



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106376525 A

(43)申请公布日 2017.02.08

(21)申请号 201610831188.3

A61K 38/17(2006.01)

(22)申请日 2011.11.04

A61P 25/28(2006.01)

(30) 优先权数据

61/410,732 2010.11.05 US

61/540.926 2011.09.29 US

(62) 分案原申请数据

201180061696.3 2011.11.04

(71)申请人 斯坦福大学托管董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 K·戴瑟罗斯 I·戈申

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51) Int.Cl.

A01K 67/027(2006.01)

权利要求书1页 说明书35页

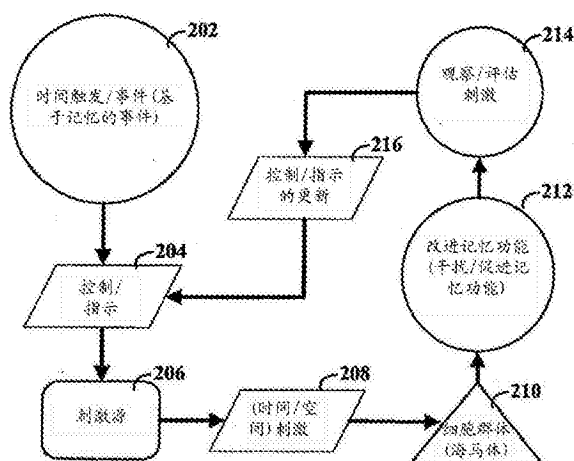
序列表7页 附图8页

(54)发明名称

记忆功能的控制和表征

(57)摘要

本文提供了用于在活的非人动物中可逆地控制记忆功能的装置和方法。用于影响记忆功能的一些变化形式包括在记忆获得或提取期间暂时抑制海马体神经元(例如海马体背侧CA1区的神经元)。或者或另外,用于可逆地影响记忆功能的方法包括抑制扁桃腺(例如基底外侧扁桃腺)的神经元和/或扣带回皮质(例如前扣带回皮质)的神经元。本文公开了通过抑制表达光活化蛋白质的兴奋性神经元来干扰记忆形成和重唤的方法。本文所述的用于可逆地影响记忆功能的一种或多种方法可用来评价药理学剂在治疗PTSD和/或各种记忆障碍中的有效性。



1. 一种产生非人动物的方法,其包括在所述动物的海马体背侧CA1区中的兴奋性神经元的细胞膜上表达光活化蛋白质,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化,其中照射所述蛋白质可逆地影响记忆功能。

2. 一种产生非人动物的方法,其包括在所述动物的前扣带回皮质中的兴奋性神经元的细胞膜上表达光活化蛋白质,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化,其中照射所述蛋白质可逆地影响记忆功能。

3. 一种产生非人动物的方法,其包括在所述动物的基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达光活化蛋白质,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化,其中照射所述蛋白质可逆地影响记忆功能。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述受影响的记忆功能为记忆提取或记忆形成。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述记忆是恐惧记忆。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述记忆是远事记忆。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述蛋白质选自由NpHR、BR、AR和GtR3组成的组。

8. 如权利要求7所述的方法,其中所述蛋白质包含与SEQ ID NO:3中所示的序列至少95%同一的氨基酸序列。

9. 如权利要求8所述的方法,其中所述蛋白质进一步包含内质网(ER)输出信号和/或膜运输信号。

10. 如权利要求8所述的方法,其中所述氨基酸序列通过连接子连接至所述ER输出信号。

11. 如权利要求9所述的方法,其中所述ER输出信号包含氨基酸序列FCYENEV。

12. 如权利要求9所述的方法,其中所述膜运输信号包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV。

13. 如权利要求7所述的方法,其中所述蛋白质包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

记忆功能的控制和表征

[0001] 本申请是申请日为2011年11月4日、发明名称为“记忆功能的控制和表征”的中国发明专利申请No.201180061696.3的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2010年11月5日提交的美国临时专利申请号61/410,732以及2011年9月29日提交的美国临时专利申请号61/540,926的优先权权益,各申请的内容以引用方式整体并入本文中。

[0004] 背景

[0005] 远事记忆的巩固依赖于时标为数分钟至数小时的突触巩固过程以及数周至数年的回路巩固(Frankland和Bontempi,2005;Squire和Bayley,2007)。长期的关联恐惧记忆巩固的过程需要海马体的早期参与,接着需要新皮质的参与;在这个过程的过程中,海马体对新皮质的影响可使海马体能够有助于记忆的长期皮质储存,而非稳定地储存记忆本身。研究已显示海马体病变损害近事记忆(在训练之后一天),但相同病变对远事记忆(在训练之后若干周)没有影响(Anagnostaras等,1999;Bontempi等,1999;Debiec等,2002;Frankland等,2004;Kim和Fanselow,1992;Kitamura等,2009;Maren等,1997;Maviel等,2004;Shimizu等,2000;Wang等,2003;Winocur等,2009)。其它研究表明海马体记忆和皮质记忆都处于连续的相互影响中。

[0006] 先前关于记忆回路的工作已涉及身体研究、药理学研究和遗传病变研究,这已极大地增强了我们对神经系统的理解,而且已遭遇某些熟知挑战;例如身体病变是高度有效的,但缺乏细胞精确性和时间精确性,并且其它方法通常涉及细胞精确性和时间精确性之间的权衡。巧妙的遗传干涉可具有细胞类型特异性(McHugh等,2007;Nakashiba等,2008),但在天数时标上是缓慢的。药理学病变允许分钟时标上更高的时间分辨率(Kitamura等,2009;Wiltgen等,2010),但仍慢于神经元并且通常不具有细胞特异性。需要开发能够实现细胞类型精确性和在毫秒时标上的时间控制以便研究动物记忆的方法和工具。

[0007] 各种精神病状可能因记忆回路中的病症而出现。例如,健忘症(例如非分级健忘症、分级逆行性健忘症、局灶性逆行性健忘症,等)涉及不能提取某些记忆,而创伤后应激障碍(PTSD)涉及不合需要地提取恐惧记忆。PTSD是一种常见的衰弱性精神病状,其中单次受到创伤性事件会因为创伤的重复再经历而造成功能受损数年。理解构成不合需要的记忆重唤的基础的神经通路可能有助于帮助发现并筛选治疗患有这些记忆障碍的患者的药理学疗法。

[0008] 本文所引用的所有参考文献(包括专利申请和出版物)均以引用的方式整体并入。

[0009] 概述

[0010] 本公开的方面是关于如本文所述的动物记忆功能的控制或表征。尽管本公开不一定限于这些上下文,但本发明的实施方案可通过使用这些和其它上下文讨论实施例来加以了解。

[0011] 本公开的某些实施方案是针对与记忆功能相关的被特异性靶向的回路。更具体的实施方案是关于对神经回路的时空控制以便鉴别与记忆功能(例如记忆形成和/或提取)相

关并对应的特定回路目标。

[0012] 本公开的具体实施方案是针对海马体中神经回路(如海马体的背侧CA1区的神经元)的时间上精确抑制,所述精确性足以干扰记忆功能。已发现神经抑制的时间精确性会有效干扰远事记忆提取,而长久抑制对远事记忆提取不具有显著影响。因此,本公开的方面是关于这种抑制的时间方面。或者或另外,用于可逆地影响记忆功能的方法可包括暂时抑制扁桃腺(例如基底外侧扁桃腺)的神经元和/或扣带回皮质(例如前扣带回皮质)的神经元。在某些实施方案中,这种抑制使用光遗传学系统进行,所述光遗传学系统涉及表达神经回路的细胞中的光活化蛋白质(例如视蛋白)。在其它实施方案中,抑制可使用直接电刺激来进行。其它实施方案允许使用时间上精确的医药品。

[0013] 本公开的各个实施方案是关于光遗传学系统或方法,它将对神经回路的时间控制与可测量的量度相关联。例如,具体记忆功能可能与神经病症相关。光遗传学系统靶向个体内的神经回路以便对其进行选择性控制。光遗传学系统涉及监测个体的与神经病症相关的量度(例如症状)。以此方式,光遗传学系统可提供关于神经回路、它的功能和/或神经病症的详细信息。用于可逆地影响记忆功能的一种或多种方法可用来评价药理学剂在治疗PTSD和/或各种记忆障碍中的有效性。

[0014] 本文提供使用光遗传学技术通过表达涉及记忆功能的特定神经元群体中的光活化蛋白质来影响记忆以及通过用光活化所述蛋白质来影响记忆功能的方法。在一些变化形式中,光活化蛋白质可被配置成在具有特定波长的光存在下抑制神经元去极化。在一些变化形式中,光活化蛋白质可被配置成在具有特定波长的光存在下促进神经元去极化。

[0015] 本文提供一种非人动物,所述非人动物包含在动物海马体的背侧CA1区中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化,其中照射蛋白质可逆地影响记忆功能。本文还提供一种非人动物,所述非人动物包含在动物前扣带回皮质中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化,其中照射蛋白质可逆地影响记忆功能。本文还提供一种非人动物,所述非人动物包含在动物基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化,其中照射蛋白质可逆地影响记忆功能。在一些实施方案中,当神经元被照射时受影响的记忆功能可为记忆提取和/或记忆形成。在一些实施方案中,记忆是恐惧记忆和/或远事记忆。

[0016] 本文还提供一种脑组织薄片,所述脑组织薄片包含选自由以下组成的组的脑区:海马体背侧CA1区、基底外侧扁桃腺和前扣带回皮质,其中光活化蛋白质在脑区的兴奋性神经元的细胞膜上表达,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化,其中照射蛋白质可逆地影响记忆功能。

[0017] 本文还提供可逆地影响个体的记忆提取或形成的方法。

[0018] 在一些实施方案中,用于可逆地影响个体的记忆提取或形成的方法包括:向个体的海马体背侧CA1区施用编码光活化蛋白质的聚核苷酸,其中光活化蛋白质在海马体背侧CA1区中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,并且蛋白质对光起反应并能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化,从而用光活化蛋白质可逆地影响事件在个体中的记忆提取或形成。在一些实施方案中,用于可逆地影响记忆提取或形成的方法包括:在事件于个体中的记

忆提取或形成期间抑制海马体背侧CA1区中的兴奋性神经元去极化,其中光活化蛋白质在个体的海马体背侧CA1区中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化。

[0019] 在一些实施方案中,用于可逆地影响个体的记忆提取或形成的方法包括:向个体的前扣带回皮质施用编码光活化蛋白质的聚核苷酸,其中光活化蛋白质在前扣带回皮质中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,并且蛋白质对光起反应并能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化,从而用光活化蛋白质可逆地影响事件在个体中的记忆提取或形成。在一些实施方案中,用于可逆地影响记忆提取或形成的方法包括:在事件于个体中的记忆提取或形成期间抑制前扣带回皮质中的兴奋性神经元去极化,其中光活化蛋白质在个体的前扣带回皮质中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化。

[0020] 在一些实施方案中,用于可逆地影响个体的记忆提取或形成的方法包括:向个体的基底外侧扁桃腺施用编码光活化蛋白质的聚核苷酸,其中光活化蛋白质在基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,并且蛋白质对光起反应并能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化,从而用光活化蛋白质可逆地影响事件在个体中的记忆提取或形成。在一些实施方案中,用于可逆地影响记忆提取或形成的方法包括:在事件于个体中的记忆提取或形成期间抑制基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元去极化,其中光活化蛋白质在个体的基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化。

[0021] 本文还提供用于治疗个体的创伤后应激障碍的方法。在一些实施方案中,用于治疗个体的创伤后应激障碍的方法包括:向个体的海马体背侧CA1区施用编码光活化蛋白质的聚核苷酸,其中光活化蛋白质在海马体背侧CA1区中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,并且蛋白质对光起反应并能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化,从而用光活化蛋白质可逆地影响事件在个体中的记忆提取或形成。在一些实施方案中,用于治疗个体的创伤后应激障碍的方法包括:向个体的前扣带回皮质施用编码光活化蛋白质的聚核苷酸,其中光活化蛋白质在前扣带回皮质中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,并且蛋白质对光起反应并能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化,从而用光活化蛋白质可逆地影响事件在个体中的记忆提取或形成。

[0022] 本文还提供筛选影响记忆提取或形成的药理学剂的方法,所述方法包括:a)在事件于非人动物中的记忆提取或形成期间使海马体背侧CA1区中的兴奋性神经元与药理学剂接触,其中非人动物包含在动物的海马体背侧CA1区中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中蛋白质对光起反应并能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化;b)在事件的记忆提取或形成期间抑制海马体背侧CA1区中兴奋性神经元的去极化;以及c)确定药理学剂在存在或不存在光下是否影响记忆提取或形成。本文还提供筛选影响记忆提取或形成的药理学剂的方法,所述方法包括:a)在事件于非人动物中的记忆提取或形成期间使前扣带回皮质中的兴奋性神经元与药理学剂接触,其中非人动物包含在动物的前扣带回皮质中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中蛋白质对光起反应并能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化;b)在事件的记忆提取或形成期间抑制前扣带回皮质中兴奋性神经元的去极化;以及c)确定药理学剂在存在或不存在光下是否影响记忆提取或

形成。本文还提供筛选影响记忆提取或形成的药理学剂的方法,所述方法包括:a)在事件于非人动物中的记忆提取或形成期间使基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元与药理学剂接触,其中非人动物包含在动物的基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中蛋白质对光起反应并能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化;b)在事件的记忆提取或形成期间抑制基底外侧扁桃腺中兴奋性神经元的去极化;以及c)确定药理学剂在存在或不存在光下是否影响记忆提取或形成。

[0023] 所述光活化蛋白质可对光起反应并且被配置为使得蛋白质能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化。在一些实施方案中,光活化蛋白质可选自由本文所述的NpHR、BR、AR和GtR3组成的组。在一些实施方案中,光活化蛋白质是一种NpHR蛋白,其包含与SEQ ID NO:3中所示的序列至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,NpHR蛋白进一步包含内质网(ER)输出信号和/或膜运输信号。例如,NpHR蛋白包含与SEQ ID NO:3中所示的序列至少95%同一的氨基酸序列以及内质网(ER)输出信号。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:3中所示的序列至少95%同一的氨基酸序列通过连接子连接至ER输出信号。在一些实施方案中,ER输出信号包含氨基酸序列FXYENE,其中X可为任何氨基酸。在另一实施方案中,ER输出信号包含氨基酸序列VXXSL,其中X可为任何氨基酸。在一些实施方案中,ER输出信号包含氨基酸序列FCYENEV。在一些实施方案中,NpHR蛋白包含与SEQ ID NO:3中所示的序列至少95%同一的氨基酸序列、ER输出信号、以及膜运输信号。在其它实施方案中,NpHR蛋白从N端到C端包含与SEQ ID NO:3中所示的序列至少95%同一的氨基酸序列、ER输出信号、以及膜运输信号。在其它实施方案中,NpHR蛋白从N端到C端包含与SEQ ID NO:3中所示的序列至少95%同一的氨基酸序列、膜运输信号、以及ER输出信号。在一些实施方案中,膜运输信号来源于人内向整流钾通道Kir2.1的氨基酸序列。在一些实施方案中,膜运输信号包含氨基酸序列K S R I T S E G E Y I P L D Q I D I N V。在一些实施方案中,膜运输信号通过连接子连接至与SEQ ID NO:3中所示的序列至少95%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,膜运输信号通过连接子连接至ER输出信号。连接子可包含5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400或500个氨基酸中任一种的长度。连接子还可进一步包含荧光蛋白,例如(但不限于)黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、绿色荧光蛋白或青色荧光蛋白。在一些实施方案中,光活化蛋白质进一步包含N端信号肽。在一些实施方案中,光活化蛋白质包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在一些实施方案中,光活化蛋白质包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0024] 应了解,本文所述的各个实施方案的一种、一些或所有特性可组合形成本发明的其它实施方案。本发明的这些方面和其它方面将变得对本领域技术人员容易了解。

[0025] 附图简述

[0026] 图1描绘装置或系统的一种变化形式,所述装置或系统可用来应用所选波长的光来影响记忆功能。

[0027] 图2描绘用于改进记忆功能的流程图。

[0028] 图3A和图3B描绘用于评价测试药理学剂对构成记忆功能的基础的神经回路的影响的方法的变化形式。

[0029] 图4A-D描绘实验数据,所述实验数据展示背侧CA1中的兴奋性神经元的特异性光遗传学抑制减少了神经元活动。图4A展示双慢病毒注射引起仅在整个CA1中的eNpHR3.1表

达。图4B展示eNpHR3.1在体细胞周围的神经元膜中表达,以及在CA1神经元的顶树突和底树突中表达。图4C描绘的数据证明:CaMKII α :eNpHR3.1在94% (458/486细胞,来自3只小鼠)的CA1锥体神经元中表达,具有100%特异性(所有eNpHR3.1-EYFP细胞都为CaMKII α 阳性)。图4D描绘来自如下进行的活体内“光极(optrode)”光施用和记录的数据:将耦接至钨电极的光学纤维插入表达eNpHR3.1的麻醉小鼠中的CA1中(左图)。这些小鼠中CA1神经元的561nm照射使得尖峰频率发生可逆的显著减小(在施用光之前、之中和之后分别为 $4.93 \pm 1.6\text{Hz}$ 、 $1.31 \pm 0.15\text{Hz}$ 和 $6.45 \pm 2.4\text{Hz}$,自2只小鼠在15条迹线中, $P < 0.02$),而未影响平均尖峰幅度(在光之前、之中和之后为 $33.55 \pm 4.94\mu\text{V}$ 、 $29.20 \pm 4.4\mu\text{V}$ 和 $33.32 \pm 5.45\mu\text{V}$)。展示了代表性光极记录迹线、以及平均频率和幅度(平均值 $\pm$ SEM)。

[0030] 图5A-5I描绘的实验数据展示:实时CA1光遗传学抑制阻断了关联恐惧获得和提取。图5A展示双侧活体内光可以通过将双光学纤维经由双侧套管导向器插入自由移动的小鼠中而施用至CA1。图5B(上方)描绘一种实验工序,其中在恐惧条件化训练期间施用连续561nm照射,并且24小时后在没有光下测试小鼠的记忆。一天后,在没有光下再训练小鼠,并且在第四天在没有光下以及在第五天在有光下再测试。(下方)在eNpHR3.1小鼠($n=5$)中与对照物($n=4$)相比,在恐惧条件化训练(光打开)期间的CA1光遗传学抑制防止了获得($39 \pm 5.4\%$ 对 $7.6 \pm 4.3\%$ 木僵(freezing);平均值 $\pm$ SEM, $P < 0.005$)。当在没有照射(光关闭)下再训练时,相同小鼠显示完整的关联记忆($64.6 \pm 6.6\%$ 对 $49.7 \pm 11.7\%$ 木僵; $P > 0.5$)。在测试期间施用光(光打开)时,在eNpHR3.1小鼠中,这种关联恐惧记忆变得不可重唤($42.6 \pm 10.1\%$ 对 $5.94 \pm 4.1\%$ 木僵, $P < 0.01$)。图5C展示在eNpHR3.1小鼠($n=5$)中与对照物($n=4$)相比,CA1光遗传学抑制对海马体无关的听觉提示恐惧记忆的获得(左边)或重唤(右边)没有影响。图5D描绘的数据展示:在eNpHR3.1小鼠($n=5$)中进行条件化之前,与对照物($n=4$)相比,光遗传学抑制对情境探索没有影响。CA1光遗传学抑制对新环境探索也没有影响。图5E和5F展示对照物($n=6$)和eNpHR3.1($n=4$)小鼠以类似通路长度(分别为 $564 \pm 9\text{cm}$ 和 $618 \pm 114\text{cm}$)和类似速度(分别为 $3.3 \pm 0.1\text{cm/sec}$ 对 $3.43 \pm 0.6\text{cm/sec}$)探索所述区域。图5G展示对焦虑不存在影响,因为对照物和eNpHR3.1小鼠在旷场中心所待的时间百分比类似($23.8 \pm 2.76\%$ 对 $20.46 \pm 5.97\%$, $P > 0.5$)。呈现了代表性探索迹线。图5H描绘基底外侧扁桃腺(BLA)中的eNpHR3.0表达。图5I展示在eNpHR3.0($n=4$)小鼠中,与对照物($n=9$)相比,向BLA施用灯引起受损的关联($65.5 \pm 7.2\%$ 对 $9.6 \pm 5.5\%$ 木僵; $P < 0.001$)和提示($69.5 \pm 9.6\%$ 对 $24.5 \pm 13\%$ 木僵; $P < 0.05$)记忆获得。

[0031] 图6A-6E描绘的实验数据展示:CA1光遗传学抑制可逆地干扰远事恐惧记忆重唤。图6A描绘的数据表明:CA1光遗传学抑制可逆地防止28天前获得的远事记忆的重唤,并且从未预先诱发($P < 0.0001$;对照物 $n=14$, $69.8 \pm 5.3\%$ 木僵,eNpHR3.1 $n=6$, $14 \pm 6.4\%$ 木僵)。这种重唤干扰是可逆的,因为当次日在没有照射下将相同小鼠再引入条件化情境中时,它们显示完整的恐惧反应($52.45 \pm 6.0\%$ 对 $45.18 \pm 11.5\%$ 木僵; $P > 0.5$)。图6B描绘的数据展示:在条件化之后28天测试的听觉提示恐惧不受影响(在新情境中,对照物 $n=14$, $22.3 \pm 6.8\%$,eNpHR3.1 $n=6$, $11.8 \pm 3.5\%$ 木僵;以及对于音调, $72.4 \pm 8.4\%$ 对 $58.77 \pm 7.9\%$ 木僵; $P > 0.5$)。图6C展示CA1光遗传学抑制损害63天前获得的极远事记忆的重唤,并且从未预先诱发($P < 0.005$;对照物 $n=9$, $31.8 \pm 3.8\%$ 木僵,eNpHR3.1 $n=6$, $11.3 \pm 3.6\%$ 木僵)。图6D描绘的数据展示:通过在条件化之后一天施用TTX和CNQX进行的药理学海马体抑制防止了

近事恐惧重唤(盐水 $n=5$, $56.86 \pm 1.9\%$ 木僵; TTX+CNQX $n=4$, $26.05 \pm 10.23\%$ 木僵; $P<0.05$)。图6E展示在条件化之后一个月施用TTX和CNQX不影响远事恐惧重唤(盐水 $n=8$, $93.93 \pm 2.54\%$ 木僵; TTX+CNQX $n=9$, $83.8 \pm 4.4\%$ 木僵; $P>0.05$)。

