas ativações em frequências mais elevadas (20 Hz, Direita) ($J_{473 \text{ nm}} 8,3 \times 10^{18}$ fótons $\text{s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$).

Figura 5 Caracterização espectral de CatCh. Após a excitação de luz, o CatCh mutante (traços a preto) entra num fotociclo comparável ao do WT (traços a vermelho) em cinética e na presença de fotointermediários. A figura apresenta as alterações espectrais após excitação a 450 nm com os comprimentos de onda característicos para a base de Schiff desprotonada, P390 (381 nm, painel superior), para P520, dominante no estado aberto (541 nm, segundo painel), e no estado basal (440 nm, terceiro painel). O primeiro intermediário deslocado para o vermelho, presumivelmente P500, não é resolvido e é apenas detetado como desloca-

mento. A base de Schiff desprotona na escala de tempo de microssegundo ($\tau=50$ ms), um evento que é dificilmente observável devido com a baixa amplitude a 381 nm, concomitante com um aumento aos 541 nm. O aumento do intermediário P520 ocorre no processo que se segue ($t=1,5$ ms), antes de decair ($t=9$ ms) populando deste modo uma segunda espécie permanente (P480). O estado basal (D470) reverte no processo a seguir ($t=10$ s). As transições no fotociclo assemelham-se às observadas na WT. Como para a cinética de abertura e de fecho nas medições das correntes, a mutação não causa alterações significativas nos estados funcionais. O estado aberto é determinado principalmente pelo intermediário P520. A principal diferença é encontrada no âmbito de amplitude do P390 em comparação com P520 que é inferior à de WT. Deste modo, a mutação L132C não afeta a reação de luz no sítio do cromóforo. Note-se que os dados das cinéticas espectroscópicas do fotociclo não foram alterados na presença de 50 mM de Ca^{++} .

Figura 6 Espectro de ação de CatCh determinado por dois elétrodos-voltagem-fixação em oócitos de *Xenopus*. As amplitudes de corrente foram medidas em diferentes comprimentos de onda (A) na ausência de Ca^{++} (como indicado nos exemplos), normalizados para o fluxo de fótons ($n=6$). Comparação do estado basal (-) e o espectro de ação (■).

Figura 7 as alterações de potencial de superfície induzidas pelo Ca^{++} . É conhecido, que a queda na voltagem através da membrana depende da diferença de potencial aplicada (Ψ') e

é modificada pelo potencial de superfície (Φ_0). Em geral o Φ_0 depende da densidade de carga de superfície negativa, que pode ser modificada pelo rastreamento com contra-íons. Deste modo a ativação dos canais de sódio acionados por voltagem (e outros canais sensíveis a voltagem) pode ser influenciada pela alteração da carga de superfície no lado externo ou interno da membrana ¹⁸. No nosso caso, o Ca^{++} conduzido através de CatCh neutraliza as cargas de superfície negativas na face interna da membrana do neurónio. Através disto, é induzido um efeito de despolarização no potencial de potencial de membrana, levando à indução de potenciais de ação em intensidades de luz inferiores. Um desenho esquemático deste mecanismo é apresentado em a-c (após Hille 2001). (a) No escuro, o canal CatCh é fechado, a diferença de potencial ao longo da membrana, EM (potencial externo aplicado), é equivalente ao potencial de membrana em repouso (aqui estabelecidos aos -60 mV). Para simplicidade, Φ_0 foi estabelecido a Φ_0' . (b) Após a ativação de CatCh pela luz, ocorre o influxo de Na^+ da normal despolarização de membrana. No entanto, o Ca^{++} adicional que entra no neurónio aumenta o potencial de superfície na face da membrana interna (Φ_0''). Quanto maior for o influxo de Ca^{++} , mais positivo será o Φ_0'' (indicado por seta com duas cabeças) e menor será a queda de voltagem através da membrana. Isto facilita a ativação de canais de sódio acionados por voltagem. (c) Substituindo o Ca^{++} extracelular por Mg^{++} , que não permeia através de CatCh e já está presente em ~4 mM no citosol, ocorre apenas um efeito menor de despolarização. Isto é devido a uma mais

fraca ligação de Mg^{++} ao lado extracelular da membrana em comparação com o Ca^{++} , que diminui ligeiramente o potencial de superfície extracelular Φ_0' . Note-se que o efeito de despolarização do potencial de superfície aumenta com a diminuição do declive da queda de voltagem através da membrana.

EXEMPLOS

Construção e caracterização biofísica de CatCh

Em contraste com as abordagens anteriores, o objetivo dos inventores foi identificar resíduos no ChR2 WT cujas mutações modificam a permeabilidade do catião. Os inventores focaram-se no terceiro domínio transmembranar uma vez que vários resíduos mutados neste domínio foram apresentados para alterar o fotociclo e a passagem através do canal (Fig. 1) ^{5-7,12}. Cada resíduo de Arg¹¹⁵ a Thr¹³⁹ foi individualmente substituído por cisteína e pesquisado quanto a alterações funcionais em oócitos de *Xenopus laevis*.

Espetroscopia. CatCh foi expressa e purificada em *Pichia pastoris* como descrito anteriormente.^{5,13}. Estudos de flashfotólise foram efetuados e as alterações de absorvência foram medidas após excitação de um laser flash de 10 ns de um laser de excímero com corante bombeado (450 nm, 2-3 mJ)¹³.

A mutação L132C (CatCh) apresenta alterações significativas na amplitude e forma dos traços da corrente.

Cultura de células HEK293 e biologia molecular.

ChR2 (L132C)-YFP C-terminalmente truncado (vetor: pcDNA3(-)-chop2-309-(L132C)-EYFP) foi transfetado em células HEK293 e mantido sob seleção de G418 todas as vezes (0,6 mg/mL; PAA Alemanha, Cölbe, Alemanha). Para o tipo selvagem ChR2 WT, o ChR2-YFP C-terminalmente truncado (vetor: pcDNA4TO-chop2-309-EYFP) foi estavelmente transfetada em células HEK293-Trex (Invitrogen), cultivadas e induzidas como descrito ¹³. As relações do pico para o basal foram determinadas a partir de células HEK293 transientemente transfetadas (Effectene, QIAGEN) com construções pcDNA3.1(-)-ChR2-YFP otimizadas para os codões humanos (WT, H134R ou L132C) 24 horas antes das medições.

Registos eletrofisiológicos em células HEK293. As pipetas patch com resistências de 2-4 MΩ foram fabricadas a partir de vidro de borossilicato de paredes finas (GB150-8P, Science Products, Hofheim, Alemanha) num extrator horizontal DMZ-Universal (Serial No. 5318904120B, Zeitz-Instruments, Augsburg, Alemanha). As fotocorrentes foram registadas com o método fixação de membranas na célula completa e activada por pulsos de luz de um laser de estado sólido bombeado por diodo (Pusch Opto Tech GmbH, Baden Baden, Alemanha; $\lambda = 473$ nm) focado numa fibra ótica de 400 μ m. Os pulsos de luz foram aplicados por uma porta rápida controlada por computador (Uniblitz LS6ZM2, Vincent

Associates). Todas as intensidades de luz dadas são medidas na extremidade da guia de luz. Para ter uma estimativa da permeabilidade para diferentes catiões, mediu-se as relações da fotocorrente-voltagem e determinou-se o potencial inverso. A solução intracelular continha 140 mM de NaCl, 7 mM de EGTA, 2 mM de $MgCl_2$ e 10 mM de Tris (pH=9) e a solução extracelular continha 140 mM de NaCl, 2 mM de $MgCl_2$ e 10 mM de Tris (pH=9). Para permeabilidades para os catiões, o NaCl externo a 140 mM foi trocado por 140 mM de KCl, 90 mM de $CaCl_2$ ou 90 mM de $MgCl_2$, respectivamente.

As permeabilidades dos prótons foram determinadas a partir do deslocamento do potencial reverso da relação corrente-voltagem quando o pH foi reduzido de 9 a 7,4 (ou 6). As taxas de permeabilidade foram calculadas de acordo com a equação de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK), incluindo os termos para Na^+ , K^+ , H^+ e Ca^{++} .

Em células HEK293, as correntes basais de CatCh induzidas por luz azul eram de amplitude ~2,5-vezes superior em comparação com ChR2 WT 24 h após transfeção (CatCh: $25,0 \pm 8,8$ pA/pF; WT: $10,1 \pm 4,1$ pA/pF; média \pm d.p., n=6, -60 mV, Fig. 2a). A proporção de corrente basal para o pico também aumentou de $0,37 \pm 0,18$ no WT para $0,71 \pm 0,16$ em CatCh (Fig. 2b). Durante a estimulação repetitiva com luz azul de CatCh o pico de corrente desapareceu. Recuperou em minutos no escuro, quando a recuperação não foi prematuramente induzida por luz amarela. Em contraste, uma recuperação completa do pico de corrente de ChR2 WT sob

condições idênticas leva 20 segundos ¹³. As constantes de tempo de ativação e desativação de CatCh ($\tau_{on} = 590 \pm 3$ ms, $\tau_{off} = 15 \pm 2$ ms, $n=9$, pH 7,4, -60 mV, média \pm d.p.) foram ligeiramente mais longos em comparação com ChR2 WT ($\tau_{on} = 214 \pm 2$ ms, $\tau_{off} = 10 \pm 1$ ms, $n= 9$, pH 7,4, -60 mV; média \pm d.p.; Figs. 2a,b, Fig. 5 painel inferior, tabela 1).

A seguir, os inventores compararam os efeitos descritos nas propriedades do canal com as alterações espectrais no fotociclo. Experiências de fotólise flash em CatCh purificado revelaram apenas desvios menores do espectro de ChR2 WT ¹³ (ver Fig. 5). 1. O intermediário precoce P390, que representa a base de Schiff desprotonada, é fracamente detetável. 2. O intermediário P520, que representa o estado tempo de vida ligeiramente aumentado de 9 ms, comparável com o valor de τ_{off} determinado eletrofisiologicamente. Valores de tempo de vida em aberto semelhantes foram obtidos para o mutante H134R, que mostrou uma atividade duplicada em unidades de condutância inalterada de 2,14. Deste modo, também no caso de CatCh, a cinética de desaceleração do estado aberto podia ser responsável por aumentar em 2,5-vezes as correntes basais medidas em células HEK293, enquanto a unidade de condutância permanece inalterada. Isto foi confirmado por medição da condutância de canal único do CatCh utilizando a análise de ruído estacionária como previamente descrito ¹⁴.

