

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 307**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/405 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2011 PCT/US2011/059390**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061744**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2011 E 11838898 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2635111**

54 Título: **Proteínas estabilizadas de tipo opsina de función escalonada y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

05.11.2010 US 410711 P

05.11.2010 US 410704 P

26.07.2011 US 201161511905 P

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

02.10.2018

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Office of the General Counsel Building 170, 3rd
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**DEISSEROTH, KARL;
YIZHAR, OFER y
FENNO, LIEF**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 684 307 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas estabilizadas de tipo opsina de función escalonada y métodos de uso de las mismas

5 **Campo técnico**

La presente solicitud se refiere a mamíferos no humanos que expresan proteínas estabilizadas de tipo opsina de función escalonada (SSFO) en sus membranas plasmáticas y a métodos de uso de las mismas para despolarizar selectivamente las neuronas que residen en microcircuitos de la corteza prefrontal con el fin de afectar a uno o más comportamientos sociales, comunicaciones y/o comportamientos condicionados en el animal no humano.

Antecedentes

La optogenética es la combinación de métodos genéticos y ópticos usados para controlar acontecimientos específicos en células diana de tejido vivo, incluso dentro de mamíferos y otros animales con libertad de movimiento, con la precisión temporal (escala de tiempo de milisegundos) necesaria para mantener el ritmo con sistemas biológicos intactos en funcionamiento. El sello distintivo de la optogenética es la introducción de proteínas canal activadas rápidamente por la luz en las membranas plasmáticas de células neuronales diana que permitan una manipulación temporalmente precisa del potencial de membrana neuronal mientras se mantiene la resolución del tipo celular a través del uso de mecanismos de dirección específicos. Entre las opsinas microbianas que se pueden usar para investigar la función de los sistemas neuronales se encuentran las canalrodopsinas (ChR2, ChR1, VChR1 y SFO) usadas para potenciar la despolarización en respuesta a la luz. En tan solo unos cuantos años, el campo de la optogenética ha fomentado la comprensión científica fundamental de cómo determinados tipos de células contribuyen a la función de tejidos biológicos tales como los circuitos neuronales *in vivo*. Además, desde el punto de vista clínico, la investigación impulsada por la optogenética ha conducido a comprender la enfermedad de Parkinson y otros trastornos neurológicos y psiquiátricos.

Sin embargo, a pesar de estos avances, los sustratos neurofisiológicos de la mayoría de los trastornos psiquiátricos siguen siendo poco conocidos, a pesar de la información que emerge con rapidez sobre factores genéticos que se asocian con fenotipos de comportamientos complejos tales como los observados en el autismo y en la esquizofrenia (Cichon *et al.*, *The American Journal of Psychiatry* 166(5):540 (2009); O'Donovan *et al.*, *Human Genetics* 126(1): 3 (2009)). Un principio emergente notable es que un intervalo muy amplio de anomalías genéticas aparentemente no relacionadas puede dar lugar a la misma clase de fenotipo psiquiátrico (tal como la disfunción del comportamiento social; Folstein y Rosen-Sheidley, *Nature Reviews* 2(12):943 (2001)). Este sorprendente patrón ha señalado la necesidad de identificar ideas simplificadoras a nivel de circuito que podrían unificar diversos factores genéticos bajo un principio fisiopatológico común.

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

Los métodos optogenéticos existentes también son inadecuados para este fin; la dirección de picos coordinados selectivamente en células excitadoras o inhibitorias con una canalrodopsina es viable, pero no es adecuada para la escasa codificación y los patrones de disparo asincrónicos de las células piramidales neocorticales. Además, la presencia continua de una fibra óptica y otro hardware plantea desafíos para los ensayos de comportamiento prolongados con movimientos rápidos y espacialmente complejos, típicos del comportamiento social y las medidas cognitivas (por ejemplo, en el condicionamiento contextual). En su lugar, el hecho de favorecer selectivamente la excitación de una población frente a otra con un producto génico biestable de tipo opsina de función escalonada (SFO) podría abordar parcialmente estos desafíos, ya que la población diana no sería impulsada con picos coordinados, sino simplemente sensibilizada a entradas nativas que pueden ser escasas y asincrónicas. El uso de SFO también tiene el potencial de abordar el desafío del hardware, ya que la sensibilidad a la luz de mayor orden de magnitud característica de las SFO, en teoría, podría permitir la administración de luz no penetrante en el cerebro, y la acción persistente de las SFO biestables tras apagarse la luz podría permitir ensayos de comportamiento sin

hardware. Sin embargo, las SFO conocidas (C128A, S, T y D156A) no son lo suficientemente estables como para producir fotocorriente constante tras una sola luz intermitente durante los muchos minutos requeridos para los ensayos de comportamientos complejos.

- 5 El documento WO 2010/056970 se refiere a SFO y a su uso para controlar las corrientes en una célula, por ejemplo, en entornos *in vivo* e *in vitro*.

Lo que se necesita, por lo tanto, es una herramienta optogenética que permita el ensayo directo de la hipótesis del equilibrio de E/I en la corteza prefrontal tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones que se mueven libremente. Dicha proteína activada por luz podría permitir la investigación del efecto de la modulación bidireccional del equilibrio de E/I celular prefrontal sobre conductas condicionadas e innatas relevantes para la disfunción cognitiva y social, así como investigar los efectos resultantes sobre la fisiología del circuito y la transmisión cuantitativa de la información.

Breve resumen de la invención

15 La invención, en su sentido más amplio, es como se define en las reivindicaciones independientes.

La presente invención proporciona un mamífero no humano que comprende una primera proteína del canal de cationes activada por luz, expresada en la membrana celular de las neuronas de la corteza prefrontal del mamífero, en el que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 95 % a la secuencia mostrada en una de SEQ ID NO: 1-4, y comprende una sustitución de Cys → Ser en una posición de aminoácido correspondiente al aminoácido 128 de SEQ ID NO: 1, y una sustitución de Asp → Ala en una posición de aminoácido correspondiente al aminoácido 156 de SEQ ID NO: 1, en el que la proteína es capaz de inducir corriente de despolarización en las neuronas mediante luz y presenta una rápida activación escalonada en respuesta a un único pulso de luz que tiene una primera longitud de onda y la desactivación en respuesta a un pulso de luz que tiene una segunda longitud de onda, en el que la corriente de despolarización en las neuronas se mantiene durante al menos diez minutos; y en el que la activación de la proteína en las neuronas de la corteza prefrontal induce cambios en los comportamientos sociales, comunicaciones y/o comportamientos condicionados en el mamífero.

30 La presente divulgación también establece ("proporciona") una serie de otros productos y métodos como los mencionados a continuación en el presente documento, que pueden facilitar la comprensión de la presente invención, lo que se define por las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento, se proporcionan células animales, animales no humanos, cortes cerebrales que comprenden células que expresan proteínas estabilizadas de opsina con función escalonada en sus membranas plasmáticas y métodos de uso de las mismas para despolarizar selectivamente las neuronas que residen en microcircuitos de la corteza prefrontal.

Por consiguiente, en el presente documento, se proporcionan animales no humanos que comprenden una primera proteína del canal de cationes activada por luz expresada en neuronas de la corteza prefrontal del animal, en los que la proteína es capaz de inducir corriente de despolarización en las neuronas mediante luz y presenta una rápida activación escalonada en respuesta a un único pulso de luz que tiene una primera longitud de onda y la desactivación en respuesta a un pulso de luz que tiene una segunda longitud de onda, en el que la corriente de despolarización en las neuronas se mantiene durante al menos aproximadamente diez minutos; y en los que la activación de la proteína en las neuronas de la corteza prefrontal induce cambios en los comportamientos sociales, comunicaciones y/o comportamientos condicionados en el animal.

En algunos aspectos, se proporciona un corte cerebral que comprende neuronas de la corteza prefrontal, en el que una proteína activada por luz se expresa en las neuronas de la corteza prefrontal, en el que la proteína es capaz de inducir corriente de despolarización en las neuronas mediante luz y presenta una rápida activación escalonada en respuesta a un único pulso de luz que tiene una primera longitud de onda y la desactivación en respuesta a un pulso de luz que tiene una segunda longitud de onda; en el que la corriente de despolarización en las neuronas se mantiene durante al menos aproximadamente diez minutos.

En otro aspecto, se proporciona un método de identificación de un compuesto químico que inhibe la despolarización de neuronas excitadoras e inhibidoras en la corteza prefrontal de un animal no humano, comprendiendo el método: (a) despolarizar neuronas excitadoras e inhibidoras en la corteza prefrontal de un animal no humano que comprende una primera proteína del canal de cationes activada por luz expresada en la membrana celular de las neuronas de la corteza prefrontal del animal, en el que la proteína es capaz de mediar una corriente de despolarización en las neuronas cuando las neuronas se iluminan con luz, en el que la proteína presenta una rápida activación escalonada en respuesta a un único pulso de luz que tiene una primera longitud de onda y la desactivación en respuesta a un pulso de luz que tiene una segunda longitud de onda; en el que la corriente de despolarización en las neuronas se mantiene durante al menos aproximadamente diez minutos; en el que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de ChR2, ChR1, VChR1 o VChR2 con sustituciones de aminoácidos en los restos de aminoácidos correspondientes a C128 y D156 de la secuencia de aminoácidos de ChR2; y en el que la activación de la proteína en las neuronas de la corteza prefrontal induce cambios en los comportamientos sociales, comunicaciones y/o

comportamientos condicionados en el animal; (b) medir un potencial postsináptico excitador (EPSP) o una corriente postsináptica inhibitoria (IPSC) en respuesta a la despolarización selectiva de las neuronas excitadoras que comprenden la proteína activada por luz; (c) poner en contacto las neuronas excitadoras o inhibitorias con un compuesto químico; y (d) medir el potencial postsináptico excitador (EPSP) o la corriente postsináptica inhibitoria (IPSC) para determinar si el contacto de las neuronas excitadoras con el compuesto químico inhibe la despolarización de las neuronas.

En otro aspecto, se proporciona un método de identificación de un compuesto químico que restablezca un comportamiento social, una comunicación y/o un comportamiento condicionado en un animal no humano, comprendiendo el método: (a) despolarizar neuronas excitadoras e inhibitorias en la corteza prefrontal de un animal no humano que comprende una primera proteína del canal de cationes activada por luz expresada en la membrana celular de las neuronas, en el que la proteína es capaz de inducir una corriente de despolarización en las neuronas cuando las neuronas se iluminan con luz, en el que la proteína presenta una rápida activación escalonada en respuesta a un único pulso de luz que tiene una primera longitud de onda y la desactivación en respuesta a un pulso de luz que tiene una segunda longitud de onda; en el que la corriente de despolarización en las neuronas se mantiene durante al menos aproximadamente diez minutos; y en el que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de ChR2, ChR1, VChR1 o VChR2 con sustituciones de aminoácidos en los restos de aminoácidos correspondientes a C128 y D156 de la secuencia de aminoácidos de ChR2, en el que la despolarización de la neurona excitadora inhibe uno o más comportamientos sociales, comunicaciones y/o comportamientos condicionados en el animal no humano; (c) administrar un compuesto químico al animal no humano; y (d) determinar si la administración del compuesto químico al animal no humano restablece dicho uno o más comportamientos sociales, comunicaciones y/o comportamientos condicionados en el animal no humano.

La presente divulgación se refiere al control óptico sobre trastornos del sistema nervioso (tales como trastornos asociados con la disfunción social), como se describe en el presente documento. Si bien la presente divulgación no se limita necesariamente a estos contextos, se pueden apreciar diversos aspectos de la divulgación a través de una descripción de los ejemplos que usan estos y otros contextos.

Diversas realizaciones de la presente divulgación se refieren a un sistema o método optogenético que correlaciona el control temporal, espacial y/o de tipo celular en un circuito neuronal con métricas medibles. Por ejemplo, diversas métricas o síntomas podrían estar asociados a un trastorno neurológico (tal como un trastorno neurológico que presenta diversos síntomas de disfunción social). El sistema optogenético se dirige a un circuito neuronal dentro de un sujeto/paciente para un control selectivo del mismo. El sistema optogenético implica controlar al sujeto/paciente para las métricas o los síntomas asociados con el trastorno neurológico. De esta manera, el sistema optogenético puede proporcionar información detallada sobre el circuito neuronal, su función y/o el trastorno neurológico.

De acuerdo con las realizaciones descritas en el presente documento, realizaciones particulares se refieren a estudiar y probar trastornos. Otras realizaciones se refieren a la identificación y/o al estudio de fenotipos y endofenotipos. Otras realizaciones más se refieren a la identificación de dianas de tratamiento.

Los aspectos de la presente divulgación se dirigen a la inducción artificial de estados de trastorno/enfermedad en una escala temporal rápida. Estos aspectos permiten el estudio de estados patológicos en animales por lo demás sanos. Esto puede ser particularmente útil para enfermedades que son poco conocidas y, por lo demás, difíciles de modelar con exactitud en animales vivos. Por ejemplo, puede ser difícil ensayar y/o estudiar estados patológicos debido a la falta de animales disponibles que muestren el estado patológico. Además, ciertas realizaciones permiten estados patológicos reversibles, que pueden ser particularmente útiles para establecer puntos de referencia/control para ensayar y/o probar los efectos de un tratamiento en el mismo animal cuando presenta el estado patológico y cuando no presenta el estado patológico. Existen otras diversas posibilidades, algunas de las cuales se describen con mayor detalle en el presente documento.

Los aspectos de la presente divulgación se dirigen al uso de un trastorno/estado patológico inducido artificialmente para el estudio de estados patológicos en animales que, por lo demás, estarían sanos. Esto puede ser particularmente útil para enfermedades que son poco conocidas y, por lo demás, difíciles de modelar con exactitud en animales vivos. Por ejemplo, puede ser difícil ensayar y/o estudiar estados patológicos debido a la falta de animales disponibles que muestren el estado patológico. Además, ciertas realizaciones permiten estados patológicos reversibles, que pueden ser particularmente útiles para establecer puntos de referencia/control para ensayar y/o probar los efectos de un tratamiento en el mismo animal cuando presenta el estado patológico y cuando no presenta el estado patológico.

Ciertos aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método que incluye la modificación (por ejemplo, elevando o reduciendo) de un equilibrio de excitación/inhibición (E/I) en un circuito neuronal diana de una corteza prefrontal de un sujeto/paciente. Por ejemplo, el equilibrio de E/I se cambia a un nivel que preserva la capacidad de respuesta del circuito neuronal diana a la actividad eléctrica intrínseca, mientras que los síntomas de un trastorno se aumentan temporalmente. Mientras se cambia el equilibrio de E/I, se introduce un estímulo al sujeto/paciente y se controlan los síntomas del trastorno. El sujeto puede ser un animal de ensayo que esté sano o un modelo animal de un trastorno. El resultado de la manipulación es una recapitulación transitoria de los síntomas de la enfermedad (en

un animal, por lo demás, sano) o el alivio de los síntomas (en un modelo animal de un trastorno neurológico). En ciertas realizaciones más específicas, el control de los síntomas también incluye la evaluación de la eficacia del estímulo para mitigar los síntomas del trastorno. Existen otras diversas posibilidades, algunas de las cuales se describen con mayor detalle en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Diversas realizaciones ilustrativas pueden entenderse de manera más completa considerando la siguiente descripción y el dibujo adjunto, en los que:

Fig. 1: propiedades cinéticas y de absorbancia de una SFO completamente estabilizada. **(A)** Espectros de absorbancia normalizados de ChR2 de tipo silvestre adaptada a la oscuridad, ChR2-C128S, ChR2-D156A y ChR2-C128S/D156A (SSFO). **(b-d)** Espectros de absorción registrados tras la iluminación con luz a 450 nm durante 30 segundos. Los espectros de diferencia de absorción tomados de los espectros de absorción correspondientes se muestran en las inserciones. Los espectros se recogieron en los tiempos indicados tras finalizar la iluminación; cabe señalar la recuperación destacada tras 3 minutos en los mutantes individuales, en contraste con el mutante doble, **(e)** Esquema de fotociclo simplificado; en mutantes C128/D156, la transición de P520 a P480 probablemente se ralentiza o bloquea, evitando el estado desensibilizado Des470 que no se puede reactivar con la luz de 470 nm, **(f - h)** Cambios de absorción monocromática registrados en la longitud de onda indicada antes, durante y después de la iluminación con luz de 450 nm para las tres variantes, destacando la estabilidad distinta del mutante doble.

FIG. 2 representa la modulación escalonada estable de la actividad neuronal en múltiples tipos de células *in vitro* e *in vivo*. **(a)** Espectros de activación (arriba a la izquierda) y de desactivación (abajo a la izquierda) registrados a partir de neuronas cultivadas que expresan ChR2 (C128S/D156A). Las barras horizontales grises indican pulsos de luz y los trazos de colores indican la longitud de onda de la luz usada en cada pulso de luz; se muestran los espectros de resumen (derecha) para las mediciones de activación y desactivación de ChR2 (C128S/D156A). **(b)** Ajustes monoexponenciales de la desintegración de la fotocorriente en células que expresan ChR2(C128S/D156A) (negro; $-t = 29,3$ min) o ChR2(D156A) (gris; $-t = 6,9$ min). **(c)** Registro representativo de pinzamiento zonal de células enteras de fotocorriente en neuronas de hipocampo cultivadas que expresan ChR2(C128S/D156A; "SSFO"). Las barras indican pulsos de luz de activación y desactivación; registro llevado a cabo en el entorno naturalista de las corrientes postsinápticas excitadoras sinápticas entrantes (epscs). **(d)** Respuestas de fotocorriente de células enteras de una neurona cultivada que expresa SSFO a pulsos de luz de 470 nm de potencia indicada (izquierda). Las longitudes de pulso fueron de 2 s (rastros de barra horizontal gris) o 5 s (rastros de barra horizontal negra). Las líneas discontinuas marcan la terminación del pulso de luz. Las constantes de tiempo para la activación (T) se muestran en un diagrama log-log frente a la potencia de la luz ($n = 27$ registros de 5 células; centro). Independientemente de la potencia de la luz, el número calculado de fotones incidentes que llegaban a cada célula para que las fotocorrientes alcanzaran la constante de curva exponencial (63 % de $I_{\text{máx}}$) para esa célula fue constante (derecha). Cada punto representa un número de fotones de un solo registro a una potencia de luz determinada (Métodos). **(e)** Configuración del registro de Optrods. Se acoplaron láseres de 470 nm y 561 nm a una fibra óptica a través de un acoplador de fibra. Se conectó un electrodo de tungsteno a la fibra óptica con una proyección de 400 μm 11 m más allá de la punta de la fibra y se avanzó hacia el cerebro. **(f)** La activación de neuronas excitadoras usando CaMKII α -SSFO en animales anestesiados eleva de manera estable la actividad neuronal dentro de los locus inyectados. Se representa un rastro ilustrativo marcado debajo de los mapas de calor de tasa de picos instantáneos calculados con la media móvil de 2 s. Cada línea de los mapas de calor representa un barrido a la profundidad indicada (3 barridos en cada sitio); los pulsos de activación de 470 nm y los pulsos de desactivación de 561 nm están indicados por barras azules y verdes, respectivamente. **(g)** La activación de interneuronas positivas en PV con PV::Cre/DIO-SSFO inhibe la actividad de la red local dentro de los locus inyectados. Se representa un rastro ilustrativo marcado debajo de los mapas de calor de tasa de picos instantáneos. **(h)** Tasas medias de picos de rastros que muestran diferencias significativas en la actividad antes y después de la estimulación antes de la activación, tras la activación y tras la desactivación en animales CK-SSFO (cuadrados) y PV::Cre/DIO-SSFO (círculos) ($n = 2$ ratones, > 5 sitios de registro por animal). **(i)** Registro representativo de 10 minutos de duración que demuestra la actividad sostenida de SSFO. Los mapas de calor de tasa de picos instantáneos se muestran para la actividad de unidades individuales aisladas indicadas como Neurona 1 y Neurona 2; las formas onduladas de las unidades indicadas se representan al lado de los rastros correspondientes.

FIG. 3 representa un equilibrio de E/I prefrontal elevado, pero no reducido, que conduce a un deterioro del comportamiento. **(a)** Se sometieron ratones de tipo silvestre o transgénicos PV::Cre inyectados con virus CaMKII α -SSFO, DIO-SSFO o CaMKII α -eYFP de control en mPFC e implantados crónicamente con conector de fibra óptica a ensayos de exploración social y de condicionamiento del miedo. **(b)** La imagen confocal de un ratón inyectado con el virus CaMKII α -SSFO-eYFP muestra la expresión en la corteza preliminar (PL) e infralímbica (IL). **(c)** Imágenes representativas de cortes prefrontales de ratones PV::Cre/DIO-SSFO y CaMKII α -SSFO teñidas para *c-fos* 90 min después de un pulso de luz de 470 nm de 2 s; Barra = 25 μm . El gráfico muestra los recuentos medios de células positivas en *c-fos* en mPFC de animales CaMKII α -SSFO y PV::Cre/DIO-SSFO. **(d)** Datos de resumen para la exploración social en ratones de control, ratones CaMKII α -SSFO y PV::Cre/DIO-SSFO de un intruso joven en la jaula de inicio. Los ratones CaMKII α -SSFO mostraron una reducción significativa en la exploración social. **(e)** Los ratones a los que se administró un pulso de luz de 470 nm de 2 s antes del

condicionamiento del miedo se ensayaron al día siguiente para determinar la parálisis en respuesta al contexto condicionado o a un indicio auditivo condicionado; Los ratones CaMKII α -SSFO se deterioraron significativamente en la respuesta de parálisis a ambos estímulos condicionados. Al día siguiente, los ratones se volvieron a condicionar sin estimulación óptica, y se evaluó la parálisis 24 h más tarde. Todos los ratones mostraron un comportamiento de parálisis similar en ausencia de luz. **(f)** La exploración de campo abierto es indistinguible en ratones de control CaMKII α -SSFO (azul) y CaMKII α -EYFP (gris), antes (Ensayo 1) y después (activación de la luz del ensayo). Se muestran ejemplos de seguimiento de animales que expresan CaMKII α -SSFO para el Ensayo 1 (parte superior) y el Ensayo dos (parte inferior). **(g)** La exploración de un nuevo objeto durante un período de 10 minutos es similar en ratones que expresan CaMKII α -SSFO (negro) y CaMKII α -EYFP (gris). **(h)** Imágenes de fluorescencia de secciones coronales de ratones de tipo silvestre inyectados con CaMKII α -SSFO en PFC (*parte superior*) o V1 (*parte inferior*). **(i)** El comportamiento social en el ensayo de 3 cámaras se ve afectado tras un pulso de luz de 470 nm de 2 s en ratones que expresan CaMKII α -SSFO en PFC ($n = 6$), pero no en ratones de control ($n = 8$) o ratones que expresan CaMKII α -SSFO en V1 ($n = 8$). Todos los gráficos de barras muestran la media \pm ETM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$). **(j)** Imágenes confocales de gran aumento de un corte cerebral coronal de 40 μ m de un ratón PV::Cre inyectado bilateralmente con virus AAV5-EF1 a-DIO-SSFO-EYFP dependiente de Cre y teñido con anticuerpos anti-parvalbúmina. Las flechas indican neuronas PV marcadas doblemente identificadas mediante el marcaje de EYFP unida a la membrana; la punta de la flecha muestra una neurona positiva en PV que no expresa niveles detectables de SSFO-EYFP. **(k)** Imagen confocal de baja potencia del mismo corte mostrado en **(j)**, que demuestra la expresión restringida espacialmente del virus DIO-SSFO en mPFC. **(l)** Porcentaje de células marcadas doblemente fuera de toda la población de células PV+ y de toda la población de células YFP+ contadas de pilas Z confocales de gran aumento ($n = 7$ cortes de 4 ratones; total de 617 células PV+ contadas, 191 células YFP+, 169 células marcadas doblemente). Este número coincide con $\sim 40\%$ de las neuronas PV que expresan Cre recombinasa en esta estirpe y aproximadamente el 50 % de la eficacia de transducción del virus. Dado que la expresión de PV no es uniforme a través de las células, algunas neuronas PV+ pueden expresar niveles no detectables de PV, pero, aún así, contener niveles suficientes de Cre para activar la expresión de DIO-SSFO. **(m)** Cuantificación de la inmunofluorescencia de c-fos en regiones corticales y subcorticales de animales inyectados unilateralmente con virus CaMKII α ::SSFO-EYFP (gris; $n = 2$ ratones) y controles inyectados unilateralmente con virus CaMKII α ::EYFP (gris claro; $n = 2$ ratones). Se muestran datos de los hemisferios ipsilateral (inyectado) y contralateral (no inyectado). Las barras de error indican la media \pm ETM; $p = 0,044$). **(n)** Dos rastros representativas que muestran la exploración en campo abierto en un ratón de control que expresa CaMKII α ::EYFP en mPFC, preactivación y postactivación con un pulso de luz de 473 nm de 2 s. Ni la velocidad de locomoción ni el tiempo dedicado a explorar el centro del campo abierto se alteró en animales CaMKII α ::SSFO y CaMKII α ::EYFP tras un pulso de luz de 473 nm de 2 s (parte inferior; $p > 0,1$, ambos en comparación con la preactivación; ensayo t de Student para muestras relacionadas), lo que indica que la activación de SSFO no es anxiogénica.

FIG. 4 Representa que la activación de SSFO en células piramidales aumenta la actividad de la red e impide la transmisión de la información a través de las neuronas principales, **(a)** Registro de células enteras de una neurona piramidal de la capa 2/3 que expresa SSFO en un corte cortical prefrontal de un ratón inyectado con AAV5-CaMKII α -SSFO-EYFP. La activación con luz de 470 nm desencadenó la despolarización de la célula registrada. El recuadro compara períodos de 2 segundos de preactivación (1), postactivación (2) y postdesactivación (3). **(b)** El registro de células enteras en una neurona piramidal sin expresión de un corte que expresa CaMKII α ::SSFO-EYFP muestra una actividad sináptica aumentada (parte superior) tras un pulso de luz 470 nm de 1 s, que se elimina mediante bloqueadores sinápticos excitadores CNQX (10 μ M) y APV (25 μ M; parte inferior). El recuadro compara la preactivación (1), la postactivación (2) y la postdesactivación (3) de la actividad. **(c)** Rastro de muestra que presenta la respuesta de una neurona piramidal representativa en un corte PV::SSFO (que expresa DIO-SSFO-EYFP) al inicio y durante la activación 5510 en células PV en el corte (entre los pulsos de luz azul y amarillo). El recuadro compara tres períodos de 5 s antes de la activación (1), después de la activación (2) y después de la desactivación (3). **(d)** Actividad de células PV tras la activación con SSFO.