[0032] 图7A-7C描绘的实验数据展示:精确但不长久的CA1光遗传学抑制阻断了远事关联恐惧重唤。图7A展示仅当在测试期间精确施用光(精确组,对照物 $n=4$, $72.65 \pm 11.5\%$ 木僵, eNpHR3.1 $n=8$, $26.9 \pm 10.4\%$ 木僵; $P<0.01$)时, CA1光遗传学抑制防止28天前获得的记忆的远事恐惧重唤,而当在测试之前以及测试之中连续地打开光30分钟(长久组,中间,对照物 $n=3$, $70.13 \pm 12.2\%$ 木僵, eNpHR3.1 $n=4$, $67.7 \pm 5.6\%$ 木僵; $P>0.05$)时,并不如此。当次日仅在测试期间有光下再测试长久组小鼠时,它们的重唤被干扰(长久组,左边, $55.5 \pm 8.5\%$ 对 $27.6 \pm 8.6\%$ 木僵; $P<0.05$)。图7B展示在条件化之后24小时,长久的光防止重唤近事记忆(对照物 $n=7$, $32.2 \pm 10.6\%$ 木僵, eNpHR3.1 $n=3$, $4 \pm 2.6\%$ 木僵; $P<0.05$)。图7C展示eNpHR3.1连续并完全防止诱发的尖峰30分钟,如记录迹线中所示。切片1(抑制开始)、2(连续抑制期间)以及3(抑制结束并且恢复)的详细迹线呈现于左下方。呈现了在光之前、在光施用期间(光打开5分钟和30分钟之后)成功诱发的尖峰以及在光关闭之后恢复的平均百分比(右下方; $n=4$ 只小鼠, 10个细胞)。

[0033] 图8描绘的实验数据展示CA1光遗传学抑制干扰了进行中的恐惧重唤。左边:在CA1光遗传学抑制下,在5周前获得并且有效重唤的远事恐惧记忆(对照物 $n=8$, $79.0 \pm 8.9\%$ 木僵; eNpHR3.1 $n=6$, $67.8 \pm 12.1\%$ 木僵; $P>0.5$)不再可重唤($77.2 \pm 4.3\%$ 对 $12.8 \pm 4.4\%$ 木僵; $P<0.0001$)。右边:这种重唤干扰不会引起记忆清除,因为当在没有照射下将相同小鼠再引入条件化情境中时,它们再次显示完整的恐惧反应($61.5 \pm 6.7\%$ 对 $58.3 \pm 3.5\%$ 木僵; $P>0.5$)。当在测试试验的中间再次引入照射时,在记忆已重唤之后,恐惧反应突然停止($65.2 \pm 6.9\%$ 对 $15.9 \pm 5.2\%$ 木僵; $P<0.001$)。

[0034] 图9A-9H描绘的实验数据展示在远事重唤期间由海马体控制的回路活动的全脑映射(brain-wide mapping)。图9A描绘一种实验,其中在光递送下将小鼠恐惧条件化,并且在训练之后90分钟采集脑部。图9B展示针对c-Fos和DAPI染色的脑部薄片。展示了YFP对照物和eNpHR3.1的表达。在图9C中由白色正方形标记获得这些图像的CA1区。图9C描绘CA1、ACC和BLA的代表性图像。由DAPI核染色展示解剖结构,并且用黄色虚线标记扁桃腺的边缘。白色定标线条:150 μm 。图9D展示在FC期间的CA1光遗传学抑制减小了在CA1 ($n=2$ 至4只小鼠,每组6至15片薄片; $P<0.01$)中,而不减小在ACC或BLA中的神经元活化标记c-Fos的表达。在对照物和eNpHR3.1小鼠 ($p<0.0001$)中,在BLA中,活动程度类似地升高。图9E描绘一种实验,其中训练另一组小鼠,并接着在条件化之后28天再暴露于条件化情境。在测试之后采集脑部以便染色90分钟。图9F描绘在显示远事记忆之后的代表性CA1、ACC和BLA图像。白色定标线条:150 μm 。图9G展示在条件化之后28天的远事重唤导致对照小鼠中 ($P<0.005$)的CA1c-Fos表达的小的但显著的增加、以及ACC ($P<0.0001$)和BLA ($P<0.0001$)中的活动程度的高度增加。与对照物相比,在暴露于情境期间的光抑制完全阻断CA1活动 ($P<0.05$),并且显著减少ACC和BLA活动(分别为 $P<0.0001$ 和 $P<0.0001$)。图9H展示在条件化(第0天)和远事重唤(第28天)之间脑部活动的全局模式。在对照 ($P<0.005$)小鼠中,从第0天到第28天,CA1中的活动程度显著减小。在对照物 ($P<0.0001$)和eNpHR3.1 ($P<0.001$)小鼠中,从第0天到第28天,ACC中的活动程度都显著提高。在对照物 ($P<0.001$)中,BLA中的活动程度显著提高,而在

eNHR3.1小鼠中并不如此。

[0035] 图10描绘的实验数据展示:精确和长久前扣带回皮质 (ACC) 光遗传学抑制干扰远事、而不干扰近事恐惧记忆重唤。图10A描绘前扣带回皮质 (ACC) 中的eNpHR3.0表达。图10B描绘一种实验,其中精确施用光引起抑制远事 (对照物 $n=5$, $81.6 \pm 4.9\%$ 木僵; eNpHR3.0 $n=5$, $53.8 \pm 11\%$ 木僵; $P<0.05$)、而不抑制近事 ($75.9 \pm 5.4\%$ 对 $76 \pm 2.9\%$ 木僵) 记忆重唤。图10C描绘另一实验,其中ACC中的长久光也引起抑制远事 (对照物 $n=3$, $78.0 \pm 6.2\%$ 木僵; eNpHR3.0 $n=8$, $45.0 \pm 5.2\%$ 木僵; $P<0.05$)、而不抑制近事 ($78.5 \pm 12.7\%$ 对 $74.3 \pm 4.3\%$ 木僵) 记忆重唤。

[0036] 详述

[0037] 据信本公开适用于基于时间来改进记忆功能。本发明的特定应用有助于干扰记忆提取和/或与记忆提取有关的情绪反应。因为本文公开的实例实施方案的许多方面是关于并且显著基于这个领域的先前发展,所以以下讨论概述这些先前发展来对可获取实施细节和改进的基础和根本教义提供可靠理解。在本文中提供以下讨论并且使这些参考文献中的教义以引用的方式并入本文中。尽管本发明不一定限于这些申请,但本发明的各个方面可通过使用本文来讨论各个实施例得到了解。

[0038] 已发现(时间性)干扰背侧CA1海马体回路会有效预防关联恐惧记忆获得。与此一致的是,盛行的神经网络理论提出记忆巩固过程以海马体和皮质之间的连接的短期改进作为开始,所述短期改进使海马体能够活化有助于完整记忆,而非存储记忆本身的相关皮质位点。尽管这些皮质迹线被重复共活化,但其间的连接发生逐渐持久的变化,直到在无任何海马涉及的情况下这些连接最终足够强以支持记忆为止。

[0039] 惊人的是,已发现甚至在据信已发生皮质改组之后,干扰背侧CA1海马体回路会有效阻断恐惧记忆重唤。

[0040] 根据本公开的各个实施方案,和控制神经回路有关来讨论方法、系统或装置。对神经回路的控制可包括抑制或激发,这可各自包括协调燃烧,和/或对外部回路输入改进的易感性。例如,抑制可使用以下实现:光活化蛋白质,如离子通道和/或离子泵(例如NpHR和NpHR变体)。这些离子通道移动神经元膜电位远离它的临界电压来阻止或抑制动作电位。在另一情况下,激发可使用以下实现:光活化蛋白质,如离子通道(例如ChR2和ChR2变体)。这些离子通道可使膜电位向临界电压移动和/或通过临界电压,从而激发或促进作用电位。根据各个实施方案,光活化蛋白质可用来(暂时)使神经元静息电位位移来增大或减小它对外部回路输入的易感性。这些各种选择也可组合使用。

[0041] 本文提供的装置和方法可能可逆地影响记忆功能。例如,下述方法可用来控制和/或表征构成长期记忆和短期记忆以及各种类型记忆(包括恐惧记忆或紧张记忆)的基础的神经回路。方法还可影响记忆功能的各种阶段(例如记忆获得、记忆巩固和记忆重唤)。在影响记忆功能的一些变化形式(例如记忆形成和/或记忆提取)中,通过向海马体背侧CA1区中的神经元、基底外侧扁桃腺(BLA)中的神经元和/或前扣带回皮质(ACC)中的神经元(其表达光活化蛋白质)应用光来影响记忆功能。在光存在下,这些光活化蛋白质可抑制神经元去极化,从而干扰记忆形成和/或记忆提取。尽管在获得和重唤基于关联远事和近事恐惧的记忆的情形下描述了示例性方法,但应了解,本文公开的装置和方法可用来影响记忆功能的其它阶段、以及其它类型的记忆(例如提示记忆)。

[0042] 本文所述和图中所示的各个实施方案可一起实施和/或以其它方式实施。图式/图中所描绘的条目中一个或多个也可以较分离或较整体的方式实施,或在某些情况下被去除和/或变得不可操作(如根据具体应用适用)。例如,涉及治疗如本文讨论的PTSD的实施方案可使用在时间上控制药物释放来实施。鉴于本文的描述,本领域技术人员将认识到可在不脱离本发明的精神和范畴下使其产生许多变化。

[0043] 在目标细胞中表达光活化蛋白质

[0044] 神经元(例如涉及记忆功能的神经元)活动可使用多种机制而受影响。影响神经元活动的确定性方法可用来控制和/或表征构成各种脑功能的基础的神经回路。例如,神经元反应可如下受影响:应用药理学剂(例如河豚毒素(tetrodotoxin;TTX)、6-氰基-7-硝基喹啉-2,3-二酮(CNQX)、印防己毒素(picotoxin)、土的宁(strychnine),等)和/或电刺激(例如电极)。在一些变化形式中,神经元活动可通过活化神经元膜上某些类型的蛋白质,从而可使细胞膜超极化或去极化而受影响。例如,在某一波长的光存在下,变得对某些离子(例如阳离子、阴离子)可透的光活化蛋白质可在神经元中表达。光活化蛋白质的实例可包括光活化离子通道和/或泵,其在下文得到进一步描述。

[0045] 在一些变化形式中,微生物视蛋白基因可适用于神经科学。这些视蛋白允许光脉冲串转导成完整哺乳动物脑中特定细胞类型(例如通道视紫红质(ChR2)、团藻属通道视紫红质(VChR1)和卤代视紫红质(NpHR))中的毫秒时标膜电位变化。ChR2是一种来源于单细胞绿藻莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的视紫红质。本文所用的术语“视紫红质”是包含至少两种构建块(视蛋白蛋白质和共价结合辅因子(通常是视网膜的(视黄醛)))的蛋白质。视紫红质ChR2衍生自视蛋白通道视蛋白-2(Chop2),它最初名为单细胞藻类衣藻-4(*Chlamyopsin-4;Cop4*)(在衣藻属基因组中)。一种去极化通道视紫红质ChR2的时间性质包括活化和去活化的快速动力学,从而产生精确定时的动作电位串。对于寻求长时标活化的应用,已发现通道视紫红质的通常快速脱附动力学可减缓。例如,通道视紫红质的某些实施应用 $1\text{mW}/\text{mm}^2$ 的光持续需要去极化的实际上全部时间,这可能小于所需。

[0046] 反应于某些波长的光产生膜超极化或抑制膜去极化的光活化蛋白质可在以下中表达:海马体背侧CA1区(CA1)、基底外侧扁桃腺(BLA)和前扣带回皮质(ACC)区域的兴奋性神经元(例如谷氨酸能神经元)。下文图1展示可在某一波长的光存在下在兴奋性神经元中表达以抑制神经元去极化或超极化的光活化蛋白质的各种实例。这些和其它光活化蛋白质的进一步描述可见于2011年3月17日提交的标题为“LIGHT SENSITIVE ION PASSING MOLECULES”的PCT申请号PCT/US11/028893中,所述PCT申请以整体引用的方式并入。如本文所用,“NpHR”、“BR”、“AR”和“GtR3”包括野生型蛋白质和功能变体(包括天然存在的变体)。

[0047] 表1

[0048]

光活化蛋白质	生物来源	波长敏感性	规定动作
NpHR	法老嗜盐碱单胞菌 (<i>Natronomonas pharaonis</i>)	680 nm 效用 (具有 3.0 系列) 589 nm 最大	抑制 (超极化)
BR	盐生盐杆菌 (<i>Halobacterium halobium</i>)	570 nm 最大	抑制 (超极化)
AR	伞藻属蝶状藻 (<i>Acetabularia acetabulum</i>)	518 nm 最大	抑制 (超极化)
GtR3	蓝隐藻 (<i>Guillardia theta</i>)	472 nm 最大	抑制 (超极化)

[0049] 本发明的实施方案包括天然存在的序列的相对较次要氨基酸变体。在一种情况下,变体与天然存在的序列的蛋白质序列大于约75%同源。在其它变体中,同源性大于约80%。还有其它变体具有大于约85%、大于90%或甚至高达约93%至约95%或约98%的同源性。在本文中同源性意谓序列相似性或同一性,同一性是优选的。这个同源性可使用序列分析领域中已知的标准技术来测定。本发明的实施方案的组合物包括本文提供的蛋白质和核酸序列,包括以下变体:与所提供的序列大于约50%同源、与所提供的序列大于约55%同源、与所提供的序列大于约60%同源、与所提供的序列大于约65%同源、与所提供的序列大于约70%同源、与所提供的序列大于约75%同源、与所提供的序列大于约80%同源、与所提供的序列大于约85%同源、与所提供的序列大于约90%同源,或与所提供的序列大于约95%同源。

[0050] 本文提供一种非人动物,所述非人动物包含在动物的海马体背侧CA1区、前扣带回皮质和/或基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中蛋白质对光起反应并且能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化,其中照射蛋白质可逆地影响记忆功能。在一些实施方案中,光活化蛋白质选自由本文所述的NpHR、BR、AR和GtR3组成的组。例如,本文所述的NpHR蛋白中任一者都可在目标神经元的细胞膜上表达。

[0051] 本文还提供脑组织薄片,所述脑组织薄片包含选自由以下组成的组的脑区:海马体背侧CA1区、基底外侧扁桃腺和前扣带回皮质,其中光活化蛋白质是在脑区的兴奋性神经元的细胞膜上表达,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化,其中照射蛋白质可逆地影响记忆功能。在一些实施方案中,脑组织薄片是经过培养的取自本文所述的非人动物的组织薄片。在一些实施方案中,光活化蛋白质选自由本文所述的NpHR、BR、AR和GtR3组成的组。例如,本文所述的NpHR蛋白中任一者都可在目标神经元的细胞膜上表达。

[0052] 在一些实施方案中,CA1、BLA和/或ACC区域的神经元可表达ChR2。除非另有说明,否则本发明包括许多类似变体。实例包括(但不限于)Chop2、ChR2-310、Chop2-310和团藻属通道视紫红质(VChR1)。欲知关于VChR1的其它细节,可参考“Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*,”*Nat Neurosci.* 2008年6月,11(6):631-3. 电子出版物,2008年4月23日,所述文献以引用的方式完全并入本文中。在其它实施中,可对其它视蛋白或光活化分子进行类似改进。例如,可对

ChR2或VChR1变体进行修饰/突变。此外,经过改进的变体可与光活化离子泵组合使用。

[0053] 如本文所用,一般使用目标细胞刺激以描述细胞性质的改进。例如,目标细胞的刺激可使得细胞膜性质发生变化,从而可使目标细胞去极化或极化。在一种具体情况下,目标细胞是神经元并且刺激可通过促进或抑制神经元产生脉冲(动作电位)来影响脉冲传输。

[0054] 欲知光活化蛋白质(例如视蛋白)的其它细节,可参考Deisseroth等标题为“Optically-Based Stimulation of Target Cells and Modifications Thereto”的PCT公布号WO 2010/056970,所述PCT公布以引用的方式完全并入本文中。

[0055] 本公开的实施方案是针对实施目标群体的兴奋性的双稳变化。这包括(但不一定限于)双突变体ChR2-C128S/D156A。已发现这种双突变体ChR2-C128S/D156A在培养的海马神经元中被充分耐受,并且在单次短暂的蓝光脉冲下保持快速阶梯样活化的必需SF0性质,并且用绿光或黄光去活化。具体来说,ChR2-C128S/D156A的活化光谱在445nm处出现峰。第二去活化峰见于390-400nm处,与590nm去活化峰相比去活化更快但不太完全。发现表达ChR2-C128S/D156A的细胞中的峰值光电流是强劲的并且与表达ChR2-D156A的细胞中的峰值光电流相当(分别为 $231.08 \pm 31.19 \text{ s.e.m}$; $n=9$ 个细胞以及 $320.96 \pm 78.26 \text{ s.e.m}$; $n=7$ 个细胞)。

[0056] 个别的经过转染和贴片夹持的神经元接着用470nm光的100毫秒脉冲活化。为确保在极长久的记录期间电流衰减将不可归因于细胞削减,用长久的590nm光脉冲以不同的间隔使各细胞去活化,以确定剩余SF0电流在各时间点的量值。惊人的是,表达ChR2-C128S/D156A的神经元产生持续的光电流,所述光电流比来自表达任一单独的单一突变体的细胞的光电流更稳定。针对I去活化/I活化之比随时间变化来拟合单指数衰减曲线揭示ChR2-C128S/D156A的自发衰减时间常数为29.3分钟,表明C128和D156突变协同地起作用来延迟ChR2的开放状态的衰减。根据对预期应用于复杂哺乳动物行为的所需改良,双突变型SF0电流的显著部分在单次光活化脉冲之后仍存在最多20分钟。

[0057] 基于这些惊人的缓慢衰减动力学,将双突变基因称为SSF0(对于稳定化阶跃函数视蛋白来说)基因。SSF0也用作活性蛋白质的简写。两种残基都可能涉及ChR2通道关闭(门控),并且两种突变都可能稳定化通道的开放状态配置

[0058] 在不受理论限制下,本公开的方面是关于发现SSF0可在光循环进展中被完全阻断,并且因此可代表光循环工程化的最大可能稳定性。例如,与ChR2C128X和ChR2-D156A相反,SSF0光循环并不显得进入其它非活性去质子化副产物,所述副产物可能在这种突变体中未达到的稍后光循环阶段分裂光循环,这又使SSF0对于活体内重复使用来说比亲本单一突变甚至更可靠。

[0059] 本公开的实施方案是针对SSF0对光的敏感性。例如,具有缓慢衰变常数的通道视紫红质有效充当光子集成者。这可能尤其适用于较敏感的侵袭性较小的光遗传学回路调节方法,经由光脉冲长度的调节对目标神经元群体仍具有容易的可滴定作用。已发现甚至在极低光强度(低至 $8 \mu\text{W mm}^{-2}$)下,可自表达SSF0的神经元获得几百微微安培的全细胞光电流,其在全部照射时间期间反应于470nm光而以单指数动力学增大。其它方面是关于以重对数图尺与活化光功率线性相关的活化时间常数的用途,所述活化时间常数指示幂律关系并且表明SSF0是纯集成者,其中以随时间变化的总光子暴露作为光电流的唯一决定因素。例如,据信光电流达到给定亚最大活化(至 τ 的时间)所需的每个膜面积的光子数目是常数,而不

论活化光功率如何。

[0060] 本公开的实例实施方案是关于杂合ChR1/VChR1嵌合体的用途,所述嵌合体根本不含ChR2序列并且来源于个别地并不充分表达的两种视蛋白基因,并且在本文中被称为C1V1。本公开的实施方案也是关于通过添加来源于Kir2.1通道的膜运输信号来改良VChR1的膜靶向。来自表达VChR1-EYFP的培养神经元的共焦图像揭示与ChR2相比的一大部分细胞内蛋白质;因此,为改良VChR1的膜靶向,我们添加来源于Kir2.1通道的膜运输信号。这种VChR1-ts-EYFP的膜靶向与VChR1-EYFP相比稍有增强;然而,从培养的表达VChR1-ts-EYFP的海马神经元记录的平均光电流仅稍大于VChR1-EYFP的平均光电流。因此,本公开的实施方案是关于通过与其它ChR的对应螺旋交换螺旋来改进的VChR1。例如,已在螺旋1和2被来自ChR1的同源片段替代的两种嵌合体中发现强劲的改良。发现无论拼接位点是在螺旋2和螺旋3之间的细胞内环(在ChR1残基Ala145处)中或在螺旋3(在ChR1残基Trp163处)内,所得嵌合体都得到强劲表达并且显示类似地增强的光电流和光谱性质。这个结果是出乎意料的,因为ChR1仅微弱表达并且不良地整合到大多数哺乳动物宿主细胞的膜中。所得杂合ChR1/VChR1嵌合体在本文中被称为C1V1。

[0061] 本公开的方面是关于培养神经元(例如海马神经元)中的C1V1表达。实验测试已显示许多惊人并适用的结果,这在后文较详细地讨论。C1V1-EYFP显示与VChR1-EYFP相比惊人的改良的平均荧光。表达C1V1的神经元中的全细胞光电流比VChR1-EYFP和VChR1-ts-EYFP的全细胞光电流大得多,并且离子选择性类似于ChR2和VChR1的离子选择性。在C1V1和YFP之间添加Kir2.1输送信号使光电流进一步增强另外41%。(C1V1-ts-EYFP平均光电流极大,比野生型(WT) VChR1大接近十倍)。平均荧光程度紧密匹配所测量的光电流(对于VChR1-EYFP、VChR1-ts-EYFP、C1V1-EYFP和C1V1-ts-EYFP,平均荧光分别为 9.3 ± 1 、 19.6 ± 3.4 、 19.8 ± 2.8 和 36.3 ± 3.8),总的体细胞荧光(测量作为整体像素密度)与不同构建体(VChR1、VChR1-ts-EYFP、C1V1、C1V1-ts-EYFP)间个别的所记录/成像细胞中的光电流大小线性相关。这表明(不受理论限制)C1V1的光电流增大是由神经元中功能表达变化引起。

[0062] 本公开的各个实施方案是关于视蛋白或具有快速衰变常数的光活化蛋白质。这种性质可能尤其适用于提供对尖峰的精确控制,例如以便在光脉冲串期间最低限度地干扰固有传导率、每个光脉冲触发单个尖峰和/或将平台电位减到最小。实验结果表明在C1V1-ts-EYFP中记录的光诱发的光电流以类似于VChR1的时间常数衰减。因此,本公开的方面是针对发色团区域中改良光循环动力学的改进、减少的不活化和/或可能的进一步红移吸收。