Análise de Ruído. Foram efetuadas experiências em células HEK293 como descrito anteriormente ¹⁴ e conduzidas

à temperatura ambiente (23°C). A solução da pipeta continha 1 mM de Guanidina-HCl, 199 mM de NMG-Cl (N-Metilglucamina), 10 mM de EGTA, 2 mM de $MgCl_2$, e 20 mM de Hepes (pH 7,4), a solução do banho continha 200 mM de guanidina-HCl, 2 mM de $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, e 20 mM de Hepes (pH 7,4). A corrente de resposta a um estímulo de luz azul foi registada sob aplicação de um protocolo de passos de voltagem sob condições saturantes de luz e de novo sob condições de luz em que a resposta de corrente a -60 mV foi metade da corrente máxima ($I_{0,5}$; 2 kHz filtro Bessel de pouca passagem; taxa de amostragem: 100 kHz; diâmetro da célula: 15 mm). Registos da $I_{0,5}$ basal durante iluminação prolongada (2 min) a -60 mV de potencial de espera foram utilizados para estimar a condutância do canal único (filtro Bessel com pouca passagem de 2 kHz; taxa de amostragem de 20 kHz). Registos alternantes sem (controlo, 3 registos) e com iluminação (2 registos, 30 seg após o início do estímulo de luz) foram recolhidos, sujeitos a transformada de Fourier e a condutância do canal único estimada a partir de uma aproximação com uma função Lorentziana (para detalhes ver ¹⁴). As intensidades de luz inferiores foram seleccionadas de modo a obter a flutuação máxima da abertura e fecho do canal acionado pela luz.

Em linha com as experiências de análise de ruído ChR2 WT e H134R, a guanidina foi utilizada como ião condutor. Note-se que as propriedades cinéticas do canal são independentes do catião de permeação ¹⁴. A avaliação da diferença de poder espectral produziu uma condutância de

canal único γ de 140 ± 5 fS ($n=6$, -60 mV) durante 200 mM de guanidina à temperatura ambiente (23°C), que é semelhante à condutância extrapolada à temperatura ambiente do canal único de ChR2 WT de 150 fS ¹⁴. A probabilidade de abertura de CatCh determinada a partir da análise de ruído é inalterada em comparação com H134R ($P_o \sim 0,6$). Deste modo, um tempo de vida aumentado de canal aberto pode facilmente contribuir para o aumento observado em fotocorrentes através de um fator de 2,5. No entanto, uma ligeira estimulação na expressão de cópias de CatCh não pode ser excluída.

Preparação de oócitos de *Xenopus laevis* e biologia molecular. Uma variante C-terminalmente-truncada de ChR2 (resíduos 1-315) sem exposição extracelular de resíduos de cisteína (contendo mutações C34A e C36A) foram subclonadas no vetor pTLN 27. As mutações únicas de cisteína foram introduzidas pelo QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) e verificadas por sequenciação. O mRNA foi preparado utilizando o SP6 mMessage mMachine kit (Ambion, Austin, TX). 50 μL de cRNA, que incluíam 30 ng de mRNA de ChR2 WT/CatCh foram injetados em cada oócito de *Xenopus*. Os oócitos foram obtidos por tratamento de colagenase após ovariectomia parcial. Após injeção de cRNA, os oócitos foram incubados em retinal todo-trans (1 mM, a partir de um stock de 1 mM em etanol) e foram mantidos em tampão ORI (90 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 2 mM de CaCl_2 e 5 mM de Mops, pH 7,4) contendo 1 mg/mL de gentamicina a 18°C durante dois a quatro dias.

Fixação de dois elétrodos-voltagem em oócitos *Xenopus laevis*. As fotocorrentes foram ativadas com uma lâmpada de 75-W de arco de xénon e um filtro de banda de 450 ± 25 nm, cuja luz foi acoplada numa guia de luz de 1 mm com uma saída de $\sim 10^{18}$ fótons $s^{-1} cm^{-2}$. Os espectros de ação foram registados utilizando filtros de banda mais estreita (398-645 nm; ± 10 nm; Balzer série K) em combinação com filtros de densidade neutral para conseguir uma fibra com saída de $\sim 1,4 \times 10^{17}$ fótons $s^{-1} cm^{-2}$ para cada comprimento de onda. Para a produção dos espectros de ação, o Ca^{++} na solução ORI foi substituída por Ba^{++} para suprimir as correntes de CaCC. As amplitudes de corrente em cada comprimento de onda foram normalizadas para representarem igual exposição a fótons. O espectro basal determinado por espectroscopia foi depois ajustado à média dos pontos dos dados. Para suprimir a ativação do canal de cloro ativado por cálcio (CaCC), 50 μL de uma solução 20 mM do quelante de Ca^{2+} rápido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacetato (BAPTA) foram injetados em cada oócito (~ 1 mM de concentração final no oócito).

Excitação de CatCh com comprimentos de onda variantes em oócitos de *Xenopus laevis* revelou um espectro de ação praticamente idêntico ao do espectro de ChR2 WT com um comprimento de onda de excitação máximo a 474 nm (Fig. 6). Na presença de Ca^{++} extracelular e a potenciais de espera negativos, as correntes de CatCh mostraram um aumento dramático na amplitude durante a iluminação devido

a uma corrente sobreposta de saída que se assemelha à dos canais de cloreto ativadas por cálcio (CaCC) ^{15,16} (Fig 2c). Nos oócitos que expressam ChR2 WT as correntes CaCC foram também observadas, mas estas foram marcadamente menores do que as induzidas por CatCh (Fig. 2c). Para ambos, ChR2 WT e CatCh, a 80 mM de Ca^{++} extracelular, a injeção do quelante rápido de Ca^{++} BAPTA 1,2-bis(2-aminofenoxy)etano-N,N',N'-tetraacetato na célula aboliu as correntes de CaCC, enquanto permaneceu uma corrente residual de Ca^{++} (Fig. 2c) 1. A maior diferença das fotocorrentes antes e após injeção de BAPTA para CatCh apoia a hipótese de um fluxo aumentado de Ca^{++} após a ativação de catch.

Permeabilidade de CatCh aumentada para o cálcio.

De modo a obter uma estimativa da permeabilidade de CatCh a iões, as relações fotocorrente-voltagem e o potencial reverso para diferentes catiões foram medidas em células HEK293. Estas experiências revelaram que as permeabilidades para o sódio, potássio e magnésio são comparáveis às de ChR2 WT (Fig. 2d) 1. A permeabilidade de CatCh a protões ($\text{pH}/\text{pNa} = 4 \times 10^6$) é ligeiramente aumentada em comparação com a de ChR2 WT ($\text{pH}/\text{pNa} = 2,5 \times 10^6$). A permeabilidade ao Ca^{++} (pCa/pNa) foi determinada pelo deslocamento do potencial reverso quando o Na^+ a 140 mM da solução extracelular foi substituído por 90 mM de Ca^{++} . A permeabilidade relativa ao Ca^{++} de CatCh foi aumentada de 0,15 em ChR2 WT para 0,24 como evidenciado pelo potencial reverso (potencial bi-iónico) deslocando-se de $-30,7 \pm 2,7$ mV (ChR2 WT, média \pm d.p., n=5) para $-21,6 \pm 3,8$ mV (CatCh, média \pm d.p., n=5;

Fig. 2e). De modo a adicionalmente quantificar a permeabilidade ao Ca^{++} de CatCh aumentada, realizou-se a imagiologia Fura-2 do cálcio de em células HEK293 que expressam CatCh e comparou-se as proporções 340/380 medidas com as proporções medidas em células que expressam ChR2 WT.

Imagiologia Fura-2 em células HEK293. Fura-2 AM (5 mM; Invitrogen) foi carregada à temperatura ambiente durante 30 min a 1 hora. Após carregamento, as células foram recuperadas numa solução a 140 mM de NaCl sem Ca^{++} (140 mM de NaCl, 7 mM de EGTA, 2 mM de MgCl_2 e 10 mM de HEPES). A proteína amarela fluorescente foi excitada por uma exposição de 500 ms à luz utilizando um filtro de 460/40 nm (Visitron Systems, Puchheim, Alemanha) para estimar o nível de expressão em cada célula a partir da sua YFP-fluorescência. A solução foi então substituída por uma solução de Ca^{++} extracelular que consistiu em 90 mM de CaCl_2 , 7 mM de EGTA, 2 mM de MgCl_2 e 10 mM HEPES. Após 15 min no escuro os canais acionados pela luz foram estimulados durante 10 s com luz azul (460/40 nm). Fura-2 foi excitado com 340 nm (340/20) e 380 nm (380/20) e a luz emitida (540/80 nm) detetada com uma câmara CCD (todos os filtros de Visitron Systems, Puchheim, Alemanha).

Para excluir vários níveis de expressão de proteína como um fator na incorporação de cálcio, as proporções medidas 340/380 foram normalizadas para o valor de YFP-fluorescência de cada célula individual. A Figura 2f mostra que após fotoestimulação de 10-s de luz azul (470

nm) em solução de Ca^{++} 90 mM saturante, o aumento de Ca^{++} intracelular nas células que expressam CatCh é cerca de 4-vezes maior do que o de células que expressam WT.

Aplicação a neurónios do hipocampo

Para testar a adequabilidade de CatCh para aplicação neuronal, a construção foi expressa em células do hipocampo piramidal em cultura.

Cultura de neurónios do hipocampo. Os hipocampus foram isolados de ratos Sprague-Dawley P1 recém nascidos (Jackson Laboratory) e tratados com papaína (20 U mL^{-1}) durante 20 min a 37°C . Os hipocampus foram lavados com DMEM (Invitrogen/ Gibco, glucose elevada) suplementado com 10% de soro de bovino fetal e triturado num pequeno volume desta solução. ~ 75 000 células foram plaqueadas em lamelas de vidro revestidas com poli-D-lisina/laminina em placas de 24 poços. Após 3 horas, o meio de plaqueamento foi substituído por meio de cultura (Neurobasal A contendo 2% de suplemento B-27, 2 mM de Glutamax-I e 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). ChR2(L132C)-YFP e ChR2-YFP foram transfetados 5-10 dias após plaqueamento utilizando o reagente de lipofectamina 2000 (Invitrogen). Alternativamente, $2-5 \times 10^9$ GC/mL de vírus (AAV2/7-CAG-ChR2(L132C)-2A-EGFP-WPRE-bGH) foram adicionados a cada poço 4-9 dias após plaqueamento. A expressão tornou-se visível 5 dias pós-tradução. Não foi observada neurotoxicidade para o tempo de vida da cultura (~5 semanas). Não foi adicionado

retinal todo trans ao meio de cultura ou meio de registo para qualquer das experiências aqui descritas.