FIG. 5 Representa un procesamiento de información celular deteriorado en un equilibrio DE E/I celular elevado pero no reducido. **(a)** Rastros representativos que muestran la respuesta de una célula representativa que expresa CaMKII α ::SSFO-eYFP a la inyección de un patrón definido idéntico de sEPSC antes (parte superior) y después (parte inferior) de la activación de luz azul. Se indica el potencial de membrana en reposo para cada rastro. **(b)** Curva de entrada-salida para una neurona piramidal que expresa SSFO, que muestra una respuesta reducida a mayores tasas de sEPSC tras la activación de SSFO (preestimulación: negro; postestimulación: gris; las barras de error muestran el ETM). **(c)** Reducción célula por célula de la información mutua transmitida (pico de EPSC) en 6 células piramidales individuales que expresan SSFO tras el pulso de 470 nm de 1 s. La IM media se muestra en negro (media \pm ETM; $p = 0,0063$, ensayo t de Student; reducción de la información mutua entre la tasa de picos y la tasa de sEPSC inyectadas obtenida en ventanas de 125 ms). **(d)** Rastros representativos que muestran las respuestas de una neurona piramidal de un corte que expresa DIO-SSFO-eYFP a una inyección idéntica de sEPSC como en una activación de luz azul anterior (parte superior) y posterior (parte inferior). Se indica el potencial de membrana en reposo para cada rastro, **(e)** Curva de entrada-salida para una neurona piramidal en un corte PV::SSFO, que muestra una reducción lineal en la ganancia tras la activación de SSFO en las neuronas PV (preestimulación: negro; postestimulación: azul; las barras de error muestran el ETM). **(f)** Datos de resumen célula por célula que no muestran una reducción significativa en la información transmitida por células piramidales, a pesar de la supresión de los picos, tras un pulso de 470 nm de 1 s que generó la activación de DIO-SSFO en las neuronas PV. La IM se muestra en negro. **(g)** Información mutua media entre las

células en condiciones iniciales frente a las condiciones activadas por SSFO en un intervalo de anchos de intervalo de tiempo usado para calcular la información mutua. Para estas comparaciones, el ancho del intervalo de velocidad de entrada de sEPSC se mantuvo constante a 50 Hz. Los asteriscos indican la importancia del cambio en la información mutua en condiciones activadas por SSFO. **(h)** Comparación del cambio medio en la información mutua (activación de SSFO menos el momento basal) en células registradas a partir de cortes que expresan CaMKII α ::SSFO o PV::SSFO. Los asteriscos indican la importancia de la diferencia en la magnitud del cambio en la información mutua para CaMKII α ::SSFO frente a PV::SSFO. **(i)** Igual que en **(g)**, pero con diferentes intervalos de velocidad de entrada de sEPSC. En este caso, el ancho del intervalo de tiempo se mantuvo constante a 125 ms. **(j)** Igual que en **(h)**, pero con diferentes intervalos de velocidad de entrada de sEPSC. Todos los gráficos de barras muestran la media \pm ETM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

FIG. 6 Representa que un elevado equilibrio de E/I celular en mPFC impulsa la ritmicidad de gamma inicial en ratones con problemas sociales que se mueven libremente. **(a)** Se implantó a ratones de tipo silvestre inyectados con CaMKII α ::SSFO o CaMKII α ::EYFP un conector de fibra óptica que no penetraba en el cerebro mediante una pequeña craneotomía en el momento de la inyección del virus. **(b)** Imagen representativa de la expresión vírica de SSFO-eYFP en la corteza PL en un ratón implantado con un conector de fibra óptica no penetrante en el cerebro. **(c)** Recuentos de células positivas en *c-fos* en PFC de ratones de control (CaMKII α ::EYFP) o ratones CaMKII α ::SSFO, 90 min después de la activación con un pulso de luz de 470 nm de 2 s. **(d)** Evaluación del comportamiento de parálisis en ratones implantados sin penetración en el cerebro que recibieron un pulso de luz de 470 nm de 2 s inmediatamente antes de la sesión de condicionamiento. La parálisis se midió inmediatamente después de la sesión de condicionamiento (inmediata), 24 horas después (Ensayo 1), y luego, 24 horas después de una segunda sesión de condicionamiento del miedo en la que no se administró luz (Ensayo 2). **(e)** Se midió la exploración social sin activación de luz (Ensayo 1) o tras un pulso de luz de 470 nm de 2 s (Ensayo 2). **(f)** Optrodo crónico implantable en múltiples sitios (OCM) para registros de comportamiento al despertar en ratones M2 y PFC. Las puntas de flecha indican sitios de terminación de cable; la flecha muestra el extremo cortado del conector de fibra óptica. **(g)** Las lesiones electrolíticas marcan los sitios de los que se tomaron los registros en un ratón con expresión de CaMKII α ::SSFO. **(h)** Se realizaron la exploración social (*izquierda*) y exploración de objetos nuevos (*derecha*) antes (barra vertical izquierda gris) y después (barra vertical derecha azul) de la activación con luz de 470 nm en los tres ratones en los que se realizaron registros de CMO ($n = 3$ ratones). **(i)** Actividad de múltiples unidades desde dos canales registrados simultáneamente durante un protocolo de activación/desactivación. Se administró luz azul y luz amarilla como se indica. Los canales con una modulación de múltiples unidades significativa (parte inferior) se seleccionaron para el análisis espectral. **(j)** Aumento medio de la velocidad de MUA en canales dentro de la región de expresión (barra vertical derecha azul; $n = 4$ canales en 3 ratones), en comparación con canales que estaban fuera de la región de expresión (barra vertical izquierda gris; $n = 4$ canales en 3 ratones). **(k)** Espectrograma de ondículas de LFP de un canal no modulado. Se muestran rastros ilustrativos para los períodos inicial, de activación y de desactivación. Se muestran los espectros medios de ondículas para los tres períodos indicados ($n = 5$ ensayos en 1 ratón) y los datos de población de cambio de potencia en 3 intervalos de frecuencia (recuadro; $n = 3$ ratones). **(l)** Espectrograma de ondículas de LFP de un canal modulado. Se muestran rastros ilustrativos para los períodos inicial, de activación y de desactivación. Se muestran los espectros medios de ondículas para los tres períodos indicados ($n = 5$ ensayos en 1 ratón) y los datos de población (recuadro; $n = 3$ ratones), que demuestran un aumento específico de la ritmicidad gamma tras la activación de SSFO en las neuronas piramidales PFC. Todos los gráficos de barras muestran la media \pm ETM. Los espectros de potencia de **(k)**, **(l)** son las medias de 5 ensayos, las áreas sombreadas indican la desviación típica entre los registros. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$).

FIG. 7 Representa el comportamiento locomotor en un nuevo ensayo de comportamiento en campo abierto. **(a)** Comportamiento en campo abierto de ratones que expresan CaMKII α ::SSFO antes de la activación de mPFC (barras de color gris oscuro; 2,5 min) y después de la activación (barras de color gris claro; 2,5 min) con luz de 473 nm de 1 s. Duración del rastreo, se muestran el % de tiempo en el centro y el % de tiempo en la periferia ($n = 3$ ratones). Se aplicó un pulso de luz amarilla tras el segundo período de 2,5 min para desactivar la SSFO. **(b)** Media de los espectros de potencia, preactivación (negro), postactivación (gris oscuro) y postdesactivación (gris claro) medidas de canales determinados como surgidos de electrodos colocados en la región de mPFC que expresa el virus ($n = 3$ ratones, las áreas sombreadas indican el ETM entre los ratones). **(c)** Media de los espectros de potencia medidos de canales en **i** durante el ensayo de comportamiento social en ensayos sin activación por luz de SSFO (gris) y con activación por luz (gris claro). **(d)** Como en **(b)**, para experimentos de exploración de nuevos objetos ($n = 3$ ratones, las áreas sombreadas indican el ETM entre los ratones). Cabe señalar que los canales no modulados no mostraron cambios significativos en el espectro de potencia tras la activación por luz.

FIG. 8 Representa el aumento de la potencia a la frecuencia gamma bajo alta densidad de luz. **(a)** Experimento de fijación de voltaje con espectros correspondientes para IPSC registrados a 0 mV y para EPSC a -60 mV. **(b)** Cambio en la potencia de la actividad sináptica dentro de los intervalos de frecuencia indicados registrados en neuronas piramidales mPFC durante un pulso de luz de 560 nm de 20 s en las densidades de potencia de luz indicadas. Las diferencias de potencia se muestran entre el período inicial (previo a la luz) y el período de encendido cuando la fijación del voltaje de las células a -60 mV o 0 mV, o en el modo de fijación de la corriente (CC). La modulación gamma más potente se hace evidente a la densidad de potencia de luz más alta, y es más potente en los registros de 0 mV y CC. **(c)** Potencia gamma relativa para las tres potencias de luz en las configuraciones de registro de **(b)**.

FIG. 9 Representa la inhibición de las células excitadoras o inhibitoras de PFC, **(a)** se ensayaron ratones de tipo

silvestre inyectados bilateralmente con CaMKII α ::eNpHR3.0, ratones PV::Cre inyectados bilateralmente con EF1 α ::D 10-eNpHR3.0 y ratones de control inyectados bilateralmente con CaMKII α -EYFP en la exploración social en jaula doméstica (**a**; $n = 6$ para todas las condiciones) y el ensayo social de tres cámaras (**b**; $n = 3, 5$ y 6 , respectivamente). El comportamiento social en la jaula doméstica no se vio afectado en estas condiciones (**a**; $p > 0,5$ para ambos grupos NpHR3.0 en comparación con los controles, ensayo t de Student de muestras no relacionadas) y los tres grupos mostraron una preferencia social similar en el ensayo social de tres cámaras (**b**; $p > 0,5$ para ambos grupos NpHR3.0 en comparación con los controles, ensayo t de Student de muestras no relacionadas) y prefirieron significativamente la cámara social (**b**; $p < 0,05$, ensayo t de Student para muestras relacionadas). Debido a la penetración de la expresión, se espera que la inhibición de las células PV en estos experimentos deje actividad en la gran mayoría de las neuronas inhibitoras (e incluso las neuronas PV) sin cambios.

FIG. 10 Representa la optogenética combinatoria en el comportamiento de los mamíferos: rescate de un comportamiento social de equilibrio de E/I elevado. (**a**) Espectros de acción de SSFO y C1V1-E122T/E162T (C1V1). Las líneas verticales indican las longitudes de onda de estimulación usadas en los experimentos. (**b**) Diseño del experimento y patrones de pulso; el control sin luz se usó para el comportamiento inicial; se usó luz a 470 nm de 2 s para activar la SSFO, activando transitoriamente C1V1 solo durante el pulso de luz; Se usaron 10 Hz a 470 nm para activar conjuntamente SSFO y C1V1; de 10 Hz a 590 nm solo activó C1V1. (**c**) Los ratones con expresión de CaMKII α ::SSFO mostraron preferencia social significativa al inicio, pero presentaron disfunción social tras la activación de 470 nm de 2 s o durante la activación de 10 Hz a 470 nm. (**d**) Los ratones con expresión tanto de CaMKII α ::SSFO como de (DIO) PV::C1V1 mostraron un comportamiento social alterado tras un pulso de 470 nm de 2 s, pero mostraron un comportamiento social restablecido durante la estimulación con luz de 10 Hz a 470 nm. La activación de C1V1 solo con pulsos de 10 Hz a 590 nm no afectó al comportamiento social.

FIG. 11 Representa el control óptico combinatorio del equilibrio de E/I celular de mPFC: experimentos de control. Los diagramas ilustran los protocolos de estimulación de la luz usados en 4 experimentos diferentes usando ratones CaMKII α ::YFP. En los cuatro experimentos, la estimulación con luz no tuvo ningún efecto sobre la preferencia significativa de estos ratones de control para pasar tiempo en la cámara en la que se encontraba el nuevo ratón conespecífico ($n = 8$ ratones).

FIG. 12 Representa un diagrama de flujo para ensayar un modelo de enfermedad, en consonancia con 10 realizaciones diferentes de la presente divulgación.

FIG. 13 Representa un modelo para evaluar tratamientos de diversos trastornos del sistema nervioso, en consonancia con una realización de la presente divulgación.

Aunque la presente divulgación es susceptible de diversas modificaciones y formas alternativas, se han mostrado detalles de la misma a modo de ejemplo en los dibujos, y se describirán en detalle. Debería entenderse, sin embargo, que no se pretende limitar la presente divulgación a las realizaciones descritas en particular. Por el contrario, la intención es cubrir todas las modificaciones, los equivalentes y las alternativas que pertenezcan al alcance de la presente divulgación, incluyendo los aspectos definidos en las reivindicaciones.

Descripción detallada

La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, células animales, animales no humanos, cortes cerebrales que comprenden células que expresan proteínas estabilizadas de opsina en sus membranas plasmáticas y métodos de uso de las proteínas estabilizadas de opsina con función escalonada para despolarizar selectivamente las neuronas excitadoras o inhibitoras que residen en el mismo microcircuito de la corteza prefrontal. Las opsinas de función escalonada o SFO, son proteínas del canal de cationes activadas por la luz ChR2 que pueden inducir estados excitables estables y prolongados en las neuronas al exponerlas a la luz azul y luego revertirse al exponerlas a la luz verde o amarilla. Las SFO se desarrollaron para implementar cambios biestables en la excitabilidad de poblaciones diana que funcionan en escalas de tiempo de hasta 4 órdenes de magnitud superiores que las de ChR2 de tipo silvestre (WT) para una modulación de estado más estable (SFO: hasta 10-100 segundos). Si bien estos genes de opsina proporcionaron un nuevo tipo de control optogenético complementario al de las canalrodopsinas convencionales diseñadas para controlar potenciales de acción individuales, la escala temporal seguía sin ser adecuada para evaluar comportamientos de mamíferos prolongados y complejos durante muchos minutos.

El trabajo posterior de los inventores ha desarrollado aún más el concepto inicial de SFO, con la mutación de la pareja de red de protones de C128 D156 para una extensión adicional del fotociclo y la vida útil del estado abierto. Esta proteína "de opsina estabilizada de función escalonada" (SSFO) posee propiedades fisicoquímicas únicas que permiten la manipulación experimental de elevaciones de E/I corticales y la capacidad de controlar las oscilaciones gamma en cortes corticales. Esta nueva herramienta, conocida como una opsina estabilizada de función escalonada (SSFO), permite la modulación de circuitos estables durante periodos de tiempo que son suficientes para experimentos de comportamiento complejos y temporalmente exactos durante muchos minutos en ausencia de activación continua de la luz, accesorios externos de fibra óptica e, incluso, sin ningún hardware óptico de penetración en el cerebro en absoluto. Además, debido a los fenómenos de integración de fotones - una propiedad que hace que las neuronas que expresan la SSFO sean extremadamente sensibles a la luz -, las células que expresan estas proteínas en sus membranas plasmáticas pueden activarse con pulsos de luz que pueden tener una

densidad de potencia de luz en el intervalo bajo de $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ y al menos 3 mm de profundidad en el tejido cerebral desde la fuente de luz. Estas proteínas de opsina de función escalonada y sensibles a la luz únicas pueden expresarse en circuitos neuronales excitadores o inhibidores, Tales como en la corteza prefrontal de animales no humanos, que luego pueden despolarizarse en respuesta a luz que tenga determinadas longitudes de onda, permitiendo la manipulación experimental de los equilibrios de E/I corticales. Además, se pueden usar cortes cerebrales de animales no humanos que contengan neuronas excitadoras o inhibidoras corticales que expresen las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada desveladas en el presente documento para buscar compuestos químicos que puedan inhibir selectivamente la despolarización de neuronas bien excitadoras o inhibidoras que residen dentro de un circuito neuronal. Estas neuronas corticales pueden ser responsables de o participar en los defectos del comportamiento social y cognitivo asociados con trastornos neurológicos tales como la esquizofrenia y/o el trastorno del espectro autista.

Técnicas generales

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

Definiciones

Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "el" y "ella" incluyen las referencias en plural a menos que se indique lo contrario.

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

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

Se pretende que cada limitación numérica máxima dada a lo largo de la presente memoria descriptiva incluya cada limitación numérica inferior, como si dichas limitaciones numéricas inferiores estuvieran escritas expresamente en el presente documento. Cada limitación numérica mínima dada a lo largo de la presente memoria descriptiva incluirá cada limitación numérica superior, como si dichas limitaciones numéricas superiores estuvieran expresamente escritas en el presente documento. Cada intervalo numérico dado a lo largo de la presente memoria descriptiva incluirá cada intervalo numérico menor que se encuentre dentro de un intervalo numérico más amplio, como si dichos intervalos numéricos menores estuvieran todos expresamente escritos en el presente documento.

Proteínas SSFO y células que las expresan

Las SFO previamente descritas aprovechan la cinética de desactivación de canales más lenta, introducida por la mutación de ChR2-C128, que se escogió basándose en la homología entre la canalrodopsina-2 (ChR2) y la bacteriorrodopsina (BR), de manera que mutaciones similares generaron una desaceleración moderada del fotociclo. T90, el homólogo de BR de ChR2-C128, está unido por hidrógeno a D115 de BR; se cree que estos dos aminoácidos funcionan conjuntamente para estabilizar la configuración totalmente transgénica del cromóforo retiniano, y ChR2-D156 es el homólogo de BR D115. Si C128 y D156 modulan el cierre de ChR2 únicamente a través de su presunto enlace de hidrógeno compartido, no cabría esperar que una mutación de combinación de estos dos restos generara efectos en la cinética del canal significativamente superiores a los de cualquiera de las mutaciones solas. Sin embargo, en contra de las expectativas, las neuronas que expresan el mutante doble ChR2-C128S/D156A dieron lugar a fotocorrientes sostenidas que fueron mucho más estables que las de las células que expresaban un único mutante solo.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos sustituidos o mutadas, en los que la proteína mutante conserva la naturaleza característica activable por luz de la proteína SFO

precursora, pero también puede poseer propiedades alteradas en algunos aspectos específicos. Por ejemplo, las proteínas SFO activadas por luz mutantes descritas en el presente documento pueden presentar un nivel de expresión aumentado tanto dentro de una célula animal como en la membrana plasmática de la célula animal; un nivel aumentado de fotocorrientes sostenidas en respuesta a una primera longitud de onda de luz; una desactivación más rápida, pero menos completa, cuando se expone a una segunda longitud de onda de luz; y/o una combinación de rasgos mediante los que la proteína SFO posee las propiedades de baja desensibilización, desactivación rápida y/o expresión potente en células animales.

Las proteínas SFO activadas por luz que comprenden sustituciones o mutaciones de aminoácidos incluyen aquellas en las que uno o más restos de aminoácidos han sufrido una sustitución de aminoácido a la vez que conservan la capacidad de responder a la luz y la capacidad de controlar el estado de polarización de una membrana plasmática. Por ejemplo, las proteínas activadas por luz que comprenden sustituciones o mutaciones de aminoácidos se pueden crear sustituyendo uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4. En algunas realizaciones, la divulgación incluye proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos modificadas en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4, en las que la proteína de opsina estabilizada de función escalonada activada por luz modificada conserva la naturaleza activada por luz característica y/o la capacidad de regular el flujo iónico a través de las membranas plasmáticas de la proteína con la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4, pero puede tener propiedades modificadas en algunos aspectos específicos.

Las sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína nativa pueden ser conservativas o no conservativas, y dichos restos de aminoácido sustituidos pueden o no ser uno codificado por el código genético. El "alfabeto" convencional de veinte aminoácidos se divide en familias químicas basadas en las propiedades químicas de sus cadenas laterales. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales que tienen grupos aromáticos (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es aquella en la que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral químicamente similar (es decir, que reemplaza un aminoácido que posee una cadena lateral básica por otro aminoácido con una cadena lateral básica). Una "sustitución de aminoácidos no conservativa" es aquella en la que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral químicamente diferente (es decir, que reemplaza un aminoácido que tiene una cadena lateral básica por un aminoácido que tiene una cadena lateral aromática). Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservativas o no conservativas. Además, las sustituciones de aminoácidos pueden estar situadas en el bolsillo de unión a la retina de SFO, en uno o más de los dominios de bucle intracelular de SFO y/o tanto en el bolsillo de unión a la retina como en los dominios de bucle intracelular.

En el presente documento, se proporcionan, por lo tanto, proteínas de tipo opsina estabilizadas de función escalonada activadas por luz que pueden tener sustituciones de aminoácidos específicos en posiciones clave de todo el bolsillo de unión a la retina de la proteína. Para obtener información sobre el bolsillo de unión a la retina de polipéptidos sensibles a la luz, Véase Greenhalgh *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268, 20305-20311 (1993). En algunos aspectos, la proteína SFO puede tener una mutación en el resto de aminoácido C128 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la proteína SFO puede tener una mutación en el resto de aminoácido D156 de SEQ ID NO: 1. La proteína SFO puede tener una mutación en ambos restos de aminoácidos C128 y D156 de SEQ ID NO: 1 (SSFO). En algunos aspectos, cada una de las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada mutantes desveladas puede tener propiedades y características específicas para su uso en la despolarización de la membrana de una célula animal en respuesta a la luz.

Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona una proteína SSFO activada por luz expresada en una membrana plasmática celular capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando la célula se ilumina con luz, en el que la proteína presenta una rápida activación escalonada en respuesta a un único pulso de luz que tiene una primera longitud de onda y la desactivación en respuesta a un pulso de luz que tiene una segunda longitud de onda; en el que la corriente de despolarización en la célula se mantiene durante hasta aproximadamente cinco, aproximadamente diez, aproximadamente quince o aproximadamente veinte minutos. En algunas realizaciones, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de ChR2, ChR1, VChR1 o VChR2 con sustituciones de aminoácidos en los restos de aminoácidos correspondientes a C128 y D156 de la secuencia de aminoácidos de ChR2 (véase, *por ejemplo*, la Figura 1B de la publicación de la solicitud de patente internacional n.º WO 2009/131837, que ilustra la conservación de restos de aminoácidos correspondientes a C128 y D156 de la secuencia de aminoácidos de ChR2 entre varias especies de canales de cationes de canalrodopsina; Véase también Kianianmomeni *et al.*, *Plant Physiol*, 2009, 151:347-356). En otros aspectos, la proteína SSFO activada por luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 sin la secuencia del péptido señal. En otros aspectos, la proteína SSFO activada por luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %,

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, la proteína SSFO activada por luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2. En otros aspectos, la proteína SSFO activada por luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3. En otra realización, la proteína SSFO activada por luz puede comprender una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, la secuencia del péptido señal de las proteínas SSFO se elimina o se sustituye con una secuencia de péptido señal de una proteína diferente. En algunos aspectos, la sustitución en los restos de aminoácido correspondientes a C128 y D156 de la secuencia de aminoácidos de Chr2 son sustituciones de aminoácidos conservativas. En otros aspectos, la sustitución en los restos de aminoácidos correspondientes a C128 y D156 de la secuencia de aminoácidos de Chr2 son sustituciones de aminoácidos no conservativas.

En algunos aspectos, la sustitución en el resto de aminoácido correspondiente a C128 de la secuencia de aminoácidos de Chr2 es una sustitución de serina. En otros aspectos, la sustitución en el resto de aminoácido correspondiente a D156 de la secuencia de aminoácidos de Chr2 es una sustitución de un aminoácido no ácido. En otro aspecto, la sustitución en el resto de aminoácido correspondiente a D156 de la secuencia de aminoácidos de Chr2 es una sustitución de alanina. En algunos aspectos, la proteína puede comprender además una proteína fluorescente C-terminal. En algunos aspectos específicos, la proteína fluorescente C-terminal se puede potenciar con la proteína fluorescente amarilla (EYFP), la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína cian fluorescente (CFP) o la proteína roja fluorescente (RFP). En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede ser capaz de mediar una corriente hiperpolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz. En algunos aspectos, la segunda proteína activada por luz puede ser NpHR, eNpHR2.0, eNpHR3.0, eNpHR3.1, GtR3 o una proteína quimérica C1V1 como se describe en la solicitud de patente internacional n.º: PCT/US2011/028893, y en las solicitudes de patente provisionales de EE.UU. n.º: 61/410.736 y 61/410.744.

En algunos aspectos, la proteína quimérica C1V1 comprende una proteína activada por luz expresada en la membrana celular, en los que la proteína es una proteína quimérica derivada de VChR1 de *Volvox carteri* y ChR1 de *Chlamydomonas reinhardtii*, en los que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de VChR1, que tiene al menos la primera y la segunda hélices transmembrana reemplazadas por la primera y la segunda hélices transmembrana de ChR1; es sensible a la luz; y es capaz de mediar una corriente de despolarización en la célula cuando se ilumina la célula con luz. En algunos aspectos, la proteína comprende además un reemplazo dentro del dominio de bucle intracelular situado entre la segunda y tercera hélice transmembrana de la proteína quimérica sensible a la luz, en los que al menos una parte del dominio de bucle intracelular se reemplaza por la parte correspondiente de ChR1. En otra realización, la parte del dominio de bucle intracelular de la proteína quimérica C1V1 se reemplaza por la parte correspondiente de la ChR1 que se extiende hasta el resto de aminoácido A145 de ChR1. En otros aspectos, la proteína quimérica C1V1 comprende además un reemplazo dentro de la tercera hélice transmembrana de la proteína quimérica sensible a la luz, en los que al menos una parte de la tercera hélice transmembrana se reemplaza por la secuencia correspondiente de ChR1. En otro aspecto, la parte del dominio de bucle intracelular de la proteína quimérica C1V1 se reemplaza por la parte correspondiente de la ChR1 que se extiende hasta el resto de aminoácido W163 de ChR1.

En algunos aspectos de las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada proporcionadas en el presente documento, la luz que tiene una primera longitud de onda puede ser luz azul. En otros aspectos, dicha luz que tiene una primera longitud de onda puede ser de aproximadamente 445 nm. En otro aspecto, dicha luz que tiene una segunda longitud de onda puede ser luz verde o luz amarilla. En otros aspectos, dicha luz que tiene una segunda longitud de onda puede ser de aproximadamente 590 nm. En otros aspectos, dicha luz que tiene una segunda longitud de onda puede ser de aproximadamente 390-400 nm, ambos inclusive, así como también cada número perteneciente a este intervalo. En algunos aspectos, las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada activadas por luz descritas en el presente documento pueden activarse mediante pulsos de luz que pueden tener una duración de cualquiera entre aproximadamente 1 milisegundo (ms), aproximadamente 2 ms, aproximadamente 3 ms, aproximadamente 4 ms, aproximadamente 5 ms, aproximadamente 6 ms, aproximadamente 7 ms, aproximadamente 8 ms, aproximadamente 9 ms, aproximadamente 10 ms, aproximadamente 15 ms, aproximadamente 20 ms, aproximadamente 25 ms, aproximadamente 30 ms, aproximadamente 35 ms, aproximadamente 40 ms, aproximadamente 45 ms, aproximadamente 50 ms, aproximadamente 60 ms, aproximadamente 70 ms, aproximadamente 80 ms, aproximadamente 90 ms, aproximadamente 100 ms, aproximadamente 200 ms, aproximadamente 300 ms, aproximadamente 400 ms, aproximadamente 500 ms, aproximadamente 600 ms, aproximadamente 700 ms, aproximadamente 800 ms, aproximadamente 900 ms, aproximadamente 1 s, aproximadamente 1,25 s, aproximadamente 1,5 s o aproximadamente 2 s, ambos inclusive, incluyendo cualquier tiempo entre estos números. En algunos aspectos, las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada activadas por luz descritas en el presente documento pueden activarse mediante pulsos de luz que pueden tener una densidad de potencia de luz de cualquiera de entre aproximadamente 1 $\mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente 2 $\mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente 3 $\mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente 4 $\mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente 5 $\mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente 6 $\mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente 7 $\mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente 8 $\mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente 9 $\mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente 10 $\mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente 11 $\mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente 12

$\mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $13 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $14 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $15 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $16 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $17 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $18 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $19 \mu\text{W mm}^{-2}$ o aproximadamente $20 \mu\text{W mm}^{-2}$, ambos inclusive, incluyendo cualquier valor entre estos números.