[0063] 一个实施方案是针对对应ChETA突变E162T,这些实验建议提供加速光循环(例如几乎3倍),(可参考Gunaydin等,Ultrafast optogenetic control,Nat Neurosci,2010,所述文献以引用的方式完全并入本文中)。惊人的是,显示这种突变使作用光谱向蓝位移至530nm,而ChR2或其它微生物视紫红质中的类似突变已引起红移。

[0064] 另一实施方案针对谷氨酸-122至苏氨酸(C1V1-E122T)的突变。实验测试显示与ChR2的46%不活化相比,C1V1-E122T仅不活化26%;另外,光谱进一步红移至546nm。

[0065] 本公开的另一实施方案针对C1V1的双突变体,包括E122T和E162T突变。实验测试已显示电流不活化甚至低于E122T突变体中,并且光循环比E162T更快。这表明个别突变的多种适用性质在双突变体中一起得到保持。

[0066] 编码光活化蛋白质的聚核苷酸

[0067] 本文所述的光活化蛋白质或视蛋白可通过本领域已知方法,如通过包含编码蛋白质的序列的聚核苷酸递送到神经元中。在一些实施方案中,聚核苷酸包含表达卡匣。在一些实施方案中,聚核苷酸是载体,如选自由以下组成的组的病毒载体:AAV载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、HSV载体以及慢病毒载体。

[0068] 例如,神经元可与包含编码可操作地连接于细胞特异性促进剂的光活化蛋白质的核酸序列的载体接触,其中所述神经元在细胞膜上表达光活化蛋白质。在一些变化形式中,细胞特异性促进剂是钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶IIa (CaMKIIa) 促进剂。在一些变化形式中,编码光可活化eNpHR3.1或eNpHR3.0的核酸序列可操作地连接于载体中的CaMKIIa促进剂。在一些变化形式中,光活化蛋白质在CA1区、BLA和/或ACC中的兴奋性谷氨酸能神经元中表达。可使用可用于基因递送的任何载体。在一些变化形式中,可使用病毒载体(如AAV、腺病毒、慢病毒、逆转录病毒)。

[0069] 在一些实施方案中,载体是重组型AAV载体。AAV载体是相对较小尺寸的DNA病毒,其可以稳定并且位点特异性的方式整合到它们感染的细胞的基因组中。它们能够感染较宽范围的细胞而不诱导对细胞生长、形态或分化的任何影响,并且它们并不显得涉及人病理中。AAV基因组已得到克隆、测序以及表征。它涵盖约4700个碱基并且在各端含有约145个碱基的反转式末端重复序列(ITR)区域,所述区域用作病毒的复制起点。基因组的其余部分分成两个携带壳体化功能的必需区域:基因组的左手部分,其含有涉及病毒复制和表达病毒基因的rep基因;以及基因组的右手部分,其含有编码病毒的衣壳蛋白的cap基因。

[0070] AAV载体可使用本领域的标准方法制备。任何血清型的腺相关病毒都适合(参见例如Blacklow, "Parvoviruses and Human Disease" J.R.Pattison编.(1988)的第165-174页;Rose, Comprehensive Virology 3:1, 1974; P.Tattersall "The Evolution of Parvovirus Taxonomy" Parvoviruses (JR Kerr, SF Cotmore, ME Bloom, RM Linden, CR Parrish编)第5-14页, Huddersfield, London, UK (2006); 以及DE Bowles, JE Rabinowitz, RJ Samulski "The Genus Dependovirus" (JR Kerr, SF Cotmore, ME Bloom, RM Linden, CR Parrish编)第15-23页, Huddersfield, London, UK (2006), 其公开内容以引用的方式整体并入本文中)。用于纯化载体的方法可见于例如标题为"Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors"的美国专利号6566118、6989264和6995006以及W0/1999/011764中,所述专利的公开内容以引用的方式整体并入本文中。制备杂合载体描述于例如PCT申请号PCT/US2005/027091中,所述PCT申请的公开内容以引用的方式整体并入本文中。来源于AAV的载体用于活体外和活体内转移基因的用途已得到描述(参见例如国际专利申请公布号91/18088和W0 93/09239;美国专利号4,797,368、6,596,535和5,139,941;以及欧洲专利号0488528中,所有这些专利都以引用的方式整体并入)。这些公布描述各种来源于AAV的构建体,其中rep和/或cap基因缺失并以目标基因替代,并且描述这些构建体用于活体外转移(到培养细胞中)或活体内转移(直接到生物体中)目标基因的用途。本发明的复制缺陷型重组型AAV可如下制备:将含有侧接两个AAV反转式末端重复序列(ITR)区域的目标核酸序列的质体,和携带AAV壳体化基因(rep和cap基因)的质体共转染到感染人辅助病毒(例如腺病毒)的细胞株中。所产生的AAV重组物接着通过标准技术纯化。

[0071] 在一些实施方案中,将用于本发明方法的载体壳体化到病毒粒子(例如AAV病毒粒

子,包括(但不限于)AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15和AAV16)中。因此,本发明包括包含任何本文所述的载体的重组型病毒粒子(因为它含有重组型聚核苷酸,所以是重组型)。产生这些粒子的方法为本领域已知并且描述于美国专利号6,596,535中。

[0072] 对于本文所述的动物细胞,应了解一种或多种载体可向神经细胞、心脏细胞或干细胞施用。如果使用一种以上载体,那么应了解它们可在同一时刻或在不同时刻向动物细胞施用。

[0073] 例如,在一些变化形式中,如下实现神经元中的C1V1视蛋白基因:产生编码C1V1-ts-EYFP的慢病毒载体以及本文讨论的各种点突变组合。接着在培养的海马神经元中表达视蛋白并且在相同刺激条件(2毫秒脉冲、542nm光、5.5mW/mm²)下记录全细胞光电流。表达C1V1、C1V1-E162T和C1V1-E122T/E162T的细胞中的光电流所有都强劲并且倾向于大于ChR2-H134R的光电流。实验还包括以下的比较:整合型体细胞YFP荧光和来自表达C1V1-E122T/E162T的细胞和表达ChR2-H134R的细胞的光电流。惊人的是,在相等荧光程度下,C1V1-E122T/E162T细胞显示光电流强于ChR2-H134R细胞。这表明C1V1与ChR2-H134R相比可具有较高的单一传导率。测试结果表明C1V1-E122T的动力学慢于C1V1-E122T/E162T的动力学,并且表达C1V1-E122T的细胞对红光(630nm)的反应强于表达双突变体的细胞。这可尤其适用于反应于红光来产生光遗传学性尖峰。

[0074] 根据本公开的各个实施方案,残留于同一微回路内的抑制性和/或兴奋性神经元得到靶向,同时引入各种光活化蛋白质(例如视蛋白)。通过独立表达的C1V1-E122T/E162T和ChR2-H134R,在CaMKIIa促进剂下,在培养的海马神经元中进行实验测试。表达C1V1-E122T/E162T的细胞反应于2毫秒绿光脉冲(560nm)而非紫光脉冲(405nm)尖峰。相反地,表达ChR2-H134R的细胞反应于2毫秒405nm光脉冲,而非2毫秒561nm光脉冲而尖峰。

[0075] 本公开的各个实施方案是关于活脑薄片内两个神经元群体的独立活化。实验测试是由20只PV::Cre小鼠的mPFC中的CaMKIIa-C1V1-E122T/E162Tts-eYFP和EF1a-DIO-ChR2-H134R-EYFP进行。在非表达PYR细胞中,由于PV细胞的直接活化,因此405nm光脉冲触发强劲并且快速的抑制性突触后电流(IPSC),而561nm光脉冲仅触发预期的自局部抑制性神经元的C1V1表达锥体细胞推动出现的长潜时多突触IPSC。

[0076] 在神经元中表达的蛋白质的光活化

[0077] 能够应用具有活化神经元中表达的光活化蛋白质的波长的光的任何装置都用来使神经元去极化和/或超极化。例如,可使用图1中描绘的光递送装置(100),所述装置用于活化离子通道和/或离子泵以影响一个或多个神经元的膜电压。如在那里所示,光递送装置(100)被配置成向脑部目标区域提供光学刺激。光递送装置(100)可包括基础(102)、连接于基础的套管导向器(cannula guide)(104),以及一根或多根经由套管导向器连接于基础的光学管道(106)。基础(102)可包括一个或多个光递送口(108),所述光递送口被定位为将光从光学管道(106)递送到目标组织区域(101),如CA1区(103)。光学管道(106)可为光学纤维,其中纤维近端连接于光学光源(未图示),并且远端和光递送口(108)连通。光学光源能够提供连续光和/或脉动光,并且可为可编程的以按照预定脉冲序列提供光。据可能所需,光递送装置(100)可具有任何数目的光学管道(106),例如1、2、3、4、5、10、15、20,等。光学管道(106)可各自载运相同或不同波长的光。所递送的光的波长在450nm和600nm之间,如

黄光或绿光。据可能所需,光递送装置(100)可具有任何数目的光递送口(108),例如1、2、3、4、5、10、15、20,等。在一些变化形式中,可能存在与光学管道相同数目的光递送口,而在其它变化形式中,可能存在不同数目的光学管道和光递送口。例如,可能存在将光输送到两个或更多个光递送口的单一光学管道。或者或另外,单一光学管道可连接于单一光递送口。套管导向器(104)可被配置成有助于固定和对准光学管道(106)与光递送口(108)。在一些实施方案中,光递送装置(100)被配置成向CA1区(103)递送双侧光以影响记忆形成和提取。光递送装置还可包括一个或多个可配置来测量神经活动的测量电极。例如,测量电极可记录以下的变化:当神经元反应于刺激时,一个或多个神经元的膜电位(例如动作电位)和/或跨膜电流。在一些变化形式中,测量电极可测量一个或多个神经元对光学刺激的电反应。测量电极可为细胞外或细胞内电极。

[0078] 影响记忆功能的方法

[0079] 如本文所述,目标组织区域(101)可包括具有如下细胞的神经组织:具有设计来改进细胞反应于光时的膜电压的光活化蛋白质的细胞。在一些变化形式中,光活化蛋白质可用来通过抑制脑部CA1、BLA和ACC区域中的神经元去极化来干扰记忆形成和/或提取。本公开的实施方案针对干扰记忆获得、重唤和/或记忆和情绪反应(如恐惧)之间的关联。在一个具体实施方案中,涉及记忆的神经回路的功能是通过活化光活化离子通道(例如使用NpHR、BR、AR,等)和/或泵(例如质子泵GtR3)来干扰。在某些实施中,这种干扰可在记忆形成期间实施。在其它实施中,这种干扰可在记忆提取之前或期间实施。这可尤其适用于涉及记忆重唤的精神或神经病症,如PTSD。根据某些实施方案,干扰可反应于为进行干扰而呈现和/或控制的记忆触发事件或其它外部刺激而触发。例如,干扰可反应于以下而提供:对个体的记忆触发,所述个体被已条件化为反应于触发。在另一情况下,个体可积极地触发干扰。例如,当经历与PTSD相关的记忆时,个体可触发干扰。本公开的其它实施方案针对促进记忆获得、重唤和/或在记忆和情绪反应之间的关联。本文所述的方法可用来确定神经元和/或神经元回路在记忆功能中的作用,和/或用来治疗与记忆损伤相关的病症。

[0080] 在一些实施方案中,本文提供的用于可逆地影响个体记忆提取或形成的方法包括向个体的海马体背侧CA1区、前扣带回皮质或基底外侧扁桃腺施用编码光活化蛋白质的聚核苷酸,其中光活化蛋白质是在海马体背侧CA1区、前扣带回皮质或基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,并且蛋白质对光起反应并能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化,从而用光活化蛋白质可逆地影响事件在个体中的记忆提取或形成。在一些实施方案中,本文提供的用于可逆地影响个体记忆提取或形成的方法包括在事件于个体中记忆提取或形成期间抑制海马体背侧CA1区、前扣带回皮质或基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元去极化,其中光活化蛋白质是在个体的海马体背侧CA1区、前扣带回皮质或基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,其中蛋白质对光起反应并且能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化。在一些实施方案中,事件是恐惧事件。

[0081] 本文提供的用于治疗个体的创伤后应激障碍的方法包括:向个体的海马体背侧CA1区、前扣带回皮质或基底外侧扁桃腺施用编码光活化蛋白质的聚核苷酸,其中光活化蛋白质是在海马体背侧CA1区、前扣带回皮质或基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,并且蛋白质对光起反应并能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化,从而用光活化蛋白质可逆地影响事件在个体中的记忆提取或形成。

[0082] 本文提供用于筛选影响记忆提取或记忆形成的药理学剂的方法,所述方法包括:
a) 在事件于非人动物中记忆提取或形成期间使海马体背侧CA1区、前扣带回皮质或基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元与药理学剂接触,其中非人动物包含在动物的海马体背侧CA1区、前扣带回皮质或基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中蛋白质对光起反应并能够在神经元被光照射时抑制神经元去极化;b) 在事件的记忆提取或记忆形成期间抑制海马体背侧CA1区、前扣带回皮质或基底外侧扁桃腺中兴奋性神经元的去极化;以及c) 确定药理学剂在存在或不存在光下是否影响记忆提取或记忆形成。

[0083] 如本文所用,“个体”是哺乳动物,包括人。哺乳动物包括(但不限于)家畜、体育动物、宠物、灵长类动物、小鼠和大鼠。个体还包括伴侣动物,包括(但不限于)狗和猫。一方面,个体是人。另一方面,个体是非人动物。如本文所用,“非人动物”包括非人哺乳动物。

[0084] 图2中描绘根据本公开实施方案控制或改进记忆功能的方法的一个实施例。时间触发事件(202)提供用于实施对记忆功能的控制的参考点。如本文所讨论,控制的时间性质可能尤其适用。尽管不限于此,但记忆触发事件(202)可与训练事件有关。例如,可将个体(例如非人动物、哺乳动物、人)引向设计来训练个体以使其反应于特定刺激的刺激。记忆触发事件(202)可为向个体引入特定刺激。在另一情况下,记忆触发事件可反应于个体的反应或作用(例如个体在经历PTSD事件的指示)。控制指令(204)确定刺激来源(206)如何向细胞群体(210)施加刺激(208)。这些控制指令可根据所需目标来确定和应用。所需目标可由例如时间属性、空间位置和/或细胞类型中一个或多个来定义。刺激(208)使得记忆功能得到改进(212)。接着可监测、观察和/或评估刺激的影响(214)。可使用监测来调节(216)控制指令(204),从而针对预定结果来细调刺激。本文讨论的各个实施方案提供可与这种用于控制和表征构成记忆功能的基础的神经回路的方法关联使用(或除这种方法以外另外使用)的其它实例。

[0085] 通过抑制CA1和ACC的神经元来影响记忆提取

[0086] 用于干扰记忆提取的方法的一种变化形式可包括抑制CA1区的兴奋性神经元(例如通过阻断或减少膜去极化,和/或通过促进膜超极化)。通过向区域施用编码通道蛋白的聚核苷酸,光活化离子通道(如eNpHR3.1或NpHR3.0)可在位于个体CA1区中的神经元上表达。在黄光(例如波长为约591nm)存在下活化eNpHR3.1或NpHR3.0离子通道。个体可具备光递送装置,如上述光递送装置(100)。光递送装置可位于个体上以使黄光能够递送到CA1神经元。在记忆(例如任何不需要的记忆,如恐惧记忆或紧张记忆)提取之后或期间,光递送装置可启动来向CA1神经元递送黄光,从而抑制它们去极化,并且干扰记忆重唤。一旦已足够干扰记忆重唤,光递送装置可去除启动。在光递送装置去除启动后,个体可重获无干扰提取记忆的能力。这种方法可用来干扰近事记忆(例如在过去小于一天内发生的事件的记忆)的重唤以及远事记忆(例如在过去一天以上、过去1周、过去2周、过去4周、过去8周或8周以上等发生的事件的记忆)的重唤。在一些变化形式中,ACC的兴奋性神经元可表达类似光活化蛋白质,并且可得到类似抑制以干扰远事记忆的提取。

[0087] 包括抑制CA1区神经元的用于干扰记忆提取的方法可用于非人动物,如小鼠中。例如,在定制的FC腔室中训练在CA1区神经元中表达eNpHR3.1或NpHR3.0的小鼠,在所述腔室中将所述小鼠引入情境A中,接着呈现音调两次,接着进行足底电击。在测试期,递送到eNpHR3.1或NpHR3.0CA1神经元的绿光干扰小鼠重唤记忆(即,恐惧记忆或紧张记忆)的能

力,如通过减少木僵(例如关联木僵)测量。在eNpHR3.1或NpHR3.0CA1神经元不暴露于光的独立测试期,小鼠能够重唤在训练期期间形成的恐惧记忆,如通过正常木僵速率来测量。在一些变化形式中,测试期可在训练期之后一天或一天以下发生,而在其它变化形式中,测试期可在训练期之后四周或四周以上发生。向小鼠的eNpHR3.1CA1神经元应用绿光可逆地抑制神经元去极化,从而干扰近事和/或远事关联恐惧记忆的重唤。从eNpHR3.1或NpHR3.0CA1神经元去除绿光提取小鼠重唤近事和/或远事关联恐惧记忆的能力。

[0088] 用于可逆地干扰远事记忆的重唤或提取的方法也可在记忆已得到重复重唤和巩固之后使用。例如,可如上所述训练具有表达eNpHR3.1或NpHR3.0的CA1神经元的小鼠。在训练期之后五周的测试期中,小鼠能够重唤在训练期间形成的记忆,然而,当eNpHR3.1或NpHR3.0CA1神经元暴露于绿光时,它们不再能重唤记忆。eNpHR3.1或NpHR3.0CA1神经元随后暴露于绿光干扰恐惧记忆的提取。在一些方法中,可如下干扰记忆重唤:在起始记忆重唤时和/或在记忆重唤期间使eNpHR3.1或NpHR3.0CA1神经元暴露于光。例如,与重唤起始(例如在测试期开始时)同时将绿光应用于eNpHR3.1或NpHR3.0CA1神经元干扰记忆重唤。当在记忆重唤期间将绿光应用于eNpHR3.1或NpHR3.0CA1神经元时(例如在测试期已开始之后某时,如在测试期中间应用光),小鼠最初重唤并且反应于恐惧记忆(依据木僵),但接着在应用光之后快速停止显示恐惧反应。这些方法可用于患有PTSD、具有表达eNpHR3.1的CA1神经元的个体中,其中光递送装置可在提取恐惧记忆的同时和/或期间启动,以便可逆地干扰和/或停止恐惧记忆的重唤。随后使光递送装置去除启动可提取个体重唤这个和其它记忆的能力。

[0089] 包括抑制ACC区域神经元的用于干扰记忆提取的方法可用于非人,如小鼠中。例如,可如上所述来训练在ACC神经元中表达eNpHR3.1的小鼠。在训练期之后四周的测试期中,递送到eNpHR3.1ACC神经元的绿光干扰小鼠重唤在训练期间形成的记忆的能力。从eNpHR3.1CA1神经元去除绿光提取小鼠提取远事恐惧记忆的能力。

[0090] 通过抑制CA海马体来影响记忆形成

[0091] 尽管抑制CA1区中的兴奋性神经元去极化(并且在一些情况下是使这些神经元超极化)可干扰记忆提取,这种抑制也可干扰记忆形成。用于干扰记忆形成的方法的一种变化形式可包括在形成记忆(如关联记忆)期间抑制CA1区神经元。如先前所述,光活化离子通道(如eNpHR3.1)可在位于个体CA1区中的神经元上表达。个体可具备光递送装置,如本文所述的光递送装置(100)。在形成记忆(例如恐惧记忆或紧张记忆)期间,光递送装置可启动来向CA1神经元递送绿光,从而抑制它们去极化并且干扰记忆形成。一旦已足够干扰记忆形成,光递送装置可去除启动。在光递送装置去除启动后,个体可重获无干扰形成记忆的能力。

[0092] 包括抑制CA1区神经元的用于干扰记忆形成的方法可用于非人动物,如小鼠中。例如,在定制的FC腔室中训练在CA1区神经元中表达eNpHR3.1的小鼠,同时将绿光递送到eNpHR3.1CA1神经元。在训练期间,将小鼠引入第一情境中,接着暴露于音调,接着进行足底电击。在不应用光的后续测试期,如通过关联木僵减少所测量,小鼠显示没有训练记忆。同一小鼠经历独立训练期,其中eNpHR3.1CA1神经元不暴露于光。小鼠接着能在后续测试期中重唤记忆。在一些变化形式中,测试期可在训练期之后一天或一天以下发生,而在其它变化形式中,测试期可在训练期之后四周发生。向小鼠的eNpHR3.1CA1神经元应用绿光可逆地抑制神经元去极化,从而干扰近事和/或远事记忆的形成。从eNpHR3.1CA1神经元去除绿光提

取小鼠形成恐惧记忆的能力。

[0093] 通过抑制基底外侧扁桃腺来影响记忆形成

[0094] 用于干扰记忆形成的方法的一些变化形式可包括在记忆形成期间将光递送到BLA中表达eNpHR3.1的神经元。如先前所述,光活化离子通道(如eNpHR3.1)可在位于个体BLA中的神经元上表达。个体可具备光递送装置,如上述光递送装置(100)。光递送装置可位于个体上以使绿光能够递送到BLA神经元。在记忆(例如恐惧记忆或紧张记忆)形成之后或期间,光递送装置可启动来向BLA神经元递送绿光,从而抑制它们去极化,并且干扰记忆形成。一旦已足够干扰记忆形成,光递送装置可去除启动。在光递送装置去除启动后,个体可重获无干扰获得记忆的能力。

[0095] 包括抑制BLA区域神经元的用于干扰记忆获得的方法可用于非人动物,如小鼠中。例如,在如上所述的恐惧条件化训练期期间,可将绿光递送到在BLA神经元中表达eNpHR3.1的小鼠。接着可测试小鼠来确定它们是否获得训练期的恐惧记忆。在训练期期间递送到BLA的绿光可干扰小鼠获得恐惧记忆或紧张记忆的能力。