Construção de vetor viral adeno-associado. O estimulador precoce de citomegalovírus/promotor da β -actina de galinha (CAG) foi amplificado por PCR e inserido no pAAV2-Rho-EGFP (gentilmente cedido por Alberto Auricchio²⁸⁾ para obter pAAV2- CAG-EGFP. O plasmídeo de expressão viral pAAV2-CAG-EGFP continha adicionalmente um elemento regulador pós-transcrição de marmota (WPRE) e uma sequência de poliadenilação da hormona de crescimento de bovino (BGH). Chr2(L132C)-2A-EGFP (gentilmente cedido por Volker Busskampö - péptido de auto-clivagem 2A/CHYSEL²⁹⁾ foi construído pelo adaptador de PCR e subclonado em pAAV2-CAG-EGFP por substituição de EGFP utilizando o kit de fusão da Clontech. O vetor viral (pAAV2-CAGChr2(L132C)-2A-EGFP-WPRE-bGH) foi empacotado (serotipo 7) e purificado por afinidade no Programa de Terapia Génica da Universidade da Pensilvânia com um título de vírus infeccioso final de $2,26 \times 10^{11}$ cópias do genoma/mL.

Registos eletrofisiológicos de neurónios do hipocampo. Para os registos de célula completa em neurónios do hipocampo em cultura, as pipetas patch com resistências de 5-10 M Ω foram cheias com 129 mM de gluconato de potássio, 10 mM de HEPES, 10 mM de KCl, 4 mM de MgATP e 0,3 mM de Na₃GTP, titulado a pH 7,2. A solução de Tyrode foi empregue como a solução extracelular (125 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 2 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 30 mM glucose e

25 mM de HEPES, titulado a pH 7,4). A denominada solução extracelular isenta de Ca^{++} continha esta mesma solução exceto que tinha 0 mM de Ca^{++} e 3 mM de Mg^{++} . Os registros foram conduzidos na presença dos bloqueadores de transmissão sináptica excitatória, 1,2,3,4-tetra-hidro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxalina-7-sulfonamida (NBQX, 10 mM, Sigma) e ácido D(-)-2-Amino-5-fosfonopentanóico (AP-5, 50 mM, Sigma). Para registros de voltagem em fixação foi adicionado 1 mM de tetrodotoxina à solução extracelular. Para inibir a atividade do canal BK, foi adicionado 1 mM de TEA. Os registros foram conduzidos num microscópio invertido Zeiss Axiovert 25 equipado com uma lâmpada de fluorescência. O sucesso da expressão de proteína foi provado por fluorescência mediada por EGFP ou YFP. A resistência do acesso neuronal foi de 15-40 M Ω e foi monitorizada quanto a estabilidade ao longo da experiência. Os sinais eletrofisiológicos foram amplificados utilizando um amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Union City, CA), filtrado a 10 kHz, digitalizados com um Axon Digidata 1600 (50 Hz) e adquiridos e analisados utilizando o pClamp9 software (Axon Instruments). As fotocorrentes foram evocadas utilizando pulsos de luz de vários comprimentos de lasers de estado sólido bombeados por diodo (Pusch Opto Tech GmbH; λ_1 = 473 nm, P_1 = 100 mW, λ_2 = 532 nm, P_2 = 50 mW) ou flashes de 10 ns de um laser de excímero com corante bombeado (Coumarina 2, λ = 450 nm). As intensidades de luz específicas são indicadas nas legendas da figura e no texto e são intensidades na extremidade de uma fibra ótica de quartzo de 400 μm de diâmetro (STE-

F100/400-Y-VIS/NIR; Laser 2000, Wessling, Alemanha) a uma distância de ~500 mm da célula. As correntes medidas a partir de neurónios que expressam ChR2(L132C)-YFP e ChR2(L132C)-2A-EGFP foram idênticos.

Imagiologia confocal. Para a imagiologia, as lamelas com neurónios do hipocampo foram fixadas a 4 °C durante 10 min em 4% de paraformaldeído em tampão PBS contendo 2% de sacarose. As células foram subsequentemente incubadas durante 1,5 horas em IgG de coelho contra α -GFP (Invitrogen, A11122) seguido de uma incubação de 45 min em Alexa Fluor 488 donkey- α -rabbit IgG (Invitrogen, A21206). A imunofluorescência de lâminas montadas foi fotografada num microscópio confocal Zeiss LSM 510 (Zeiss, Plan-Neofluar 403/0.75).

O mutante CatCh foi robustamente expressa em culturas do hipocampo (Fig. 3a) durante semanas sem sinais de neurotoxicidade e exibiu, como nas células HEK293, uma proporção superior de estado basal-para-pico em registos de células completas e amplitudes de corrente aumentadas cerca de quatro vezes de 644 ± 31 pA (-60 mV, n=6, média \pm d.p.) em comparação com WT com 164 ± 39 pA (-60 mV, n=6, média \pm d.p.) em resposta a 473-nm de luz azul (Fig. 3b). No modo de fixação de corrente, luz azul artificial de intensidade elevada tipicamente utilizada para ativar o WT (1018- 1019 fotões s⁻¹ cm⁻²) conduz as células piramidais que expressam CatCh num bloco de despolarização (Fig. 4a). Para induzir sequências de ação fiáveis a intensidade de luz foi

reduzida em 2 unidades log (5×10^{16} – 2×10^{17} fotões $s^{-1} cm^{-2}$) para uma intensidade de luz no intervalo natural da visão fotópica conduzida pelo fotorecetor em cone (Fig. 4b) ¹⁷. A Figura 4c mostra uma curva representativa de afinação para a taxa de iniciação dependente da intensidade de luz de uma célula piramidal. A taxa de iniciação média máxima reside em $8,2 \times 10^{16} \pm 2,5 \times 10^{16}$ fotões $s^{-1} cm^{-2}$ (média \pm d.p., n=5). A maior eficácia da luz de neurónios que expressam CatCh facilita a ativação com comprimentos de onda fora da sensibilidade do pico, como exemplificado para a luz verde (532 nm) na figura 4d. Isto pode conferir benefícios em termos de recrutamento de tecido mais eficaz com maior penetração da luz verde. Relacionou-se a sensibilidade à luz dramaticamente melhorada de neurónios que expressam CatCh a uma aumentada permeabilidade ao Ca^{++} , aumentando deste modo, transientemente, o potencial de superfície na superfície da membrana citossólica ^{10,11,18,19} (para uma explicação do efeito do Ca^{++} no potencial de superfície, ver Figura 7). Durante a excitação de luz, o CatCh serve como uma fonte rápida de Ca^{++} ligada à membrana, pelo aumento temporário da concentração do Ca^{++} na superfície intracelular local, neutralizando deste modo as cargas negativas de superfície (Fig. 7). É conhecido que isto causa um deslocamento do potencial de superfície interno para valores mais positivos despolarizando deste modo a membrana (Fig. 7) ^{11,18}. A consequência é que os canais de Na^{+} acionados por voltagem são ativados a um potencial de membrana mais negativo ¹⁸. Após curtos pulsos de luz ou após desligar a luz fixa, o Ca^{++} equilibra rapidamente (mi-

crossegundos) no citoplasma, levando a uma rápida recuperação e ao imediato desaparecimento dos potenciais de ação. Deste modo, para CatCh, menos fotocorrente e subsequentemente menos luz é necessária para a iniciação da ativação em comparação com ChR2 WT. O pulso de luz-para-latência da ativação em CatCh foi mais rápida (~ 5 -6 ms; Fig. 4e) com uma pequena variação do que a latência para ChR2 WT (~ 10 ms) a intensidades de luz semelhantes ($2,8 \times 10^{18}$ fótons $s^{-1} cm^{-2}$)³. Os inventores testaram ainda CatCh para a sua capacidade de induzir potenciais de ação únicos a uma estimulação por luz de elevada frequência. Uma sequência de pulsos de luz azul 473-nm de 1-ms de duração ($2,8 \times 10^{19}$ fótons $s^{-1} cm^{-2}$) conduziram 100% de sequências de ativação fiáveis até frequências de 50 Hz ($n=8$; Fig. 4f - maior parte das células piramidais não caem bem para além de 50 Hz mesmo com injeção de corrente direta). A WT, por outro lado, necessita de pelo menos pulsos de luz de 2-ms para induzir ativações de modo fiável e faz isto apenas até frequências de 20 Hz¹². Forçou-se a ativação em tempo curto de CatCh ainda mais e evocou-se potenciais de ação únicos até frequências de 10 Hz por pulsos de luz azul de 10 ns ($1,1 \times 10^{25}$ fótons $s^{-1} cm^{-2}$), uma duração de pulso de suficientemente curta para induzir apenas um único processamento em cada proteína CatCh (Fig. 4g). No entanto, as frequências de estimulação rápidas também requerem uma rápida repolarização da célula após cada ativação. Apesar de um τ_{off} desacelerado de CatCh em comparação com WT, o aumento de ~ 4 -vezes no influxo de Ca^{++} durante a ativação de CatCh (ver medições de Fura-2 Fig. 2f) parece ser

suficiente para ativar canais de potássio de grande condutância ativados por Ca^{++} (canais BK) ²⁰ para potentemente repolarizar a célula ao seu original potencial de repouso em milissegundos após cada potencial de ação. Para provar que a rápida repolarização foi mediada através dos canais BK, adicionou-se 100 mM do inibidor do canal de potássio tetraetilamônio (TEA) à solução extracelular e observou-se a repolarização incompleta da membrana e a produção de um patamar de potencial tipicamente observado nos protocolos de estimulação por pulso com o ChR2 WT ³ (Fig 4h).

Em conjunto, os neurónios que expressam CatCh exibem um início de ativação mais rápido, uma repolarização mais rápida e um sensibilidade à luz aumentada em comparação com a das células que expressam WT (para uma comparação ver tabela 1). As experiências de controlo na ausência de Ca^{++} externo e na presença de 3 mM de Mg^{++} , que possui um efeito menos pronunciado no potencial de superfície ^{11,18} (Fig. 7) e não é conduzido através de ChR2 WT ou CatCh, apoiam as interpretações acima: 1) A latência de pulso de luz-para-ativação aumentou para valores de ChR2 WT (Fig. 4e), 2) Em vez da ativação rápida da repolarização como observado na presença de Ca^{++} , foi observada uma despolarização artificial prolongada semelhante à que é vista nas experiências ChR2 WT (Fig. 4i, Esquerda), 3) Na ausência de Ca^{++} , as intensidades de luz idênticas resultaram numa despolarização reduzida em ~ 10 mV sob condições experimentais iguais de outra forma e 4) Multi-ativação

como esperado do tempo prolongado de abertura de CatCh reocorre na ausência de Ca^{++} (Fig. 4i, Direita).