5 En otros aspectos, las proteínas activadas por luz pueden activarse mediante pulsos de luz que pueden tener una densidad de potencia de luz de cualquiera de entre aproximadamente 1 mW mm^{-2} , aproximadamente 2 mW mm^{-2} , aproximadamente 3 mW mm^{-2} , aproximadamente 4 mW mm^{-2} , aproximadamente 5 mW mm^{-2} , aproximadamente 6 mW mm^{-2} , aproximadamente 7 mW mm^{-2} , aproximadamente 8 mW mm^{-2} , aproximadamente 9 mW mm^{-2} , aproximadamente 10 mW mm^{-2} , aproximadamente 11 mW mm^{-2} , aproximadamente 12 mW mm^{-2} , aproximadamente
10 13 mW mm^{-2} , aproximadamente 14 mW mm^{-2} , aproximadamente 15 mW mm^{-2} , aproximadamente 16 mW mm^{-2} , aproximadamente 17 mW mm^{-2} , aproximadamente 18 mW mm^{-2} , aproximadamente 19 mW mm^{-2} , aproximadamente 20 mW mm^{-2} , aproximadamente 21 mW mm^{-2} , aproximadamente 22 mW mm^{-2} , aproximadamente 23 mW mm^{-2} , aproximadamente 24 mW mm^{-2} , o aproximadamente 25 mW mm^{-2} , ambos inclusive, incluyendo cualquier valor entre estos números.

15 En algunos aspectos, las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada activadas por la luz descritas en el presente documento pueden mantener una fotocorriente sostenida durante aproximadamente 20 minutos. En otros aspectos, las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada activadas por la luz descritas en el presente documento pueden mantener una fotocorriente sostenida para cualquiera de aproximadamente 10, 11, 12,
20 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 minutos, ambos inclusive, incluyendo cualquier tiempo entre estos números. En otros aspectos, la progresión del fotociclo de cualquiera de las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada activadas por luz descritas en el presente documento se bloquea por completo cuando la proteína se ilumina con dicho único pulso de luz que tiene una primera longitud de onda.

25 En algunos aspectos de las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada activadas por luz descritas en el presente documento, la célula puede ser una célula de mamífero. En algunos aspectos, la célula animal puede ser una célula neuronal, una célula cardíaca o una célula madre. En algunos aspectos, la célula animal puede ser una célula neuronal. En otros aspectos, las células animales comprenden neuronas que afectan al comportamiento social cuando se despolarizan. En algunos aspectos, la célula neuronal es una neurona que cambia el comportamiento
30 social innato y/o el comportamiento condicionado cuando se despolariza. En otros aspectos, las células animales comprenden neuronas que dan lugar a defectos sociales y cognitivos en el autismo y/o la esquizofrenia cuando se despolarizan. En otros aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona excitadora situada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona excitadora puede ser una neurona piramidal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona inhibidora situada en la corteza prefrontal de un animal
35 no humano. En otros aspectos más, la neurona inhibidora puede ser una neurona de parvalbúmina. En algunos aspectos, las neuronas inhibidoras y excitadoras pueden estar en un animal vivo no humano.

En otros aspectos de las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada activadas por luz, las células pueden ser neuronas de una corte cerebral vivo de un animal no humano. En algunos aspectos, los cortes
40 cerebrales son cortes cerebrales coronales. En algunos aspectos, los cortes cerebrales son de la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, los cortes cerebrales comprenden neuronas que afectan al comportamiento social cuando se despolarizan. En algunos aspectos, los cortes cerebrales comprenden neuronas que cambian el comportamiento social innato y/o el comportamiento condicionado cuando se despolarizan. En otros aspectos, los cortes cerebrales comprenden neuronas que dan lugar a defectos sociales y cognitivos en el autismo
45 y/o la esquizofrenia cuando se despolarizan.

En algunos aspectos, las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada descritas en el presente documento pueden modificarse mediante la adición de uno o más motivos de secuencia de aminoácidos que potencien el transporte a las membranas plasmáticas de células de mamífero. Las proteínas de opsina activadas por
50 luz se derivan de organismos evolutivamente más sencillos y, por lo tanto, pueden no ser expresadas o toleradas por células de mamífero, o pueden presentar una ubicación subcelular alterada cuando se expresan a niveles elevados en células de mamífero. Por consiguiente, en algunos aspectos, las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada descritas en el presente documento pueden fusionarse a uno o más motivos de secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en un péptido señal, una señal de exportación de retículo
55 endoplasmático (RE), una señal de tráfico de membrana y una señal de exportación de Golgi N-terminal. El uno o más motivos de secuencia de aminoácidos que potencian las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada activadas por luz que se transportan a las membranas plasmáticas de las células de mamífero se pueden fusionar al extremo N, al extremo C o tanto al extremo N como al extremo C de la proteína activada por luz. Opcionalmente, la proteína activada por luz y uno o más motivos de secuencia de aminoácidos pueden estar
60 separados por un enlazador. En algunos aspectos, la proteína de opsina estabilizada con función escalonada se modifica mediante la adición de una señal de tráfico (ts) que potencia el transporte de la proteína a la membrana plasmática celular. En algunos aspectos, la señal de tráfico se deriva de la secuencia de aminoácidos del canal de potasio rectificador hacia adentro humano $\text{Kir}2.1$. En algunos aspectos, la señal de tráfico comprende la secuencia de aminoácidos $\text{KSRITSEGEYIPLDQIDINV}$. En otros aspectos, la proteína de opsina estabilizada con función
65 escalonada activada por luz se modifica mediante la adición de un péptido señal (por ejemplo, que potencia el transporte a la membrana plasmática). El péptido señal se puede fusionar con el extremo C de la secuencia de

aminoácidos del núcleo o se puede fusionar con el extremo N de la secuencia de aminoácidos del núcleo. En algunos aspectos, el péptido señal se une a la secuencia de aminoácidos del núcleo mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400 o 500 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos, el péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVNGSVLPEDQCYCAGWIESRGTNG. En otros aspectos, la proteína de opsina estabilizada con función escalonada activada por luz se modifica mediante la adición de una señal de exportación de retículo endoplasmático (RE). La señal de exportación de RE se puede fusionar con el extremo C de la secuencia de aminoácidos del núcleo o se puede fusionar con el extremo N de la secuencia de aminoácidos del núcleo. En algunos aspectos, la señal de exportación de RE se une a la secuencia de aminoácidos del núcleo mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquiera de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400 o 500 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos, la señal de exportación de RE comprende la secuencia de aminoácidos FXYENE, en la que X puede ser cualquier aminoácido. En algunos aspectos, la señal de exportación de RE comprende la secuencia de aminoácidos VXXSL, en la que X puede ser cualquier aminoácido. En algunos aspectos, la señal de exportación de RE comprende la secuencia de aminoácidos FCYENEV.

Células animales, animales no humanos y cortes cerebrales

En el presente documento, se proporcionan células que comprenden las proteínas quiméricas activadas por la luz desveladas en el presente documento. En algunos aspectos, las células son células animales. En algunos aspectos, las células animales comprenden la proteína correspondiente a la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos, las células animales comprenden las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada desveladas en el presente documento. En un aspecto, la célula animal puede ser una célula neuronal. En algunos aspectos, las células animales son de la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, las células animales comprenden neuronas que afectan al comportamiento social cuando se despolarizan. En algunos aspectos, la célula neuronal es una neurona que cambia el comportamiento social innato y/o el comportamiento condicionado cuando se despolariza. En otros aspectos, las células animales comprenden neuronas que dan lugar a defectos sociales y cognitivos en el autismo y/o la esquizofrenia cuando se despolarizan. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona excitadora situada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otras realizaciones, la neurona excitadora puede ser una neurona piramidal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona inhibidora situada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos más, la neurona inhibidora puede ser una neurona de parvalbúmina.

También se proporcionan en el presente documento animales no humanos que comprenden las proteínas desveladas en el presente documento. En algunos aspectos, los animales no humanos comprenden la proteína correspondiente a la SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, los animales comprenden las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada desveladas en el presente documento. En algunos aspectos, los animales que comprenden las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada desveladas en el presente documento expresan transgénicamente dichas proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada. En otros aspectos, los animales que comprenden las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada descritas en el presente documento se han transfectado víricamente con un vector que porta las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada, tal como, pero sin limitación, un vector adenovírico. En algunos aspectos, los animales que comprenden las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada desveladas en el presente documento presentan cambios en el comportamiento cuando dichas proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada se despolarizan mediante la activación con luz. En otros aspectos, los animales que comprenden las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada desveladas en el presente documento presentan cambios en los comportamientos sociales innatos y aprendidos cuando dichas proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada se despolarizan mediante la activación con luz. En otros aspectos, los animales que comprenden las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada desveladas en el presente documento presentan cambios en los comportamientos condicionados cuando dichas proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada se despolarizan mediante la activación con luz.

En el presente documento, se proporcionan cortes cerebrales vivos de un animal no humano que comprende las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada descritas en el presente documento. En algunos aspectos, los cortes de cerebro son de animales no humanos que expresan transgénicamente las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada descritas en el presente documento. En otros aspectos, los cortes de cerebro son de animales no humanos que han sido transfectados víricamente con un vector que porta dichas proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada tales como, pero sin limitación, un vector adenovírico. En algunos aspectos, los cortes cerebrales son cortes cerebrales coroneales. En algunos aspectos, los cortes cerebrales son de la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, los cortes cerebrales comprenden neuronas que afectan al comportamiento social cuando se despolarizan. En algunos aspectos, los cortes cerebrales comprenden neuronas que cambian el comportamiento social innato y/o el comportamiento condicionado cuando se despolarizan. En otros aspectos, los cortes cerebrales comprenden neuronas que dan lugar a defectos sociales y cognitivos en el autismo y/o la esquizofrenia cuando se despolarizan. En algunas realizaciones, los cortes cerebrales son cualquiera de entre aproximadamente 100 µm, aproximadamente 150 µm, aproximadamente 200 µm, aproximadamente 250 µm, aproximadamente 300 µm, aproximadamente 350 µm, aproximadamente 400 µm, aproximadamente 450 µm o aproximadamente 500 µm de espesor, ambos inclusive, incluyendo cualquier espesor de entre estos números.

Polinucleótidos, promotores y vectores

En el presente documento, se proporcionan polinucleótidos aislados que codifican proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada que tienen al menos una actividad de una proteína de opsina de función escalonada. La divulgación proporciona polinucleótidos aislados, sintéticos o recombinantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente un 70 %, por ejemplo, al menos aproximadamente un 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, o identidad de secuencia completa (100 %) con el ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 en una región de al menos aproximadamente 10, por ejemplo, al menos aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1.000 nucleótidos.

La divulgación proporciona específicamente un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de opsina estabilizada de función escalonada y/o una variante mutante de la misma. Por ejemplo, la divulgación proporciona una molécula de polinucleótido aislada, en la que la molécula de polinucleótido codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La divulgación también proporciona una molécula de polinucleótido aislada, en la que la molécula de polinucleótido codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. La divulgación también proporciona una molécula de polinucleótido aislada, en la que la molécula de polinucleótido codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. La divulgación también proporciona una molécula de polinucleótido aislada, en la que la molécula de polinucleótido codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

La divulgación también proporciona casetes de expresión y/o vectores que comprenden los ácidos nucleicos descritos anteriormente. De manera adecuada, el ácido nucleico que codifica una proteína de opsina estabilizada con función escalonada de la divulgación está unido operativamente a un promotor. Los promotores son bien conocidos en la técnica. Se puede usar cualquier promotor que funcione en la célula hospedadora para la expresión de SSFO y/o cualquier variante del mismo de la presente divulgación. Las regiones o los promotores de control del inicio, que son útiles para dirigir la expresión de una proteína SSFO o una variante de la misma en una célula animal específica, son numerosos y familiares para los expertos en la materia. Se puede usar casi cualquier promotor capaz de conducir estos ácidos nucleicos.

En concreto, cuando se desea la expresión recombinante de proteínas SSFO, tales como las proteínas descritas en el presente documento, en una célula neuronal excitadora, se puede usar un promotor de la proteína quinasa II alfa dependiente de la calmodulina (CaMKII α). En otras realizaciones, se puede usar un promotor del factor de elongación 1a (EF-1a), junto con un vector de AAV recombinante inducible por Cre con ratones transgénicos de parvalbúmina-Cre para dirigir las proteínas SSFO de expresión a las neuronas inhibitoras.

También se proporcionan en el presente documento vectores que comprenden los polinucleótidos desvelados en el presente documento que codifican proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada o cualquier variante de las mismas. Los vectores que pueden administrarse de acuerdo con la presente divulgación también incluyen vectores que comprenden un polinucleótido que codifica un ARN (por ejemplo, un ARNm), que cuando se transcribe a partir de los polinucleótidos del vector producirá la acumulación de proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada activadas por la luz sobre las membranas plasmáticas de las células animales diana. Los vectores que se pueden usar incluyen, sin limitación, vectores lentivíricos, VHS, adenovíricos y víricos adeno-asociados (AAV). Los lentivirus incluyen, pero sin limitación, VIH-1, VIH-2, SIV, FIV y EIAV. Los lentivirus se pueden pseudotipar con las proteínas de la envoltura de otros virus, incluyendo, pero sin limitación, VSV, rabia, Mo-MLV, baculovirus y Ébola. Dichos vectores se pueden preparar usando métodos convencionales en la técnica.

En algunos aspectos, el vector es un vector de AAV recombinante. Los vectores de AAV son virus de ADN de un tamaño relativamente pequeño que pueden integrarse, de una manera estable y específica del sitio, en el genoma de las células que infectan. Pueden infectar un amplio espectro de células sin inducir ningún efecto sobre el crecimiento celular, la morfología o la diferenciación, y no parecen participar en patologías humanas. El genoma de AAV ha sido clonado, secuenciado y caracterizado. Abarca aproximadamente 4.700 bases y contiene una región de repetición terminal invertida (ITR) de aproximadamente 145 bases en cada extremo, que sirve como un origen de replicación para el virus. El resto del genoma se divide en dos regiones esenciales que portan las funciones de encapsidación: la parte de la izquierda del genoma, que contiene el gen *rep* implicado en la replicación vírica y la expresión de los genes víricos; y la parte de la derecha del genoma, que contiene el gen *cap* que codifica las proteínas de la cápside del virus.

Los vectores de AAV se pueden preparar usando métodos convencionales en la técnica. Los virus adeno-asociados

de cualquier serotipo son adecuados (véase, por ejemplo, Blacklow, pág. 165-174 de "Parvoviruses and Human Disease" J. R. Pattison, ed. (1988); Rose, *Comprehensive Virology* 3:1, 1974; P. Tattersall "The Evolution of Parvovirus Taxonomy" en *Parvoviruses* (J. R. Kerr, S. F. Cotmore. M. E. Bloom, R. M. Linden, C. R. Parrish, Eds.) pág. 5-14, Hudder Arnold, Londres, RU (2006); y D. E. Bowles, J. E. Rabinowitz, R. J. Samulski "The Genus Dependovirus" (J. R. Kerr, S. F. Cotmore. M. E. Bloom, R. M. Linden, C. R. Parrish, Ed.) pág. 15-23, Hudder Arnold, Londres, RU (2006)). Se pueden encontrar métodos para purificar los vectores en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6566118, 6989264 y 6995006, y la publicación de solicitud de patente internacional n.º: WO/1999/011764, titulada "Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors". La preparación de vectores híbridos se describe en, por ejemplo, la solicitud PCT n.º PCT/US2005/027091. El uso de vectores derivados de los AAV para la transferencia de genes *in vitro* e *in vivo* se ha descrito (véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO 91/18088 y WO 93/09239; las patentes de EE.UU. n.º: 4.797.368, 6.596.535 y 5.139.941; y la patente europea n.º: 0488528). Estas publicaciones describen diversas construcciones derivadas de AAV en las que los genes *rep* y/o *cap* se eliminan y se reemplazan por un gen de interés, y el uso de estas construcciones para transferir el gen de interés *in vitro* (a células cultivadas) o *in vivo* (directamente a un organismo). Los AAV recombinantes de replicación defectuosa de acuerdo con la divulgación se pueden preparar mediante la transfección conjunta de un plásmido que contiene la secuencia de ácido nucleico de interés flanqueada por dos regiones de repetición terminales invertidas (ITR) de AAV, y un plásmido portador de los genes de encapsidación de AAV (genes *rep* y *cap*), a una estirpe celular que está infectada con un virus auxiliar humano (por ejemplo, un adenovirus). Los AAV recombinantes que se producen se purifican luego mediante técnicas convencionales.

En algunas realizaciones, el/los vector/es para su uso en los métodos de la divulgación está/n encapsidado/s en una partícula de virus (por ejemplo, partícula de virus AAV, incluyendo, pero sin limitación, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV 12, AAV 13, AAV 14, AAV 15 y AAV 16). Por consiguiente, la divulgación proporciona una partícula de virus recombinante (recombinante, porque contiene un polinucleótido recombinante) que comprende cualquiera de los vectores descritos en el presente documento. Los métodos de producción de partículas son conocidos en la técnica y se describen en la patente de EE.UU. n.º 6.596.535.

Para las células animales descritas en el presente documento, se entiende que es posible administrar uno o más vectores a células neuronales, células cardíacas o células madre. Si se usa más de un vector, se entiende que se pueden administrar al mismo tiempo o en momentos diferentes a las células animales.

Métodos de la invención

Se proporcionan en el presente documento métodos de despolarización de neuronas excitadoras o inhibitoras que residen en un microcircuito expresando en esas neuronas las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada activadas por luz descritas en el presente documento. En algunos aspectos, se proporciona un método de uso de las proteínas estabilizadas de opsina con función escalonada descritas en el presente documento mediante la activación de las proteínas con luz.

Las proteínas estabilizadas de opsina con función escalonada desveladas en el presente documento pueden expresarse en una neurona excitadora o en una neurona inhibitora. En otros aspectos, el método de uso de las proteínas estabilizadas de opsina con función escalonada desveladas en el presente documento puede ser en un animal vivo no humano o en un corte cerebral vivo de un animal no humano. En otros aspectos, se proporciona un método de identificación de un compuesto químico que inhiba la despolarización de neuronas excitadoras en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, se proporciona un método de identificación de un compuesto químico que restablece un comportamiento social innato y/o la comunicación en un animal no humano.

Métodos de uso de proteínas SSFO

Se proporcionan en el presente documento métodos de uso de las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada desveladas en el presente documento, que comprenden activar las proteínas con luz que tiene una primera longitud de onda. En algunas realizaciones, las proteínas se pueden activar con luz que tenga una primera longitud de onda que puede ser luz azul. En otras realizaciones, dicha luz que tiene una primera longitud de onda puede ser de aproximadamente 445 nm.

En otro aspecto de los métodos de uso de las composiciones desveladas en el presente documento, las proteínas estabilizadas de opsina con función escalonada desveladas en el presente documento se pueden desactivar con luz que tenga una segunda longitud de onda. En algunos aspectos, dicha luz que tiene una segunda longitud de onda puede ser luz verde o luz amarilla. En otros aspectos, dicha luz que tiene una segunda longitud de onda puede ser de aproximadamente 590 nm. En otros aspectos, dicha luz que tiene una segunda longitud de onda puede ser de aproximadamente 390-400 nm, ambos inclusive, así como también cada número perteneciente a este intervalo.

En algunos aspectos de los métodos proporcionados en el presente documento, las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada pueden activarse mediante pulsos de luz que pueden tener una duración de cualquiera entre aproximadamente 1 milisegundo (ms), aproximadamente 2 ms, aproximadamente 3 ms,

aproximadamente 4 ms, aproximadamente 5 ms, aproximadamente 6 ms, aproximadamente 7 ms, aproximadamente 8 ms, aproximadamente 9 ms, aproximadamente 10 ms, aproximadamente 15 ms, aproximadamente 20 ms, aproximadamente 25 ms, aproximadamente 30 ms, aproximadamente 35 ms, aproximadamente 40 ms, aproximadamente 45 ms, aproximadamente 50 ms, aproximadamente 60 ms, aproximadamente 70 ms, aproximadamente 80 ms, aproximadamente 90 ms, aproximadamente 100 ms, aproximadamente 200 ms, aproximadamente 300 ms, aproximadamente 400 ms, aproximadamente 500 ms, aproximadamente 600 ms, aproximadamente 700 ms, aproximadamente 800 ms, aproximadamente 900 ms, aproximadamente 1 s, aproximadamente 1,25 s, aproximadamente 1,5 s o aproximadamente 2 s, ambos inclusive, incluyendo cualquier tiempo entre estos números. En algunos aspectos de los métodos proporcionados en el presente documento, las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada pueden activarse mediante pulsos de luz que pueden tener una densidad de potencia de luz de cualquiera de entre aproximadamente $1 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $2 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $3 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $4 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $5 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $6 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $7 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $8 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $9 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $10 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $11 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $12 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $13 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $14 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $15 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $16 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $17 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $18 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $19 \mu\text{W mm}^{-2}$, o aproximadamente $20 \mu\text{W mm}^{-2}$, ambos inclusive, incluyendo cualquier valor entre estos números.

En otros aspectos, las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada activadas por luz pueden activarse mediante pulsos de luz que pueden tener una densidad de potencia de luz de cualquiera de entre aproximadamente 1 mW mm^{-2} , aproximadamente 2 mW mm^{-2} , aproximadamente 3 mW mm^{-2} , aproximadamente 4 mW mm^{-2} , aproximadamente 5 mW mm^{-2} , aproximadamente 6 mW mm^{-2} , aproximadamente 7 mW mm^{-2} , aproximadamente 8 mW mm^{-2} , aproximadamente 9 mW mm^{-2} , aproximadamente 10 mW mm^{-2} , aproximadamente 11 mW mm^{-2} , aproximadamente 12 mW mm^{-2} , aproximadamente 13 mW mm^{-2} , aproximadamente 14 mW mm^{-2} , aproximadamente 15 mW mm^{-2} , aproximadamente 16 mW mm^{-2} , aproximadamente 17 mW mm^{-2} , aproximadamente 18 mW mm^{-2} , aproximadamente 19 mW mm^{-2} , aproximadamente 20 mW mm^{-2} , aproximadamente 21 mW mm^{-2} , aproximadamente 22 mW mm^{-2} , aproximadamente 23 mW mm^{-2} , aproximadamente 24 mW mm^{-2} , o aproximadamente 25 mW mm^{-2} , ambos inclusive, incluyendo cualquier valor entre estos números. En algunos aspectos, las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada activadas por la luz de los métodos descritos en el presente documento pueden mantener una fotocorriente sostenida durante aproximadamente 10 minutos o más. En otros aspectos, las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada activadas por la luz descritas en el presente documento pueden mantener una fotocorriente sostenida para cualquiera de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 minutos, ambos inclusive, incluyendo cualquier tiempo entre estos números. En otros aspectos, Los métodos proporcionados en el presente documento comprenden bloquear completamente la progresión del fotociclo de cualquiera de las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada activadas por luz descritas en el presente documento cuando la proteína se ilumina con un único pulso de luz que tiene una primera longitud de onda.

En algunos aspectos de los métodos descritos en el presente documento, la célula animal puede ser una célula neuronal, una célula cardíaca o una célula madre. En algunos aspectos, la célula animal puede ser una célula neuronal. En otros aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona excitadora situada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona excitadora puede ser una neurona piramidal. En otros aspectos, las células animales comprenden neuronas que afectan al comportamiento social cuando se despolarizan. En algunos aspectos, la célula neuronal es una neurona que cambia el comportamiento social innato y/o el comportamiento condicionado cuando se despolariza. En otras realizaciones, las células animales comprenden neuronas que dan lugar a defectos sociales y cognitivos en el autismo y/o la esquizofrenia cuando se despolarizan. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona inhibidora situada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos más, la neurona inhibidora puede ser una neurona de parvalbúmina. En algunas realizaciones, las neuronas inhibidoras y excitadoras pueden estar en un animal vivo no humano. En otros aspectos, las neuronas inhibidoras y excitadoras pueden estar en un corte cerebral de un animal no humano.

Métodos de identificación de un compuesto químico que inhibe la despolarización de neuronas excitadoras e inhibidoras en la corteza prefrontal

En el presente documento, se proporciona un método de identificación de un compuesto químico que inhibe la despolarización de neuronas excitadoras e inhibidoras en la corteza prefrontal de un animal no humano, comprendiendo el método: (a) despolarizar una neurona excitadora o inhibidora de la corteza prefrontal de un animal no humano o un corte de tejido vivo de un animal no humano que comprende un canal de cationes de proteína activado por luz expresado en la membrana celular capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz, en el que la proteína presenta una rápida activación escalonada en respuesta a un único pulso de luz que tiene una primera longitud de onda y la desactivación en respuesta a un pulso de luz que tiene una segunda longitud de onda; en el que la corriente de despolarización de la célula se mantiene durante hasta aproximadamente veinte minutos; y en el que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de ChR2, ChR1, VChR1 o VChR2 con sustituciones de aminoácidos en los restos de aminoácidos correspondientes a C128 y D156 de la secuencia de aminoácidos de ChR2; (b) medir un potencial postsináptico excitador (EPSP) o una corriente postsináptica inhibidora (IPSC) en respuesta a la despolarización selectiva de la neurona excitadora o inhibidora que

comprende la proteína activada por luz; (c) poner en contacto la neurona excitadora con un compuesto químico; y (d) medir el potencial postsináptico excitador (EPSP) o una corriente postsináptica inhibitoria (IPSC) para determinar si el contacto de la neurona excitadora con el compuesto químico inhibe la despolarización de la neurona. En algunos aspectos, las proteínas se pueden activar con luz que tenga una primera longitud de onda que puede ser luz azul.

En otros aspectos, dicha luz que tiene una primera longitud de onda puede ser de aproximadamente 445 nm. En otros aspectos, dicha luz que tiene una segunda longitud de onda puede ser luz verde o luz amarilla. En otros aspectos, dicha luz que tiene una segunda longitud de onda puede ser de aproximadamente 590 nm. En otros aspectos más, dicha luz que tiene una segunda longitud de onda puede ser de aproximadamente 390-400 nm, ambos inclusive, así como también cada número perteneciente a este intervalo. En algunos aspectos, el compuesto químico puede ser un miembro de una biblioteca química combinatoria.