[0096] 筛选修复记忆形成或提取的药物

[0097] 控制构成记忆功能的基础的神经回路可提供用于评价药理学剂对记忆提取的影响的工具。例如,抑制CA1区和/或ACC和/或BLA的表达eNpHR3.1的神经元可用来评价各种药理学剂对于提取记忆重唤的有效性。图3A中描绘用于鉴别活化CA1区和/或ACC和/或BLA中非人兴奋性神经元的去极化或激发的药理学剂的方法的一个实例。方法(300)可包括将光活化蛋白质递送到脑部CA1区和/或ACC和/或BLA(302),以及抑制CA1和/或ACC区域兴奋性神经元的去极化(303)。如上所述,抑制去极化可包括向在CA1和/或ACC区域神经元上表达的eNpHR3.1离子通道应用具有所选波长的光(例如黄色或绿色)来防止产生动作电位。其它类型的光活化通道也可表达以抑制这些兴奋细胞(如NpHR、BR、AR的变体)和质子泵(如GtR3)的去极化。来自活化eNpHR3.1离子通道的抑制的影响可通过使用松散细胞或全细胞贴片夹法来电测量(304)。在一些变化形式中,CA1和/或ACC区域兴奋细胞的电活动可使用单电极和/或多电极阵列来测量。CA1和/或ACC区域中受抑制的神经元接着可与测试药理学剂接触(306)。可类似地测量神经元的电活动(308)。可比较与测试药理学剂接触前后CA1区和/或ACC和/或BLA的兴奋性神经元的电测量值,以确定测试剂是否活化和/或提取神经元去极化(310)。必要时可重复使用方法(300)以筛选任何数目或种类的药理学剂。

[0098] 图3B中描绘用于鉴别可有效提取非人动物的记忆形成或提取的药理学剂的方法的一个实例。方法(320)可包括将光活化蛋白质递送到脑部CA1区和/或ACC和/或BLA(322),以及向在CA1和/或ACC和/或BLA区域神经元上表达的eNpHR3.1离子通道应用具有所选波长的光(例如黄色或绿色)以防止产生动作电位(323)。其它类型的光活化通道也可表达以抑制这些兴奋细胞(如NpHR、BR、AR的变体)和质子泵(如GtR3)的去极化。可测量在记忆形成或提取期间,在光存在下非人动物的反应(324)。在一些变化形式中,记忆可在训练期期间形成,在训练期期间将个体引入情境A中并使其暴露于音调,伴随足底电击,并且当引入情境A中时和/或当演奏音调时对记忆提取的反应可为木僵。CA1和/或ACC区域中受抑制的神经元接着可与测试药理学剂接触(326)。可类似地测量非人动物的反应(328)。可评价与测试药理学剂接触前后非人动物的反应,以确定在光存在下测试剂是否影响记忆形成或提取(330)。在一些变化形式中,可在记忆形成期间(例如训练期)使用方法(320)来评价药理学

剂对记忆形成的影响。还可在记忆提取期间(例如在训练期之后某时的测试期)使用方法(320)来评价药理学剂对记忆提取的影响。必要时可重复使用方法(320)以筛选任何数目或种类的药理学剂。

[0099] 可应用于所有上述方法的时间精确性的变化形式

[0100] 在上述方法的一些变化形式中,表达光活化蛋白质(例如eNpHR3.1或eNpHR3.0)的神经元的抑制可在精确时间点应用。例如,在CA1区中表达eNpHR3.1的神经元可仅在测试期间被光照射。表达eNpHR3.1的神经元的时间上精确抑制可干扰记忆重唤。在测试期间向小鼠CA1区中表达eNpHR3.1的神经元精确应用光可抑制动物的远事和/或近事恐惧记忆提取。在上述方法的其它变化形式中,表达eNpHR3.1的神经元的抑制可长时期应用。例如,在CA1区中表达eNpHR3.1的神经元可在测试期之前(例如在测试期之前30分钟或30分钟以上)被光照射。在海马体CA1区中表达eNpHR3.1的神经元的长久抑制可与CA1神经元的精确抑制不同地影响记忆提取。例如,对CA1神经元进行长久光应用(即,长久抑制)可影响近事关联恐惧重唤,但可能不影响远事关联记忆重唤。

[0101] 治疗PTSD的方法

[0102] 上述方法中一个或多个可用来治疗患有PTSD的个体。本公开的方面可用来治疗PTSD患者,其中可停止重现干扰性记忆,因为它显得通过在再巩固前后实时地或在远事恐惧记忆已提取之后实时地可逆地切断远事恐惧记忆。在一些变化形式中,用于治疗PTSD的方法可包括向个体施用编码光活化蛋白质的病毒载体。光活化蛋白质可被配置成在具有特定波长的光存在下抑制神经元去极化。这些光活化蛋白质的实例可包括NpHR、BR、AR以及GrR3。如先前所述,可将病毒载体递送到任何神经元群体或类型(例如CA1、ACC和BLA脑区的兴奋性神经元)。在重唤不需要的记忆(例如恐惧记忆或紧张记忆)期间,可抑制表达光活化蛋白质的神经元去极化,从而干扰不需要的记忆的提取。在一些变化形式中,抑制神经元去极化可包括向表达光活化蛋白质的神经元应用特定波长的光。随后(例如在不需要的记忆的重唤已被干扰之后),去除光。这可提取记忆功能以使记忆可无干扰地重唤。在PTSD治疗过程中,需要时可重复这些步骤。

[0103] 根据本公开的另一实施方案,可抑制与滥用药物有关的记忆来减少寻找药物的行为。其它实施方案是针对通过调节不同的脑区域来即刻影响认知的能力以便研究特定神经元群体在记忆过程中的作用。通过某些光活化蛋白质实现的神经元抑制和通过其它光活化实现的活化可实现构成各种脑功能和行为的基础的神经元回路的更好的时间解剖、遗传解剖和空间解剖。

[0104] 本文提供干扰记忆重唤的方法,所述方法包括:以足以干扰远事记忆提取影响的抑制的时间精确性抑制海马体回路背侧CA1的功能。在一些实施方案中,抑制步骤对记忆触发事件起反应。在一些实施方案中,抑制步骤包括活化背侧CA1海马体回路的细胞中表达的光反应性视蛋白。在一些实施方案中,抑制步骤包括通过一个或多个位于背侧CA1海马体回路附近的电极来施加电脉冲。在一些实施方案中,抑制步骤包括在邻近于背侧CA1海马体回路的位置释放药物。在一些实施方案中,远事记忆提取的影响包括对远事记忆的情绪反应。

[0105] 本文还提供干扰记忆产生的方法,所述方法包括:以足以干扰远事记忆产生的抑制的时间精确性抑制背侧CA1海马体回路的功能。在一些实施方案中,抑制步骤对记忆触发事件起反应。在一些实施方案中,抑制步骤包括活化背侧CA1海马体回路的细胞中表达的光

反应性视蛋白。在一些实施方案中,抑制步骤包括通过一个或多个位于背侧CA1海马体回路附近的电极来施加电脉冲。在一些实施方案中,抑制步骤包括在邻近于背侧CA1海马体回路的位置释放药物。在一些实施方案中,远事记忆提取的影响包括对远事记忆的情绪反应。

[0106] 本文还提供促进记忆功能的方法,所述方法包括:激发背侧CA1海马体回路的功能以促进远事记忆产生或远事记忆重唤。

[0107] 本文还提供用于治疗与远事记忆重唤相关的神经病症的方法,所述方法包括:反应于远事记忆的提取,以足以干扰远事记忆提取的影响的抑制的时间精确性抑制背侧CA1海马体回路的功能。

实施例

[0108] 下文提供根据本文公开内容的各种实验和实施例。

[0109] 在使用光遗传学方法(其开始和结束(onset and offset)要比先前方法快几个数量级)探索规定细胞类型对远事记忆的贡献中,发现在关联条件化之后甚至很多周(远到“远事”阶段),海马体CA1区中兴奋性神经元的光遗传学抑制消除了关联恐惧记忆重唤—有时当先前研究已发现海马体的无可检测影响时。未观察到这种介入对运动、焦虑或提示记忆形成的影响,并且显著的是,甚至在自由移动的行为期当中,远事关联记忆可通过CA1抑制来即刻抑制。下述实验证实先前观察结果然而为延长海马体的光遗传学抑制以匹配典型药理学时标将远事海马体依赖性转化为远事海马体独立性;光遗传学方法还证实前扣带回皮质(ACC)的远事时标重要性,并且显示海马体涉及远事重唤的ACC募集。这些发现具有广泛含意以便解释药物和病变数据、阐明临床海马体文献的迷惑性方面,并且揭露值得注意的记忆提取物力论,其中潜在的神经回路适合地改变涉及记忆的默认结构—通常取决于甚至在远事时间点的海马体,但灵活地移到按照分钟时标的替代性机制。

[0110] 各种类型的光活化蛋白质可用来控制和表征构成记忆功能的基础的神经回路。例如,NpHR变体可用来抑制神经元去极化和/或超极化。第三代eNpHR在基因和荧光团之间具有输送信号,并且已显示膜靶向改良并且光诱导性超极化增大。使用这种第三代eNpHR来扰乱海马体CA1区中的神经元以确定它们在近事和远事记忆获得和重唤中的作用。使用编码eNpHR3.1的慢病毒载体,其同框融合以在钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II α (CaMKII α)促进剂的控制下增强黄色荧光蛋白(eNpHR3.1-EYFP),对海马体中兴奋性谷氨酸能神经元具有选择性。eNpHR3.1是固有N端信号肽缺失的截断版eNpHR3.0,其在神经元中诱导的光电流和超极化方面都类似于eNpHR3.0。

[0111] 实验程序

[0112] 受试者。自Charles River获得6周到8周龄的C57BL6小鼠。以群落形式每笼圈养四至五只小鼠,将其维持在相反的12小时明/暗周期并且使其随意获取食物和水。实验方案被斯坦福大学IACUC批准并且满足国家卫生研究院实验动物护理和使用指南(National Institutes of Health guide for the Care and Use of Laboratory Animals)的准则。

[0113] 病毒制备。如先前所述(Gradinaru等,2010;Zhang等,2007)制备用于活体内注射的CaMKII α -eNpHR3.1-EYFP慢病毒。如下构建腺相关病毒(AAV)CaMKII α -eNpHR3.0-EYFP质体:使用BamHI和EcoRI限制位点将eNpHR3.0-EYFP克隆到携带CaMKII α 促进剂的AAV骨架中。用AAV5鞘蛋白对重组型AAV载体进行血清分型,并且由北卡罗来纳大学(University of

North Carolina)的Vector Core包装;效价是 2×10^{12} 个粒子/毫升。AAV CaMKII α ::eNpHR3.0和Lenti CaMKII α ::eNpHR3.1的图可在www.optogenetics.org在线获得。

[0114] 立体定向病毒注射、套管/插入线植入和光递送。用异氟烷使小鼠麻醉,将头放在立体定向设备(Kopf Instruments,Tujunga,CA;Leica立体显微镜)中。涂覆眼用软膏来防止眼睛干燥。进行中线头皮切开,接着进行小颅骨切开术,并且使用10 μ l注射器和细的34号金属针(World Precision Instruments,Sarasota,FL)递送病毒。由注射泵(WPI)控制注射体积和流动速率(1 μ l,0.1 μ l/min)。在注射之后,将针再留在那里5分钟,接着缓慢抽出。为进行CA1光遗传学抑制,将2 μ l浓缩的携带CaMKII α ::eNpHR3.1-EYFP的慢病毒微量注射到左右成年海马体的CA1中的两个位点(1微升/位点)。位点一:前后(AP),距前囟-1.5mm,中间外侧(ML), $\pm$ 1mm,背腹(DV)-1.5;位点二:AP,-2.5mm,ML, $\pm$ 2mm,DV-1.5mm。接着将双侧引导套管(中心到中心2.5mm;PlasticsOne,Roanoke,VA)放在CA1上方0.5mm(AP,-1.94mm,ML, $\pm$ 1.25mm,DV-1mm),并且使用牙科粘固粉(dental cement)(C&B环氧树脂类粘合剂(C&B metabond),Parkell,Edgewood,NY)固定于颅骨。用Vetbond组织粘着剂背部胶合皮肤。将动物保留在加热板上直到它从麻醉剂中恢复为止。在手术程序开始时皮下给予丁丙诺啡(Buprenorphine)(0.03mg/kg)以将不适减到最小。为抑制神经元活动,通过穿插引导套管的两个300 μ m厚的具有0.5mm突出物的光学纤维(Thorlabs,Newton,NJ)双侧递送绿光(561nm,描述激光等)。对照小鼠未感染eNpHR3.1,但仍植有向CA1递送光的套管,或感染eNpHR3.1并且有植入,但连接至在脑表面终止光递送的假光纤。因此,对照小鼠经历和与激光之光递送相关的实验小鼠相同的视觉提示和关联信息。为进行基底外侧扁桃腺(BLA)光遗传学抑制,将1.5 μ l AAV5CaMKII α ::eNpHR3.0-EYFP微量注射到左右BLA中(AP,-1.5mm,ML, $\pm$ 3.47mm,DV-5mm)。接着将插入线(金属套圈,直径2.5mm,厚200 μ m,长5mm,劈开裸光学纤维;Doric透镜公司,Quebec,Canada)放在各BLA中(AP,-1.5mm,ML, $\pm$ 3.47mm,DV-4.8mm),并且使用牙科粘固粉固定于颅骨。使用连接性塑料套通过两个连接于插入线的200 μ m厚的光学纤维(Doric透镜)来双侧递送绿光。为进行前扣带回皮质(ACC)光遗传学抑制,将1.0 μ l AAV5CaMKII α ::eNpHR3.0-EYFP微量注射到左右ACC中(AP,+1mm,ML, $\pm$ 0.35mm,DV-2.2mm)。接着将插入线(Doric透镜公司)以单侧方式放在一个ACC上方,尽可能靠近中线(AP,+1mm,ML, $\pm$ 0.2mm,DV-1.25mm),并且使用牙科粘固粉固定于颅骨。通过连接于插入线的200 μ m厚的光学纤维(Doric透镜)来递送绿光。为进行嗅球(OB)光遗传学抑制,将1.0 μ l AAV5CaMKII α ::eNpHR3.0-EYFP微量注射到左右OB中(AP,+4.5mm,ML, $\pm$ 0.75mm,DV-3.25mm和-2mm)。接着将插入线(Doric透镜公司)以单侧方式放在一个OB上方,尽可能靠近中线(AP,+4.5mm,ML, $\pm$ 0.15mm,DV-1.4mm),并且使用牙科粘固粉固定于颅骨。通过连接于插入线的200 μ m厚的光学纤维(Doric透镜)来递送绿光。

[0115] 免疫组织化学。为测量传播性并测定CaMKII α 阳性神经元中eNpHR-EYFP表达的特异性,用克他明(ketamine)/甲苯噻嗪(xylazine)使小鼠麻醉,并且依次用冷的PBS、溶解于磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH 7.4)中的4%多聚甲醛(PFA)经贲门灌注。去除脑部并在4 $^{\circ}$ C下后固定于4%PFA的PBS溶液中3小时,接着在30%蔗糖的PBS溶液中平衡。在冷冻切片机(Leica)上切割40 μ m厚的冠状切面,并且在4 $^{\circ}$ C下存储于低温保护剂(25%甘油、30%乙二醇,在PBS)中,直到被处理用于免疫组织化学为止。在PBS中洗涤自由浮动的切片,接着在0.2%氘核X-100(Tx100)和2%正常驴血清(NDS)中孵育30分钟。薄片与含一抗的2%NDS(小

鼠抗CaMKII α 1:500, Abcam, Cambridge, MA; 兔抗GABA 1:500, Millipore, Billerica, MA; 兔抗c-Fos 1:500, EMD Darmstadt, Germany) 一起孵育隔夜。接着以PBS洗涤切片并在室温下与二抗(与Cy3缀合的驴抗小鼠、与Cy3或Cy5共轭的驴抗兔, 所有都为1:1000, Jackson Laboratories, West grove, PA) 一起孵育2小时。接着洗涤薄片, 与DAPI (1:50,000) 一起孵育20分钟, 再次洗涤, 并安装于具有PVA-Dabco (Sigma) 的载片上。在使用5X或10X空气物镜, 或40X油浸物镜的扫描激光显微镜上获得共焦荧光图像。为确定病毒转导速率, 我们计算每40X区域(也具有eNpHR-EYFP阳性)的CaMKII α 免疫活动神经元的百分比。

[0116] 活体内光极记录。如先前所述(Gradinaru等, 2007), 使用由与光学纤维(200 μ m核心直径, 0.2N.A.) 紧密捆扎的细胞外钨电极(1M Ω , 约125 μ m) 组成的光极在CA1中同时进行光学刺激和电记录, 其中电极尖端突出为稍超过纤维末端(约0.4mm) 以确保照射所记录的神经元。用光极进行记录, 所述光极最初位于CA1边界(AP, -1.94mm; ML, 1.4mm; DV, -1.1) 并且以0.1mm增量逐渐降低。光学纤维耦接至473nm固态激光二极管, 从200 μ m纤维有约20mW的输出。在用稀释于PBS中的克他明/甲苯噻嗪混合物(克他明, 80mg/kg; 甲苯噻嗪, 15-20mg/kg) 麻醉的小鼠中进行单一单元记录。记录信号并且使用1800微电极AC放大器在300Hz低/5kHz高下带通过滤。

[0117] 恐惧条件化范例中学习和记忆的测量。恐惧条件化设备由正方形条件化笼(18 $\times$ 18 $\times$ 30cm) 组成, 其中格形地面以线连接至电击产生器和扰频器, 周围是隔音室(acoustic chamber) (Coulbourn instruments, PA, USA.)。改进所述设备以实现在训练和/或测试期间进行光递送。为诱导恐惧条件化, 将小鼠放在笼中120秒, 接着发出纯音(2.9kHz) 持续20秒, 接着是2秒的足底电击(短期记忆为0.5mA, 长期记忆为1mA)。接着重复这个程序, 并且在递送第二次电击之后30秒使小鼠返回它们的收容笼(home cage) 中。通过连续测量木僵(完全不动)(支配性行为恐惧反应) 来评估恐惧条件化(Fanselow, 2000)。在整个测试试验中由不知治疗组的有经验实验者连续地测量木僵。为测试关联恐惧条件化, 将小鼠放在原始条件化笼中, 并且测量木僵5分钟。为测试听觉提示恐惧条件化, 将小鼠放在不同情境一地面光滑的金字塔形笼子中。作为新环境影响的对照, 在这个新笼中测量木僵2.5分钟, 接着发出2.9kHz音调持续2.5分钟, 在此期间测量条件化的木僵。在不同实验中, 这个基本范例是在可变条件下应用: 在第一实验(图5) 中, 如下训练并测试小鼠: 第1天-在连续561nm光的施用下(光打开) 训练。第2天-在不施用光下(光关闭) 进行关联测试和提示测试(分开2小时)。第3天-训练, 光关闭。第4天-测试, 光关闭。第5天-关联测试和提示测试, 光打开。在第一远事记忆实验(图6A) 中: 第1天-训练, 光关闭。第29天-关联测试和提示测试, 光打开。第30天-测试, 光关闭。在第二远事记忆实验(图6C) 中: 第1天-训练, 光关闭。第64天-关联测试, 光打开。在第三实验(图8) 中: 第1天-训练, 光关闭。第36天-测试, 光关闭。第37天-测试, 光打开。第38天-测试, 3分钟光关闭, 接着为3分钟光打开。

[0118] 在BLA实验(图5H-I) 中, 第1天在光打开下训练小鼠, 并且第2天在光关闭下测试关联和提示恐惧。在ACC(图10A-B) 和OB实验中, 第1天在光关闭下训练小鼠, 第2天在光打开下测试小鼠, 接着第29天在光打开下测试小鼠。对于长久曝光(图7A、B、10C), 使光学纤维穿过条件化笼进入具有垫草的规则圈养笼中, 并且在这个笼中递送光30分钟。接着将小鼠放在条件化笼中测试五分钟, 期间不中断地继续递送光。通过Student's t检验或双向ANOVA(2-way ANOVA), 接着通过事后检验(post-hoc test) (适用时) 来分析关联和提示条件化测试

的结果。

[0119] 药物递送。对于药理学实验(图6D-E),在小鼠CA1上方植入双套管。套管、手术程序和位置与光递送实验中相同。如Kitamura等(Kitamura等,2009)所述,以1 μ l的体积,通过比引导套管长0.5mm的28号不锈钢内部套管(PlasticsOne)来输注TTX(Sigma,20 μ M)和CNQX(Tocris Bioscience,Ellisville,MO;3mM)或盐水。内部套管通过PE20管连接至微注射器泵(Harvard Apparatus,Holliston,MA)。在200nl/min的恒定速率下施用溶液,并且在注射结束之后2分钟去除注射套管以避免从引导套管溢出。

[0120] 旷场测试(Open field test)。旷场测试是在开放的塑料场地(50cm长 $\times$ 50cm宽 $\times$ 40cm深)进行。将小鼠个别地放在腔室中心并且允许其自由探索3分钟。使用自动视频跟踪系统(Bioobserve,Bonn,Germany)来测量区域中心和周边的活动性。在中心的时间的百分比定义为在旷场的中心35 $\times$ 35cm区域中所待的总时间的百分比。

[0121] eNpHR3.1对诱发的尖峰连续抑制的电生理学测量。来自长久曝光实验的四只小鼠如上所述得到注射、经受行为测试,接着被处死和切薄片以用于生理学。如下制备含有背侧CA1的冠状薄片:经贲门灌注冰冷的蔗糖溶液,所述蔗糖溶液含有(mM):26NaHCO₃、2.5KCl、1.25NaH₂PO₄、10MgSO₄H₂O、5CaCl₂H₂O、11葡萄糖和234蔗糖,随后在同一冰冷的蔗糖溶液中切割300微米薄片。在恒定灌注aCSF下进行电生理学记录,所述aCSF含有(mM):126NaCl、26NaHCO₃、2.5KCl、1.25NaH₂PO₄、1MgCl₂、2CaCl₂和10葡萄糖。所有记录都在32 $^{\circ}$ C下进行。贴片电极(尖端电阻=2-6M Ω)填充有(mM):130葡萄糖酸钾、10KCl、10Hepes、10EGTA和2MgCl₂(用KOH将pH值调节至7.3)。串联电阻通常是10-20M Ω ,并且如果它超过30M Ω ,那么停止实验。针对7mV的测量液接电位来校正膜电位。通过注射在10Hz下在200pA范围内的电流来诱导动作电位。使用通过531 $\pm$ 20nm滤波器的X-Cite120W卤素光源以及40 $\times$ /0.8NA水物镜在7mW/mm²下递送用于活化eNpHR3.1的光。

[0122] 培养神经元中eNpHR3.1和eNpHR3.0之间的电生理学比较。海马培养物:自P0Sprague-Dawley大鼠幼崽制备一级培养海马神经元。分离CA1和CA3区域,用0.4mg/ml木瓜酶(Worthington,Lakewood,NJ)消化,并且以65,000个/厘米²的密度接种于预涂有1:30Matrigel(Beckton Dickinson Labware,Bedford,MA)的玻璃盖玻片上。将培养物维持在含Neurobasal-A培养基(Invitrogen Carlsbad,CA)的5%CO₂潮湿孵育箱中,所述Neurobasal-A培养基含有1.25%FBS(Hyclone,Logan,UT)、4%B-27补充物(GIBCO,Grand Island,NY)、2mM Glutamax(GIBCO)以及FUDR(2mg/ml,Sigma)。