Deste modo, os inventores demonstraram que o CatCh, um canalrodopsina com uma elevada permeabilidade ao Ca^{++} , pares de sensibilidade à luz aumentada com cinética rápida e deste modo supera o ChR2 WT e os mutantes lentos e rápidos publicados (para uma comparação das propriedades de diferentes variantes de ChR2, ver tabela 1).

Discussão

À primeira vista CatCh, o mutante L132C de ChR2 WT, mostra resultados muito pouco espetaculares em comparação com os de ChR2 WT: 1) um aumento de duas-vezes no tempo de vida do estado aberto, 2) um decaimento desacelerado do intermediário P520 na cinética do fotociclo, 3) uma inalterada condutância do canal único, e 4) um máximo de absorção marginalmente deslocado para o vermelho (4 nm). Um aumento de 2,5-vezes na fotocorrente pode ser facilmente explicado pelos parâmetros medidos sem aumento relevante no nível de expressão. No segundo olhar, no entanto, a inspeção mais de perto dos dados de voltagem em fixação obtidos para oócitos de *Xenopus laevis* que expressam CatCh produziu uma primeira indicação para uma elevada permeabilidade ao Ca^{++} , que foi então confirmada pela determinação do potencial reverso e experiências de imagiologia de cálcio em células HEK293. Olhando para o modelo na figura

1, um aumento na permeabilidade ao Ca^{++} pode ser facilitado pela formação de uma estrutura mais flexível e deste modo a formação de uma cavidade, como apresentado para a mutação L94A da bomba de prótons conduzidos pela luz bacteriorrodopsina (comparar Fig. 1) ²¹. Esta cavidade pode estar localizada numa ansa hidrofóbica como parte da hélice transmembranar três (TM3) conservada, apenas uma volta hélica de distância de C128. A manipulação da interação entre C128 (TM3) e D156 (TM4) desacelera dramaticamente o ciclo de reação de ChR2 ^{5,6}, um efeito que foi também observado na bacteriorrodopsina mutante L93A ^{22,23}, *i.e.* a vizinhança do resíduo L94. Em ChR2, a interação de TM3 e TM4 parece afetar a passagem e a seletividade, apontando para um elemento estrutural como transdutor da reação de luz ao poro de iões ²⁴. A inserção da cisteína mais pequena e mais hidrofílica pode aumentar a flexibilidade do segmento hélico, facilitando o acesso de Ca^{++} .

Quando distribuído às células piramidais do hipocampo, CatCh exibiu um aumento em ~70-vezes na sensibilidade à luz em comparação com ChR2 WT. Normalmente, esta eficácia de luz aumentada é acompanhada por um tempo de vida de canal aberto fortemente prolongado ^{2,6,13}. Isto não é o caso de CatCh. A sensibilidade à luz observada difere marcadamente do que foi observado para outros canais rodopsina até agora. Como explicado a seguir, os efeitos secundários na excitabilidade neuronal são induzidos por um influxo de Ca^{++} através de CatCh. Apesar

de possuir uma cinética de fecho mais lenta em comparação com WT, o CatCh mostra o aumento da fiabilidade da ativação e precisão durante estimulação por luz de elevada frequência, reduzindo as ativações extra e eliminação artificial de plataformas de potenciais tipicamente observados em células que expressam WT em frequências de estimulação acima de 20 Hz ^{3,7,12}, pulsos de luz de 1-ms distribuídos à temperatura ambiente induziram sequências de ativação fiáveis até 50 Hz em células piramidais que expressam CatCh (o seu limite natural de ativação natural; Fig. 4f). A indução da ativação com frequência elevada mediada por CatCh em células de ativação mais rápida tais como interneurónios corticais de paravalbumina permanece por testar ¹². Uma vez que a cinética do canalrodopsina é dependente da temperatura com um Q10 de ~2,3 ¹⁴, os inventores esperariam uma cinética de CatCh acelerada 3,2-vezes para experiências *in vivo* a 37 °C sem perder a sensibilidade à luz. Isto permitirá a estimulação da ativação mediada por CatCh até pelo menos 300 Hz. A sensibilidade à luz aumentada combinada com a cinética rápida e precisão temporal elevada permitiu ativar CatCh com pulsos de luz tão curtos como 10 ns, que ativa um único processamento em cada molécula de CatCh seguida por uma única ativação. As observações em células excitáveis são melhor explicadas pelo aumentado influxo de Ca⁺⁺ para o neurónio durante a iluminação. Note-se que a contribuição de Ca⁺⁺ para a força condutora devido à sua permeabilidade aumentada pode ser negligenciada. No entanto, pode considerar-se CatCh como uma fonte de Ca⁺⁺ ligado à

membrana acionado pela luz ("Ca⁺⁺ ligado a membrana retido"), que transientemente distribui Ca⁺⁺ à superfície citossólica da membrana da célula desde que o canal CatCh esteja aberto. isto neutraliza temporariamente as cargas negativas na face da membrana interna, aumentando deste modo o potencial de superfície, que é equivalente a uma despolarização da membrana ¹¹ (Fig. 7). Como esperado, quando o Ca⁺⁺ extracelular foi substituído pelo Mg⁺⁺ não permeável, todos os efeitos de Ca⁺⁺ observados no potencial de ação foram abolidos, restaurando o fenótipo de ChR2 WT. Isto prova que os efeitos de Ca⁺⁺ observados foram devidos ao influxo do Ca⁺⁺ extracelular e não causados por um aumento de [Ca⁺⁺]_i através de uma potencial expressão de CatCh nos organelos das células como o retículo endoplasmático. A rápida despolarização inicial via o potencial de superfície divide a latência do pulso de luz-para-pico de ~10 ms em células que expressam ChR2 WT 3 a ~5 ms em células que expressam CatCh. Em comparação com o ChR2 WT, a proporção de corrente de pico-basal é muito reduzida em CatCh (ver tabela 1). Deste modo, durante a iluminação sustentada de CatCh, o nível de despolarização das células permanece quase basal. O influxo de Ca⁺⁺ contínuo durante a iluminação persistente pode ativar os canais de catiões não seletivos ativados por cálcio, que apoia ainda a manutenção de um nível de despolarização basal. Por outro lado, um pré-requisito para a estimulação pulsada de levada frequência bem-sucedida é uma rápida repolarização da célula após cada potencial de ação. O tempo de vida do estado aberto de CatCh ligeiramente aumen-

tado em comparação com WT deve limitar a sua frequência de estimulação máxima. No entanto, uma permeabilidade ao Ca^{++} melhorada contraria esta limitação pela potente ativação de canais de potássio acionados por cálcio de grande condutância (canais BK). Isto restabelece o potencial de repouso da membrana do neurónio em milissegundos após cada potencial de ação. Esta teoria foi confirmada pela inibição de canais BK com o bloqueador TEA do canal aberto, que resultou numa despolarização persistente do neurónio durante a duração de um protocolo de estimulação por pulso.

Em comparação com as ferramentas optogenéticas já disponíveis, o CatCh tem uma sensibilidade à luz aumentada semelhante aos mutantes lentos ¹³ ou SFOs ⁶ mas com uma cinética de resposta muito mais acelerada que é devida à sua permeabilidade ao Ca^{++} aumentada e as consequências na excitabilidade neuronal. Isto torna o CatCh superior às variantes de ChR2 disponíveis, em que uma elevada sensibilidade à luz tinha de ser estabelecida à custa da cinética rápida e *vice versa* no que respeita aos canaisro-dopsina rápidos ^{7,12} (para uma visão geral ver tabela 1).

No que respeita a aplicação optogenética, nota-se que será importante validar os parâmetros de pulso de luz ótimo em cada preparação experimental tal como a duração e intensidade da estimulação, uma vez que a resposta específica será, em última análise, controlada pelas propriedades biofísicas intrínsecas do neurónio e níveis de expressão de CatCh.

Tabela 1: Comparação de propriedades de *CaTch* com outras ferramentas optogenéticas excitatórias

	τ_{on} [ms]	τ_{off} [ms, s]	V [fS]	I (pA) estat	$I_{max}/$ I_{max}	λ_{max} (nm)	J (pA s ⁻¹ cm ²) [EC ₅₀] (mW/cm ²)	Ativação max U	pCa/ pVa	AD	Ref	
CaTch	0,6 ± 0,003	15±2 ms	140±5	643,8±30,9	0,71±0,16	474	10 ¹⁶ -10 ¹⁷ 70x infe- rior a WT [0, 7]	≥ 50 Hz	0,24	Não		
ChR2 WT	0,250,002	10±1 ms	~150 ^b	216,3±39,0	0,37±0,18	470	5x10 ¹⁷ -10 ¹⁹ [0, 7]	≤ 20 Hz	0,15	Sim	[2,3,14]	
ChR2 H134R	-0,6	19±2 ms	~150 ^b	~ 1,5 x IWT	0,53±0,09	450	5x10 ¹⁷ -10 ¹⁹ [0, 7]	~ 20 Hz	-	Sim	[1,7,14]	
SFO, mutantes lentos	C128T	9±1,6	2±0,5 s	-	~0,73xIWT	~0,5	480	5x10 ¹⁷ -10 ¹⁹ [0,03]	c	-	Sim	[5,6]
	C128A	5,7±1,0	52±2 s	-	~ 0,30 x IWT	~0,7	480	5x10 ¹⁷ -10 ¹⁹ [0,01]	c	-	Sim	
	C128S	30±7,5	106±9 s	-	~ 0,25 x IWT	-0,85	480	5x10 ¹⁷ -10 ¹⁹ [0,01]	c	-	Sim	
	D156A	3,3±0,1	>150 s ^a	-	~ IWT	~1	480	5x10 ¹⁷ -10 ¹⁹ [0,01]	d	-	Yes	
ChETA	-	4,8±0,6 ms	-	~ 0,9 x IWT	0,6±0,04	500	10 ¹⁸ -10 ¹⁹ menos sensível do que WT	200 Hz	-	No	[12]	
ChIEF	-	9,8±0,7 ms	-	~3 x IWT	~ 0,8	450	10 ¹⁸ -10 ¹⁹ menos sen- sível do que WT [0, 92]	25 Hz	0,12	Yes	[7]	

τ_{on} : valores de medições de um processamento único, V : em 200 mV de guanidina-HCl, RT, -60 mV I: HCN, -60 mV; IWT = ChR2 corrente WT sob condições experimentais respectivas, J : intensidade de luz necessária para induzir o potencial de ação; **EC₅₀**: intensidades de luz semi-saturante aparente, **max ativação** U: frequência de ativação máxima fiável induzida por pulso de luz, **AD**: artificial após despolarização, ^adados não podem ser determinados com precisão e representam a estimativa do limite inferior, ^bvalor extrapolado, ^cdespolarização sublimiar, ^dcontrole on/off de duas cores com azul-amarelo

LISTA de REFERÊNCIAS

WO 03/084994

1. Nagel, G. et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 13940-13945 (2003).
2. Nagel, G. et al. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol* 15, 2279-2284 (2005).
3. Boyden, E., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8, 1263-1268 (2005).
4. Zhang, F. et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446, 633-639 (2007).
5. Bamann, C., Gueta, R., Kleinlogel, S., Nagel, G. & Bamberg, E. Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry* 49, 267-278 (2010).
6. Berndt, A., Yizhar, O., Gunaydin, L., Hegemann, P.