En algunos aspectos de los métodos proporcionados en el presente documento, las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada activadas por luz pueden activarse mediante pulsos de luz que pueden tener una duración de cualquiera entre aproximadamente 1 milisegundo (ms), aproximadamente 2 ms, aproximadamente 3 ms, aproximadamente 4 ms, aproximadamente 5 ms, aproximadamente 6 ms, aproximadamente 7 ms, aproximadamente 8 ms, aproximadamente 9 ms, aproximadamente 10 ms, aproximadamente 15 ms, aproximadamente 20 ms, aproximadamente 25 ms, aproximadamente 30 ms, aproximadamente 35 ms, aproximadamente 40 ms, aproximadamente 45 ms, aproximadamente 50 ms, aproximadamente 60 ms, aproximadamente 70 ms, aproximadamente 80 ms, aproximadamente 90 ms, aproximadamente 100 ms, aproximadamente 200 ms, aproximadamente 300 ms, aproximadamente 400 ms, aproximadamente 500 ms, aproximadamente 600 ms, aproximadamente 700 ms, aproximadamente 800 ms, aproximadamente 900 ms, aproximadamente 1 s, aproximadamente 1,25 s, aproximadamente 1,5 s o aproximadamente 2 s, ambos inclusive, incluyendo cualquier tiempo entre estos números. En algunos aspectos de los métodos proporcionados en el presente documento, las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada activadas por luz pueden activarse mediante pulsos de luz que pueden tener una densidad de potencia de luz de cualquiera de entre aproximadamente $1 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $2 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $3 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $4 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $5 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $6 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $7 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $8 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $9 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $10 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $11 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $12 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $13 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $14 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $15 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $16 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $17 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $18 \mu\text{W mm}^{-2}$, aproximadamente $19 \mu\text{W mm}^{-2}$, o aproximadamente $20 \mu\text{W mm}^{-2}$, ambos inclusive, incluyendo cualquier valor entre estos números. En otros aspectos, las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada activadas por luz pueden activarse mediante pulsos de luz que pueden tener una densidad de potencia de luz de cualquiera de entre aproximadamente 1 mW mm^{-2} , aproximadamente 2 mW mm^{-2} , aproximadamente 3 mW mm^{-2} , aproximadamente 4 mW mm^{-2} , aproximadamente 5 mW mm^{-2} , aproximadamente 6 mW mm^{-2} , aproximadamente 7 mW mm^{-2} , aproximadamente 8 mW mm^{-2} , aproximadamente 9 mW mm^{-2} , aproximadamente 10 mW mm^{-2} , aproximadamente 11 mW mm^{-2} , aproximadamente 12 mW mm^{-2} , aproximadamente 13 mW mm^{-2} , aproximadamente 14 mW mm^{-2} , aproximadamente 15 mW mm^{-2} , aproximadamente 16 mW mm^{-2} , aproximadamente 17 mW mm^{-2} , aproximadamente 18 mW mm^{-2} , aproximadamente 19 mW mm^{-2} , aproximadamente 20 mW mm^{-2} , aproximadamente 21 mW mm^{-2} , aproximadamente 22 mW mm^{-2} , aproximadamente 23 mW mm^{-2} , aproximadamente mW mm^{-2} , o aproximadamente 25 mW mm^{-2} , ambos inclusive, incluyendo cualquier valor entre estos números.

En algunos aspectos de los métodos descritos en el presente documento, la célula animal puede ser una célula neuronal, una célula cardíaca o una célula madre. En algunos aspectos, la célula animal puede ser una célula neuronal. En otras realizaciones, la célula neuronal puede ser una neurona excitadora situada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos, la neurona excitadora puede ser una neurona piramidal. En algunos aspectos, la célula neuronal puede ser una neurona inhibitoria situada en la corteza prefrontal de un animal no humano. En otros aspectos más, la neurona inhibitoria puede ser una neurona de parvalbúmina. En algunas realizaciones, las neuronas inhibitorias y excitadoras pueden estar en un animal vivo no humano. En otros aspectos, las neuronas inhibitorias y excitadoras pueden estar en un corte cerebral de un animal no humano. En otras realizaciones, los cortes cerebrales comprenden neuronas que afectan al comportamiento social cuando se despolarizan. En algunos aspectos, la célula neuronal es una neurona que cambia el comportamiento social innato y/o el comportamiento condicionado cuando se despolariza.

En otros aspectos, los cortes cerebrales comprenden neuronas que dan lugar a defectos sociales y cognitivos en el autismo y/o la esquizofrenia cuando se despolarizan.

Métodos de identificación de un compuesto químico que restablece un comportamiento social innato y/o la comunicación en un animal no humano

En el presente documento, se proporciona un método de identificación de un compuesto químico que restablece uno o más comportamientos sociales, comunicaciones y/o comportamientos condicionados en el animal no humano, comprendiendo el método: (a) despolarizar una neurona excitadora de la corteza prefrontal de un animal no humano que comprende un canal de cationes de proteína activado por luz expresado en la membrana celular capaz de mediar una corriente despolarizante en la célula cuando la célula se ilumina con luz, en el que la proteína presenta una rápida activación escalonada en respuesta a un único pulso de luz que tiene una primera longitud de onda y la

desactivación en respuesta a un pulso de luz que tiene una segunda longitud de onda; en el que la corriente de despolarización de la célula se mantiene durante hasta aproximadamente veinte minutos; y en el que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de ChR2, ChR1, VChR1 o VChR2 con sustituciones de aminoácidos en los restos de aminoácidos correspondientes a C128 y D156 de la secuencia de aminoácidos de ChR2, en el que la despolarización de la neurona excitadora inhibe uno o más comportamientos sociales, comunicaciones y/o comportamientos condicionados en el animal no humano; (b) administrar un compuesto químico al animal no humano; y (c) determinar si la administración del compuesto químico al animal no humano restablece dicho uno o más comportamientos sociales, comunicaciones y/o comportamientos condicionados en el animal no humano. En algunos aspectos, el comportamiento social es un comportamiento social innato, y se selecciona del grupo que consiste en: acicalamiento social entre miembros de la misma especie, agresión entre residente e intruso, peleas inducidas por el aislamiento, comportamiento sexual, comportamiento parental, reconocimiento social y comunicación auditiva. Se puede encontrar información relativa a ensayos de conducta social innata para ratones y otros modelos de laboratorio en Crawley, *Social Behavior Tests for Mice*, Laboratory of Behavioral Neuroscience, National Institute of Mental Health, (Bethesda, MD; 2007). En otros aspectos, el comportamiento es un comportamiento condicionado, tal como, pero sin limitación, una respuesta de miedo condicionada. En algunos aspectos, el animal no humano no está restringido por ningún hardware durante las etapas (b) a (c). En algunos aspectos, el hardware es una fuente de luz conectada a un cable de fibra óptica. En otros aspectos, el animal no humano se separa del hardware inmediatamente después de que se active la proteína de opsina estabilizada con función escalonada en respuesta a dicho único pulso de luz que tiene una primera longitud de onda. En algunos aspectos, la célula animal se encuentra en la superficie de un tejido biológico. En algunos aspectos, el tejido es tejido nervioso o tejido cerebral. En algunos aspectos, el compuesto químico puede ser un miembro de una biblioteca química combinatoria.

En algunos aspectos, los animales no humanos de los métodos proporcionados en el presente documento comprenden la proteína correspondiente a la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos, los animales comprenden las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada desveladas en el presente documento. En algunos aspectos, los animales que comprenden las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada desveladas en el presente documento expresan transgénicamente dichas proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada. En otros aspectos, los animales que comprenden las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada descritas en el presente documento se han transfectado víricamente con un vector que porta las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada, tal como, pero sin limitación, un vector adenovírico o un vector vírico adeno-asociado. En algunos aspectos, los animales que comprenden las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada desveladas en el presente documento presentan cambios en el comportamiento cuando dichas proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada se despolarizan mediante la activación con luz. En otros aspectos, los animales que comprenden las proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada desveladas en el presente documento presentan cambios en los comportamientos sociales innatos y aprendidos cuando dichas proteínas de opsina estabilizadas con función escalonada se despolarizan mediante la activación con luz. En otros aspectos, los animales que comprenden las proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada desveladas en el presente documento presentan cambios en los comportamientos condicionados cuando dichas proteínas de opsina estabilizadas de función escalonada se despolarizan mediante la activación con luz.

REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

La presente divulgación se cree que es útil para el control óptico de los trastornos del sistema nervioso. Las aplicaciones específicas de la presente divulgación se refieren a sistemas o métodos optogenéticos que correlacionan el control temporal, espacial y/o de tipo celular en un circuito neuronal con medidas mensurables. Dado que muchos aspectos de los aspectos ilustrativos desvelados en el presente documento se relacionan y se basan significativamente en desarrollos previos en este campo, la siguiente descripción resume dichos desarrollos previos para proporcionar una comprensión sólida de los fundamentos y las enseñanzas subyacentes a partir de los cuales se pueden extraer detalles y modificaciones de implantación, incluyendo aquellos encontrados en Yizhar *et al.*, *Nature*, 2011, 477(7363):171-8. Es en este contexto en el que se proporciona la siguiente descripción. Si bien la presente invención no se limita necesariamente a dichas aplicaciones, varios aspectos de la invención se pueden apreciar a través de una descripción de diversos ejemplos con el uso de dicho contexto.

Diversos aspectos de la presente divulgación se refieren a un sistema o método optogenético que correlaciona el control temporal en un circuito neuronal con métricas medibles. Por ejemplo, diversas métricas o síntomas podrían estar asociados a un trastorno neurológico que presente diversos síntomas de disfunción social. El sistema optogenético se dirige a un circuito neuronal dentro de un sujeto/paciente para un control selectivo del mismo. El sistema optogenético implica controlar al sujeto/paciente para las métricas o los síntomas asociados con el trastorno neurológico. De esta manera, el sistema optogenético puede proporcionar información detallada sobre el circuito neuronal, su función y/o el trastorno neurológico.

La **FIG. 12** representa un diagrama de flujo para ensayar un modelo de enfermedad, en consonancia con diversas realizaciones diferentes de la presente divulgación. En **102**, se identifican o seleccionan uno o más modelos de enfermedad. Los modelos de enfermedad pueden ser para uno o más trastornos del sistema nervioso central (SNC). Los modelos pueden incluir diversos trastornos, enfermedades o incluso características generales de los pacientes

(por ejemplo, estado de ánimo, memoria, locomoción o comportamiento social). En **104**, se identifican una o más dianas del SNC. Como se usa en el presente documento, las dianas del SNC incluyen las propiedades del estímulo que se proporcionará como parte de la evaluación, del ensayo o relacionado de otro modo con el modelo de la enfermedad. Los ejemplos no limitantes de dianas pueden ser dianas espaciales, dianas de tipo celular, dianas temporales y combinaciones de las mismas.

Las propiedades de las dianas **106-118** se pueden usar entonces para seleccionar una determinada opsina del kit de herramientas optogenético **120**. El kit de herramientas optogenético **120** incluye varias opsinas diferentes, que se pueden alinear con una o más de las propiedades **106-118**. En el presente documento, se describen diversos ejemplos no limitantes de las opsinas. La/s opsina/s seleccionada/s **122** pueden ser las opsinas que se acerquen más a la/s diana/s del SNC y/o las propiedades del estímulo. Por ejemplo, una diana deseada puede ser la modificación del equilibrio de excitación/inhibición (E/I) dentro de una parte del cerebro durante un período de tiempo prolongado. Como se menciona en el presente documento, podría seleccionarse la opsina C1V1 (descrita en más detalle en el presente documento) y sus variantes. Posteriormente, la/s opsina/s seleccionada/s se expresa/n en una ubicación/tipo de célula **124** del SNC diana. El módulo de la enfermedad se ensaya a continuación **126**, *por ejemplo*, a través del estímulo óptico de la/s opsina/s expresada/s.

Algunos aspectos de la presente divulgación se dirigen al control sobre el equilibrio de excitación/inhibición (E/I) celular dentro del microcircuito neocortical. Dicho control del equilibrio de E/I puede ser particularmente útil para la modelización y/o el tratamiento de déficits sociales y cognitivos (por ejemplo, autismo y esquizofrenia) que están relacionados con aumentos de la excitación.

Algunos aspectos de la presente divulgación se dirigen al uso de opsinas para proporcionar un mecanismo de inducción de un equilibrio de E/I celular elevado con control espacial y temporal específico. Esto puede incluir la expresión de opsinas sensibles a la luz en neuronas excitadoras relacionadas con una o más enfermedades neuropsiquiátricas graves.

Diversos aspectos se refieren a las herramientas y a los métodos de control del equilibrio de E/I en mamíferos con libertad de movimiento, lo que puede ser particularmente útil para explorar mecanismos fisiológicos del circuito subyacentes. Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren al aumento de la excitabilidad de las neuronas excitadoras, con respecto a la excitabilidad de las neuronas inhibitorias con control espacial selectivo. Esto puede ser particularmente útil para aumentar la susceptibilidad de las neuronas excitadoras al estímulo intrínseco y, por lo tanto, preservar los patrones naturales de disparo. En algunas implantaciones, esta excitación es reversible.

Ciertos aspectos se dirigen al uso de los canales iónicos que son ópticamente controlable. Cuando se expresan en una neurona, los canales iónicos están diseñados para aumentar la susceptibilidad de las neuronas al estímulo intrínseco con el fin de mantener la susceptibilidad aumentada durante períodos de tiempo prolongados. Algunos aspectos de la presente divulgación se refieren a SSFO (opsinas estabilizadas con función escalonada) que son lo suficientemente estables para producir fotocorriente constante tras una sola luz intermitente durante muchos minutos, y al uso de las mismas para ensayos de comportamientos complejos. En determinadas implantaciones, la susceptibilidad aumentada se puede mantener desde muchos minutos después de que se aplique el estímulo óptico.

Diversos aspectos se dirigen a tratamientos, la modelización y otros aspectos que se relacionan con el descubrimiento de que las deficiencias en comportamientos específicos de interacción social y de cognición en ratones con libertad de movimiento pueden estar inducidas por la elevación diana del equilibrio de E/I.

Otros aspectos se dirigen a tratamientos, la modelización y otros aspectos que se relacionan con el descubrimiento de que no se observan dichos efectos en el comportamiento cuando se proporciona selectivamente la misma ventaja de excitabilidad a las neuronas inhibitorias, con independencia de profundos efectos sobre la actividad del circuito local.

Otros aspectos más de la presente divulgación se dirigen a tratamientos, la modelización y otros aspectos relacionados con el descubrimiento de que el efecto en el nivel de circuito dominante de la intervención del equilibrio de E/I conductualmente significativa es una elevación específica en la excitación sináptica recurrente de la banda gamma inicial (alrededor de 40-60 Hz), análoga a los ritmos gamma elevados observados al inicio del estudio en el autismo y la esquizofrenia, con el deterioro cuantitativo concomitante de la transmisión de información por los microcircuitos.

Algunos aspectos de la presente divulgación se refieren al uso de las opsinas para dirigir elevaciones de E/I y controlar las oscilaciones gamma en cortes corticales. Determinados aspectos se dirigen al uso de C1V1 (descrita con más detalle en el presente documento) y sus variantes, que puede ser particularmente útil para dirigir elevaciones de E/I y controlar las oscilaciones gamma en cortes corticales, con 1) alta potencia para permitir ensayos de respuesta a la dosis; 2) baja desensibilización para permitir cambios escalonados en el equilibrio de E/I; y 3) excitación desplazada hacia el rojo para permitir la dirección separable de diferentes poblaciones dentro de la misma preparación.

Algunos aspectos de la presente divulgación se refieren al control en el equilibrio de E/I celular elevado (o reducido). Esto puede ser particularmente útil para el estudio, el ensayo y el tratamiento relacionados con el deterioro social y cognitivo que no responde a la medicación en los trastornos neurológicos, tales como el autismo y la esquizofrenia. Determinados aspectos se refieren al estudio y a la distinción de los efectos a largo plazo en el desarrollo y en la maduración del circuito en relación con los efectos inmediatos de las anomalías de E/I con respecto a la función de los circuitos neuronales implicados. Otros aspectos se dirigen a la confirmación del equilibrio de E/I celular elevado como un componente central de los defectos cognitivos observados en los diversos modelos de enfermedad y pacientes (humanos o de otro tipo). Determinados aspectos proporcionan la programación y la especificidad suficientes para probar la hipótesis del equilibrio de E/I celular elevado en el cerebro de los mamíferos (por ejemplo, la corteza prefrontal), y las manifestaciones en la fisiología de los circuitos identificados.

Un aspecto particular se refiere al uso de la SSFO mutante doble (descrita en más detalle en el presente documento), que puede ser particularmente útil para proporcionar modulación de circuito estable durante períodos de tiempo que sean suficientes para experimentos de comportamiento temporal exactos y complejos. Por ejemplo, la modulación del circuito de experimentación de la modulación y del comportamiento puede durar varios minutos en ausencia de activación de luz continua, conexiones de fibra óptica externas y/o penetración en el cerebro de hardware óptico (por ejemplo, usando un dispositivo de administración de luz totalmente externo al cerebro). Determinadas implantaciones usan una propiedad de integración de fotones, que puede facilitar la activación de células con baja intensidad de luz (*por ejemplo*, a baja - gm/mm^2). Esta activación puede ocurrir con una penetración relativamente profunda de la luz en el tejido cerebral (por ejemplo, 3 mm o más en relación con la fuente de luz). La activación de SSFO en las neuronas excitadoras (pero no inhibitoras) puede usarse para producir alteraciones profundas y reversibles en la función social y cognitiva. En ciertas implantaciones, las deficiencias se pueden producir con pocas, si las hay, anomalías motoras o comportamientos alterados de miedo/ansiedad.

Algunos aspectos de la presente divulgación también se relacionan con el uso de las SSFO para el sondeo *in vitro* de los cambios producidos en las propiedades del circuito. Por ejemplo, las SSFO se pueden usar para elevar el equilibrio de E/I celular y para medir las funciones de transferencia de las neuronas piramidales. Los resultados experimentales sugieren que dicha elevación satura las funciones de transferencia de las neuronas piramidales a bajas velocidades de corriente postsináptica excitadora (EPSC), afectando a la transmisión de la información dentro del circuito cortical, en contraste con las consecuencias de la reducción del equilibrio de E/I.

Estos y otros aspectos pueden ser particularmente útiles para abordar los desafíos sintomáticos y de tratamiento en trastornos que no responden a la medicación como el autismo, (*por ejemplo*, con relación a las elevaciones del equilibrio de E/I y situaciones en las que el cerebro parece hiperexcitable y deficiente en su capacidad de procesar la información.

De acuerdo con un aspecto experimental, se realizó una comparación entre la actividad producida por la luz en células piramidales con expresión de C1V1- E162T (descritas en más detalle en el presente documento) y sin expresión (células PYR). Las células PYR que expresan C1V1-E162T se activaron en respuesta a pulsos de luz a 561 nm de 2 ms, mientras que el mismo paradigma de estimulación evocó de forma fiable potenciales postsinápticos excitadores (EPSP) en células sin expresión dentro de los mismos cortes.

Determinados aspectos de la presente divulgación se dirigen al uso del producto génico de SSFO para favorecer selectivamente la excitación de una población neuronal frente a otra. El favorecimiento selectivo de la población diana puede configurarse para evitar que las SSFO anulen las entradas de excitación intrínseca a la población diana. De esta manera, la población diana no sería impulsada con picos coordinados directamente causados por las opsinas. Más bien, la población diana mostraría una mayor sensibilidad a las entradas nativas, que pueden ser dispersas y asincrónicas.

Algunos aspectos de la presente divulgación se dirigen al uso de SFO para abordar diversos desafíos planteados por el hardware. Por ejemplo, el aumento significativo en la sensibilidad a la luz (por ejemplo, órdenes de magnitud superiores) pueden facilitar el uso de mecanismos alternativos de administración de luz y ensayos de comportamiento sin hardware.

Algunos aspectos de la presente divulgación se dirigen a la identificación y modificación de partes específicas de canales abiertos por luz. Estas modificaciones implican la identificación de partes clave de los canales. Los canales se pueden identificar usando imágenes de alta resolución de la estructura terciaria del canal. Como alternativa, se puede usar el conocimiento de la estructura de canales similares. La siguiente descripción proporciona detalles de una implantación y metodología experimental específica. La presente divulgación no se limita a ninguna implantación en particular, y puede implantarse para una serie de modificaciones moleculares diferentes en diversos lugares, de acuerdo con las enseñanzas del presente documento.

Determinados aspectos específicos de la presente divulgación se refieren a genes de opsina microbianos adaptados para la neurociencia, lo que permite la transducción de trenes de pulsos de luz a cambios en el potencial de membrana a una escala temporal de milisegundos en tipos de células específicos del cerebro intacto de mamíferos (por ejemplo, canalrodopsina (ChR2), canalrodopsina *Volvox* (VChR1) y halorrodopsina (NpHR)). La ChR2 es una

rodopsina derivada de las algas verdes unicelulares *Chlamydomonas reinhardtii*. El término "rodopsina", como se usa en el presente documento, es una proteína que comprende al menos dos bloques constituyentes, una proteína opsina y un cofactor unido covalentemente, habitualmente retiniano (retinaldehído). La rodopsina ChR2 se deriva de la opsina Canalopsina-2 (Chop2), originalmente denominada Clamiopsina-4 (Cop4) en el genoma de *Chlamydomonas*. Las propiedades temporales de un canalrodopsina despolarizante, ChR2, incluyen una rápida cinética de activación y desactivación, que permite la generación de trenes de potencial de acción sincronizados con precisión. Para aplicaciones que buscan una activación de escala temporal prolongada, se ha descubierto que se puede reducir la cinética de desactivación normalmente rápida de las canalrodopsinas. Por ejemplo, ciertas implantaciones de canalrodopsinas aplican luz de 1 mW/mm^2 durante prácticamente todo el tiempo en el que se desea la despolarización, que puede ser inferior al deseable.

Gran parte de la descripción del presente documento se dirige a la ChR2. Salvo que se indique de otra forma, la divulgación incluye una serie de variantes similares. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, Chop2, ChR2-310, Chop2-310 y *Volvox channelrhodopsin* (VChR1). Para más detalles sobre la VChR1, se puede hacer referencia a "Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*," *Nat Neurosci.*, junio de 2008, 11(6):631-3. Epub 23 de abril de 2008. En otras implantaciones, se pueden realizar modificaciones similares a otras moléculas de opsina. Por ejemplo, las modificaciones/mutaciones se pueden realizar a las variantes ChR2 o VChR1. Además, las variantes modificadas se pueden usar en combinación con bombas de iones activadas por la luz.

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

Como se usa en el presente documento, la estimulación de una célula diana se usa, en general, para describir la modificación de propiedades de la célula. Por ejemplo, el estímulo de una célula diana puede dar lugar a un cambio en las propiedades de la membrana celular que puede conducir a la despolarización o polarización de la célula diana. En un caso particular, la célula diana es una neurona, y el estímulo afecta a la transmisión de impulsos al facilitar o inhibir la generación de impulsos (potenciales de acción) por la neurona.

Para más detalles sobre las opsinas sensible a la luz, se puede hacer referencia a la publicación PCT n.º WO 2010/056970, titulada "Optically-Based Stimulation of Target Cells and Modifications Thereto," concedida a Deisseroth *et al.*

Algunos aspectos de la presente divulgación se dirigen a la implantación de cambios biestables en la excitabilidad de las poblaciones diana. Esto incluye, pero no se limita necesariamente, el mutante doble ChR2-C128S/D156A. Se ha encontrado que este mutante doble ChR2-C128S/D156A es bien tolerado en neuronas del hipocampo cultivadas, y conserva las propiedades esenciales de la SFO de activación rápida de tipo escalonada con pulsos breves individuales de luz azul, y de desactivación con luz verde o amarilla. En particular, el espectro de activación de ChR2-C128S/D156A alcanza un máximo de 445 nm. Se encontró un segundo máximo de desactivación a 390-400 nm, con una desactivación más rápida pero menos completa en comparación con el máximo de desactivación de 590 nm. Las fotocorrientes máximas en células que expresan ChR2-C128S/D156A resultaron ser robustas, y comparables a las de ChR2-D156A ($231,08 \pm 31,19 \text{ ETM}$; $N = 9$ células y $320,96 \pm 78,26 \text{ ETM}$; $n = 7$ células, respectivamente). Otros aspectos se dirigen a una mutación similar en VChR1.

Por ejemplo, la mutación en VChR1 podría proporcionarse en C123S/D151A, para proporcionar una fotocorriente desplazada hacia el rojo con una cinética lenta comparable a ChR2.

A continuación, se activaron neuronas transfectadas y de pinzamiento zonal individuales con pulsos de luz de 470 nm de 100 ms, y para garantizar durante registros muy prolongados que la disminución de corriente no fuera atribuible al deterioro de las células, cada célula se desactivó con pulsos de luz de 590 nm prolongados a intervalos distintos para determinar la magnitud de la corriente de las SFO restante en cada punto de tiempo. Sorprendentemente, las neuronas que expresaban ChR2-C128S/D156A dieron lugar a fotocorrientes sostenidas que eran más estables que las células que expresaban un único mutante solo. Ajustar una curva de desintegración

monoexponencial a la proporción de desactivación de I/activación de I a lo largo del tiempo reveló una constante de tiempo de desintegración espontánea de 29,3 min para ChR2-C128S/D156A, lo que indica que las mutaciones C128 y D156 actúan sinérgicamente para retrasar la desintegración del estado abierto de ChR2.

- 5 De acuerdo con la mejora requerida para la aplicación prevista a comportamientos de mamíferos complejos, todavía se presentaban partes significativas de la corriente de SFO mutante doble hasta 20 minutos después del único pulso de fotoactivación. Basándose en estas cinéticas de desintegración sorprendentemente lentas, el gen de mutante doble se conoce como gen SSFO (para la opsina estabilizada con función escalonada). La SSFO también se usa como abreviatura de la proteína activa. Ambos restos probablemente participan en el cierre del canal de ChR2
10 (bloqueo), y ambas mutaciones probablemente estabilicen la configuración de estado abierto del canal.

- Sin pretender quedar limitados a teoría alguna, algunos aspectos de la presente divulgación se refieren al descubrimiento de que las SSFO pueden ser completamente bloqueadas en la progresión del fotociclo, y por lo tanto, pueden representar la máxima estabilidad posible con el diseño del fotociclo. Por ejemplo, a diferencia de
15 ChR2-C128X y ChR2-D156A, el fotociclo de SSFO no parece tener acceso a productos secundarios desprotonados inactivos adicionales que probablemente se separen del fotociclo en etapas de fotociclo posteriores no alcanzadas en este mutante, lo que, a su vez, hace que la SSFO sea aún más fiable para el uso repetido *in vivo* que las mutaciones individuales parentales.

- 20 Algunos aspectos de la presente divulgación se dirigen a la sensibilidad de la SSFO a la luz. Por ejemplo, las canalrodopsinas con constantes de desintegración lentas actúan con eficacia como integradores de fotones. Esto puede ser particularmente útil para enfoques más sensibles y menos invasivos de modulación de circuitos optogenéticos, aún con una acción fácilmente valorable en la población neuronal diana a través de la modulación de la longitud del pulso de luz. Se ha descubierto que, incluso a intensidades de luz extraordinariamente bajas (tan
25 bajas como de 8 mW/mm^2), se podían obtener cientos de picoamperios de fotocorrientes de células enteras a partir de neuronas con expresión de SSFO, que aumentaban con cinéticas monoexponenciales en respuesta a la luz de 470 nm durante el todo el tiempo de iluminación. Otros aspectos se relacionan con el uso de constantes de tiempo de activación que se correlacionan linealmente con la potencia de luz de activación en una escala logarítmica, lo que es indicativo de una relación de la ley de potencia, y sugiere que la SSFO es un integrador puro, con la exposición
30 total de los fotones a lo largo del tiempo como el único determinante de la fotocorriente. Por ejemplo, se cree que el número de fotones por superficie de membrana necesario para que las fotocorrientes alcancen una activación submáxima dada (tiempo hasta T) es constante independientemente de la potencia de la luz de activación.