[0123] 磷酸钙转染。使6-10div海马神经元在24孔板中以65,000个细胞/孔生长。各孔的DNA/CaCl₂混合物:1.5-3 μ g DNA(QIAGEN无内毒素制剂)+1.875 μ l 2M CaCl₂(最终Ca²⁺浓度250mM)于总共15 μ l H₂O中。向DNA/CaCl₂中添加15 μ l 2X HEPES缓冲盐水(pH 7.05),并且通过移液来充分混合最终体积。在室温下20分钟之后,将30 μ l DNA/CaCl₂/HBS混合物滴入各孔(其中生长培养基已暂时去除并且以400 μ l温MEM替代)中并且使转染在37 $^{\circ}$ C下进行45-60分钟。接着以3 $\times$ 1mL温MEM洗涤各孔并且替换生长培养基。一般在20-24小时内观察到视蛋白表达。

[0124] 电生理学。如先前所述进行全细胞贴片夹记录(细胞内溶液:129mM葡萄糖酸钾、10mM HEPES、10mM KCl、4mM MgATP、0.3mM Na₃GTP滴定至pH 7.2;细胞外Tyrode:125mM NaCl、2mM KCl、3mM CaCl₂、1mM MgCl₂、30mM葡萄糖以及25mM HEPES(滴定至pH 7.3))。对于电压夹记

录,将细胞保持在 -70mV 。从300W DG-4灯(Sutter Instruments,Novato,CA)通过593/40nm滤波器(Semrock,Rochester,NY)和Leica 40X/0.8NA水物镜来递送光;样本处的光功率是 $3\text{mW}/\text{mm}^2$ 。全细胞贴片夹数据是来自培养的海马神经元,所述培养的海马神经元用慢病毒eNpHR3.0和enpHR3.1转染或转导并且被允许表达一周。表达是由人CaMKII α 促进剂推动并且通过与EYFP融合来可视化。

[0125] 通过cFos染色进行神经元活化成像。在条件化(无音调呈现,以便仅诱导情境的恐惧)期间施用光来训练YFP对照物和eNpHR3.1小鼠,并且90分钟后处死以测试c-Fos含量(在上文免疫组织化学部分中详细描述)。将两个其它组的未训练对照物和eNpHR3.1小鼠从它们的收容笼处死。对于远事记忆,YFP对照物和eNpHR3.1小鼠在没有光下被恐惧条件化,28天后暴露于具有光的条件化情境,并且之后90分钟被处死以测试cFos含量。在这个时间点的对照组是经过训练的对照物和eNpHR3.1小鼠,接着在28天后将其从它们的收容笼处死而不再暴露于条件化情境。

[0126] 结果

[0127] 背侧CA1中的兴奋性神经元的特异性光遗传学抑制减少神经元活动。发现立体定向递送CaMKII α ::eNpHR3.1载体引起CA1特异性表达(图4A)。eNpHR3.1是固有N端信号肽缺失的截断版eNpHR3.0,其具有对膜电位相当的影响。eNpHR3.1靶向于神经元膜,并且在体细胞周围表达,以及在CA1神经元的顶树突和底树突中表达(图4B)。在经过转染的区域内,94%(458/486细胞,来自3只小鼠)CaMKII α 细胞表达eNpHR3.1,并且促进剂提供完整特异性;所有eNpHR3.1-EYFP都具有CaMKII α 阳性(图4C)。eNpHR3.1蛋白在CA1中表达,但在这些表达条件下不在其它海马子区域、注射部位上方的顶骨皮质、丘脑或松果体缰(habenula)中表达。在表达位点上方可见套管轨道(在前囟 -1.94)。感染体积覆盖大部分背侧CA1($0.875\pm 0.05\text{mm}^3$;N=12只小鼠)。

[0128] 为验证eNpHR3.1对CA1神经元活动的生理作用,对麻醉小鼠中的CA1神经元进行‘光极’记录(使用耦接至光学纤维电缆的细胞外电极同时进行光学刺激和电记录)(图4D左边),并且实验证实连续561nm照射兴奋性CA1神经元以在时间上精确并可逆的方式,在不影响尖峰幅度下活体内强力抑制尖峰(图4D)。561nm照射这些小鼠的CA1神经元引起尖峰频率可逆、显著地减小(在施用光之前、之中和之后分别为 $4.93\pm 1.6\text{Hz}$ 、 $1.31\pm 0.15\text{Hz}$ 和 $6.45\pm 2.4\text{Hz}$,自2只小鼠在15条迹线中, $P<0.02$),而不影响平均尖峰幅度(在光之前、之中和之后分别为 $33.55\pm 4.94\mu\text{V}$ 、 $29.20\pm 4.4\mu\text{V}$ 和 $33.32\pm 5.45\mu\text{V}$)。展示了代表性光极记录迹线、以及平均频率和幅度(平均值 $\pm$ SEM)。

[0129] 实时CA1光遗传学抑制阻断关联恐惧获得和提取。海马体涉及于关联恐惧条件化是基于这个结构的身体、药理学和基因病变,其中病变和测试之间的间隔介于几十分钟到若干周的范围(Anagnostaras等,1999;Kim和Fanselow,1992;Kitamura等,2009;Shimizu等,2000;Wiltgen等,2010),这可允许相关神经回路内的改适和补偿。如果CA1的实时光遗传学抑制可调节记忆形成,那么经由两个穿插双套管系统的光学纤维向第一测试递送双侧连续绿(561nm)光,靶向定制的FC腔室中自由移动小鼠的背侧CA1(图5A)。将光递送到所有小鼠,并且伴随有eNpHR3.1而非对照小鼠(它们没被感染,但植有套管并接收光进入CA1中,或受感染并有植入(与不会延伸到脑中的假光纤连接)的小鼠)的CA1抑制。在恐惧条件化训练期间,在连续双侧561nm光递送下,将小鼠引入情境A中,接着呈现音调两次,接着进行足

底电击,并且稍后在没有光下测试小鼠的记忆24小时。接着于次日在不存在光学抑制下评估恐惧记忆。在训练期间的背侧CA1光遗传学抑制完全防止关联恐惧获得,eNpHR3.1小鼠($n=5$)相对于对照物($n=4$)($39\pm5.4\%$ 相对于 $7.6\pm4.3\%$ 木僵;平均值 $\pm$ SEM, $P<0.005$ (图5B,左边)。为测试光遗传学抑制的影响是否可逆,接着在不施用光的同一情境中再训练所有小鼠,并且于次日再次进行测试;实际上,当在训练期间未施用光时,eNpHR3.1小鼠显示完整关联记忆($64.6\pm6.6\%$ 相对于 $49.7\pm11.7\%$ 木僵; $P>0.5$) (图5B,中间)。

[0130] 接着,测试背侧CA1光遗传学抑制是否也可干扰记忆重唤。为此,测试相同小鼠,这次在重唤期间有光递送,并且发现前一天存在的记忆在照射下变得不可重唤(图5B,右边; $42.6\pm10.1\%$ 相对于 $5.94\pm4.1\%$ 木僵, $P<0.01$)。这些实验支持以下的先前理解:通过直接显示CA1兴奋细胞在这些过程中的实时重要性,需要海马体以便获得和重唤近事关联恐惧记忆。为验证这些影响对于关联恐惧记忆而非恐惧获得和恐惧表达机制特定,一般来说,在小鼠的音调记忆的不同情境中测试相同小鼠;与对照物($n=4$)相比,eNpHR3.1小鼠($n=5$) 在训练期间在CA1光抑制之后显示完整的听觉提示恐惧记忆获得(图5C,左边),以及在测试期间在照射下显示完整的提示恐惧重唤(图5C,右边)。这些发现证明在仅影响海马体依赖性任务中光遗传学操作的功能特异性。

[0131] 为进一步验证光遗传学系统,进行许多其它对照实验。因为空间探索对于关联恐惧获得是重要的(McHugh和Tonegawa,2007),所以测量在训练期间在光刺激下条件化室内的探索时间,并且发现在表达eNpHR3.1的动物($n=5$)和对照动物($n=5$;图5D)之间无差异。CA1光遗传学抑制对新环境探索也没有影响。为验证CA1光遗传学抑制不具有抗焦虑作用,在施用光期间对小鼠进行旷场探索测试;在表达eNpHR3.1的小鼠($n=6$)和对照小鼠($n=4$;图5G; $23.8\pm2.76\%$ 相对于 $20.46\pm5.97\%$, $P>0.5$)之间未发现通路长度(图5E;eNpHR3.1和对照物分别为 $564\pm9\text{cm}$ 和 $618\pm114\text{cm}$)、速度(图5F;eNpHR3.1和对照物分别为 $3.3\pm0.1\text{cm/sec}$ 相对于 $3.43\pm0.6\text{cm/sec}$)或在区域中心所待的时间百分比(其用作焦虑相关行为的征兆)有差异。

[0132] 最终,在小鼠基底外侧扁桃腺(BLA;图5H)而非海马体中进行双侧注射并且发现与对照物($n=9$)相比,在eNpHR3.0($n=4$)小鼠中,可能在光遗传学上抑制关联(图5I; $65.5\pm7.2\%$ 相对于 $9.6\pm5.5\%$; $p<0.001$)和听觉提示FC获得(图5I; $69.5\pm9.6\%$ 相对于 $24.5\pm13\%$ 木僵; $P<0.05$),如从以下先前发现所预期:获得恐惧本身和表达近事和远事恐惧取决于扁桃腺(Han等,2009;Johansen等,2010;Killcross等,1997;LeDoux,2000;Lee等,2006;Maren and Quirk,2004)。这个发现群集一起证实实时、快速、细胞类型特异性、可逆的光遗传学系统的有效性,并且通过直接证明海马体在获得和重唤中的实时作用来支持记忆文献中的大量先前发现。

[0133] CA1光遗传学抑制可逆地干扰远事恐惧记忆重唤。探索海马体在远事记忆重唤中的作用。训练如前具有关联FC的一组小鼠并且在4周后测试受试者(图6A),远到远事阶段,此时预期无海马体涉及。惊人的是,发现在重唤期间的CA1抑制完全阻断远事恐惧记忆($P<0.0001$;对照物 $n=14$, $69.8\pm5.3\%$ 木僵eNpHR3.1 $n=6$, $14\pm6.4\%$ 木僵)。这种对重唤的干扰是可逆的;当次日在没有照射下再测试相同小鼠时,对照物中完全表达恐惧记忆(图6A; $52.45\pm6.0\%$ 相对于 $45.18\pm11.5\%$ 木僵; $P>0.5$)。此外,在提示测试期间在照射下,eNpHR3.1小鼠显示完整的远事听觉提示恐惧记忆重唤(图6B;对照物 $n=14$, $22.3\pm6.8\%$,

eNpHR3.1n=6, 11.8±3.5% 木僵, 在新情境中; 以及对音调72.4±8.4% 相对于58.77±7.9% 木僵; P>0.5), 从而进一步证明恐惧表达机制保持完整。为测试甚至在长得多的时间间隔下海马体是否仍将涉及于关联恐惧重唤, 训练另一小鼠群体并且在关联FC之后9周测试这个群组。发现甚至在这个极长间隔之后, 重唤期间的CA1抑制阻断远事恐惧记忆, 并且从未预先诱发(图6C; P<0.005; 对照物n=9, 31.8±3.8% 木僵 eNpHR3.1n=6, 11.3±3.6% 木僵)。

[0134] 这些结果指出海马体正在涉及于远事关联恐惧记忆中, 表明完整的海马体仍是记忆迹线的默认启动者。它们和基于对海马体的精致并开拓性的身体、药理学或基因病变的盛行理论形成对比, 其中病变和重唤测试之间的间隔介于几十分钟到若干周的范围内(Anagnostaras等, 1999; Kim and Fanselow, 1992; Kitamura等, 2009; Shimizu等, 2000; Wiltgen等, 2010)。实际上, 如先前所报道(Kitamura等, 2009), 实验使用TTX和CNQX来显示海马体的药理学抑制, 当使用FC方案时, 仅干扰近事(图6D; 盐水n=5, 56.86±1.9% 木僵; TTX+CNQX n=4, 26.05±10.23% 木僵; P<0.05) 而非远事(图6E; 盐水n=8, 93.93±2.54% 木僵; TTX+CNQX n=9, 83.8±4.4% 木僵; P>0.05) 恐惧重唤, 证实了先前结果。因此, 通过不允许表达补偿机制, 光遗传学的速度和特异性可实际上允许测试细胞和回路当用于作出行为的动物中时的起因性作用。接着明确测试这个假设。

[0135] 精确但不长久的CA1光遗传学抑制阻断远事关联恐惧重唤。为测试时间精确性是造成光遗传学发现和药理学发现之间差异的重要因素的假设, 在限于如前测试持续时间的照射下(图7A“精确”)或在测试之前长久照射30分钟以模拟较慢介入并且允许假定补偿机制的时间得到预定下(图7A“长久”)重复远事光遗传学实验。精确光遗传学抑制显著抑制远事记忆, 而长久抑制对远事记忆提取不具有可检测的影响(图7A)。此外, 当次日在精确施用光(仅在测试期间)下再测试长久组的小鼠时, 相同小鼠显示恐惧重唤被抑制(图7A右边)。换句话说, 仅当在测试期间精确施用光(精确组, 对照物n=4, 72.65±11.5% 木僵, eNpHR3.1n=8, 26.9±10.4% 木僵; P<0.01)时, 而非当在测试之前以及测试期间连续地打开光30分钟(长久组, 中间, 对照物n=3, 70.13±12.2% 木僵, eNpHR3.1n=4, 67.7±5.6% 木僵; P>0.05)时, CA1光遗传学抑制防止28天前获得的记忆的远事恐惧重唤。当次日仅在测试期间有光下再测试长久组小鼠时, 它们的重唤被干扰(长久组, 左边, 55.5±8.5% 相对于27.6±8.6% 木僵; P<0.05)。

[0136] 为验证这些结果, 进行行为控制和生理控制。首次, 证实长久eNpHR3.1介导性CA1抑制, 其对远事记忆没有影响, 仍可阻断近事记忆。为了那个目的, 次日在测试之前以及接着在测试期间长久照射30分钟下训练和测试新一组小鼠。发现长久光遗传学抑制显著抑制近事恐惧记忆重唤(图7B; 对照物n=7, 32.2±10.6% 木僵, eNpHR3.1n=3, 4±2.6% 木僵; P<0.05), 类似于药理学作用(图6D)。第二, 进行全细胞贴片夹记录(在从图4A中的长久组制备的薄片), 所述记录揭示eNpHR3.1抑制尖峰的能力在整个30分钟记录时期是稳定的, 这已被预期到(Gradinaru等, 2010), 并且完全可逆(图7C)。切片1(抑制开始)、2(在连续抑制期间)以及3(抑制结束并且恢复)的详细迹线呈现于左下方。呈现了在光之前、在施用光期间(光打开5分钟和30分钟之后)成功诱发的尖峰以及在光关闭之后恢复的平均百分比(右下方; n=4只小鼠, 10个细胞)。

[0137] CA1光遗传学抑制干扰进行中的恐惧重唤。训练另一小鼠群体并且在关联FC之后5

周在远事光打开和光关闭重唤探针顺序相反下测试群组,首次验证了记忆迹线的持续(在测试期间没有光,如所预期在eNpHR3.1和对照组中观察到类似性能;图8左边;对照物 $n=8$, $79.0 \pm 8.9\%$ 木僵;eNpHR3.1 $n=6$, $67.8 \pm 12.1\%$ 木僵; $P>0.5$)。次日,在照射下测试相同小鼠,并且eNpHR3.1组未能重唤关联记忆(图8左边; $77.2 \pm 4.3\%$ 相对于 $12.8 \pm 4.4\%$ 木僵; $P<0.0001$)。这种影响又是完全可逆的,因为在次日,当在没有光递送下测试时,eNpHR3.1小鼠显示完整的关联记忆(图8右边; $61.5 \pm 6.7\%$ 相对于 $58.3 \pm 3.5\%$ 木僵; $P>0.5$)。最重要的是,在eNpHR3.1中,在这期间一旦光再次递送到CA1,在小鼠已重唤厌恶的情境并表达恐惧之后,就即刻停止恐惧反应(图8右边, $65.2 \pm 6.9\%$ 相对于 $15.9 \pm 5.2\%$ 木僵; $P<0.001$),而在对照动物中并非如此。

[0138] 这些数据一起可统一某些不同的发现,通过揭示远事记忆迹线不仅存储于海马体中(根据先前报道,从得到足够时间来补偿海马不活化以后,记忆迹线仍可由其它结构提取),而且同时揭示以下惊人的发现而立刻支持先前工作:完整的海马体可为远事记忆迹线的默认启动者并且在整个重唤期积极参与它的维持。

[0139] 在远事重唤期间由海马体控制的回路活动的全脑映射(Brain-wide mapping)。立早基因产物(例如zif268和c-Fos)的表达以及神经活动的其它全局测量的先前研究已表明从近事记忆过渡到远事记忆可伴随有海马活动减小和新皮质活动增大(在ACC和前额叶皮质中;Bontempi等,1999;Frankland等,2004;Hall等,2001;Maviel等,2004)。为使这种活动映射方法延伸到CA1光遗传学控制的背景中,在训练或远事重唤期间递送eNpHR3.1介导性抑制,并且在整个脑部评估立早基因产物c-Fos的诱导。在光递送下将小鼠恐惧条件化,并且在训练之后90分钟采集脑部(图9A)。针对c-Fos和DAPI将脑部薄片染色(图9B)。展示YFP对照物和eNpHR3.1的表达。在图9C中由白色正方形标记获得这些图像的CA1区。在训练之后,与经过训练的对照动物相比,表达eNpHR3.1的小鼠显示c-Fos表达显著减小,尤其是在CA1中(图9C-D; $n=2$ 至4只小鼠,每组6至15片薄片; $P<0.01$),但显示BLA活动等于经过训练的对照物(图9C-D; $p<0.0001$),这揭示在训练期间恐惧回路的预期的海马体独立性参与。请注意,(900)所提及的图9D、9G和9H的条形图和线是“无对照物”组的数据,(902)是“无NpHR”组的数据,(904)是“对照恐惧”组的数据,并且(906)是“NpHR恐惧”组的数据。在这个时间点未观察到ACC活动程度有显著变化。展示CA1、ACC和BLA的代表性图像。由DAPI核染色展示解剖结构,并且用虚线标记扁桃腺的边缘。白色定标线条:150 μm 。

[0140] 将另一组小鼠条件化,接着在条件化之后28天在存在或不存在CA1光遗传学抑制下再暴露于情境;如前所述,表达eNpHR3.1的小鼠显示远事重唤受损。90分钟后,采集脑部并且针对c-Fos染色(图9E)以在这个遥远时间点在海马体控制下捕捉假定的记忆相关全脑活动模式。有趣的是,在远事重唤之后,在对照物而非eNpHR3.1小鼠中观察到CA1c-Fos较小,但显著增大(图9F-G; $P<0.005$)。展示在远事记忆之后的代表性CA1、ACC和BLA图像。白色定标线条:150 μm 。这个CA1细胞群体显得有原因地涉及于募集全脑远事记忆相关活动中,因为在对照动物中观察到在这个遥远时间点的ACC活动增大($P<0.0001$) 在eNpHR3.1/CA1受抑制的小鼠中减小($P<0.0001$)。甚至更惊人的是,在对照小鼠(其识别情境并且表达恐惧)中,而非在CA1受抑制的eNpHR3.1小鼠(其此外被发现不能记得情境;图9F-G; $P<0.0001$)中观察到BLA中的活化细胞群体($P<0.0001$)。如图9G中所描绘,在条件化之后28天的远事重唤使得对照小鼠中的CA1c-Fos表达较小但显著增大,并且ACC和BLA中的活动程度高度提高。与对

照物相比,在暴露于情境期间的光抑制完全阻断CA1活动 ($P<0.05$),并且显著减小ACC和BLA活动。

[0141] 其它观察结果指出在遥远时间点这个CA1募集群体的特异性。表达eNpHR3.1的小鼠显示等于对照物的前额叶皮质活动提高的前额叶皮质活动提高,并且在任何组都没有观察到顶骨皮质活动程度有显著变化。相反地,如上所述,ACC中的活动程度仅在远事记忆中显著募集,并且在eNpHR3.1介导性CA1抑制的背景中达较小程度(图9H中间),这也和先前报道一致(Bontempi等,1999;Frankland等,2004;Hall等,2001;Maviel等,2004)。图9H描绘在条件化(第0天)和远事重唤(第28天)之间脑部活动的全局模式。在对照 ($P<0.005$) 小鼠中,从第0天到第28天,CA1中的活动程度显著降低。在对照物 ($P<0.0001$) 和eNpHR3.1 ($P<0.001$) 小鼠中,从第0天到第28天,ACC中的活动程度都显著提高。在对照物 ($P<0.001$) 中而非在eNpHR3.1小鼠中,BLA中的活动程度显著提高。这些数据一起指出这个小的CA1神经元群体在组织与远事关联记忆相关的全脑活动模式中的作用。

[0142] ACC的光遗传学抑制会抑制远事而非近事关联记忆。因为发现在远事关联记忆期间活跃的CA1神经元群体有原因地涉及于如上所示完全组织ACC神经元活动中,并且因为先前研究已牵涉远事恐惧记忆存储中的ACC(Bontempi等,1999;Fischer等,2007;Frankland等,2004;Maviel等,2004),所以通过在关联FC之后一天或一个月直接靶向ACC来探索记忆的光遗传学抑制。图10A描绘前扣带回皮质(ACC)中的eNpHR3.0表达。完全根据先前研究(Frankland等,2004),ACC的光遗传学抑制对近事记忆没有影响($75.9\pm5.4\%$ 相对于 $76\pm2.9\%$ 木僵),但显著损害远事记忆(图10B;对照物 $n=5$, $81.6\pm4.9\%$ 木僵;eNpHR3.0 $n=5$, $53.8\pm11\%$ 木僵; $P<0.05$)。