& Deisseroth, K. Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci* 12, 229-234 (2009).

7. Lin, J., Lin, M., Steinbach, P. & Tsien, R. Characterization of engineered channelrodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys J* 96, 1803-1814 (2009).

8. Lagali, P. et al. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration *Nat Neurosci* 11, 667-675 (2008).

9. Bi, A. et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 50, 23-33 (2006).

10. Frankenhäuser, B. & Hodgkin, A. The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *JPhysiol* (Lond) 137, 218-244 (1957).

11. Hille, B. 649-662 (Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts USA, 2001).

12. Gunaydin, L. et al. Ultrafast optogenetic control. *Nat Neurosci* 13, 387-392 (2010).

13. Bamann, C., Kirsch, T., Nagel, G. & Bamberg, E. Spectral characteristics of the photocycle of

channelrodopsin-2 and its implication for channel function. *J Mol Biol* 375, 686-694 (2008).

14. Feldbauer, K. et al. Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *Proc Natl Acad Sci USA* (2009).

15. Caldwell, J. et al. Increases in intracellular calcium triggered by channelrodopsin-2 potentiate the response of metabotropic glutamate receptor mGluR7. *J Biol Chemistry* 283, 24300-24307 (2008).

16. Weber, W.-M. Ion currents in *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* 1421, 213-233 (1999).

17. Thyagarajan, S. et al. Visual function in mice with photoreceptor degeneration and transgenic expression of channelrodopsin 2 in ganglion cells. *J Neurosci* 30, 8745-8758 (2010).

18. Hille, B., Woodhull, B. & Shapiro, B. Negative surface charge near sodium channels of nerve: divalent ions, monovalent ions, and pH. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 270, 301-318 (1975).

19. Muller, R. & Finkelstein, A. The effect of surface charge on the voltage-dependent conductance induced in thin lipid membranes by monazomycin. *J General Physiol* 60, 285-306 (1972).

20. Faber, E. & Sah, P. Calcium-activated potassium-channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist* 9, 181-194 (2003).
21. Joh, N., Oberai, A., Yang, D., Whitelegge, J. & Bowie, J. Similar energetic contributions of packing in the core of membrane and water-soluble proteins. *J Am Chem Soc* 131, 10846-10847 (2009).
22. Subramaniam, S., Faruqi, A., Oesterhelt, D. & Henderson, R. Electron diffraction studies of light-induced conformational changes in the Leu-93→Ala bacteriorhodopsin mutant. *Proc Nat Acad Sci USA* 94 1767-1772 (1997).
23. Subramaniam, S., Greenhalgh, D., Rath, P., Rothschild, K. & Khorana, H. Replacement of leucine-93 by alanine or threonine slows down the decay of the N and O intermediates in the photocycle of bacteriorhodopsin: implications for proton uptake and 13-cis-retinal all-trans-retinal reisomerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 6873-6877 (1991).
24. Nack, M. et al. The DC gate in Channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156. *Photochemical & Photobiological Sciences* 9, 194-198 (2010).

25. Busskamp, V. *et al.* Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science* 329, 413-417 (2010).
26. Ellis-Davies, G. C. R. Neurobiology with caged calcium. *Chem Rev* 108, 1603-1613 (2008).
27. Lorenz, C., Pusch, M. & Jentsch, T. Heteromultimeric ClC chloride channels with novel properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 13362-13366 (1996).
28. Allocca, M. *et al.* Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virology* 81, 11372-11380 (2007).
29. de Felipe, P. *et al.* E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends Biotechnol* 24, 68-75 (2006).
30. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J Molec Graphics* 14, 33-38 (1996).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

- <110> Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.
- <120> Canalrodopsina 2 Mutante
- <130> M67346PC

<160> 1

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 737

<212> PRT

<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Asp Asn Thr Leu Ala Leu Val Thr Gln Ala Gln Asn Leu Gly Gly
 435 440 445
 Val Asp Phe Val Leu Ile His Pro Glu Phe Leu Arg Asp Arg Ser Ser
 450 455 460
 Thr Ser Ile Leu Ser Arg Leu Arg Gly Ala Gly Gln Arg Val Ala Ala
 465 470 475 480
 Phe Gly Trp Ala Gln Leu Gly Pro Met Arg Asp Leu Ile Glu Ser Ala
 485 490 495
 Asn Leu Asp Gly Trp Leu Glu Gly Pro Ser Phe Gly Gln Gly Ile Leu
 500 505 510
 Pro Ala His Ile Val Ala Leu Val Ala Lys Met Gln Gln Met Arg Lys
 515 520 525
 Met Gln Gln Met Gln Gln Ile Gly Met Met Thr Gly Gly Met Asn Gly
 530 535 540
 Met Gly Gly Gly Met Gly Gly Gly Met Asn Gly Met Gly Gly Gly Asn
 545 550 555 560
 Gly Met Asn Asn Met Gly Asn Gly Met Gly Gly Gly Met Gly Asn Gly
 565 570 575
 Met Gly Gly Asn Gly Met Asn Gly Met Gly Gly Gly Asn Gly Met Asn
 580 585 590
 Asn Met Gly Gly Asn Gly Met Ala Gly Asn Gly Met Gly Gly Gly Met
 595 600 605
 Gly Gly Asn Gly Met Gly Gly Ser Met Asn Gly Met Ser Ser Gly Val
 610 615 620
 Val Ala Asn Val Thr Pro Ser Ala Ala Gly Gly Met Gly Gly Met Met
 625 630 635 640
 Asn Gly Gly Met Ala Ala Pro Gln Ser Pro Gly Met Asn Gly Gly Arg
 645 650 655
 Leu Gly Thr Asn Pro Leu Phe Asn Ala Ala Pro Ser Pro Leu Ser Ser
 660 665 670
 Gln Leu Gly Ala Glu Ala Gly Met Gly Ser Met Gly Gly Met Gly Gly

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

Lisboa, 24 de agosto de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Canal iónico indutível com luz, em que o canal iónico indutível com luz compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de homologia com a sequência de aminoácidos apresentada nas posições 1-309 de SEQ ID NO: 1 (CHOP-2), e que compreende uma substituição numa posição correspondente a L132 na SEQ ID NO: 1, substituição que aumenta a polaridade do canal, e em que a condutividade do cálcio do referido canal iónico indutível com luz é aumentada pelo menos duas vezes, em comparação com CHOP-2, conforme determinado por imagiologia Fura-2 em células HEK293.

2. Canal iónico indutível com luz da reivindicação 1, em que o canal iónico indutível com luz compreende, de um modo preferido consiste na sequência de aminoácidos apresentada nas posições 1-309 da SEQ ID NO: 1 (CHOP-2), exceto para uma substituição na posição L132, em que a substituição aumenta a polaridade do canal.

3. Canal iónico indutível com luz da reivindicação 1 ou 2, em que a substituição é selecionado a partir de L132C, L132S, L132E, L132D, e L132T, de um modo preferido em que a substituição é L132C.

4. Canal iónico indutível com luz de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que (a) a sensibilidade à luz é aumentada em mais do que 5 vezes, de um

modo preferido em mais do que 10 vezes, de um modo mais preferido em mais do que 20 vezes, tal como 30 vezes, de um modo ainda mais preferido em mais do que 40 vezes, tal como 50 vezes, e de um modo mais preferido em mais do que 60 vezes, ou ainda em mais do que 70 vezes, em comparação com CHOP-2 wt nos neurónios do hipocampo; e/ou (b) a condutividade do cálcio é aumentada pelo menos três-vezes, de um modo mais preferido pelo menos quatro-vezes em comparação com CHOP 2 wt, como determinado por imagiologia Fura-2 em células HEK293; e/ou (c) a frequência de estimulação é aumentada pelo menos 1,5-vezes, de um modo mais preferido 2-vezes, ou de um modo ainda mais preferido 2,5 vezes, em comparação com CHOP 2 wt como determinado por registos eletrofisiológicos de célula completa em neurónios do hipocampo.

5. Canal iónico indutível com luz de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o canal iónico indutível com luz compreende adicionalmente pelo menos um dos seguintes resíduos de aminoácidos: ácido aspártico numa posição correspondente à posição 253 da SEQ ID NO: 1; lisina numa posição correspondente à posição 257 da SEQ ID NO: 1; triptofano numa posição correspondente à posição 260 da SEQ ID NO: 1; ácido glutâmico numa posição correspondente à posição 123 da SEQ ID NO: 1; histidina ou arginina, de um modo preferido arginina, numa posição correspondente à posição 134 da SEQ ID NO: 1; treonina, serina, ou alanina numa posição correspondente à posição 128 da SEQ ID NO: 1; e/ou alanina numa posição correspondente à posição 156 da SEQ ID NO: 1.

6. Canal iónico indutível com luz de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o canal iónico indutível com luz compreende o motivo de consenso L(I)DxxxKxxW(F,Y).

7. Canalrodopsina, compreendendo o canal iónico indutível com luz de acordo com as reivindicações 1-6 e um retinal ou derivado de retinal, de um modo preferido em que o derivado de retinal é selecionado a partir do grupo consistindo em 3,4-desidrorretinal, 13-etilretinal, 9-dm-retinal, 3-hidroxirretinal, 4-hidroxirretinal, naftilretinal; 3,7,11-trimetil-dodeca-2,4,6,8,10-pentaenal; 3,7-dimetil-deca-2,4,6,8-tetraenal; 3,7-dimetil-octa-2,4,6-trienal; e 6-7 retinais com rotação bloqueada, 8-9 retinais com rotação bloqueada, e 10-11 retinais com rotação bloqueada.