- Algunos aspectos ilustrativos de la presente divulgación se refieren al uso de una quimera de ChR1/VChR1 híbrida que no contiene ninguna secuencia de ChR2, se deriva de dos genes de opsina que no se expresan bien individualmente, y se denomina en el presente documento C1V1. Algunos aspectos de la presente divulgación también se refieren a mejoras de la dirección a la membrana de VChR1 mediante la adición de una señal de tráfico de membrana derivada del canal $K_{ir}2.1$. Las imágenes confocales de neuronas cultivadas que expresan VChR1-EYFP revelaron una gran proporción de proteína intracelular en comparación con ChR2; por lo tanto, la señal de
40 tráfico de membrana derivada del canal $K_{ir}2.1$ se usó para mejorar la dirección a la membrana de VChR1. La dirección a la membrana de este VChR1-ts-EYFP se mejoró ligeramente en comparación con VChR1-EYFP; sin embargo, las fotocorrientes medias registradas a partir de neuronas de hipocampo cultivadas con expresión de VChR1-ts-EYFP solo fueron ligeramente superiores a las de VChR1-EYFP.

- 45 Por consiguiente, algunos aspectos de la presente divulgación se refieren a VChR1 modificada intercambiando hélices con las hélices correspondientes de otras ChR. Por ejemplo, se ha descubierto una mejora sólida en dos quimeras en las que se reemplazaron las hélices 1 y 2 por los segmentos homólogos de ChR1. Se descubrió que si los sitios de corte y empalme estaban en el bucle intracelular entre las hélices 2 y 3 (en el resto A1a145 de ChR1) o dentro de la hélice 3 (en el resto Trp163 de Chp1), las quimeras resultantes se expresaron de manera consistente y
50 mostraron fotocorriente y propiedades espectrales mejoradas de forma similar. Este resultado fue inesperado, ya que la ChR1 solo se expresa débilmente y se integra poco en las membranas de la mayoría de las células hospedadoras de mamíferos. La quimera ChR11VChR1 híbrida resultante se denomina en el presente documento C1V1.

- 55 Algunos aspectos de la presente divulgación se refieren a la expresión de C1V1 en neuronas del hipocampo cultivadas. Los ensayos experimentales han mostrado una serie de resultados sorprendentes y útiles, que se analizarán con más detalle más adelante. C1V1-EYFP presenta una fluorescencia media sorprendentemente mejorada en comparación con VChR1-EYFP. Las fotocorrientes de células enteras en neuronas que expresan C1V1 fueron mucho mayores que las de VChR1-EYFP y VChR1-ts-EYFP, y la selectividad iónica fue similar a la de ChR2 y VChR1. La adición de la señal de tráfico de $K_{ir}2.1$ entre C1V1 e YFP potenció aún más las fotocorrientes en un 41 % más (las fotocorrientes medias de C1V1-ts-EYFP fueron extremadamente elevadas, casi diez veces superiores a las de VChR1 de tipo silvestre (WT)). Los niveles medios de fluorescencia coincidían estrechamente con las fotocorrientes medidas (fluorescencia media $9,3 \pm 1$, $19,6 \pm 3,4$, $19,8 \pm 2,8$ y $36,3 \pm 3,8$ para VChR1-EYFP, VChR1-ts-EYFP, C1V1-EYFP y C1V1-ts-EYFP, respectivamente), lo que sugiere que el aumento en los tamaños de las fotocorriente se debió principalmente a la expresión mejorada de estos canales en las neuronas de mamíferos. La fluorescencia somática total (medida como la densidad de píxeles integrada) se correlacionó linealmente con el
65

tamaño de la fotocorriente en células individuales registradas/fotografiadas a través de las diferentes construcciones (VChR1, VChR1-ts-EYFP, C1V1, C1V1-ts-EYFP). Esto sugiere (sin quedar limitados a la teoría) que el aumento de la fotocorriente de C1V1 se debe a cambios en la expresión funcional en las neuronas.

- 5 Diversos aspectos de la presente divulgación se refieren a opsinas con constantes de desintegración rápidas. Esta propiedad puede ser particularmente útil para proporcionar un control exacto de la generación de picos, *por ejemplo*, para interferir mínimamente con la conductancia intrínseca, activar picos individuales por pulso de luz y/o minimizar los potenciales de meseta durante los trenes de pulsos de luz.
- 10 Los resultados experimentales sugieren que las fotocorrientes generadas por la luz registradas en C1V1-ts-EYFP se desintegraron con una constante de tiempo similar a la de VChR1. Por lo tanto, algunos aspectos de la presente divulgación se dirigen a modificaciones en la región del cromóforo para mejorar la cinética del fotociclo, la inactivación reducida y/o la posible absorción desplazada al rojo adicional.
- 15 Un aspecto se dirige a una mutación de ChETA correspondiente E162T, cuyos experimentos sugieren que proporciona una fotociclo acelerado (por ejemplo, de casi el triple); cabe hacer referencia a Gunaydin, *et al.*, "Ultrafast optogenetic control", *Nat Neurosci*, 2010. Sorprendentemente, esta mutación mostró que el espectro de acción es hipsocrómico a 530 nm, mientras que las mutaciones análogas en ChR2 u otras rodopsinas microbianas han causado un cambio al rojo. Otra realización se dirige a una mutación de glutamato-122 a treonina (C1V1-E122T). Los ensayos experimentales mostraron que C1V1-E122T se inactiva solo en un 26 % en comparación con un 46 % de inactivación de ChR2; además, el espectro se desplazó hacia el rojo a 546 nm.
- 20

- 25 Otro aspecto de la presente divulgación se dirige a un mutante doble de C1V1 que incluye las mutaciones E122T y E162T. Los ensayos experimentales han demostrado que la inactivación de la corriente fue incluso menor que en el mutante E122T, y que el fotociclo fue más rápido en comparación con E162T. Esto sugiere que múltiples propiedades útiles de las mutaciones individuales se conservaron juntas en el mutante doble.

- Algunos aspectos de la presente divulgación incluyen la expresión de diversas opsinas sensibles a la luz en las neuronas. Se llevaron a cabo ensayos experimentales de genes de opsina C1V1 en neuronas generando vectores lentivíricos codificantes de C1V1-ts-EYFP y diversas combinaciones de mutaciones puntuales descritas en el presente documento. A continuación, se expresaron las opsinas en neuronas del hipocampo cultivadas, y se registraron fotocorrientes de células enteras en condiciones de estimulación idénticas (pulsos de 2 ms, luz 542 nm, 5,5 mW/mm²). Las fotocorrientes en las células que expresan C1V1, C1V1-E162T y C1V1-E122T/E162T fueron todas consistentes, y tenían una tendencia mayor que las fotocorrientes de ChR2-H134R. Los experimentos también incluyeron una comparación de la fluorescencia de YFP somática integrada y las fotocorrientes de células con expresión de C1V1-E122T/E162T y de células con expresión de ChR2-H134R. Sorprendentemente, las células C1V1-E122T/E162T mostraron fotocorrientes más potentes que las células ChR2-H134R a niveles de fluorescencia equivalentes. Esto sugiere que C1V1 podría poseer una conductancia unitaria más alta en comparación con ChR2-H134R. Los resultados de los ensayos sugieren que la cinética de C1V1-E122T fue más lenta que la de C1V1-E122T/E162T y que las células con expresión de C1V1-E122T respondieron más fuertemente a la luz roja (630 nm) que las células con expresión del mutante doble. Esto puede ser particularmente útil para generar picos optogenéticos en respuesta a la luz roja.
- 30
- 35
- 40

- 45 En consonancia con diversos aspectos de la presente divulgación, neuronas inhibitoras y/o excitadoras que residen dentro del mismo microcircuito van a ser la diana con la introducción de diversas opsinas. Se realizaron ensayos experimentales mediante C1V1-E122T/E162T y ChR2-H134R expresados por separado bajo el promotor de CaMKIIa en neuronas de hipocampo cultivadas. Las células que expresan C1V1-E122T/E162T se activaron en respuesta a pulsos de luz verde de 2 ms (560 nm), pero no a pulsos de luz violeta (405 nm). Por el contrario, las células con expresión de ChR2-H134R se activaron en respuesta a pulsos de luz a 405 nm de 2 ms, pero no en respuesta a pulsos de luz a 561 nm de 2 ms.
- 50

- Diversos aspectos de la presente divulgación se refieren a la activación independiente de dos poblaciones neuronales de cortes cerebrales vivos. Los ensayos experimentales se realizaron mediante CaMKIIa-C1V1-E122T/E162T-ts-eYFP y EFla-DIO-ChR2-H134R-EYFP en mPFC de ratones PV::Cre. En células PYR sin expresión, los pulsos de luz de 405 nm generaron corrientes postsinápticas inhibitoras potentes y rápidas debido a la activación directa de las células PV, mientras que los pulsos de luz de 561 nm solo generaron las IPSC polisinápticas de larga latencia esperadas derivadas de la activación de células piramidales C1V1 de neuronas inhibitoras locales.
- 55

- De acuerdo con otros aspectos de la presente divulgación, se puede realizar la excitación de elementos celulares independientes *in vivo*. Los ensayos experimentales se realizaron usando registros de optodos. Para examinar el efecto inhibitor de la actividad de las células PV sobre el aumento de neuronas piramidales, se usó un protocolo experimental en el que pulsos de luz violeta de 5 Hz (para activar ChR2 en células PV) precedieron a pulsos de luz verde de 5 Hz (para activar C1V1 en neuronas piramidales excitadoras) con intervalos entre pulsos variables. Los resultados de los ensayos sugieren que, cuando los pulsos de luz violeta y verde se separaron en 100 ms, las respuestas a los pulsos de luz verde no se vieron afectadas por los pulsos violetas. Sin embargo, a medida que se redujeron los retrasos entre los pulsos violeta y verde, los eventos inducidos por la luz verde se inhibieron más
- 60
- 65

fácilmente hasta que se eliminaron de manera eficaz/completa cuando se presentaron los pulsos de luz simultáneamente.

Como se menciona en el presente documento, diversos aspectos de la presente divulgación se refieren a un sistema o método optogenético que correlaciona el control temporal, espacial y/o de tipo celular en un circuito neuronal con métricas medibles. De acuerdo con los otros aspectos mencionados en el presente documento, determinados aspectos se refieren a estudiar y probar trastornos. Una lista no exhaustiva de ejemplos de realizaciones y resultados experimentales coincidentes con dichas realizaciones se proporciona en Yizhar *et al.*, *Nature*, 2011, 477(7363):171-8. Las referencias enumeradas en el presente documento pueden ayudar a proporcionar información general con respecto a varios campos que pueden relacionarse con uno o más aspectos de la presente divulgación, y además pueden proporcionar información específica con respecto a la aplicación de uno o más de dichos aspectos, a los que se pueden aplicar una o más de las siguientes referencias.

Varios aspectos descritos anteriormente y mostrados en las figuras pueden implantarse juntos y/o de otras maneras. Uno o más de los elementos representados en los dibujos/figuras también pueden implantarse de una manera más separada o integrada, o eliminarse y/o volverse no operativos en ciertos casos, como es útil de acuerdo con determinadas aplicaciones. En vista de la descripción del presente documento, los expertos en la materia reconocerán que se pueden realizar muchos cambios en la misma sin apartarse del espíritu ni del alcance de la presente divulgación.

Se cree que la presente divulgación es útil, ya que se relaciona con el control sobre trastornos del sistema nervioso, tales como trastornos asociados con la disfunción social, como se describe en el presente documento. Determinadas aplicaciones de la presente divulgación se refieren a sistemas o métodos optogenéticos que correlacionan el control temporal, espacial y/o de tipo celular en un circuito neuronal con medidas mensurables. Dado que muchos aspectos de las realizaciones ilustrativas desveladas en el presente documento se refieren y se basan significativamente en desarrollos previos en este campo, la siguiente descripción resume dichos desarrollos previos para proporcionar una comprensión sólida de los fundamentos y las enseñanzas subyacentes a partir de los cuales se pueden extraer detalles y modificaciones de implantación, incluyendo aquellos encontrados en el anexo adjunto. Es en este contexto en el que se proporciona la siguiente descripción. Si bien la presente invención no se limita necesariamente a dichas aplicaciones, varios aspectos de la invención se pueden apreciar a través de una descripción de diversos ejemplos con el uso de dicho contexto.

La **FIG. 13** representa un modelo para evaluar estímulos y/o posibles tratamientos para diversos trastornos del sistema nervioso. Las observaciones iniciales **220** se toman **202** de comportamiento y/o respuesta celular para un sujeto/paciente. Se escoge y se modifica una población de células diana para expresar una molécula sensible a la luz. En determinadas implantaciones, la población de células diana se selecciona para proporcionar control sobre el equilibrio de E/I en la corteza prefrontal del cerebro de un sujeto, como se describe con más detalle en el presente documento. El equilibrio de excitación/inhibición (E/I) de la población de células diana se puede modificar **204** entonces (por ejemplo, elevar o reducir) mediante la exposición de la población de células diana modificada a la luz. La luz puede proporcionarse dentro de un intervalo predeterminado basado en las características de absorción de la molécula que responde a la luz. Se toman nuevamente observaciones **220** del comportamiento y/o de la respuesta celular del sujeto. Estas observaciones proporcionan un punto de referencia sobre cómo actúa el sujeto sin estímulos ni tratamiento.

Para evaluar posibles tratamientos, se escoge **206** un estímulo y/o un posible tratamiento para el sujeto. Los ejemplos no limitantes de estímulos y tratamientos incluyen estímulos farmacológicos/fármacos **208**, de comportamiento **210** y/o eléctricos **212**. Los estímulos/tratamientos pueden evaluarse **214** observando el comportamiento del sujeto en respuesta al tratamiento y/o el comportamiento de la población de células diana en respuesta al tratamiento. Basándose en las observaciones, se puede hacer una determinación con respecto a la necesidad de un estímulo o tratamiento **216** adicional, o el deseo de ensayar tratamientos adicionales y/o diferentes. Una vez recogidas las observaciones **220**, las observaciones **220** de diversos tratamientos se pueden comparar **218** entre sí, así como con la observación inicial y las observaciones de comportamiento tras la elevación de E/I. La comparación de las observaciones **220** puede usarse para evaluar la eficacia de diversos posibles tratamientos.

En ciertos aspectos más específicos, la elevación del equilibrio de E/I produce déficits sociales y cognitivos en comparación con los comportamientos durante las observaciones iniciales.

La elevación deliberada y controlada del equilibrio de E/I permite el ensayo de posibles tratamientos en sujetos de ensayo mamíferos, tales como ratones que no presentan síntomas de la enfermedad que se está modelizando.

Algunos aspectos de la presente divulgación se refieren a la evaluación del efecto de diversos estímulos sobre síntomas de enfermedades neurológicas. Como se menciona a lo largo de la presente divulgación, la modificación del equilibrio de E/I en la corteza prefrontal del cerebro de un sujeto produce síntomas similares a los de diversos trastornos neurológicos, tales como el autismo y la esquizofrenia. En ciertos aspectos de la presente divulgación, el circuito neuronal identificado como aquel que efectúa el equilibrio de E/I se manipula usando una o más técnicas que incluyen métodos farmacológicos, eléctricos, magnéticos, quirúrgicos y optogenéticos. Se controla el efecto de la

manipulación de los síntomas mostrados.

En ciertos aspectos más específicos, la manipulación de neuronas piramidales e interneuronas inhibitoras de la expresión de la parvalbúmina se usa para modelizar estados patológicos e identificar nuevos tratamientos para enfermedades conocidas. Por ejemplo, el equilibrio de E/I en la corteza prefrontal se eleva (o se reduce), y luego se administra un posible tratamiento al sujeto. Se puede controlar el efecto del tratamiento sobre los síntomas observados o sobre el circuito neuronal (o ambos). La información obtenida del control de los síntomas y/o del circuito neuronal se puede usar para proporcionar una mejor comprensión de las vías neuronales que causan los síntomas observados. La información también se puede usar para determinar la eficacia del posible tratamiento. En función de la eficacia, o de la falta de la misma, del posible tratamiento, se pueden realizar modificaciones que den lugar a un nuevo posible tratamiento para su ensayo.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, se proporciona un estímulo a un sujeto que presenta síntomas de una enfermedad neuronal tal como esquizofrenia o autismo, por ejemplo. El estímulo puede ser farmacológico, eléctrico, magnético, quirúrgico, optogenético o de comportamiento, por ejemplo.

En consonancia con diversos aspectos de la presente divulgación, el control sobre el circuito neuronal puede incluir la inhibición o excitación, pudiendo incluir cada una el disparo coordinado y/o susceptibilidad modificada para entradas del circuito externas. Por ejemplo, la inhibición se puede lograr usando una opsina que responda a la luz, tal como una bomba de iones (por ejemplo, NpHR y variantes de NpHR). Dichas bombas de iones alejan el potencial de membrana de la neurona de su voltaje umbral para disuadir o inhibir los potenciales de acción. En otro caso, la excitación se puede lograr usando una opsina sensible a la luz, tal como un canal iónico (por ejemplo, ChR2 y variantes de ChR2). Dichos canales iónicos pueden hacer que el potencial de membrana se mueva hacia y/o sobrepase el voltaje umbral, excitando o estimulando así potenciales de acción.

De acuerdo con diversos aspectos, se puede usar una opsina sensible a la luz para cambiar (temporalmente) el potencial de reposo de una neurona con el fin de aumentar o disminuir su susceptibilidad a las entradas del circuito externas. Estas diversas opciones también se pueden usar en combinación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Creación y caracterización de la opsina estabilizada con función escalonada

Se desarrollaron inicialmente herramientas optogenéticas a largo plazo (de hecho, biestables) que funcionan a escalas de tiempo de hasta 4 órdenes de magnitud superiores a las de ChR2 de tipo silvestre (WT) (SFO o productos génicos de opsina con función escalonada; Velocidad de disociación = 2,5-102 segundos); estas mutaciones de la posición C128 de ChR2 condujeron a un aumento de la sensibilidad a la luz que aumentó con la constante de tiempo de desactivación. El trabajo posterior desarrolló aún más el concepto inicial de SFO, con la mutación de la pareja de red de protones de C128 D156 (FIG. 1A) para una extensión del fotociclo y la vida útil del estado abierto. Sin embargo, ninguna clase de mutación da lugar a una estabilidad completa en la escala de tiempo de comportamiento de mamíferos, mostrando ambas una desintegración sustancial durante los primeros 5-10 minutos, y la iluminación prolongada de las neuronas que expresan SFO, en algunos casos, puede conducir a inactivación de la canalrodopsina causada por la desprotonación del cromóforo y la acumulación de un producto secundario de fotociclo en una reacción secundaria de un fotociclo intermedio tardío. Por lo tanto, se intentó la generación de una SFO activada con luz azul, adecuadamente estable para la optogenética combinatoria en sistemas de mamíferos mediante la mutación de C128 y D156, con la hipótesis de que el mutante combinado podría presentar una estabilización suficiente del estado abierto. Dado que las SFO se activan con luz azul, pero, de hecho, se pueden desactivar con luz amarilla, si se mantuviera esta propiedad adicional, dicha SFO estable también proporcionaría una inhibición lateral en el dominio espectral que podría potenciar aún más el control combinatorio.

Materiales y métodos

Se generaron ChR2 (D156A) y SSFO mediante la introducción de mutaciones puntuales en el vector pLentiCaMKII α -ChR2-EYFP-WPRE usando mutagénesis dirigida al sitio (Quikchange II XL; Stratagene). La señal de tráfico de membrana se obtuvo del canal Kir2.1. Las mutaciones se confirmaron secuenciando la secuencia de codificación y los sitios de corte y empalme. Para la administración de genes mediada por AAV, se subclonaron fusiones de opsina-EYFP junto con el promotor CaMKII α en una versión modificada del vector pAAV2-MCS. La expresión de opsina dependiente de Cre se realizó clonando el casete de opsina-EYFP en la orientación inversa entre pares de sitios lox incompatibles (loxP y lox2722) para generar un marco de lectura abierto invertido doble floxeado (D10) bajo el control del promotor del factor de alargamiento 1 α (EF-1 α). Todas las construcciones están disponibles en Deisseroth Lab (www.optogenetics.org).

Para la expresión heteróloga de ChR en células de *Pichia pastoris* (cepa 1168H, adquirida en Invitrogen), se clonó el fragmento de ChR sintético optimizado en codones humanos codificante de los aminoácidos 1-315 (véase el n.º de acceso AF461397) en el vector pPICZ (Invitrogen) a través de sus sitios de restricción de EcoRI y NotI. Se modificó el marcador de polihistidina C-terminal codificado en el vector a una secuencia 12His. Los mutantes de ChR se

generaron mediante mutagénesis dirigida (kit QuickChange, Stratagene). Se realizaron la transformación, el cultivo celular y la purificación de proteínas. Tras la inducción de la expresión de proteínas durante 24 h, las células se cosecharon y se lisaron suavemente usando un homogenizador de alta presión (Avastin). Se recogió la fracción de membrana, se homogenizó y se disolvió en dodecilmaltósido al 1 % (p/v). Tras la unión de la proteína ChR a una resina de Ni-NTA (Qiagen) y el lavado de la columna con imidazol 200 mM, se eluyó ChR con imidazol 500 mM. Se combinaron las fracciones que contenían la proteína, se desalaron (Float-a-lyzer, Roth) y se concentraron (Amicon Ultra, Millipore) a una densidad óptica de 1 a 480 nm. Los espectros se registraron en un espectrofotómetro Cary 50 Bio (Varian Inc.).

Resultados

Se generaron los mutantes de ChR2 C128S, D156A, y los mutantes dobles 128S/156A, y se purificaron a partir de *Pichia pastoris* para medir primero la estabilidad intrínseca en estado abierto en ausencia de propiedades celulares que pudieran confundir. Los espectros de absorción mostraron cambios rápidos esperados en respuesta a una breve administración de luz que se recuperaron en gran medida en 3 minutos para los mutantes simples C128S (**Figura 1B, F**) y D156A (**Figura 1C, G**). Sin embargo, en contraste con ambos mutantes simples, el mutante doble C128S/D156A mostró una estabilidad notablemente completa del estado activado, con un retorno esencialmente detectable al estado oscuro incluso tras 30 minutos (**FIG. 1D, H**). Los dos máximos característicos de estos espectros de absorción se pueden atribuir a la formación del estado conductor y a una especie desprotonada (P390; **FIG. 1B, C**) con algunas diferencias interesantes entre las variantes. En primer lugar, se observó un desplazamiento al rojo reducido del estado conductor en relación con el estado oscuro para el mutante doble en comparación con C128S (**Figura 1A, D**), planteando la preocupante cuestión del grado de eficacia que tendría la importante propiedad de inactivación con luz desplazada al rojo para el mutante doble. En el lado potencialmente beneficioso, también se observó que existía una contribución reducida del estado no conductor (P390) con respecto al estado conductor en el mutante doble en comparación con C128S (**FIG. 1B, D**), una propiedad útil que puede predecir una acumulación reducida de canales no conductores y que sugiere una etapa tardía del fotociclo que podría agotar el estado de conducción (por ejemplo, estado desensibilizado de P520 -> P480 (Des480); (**Fig. 1E**) puede bloquearse casi por completo (**FIG. 1E**). La estabilidad única del mutante doble C128S/D156A se ilustra además mediante mediciones de absorbancia monocromática continua de los tres mutantes durante 35 minutos de registro (**FIG. 1H**).

Ejemplo 2: Validación de activación en neuronas e *in vivo*

Por consiguiente, el mutante doble parece tener estabilidad notablemente distinta y casi óptima en la escala temporal del comportamiento de los mamíferos, pero con la capacidad crucial potencialmente reducida para la desactivación por luz desplazada hacia el rojo; todas estas cuestiones requieren la validación en neuronas e *in vivo*.

Materiales y métodos.

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

Se aislaron cultivos de hipocampo primarios de ratas Sprague-Dawley PO, se sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos de Matrigel (Invitrogen) y se trataron con FUDR para inhibir la excrecencia glial. Se transfeció ADN plasmídico exento de endotoxinas en neuronas cultivadas usando una mezcla de solución salina/CaPO₄ tamponada con HEPES. Se obtuvieron registros electrofisiológicos de neuronas individuales identificadas por la expresión de proteína fluorescente en medios Tyrode ([mM] NaCl 150, KCl 4, MgCl₂ 2, D-glucosa 10, HEPES 10, pH 7,35 con NaOH) usando una solución interna convencional ([mM] gluconato de K 130, KCl 10, HEPES 10, EGTA 10, MgCl₂ 2, pH 7,3 con KOH) en pipetas de vidrio de 3-5 MΩ. Para la fisiología de cortes corticales, se obtuvieron cortes coronales agudos de 300 μm de ratones C57BL/6J de tipo silvestre de 8-9 semanas de vida o PV::Cre inyectados previamente con virus en solución de corte de sacarosa con hielo ([mM] D-glucosa 11, sacarosa 234, KCl 2,5, NaH₂PO₄ 1,25, MgSO₄ 10, CaCl₂ 0,5, NaHCO₃ 26) usando un Vibratome (Leica). Los cortes se recuperaron en líquido cefalorraquídeo artificial oxigenado (LCRA; [mM] NaCl 124, KCl 3, MgCl₂ 1,3, CaCl₂ 2,4, NaH₂PO₄ 1,25, NaHCO₃ 26, D-glucosa 10) a 32 °C durante una hora. Se obtuvieron parches neuronales individuales tras identificar la expresión de proteína fluorescente a partir de la capa cortical prefrontal indicada bajo perfusión constante de LCRA. Se acopló la luz filtrada procedente de una fuente de lámpara de xenón de longitud de onda amplia (Sutter Instruments DG-4) al puerto de fluorescencia del microscopio (Leica DM-LFSA). Los filtros de paso de banda (Semrock) tenían un ancho de banda de 20 nm y se ajustaron con filtros de densidad neutra adicionales (ThorLabs) para igualar la potencia de salida de la luz en todo el espectro. Al manipular células o tejidos con expresión de SSFO, se tuvo cuidado de reducir al mínimo la exposición a la luz para evitar la activación por la luz ambiental. Antes de cada experimento, se aplicó un pulso de 20 s de luz a 590 nm para convertir todos los canales de SSFO al estado oscuro y evitar el agotamiento de las fotocorrientes. Para la adquisición de los espectros de activación y desactivación de SSFO, se registraron las neuronas cultivadas en el modo de fijación de voltaje. Para registrar los espectros de activación, se aplicó un pulso de 1 s de longitud de onda variable, seguido de un pulso de 10 s a 590 nm. Los espectros de desactivación se adquirieron aplicando primero un pulso de 1 s a 470 nm para activar las SSFO, seguido de un pulso de 10 s de longitud de onda variable. La activación o desactivación neta se calculó dividiendo el cambio en la fotocorriente después del primer o segundo pulso, respectivamente, mediante el cambio máximo de fotocorriente inducido por la longitud de onda máxima para esa célula. Los valores negativos en los

espectros de desactivación resultaron de rastros en los que, por ejemplo, un pulso de 10 s a 470nm condujo a un ligero aumento de la fotocorriente en lugar de desactivar los canales. Esto podría deberse al ancho del filtro de paso de banda relativamente ancho (20 nm) usado para estos registros con el Sutter DG-4. Se espera que las longitudes de onda intermedias (entre 470 nm y 520 nm) tengan un efecto mixto en la población del canal por las mismas razones.