[0143] 在新一组小鼠中重复相同实验,但这次在测试之前以及接着在测试期间递送长久照射30分钟。再次发现ACC的光遗传学抑制显著损害远事记忆(对照物 $n=3$, $78.0\pm6.2\%$ 木僵;eNpHR3.0 $n=8$, $45.0\pm5.2\%$ 木僵; $P<0.05$),但对近事记忆没有影响(图10C; $78.5\pm12.7\%$ 相对于 $74.3\pm4.3\%$ 木僵)。相反地,当靶向另一主要皮质输入区域(嗅球(OB))以用于对照目的,以及在近事和远事恐惧重唤期间测试光遗传学抑制的影响时,发现它对任一时间点的重唤都没有影响。这个结果立刻证明向皮质的突触输入的主要来源突然下降不会非特异性地影响重唤,并且还指出远事记忆中ACC的特异性(与先前工作一致)。总体来说,这些发现支持新皮质的远事重要性,并且还说明甚至在皮质改组之后,在重唤远事记忆迹线中对海马体存在默认需求。

[0144] 最近通过PKW施用在海马体和皮质中(Migues等;Pastalkova等,2006;Shema等,2009;Shema等,2007)并且通过选择性切除预标记的神经元在扁桃腺中(Han等,2009)证明远事记忆的不可逆清除。另一方面,因神经元损伤而假定失去的远事记忆迹线在环境丰富和染色质改质之后变得可重唤(Fischer等,2007)。另一方面,光遗传学可实现在没有永久性清除记忆下实现可逆的重唤预防。海马体仍是关联恐惧记忆重唤的默认启动者的发现可归因于以下事实:反应于恐惧条件化(Moita等,2004),许多将细胞放在(Moser等,2008)CA1remap中,并且可有助于更快地识别情境。实际上,重复显示海马体病变诱导空间记忆的逆行性健忘症(Broadbent等,2006;Martin等,2005)。

[0145] 当远事记忆提取时它们变得可再巩固,从而使它们易于受干扰,但还可增强迹线(Dudai 2006;Morris等,2006;Nader and Hardt 2009;Tronson和Taylor 2007;Wang和

Morris)。在再巩固前后实时地以及甚至在远事恐惧记忆已提取之后实时地可逆地切断远事恐惧记忆的能力可为PTSD患者开辟一条激励人心的治疗途径,其中重现干扰性记忆可在出现时便被停止,而未永久地影响其它记忆。另外,可抑制与滥用药物有关的记忆来减少寻找药物的行为(Everitt等,2001;Lee等,2005;Robbins等,2008)。通过光遗传学调节不同脑区来即刻影响认知的能力可用作再检查特定神经元群体在记忆过程中的作用的未来研究的基础,并且可实现成为其基础的神经元回路的更好的时间、遗传和空间解剖。

[0146] 本发明涉及以下实施方式:

[0147] 1.一种非人动物,所述非人动物包含在所述动物的海马体背侧CA1区中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化,其中照射所述蛋白质可逆地影响记忆功能。

[0148] 2.一种非人动物,所述非人动物包含在所述动物的前扣带回皮质中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化,其中照射所述蛋白质可逆地影响记忆功能。

[0149] 3.一种非人动物,所述非人动物包含在所述动物的基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化,其中照射所述蛋白质可逆地影响记忆功能。

[0150] 4.如实施方式1至3中任一项所述的非人动物,其中所述受影响的记忆功能为记忆提取或记忆形成。

[0151] 5.如实施方式1至4中任一项所述的非人动物,其中所述记忆是恐惧记忆。

[0152] 6.如实施方式1至5中任一项所述的非人动物,其中所述记忆是远事记忆。

[0153] 7.如实施方式1至6中任一项所述的非人动物,其中所述蛋白质选自由NpHR、BR、AR和GtR3组成的组。

[0154] 8.如实施方式7所述的非人动物,其中所述蛋白质包含与SEQ ID NO:3中所示的序列至少95%同一的氨基酸序列。

[0155] 9.如实施方式8所述的非人动物,其中所述蛋白质进一步包含内质网(ER)输出信号和/或膜运输信号。

[0156] 10.如实施方式8所述的非人动物,其中所述氨基酸序列通过连接子连接至所述ER输出信号。

[0157] 11.如实施方式9所述的非人动物,其中所述ER输出信号包含氨基酸序列FCYENEV。

[0158] 12.如实施方式9所述的非人动物,其中所述膜运输信号包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV。

[0159] 13.如实施方式7所述的非人动物,其中所述蛋白质包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

[0160] 14.一种脑组织薄片,所述脑组织薄片包含选自由以下组成的组的脑区:海马体背侧CA1区、基底外侧扁桃腺和前扣带回皮质,其中光活化蛋白质在所述脑区的兴奋性神经元的细胞膜上表达,其中所述蛋白质对光起反应并且能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化,其中照射所述蛋白质可逆地影响记忆功能。

[0161] 15.一种用于可逆地影响个体的记忆提取或形成的方法,所述方法包括:向所述个体的海马体背侧CA1区施用编码光活化蛋白质的聚核苷酸,其中光活化蛋白质在所述海马

体背侧CA1区中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,并且所述蛋白质对光起反应并能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化,从而用所述光活化所述蛋白质可逆地影响事件在所述个体中的记忆提取或形成。

[0162] 16.一种用于可逆地影响个体的记忆提取或形成的方法,所述方法包括:向所述个体的前扣带回皮质施用编码光活化蛋白质的聚核苷酸,其中光活化蛋白质在所述前扣带回皮质中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,并且所述蛋白质对光起反应并能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化,从而用所述光活化所述蛋白质可逆地影响事件在所述个体中的记忆提取或形成。

[0163] 17.一种用于可逆地影响个体的记忆提取或形成的方法,所述方法包括:向所述个体的基底外侧扁桃腺施用编码光活化蛋白质的聚核苷酸,其中光活化蛋白质在所述基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,并且所述蛋白质对光起反应并能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化,从而用所述光活化所述蛋白质可逆地影响事件在所述个体中的记忆提取或形成。

[0164] 18.如实施方式15至17中任一项所述的方法,其中所述聚核苷酸是载体。

[0165] 19.如实施方式18所述的方法,其中所述载体是选自由以下组成的组的病毒载体:AAV载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、HSV载体以及慢病毒载体。

[0166] 20.一种用于可逆地影响记忆提取或形成的方法,所述方法包括:在事件于个体中的记忆提取或形成期间抑制海马体背侧CA1区中的兴奋性神经元的去极化,其中光活化蛋白质在所述个体的所述海马体背侧CA1区中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,其中所述蛋白质对光起反应并能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化。

[0167] 21.一种用于可逆地影响记忆提取或形成的方法,所述方法包括:在事件于个体中的记忆提取或形成期间抑制前扣带回皮质中的兴奋性神经元的去极化,其中光活化蛋白质在所述个体的所述前扣带回皮质中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,其中所述蛋白质对光起反应并能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化。

[0168] 22.一种用于可逆地影响记忆提取或形成的方法,所述方法包括:在事件于个体中的记忆提取或形成期间抑制基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的去极化,其中光活化蛋白质在所述个体的所述基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,其中所述蛋白质对光起反应并能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化。

[0169] 23.如实施方式15至22中任一项所述的方法,其中所述事件是恐惧事件。

[0170] 24.如实施方式15至22中任一项所述的方法,其中所述个体是人。

[0171] 25.如实施方式15至22中任一项所述的方法,其中所述个体是非人动物。

[0172] 26.一种用于治疗个体的创伤后应激障碍的方法,所述方法包括:向所述个体的海马体背侧CA1区施用编码光活化蛋白质的聚核苷酸,其中光活化蛋白质在所述海马体背侧CA1区中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,并且所述蛋白质对光起反应并能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化,从而用所述光活化所述蛋白质可逆地影响事件在所述个体中的记忆提取或形成。

[0173] 27.一种用于治疗个体的创伤后应激障碍的方法,所述方法包括:向所述个体的前扣带回皮质施用编码光活化蛋白质的聚核苷酸,其中光活化蛋白质在所述前扣带回皮质中的兴奋性神经元的细胞膜上表达,并且所述蛋白质对光起反应并能够在所述神经元被所述

光照射时抑制所述神经元去极化,从而用所述光活化所述蛋白质可逆地影响事件在所述个体中的记忆提取或形成。

[0174] 28.如实施方式26或27所述的方法,其中所述聚核苷酸是载体。

[0175] 29.如实施方式28所述的方法,其中所述载体是选自由以下组成的组的病毒载体: AAV载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、HSV载体以及慢病毒载体。

[0176] 30.一种筛选影响记忆提取或形成的药理学剂的方法,所述方法包括:a)在事件于非人动物中的记忆提取或形成期间使海马体背侧CA1区中的兴奋性神经元与药理学剂接触,其中所述非人动物包含在所述动物的所述海马体背侧CA1区中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中所述蛋白质对光起反应并能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化;b)在事件的记忆提取或形成期间抑制所述海马体背侧CA1区中所述兴奋性神经元的去极化;以及c)确定所述药理学剂在存在或不存在所述光下是否影响记忆提取或形成。

[0177] 31.一种筛选影响记忆提取或形成的药理学剂的方法,所述方法包括:a)在事件于非人动物中的记忆提取或形成期间使前扣带回皮质中的兴奋性神经元与药理学剂接触,其中所述非人动物包含在所述动物的所述前扣带回皮质中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中所述蛋白质对光起反应并能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化;b)在事件的记忆提取或形成期间抑制所述前扣带回皮质中所述兴奋性神经元的去极化;以及c)确定所述药理学剂在存在或不存在所述光下是否影响记忆提取或形成。

[0178] 32.一种筛选影响记忆提取或形成的药理学剂的方法,所述方法包括:a)在事件于非人动物中的记忆提取或形成期间使基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元与药理学剂接触,其中所述非人动物包含在所述动物的所述基底外侧扁桃腺中的兴奋性神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质,其中所述蛋白质对光起反应并能够在所述神经元被所述光照射时抑制所述神经元去极化;b)在事件的记忆提取或形成期间抑制所述基底外侧扁桃腺中所述兴奋性神经元的去极化;以及c)确定所述药理学剂在存在或不存在所述光下是否影响记忆提取或形成。

[0179] 33.如实施方式15至32中任一项所述的方法,其中所述蛋白质选自由NpHR、BR、AR和GtR3组成的组。

[0180] 34.如实施方式33所述的方法,其中所述NpHR蛋白包含与SEQ ID NO:3中所示的序列至少95%同一的氨基酸序列。

[0181] 35.如实施方式34所述的方法,其中所述NpHR蛋白进一步包含内质网(ER)输出信号和/或膜运输信号。

[0182] 36.如实施方式35所述的方法,其中所述与SEQ ID NO:3中所示的序列至少95%同一的氨基酸序列通过连接子连接至所述ER输出信号和/或所述膜运输信号。

[0183] 37.如实施方式35所述的方法,其中所述ER输出信号包含氨基酸序列FCYENEV。

[0184] 38.如实施方式35所述的方法,其中所述膜运输信号包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV。

[0185] 39.如实施方式33所述的方法,其中所述NpHR蛋白包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列。

[0186] 尽管已借助于说明和实施例相当详细地描述了前述发明以达到理解清楚性的目的,但不应将说明书和实施例视为限制本发明的范畴。

[0187] 参考文献

[0188] Adamantidis,A.R.,Zhang,F.,Aravanis,A.M.,Deisseroth,K.和de Lecea,L. (2007).Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons.Nature 450,420-424.

[0189] Anagnostaras,S.G.,Maren,S.和Fanselow,M.S. (1999).Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination.J Neurosci 19,1106-1114.

[0190] Aravanis,A.M.,Wang,L.P.,Zhang,F.,Meltzer,L.A.,Mogri,M.Z.,Schneider, M.B.和Deisseroth,K. (2007).An optical neural interface:in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology.J Neural Eng 4,S143-156.

[0191] Bolhuis,J.J.,Stewart,C.A.和Forrest,E.M. (1994).Retrograde amnesia and memory reactivation in rats with ibotenate lesions to the hippocampus or subiculum.Q J Exp Psychol B 47,129-150.

[0192] Bontempi,B.,Laurent-Demir,C.,Destrade,C.和Jaffard,R. (1999).Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage.Nature 400,671-675.

[0193] Boyden,E.S.,Zhang,F.,Bamberg,E.,Nagel,G.和Deisseroth,K. (2005).Millisecond-timescale,genetically targeted optical control of neural activity.Nat Neurosci 8,1263-1268.

[0194] Broadbent,N.J.,Squire,L.R.和Clark,R.E. (2006).Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests.Learn Mem 13,187-191.

[0195] Cipolotti,L.和Bird,C.M. (2006).Amnesia and the hippocampus.Curr Opin Neurol 19,593-598.

[0196] Debiec,J.,LeDoux,J.E.和Nader,K. (2002).Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus.Neuron 36,527-538.

[0197] Deisseroth,K.,Feng,G.,Majewska,A.K.,Miesenbock,G.,Ting,A.和Schnitzer, M.J. (2006).Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits.J Neurosci 26,10380-10386.

[0198] Dudai,Y. (2006).Reconsolidation:the advantage of being refocused.Curr Opin Neurobiol 16,174-178.

[0199] Everitt,B.J.,Dickinson,A.和Robbins,T.W. (2001).The neuropsychological basis of addictive behaviour.Brain Res Brain Res Rev 36,129-138.

[0200] Fanselow,M.S. (2000).Contextual fear,gestalt memories,and the hippocampus.Behav Brain Res 110,73-81.

[0201] Fischer,A.,Sananbenesi,F.,Wang,X.,Dobbin,M.和Tsai,L.H. (2007).Recovery

of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178–182.

[0202] Frankland, P.W. 和 Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6, 119–130.

[0203] Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L. 和 Silva, A.J. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304, 881–883.

[0204] Gradinaru, V., Thompson, K.R., Zhang, F., Mogri, M., Kay, K., Schneider, M.B. 和 Deisseroth, K. (2007). Targeting and readout strategies for fast optical neural control in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27, 14231–14238.

[0205] Gradinaru, V., Zhang, F., Ramakrishnan, C., Mattis, J., Prakash, R., Diester, I., Goshen, I., Thompson, K.R. 和 Deisseroth, K. (2010). Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* 141, 154–165.

[0206] Hall, J., Thomas, K.L. 和 Everitt, B.J. (2001). Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci* 21, 2186–2193.

[0207] Han, J.H., Kushner, S.A., Yiu, A.P., Hsiang, H.L., Buch, T., Waisman, A., Bontempi, B., Neve, R.L., Frankland, P.W. 和 Josselyn, S.A. (2009). Selective erasure of a fear memory. *Science* 323, 1492–1496.

[0208] Johansen, J.P., Hamanaka, H., Monfils, M.H., Behnia, R., Deisseroth, K., Blair, H.T. 和 LeDoux, J.E. (2010). Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12692–12697.

[0209] Killcross, S., Robbins, T.W. 和 Everitt, B.J. (1997). Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature* 388, 377–380.

[0210] Kim, J.J. 和 Fanselow, M.S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256, 675–677.

[0211] Kitamura, T., Saitoh, Y., Takashima, N., Murayama, A., Niibori, Y., Ageta, H., Sekiguchi, M., Sugiyama, H. 和 Inokuchi, K. (2009). Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell* 139, 814–827.

[0212] LeDoux, J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23, 155–184.

[0213] Lee, J.L., Di Ciano, P., Thomas, K.L. 和 Everitt, B.J. (2005). Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior. *Neuron* 47, 795–801.

[0214] Lee, J.L., Milton, A.L. 和 Everitt, B.J. (2006). Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci* 26,

10051-10056.

[0215] Maren,S.(2001).Neurobiology of Pavlovian fear conditioning.*Annu Rev Neurosci* 24,897-931.

[0216] Maren,S.,Aharonov,G.和Fanselow,M.S.(1997).Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats.*Behav Brain Res* 88,261-274.

[0217] Maren,S.和Quirk,G.J.(2004).Neuronal signalling of fear memory.*Nat Rev Neurosci* 5,844-852.

[0218] Martin,S.J.,de Hoz,L.和Morris,R.G.(2005).Retrograde amnesia:neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory,even after reminding.*Neuropsychologia* 43, 609-624.

[0219] Maviel,T.,Durkin,T.P.,Menzaghi,F.和Bontempi,B.(2004).Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory.*Science* 305,96-99.

[0220] McHugh,T.J.,Jones,M.W.,Quinn,J.J.,Balthasar,N.,Coppari,R.,Elmquist,J.K.,Lowell,B.B.,Fanselow,M.S.,Wilson,M.A.和Tonegawa,S.(2007).Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid patternseparation in the hippocampal network.*Science* 317,94-99.

[0221] McHugh,T.J.和Tonegawa,S.(2007).Spatial exploration is required for the formation of contextual fear memory.*Behav Neurosci* 121,335-339.

[0222] Moita,M.A.,Rosis,S.,Zhou,Y.,LeDoux,J.E.和Blair,H.T.(2004).Putting fear in its place:remapping of hippocampal place cells during fear conditioning.*J Neurosci* 24,7015-7023.

[0223] Morris,R.G.,Inglis,J.,Ainge,J.A.,Olverman,H.J.,Tulloch,J.,Dudai,Y.和Kelly,P.A.(2006).Memory reconsolidation:sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval.*Neuron* 50,479-489.

[0224] Moscovitch,M.,Nadel,L.,Winocur,G.,Gilboa,A.和Rosenbaum,R.S.(2006).The cognitive neuroscience of remote episodic,semantic and spatial memory.*Curr Opin Neurobiol* 16,179-190.

[0225] Moser,E.I.,Kropff,E.和Moser,M.B.(2008).Place cells,grid cells,and the brain's spatial representation system.*Annu Rev Neurosci* 31,69-89.

[0226] Nadel,L.和Moscovitch,M.(1997).Memory consolidation,retrograde amnesia and the hippocampal complex.*Curr Opin Neurobiol* 7,217-227.

[0227] Nader,K.和Hardt,O.(2009).A single standard for memory:the case for reconsolidation.*Nat Rev Neurosci* 10,224-234.

[0228] Nakashiba,T.,Young,J.Z.,McHugh,T.J.,Buhl,D.L.和Tonegawa,S.(2008).Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3output in

hippocampal learning.Science 319,1260-1264.

[0229] Phelps,E.A.和LeDoux,J.E.(2005).Contributions of the amygdala to emotion processing:from animal models to human behavior.Neuron 48,175-187.

[0230] Riedel,G.,Micheau,J.,Lam,A.G.,Roloff,E.L.,Martin,S.J.,Bridge,H.,de Hoz,L.,Poeschel,B.,McCulloch,J.和Morris,R.G.(1999).Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes.Nat Neurosci 2,898-905.

[0231] Robbins,T.W.,Ersche,K.D.和Everitt,B.J.(2008).Drug addiction and the memory systems of the brain.Ann N Y Acad Sci 1141,1-21.

[0232] Shimizu,E.,Tang,Y.P.,Rampon,C.和Tsien,J.Z.(2000).NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation.Science 290,1170-1174.

[0233] Squire,L.R.和Alvarez,P.(1995).Retrograde amnesia and memory consolidation:a neurobiological perspective.Curr Opin Neurobiol 5,169-177.

[0234] Squire,L.R.和Bayley,P.J.(2007).The neuroscience of remote memory.Curr Opin Neurobiol 17,185-196.

[0235] Sutherland,R.J.,O'Brien,J.和Lehmann,H.(2008).Absence of systems consolidation of fear memories after dorsal,ventral,or complete hippocampal damage.Hippocampus 18,710-718.

[0236] Sutherland,R.J.,Sparks,F.T.和Lehmann,H.(2010).Hippocampus and retrograde amnesia in the rat model:a modest proposal for the situation of systems consolidation.Neuropsychologia 48,2357-2369.

[0237] Tronson,N.C.和Taylor,J.R.(2007).Molecular mechanisms of memory reconsolidation.Nat Rev Neurosci 8,262-275.

[0238] Wang,H.,Shimizu,E.,Tang,Y.P.,Cho,M.,Kyin,M.,Zuo,W.,Robinson,D.A.,Alaimo,P.J.,Zhang,C.,Morimoto,H.等(2003).Inducible protein knockout reveals temporal requirement of CaMKII reactivation for memory consolidation in the brain.Proc Natl Acad Sci U S A 100,4287-4292.

[0239] Wang,S.H.和Morris,R.G.(2010).Hippocampal-neocortical interactions in memory formation,consolidation,and reconsolidation.Annu Rev Psychol 61,49-79, C41-44.

[0240] Wang,S.H.,Teixeira,C.M.,Wheeler,A.L.和Frankland,P.W.(2009).The precision of remote context memories does not require the hippocampus.Nat Neurosci 12,253-255.

[0241] Wiltgen,B.J.,Zhou,M.,Cai,Y.,Balaji,J.,Karlsson,M.G.,Parivash,S.N.,Li,W.和Silva,A.J.(2010).The Hippocampus Plays a Selective Role in the Retrieval of Detailed Contextual Memories.Curr Biol 20,1336-1344.

[0242] Winocur,G.,Frankland,P.W.,Sekeres,M.,Fogel,S.和Moscovitch,M.(2009).Changes in context-specificity during memory reconsolidation:selective

effects of hippocampal lesions. *Learn Mem* 16,722-729.

[0243] Winocur,G.,Moscovitch,M.和Bontempi,B.(2010).Memory formation and long-term retention in humans and animals:convergence towards a transformation account of hippocampal-neocortical interactions.*Neuropsychologia* 48,2339-2356.

[0244] Winocur,G.,Moscovitch,M.和Sekeress,M.(2007).Memory consolidation or transformation:context manipulation and hippocampal representations of memory.*Nat Neurosci* 10,555-557.

[0245] Zhang,F.,Wang,L.P.,Brauner,M.,Liewald,J.F.,Kay,K.,Watzke,N.,Wood,P.G.,Bamberg,E.,Nagel,G.,Gottschalk,A.等(2007).Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry.*Nature* 446,633-639.