8. Construção de ácido nucleico, compreendendo uma sequência de nucleótidos codificante para o canal iónico indutível com luz de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6.

9. Vetor de expressão, compreendendo uma sequência de nucleótidos codificante para o canal iónico indutível com luz de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6 ou uma construção de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8, de um modo preferido em que o vetor é adequado para terapia génica, em particular em que o vetor é adequado para transferência de genes mediada por vírus.

10. Célula compreendendo o canalrodopsina de acordo com a reivindicação 7, a construção de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8 ou o vetor de expressão de acordo com a reivindicação 9.

11. Célula da reivindicação 10, em que a célula é uma célula de mamífero ou uma célula de inseto, ou em que a célula é uma célula de levedura, de um modo preferido de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, ou *Pichia pastoris*.

12. Célula da reivindicação 11, em que a célula de mamífero é (a) uma célula fotorrecetora, uma célula retinal em bastonete, uma célula retinal em cone, uma célula retinalganglionar, um neurónio bipolar, uma célula ganglionar, um neurónio pseudounipolar, um neurónio multipolar, um neurónio piramidal, uma célula de Purkinje, ou uma célula de grânulo; ou (b) uma célula de melanoma, uma célula COS; uma célula BHK; uma célula HEK293; uma célula CHO; uma célula de mieloma; ou uma célula MDCK.

13. Canal iónico indutível com luz de acordo com as reivindicações 1-6, ou o canalrodopsina de acordo com a reivindicação 7, ou a construção de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8, ou o vetor de expressão de acordo com a reivindicação 9, ou a célula de acordo com a reivindicação 10 para utilização como um medicamento.

14. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 10 para utilização em terapia génica.

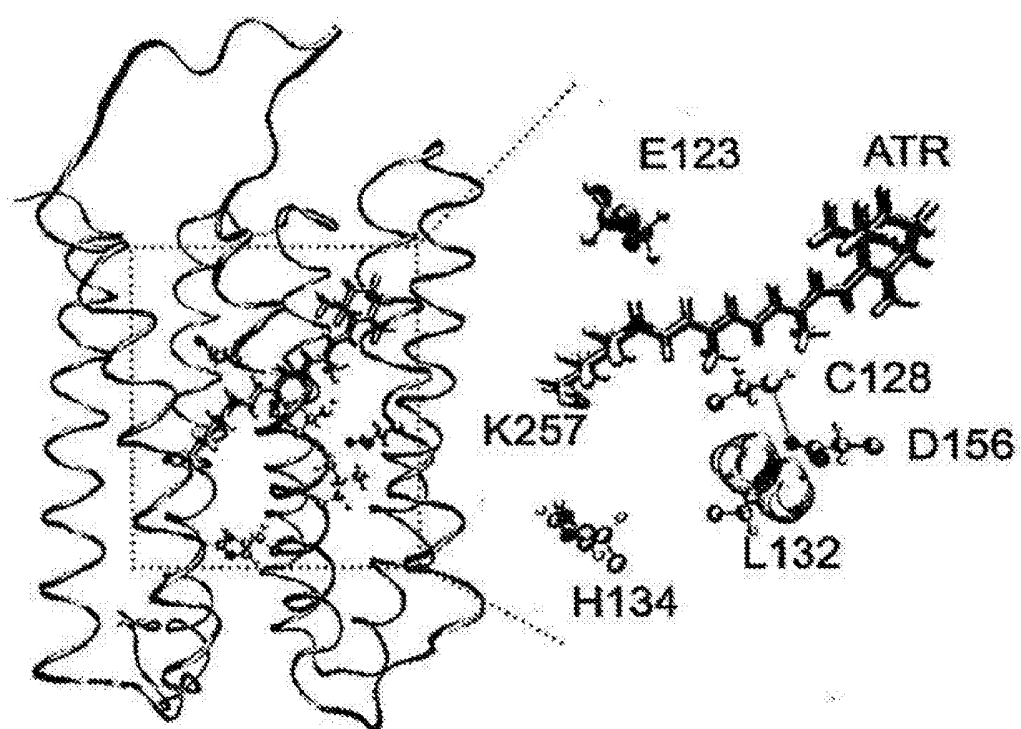
15. Canal iónico indutível com luz de acordo com as reivindicações 1-6, ou o canalrodopsina de acordo com a reivindicação 7, ou a construção de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 8, ou o vetor de expressão de acordo com a reivindicação 9, ou a célula de acordo com a reivindicação 10 para utilização no tratamento de cegueira ou vista reduzida.

16. Canal de iões indutível com luz de acordo com a reivindicação 5 possuindo treonina, serina, ou alanina numa posição correspondente à posição 128 da SEQ ID NO: 1; e/ou alanina numa posição correspondente à posição 156 da SEQ ID NO: 1, para utilização na ablação de células de cancro, de um modo preferido em que as células de cancro são células de cancro de melanoma.

17. Utilização de um canal iónico indutível com luz de acordo com as reivindicações 1-6, ou um canalrodopsina de acordo com a reivindicação 7, ou uma célula de acordo com a reivindicação 10 numa pesquisa de elevado processamento.

Lisboa, 24 de agosto de 2015

Fig. 1



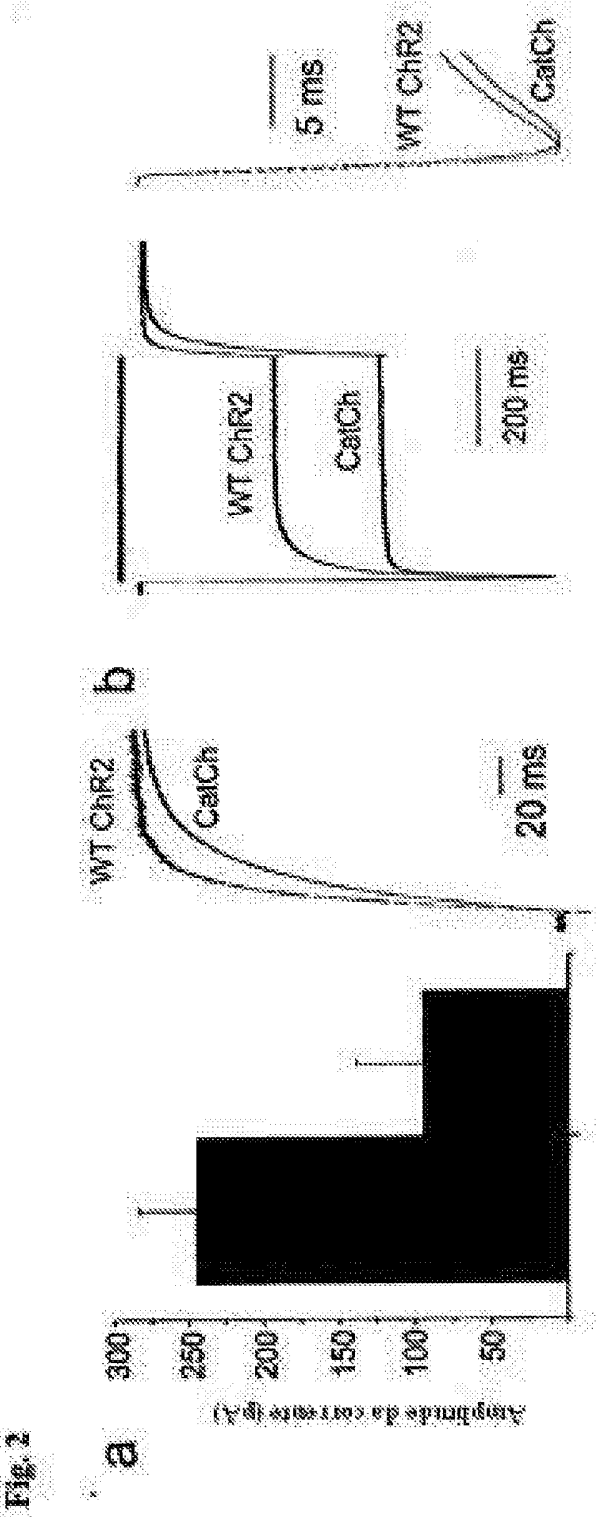


Fig. 2 (continued)

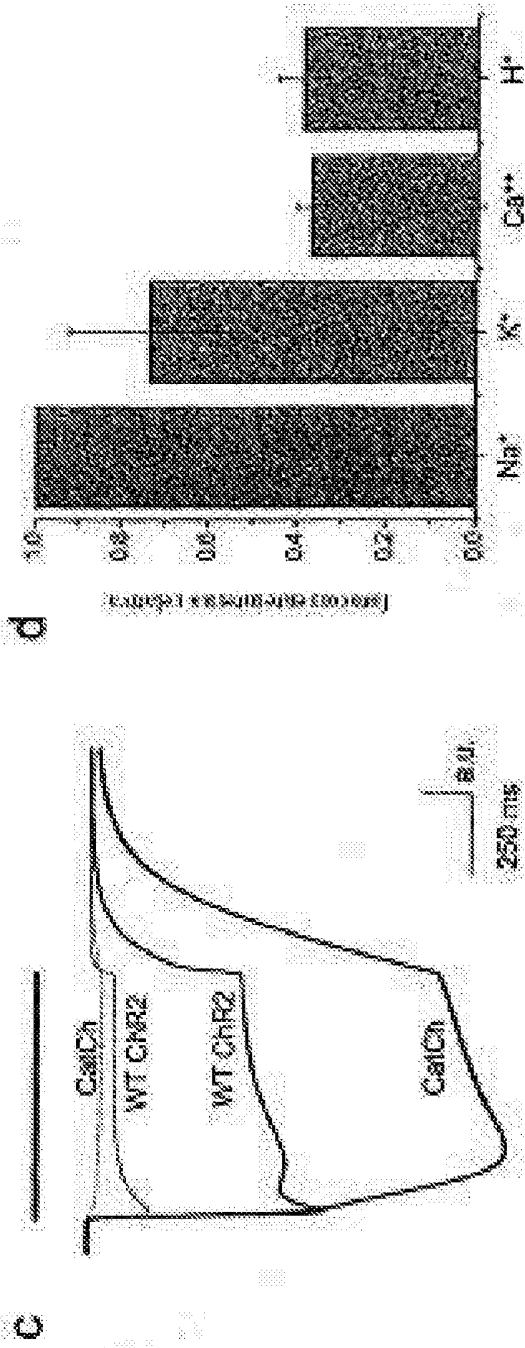


Fig. 2 (continuação)