Se adquirieron imágenes de células cultivadas en el mismo microscopio usando una cámara CCD Retiga Exi (Qimaging, Inc.) con una exposición de 100 ms con ganancia de 30. La densidad de potencia de iluminación fue de 12 mW mm⁻² a 500 nm con un conjunto de filtros de EYFP convencionales. Se realizó la cuantificación de la fluorescencia con el software ImageJ marcando una región que contenía el soma y las neuritas proximales, y calculando la intensidad total de los píxeles para cada celda integrada en esa región, en lugar de la fluorescencia media, ya que las fotocorrientes probablemente estén relacionadas con el número total de canales unidos a la membrana en lugar de la expresión del canal media por área. Los cálculos del flujo de fotones para las propiedades de integración de SSFO se realizaron calculando el flujo de fotones a través del objetivo del microscopio con cada potencia de luz, y luego dividiéndolo para obtener el flujo de fotones a través de la superficie de la célula, basado en el diámetro de las células registradas y aproximándose a la forma de la celda como un esferoide.

Transfección genética vírica

Se usó la administración génica mediada tanto por lentivirus como por AAV para la expresión heteróloga de opsinas en ratones. Las opsinas indicadas fueron impulsadas por el promotor de la proteína quinasa II alfa dependiente de la calmodulina (CaMKII α) humana para dirigir las neuronas excitadoras corticales o el factor de elongación 1a (EF-1a) junto con un casete inducible por Cre, y seguido por el elemento regulador posterior a la transcripción del virus de la hepatitis de Woodchuck (WPRE). El vector AAV recombinante inducible por Cre fue producido por el Centro de Vectores de la Universidad de Carolina del Norte (Chapel Hill, NC, EE. UU.), y se usó junto con los ratones transgénicos parvalbúmina::Cre para dirigirse a las interneuronas positivas en parvalbúmina. En resumen, SSFO-eYFP se insertó en la orientación inversa entre pares de sitios lox incompatibles (loxP y lox2722). Las construcciones de AAV se subclonaron en una versión modificada del pAAV2-MCS, se serotiparon con proteínas de la cubierta de AAV5 y se empaquetaron mediante el núcleo del vector vírico en la Universidad de Carolina del Norte. La concentración vírica final de los vectores de AAV fue de 1 x 10¹² copias del genoma (gc)/ml. Todas las construcciones lentivíricas se generaron como se ha informado. Todas las construcciones están disponibles en Deisseroth Lab (www.optogenetics.org). Se aplicaron inyecciones víricas estereotácticas según los protocolos aprobados por la Universidad de Stanford. Se dispusieron ratones jóvenes (4-6 semanas) bajo anestesia con isoflurano en un marco estereotáctico (Kopf Instruments) y se nivelaron usando referencias en el cráneo de bregma y lambda. Las craneotomías se realizaron para causar un daño mínimo en el tejido cortical. La corteza prefrontal infralímbica (IL; desde el bregma: 1,8 mm anterior, 0,35 mm lateral, -2,85 mm ventral) se usó como diana con una jeringa de 10 μ l y una aguja biselada de 35 g (World Precision Instruments). El virus se infundió a una velocidad de 0,111 l/min. A los sujetos inyectados con virus para estudios de comportamiento se les implantó además un dispositivo de acoplamiento de fibra óptica para facilitar la administración de luz con o sin una fibra cerebral penetrante conectada para la administración local a la región cortical diana como se ha indicado (Doric Lenses, Canadá). Las fibras penetrantes se introdujeron estereotácticamente a una profundidad de -2,5 mm desde las mismas coordenadas anterior y lateral, y se fijaron usando cemento adhesivo de fijación (C&B MetaBond) antes del cierre con adhesivo del cuero cabelludo (Vetbond, 3M). A los animales, se les administró alivio analgésico tras la recuperación de la cirugía.

Resultados

Como con la ChR2 de tipo silvestre, los mutantes C128 y los mutantes D156, Se descubrió que el mutante doble ChR2-C128S/D156A se expresó bien en neuronas del hipocampo cultivadas, y conservó las propiedades esenciales de la SFO de activación rápida de tipo escalonada con pulsos breves individuales de luz azul, y de desactivación con luz verde o amarilla. De hecho, a pesar del desplazamiento al rojo reducido en la absorbancia de estado abierto de mutante doble, se podría lograr la desactivación completa aún con luz desplazada hacia el rojo (en este caso con luz amarilla, óptimamente a 590 nm), esencial para posibles fines de control combinatorio. La desactivación también fue posible con luz de 390 nm, a una velocidad mayor que la luz amarilla debido a la presencia sustancial de la especie P390, pero también fue incompleta debido a la absorción residual del estado oscuro a esta longitud de onda (**FIG. 1A**). Además, tras la desactivación con luz a 390 nm, la reactivación con 470 nm fue menos eficaz que tras la desactivación a 590 nm, apuntando a una probable inactivación fotoquímica con luz UV debido al atrapamiento en una isoforma desprotonada/desensibilizada que no se alcanza tras la desactivación de la luz desplazada al rojo (ilustrado en la **Fig. 1E**), de nuevo apoyando el uso de la desactivación de luz amarilla para mejorar potencialmente la separación espectral.

Las fotocorrientes máximas en células que expresan ChR2-C128S/D156A fueron comparables a las de ChR2-D156A (231,08 \pm 31,19; n = 9 células y 320,96 \pm 78,26; n = 7 células, respectivamente, p = 0,26, ensayo t para muestras no relacionadas). De acuerdo con los datos espectroscópicos, las neuronas que expresaban ChR2-C128S/D156A dieron lugar a fotocorrientes sostenidas que eran mucho más estables que las células que expresaban un único mutante solo (**FIG. 2B**). El ajuste de una curva de desintegración monoexponencial con la

relación de desactivación/activación en función del tiempo reveló una constante de tiempo de desintegración espontánea aparente de 29,3 min para ChR2-C128S/D156A ($r^2 = 0,9139$), que fue 4,2 veces mayor que para D156A (6,9 min, $r^2 = 0,8357$; **FIG. 2B**) en comparación de un lado a otro. De hecho, dado el hecho de que la espectroscopia no reveló esencialmente ninguna reversión al estado oscuro en esta escala de tiempo, la desintegración restante podría ser atribuible, en parte, a las propiedades dictadas por las células, tales como el recambio proteico. De acuerdo con la mejora requerida para la aplicación prevista a comportamientos de mamíferos complejos, la **Figura 2C** muestra un registro típico de células enteras largas con activación de luz azul y desactivación de luz amarilla en el contexto de la actividad sináptica asíncrona entrante. Basándose en estas propiedades temporales sorprendentemente prolongadas, el gen del mutante doble se conoce como el gen SSFO (para la opsina estabilizada con función escalonada) y, para simplificar, también se usa SSFO como abreviatura de la proteína.

Las canalrodopsinas con dichas constantes de desintegración lenta podrían permitir que la célula transducida actuara como un integrador de fotones, con una sensibilidad a la luz eficaz (es decir, amplitud de la fotocorriente por fotón absorbido por la célula) que se escale con la $T_{\text{desactivación}}$. La SSFO podría, por lo tanto, permitir enfoques más sensibles, y menos invasivos de modulación de circuitos optogenéticos, pero aún con inicio y compensación de acción temporalmente precisos y con efectos fácilmente valorables sobre la población neuronal diana a través de la modulación de la longitud del pulso de luz. De hecho, se encontró que, con intensidades de luz extraordinariamente bajas (tan bajas como de $8 \mu\text{W mm}^{-2}$), se pudieron obtener cientos de picoamperios de fotocorriente de células enteras a partir de neuronas que expresaban SSFO (**FIG. 2D**). Las fotocorrientes aumentaron con la cinética monoexponencial en respuesta a la luz a 470 nm durante todo el tiempo de iluminación (**FIG. 2D**, izquierda) y las constantes de tiempo de activación fueron linealmente dependientes de la potencia de la luz de activación en una escala logarítmica hasta que se aproximó a la escala de milisegundos intrínseca al canal, lo que sugiere que la SSFO alcanza el estado de un integrador puro, con la exposición total de los fotones a lo largo del tiempo como el único determinante de la fotocorriente (**FIG. 2D** medio; $n = 27$ registros de 5 células). Sin embargo, esto también significa que el tejido que expresa la opsina debe mantenerse en completa oscuridad antes de que se inicien los experimentos (algo trivial para los experimentos en mamíferos *in vivo*, pero que requiere mayor atención para las labores *in vitro*). Cuando los datos fueron representados como el número total de fotones (administrados a un único soma neuronal e integrados en el tiempo) necesario para que las fotocorrientes alcanzaran una fracción fija de $I_{\text{máx}}$ para la célula registrada, este número característico de fotones fue constante independientemente de la potencia de la luz de activación **FIG. 2D**, derecha; $9,1 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^8$ fotones; $n = 27$ registros de 5 células), demostrando nuevamente la propiedad de integración de fotones puros de la SSFO.

Para validar esta nueva herramienta optogenética *in vivo*, se exploró la capacidad de la SSFO para lograr la modulación específica del tipo de célula estable *in vivo* en los mamíferos, usando la regulación de la excitación cortical y la inhibición como un sistema experimental. Como lectura, se realizaron registros de los optrodos en ratones anestesiados que expresaban SSFO en las subregiones prefrontal (PL) e infralímbica (IL) de la corteza prefrontal media (mPFC; **FIG. 2E**). Para modular la excitación, en primer lugar, se expresó SSFO-eYFP en las neuronas piramidales bajo el control del promotor de CaMKIIa específico de las neuronas excitadoras. En segundo lugar, para modular la inhibición, se expresó SSFO-eYFP en ratones transgénicos PV::Cre usando un virus de marco de lectura abierto invertido (DIO) floxeado doble; en estos ratones, la SSFO solo se expresó en las neuronas de parvalbúmina GABAérgicas positivas en Cre. Para cartografiar la modulación óptica, se realizaron registros en sitios progresivamente más ventrales de ratones a los que se inyectó AAV5-CaMKIIa::SSFO-EYFP en la corteza prefrontal media (mPFC), usando un optrodo de dos láser en avance (**FIG. 2E**) y un protocolo de láser de activación/desactivación azul/verde (**FIG. 2F-G**). La actividad de unidades múltiples en mPFC de estos ratones aumentó de manera significativa y estable solo en la región transducida, en respuesta a un pulso de 1 s de luz a 473 nm (95 mm^{-2} , correspondiente a 10 mW mm^{-2} en la punta del electrodo). Esta actividad aumentada se terminó de forma eficaz con un pulso de luz de 2 s a 561 nm (112 mW mm^{-2} ; **FIG. 2F**). Los aumentos significativos en la tasa de picos de múltiples unidades (Hz) se restringieron en mPFC (**FIG. 2**) y no se observaron reducciones significativas en la tasa de picos en ninguno de los sitios de registro tras la estimulación con luz azul. Como era de esperar, en los sitios de registro de mPFC (pero no en los sitios dorsal a mPFC), las tasas medias de picos de múltiples unidades se modularon con la luz; en rastros que mostraron una modulación significativa de actividad, antes de la activación, tras la activación y tras la desactivación, las tasas de picos fueron de $2,60 \pm 0,39$ Hz, $33,82 \pm 4,83$ Hz y $5,04 \pm 1,23$ Hz, respectivamente (**FIG. 2H**; $n = 46$ registros en 2 ratones; $p = 3 \times 10^{-8}$ tras la activación y $p = 0,048$ tras la desactivación, ambas comparadas con el momento basal previo a la activación; ensayo t de Student para muestras relacionadas).

Por el contrario, en ratones PV::Cre inyectados con AAV5-EF1a-DIO::SSFO-eYFP en mPFC, la actividad de múltiples unidades disminuyó tras un pulso idéntico de 1 s de luz a 470 nm y volvió a los niveles basales tras el pulso de 2 s a 561 nm (**FIG. 2G**). En estos ratones, las disminuciones en la tasa de picos de múltiples unidades también estuvieron altamente restringidas a mPFC ($n = 5$ de 54 sitios de registro a lo largo del rastreo dorsoventral completo), y no se observó un aumento significativo en la tasa de picos en ninguno de los sitios de registro tras la estimulación con luz azul. En las rastros que mostraron una modulación significativa de la actividad, las tasas medias de picos de múltiples unidades antes de la activación, tras la activación y tras la desactivación fueron de $14,82 \pm 1,26$ Hz, $3,66 \pm 0,58$ Hz y $9,69 \pm 1,77$ Hz, respectivamente (**FIG. 2H**; $p = 0,002$ tras la activación y $p = 0,088$ tras la desactivación, ambas comparadas con el momento basal previo a la activación; ensayo t de Student para muestras relacionadas). De nuevo, acorde con la alta estabilidad prevista de la fotocorriente de SSFO, se descubrió que la

modulación de las tasas de disparos *in vivo* se mantuvo de manera estable tras el pulso breve durante muchos minutos (FIG. 2I).

Ejemplo 3: Efectos de la SSFO sobre el comportamiento y la dinámica del circuito en ratones con libertad de movimiento

Tras establecer que la SSFO puede usarse para modular bidireccionalmente la excitabilidad prefrontal en escalas de tiempo relevantes para el comportamiento, se usó SSFO para examinar los efectos del equilibrio de E/I celular elevado sobre el comportamiento y la dinámica del circuito en ratones con libertad de movimiento (FIG. 3). Se expresó SSFO en neuronas excitadoras corticales prefrontales usando el promotor de CaMKII α específico de las neuronas excitadoras, o en neuronas inhibitoras con expresión de parvalbúmina (PV) usando un virus de marco de lectura abierto invertido (DIO), doble floxeado, junto con ratones transgénicos PV::Cre (FIG. 3J-L). El virus se inyectó en mPFC como se ha descrito anteriormente, seguido de un implante crónico de fibra óptica que se proyectó más allá del cráneo inmediatamente dorsal a mPFC para la administración de luz. (FIG. 3A, B).

Materiales y métodos

Cálculos de información mutua

Para estudiar los efectos de la SSFO en la información de tasa de picos de sEPSC, se realizaron registros zonales de células enteras a partir de células piramidales identificadas visualmente en la capa V de mPFC. Usando la fijación de la corriente, se estimuló una sola célula piramidal con un tren de formas de onda de EPSC simuladas. Los eventos individuales de sEPSC tuvieron magnitudes de corriente máxima de 200 pA, y se desintegraron con una constante de tiempo de 2 ms. Cada experimento se dividió en 10 barridos, cada uno de 10 segundos de duración y separados 5 segundos para reducir al mínimo el agotamiento. Cada barrido se dividió en segmentos de 500 ms. El número total de sEPSC en cada segmento de 500 ms se seleccionó aleatoriamente de una distribución uniforme entre 0 y 250. Después, los tiempos de sEPSC dentro del segmento de 500 ms se seleccionaron aleatoriamente a partir de una distribución uniforme que abarcaba todo el segmento, simulando la entrada de excitación de una población de neuronas no sincronizadas. Empíricamente, estos parámetros de estimulación condujeron de manera fiable a las neuronas piramidales a tasas de disparo de 0 a 30 Hz. En condiciones marcadas como iniciales, se administró un pulso de 10 segundos de luz a 590 nm para inactivar por completo la opsina antes de ejecutar el protocolo de sEPSC. En condiciones en las que se activó la opsina, un pulso de 1 seg de luz a 470 nm precedió al protocolo de sEPSC.

Para comprender el efecto neto del equilibrio de E/I alterado sobre el procesamiento de la información, se calculó la información mutua entre la tasa de sEPSC de entrada y la tasa de picos de salida de cada neurona, que capta cambios relevantes en la forma de la curva IO y en la variabilidad de respuesta. En primer lugar, se estimó la distribución conjunta de la tasa sEPSC y la tasa de picos mediante la agrupación en el tiempo, la tasa de sEPSC y la tasa de picos, y construyendo un histograma conjunto. Los intervalos de tiempo tenían 125 ms de ancho, y la tasa de sEPSC se dividió en 10 intervalos igualmente espaciados de 0 a 500 Hz, aunque los resultados de la información mutua fueron uniformes en un amplio intervalo de parámetros de agrupamiento. La tasa de picos se agrupó usando el ancho del intervalo menos significativo dado el ancho del intervalo de tiempo (por ejemplo, ancho de intervalo de 8 Hz para intervalo de tiempo de 125 ms). A partir de este histograma conjunto, se calculó la información mutua igualando la diferencia entre la entropía de respuesta y la entropía de ruido. La entropía de respuesta cuantifica la cantidad total de incertidumbre en la tasa de picos de salida de la neurona. La entropía de ruido cuantifica la incertidumbre que permanece en la tasa de picos de salida dada la tasa de entrada. Cabe señalar que la máxima información que las respuestas neuronales pueden transmitir sobre el estímulo de entrada es la entropía del conjunto de estímulos. Para 10 intervalos de tasas de sEPSC de entrada igualmente espaciadas y una distribución uniforme de la tasa de entrada en estos intervalos, la entropía de la tasa de entrada es $\log_2(10) = 3,322$ bits. La información mutua calculada a partir de distribuciones de probabilidad submuestreadas puede estar sesgada hacia arriba. Por consiguiente, todos los valores presentados de información mutua, la entropía de respuesta y la entropía de ruido se corrigieron por el sesgo debido a la falta de muestreo. Esta corrección se realiza calculando valores de fracciones más pequeñas (de la mitad a una octava parte) de los datos completos y extrapolando al límite de datos infinitos. Usando ventanas de tiempo de 125 ms, los factores de corrección siempre fueron inferiores a 0,07 bits.

También se estimó la función de transferencia de entrada-salida para cada neurona promediando la tasa de picos de salida a través de intervalos de tiempo con tasas de sEPSC de entrada similares. La forma de la función de entrada-salida se cuantificó calculando el intervalo dinámico y el punto de saturación de cada neurona, tratando las condiciones iniciales y las condiciones activadas por opsina por separado. El intervalo dinámico se definió como la diferencia entre la tasa de picos de salida máxima y mínima en todo el intervalo de tasas de sEPSC de entrada. El punto de saturación se definió como la tasa de sEPSC de entrada más baja que condujo a la neurona al 90 % de su tasa máxima de picos de salida en esa condición. Un punto de saturación reducido no puede deberse a una reducción multiplicativa de la ganancia o intervalo dinámico, sino que indica que la función de entrada-salida se vuelve más plana a tasas de sEPSC de entrada más elevadas.

Ensayo de comportamiento

Todos los animales sometidos a experimentos de comportamiento se aclimataron a un ciclo de luz/oscuridad inverso de 12 horas. Antes de los ensayos de comportamiento, se dejó que los animales se aclimataran a la sala en la que se llevaban a cabo los experimentos durante al menos 1 hora antes de que comenzaran los mismos.

El aparato de condicionamiento del miedo consistía en una jaula de condicionamiento cuadrada (18 x 18 x 30 cm) con un suelo de rejilla conectado a un generador de choque y un codificador, rodeado por una cámara acústica (instrumentos Coulburn, PA, EE.UU.). El aparato se modificó para permitir la administración de luz durante el entrenamiento y/o el ensayo. Para inducir el miedo, se colocaron los ratones en la jaula durante 120 segundos, y luego se emitió un tono puro (2,9 kHz) durante 20 segundos, seguido de un choque en la pata de 2 segundos (0,5 mA). Este procedimiento se repitió luego, y se controló el comportamiento de parálisis inmediata durante 30 s más tras la administración del segundo choque antes de que los ratones regresaran a su jaula de origen. El condicionamiento del miedo se evaluó 24 horas después mediante una medición continua de la parálisis (inmovilidad completa), la respuesta dominante del miedo conductual. Para ensayar el miedo contextual, se colocaron ratones en la jaula de condicionamiento original y se midió la parálisis durante 5 minutos. Para ensayar el condicionamiento de miedo asociado a una señal auditiva, se colocaron los ratones en un contexto diferente - una jaula en forma de pirámide con un suelo liso. Como control de la influencia del nuevo entorno, se midió la parálisis durante 2,5 minutos en esta nueva jaula, y luego se emitió un tono de 2,9 kHz durante 2,5 minutos, durante el que se midió la parálisis condicionada. La estimulación de luz a través del conector de fibra óptica se administró al suministrar luz a través de un cable zonal personalizado conectado a un láser de 473 nm. El pulso de luz se administró durante 2 segundos a una potencia de 98 mW mm⁻² en la punta de la fibra. Los resultados de los ensayos de condicionamiento contextual y asociado a una señal auditiva se analizaron mediante un ensayo t de Student.

Se analizó la interacción social en la jaula de inicio. En resumen, se dejó a un solo ratón en la jaula de inicio que vagara libremente en ausencia de la parte superior de la jaula durante un minuto. Se introdujo un nuevo macho joven (de 3 a 4 semanas de vida) intruso en la esquina opuesta a la del sujeto macho residente y se le dejó vagar libremente durante dos minutos. Se cuantificó visualmente la interacción física total entre los dos ratones, anotando la interacción social como el tiempo durante el que el ratón residente exploró activamente al intruso. Se realizaron ensayos de estimulación con la adición de un pulso de dos segundos de luz a 473 nm suministrado a través de un cable de fibra óptica (Doric Lenses) conectado a un cable de fibra óptica implantado crónicamente o dispositivo de acoplamiento de fibra craneal no invasivo implantado crónicamente como se indica. La fibra se desconectó antes de la experimentación y del período de aclimatación de un minuto.

Se realizó el ensayo social de tres cámaras. Los ratones de ensayo se introdujeron en la cámara central del aparato de tres cámaras y se dejó que se aclimataran durante 10 minutos con las puertas de las dos cámaras laterales cerradas. Se aplicaron pulsos de luz al comienzo y al final del período de aclimatación de 10 minutos. Al final del período de aclimatación, se introdujo un nuevo ratón macho conespecífico en la cámara "social", dentro de una copa de malla de alambre (Galaxy Pencil/Utility cup, Spectrum Diversified Designs). En la otra cámara (no social), se colocó una copa vacía idéntica. Las designaciones de las cámaras sociales y no sociales se escogieron al azar en cada ensayo para evitar el sesgo de la cámara. Entre los ensayos, se limpiaron las cámaras con etanol al 20 % y se dejaron secar por completo antes de iniciar el segundo ensayo. Se cuantificó el tiempo pasado en el centro no social y en las cámaras sociales usando el software de seguimiento automatizado Viewer II (BiObserve, Fort Lee, NJ). Los ratones que no mostraron preferencia de exploración social al inicio del estudio se excluyeron del análisis.

Se realizó el experimento de exploración de nuevos objetos en el mismo aparato de tres cámaras usado para los ensayos de comportamiento social, y usando el mismo método general. Los ratones se colocaron en la cámara central con las puertas de ambas cámaras laterales cerradas. Se administraron pulsos de luz durante el período de aclimatación de 10 minutos, tras lo que se abrieron las puertas y se permitió que los ratones exploraran todo el aparato. En lugar de las copas de malla de alambre, los nuevos objetos se presentaron al azar en cualquiera de las dos cámaras finales. Se calificó la exploración de los nuevos objetos en un período de 10 minutos para cada ratón como el tiempo en el que el ratón pasó explorando activamente el objeto. Los objetos usados eran bolas de plástico, cubos o figuras de porcelana, todas de tamaño aproximadamente similar. Los objetos se limpiaron a fondo entre los ensayos para evitar los rastros de olor.

La cámara de campo abierto (50 x 50 cm) se dividía en un campo central (centro, 23 x 23 cm) y un campo exterior (periferia). Se colocaron ratones individuales en la periferia del campo y se registraron las trayectorias de los animales con una cámara de vídeo. La distancia total recorrida se analizó usando el software Viewer2 (BiObserve, Fort Lee, NJ). El ensayo en campo abierto para cada ratón consistió en una sesión de 5 minutos dividida en dos segmentos de 2,5 minutos, con un pulso de luz de 2 s a 473 nm entre los dos segmentos. Se calificaron la longitud del rastreo, la velocidad y el % de tiempo pasado en el centro para cada ratón, y se promediaron en los ratones para cada condición.

El laberinto en forma de cruz elevado era de plástico y consistía en dos brazos abiertos de color gris claro (30 x 5 cm) y dos brazos cerrados de color negro (30 x 5 x 30 cm) que se extendían desde una plataforma central (5 x 5 x 5 cm) 31 a 90 grados en forma de cruz. El laberinto se colocó 30 cm por encima del suelo. Para cada ratón, se

administró un pulso de luz de 2 s a 473 nm cuando el ratón estaba en la jaula de inicio. 5 minutos después, se desconectó el conector de fibra óptica, y los ratones se colocaron individualmente en el centro del laberinto durante un ensayo de 15 minutos. Se usó el software de seguimiento de vídeo (ViewerII, BiObserve, Fort Lee, NJ) para rastrear la ubicación del ratón. Todas las medidas mostradas eran relativas a todo el cuerpo del ratón.

Registros electrofisiológicos crónicos en ratones en estado de alerta

Para registrar simultáneamente desde sitios tanto dentro del tejido transducido víricamente como fuera de la región transducida, se diseñó un nuevo optrodo multisitio crónico (CMO) para los registros de animales en estado de alerta en combinación con la administración de luz. Se usaron matrices de cuatro hilos de tungsteno de 25 μm (California Fine Wire Company, Grover Beach, CA), se arrollaron y se cortaron aproximadamente en incrementos de 500 μm , y se combinaron estos haces de 4 hilos con una guía de fibra óptica implantable (IFL; Doric Lenses, Quebec, Canadá) que consistía en una férula metálica de 2,5 mm de diámetro a partir de la que se extendía un cable de fibra óptica de núcleo de 200 μm . El haz de cuatro hilos se retroalimentó a un tubo de guía de 250 μm de diámetro en el que se introdujo el cable de fibra óptica. Los cables se conectaron usando pasadores dorados a un conector Mill-Max, al que también se conectó un cable de tierra de acero inoxidable. El dispositivo fue implantado estereotácticamente tras la inyección del virus (véase información anterior) de manera que la punta de la fibra solo se extendía más allá del cráneo, pero no hacia el tejido cerebral. El cable de tierra se introdujo a través de una pequeña craneotomía por encima del cerebelo. Se dejó que los ratones se recuperaran durante dos semanas antes de que comenzaran los experimentos.

Para registrar la actividad neuronal durante el comportamiento, los ratones se aclimataron primero durante varios días a la conexión de la cabeza y al cable de fibra óptica. Se dejó que los ratones exploraran la jaula de inicio con la fase de la cabeza conectada durante 1-2 horas cada día. Los registros se llevaron a cabo 2-4 semanas después de la cirugía. Las señales se multiplexaron en la fase de la cabeza en un cable de 3 hilos que se pasó a través de un conmutador eléctrico (PlasticsOne), se desmultiplexaron usando una placa de desmultiplexación (Triangle BioSystems, Inc.) y se digitalizaron usando Neuralynx Digital Cheetah. Se suspendieron los conmutadores de fibra óptica y eléctricos de un brazo de compensación (Harvard Apparatus) para permitir que el ratón explore libremente una gran región (como en el ensayo en campo abierto). Esta configuración también evitó que tanto el ratón estudiado como el intruso joven (durante el ensayo de interacción social) accedieran a cualquier exceso de cable o fibra óptica y minimizaran el daño al hardware. Los vídeos se grabaron usando el software Neuralynx Cheetah, y se analizaron sin conexión con Viewer II (BiObserve, Fort Lee, NJ) para cuantificar el comportamiento en campo abierto. Las interacciones sociales y la exploración de objetos nuevos se calificaron manualmente, como en otros experimentos de comportamiento. Los LFP se filtraron a de 1 a 500 Hz y se tomaron muestras a una frecuencia de 6,5 kHz. La actividad de unidades múltiples se registró a 32 kHz y los eventos individuales se recogieron con un umbral de 40 μV en todos los canales.