序列表

<110> GOSHEN, INBAL
DEISSEROTH, KARL

<120> 记忆功能的控制和表征

<130> STAN

<140> US 11/59283

<141> 2011-11-04

<150> 61/410,732

<151> 2010-11-05

<150> 61/540,926

<151> 2011-09-29

<160> 10

<170> FastSEQ for Windows 4.0版

<210> 1

<211> 223

<212> PRT

<213> 蓝隐藻

<400> 1

[0001] Ala Ser Ser Phe Gly Lys Ala Leu Leu Glu Phe Val Phe Ile Val Phe
1 5 10 15
Ala Cys Ile Thr Leu Leu Leu Gly Ile Asn Ala Ala Lys Ser Lys Ala
20 25 30
Ala Ser Arg Val Leu Phe Pro Ala Thr Phe Val Thr Gly Ile Ala Ser
35 40 45
Ile Ala Tyr Phe Ser Met Ala Ser Gly Gly Gly Trp Val Ile Ala Pro
50 55 60
Asp Cys Arg Gln Leu Phe Val Ala Arg Tyr Leu Asp Trp Leu Ile Thr
65 70 75 80
Thr Pro Leu Leu Leu Ile Asp Leu Gly Leu Val Ala Gly Val Ser Arg
85 90 95
Trp Asp Ile Met Ala Leu Cys Leu Ser Asp Val Leu Met Ile Ala Thr
100 105 110
Gly Ala Phe Gly Ser Leu Thr Val Gly Asn Val Lys Trp Val Trp Trp
115 120 125
Phe Phe Gly Met Cys Trp Phe Leu His Ile Ile Phe Ala Leu Gly Lys
130 135 140
Ser Trp Ala Glu Ala Ala Lys Ala Lys Gly Gly Asp Ser Ala Ser Val
145 150 155 160
Tyr Ser Lys Ile Ala Gly Ile Thr Val Ile Thr Trp Phe Cys Tyr Pro
165 170 175
Val Val Trp Val Phe Ala Glu Gly Phe Gly Asn Phe Ser Val Thr Phe
180 185 190
Glu Val Leu Ile Tyr Gly Val Leu Asp Val Ile Ser Lys Ala Val Phe
195 200 205
Gly Leu Ile Leu Met Ser Gly Ala Ala Thr Gly Tyr Glu Ser Ile
210 215 220

<210> 2

<211> 270

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白

<400> 2

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

[0002]

<210> 3

<211> 273

<212> PRT

<213> 法老嗜盐碱单胞菌

<400> 3

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

```

145          150          155          160
Trp Tyr Ala Ile Ser Cys Ala Cys Phe Leu Val Val Leu Tyr Ile Leu
          165          170          175
Leu Val Glu Trp Ala Gln Asp Ala Lys Ala Ala Gly Thr Ala Asp Met
          180          185          190
Phe Asn Thr Leu Lys Leu Leu Thr Val Val Met Trp Leu Gly Tyr Pro
          195          200          205
Ile Val Trp Ala Leu Gly Val Glu Gly Ile Ala Val Leu Pro Val Gly
          210          215          220
Val Thr Ser Trp Gly Tyr Ser Phe Leu Asp Ile Val Ala Lys Tyr Ile
          225          230          235          240
Phe Ala Phe Leu Leu Leu Asn Tyr Leu Thr Ser Asn Glu Ser Val Val
          245          250          255
Ser Gly Ser Ile Leu Asp Val Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Ala Asp
          260          265          270
Asp

```

<210> 4

<211> 291

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白

<400> 4

```

[0003] Met Thr Glu Thr Leu Pro Pro Val Thr Glu Ser Ala Val Ala Leu Gln
1          5          10          15
Ala Glu Val Thr Gln Arg Glu Leu Phe Glu Phe Val Leu Asn Asp Pro
          20          25          30
Leu Leu Ala Ser Ser Leu Tyr Ile Asn Ile Ala Leu Ala Gly Leu Ser
          35          40          45
Ile Leu Leu Phe Val Phe Met Thr Arg Gly Leu Asp Asp Pro Arg Ala
          50          55          60
Lys Leu Ile Ala Val Ser Thr Ile Leu Val Pro Val Val Ser Ile Ala
65          70          75          80
Ser Tyr Thr Gly Leu Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser Val Leu Glu Met
          85          90          95
Pro Ala Gly His Phe Ala Glu Gly Ser Ser Val Met Leu Gly Gly Glu
          100          105          110
Glu Val Asp Gly Val Val Thr Met Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Trp Ala
          115          120          125
Leu Ser Thr Pro Met Ile Leu Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ser
          130          135          140
Asn Ala Thr Lys Leu Phe Thr Ala Ile Thr Phe Asp Ile Ala Met Cys
145          150          155          160
Val Thr Gly Leu Ala Ala Leu Thr Thr Ser Ser His Leu Met Arg
          165          170          175
Trp Phe Trp Tyr Ala Ile Ser Cys Ala Cys Phe Leu Val Val Leu Tyr
          180          185          190
Ile Leu Leu Val Glu Trp Ala Gln Asp Ala Lys Ala Ala Gly Thr Ala
          195          200          205
Asp Met Phe Asn Thr Leu Lys Leu Leu Thr Val Val Met Trp Leu Gly
          210          215          220
Tyr Pro Ile Val Trp Ala Leu Gly Val Glu Gly Ile Ala Val Leu Pro
225          230          235          240
Val Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Ser Phe Leu Asp Ile Val Ala Lys
          245          250          255
Tyr Ile Phe Ala Phe Leu Leu Leu Asn Tyr Leu Thr Ser Asn Glu Ser
          260          265          270
Val Val Ser Gly Ser Ile Leu Asp Val Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro
          275          280          285
Ala Asp Asp

```

290

<210> 5
 <211> 559
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合蛋白

<400> 5
 Met Thr Glu Thr Leu Pro Pro Val Thr Glu Ser Ala Val Ala Leu Gln
 1 5 10 15
 Ala Glu Val Thr Gln Arg Glu Leu Phe Glu Phe Val Leu Asn Asp Pro
 20 25 30
 Leu Leu Ala Ser Ser Leu Tyr Ile Asn Ile Ala Leu Ala Gly Leu Ser
 35 40 45
 Ile Leu Leu Phe Val Phe Met Thr Arg Gly Leu Asp Asp Pro Arg Ala
 50 55 60
 Lys Leu Ile Ala Val Ser Thr Ile Leu Val Pro Val Val Ser Ile Ala
 65 70 75 80
 Ser Tyr Thr Gly Leu Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser Val Leu Glu Met
 85 90 95
 Pro Ala Gly His Phe Ala Glu Gly Ser Ser Val Met Leu Gly Gly Glu
 100 105 110
 Glu Val Asp Gly Val Val Thr Met Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Trp Ala
 115 120 125
 Leu Ser Thr Pro Met Ile Leu Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ser
 130 135 140
 Asn Ala Thr Lys Leu Phe Thr Ala Ile Thr Phe Asp Ile Ala Met Cys
 145 150 155 160
 Val Thr Gly Leu Ala Ala Ala Leu Thr Thr Ser Ser His Leu Met Arg
 165 170 175
 Trp Phe Trp Tyr Ala Ile Ser Cys Ala Cys Phe Leu Val Val Leu Tyr
 180 185 190
 Ile Leu Leu Val Glu Trp Ala Gln Asp Ala Lys Ala Ala Gly Thr Ala
 195 200 205
 Asp Met Phe Asn Thr Leu Lys Leu Leu Thr Val Val Met Trp Leu Gly
 210 215 220
 Tyr Pro Ile Val Trp Ala Leu Gly Val Glu Gly Ile Ala Val Leu Pro
 225 230 235 240
 Val Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Ser Phe Leu Asp Ile Val Ala Lys
 245 250 255
 Tyr Ile Phe Ala Phe Leu Leu Leu Asn Tyr Leu Thr Ser Asn Glu Ser
 260 265 270
 Val Val Ser Gly Ser Ile Leu Asp Val Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro
 275 280 285
 Ala Asp Asp Ala Ala Ala Lys Ser Arg Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr
 290 295 300
 Ile Pro Leu Asp Gln Ile Asp Ile Asn Val Val Ser Lys Gly Glu Glu
 305 310 315 320
 Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val
 325 330 335
 Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr
 340 345 350
 Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro
 355 360 365
 Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys
 370 375 380
 Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser
 385 390 395 400
 Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp
 405 410 415
 Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr

[0004]

```

          420          425          430
Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly
          435          440          445
Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val
          450          455          460
Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys
465          470          475          480
Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr
          485          490          495
Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn
          500          505          510
His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys
          515          520          525
Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr
          530          535          540
Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val
545          550          555

```

<210> 6

<211> 542

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白

<400> 6

```

[0005] Met Val Thr Gln Arg Glu Leu Phe Glu Phe Val Leu Asn Asp Pro Leu
          1          5          10          15
Leu Ala Ser Ser Leu Tyr Ile Asn Ile Ala Leu Ala Gly Leu Ser Ile
          20          25          30
Leu Leu Phe Val Phe Met Thr Arg Gly Leu Asp Asp Pro Arg Ala Lys
          35          40          45
Leu Ile Ala Val Ser Thr Ile Leu Val Pro Val Val Ser Ile Ala Ser
          50          55          60
Tyr Thr Gly Leu Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser Val Leu Glu Met Pro
65          70          75          80
Ala Gly His Phe Ala Glu Gly Ser Ser Val Met Leu Gly Gly Glu Glu
          85          90          95
Val Asp Gly Val Val Thr Met Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Trp Ala Leu
          100          105          110
Ser Thr Pro Met Ile Leu Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ser Asn
          115          120          125
Ala Thr Lys Leu Phe Thr Ala Ile Thr Phe Asp Ile Ala Met Cys Val
          130          135          140
Thr Gly Leu Ala Ala Ala Leu Thr Thr Ser Ser His Leu Met Arg Trp
145          150          155          160
Phe Trp Tyr Ala Ile Ser Cys Ala Cys Phe Leu Val Val Leu Tyr Ile
          165          170          175
Leu Leu Val Glu Trp Ala Gln Asp Ala Lys Ala Ala Gly Thr Ala Asp
          180          185          190
Met Phe Asn Thr Leu Lys Leu Leu Thr Val Val Met Trp Leu Gly Tyr
          195          200          205
Pro Ile Val Trp Ala Leu Gly Val Glu Gly Ile Ala Val Leu Pro Val
          210          215          220
Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Ser Phe Leu Asp Ile Val Ala Lys Tyr
225          230          235          240
Ile Phe Ala Phe Leu Leu Leu Asn Tyr Leu Thr Ser Asn Glu Ser Val
          245          250          255
Val Ser Gly Ser Ile Leu Asp Val Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Ala
          260          265          270
Asp Asp Ala Ala Ala Lys Ser Arg Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr Ile
          275          280          285
Pro Leu Asp Gln Ile Asp Ile Asn Val Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu

```

```

      290      295      300
Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn
305      310      315      320
Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr
      325      330      335
Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val
      340      345      350
Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe
      355      360      365
Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
370      375      380
Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
385      390      395      400
Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
      405      410      415
Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
      420      425      430
Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr
      435      440      445
Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile
      450      455      460
Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
465      470      475      480
Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
      485      490      495
Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
      500      505      510
Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
      515      520      525
Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val
530      535      540

```

[0006]

```

<210> 7
<211> 262
<212> PRT
<213> 盐生盐杆菌

```

```

<400> 7
Met Leu Glu Leu Leu Pro Thr Ala Val Glu Gly Val Ser Gln Ala Gln
1      5      10      15
Ile Thr Gly Arg Pro Glu Trp Ile Trp Leu Ala Leu Gly Thr Ala Leu
      20      25      30
Met Gly Leu Gly Thr Leu Tyr Phe Leu Val Lys Gly Met Gly Val Ser
      35      40      45
Asp Pro Asp Ala Lys Lys Phe Tyr Ala Ile Thr Thr Leu Val Pro Ala
      50      55      60
Ile Ala Phe Thr Met Tyr Leu Ser Met Leu Leu Gly Tyr Gly Leu Thr
65      70      75      80
Met Val Pro Phe Gly Gly Glu Gln Asn Pro Ile Tyr Trp Ala Arg Tyr
      85      90      95
Ala Asp Trp Leu Phe Thr Thr Pro Leu Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu
      100      105      110
Leu Val Asp Ala Asp Gln Gly Thr Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Asp
      115      120      125
Gly Ile Met Ile Gly Thr Gly Leu Val Gly Ala Leu Thr Lys Val Tyr
      130      135      140
Ser Tyr Arg Phe Val Trp Trp Ala Ile Ser Thr Ala Ala Met Leu Tyr
145      150      155      160
Ile Leu Tyr Val Leu Phe Phe Gly Phe Thr Ser Lys Ala Glu Ser Met
      165      170      175
Arg Pro Glu Val Ala Ser Thr Phe Lys Val Leu Arg Asn Val Thr Val
      180      185      190
Val Leu Trp Ser Ala Tyr Pro Val Val Trp Leu Ile Gly Ser Glu Gly
195      200      205

```

Ala Gly Ile Val Pro Leu Asn Ile Glu Thr Leu Leu Phe Met Val Leu
 210 215 220
 Asp Val Ser Ala Lys Val Gly Phe Gly Leu Ile Leu Leu Arg Ser Arg
 225 230 235 240
 Ala Ile Phe Gly Glu Ala Glu Ala Pro Glu Pro Ser Ala Gly Asp Gly
 245 250 255
 Ala Ala Ala Thr Ser Asp
 260

<210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 变体
 <222> (2)... (2)
 <223> xxa =任何氨基酸

<400> 8
 Phe Xaa Tyr Glu Asn Glu
 1 5

[0007]

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 9
 Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val
 1 5

<210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 10
 Lys Ser Arg Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr Ile Pro Leu Asp Gln Ile
 1 5 10 15
 Asp Ile Asn Val
 20