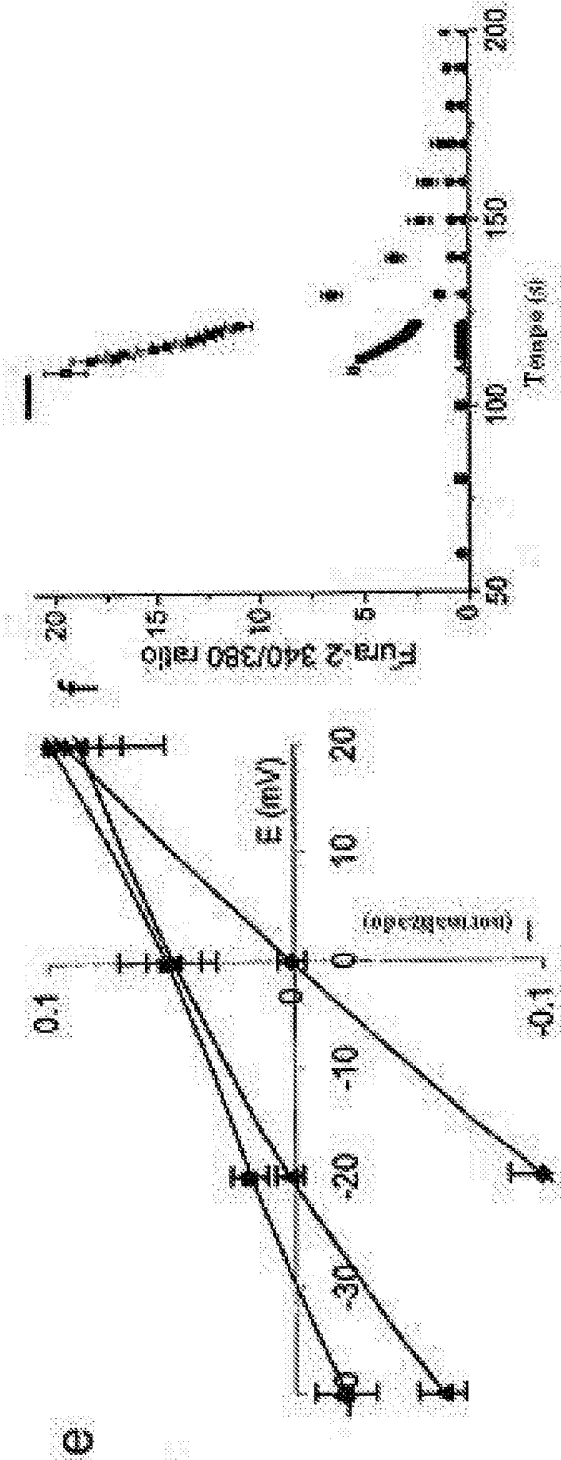
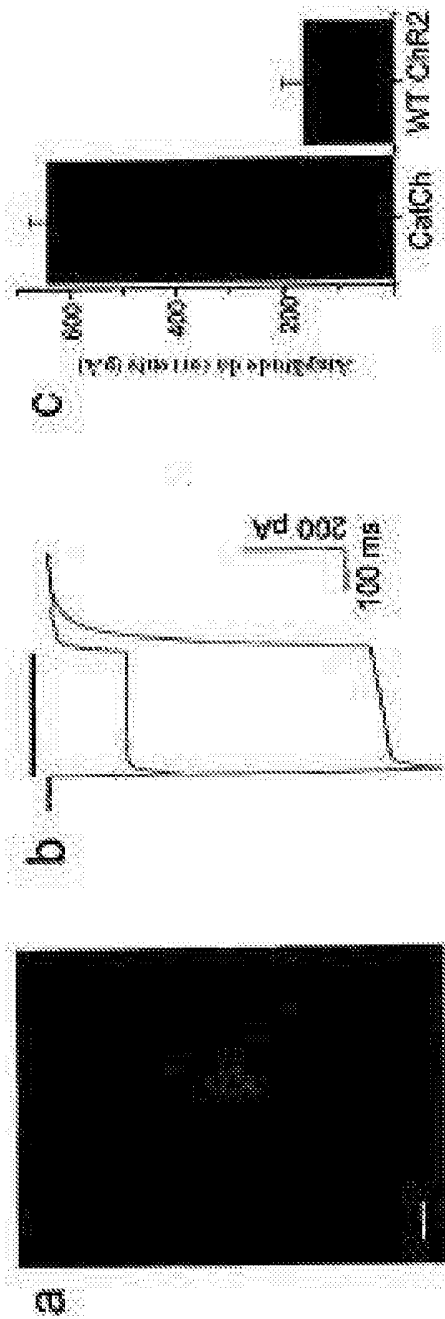


Fig. 3



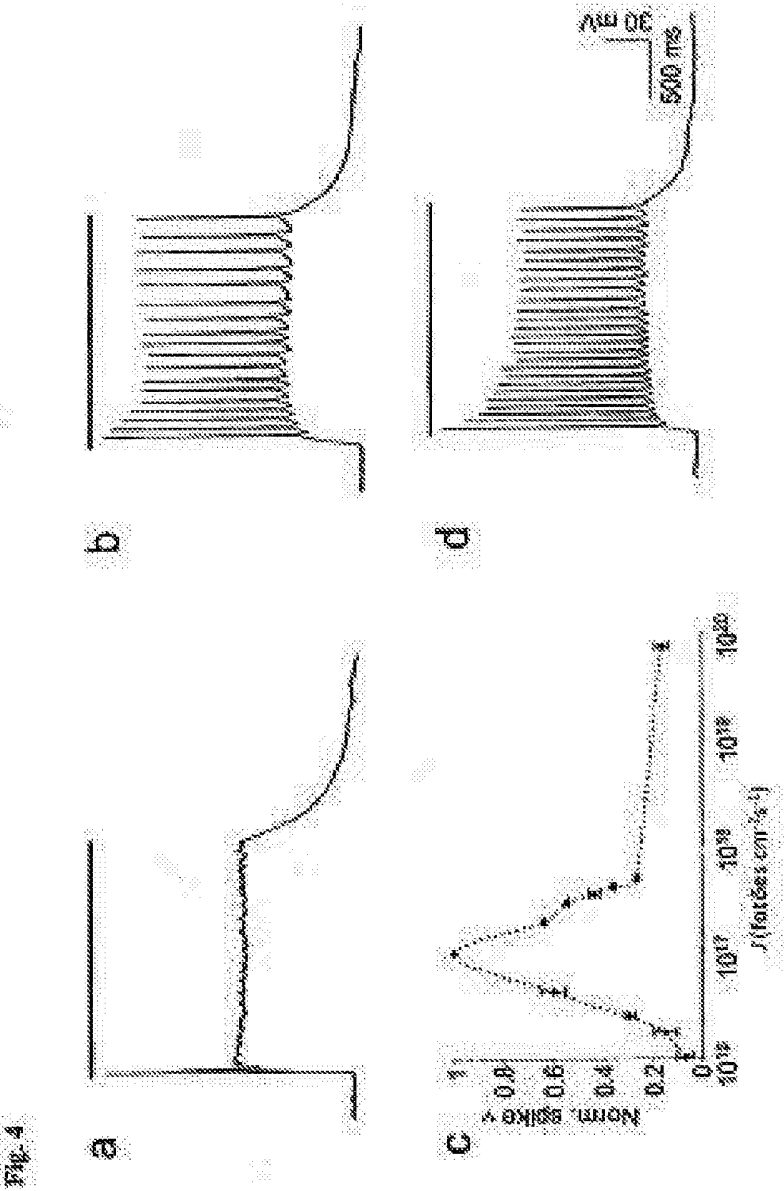
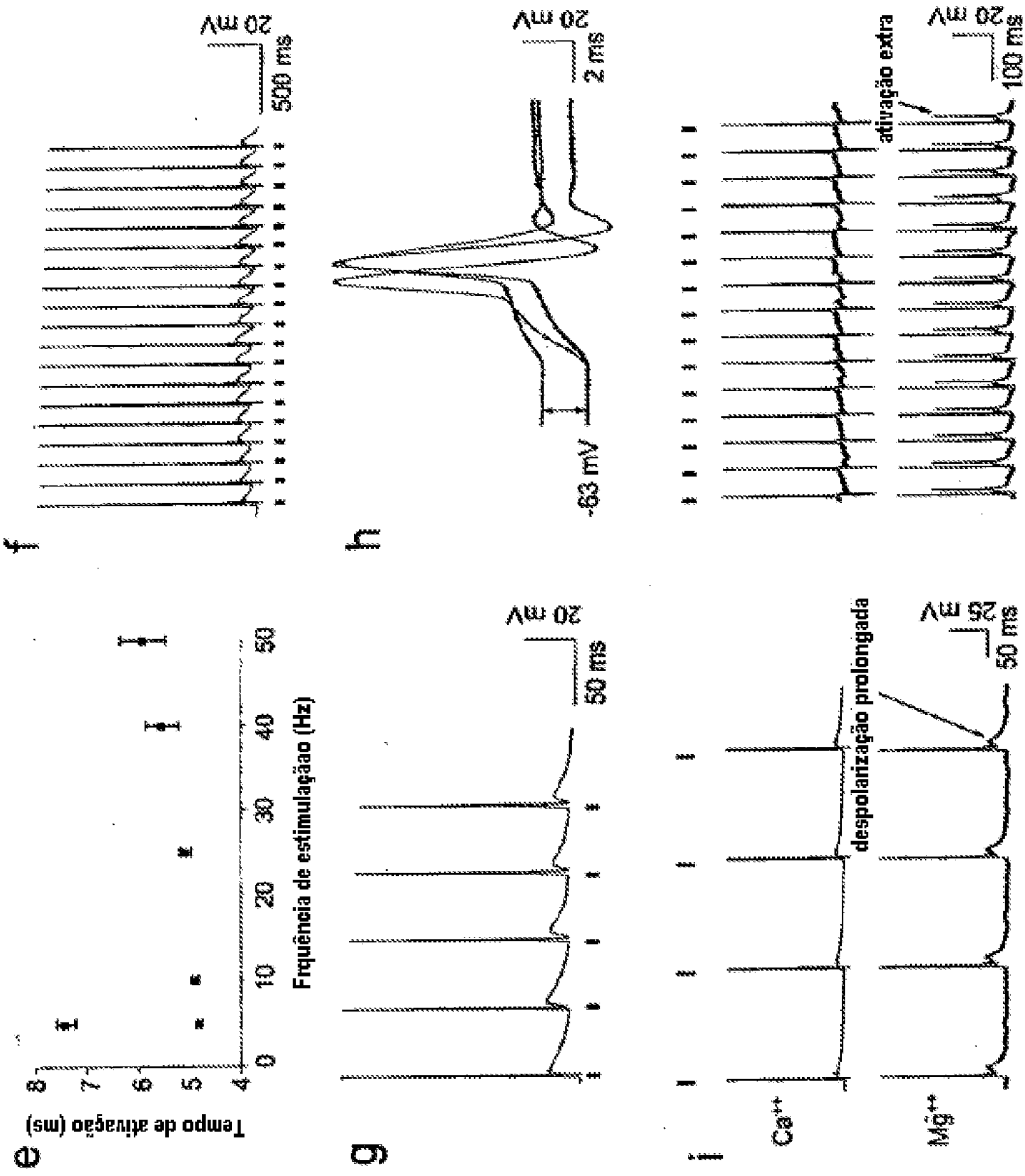