Los espectrogramas de potencia de ondículas de los registros de LFP se analizaron como se ha descrito anteriormente al muestrear el espectro de potencia cada 2 s durante el registro. La potencia se calculó entre 2 Hz y 120 Hz con un ancho de intervalo de 2 Hz. En todos los ratones, los efectos de la activación de la SSFO se registraron usando un protocolo de registro inicial de 2 minutos, seguido de un pulso de 1 s a 473 nm a una irradiancia de 56 mW mm^{-2} en la punta de la fibra. Tras el pulso azul, se registró la actividad durante 2 minutos, seguido de un pulso de luz de desactivación de 30 s a una longitud de onda de 594 nm de luz con una intensidad similar. La actividad se registró luego durante 2 minutos más. Para cada ratón, este protocolo se repitió al menos 4 veces, y los espectros de potencia para cada uno de los tres períodos (pre-activación, post-activación y post-desactivación) se promediaron en las 4 repeticiones.

Los experimentos de comportamiento social con los ratones con implantación de electrodos se realizaron usando el paradigma de la caja de inicio, como se ha descrito anteriormente. Los ensayos sin luz y con luz se separaron al menos 24 horas, usando nuevos ratones jóvenes en cada ensayo. El ensayo consistió en 2 minutos de registro de referencia, luego 1 minuto de registro tras el pulso de luz de activación de 1 s, tras el que se introdujo el intruso joven. El comportamiento social se calificó durante 2 minutos, seguido de la retirada del joven y un pulso de luz de 30 s a 594 nm para desactivar la SSFO. Los registros se adquirieron durante todo el tiempo y se analizaron de la misma manera que se ha descrito anteriormente para los registros realizados en la jaula de inicio anteriores. Los espectros de potencia para el período de interacción social de 2 minutos se promediaron en los ratones para los ensayos sin luz y con luz. El experimento del nuevo objeto en estos ratones se realizó de manera idéntica, reemplazando el nuevo ratón joven por un objeto inanimado.

Análisis de datos

Se calculó la significancia estadística usando ensayos t bilaterales para muestras relacionadas o no relacionadas, según sea aplicable. Los datos se analizaron usando la caja de herramientas de Matlab Statistics o Microsoft Excel.

Inmunohistoquímica

Los animales que se habían sometido al análisis de comportamiento se anestesiaron con ketamina/xilazina y se

perfundieron por vía transcardíaca con PBS enfriado con hielo seguido de paraformaldehído al 4 % en PBS (PFA al 4 %). Se fijaron cerebros aislados posteriormente en PFA al 4 % durante una noche a 4 °C y luego se sumergieron en un crioprotector estéril que consistía en sacarosa al 30 % en PBS hasta su sedimentación (2 a 3 días a 4 °C). Se recogieron cortes coronales de 40 µm usando un micrótopo de inmovilización (Leica), se lavaron en PBS, se permeabilizaron en Triton X-100 al 0,3 % (PBST) y se bloquearon en suero de burro normal al 3 % disuelto en PBS durante una hora a temperatura ambiente. La localización nuclear de c-fos se determinó usando anti-c-fos de conejo (Calbiochem) en animales que habían sido sometidos a estimulación con luz de 1 s a 473 nm 90 minutos antes de la perfusión; la dirección de la parvalbúmina se confirmó usando la colocalización de la anti-parvalbúmina de ratón (Sigma Aldrich) y la proteína fluorescente. Los cortes teñidos se visualizaron en un microscopio confocal Leica SP5. Para calcular la fluorescencia media en diferentes subregiones anatómicas, las imágenes histológicas se analizaron con ImageJ. Las imágenes de subregiones individuales se clasificaron en umbrales a un nivel de umbral fijo. Se calculó la fluorescencia media por encima del umbral y se promedió por región entre los ratones. Los recuentos de c-fos se realizaron usando puntos de referencia estandarizados para identificar las regiones, y se anonimizaron antes del recuento. El recuento se realizó en apilamientos z de todo el volumen de cortes. Los datos solo se compararon en condiciones experimentales en experimentos en los que la inducción de c-fos se realizó el mismo día y en las mismas condiciones físicas, y en los que la preparación del tejido, la tinción y generación de imágenes se realizaron en condiciones estandarizadas.

Resultados

En primer lugar, para evaluar los efectos de la actividad inducida por SSFO en poblaciones neuronales a nivel celular, se examinó *in vivo* la expresión del producto génico inmediato-temprano c-fos 90 minutos después de un pulso de 2 s de estimulación con luz a 470 nm (**FIG. 3C**). Se cuantificó el número de neuronas positivas en c-fos de todo el subcampo prelímbico/infralímbico (delimitado en la **FIG. 3B**) en el hemisferio transducido por virus y estimulado ópticamente. En animales inyectados con el virus CaMKIIα-YFP (control), 335 ± 107 células mPFC expresaron c-fos detectable en el momento basal. A modo comparativo, los ratones con expresión de SSFO en neuronas PV (ratones PV::SSFO) muestran significativamente menos células con expresión de c-fos en comparación con los controles en mPFC (81 ± 7 células, n = 5 ratones; $p < 0,005$, ensayo t bilateral). De manera destacable, una gran fracción de estas células eran, de hecho, positivas en YFP (61 ± 8 % de la población total positiva en c-fos; **FIG. 3C**), lo que indica que incluso la mayoría de estas células activas son, de hecho, neuronas positivas en PV activadas directamente por la SSFO administrada víricamente. Por el contrario, los ratones que expresan SSFO en células excitadoras (ratones CaMKIIα::SSFO) mostraron aumentos significativos en núcleos positivos en c-fos tanto en el hemisferio transducido víricamente (1455 ± 305 células; n = 3 ratones; $p < 0,05$, ensayo t bilateral; **FIG. 2C**), como en el hemisferio contralateral (617 ± 97 células; n = 3 ratones; $p < 0,05$), pero no más allá de otras áreas del cerebro (**FIG. 3M**), lo que indica que la activación se propaga principalmente localmente y al hemisferio contralateral. Estos hallazgos validan la dirección, eficacia y direccionalidad esperadas de la SSFO en el ratón en estado de alerta.

Tres grupos de animales para el ensayo de comportamiento (**FIG. 3D-G**) ratones CaMKIIα::SSFO, ratones PV::SSFO, y los ratones de control (bien inyectados con virus AAV5-CaMKIIα-eYFP o no inyectados con virus). Dos a cuatro semanas después de la cirugía, se ensayó el aprendizaje condicionado y el comportamiento social no condicionado, así como la exploración de objetos nuevos y el funcionamiento locomotor (**FIG. 3D-G**); todos los animales recibieron un único pulso de 1 s de luz a 470 nm a través del conector de fibra óptica implantado, seguido de la extracción del cable de fibra óptica 1 minuto antes de la introducción en la cámara de comportamiento, aprovechando la estabilidad de la SSFO.

Se observaron déficits sorprendentes tanto en el comportamiento social como en el condicionamiento, de forma selectiva en los ratones con elevado equilibrio de E/I celular (**FIG. 3D-G**). Se exploró la primera exploración social no condicionada de ratones jóvenes del mismo sexo que se habían introducido en la jaula doméstica del animal experimental⁴⁹. La exploración del nuevo ratón fue casi abolida en el grupo de E/I elevado (CaMKIIα::SSFO) tras un pulso de luz de 1 s a 470 nm, en comparación con los controles (n = 8 ratones CaMKIIα::SSFO y n = 6 controles; $p < 0,0005$, ensayo t para muestras no relacionadas), mientras que los ratones PV::SSFO no mostraron ningún efecto en este comportamiento (**FIG. 3D** y 2; n = 6 ratones PV::SSFO; $p > 0,1$; ensayo t para muestras no relacionadas). Los mismos ratones se sometieron a continuación a un protocolo de condicionamiento realizado inmediatamente después de la administración de un pulso de luz de 1 s a 470 nm. Veinticuatro horas después, se evaluaron las respuestas al tono condicionado y al contexto con el fin de evaluar la medida en la que los ratones aprendieron a asociar los estímulos condicionados y no condicionados estando en estados de E/I alterados. Los animales de E/I elevado (CaMKIIα::SSFO) no mostraron respuestas condicionadas (a ninguno de los contextos: $p < 0,0005$ o tono: $p < 0,05$, en comparación con los controles; ensayo t bilateral). Además, el déficit fue completamente reversible; los mismos animales se recondicionaron 24 horas más tarde en ausencia de activación de SSFO, mostrando un condicionamiento de miedo que era indistinguible del grupo de control cuando se ensayó el día siguiente (**FIG. 3E**; $p > 0,1$ señal y contexto; ensayo t para muestras no relacionadas). Por el contrario, el grupo PV::SSFO, en el que se redujo el equilibrio de E/I, no mostró deterioro significativo en el comportamiento de parálisis en comparación con los controles en respuesta tanto al tono como al contexto (**FIG. 3E**; $p = 0,09$ y $p = 0,56$, respectivamente; ensayo t bilateral), al igual que en el comportamiento social. Los déficits de comportamiento asociados con el equilibrio de E/I elevado no fueron atribuibles a cambios en la función motora, ya que en los mismos ratones, el comportamiento en

campo abierto fue normal ($n = 8$ ratones CaMKII α ::SSFO y $n = 6$ ratones CaMKII α ::YFP; **FIG. 3F** y **FIG. 3N**).

Ejemplo 4: La elevación pero no la reducción de E/I celular conduce a una reducción cuantitativa en el procesamiento de la información

A continuación, se investigaron las bases neurofisiológicas de las alteraciones del comportamiento resultantes de las alteraciones del equilibrio de E/I prefrontal. En el autismo, un hallazgo de comorbilidad del 30 % con convulsiones debilitantes ha llevado a sugerir que está implicada la hiperexcitación, y se han propuesto la excitación o la inhibición cortical alterada como base de algunos de los déficits del comportamiento centrales tanto en el autismo como en la esquizofrenia.

Materiales y métodos

Se obtuvieron cortes coronales agudos de 300 μm aislados de ratones C57BL/6J de tipo silvestre de 8-9 semanas de vida o PV::Cre inyectados previamente con virus en solución de corte de sacarosa con hielo ([mM] D-glucosa 11, sacarosa 234, KCl 2,5, NaH₂PO₄ 1,25, MgSO₄ 10, CaCl₂ 0,5, NaHCO₃ 26) usando un Vibratome (Leica). Los cortes se recuperaron en líquido cefalorraquídeo artificial oxigenado (LCRA; [mM] NaCl 124, KCl 3, MgCl₂ 1,3, CaCl₂ 2,4, NaH₂PO₄ 1,25, NaHCO₃ 26, D-glucosa 10) a 32 °C durante una hora. Se obtuvieron parches neuronales individuales tras identificar la expresión de proteína fluorescente a partir de la capa cortical prefrontal indicada bajo perfusión constante de LCRA. Se acopló la luz filtrada procedente de una fuente de lámpara de xenón de longitud de onda amplia (Sutter Instruments DG-4) al puerto de fluorescencia del microscopio (Leica DM-LFSA). Antes de cada experimento, se aplicó un pulso de 20 s de luz a 590 nm para convertir todos los canales de SSFO al estado oscuro y evitar el agotamiento de las fotocorrientes. Se adquirieron imágenes de células cultivadas en el mismo microscopio usando una cámara CCD Retiga Exi (QimagingInc. Inc.) con una exposición de 100 ms con ganancia de 30. La densidad de potencia de iluminación fue de 12 mW mm⁻² a 500 nm con un conjunto de filtros de EYFP convencionales. Se realizó la cuantificación de la fluorescencia con el software ImageJ marcando una región que contenía el soma y las neuritas proximales, y calculando la intensidad total de los píxeles para cada celda integrada en esa región, en lugar de la fluorescencia media, ya que las fotocorrientes probablemente estén relacionadas con el número total de canales unidos a la membrana en lugar de la expresión del canal media por área. Los cálculos del flujo de fotones para las propiedades de integración de SSFO se realizaron calculando el flujo de fotones a través del objetivo del microscopio con cada potencia de luz, y luego dividiéndolo para obtener el flujo de fotones a través de la membrana de la célula, Basándose en la capacitancia de las células fijadas.

Para estudios en animales vivos, se realizaron la estimulación óptica y el registro eléctrico simultáneos en la corteza prefrontal de ratones macho adultos C57/BL6 de tipo silvestre previamente transducidos con construcciones víricas indicadas como se ha descrito anteriormente. En resumen, los animales se anestesiaron profundamente con isoflurano antes de la craneotomía. Tras alinear el ratón estereotácticamente y extirpar quirúrgicamente el cráneo dorsal de la corteza prefrontal (centrada 1,8 mm anterior, 0,35 mm lateral), se introdujo estereotácticamente un electrodo de tungsteno extracelular MO de 127 micrómetros (0,005 pulgadas) (A-M systems) con su punta acoplada aproximadamente 400 μm por debajo del extremo romo de un cable de fibra óptica de 200 μm de 0,2 N.A. de diámetro central (ThorLabs; "optrodo") en la región del cerebro transducida víricamente. Las señales registradas se filtraron con paso de banda entre 300 Hz y 20 kHz, con amplificación de CA x 10.000 (AM Systems 1800), se digitalizaron (Molecular Devices Digidata 1322A) y se registraron usando el software Clampex (Molecular Devices). El software Clampex se usó para registrar señales de campo y controlar las fuentes de diodo láser de estado sólido de 473 nm (OEM Laser Systems) y 561 nm (CrystalLaser) de -10 mW acopladas al optrodo. Los registros electrofisiológicos se iniciaron en el límite Cg/PL (1,8 mm anterior, 0,35 mm lateral, -2,0 mm ventral) tras reducir la anestesia con isoflurano a un nivel constante del 1 %. El optrodo se bajó ventralmente en pasos de -0,1 mm. Los eventos se aislaron usando un algoritmo personalizado en Matlab (Math-Works) con el umbral establecido por encima del ruido inicial (de 25 a 40 μV). Las imágenes de mapa de calor se generaron en Matlab a partir de un promedio móvil no ponderado de 2 s con pasos de 200 ms. El valor promedio móvil se restableció al inicio de las manipulaciones externas (inicio del barrido, inicio de pulsos de luz).

Resultados

Para explorar las manifestaciones fisiológicas en los circuitos de las alteraciones del equilibrio de E/I dentro del microcircuito prefrontal que conducen a las alteraciones del comportamiento, se prepararon cortes corticales prefrontales agudos de ratones CaMKII α ::SSFO. Se realizaron registros de células enteras en presencia de una actividad sináptica asincrónica continua inducida por el agonista colinérgico carbachol a 20 μM 52-54; nunca se observó la generación de picos solo con la activación de SSFO. La activación de SSFO en todo el circuito con un solo pulso de luz azul tuvo el efecto de despolarizar las neuronas que expresaban SSFO registradas en $9,8 \pm 1,4$ mV ($n = 7$ células; **FIG. 4A**), en parte, al desencadenar un aumento de la actividad sináptica entrante (**FIG 4A**, recuadro); ambos efectos fueron terminados con luz amarilla. El análisis espectral de respuestas a SSFO en células tanto con expresión como sin expresión reveló que esta actividad aumentada mostraba un amplio intervalo espectral con un máximo por encima de 20 Hz (**FIG. 4A-B**). Por el contrario, las células piramidales de cortes que expresan SSFO en células PV mostraron una reducción consistente de la actividad sináptica y una reducción de la potencia a bajas frecuencias (**FIG. 4C**), coincidiendo con la actividad aumentada de células PV tras la activación con SSFO (**FIG. 4D**).

Conjuntamente, estos datos y los datos de c-fos de la **Figure 3** revelaron que las intervenciones para elevar o reducir el equilibrio de E/I celular en mPFC influyeron fuertemente en la actividad neuronal neocortical, pero, como la sola elevación del equilibrio de E/I celular en mPFC indujo déficits de comportamientos, se decidió hacer un intento por comprender a un nivel más profundo cómo se alteró el procesamiento de la información en mPFC en ambos casos. Para examinar los efectos del equilibrio de E/I alterado en la transmisión de la información en el microcircuito prefrontal, se realizaron registros de células enteras en cortes agudos de ratones CaMKII α ::SSFO, en los que se identificaron neuronas piramidales con expresión de opsina por la morfología y la fluorescencia. Las neuronas del pinzamiento zonal de células enteras se estimularon con trenes de EPSC simulados diseñados para englobar un amplio intervalo de tasas de sEPSC a lo largo del tiempo (**FIG. 5A**) de células que expresan SSFO, aumentando, de hecho, la activación de la luz azul la excitabilidad a bajas tasas de sEPSC, pero conduciendo a una saturación de la curva de entrada-salida (IO) a tasas de sEPSC superiores (**FIG. 5B**), causando una reducción significativa en la información mutua entre la tasa de EPSC de entrada y la tasa de picos resultantes ($-0,40 \pm 0,09$ bits; $p = 0,011$, ensayo t de Student para muestras relacionadas; **FIG. 5C**), y demostrando que el aumento del equilibrio de E/I celular afecta de forma cuantitativa al procesamiento de la información en las células principales neocorticales.

A continuación, para examinar los efectos de la reducción del equilibrio de E/I celular sobre el procesamiento de la información en células principales neocorticales, se registraron cortes agudos de ratones PV::SSFO y células piramidales sin expresión estimuladas con trenes de sEPSC como se ha explicado anteriormente (**FIG. 5D**). La activación de la SSFO en células PV causó una disminución sustancial de la ganancia de la curva IO en las células piramidales registradas (**FIG. 5E**) como era de esperar a través de la inhibición sináptica, pero, en este caso, se conservó la forma general de la curva IO sin saturación y, sorprendentemente, no tuvo ningún efecto significativo sobre la información mutua entre la tasa de sEPSC de entrada y la tasa de picos resultante en las células piramidales (**FIG. 5F**).

La disminución de la producción de información para células principales mPFC fue significativamente superior (4,8 veces, $p = 0,0144$, ensayo t para muestras no relacionadas) tras la activación con luz en ratones CaMKII α ::SSFO frente a ratones PV::SSFO a través de un intervalo amplio tanto de ancho del intervalo de tiempo (**FIG. 5G-H**) como de ancho del intervalo de entrada (**FIG. 5I-J**) usados para calcular información mutua, a pesar de que hubo (si acaso) un mayor impacto en la tasa de picos con la activación de PV::SSFO (**FIG. 5B, E**). En conjunto, estos datos de comportamiento e informativos ilustran que, a pesar de la suposición natural intuitiva de que favorecer la inhibición sería más perturbador para el procesamiento de la información, de hecho, son las elevaciones del equilibrio de E/I las que son perjudiciales para el circuito de mPFC y el comportamiento, coincidiendo con la asociación clínica de trastornos tales como el autismo con fenotipos de mayor excitabilidad. Si la disfunción social inducida por el equilibrio de E/I celular demostrada en el presente documento estaba relacionada con los procesos de circuito y la disfunción social observada en estados patológicos neuropsiquiátricos humanos graves tales como el autismo y la esquizofrenia, una predicción importante sería que los marcadores electrofisiológicos característicos de estos estados patológicos humanos también se pueden observar en este modelo animal. Dado que un marcador electrofisiológico clínico común del autismo y de la esquizofrenia es una potencia gamma elevada (no provocada) en el momento basal (30-80 Hz), esta hipótesis de marcadores fisiológicos se ensayó midiendo este marcador clínico uniforme en ratones en estado de alerta, que se mueven libremente, con equilibrio de E/I celular específicamente elevado.

El ensayo de esta posibilidad con la sensibilidad necesaria requirió la introducción adicional de electrodos de registro multisitio en mPFC. Si bien la presencia adicional de dicho dispositivo en combinación con un dispositivo de fibra óptica penetrante para la administración de luz podría ser demasiado disruptiva e invasiva espacialmente para el circuito de mPFC de ratón pequeño, se desarrolló e implantó una estrategia con dos características importantes para permitir este experimento. En primer lugar, se diseñó el dispositivo de registro para la implantación crónica, de modo que se pudieran llevar a cabo registros en animales habituados a los electrodos de registro. En segundo lugar, se aprovecharon las propiedades de integración de fotones de la SSFO para permitir no solo ensayos de comportamiento sin hardware óptico, sino también (incluso para estructuras profundas como IL y PL) sin penetración de hardware óptico en el propio cerebro, en cualquier momento. Para verificar que, efectivamente, es posible modular las células que expresaban SSFO en las estructuras corticales profundas, se inyectaron virus CaMKII α ::SSFO o CaMKII α ::EYFP y se implantaron conectores de fibra óptica que se extendían solo más allá del cráneo (**FIG. 6A**), sin entrar en la superficie cortical (**FIG. 6B**). La direccionalidad de la elevación del equilibrio de E/I en esta configuración mínimamente invasiva se validó mediante el análisis de c-fos en estos animales ($n = 3$ ratones de control CaMKII α ::SSFO y $n = 4$ ratones control CaMKII α ::EYFP; $p = 0,034$, ensayo t bilateral; **FIG. 6C**). El equilibrio de E/I celular elevado durante el condicionamiento no mostró efecto en las respuestas de parálisis por choque en la planta de la pata (que indica la percepción sensorial intacta del estímulo aversivo no condicionado; **FIG. 6D**), pero mostró un efecto marcado y totalmente reversible en el contexto ($p < 0,005$; ensayo t para muestras no relacionadas con varianza desigual) y condicionamiento auditivo ($p < 0,005$; ensayo t para muestras no relacionadas con varianza desigual; **FIG. 6D**). De manera crucial, el comportamiento social también se vio afectado en los ratones que recibieron estimulación con luz no invasiva antes del ensayo ($p < 0,005$; ensayo t para muestras no relacionadas; **FIG. 6E**), lo que demuestra la oportunidad que ofrece la sensibilidad a la luz extrema de la SSFO.

Para obtener lecturas electrofisiológicas directas de estos ratones, se diseñó un nuevo optrodo multisitio crónico (CMO) en el que el conector de fibra óptica estaba conectado a través de un tubo de guía con 4 hilos de tungsteno

de 25 μm , se cortó en incrementos de distancia de 0,5 mm desde la punta de la fibra, para muestrear simultáneamente la actividad neuronal a varias profundidades dentro del tejido iluminado (**FIG. 6F**). Al final de los experimentos, las posiciones de los electrodos se marcaron usando lesiones electrolíticas (**FIG. 6G**), lo que permitió identificar las ubicaciones anatómicas de las que se tomaron los registros individuales; no se permitió la penetración de fibra óptica en el tejido. En tres ratones a quienes se inyectó el virus CaMKII α ::SSFO y se les implantó el optrodo de muestreo en profundidad, primero se confirmó que el comportamiento social era normal en el momento basal, y que se vio afectado tras un pulso de 1 s a 470 nm (**FIG. 6H**; $p = 0,044$, ensayo t de Student para muestras relacionadas). Los mismos animales no mostraron ningún efecto de la luz en la exploración de un objeto nuevo; sin embargo, de acuerdo con los hallazgos previos de los presentes inventores **FIG. 6H**; $p = 0,82$, ensayo t de Student para muestras relacionadas). Además, el comportamiento locomotor en la jaula de inicio familiar (no mostrada) y en un nuevo campo abierto no se alteraron significativamente tras el pulso de activación de 1 s (**FIG. 7A**) aunque era evidente una tendencia hacia la ansiedad reducida (aumento del % de tiempo en el centro; **FIG. 7A**). Durante estos experimentos de validación de los fenotipos de comportamiento en el contexto de la implantación de CMO, la actividad se registró simultáneamente en todos los canales, y se analizaron los cambios resultantes de la activación de SSFO.

Los registros en la jaula de inicio de los animales se analizaron primero usando un protocolo que consistía en 2 minutos de momento basal previo a la activación, un pulso de luz de 1 s a 470 nm, 2 minutos de registro continuo y luego un pulso de luz de 30 s a 590 nm para desactivar completamente la SSFO. Este protocolo se repitió 4 veces en cada ratón, y se promediaron los rastros de actividad unitarios entre los ensayos (**FIG. 6I**). En registros de múltiples unidades procedentes de canales dentro de las regiones que expresan SSFO, se observaron aumentos significativos en la producción de picos en respuesta al pulso de luz azul (**FIG. 6I-J** $77 \pm 18\%$ en canales modulados, en comparación con $-3,4 \pm 4,4\%$ en los canales no modulados; $n = 4$ canales modulados y 4 canales no modulados en 3 ratones registrados; $p = 0,02$; ensayo t bilateral).

También se observaron cambios destacados en los registros del potencial de campo local (LFP) de los canales modulados. Se usó el análisis espectral de ondículas para generar espectrogramas resueltos en el tiempo (**FIG. 6K-L**; izquierda) de la actividad de LFP en cada canal, y se cuantificó el cambio medio entre el momento basal previo a la activación y el período posterior a la activación. En los canales no modulados, no hubo efecto aparente del pulso de activación en el LFP (**FIG. 6K**, izquierda), con solo una pequeña disminución media en la potencia en todas las frecuencias en los períodos de post-activación y post-desactivación en comparación con el período basal (**FIG. 6K**, derecha). Por el contrario, los canales modulados ubicados dentro de las regiones transducidas víricamente mostraron un notable aumento de la actividad de la banda gamma (**FIG. 6L**) tras la activación con SSFO, que se delimitó bruscamente temporalmente al período de activación y se terminó por el pulso de desactivación de 590 nm (**FIG. 6L**, derecha). El aumento en la actividad de la banda gamma se asoció con una reducción en la potencia de frecuencia inferior dentro de los mismos canales que mostraron una actividad gamma aumentada (**FIG. 6L**, derecha; recuadro). Un análisis similar de los registros realizados durante los experimentos de comportamiento realizados con estos animales mostró una actividad de banda gamma aumentada de manera uniforme en los experimentos en los que se administró un pulso de luz de 1 s a 470 nm durante el ensayo de comportamiento en el experimento de campo abierto (**FIG. 7B**), el ensayo de exploración social (**FIG. 7C**) y el ensayo de exploración de nuevos objetos (**FIG. 7D**). En conjunto, estos datos revelan que el biomarcador fisiológico (actividad de banda gamma elevada en el momento basal) que se observa en el autismo y en la esquizofrenia se conserva con un equilibrio de E/I celular selectivamente elevado en mamíferos que se comportan libremente con déficits sociales.

Por último, se ensayó si los circuitos neocorticales que tanto indujeron como expresaron gamma inducida por un equilibrio de E/I elevado *in vivo* (**FIG. 6**) también podían dar lugar a este fenómeno fisiológico en sí mismo, en ausencia de otras regiones cerebrales. Aunque los cortes agudos son más refractarios a la inducción de patrones de oscilación bruscos que los preparados *in vivo*, incluso en este preparado reducido, se observaron aumentos de potencia de banda de 20-80 Hz en el potencial de membrana de pinzamiento zonal en condiciones de activación moderada de CaMKII::SSFO (**FIG. 4A-B**) y elevaciones de gamma de 30-80 Hz en el potencial de membrana de pinzamiento zonal usando la canalrodopsina más potente disponible (CaMKII::C1V1-E162T).

A alta densidad de potencia de luz (12 mW mm^{-2}), se observó el mayor aumento de potencia a la frecuencia gamma (30-80 Hz; **FIG. 8B**). Con potencias de luz inferiores ($4,3 \text{ mW mm}^{-2}$ y $0,6 \text{ mW mm}^{-2}$), se observó potencia gamma monótonamente reducida junto con potencia relativamente mayor a frecuencias inferiores (theta, 8-12 Hz y beta, 15-25 Hz; **FIG. 8B-C**). En condiciones de fijación de voltaje, se resolvieron los espectros correspondientes tanto para IPSC registrados a 0 mV como para EPSC a -60 mV (**FIG. 8A**). En conjunto, estos resultados coinciden con una relación monótona entre la elevación estable del equilibrio de E/I y el biomarcador fisiológico de las oscilaciones gamma generadas intrínsecamente en la corteza prefrontal.