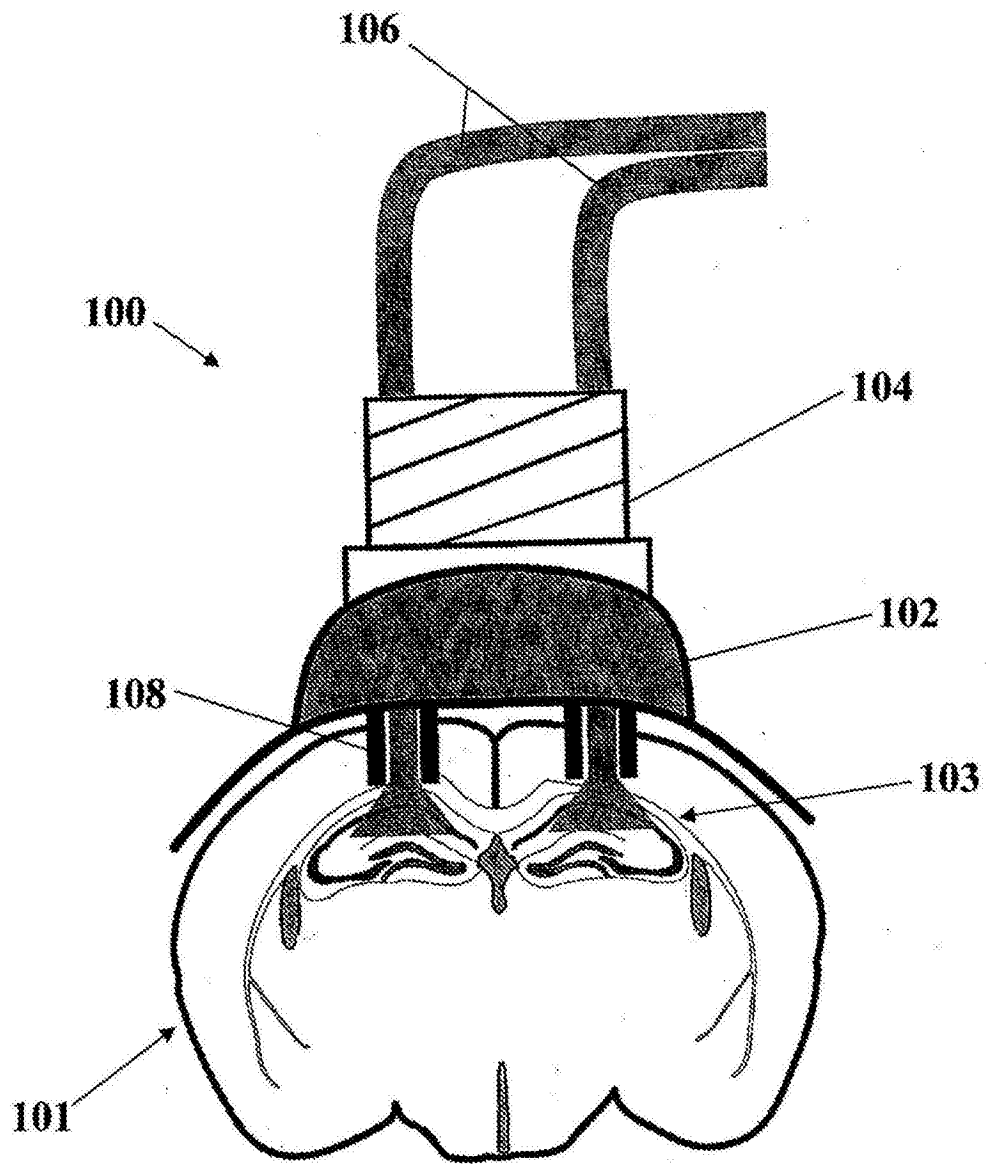


图1

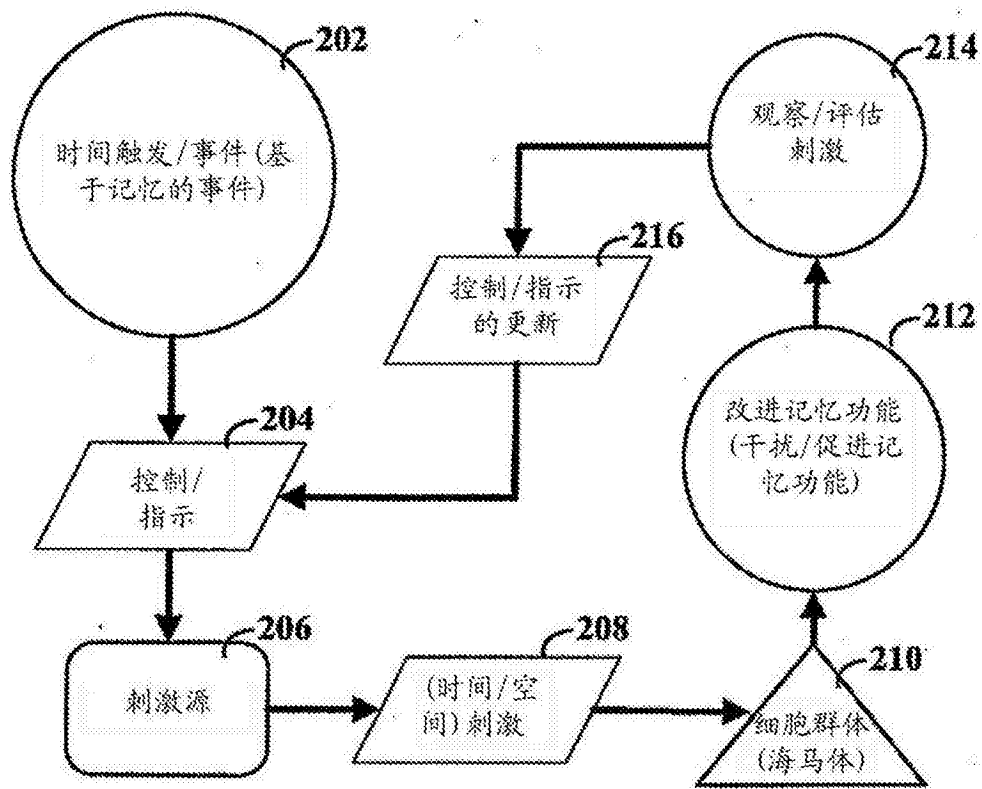


图2

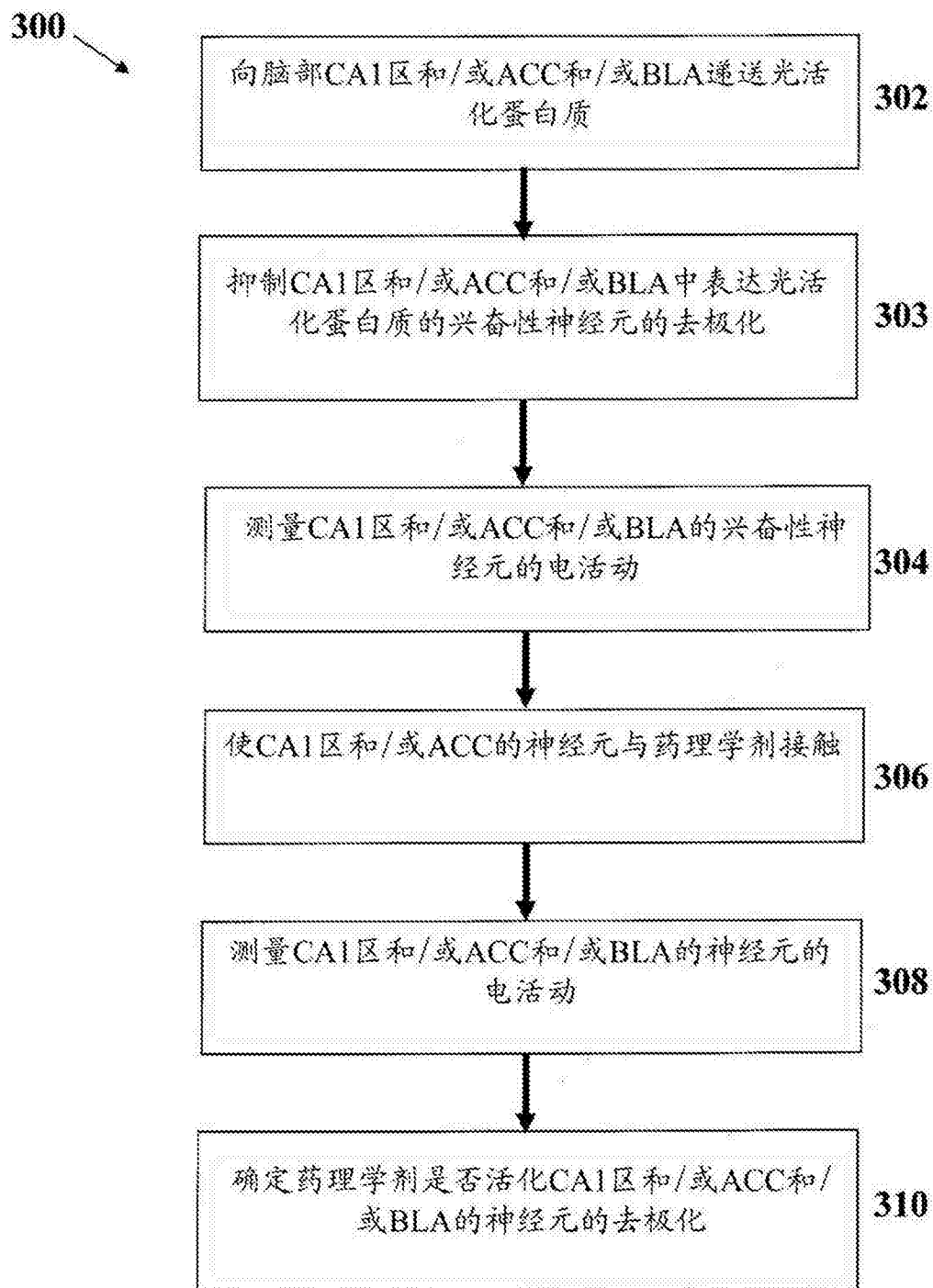


图3A

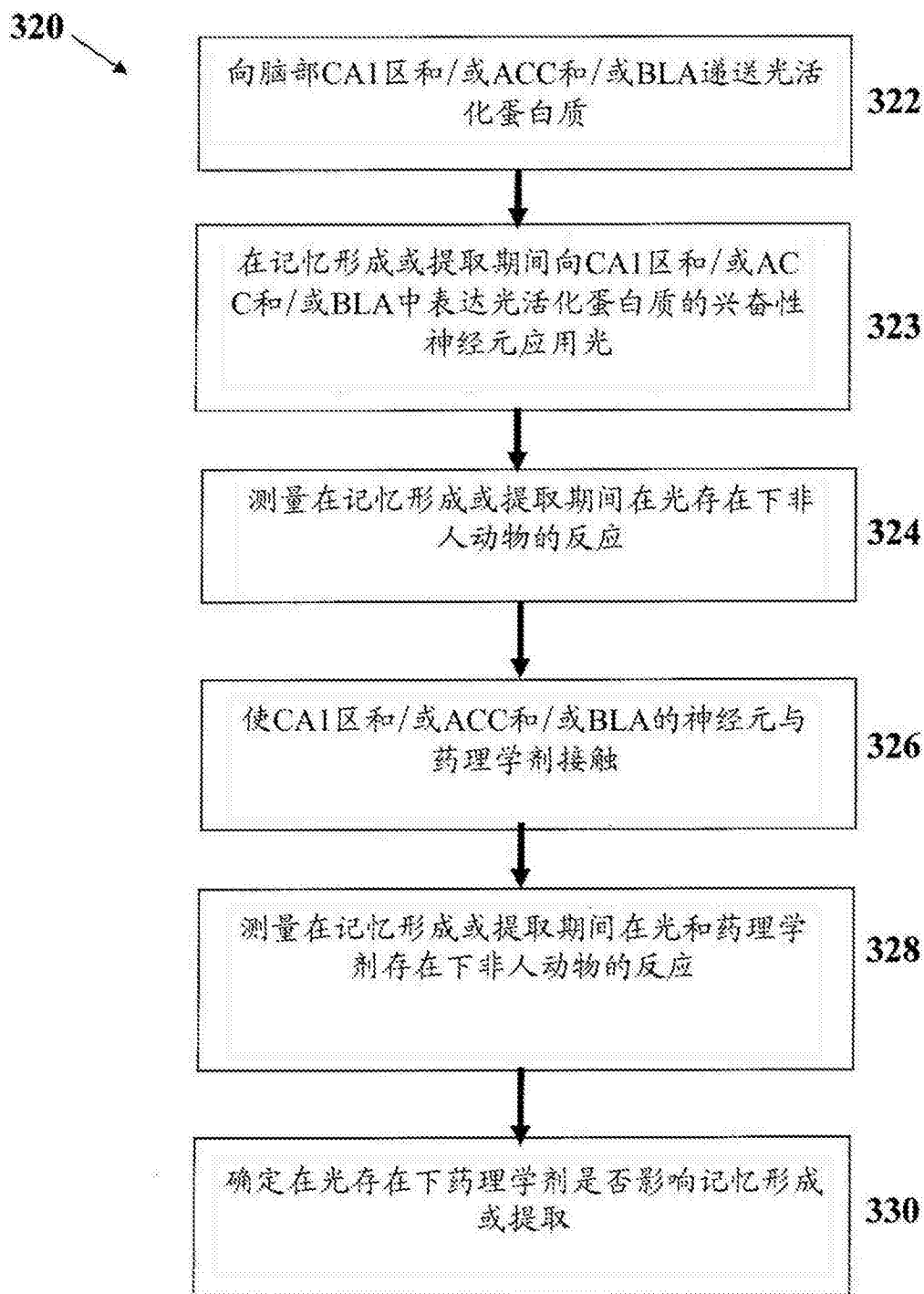


图3B

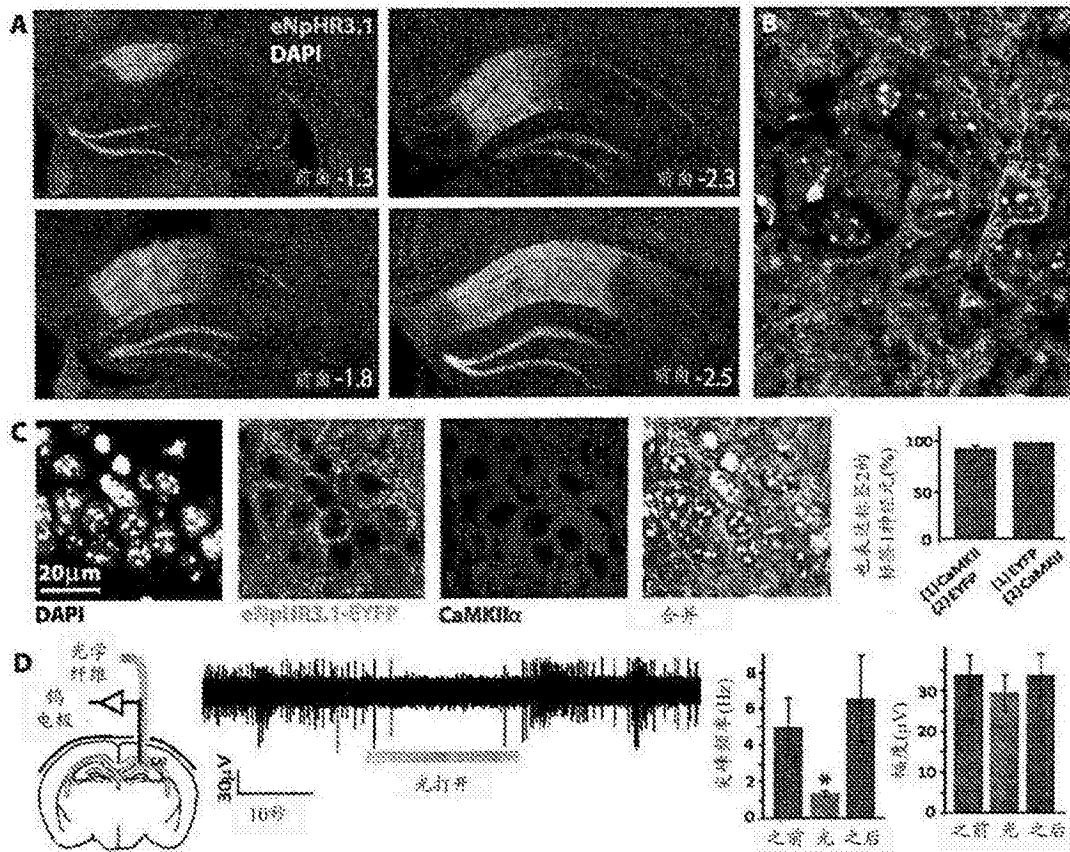


图4

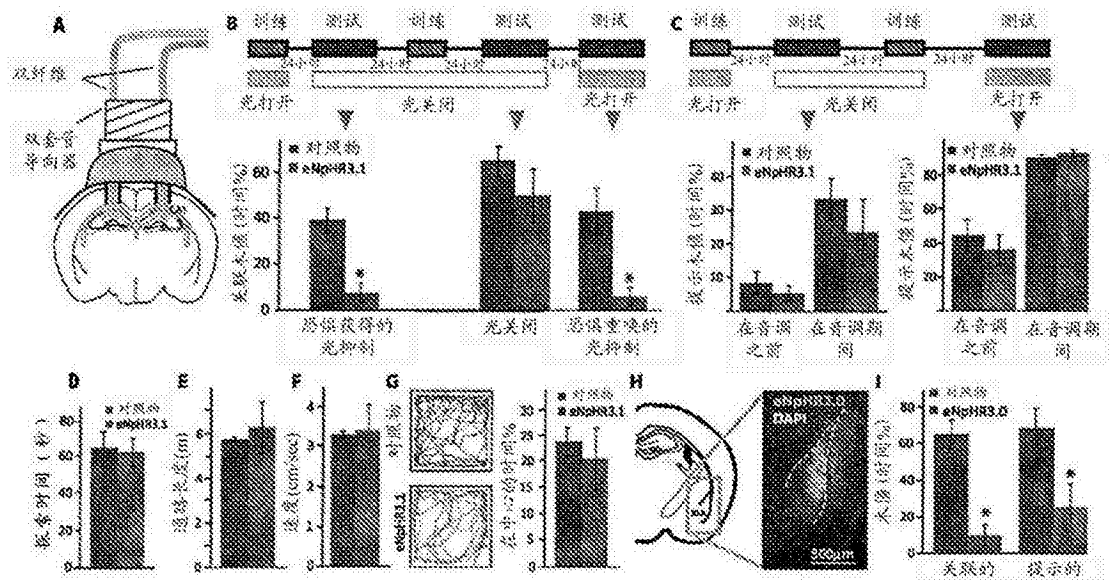


图5

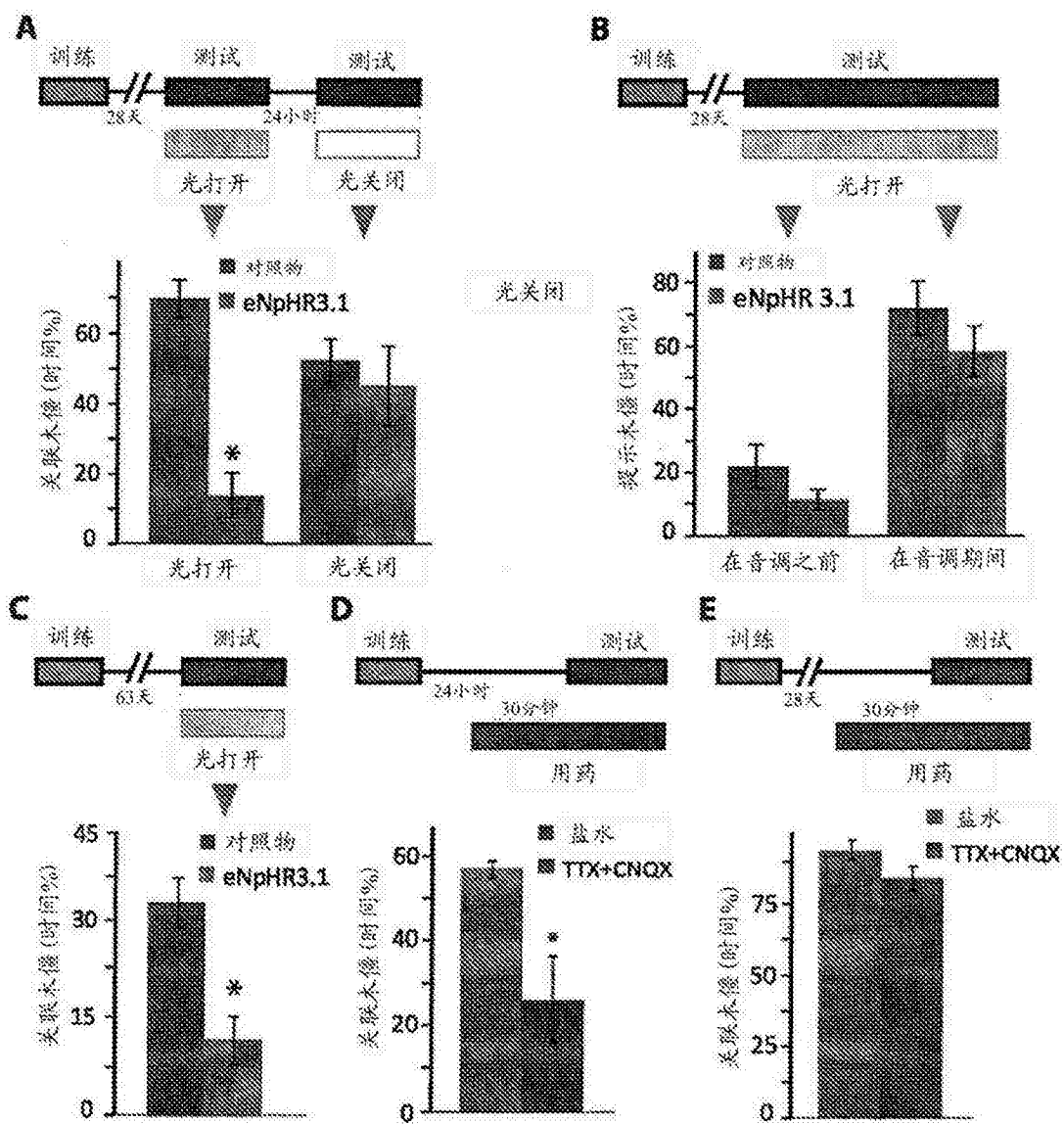


图6

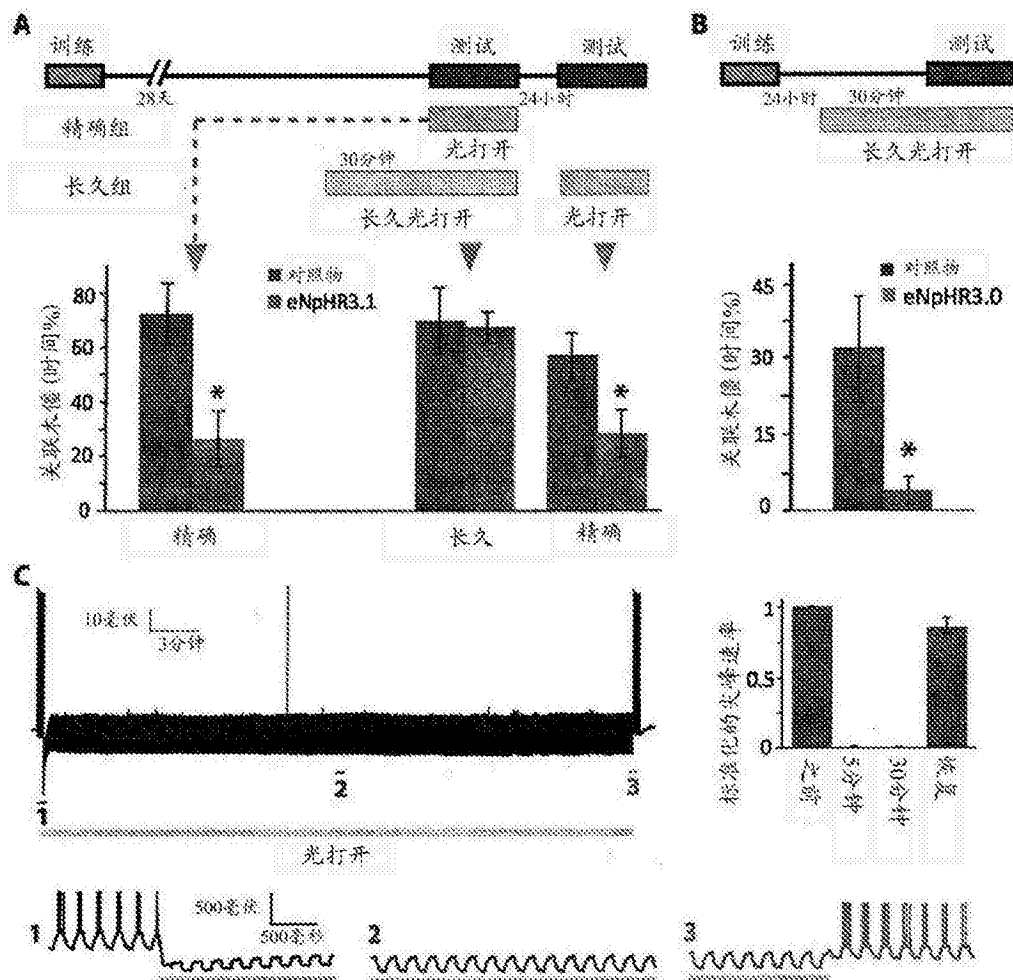


图7

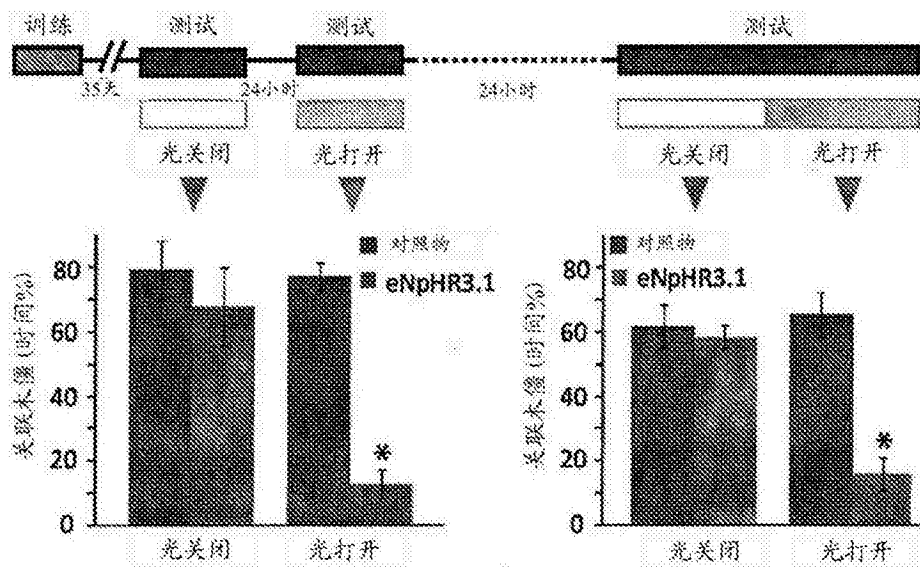


图8

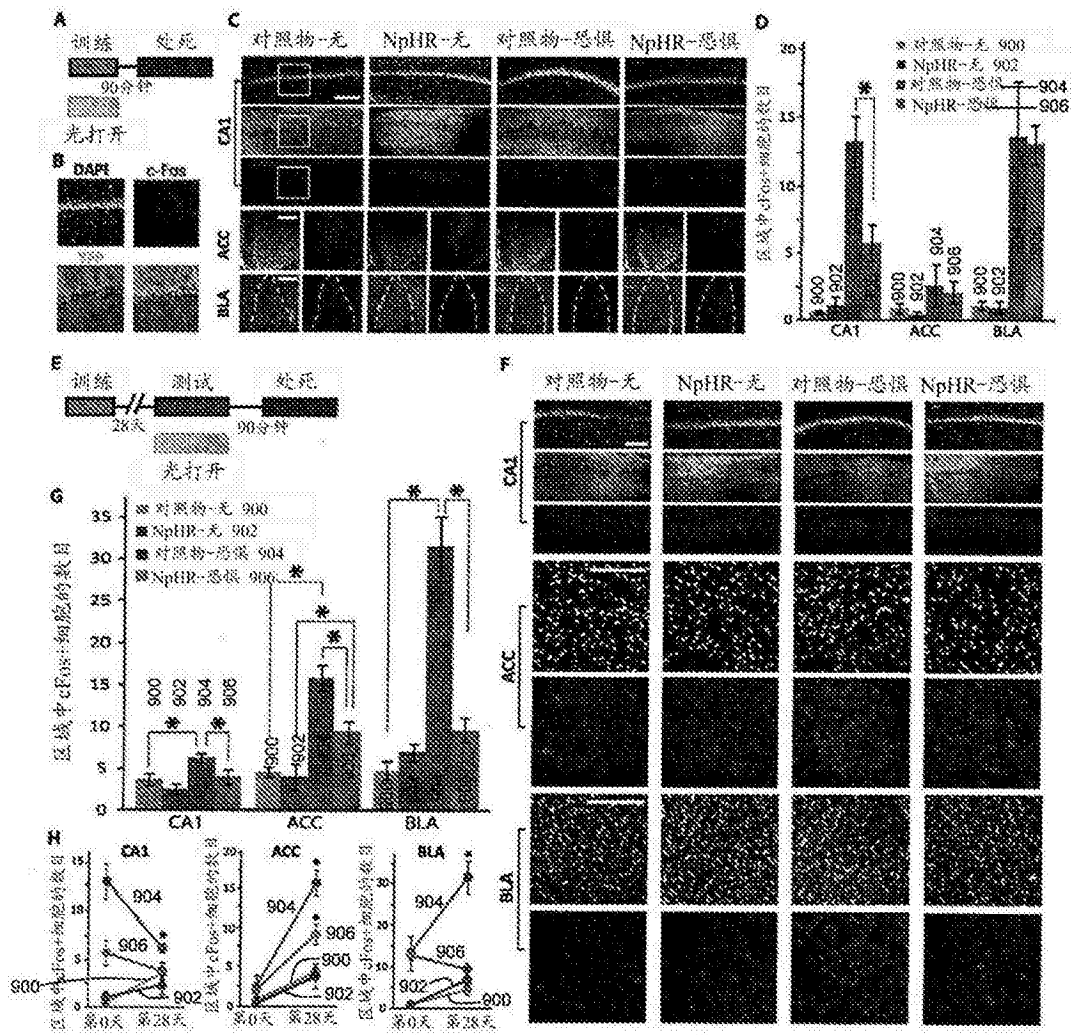


图9

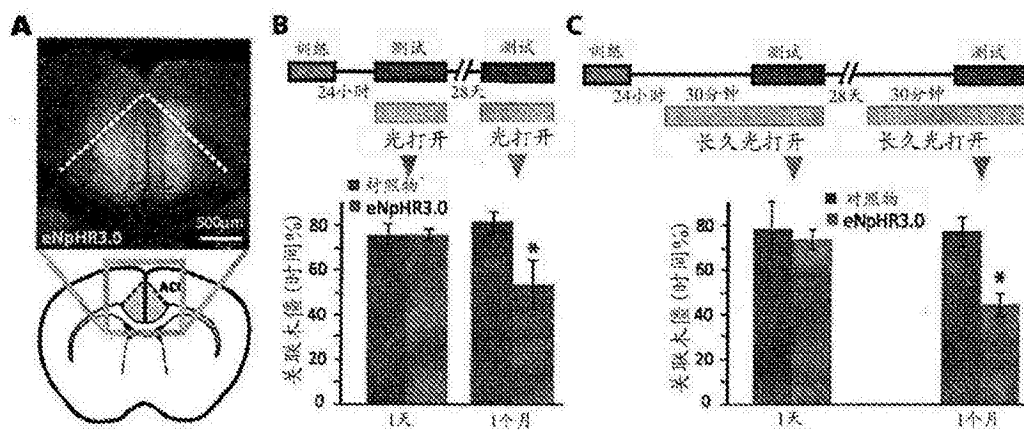


图10