Fig. 4 (continuação)



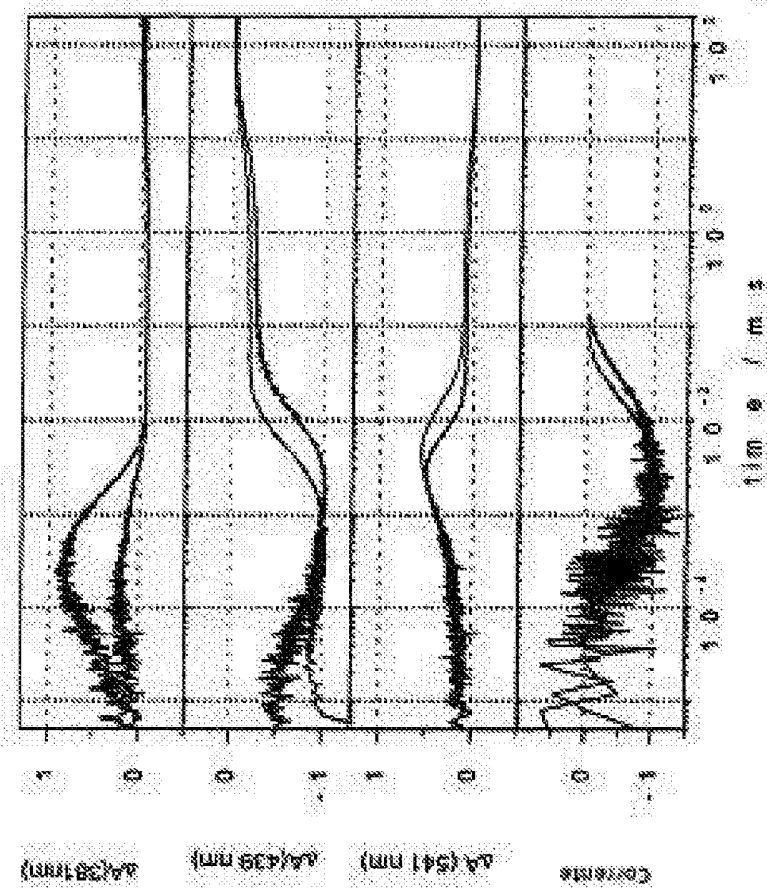


Fig. 5

Fig. 6

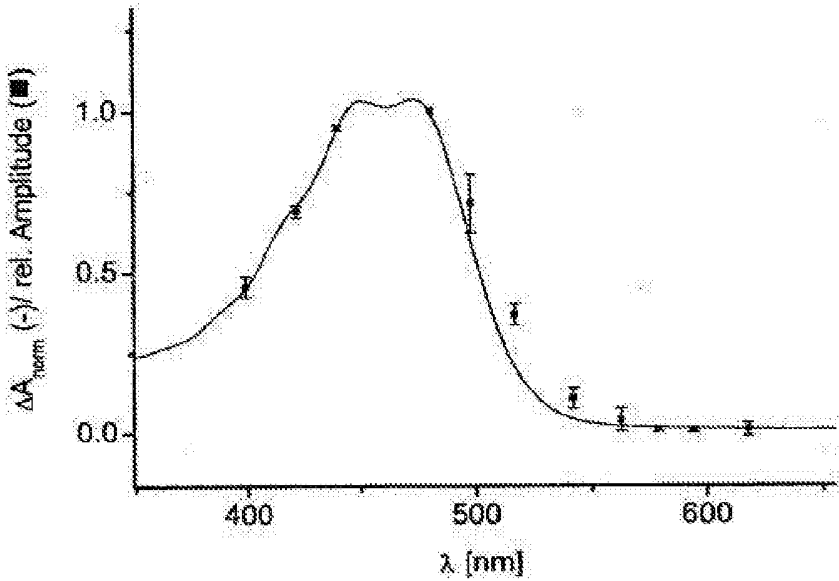
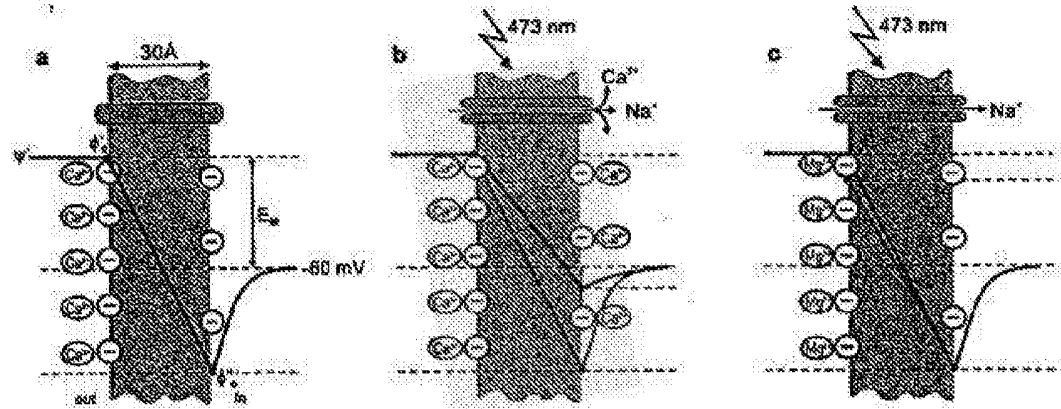


Fig. 7



REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 03084994 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- NAGEL, G. et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, 13940-13945
- NAGEL, G. et al. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol*, 2005, vol. 15, 2279-2284
- BOYDEN, E.; ZHANG, F.; BAMBERG, E.; NAGEL, G.; DEISSEROTH, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 2005, vol. 8, 1263-1268 [0080]
- ZHANG, F. et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 2005, vol. 446, 633-639
- BAMANN, C.; GUETA, R.; KLEINLOGEL, S.; NAGEL, G.; BAMBERG, E. Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry*, 2010, vol. 49, 267-278
- BERNDT, A.; YIZHAR, O.; GUNAYDIN, L.; HEGMANN, P.; DEISSEROTH, K. Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci*, 2009, vol. 12, 229-234
- LIN, J.; LIN, M.; STEINBACH, P.; TSJEN, R. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys J*, 2009, vol. 96, 1803-1814
- LAGALI, P. et al. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci*, 2008, vol. 11, 667-675
- BI, A. et al. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron*, 2006, vol. 50, 23-33
- FRANKENHÄUSER, B.; HODGKIN, A. The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J Physiol (Lond)*, 1957, vol. 137, 218-234
- GUNAYDIN, L. et al. Ultrafast optogenetic control. *Nat Neurosci*, 2010, vol. 13, 387-392
- BAMANN, C.; KIRSCH, T.; NAGEL, G.; BAMBERG, E. Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. *J Mol Biol*, 2009, vol. 375, 686-694
- FELDBAUER, K. et al. Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009
- CALDWELL, J. et al. Increases in intracellular calcium triggered by channelrhodopsin-2 potentiate the response of metabotropic glutamate receptor mGluR7. *J Biol Chemistry*, 2006, vol. 283 [0080]
- WEBER, W.-M. Ion currents in *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta*, 1999, vol. 1421, 213-233
- THYAGARAJAN, S. et al. Visual function in mice with photoreceptor degeneration and transgenic expression of channelrhodopsin 2 in ganglion cells. *J Neurosci*, 2010, vol. 30, 8745-8758
- HILLE, B.; WOODHULL, B.; SHAPIRO, B. Negative surface charge near sodium channels of nerve: divalent ions, monovalent ions, and pH. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1975, vol. 270, 301-318
- J. General Physiol. 1972, vol. 60, 285-306
- FABER, E.; SAH, P. Calcium-activated potassium-channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist*, 2003, vol. 9, 181-194
- JOH, N.; OBERAI, A.; YANG, D.; WHITELEGGE, J.; BOWIE, J. Similar energetic contributions of packing in the core of membrane and water-soluble proteins. *J Am Chem Soc*, 2009, vol. 131, 10846-10847
- SUBRAMANIAM, S.; FARUQI, A.; OESTERHELT, D.; HENDERSON, R. Electron diffraction studies of light-induced conformational changes in the Leu-93→Ala bacteriorhodopsin mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94, 1767-1772
- SUBRAMANIAM, S.; GREENHALGH, D.; RATH, P.; ROTHCHILD, K.; KHORANA, H. Replacement of leucine-93 by alanine or threonine slows down the decay of the N and O intermediates in the photocycle of bacteriorhodopsin: implications for proton uptake and 13-cis-retinal all-trans-retinal re-isomerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, vol. 88, 6873-6877

- * NACK, M. et al. The DC gate in Channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D158. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2010, vol. 9, 194-198
- * BUSSKAMP, V. et al. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science*, 2010, vol. 329, 413-417 [0080]
- * ELLIS-DAVIES, G. C. R. Neurobiology with caged calcium. *Chem Rev*, 2008, vol. 108, 1603-1613
- * LORENZ, C. ; PUSCH, M. ; JENTSCH, T. Heteromultimeric ClC chloride channels with novel properties. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 92, 13362-13366
- * ALLOCCA, M. et al. Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virology*, 2007, vol. 81, 11372-11380
- * DE FELIPE, P. et al. E unum plures: multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends Biotechnol*, 2008, vol. 24, 68-75
- * HUMPHREY, W. ; DALKE, A. ; SCHULTEN, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J Molec Graphics*, 1996, vol. 14, 33-38