Los datos presentados en el presente documento apuntan a deficiencias específicas en el comportamiento social como resultado de una relación de E/I elevada en mPFC. En principio, también podría lograrse una relación de E/I elevada inhibiendo las células inhibitoras, aunque cabría esperar que este enfoque de pérdida de función mostrara efectos solo en el caso poco probable de que hubiera patrones de actividad basales altos de las células inhibitoras. De hecho, cuando se inyectó el virus AAV5-EF1 α -DIO-eNpHR3.0-EYFP en mPFC en ambos hemisferios de ratones PV::Cre (generando ratones PV::eNpHR3.0) y se implantaron conectores de fibra óptica bilaterales para

la jaula de inicio o el paradigma de exploración social de tres cámaras, no se encontró ningún deterioro del comportamiento asociado con la activación de eNpHR3.0 en estas condiciones (**FIG. 9**), como se podría haber esperado. Sin embargo, una cuestión más importante central para la hipótesis de la relación de E/I celular elevada es la predicción de que la inhibición aumentada podría actuar en el sentido de rescatar los déficits de comportamiento asociados con el equilibrio de E/I elevado causado por la activación de SSFO en células excitadoras (**FIG. 3**).

C1V1 es una proteína quimérica sensible a la luz derivada del canal de cationes de VChR1 de *Volvox carteri* y del canal de cationes de ChR1 de *Chlamydomonas Reinhardtii*. C1V1 y sus variantes permiten la manipulación experimental de las elevaciones de E/I corticales y el control de las oscilaciones gamma en cortes corticales con alta potencia (permitiendo así permitir ensayos de dosis-respuesta), baja desensibilización (permitiendo así inducir cambios escalonados en el equilibrio de E/I) y la excitación desplazada hacia el rojo (para permitir el impulso separable de diferentes poblaciones dentro del mismo circuito neuronal). Para este ejemplo, se seleccionó la variante C1V1 con la potencia más alta para permitir la dosis-respuesta más fiable. Para ensayar la predicción anterior, se diseñó un experimento combinatorio optogenético para ratones con libertad de movimiento, aprovechando las propiedades espectrales y temporales únicas de C1V1 y SSFO para impulsar las células piramidales con SSFO y coactivar (o no) las células PV usando C1V1-E122T/E162T para la máxima separación espectral. Se inyectó en ratones PV::Cre una combinación de AAV5-CaMKII α -SSFO y AAV5-EF1 α -DIO-C1V1-E122T/E162T en mPFC para expresar SSFO en neuronas piramidales y C1V1 en células PV (a los que se hace referencia en el presente documento como ratones SSFO/C1V1; $n = 7$). Un segundo grupo de ratones recibió por inyección solo el virus CaMKII α -SSFO (CaMKII α ::SSFO, $n = 9$) y los ratones de control recibieron por inyección CaMKII α -EYFP ($n = 10$). De dos a cuatro semanas después, los ratones se ensayaron en el ensayo social de tres cámaras en 4 diferentes paradigmas de iluminación, utilizando la estrategia espectrotemporal para la separación entre C1V1-E122T/E162T (impulsada con luz a 590 nm) y SSFO (impulsada por corrientes potentes en el máximo de 470 nm; **FIG. 10A**). Las caracterizaciones iniciales se realizaron sin suministro de luz, para adquirir una preferencia social inicial (**FIG. 10B**). En este ensayo, todos los ratones mostraron una preferencia significativa por la cámara social (**FIG. 10B, FIG. 11**; ratones CaMKII α -SSFO, $p = 0,002$; ratones SSFO/C1V1, $p = 0,0003$; ratones CaMKII α -EYFP, $p = 0,032$).

A continuación, los ratones del mismo paradigma se ensayaron con ratones jóvenes nuevos, a la vez que se administraba luz láser pulsada a 590 nm para activar solamente C1V1-E122T/E162T en las células PV de los ratones SSFO/C1V1 (**FIG. 10B**). En este ensayo, de nuevo, todos los ratones mostraron preferencia normal por el nuevo ratón joven (**FIG. 10C y FIG. 11**; ratones CaMKII α -SSFO, $p = 0,008$; ratones SSFO/C1V1, $p = 0,005$; ratones CaMKII α -EYFP, $p = 0,014$), en consonancia con los experimentos previos de PV::SSFO. En un tercer ensayo, la SSFO se activó con un pulso de luz de 2 s a 470 nm durante el período de habituación previo al ensayo (**FIG. 10B**). En este ensayo, ni el grupo CaMKII α ::SSFO ni el grupo SSFO/C1V1 mostró preferencia por la cámara social (**FIG. 10C-D**; $p = 0,21$ y $p = 0,87$, respectivamente), un profundo déficit de comportamiento social en consonancia con las presentes observaciones previas en ratones CaMKII α ::SSFO (**FIG. 3I**). Cabe señalar la importancia de la separación espectrotemporal en este caso: mientras que el uso de luz a 470 nm para un impulso máximo de SSFO implicará también el impulso de C1V1-E122T/E162T, la transitoriedad contrastante de C1V1-E122T/E162T y la estabilidad de SSFO garantizan que los ensayos de comportamiento llevados a cabo tras el pulso de luz de 2 s a 470 nm solo sean en presencia de actividad de SSFO. Por último, se intentó rescatar el déficit de comportamiento compensando el equilibrio de E/I celular, añadiendo a la activación de SSFO en células excitadoras una activación adicional de C1V1-E122T/E162T en células inhibitoras mediante la administración de pulsos de luz de 470 nm a 10 Hz a lo largo del período de ensayo del comportamiento (**FIG. 10A-B**). En estas condiciones de iluminación, los ratones CaMKII α ::SSFO (sin C1V1-E122T/E162T para activarse, que experimentaron una elevación pura del equilibrio de E/I celular) mostraron un deterioro grave del comportamiento social sin preferencia significativa por la cámara social (**FIG. 10C**; $p = 0,59$), pero, por el contrario, en los ratones SSFO/C1V1, se restableció la preferencia por la cámara social (**FIG. 10D**; $p = 0,005$) mediante esta actividad compensatoria aumentada de neuronas inhibitoras. Como cabía esperar, los ratones CaMKII α -EYFP de control mostraron una preferencia significativa por la cámara social en los paradigmas de estimulación tanto de 2 s a 470 nm como a de 470 nm a 10 Hz (**FIG. 11**).

Discusión

Varias líneas de evidencia han sugerido la participación del equilibrio de excitación-inhibición (E/I) celular elevado en la etiología de las alteraciones sociales y del procesamiento de la información que no responden a la medicación en el autismo y en la esquizofrenia. Pero ha sido difícil ensayar formalmente esta hipótesis sin 1) el control selectivo sobre tipos de células individuales; y 2) separar los efectos a largo plazo de dicho control en el desarrollo y la maduración del circuito desde los efectos inmediatos de las anomalías de E/I con respecto al funcionamiento de los circuitos neuronales implicados. La estrecha interacción y la complejidad farmacológica de la excitación y la inhibición dentro del microcircuito cortical han impedido la confirmación del equilibrio de E/I celular elevado como un componente central de los defectos de comportamiento observados en los diversos modelos de enfermedades y pacientes humanos. En el presente caso, usando dos nuevas herramientas optogenéticas, se obtuvo el apoyo directo para la hipótesis del equilibrio de E/I celular elevado, y se identificaron las manifestaciones de la fisiología del circuito de la disfunción social resultante.

Para comprender mejor el estado de E/I elevado, se ensayaron las manifestaciones de la fisiología del circuito subyacente tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que, indudablemente, será complejo dado el amplio intervalo de fenómenos del circuito que una elevación del equilibrio de E/I celular podría iniciar. Se descubrió que la elevación del equilibrio de E/I celular altera las funciones de transferencia de las neuronas principales de una manera que altera de forma cuantitativa la transmisión de la información dentro de los circuitos corticales. En marcado contraste, la reducción del equilibrio de E/I (que no afectó a la función social a pesar de los espectaculares efectos sobre las tasas de picos de células principales) no perjudicó a la transmisión de la información y conservó la forma general de las principales funciones de transferencia de neuronas. También se identificó la correspondencia entre un marcador clínico de estados patológicos relacionados con la disfunción social (potencia gamma basal elevada) y los hallazgos electrofisiológicos durante el comportamiento libre en el estado de E/I celular elevado. Usando un novedoso dispositivo de optrodo crónico multisitio (CMO) para el registro combinado y la modulación óptica en ratones en estado de alerta, se encontró que el estado de E/I elevado se asocia con oscilaciones de gamma potentes y estables, que se generan y se manifiestan dentro de las regiones que experimentan directamente un equilibrio de E/I celular elevado. En estos ratones, se observó un deterioro específico en el comportamiento social, pero sin grandes cambios en el comportamiento locomotor o la exploración de objetos inanimados bajo el estado de E/I elevado inducido por gamma.

Los efectos del equilibrio de E/I elevado sobre el comportamiento social mostraron evidencias de especificidad hacia PFC, ya que el aumento de la relación de E/I en otro lugar, en la corteza visual primaria, no afectó al comportamiento social. La red de PFC, con su amplia conectividad subcortical, podría ser particularmente susceptible de provocar síntomas relacionados con la psiquiatría en el marco de cambios sutiles en el equilibrio de E/I, una noción que está respaldada por las alteraciones observadas en marcadores inhibidores de PFC asociados con la enfermedad psiquiátrica y la alteración de la ritmicidad de PFC observada en individuos autistas. No se observaron alteraciones del comportamiento en las condiciones en las que se inhibieron las neuronas positivas en PV; de forma destacable, la capacidad de inhibir completamente las neuronas positivas en PV está limitada por la penetrancia de la expresión (DIO::SSFO expresada en ~ 25 % de las células positivas en PV), y el hecho de que el impacto dependerá del nivel de actividad basal de las células diana.

Finalmente, para intentar restablecer el deterioro resultante del equilibrio de E/I elevado, se utilizó una familia de nuevas canalrodopsinas activadas por la luz roja cuidadosamente diseñadas por ingeniería genética, denominadas colectivamente variantes C1V1, para modular independientemente tanto neuronas excitadoras (usando SSFO) como neuronas PV inhibitoras (usando una variante C1V1). Usando una nueva forma de separación espectrotemporal integrada de la actividad de dos herramientas optogenéticas, se encontró que el aumento de la inhibición celular mejoró los déficits de comportamiento social en ratones que habían sido sometidos a la elevación del equilibrio de E/I celular.

Los ejemplos, que pretenden ser puramente ilustrativos de la invención, y por tanto, no deberían considerarse limitantes de la misma de ningún modo, también describen y detallan aspectos y realizaciones de la invención descrita anteriormente. Los ejemplos anteriores y la descripción detallada se ofrecen a modo ilustrativo, y no a modo de limitación. En particular, todas las publicaciones citadas en el presente documento tienen el fin de describir y desvelar composiciones y metodologías que podrían usarse en relación con la invención. Aunque la invención anterior se ha descrito con algo de detalle a modo ilustrativo y de ejemplo a efectos de aclarar la comprensión, resulta fácilmente evidente para aquellos expertos habituales en la materia ante las enseñanzas de la presente invención que puedan realizarse determinados cambios y modificaciones a la misma.

La invención está definida en las reivindicaciones.

Referencias

- 1 Pardo, C. A. y Eberhart, C. G. "The neurobiology of autism". *Brain Pathol* 17, 434-447 (2007).
- 2 O'Donovan, M. C., Craddock, N. J. y Owen, M. J. "Genetics of psychosis; insights from views across the genome". *Hum Genet* 126, 3-12 (2009).
- 3 Sudhof, T. C. "Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease". *Nature* 455, 903-911 (2008).
- 4 Patterson, P. H. "Modeling autistic features in animals". *Pediatr Res* 69, 34R-40R, doi: 10.1203/PDR.0b013e318212b80f (2011).
- 5 Folstein, S. E. y Rosen-Sheidley, B. "Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder". *Nat Rev Genet* 2, 943-955 (2001).
- 6 Walsh, T. *et al.* "Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia". *Science* 320, 539-543 (2008).

- 7 Markram, K. y Markram, H. "The intense world theory - a unifying theory of the neurobiology of autism". *Front Hum Neurosci* 4, 224 (2010).
- 5 8 Vattikuti, S. y Chow, C. C. "A computational model for cerebral cortical dysfunction in autism spectrum disorders". *Biol Psychiatry* 67,672-678 (2010).
- 9 Kehler, C., Maziashvili, N., Dugladze, T. y Gloveli, T. "Altered Excitatory- Inhibitory Balance in the NMDA-Hypofunction Model of Schizophrenia". *Front Mol Neurosci* 1, 6 (2008).
- 10 10 Rubenstein, J. L. "Three hypotheses for developmental defects that may underlie some forms of autism spectrum disorder". *Curr Opin Neurol* 23, 118-123 (2010).
- 11 Rubenstein, J. L. y Merzenich, M. M. "Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems". *Genes Brain Behav* 2, 255-267 (2003).
- 15 12 Gogolla, N. et al. "Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism". *J Neurodev Disord* 1, 172-181 (2009).
- 20 13 Hashimoto, T. et al. "Conserved regional patterns of GABA-related transcript expression in the neocortex of subjects with schizophrenia". *Am J Psychiatry* 165, 479-489 (2008).
- 14 Hashimoto, T. et al. "Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia". *J Neurosci* 23, 6315-6326 (2003).
- 25 15 Lewis, D. A., Hashimoto, T. y Volk, D. W. "Cortical inhibitory neurons and schizophrenia". *Nat Rev Neurosci* 6, 312-324 (2005).
- 30 16 Lewis, D. A., Volk, D. W. y Hashimoto, T. "Selective alterations in prefrontal cortical GABA neurotransmission in schizophrenia: a novel target for the treatment of working memory dysfunction". *Psychopharmacology (Berl)* 174, 143-150 (2004).
- 17 Lisman, J. E. et al. "Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia". *Trends Neurosci* 31, 234-242 (2008).
- 35 18 Belforte, J. E. et al. "Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes". *Nat Neurosci* 13, 76-83 (2010).
- 19 Blatt, G. J. et al. "Density and distribution of hippocampal neurotransmitter receptors in autism: an autoradiographic study". *J Autism Dev Disord* 31, 537-543 (2001).
- 40 20 Bourgeron, T. "A synaptic trek to autism". *Curr Opin Neurobiol* 19, 231-234 (2009).
- 21 Belmonte, M. K., Gomot, M. y Baron-Cohen, S. "Visual attention in autism families: unaffected' sibs share atypical frontal activation". *J Child Psychol Psychiatry* 51, 259-276 (2010).
- 45 22 Gomot, M., Belmonte, M. K., Bullmore, E. T., Bernard, F. A. y Baron-Cohen, S. "Brain hyper-reactivity to auditory novel targets in children with high-functioning autism". *Brain* 131,2479-2488 (2008).
- 23 Dichter, G. S., Felder, J. N. y Bodfish, J. W. "Autism is characterized by dorsal anterior cingulated hyperactivation during social target detection". *Soc Cogn Affect Neurosci* 4, 215-226 (2009).
- 50 24 Orekhova, E. V. et al. "Excess of high frequency electroencephalogram oscillations in boys with autism". *Biol Psychiatry* 62, 1022-1029 (2007).
- 55 25 Rojas, D. C., Maharajh, K., Teale, P. y Rogers, S. J. "Reduced neural synchronization of gamma-band MEG oscillations in first-degree relatives of children with autism". *BMC Psychiatry* 8, 66 (2008).
- 26 Gillberg, C. y Billstedt, E. "Autism and Asperger syndrome: coexistence with other clinical disorders". *Acta Psychiatr Scand* 102, 321-330 (2000).
- 60 27 Canitano, R. "Epilepsy in autism spectrum disorders". *Eur Child Adolesc Psychiatry* 16,61-66(2007).
- 28 Rippon, G., Brock, J., Brown, C. y Boucher, J. "Disordered connectivity in the autistic brain: challenges for the "new psychophysiology". *Intl J Psychophysiol* 63, 164-172 (2007).
- 65 29 Dani, V. S. et al. "Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a

mouse model of Rett syndrome". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 102, 12560-12565 (2005).

30 Etherton, M. R., Blaiss, C. A., Powell, C. M. y Sudhof, T. C. "Mouse neurexin-1 alpha deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 106, 17998-18003 (2009).

31 Tabuchi, K. *et al.* "A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice". *Science* 318, 71-76 (2007).

32 Chao, H. T. *et al.* "Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes". *Nature* 468, 263-269 (2010).

33 Moretti, P. *et al.* "Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome". *J Neurosci* 26, 319-327 (2006).

34 Rinaldi, T., Perrodin, C. y Markram, H. "Hyper-connectivity and hyper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valproic Acid animal model of autism". *Front Neural Circuits* 2,4 (2008).

35 Rinaldi, T., Silberberg, G. y Markram, H. "Hyperconnectivity of local neocortical microcircuitry induced by prenatal exposure to valproic acid". *Cereb Cortex* 18, 763-770 (2008).

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

37 Huber, D. *et al.* "Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice". *Nature* 451, 61-64 (2008).

38 Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O. y Deisseroth, K. "Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance". *Nature* 459, 698-702 (2009).

39 Tsai, H. C. *et al.* "Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning". *Science* 324, 1080-1084 (2009).

40 Hira, R. *et al.* "Transcranial optogenetic stimulation for functional mapping of the motor cortex". *J Neurosci Methods* 179, 258-263 (2009).

41 Covington, H. E., 3ª *et al.* "Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex". *J Neurosci* 30, 16082-16090 (2010).

42 Cruikshank, S. J., Urabe, H., Nurmikko, A. V. y Connors, B. W. "Pathway-specific feedforward circuits between thalamus and neocortex revealed by selective optical stimulation of axons". *Neuron* 65, 230-245 (2010).

43 Haubensak, W. *et al.* "Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear". *Nature* 468, 270-276 (2010).

44 Kravitz, A. V. y Kreitzer, A. C. "Optogenetic manipulation of neural circuitry in vivo". *Curr Opin Neurobiol* (2011).

45 Berndt, A., Yizhar, O., Gunaydin, L. A., Hegemann, P. y Deisseroth, K. "Bi-stable neural state switches". *Nat Neurosci* 12, 229-234 (2009).

46 Diester, I. *et al.* "An optogenetic toolbox designed for primates". *Nat Neurosci* 14, 387-397(2011).

47 Bamann, C., Gueta, R., Kleinlogel, S., Nagel, G. y Bamberg, E. "Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond". *Biochemistry* 49, 267-278 (2010).

48 Dittgen, T. *et al.* "Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 101, 18206-18211 (2004).

49 Winslow, J. T. "Mouse social recognition and preference". *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8, Unidad 8 16 (2003).

50 Ni, A. M. y Maunsell, J. H. "Microstimulation reveals limits in detecting different signals from a local cortical region". *Curr Biol* 20, 824-828 (2010).

51 May, S. S. *et al.* "Sociability and preference for social novelty in five inbred strains:" "an approach to assess

autistic-like behavior in mice". *Genes Brain Behav* 3, 287-302 (2004).

52 Ben-Ari, Y., Krnjevic, K., Reinhardt, W. y Ropert, N. "Intracellular observations on the disinhibitory action of acetylcholine in the hippocampus". *Neuroscience* 6, 2475-2484 (1981).

53 Buhl, E. H., Tamas, G. y Fisahn, A. "Cholinergic activation and tonic excitation induce persistent gamma oscillations in mouse somatosensory cortex in vitro". *J Physiol* 513 (Pt 1), 117-126 (1998).

54 van Aerde, K. I. et al. "Flexible spike timing of layer 5 neurons during dynamic beta oscillation shifts in rat prefrontal cortex". *J Physiol* 587, 5177-5196 (2009).

55 Wilson, T. W., Rojas, D. C., Reite, M. L., Teale, P. D. y Rogers, S. J. "Children and adolescents with autism exhibit reduced MEG steady-state gamma responses". *Biol Psychiatry* 62, 192-197 (2007).

SECUENCIAS

La secuencia de aminoácidos de ChR2:

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNV
LQWLAAGFSILLMFYAYQTWKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYL
ATGHRVQWLRYAEWLLTCPVILHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATS
AMATGYVKVIFCLGLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFF
VSWGMPILFILGPEGFGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIH
GDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAGAVP (SEQ ID NO:1)

La secuencia de aminoácidos de ChR1:

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQT
SYTLENNGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYG
YQTWKSTCGWEEIYVATIEMIKFIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKT VWLRYAEWLLTC
PVILHLSNLTGLANDYNKRTMGLLVSDIGTIVWGTTAALSKGYVRVIFFLMGLCY
GIYTFNAAKVYIEAYHTVPKGICRDLVRYLAWLYFCSWAMFPVLFLLGPEGFGHI
NQFNSAIAHAILDLASKNAWSMMGHFLRVKIHEHILLYGDIRKKQK VNVAGQEME
VETMVHEEDD (SEQ ID NO:2)

La secuencia de aminoácidos de VChR1:

MDYPVARSLIVRYPTDLGNGTVCMPRGQCYCEGWLRSRGTSIEKTIAITLQWVVFA
LSVACLGWYAYQAWRATCGWEEVYVALIEMMKSIEAFHEFDSPATLWLSSGNGV
VWMRYGEWLLTCPVLLIHLNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCT
GWTKILFFLISLSYGMITYFHAARKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVAVGM
FPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSLDLIAKNMWGVLGNYLRVKIHEHILLYGDIRK
KQKITIAGQEMEVETLVAEEED (SEQ ID NO:3)

La secuencia de aminoácidos de VChR2:

MDHPVARSLIGSSYTNLNNGSIVIPSDACFCMKWLKSKGSPVALKMANALQWAAF
ALSVIILIYYAYATWRTTCGWEEVYVCCVELTKVVIEFFHEFDEPGMLYLANGNRV
LWLRYGEWLLTCPVILIHLSNLTGLKDDYNKRTMRLLVSDVGTIVWGATAAMSTG
YIKVIFLLGCMYGANTFFHAAKVYIESYHTVPGGLCRQLVRAMAWLFFVSWGMF
PVLFLLGPEGFGHLSVYGSTIGHTIIDLLSKNCWGLLGHFRLRKIHEHILLYGDIRKV
QKIRVAGEELEVETLMTEEAPDTVKKSTAQYANRESFLTMRDKLKEKGFEVRASL
DNSGIDAVINHNNNNYNNALANAAAAVGKPGMELSKLDHVAANAAGMGGIADHV
ATTSGAISPGRVILAVPDISMVDYFREQFAQLPVQYEVVVPALGADNAVQLVVQAAG
LGGCDFVLLHPEFLRDKSSTSLPARLRSIGQRVAAFGWSPVGPVRDLIESAGLDGWL
EGPSFGLGISLPNLASLVLRMQHARKMAAMLGGMGGMLGSNLMSGSGGVGLMG
AGSPGGGGGAMGVGMTGMGMVGTNAMGRGAVGNSVANASMGGGSAGMGMG
MMGMVGAGVGGQQQMGANGMGPTSFQLGSNPLYNTAPSPLSSQPGGDASAAAA
AAAAAAATGAASNSMNAMQAGGSVRNSGILAGGLGSMMGPPGAPAAPTAAATA
APAVTMGAPGGGGAAASEAEMLQQLMAEINRLKSELGE (SEQ ID NO:4)

REIVINDICACIONES

1. Un mamífero no humano que comprende una primera proteína del canal de cationes activada por luz, expresada en la membrana celular de las neuronas de la corteza prefrontal del mamífero, en donde la proteína comprende una
5 secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 95 % a la secuencia mostrada en una de SEQ ID NO: 1-4, y comprende una sustitución de Cys → Ser en una posición de aminoácido correspondiente al aminoácido 128 de SEQ ID NO: 1, y una sustitución de Asp → Ala en una posición de aminoácido correspondiente al aminoácido 156 de
10 SEQ ID NO: 1, en donde la proteína es capaz de inducir mediante luz corriente de despolarización en las neuronas y presenta una rápida activación escalonada en respuesta a un único pulso de luz que tiene una primera longitud de onda y la desactivación en respuesta a un pulso de luz que tiene una segunda longitud de onda, en donde la corriente de despolarización en las neuronas se mantiene durante al menos diez minutos; y en donde la activación de la proteína en las neuronas de la corteza prefrontal induce cambios en los comportamientos sociales, las comunicaciones y/o los comportamientos condicionados en el mamífero.
- 15 2. El mamífero de la reivindicación 1, en el que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 95 % a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.
3. El mamífero de la reivindicación 1, en el que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 95 % a la secuencia de aminoácidos mostrada en una de SEQ ID NO: 2-4.
20
4. El mamífero de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la proteína se expresa mediante la administración de la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína usando un vector vírico, que, opcionalmente, es un vector vírico adenoasociado, un vector retrovírico, un vector lentivírico, un vector adenovírico o un vector de VHS.
25
5. El mamífero de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dichos comportamientos sociales se seleccionan del grupo que consiste en acicalamiento social entre miembros de la misma especie, agresión entre residente e intruso, peleas inducidas por el aislamiento, comportamiento sexual, comportamiento parental, reconocimiento social y comunicación auditiva.
30
6. El mamífero de la reivindicación 5, en el que las neuronas están en las subregiones infralímbica o prelímbica de la corteza prefrontal media.
7. El mamífero de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la proteína se expresa bien en neuronas
35 inhibitoras o en neuronas excitadoras de la corteza prefrontal.
8. El mamífero de la reivindicación 7, en el que las neuronas excitadoras son neuronas piramidales, o en el que las neuronas inhibitoras son neuronas de parvalbúmina GABAérgicas.
9. El mamífero de la reivindicación 7, en donde el mamífero comprende además una segunda proteína activada por luz expresada en dichas neuronas inhibitoras o dichas neuronas excitadoras de la corteza prefrontal, y en el que la segunda proteína activada por luz no se expresa en las mismas neuronas que la primera proteína activada por luz.
40
10. El mamífero de la reivindicación 9, en el que la segunda proteína activada por luz es C1V1.
45
11. Un método de identificación de un compuesto químico que restablezca un comportamiento social, una comunicación y/o un comportamiento condicionado en un mamífero no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, comprendiendo el método:
50 (a) despolarizar neuronas excitadoras de la corteza prefrontal de dicho mamífero no humano, activando la proteína del canal de cationes activada por luz expresada en la membrana celular de las neuronas del mamífero usando un pulso de luz que tiene una primera longitud de onda, en donde la despolarización de la neurona excitadora inhibe uno o más comportamientos sociales, comunicaciones y/o comportamientos condicionados en el mamífero no humano;
55 (b) administrar un compuesto químico al mamífero no humano; y
(c) determinar si la administración del compuesto químico al mamífero no humano restablece dicho uno o más comportamientos sociales, comunicaciones y/o comportamientos condicionados en el mamífero no humano.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el comportamiento social se selecciona del grupo que consiste en:
60 acicalamiento social entre miembros de la misma especie, agresión entre residente e intruso, peleas inducidas por el aislamiento, comportamiento sexual, comportamiento parental, reconocimiento social y comunicación auditiva.
13. El método de las reivindicaciones 11 o 12, en el que la proteína es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
65
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la primera longitud de onda es luz azul y

en donde el método comprende además desactivar la proteína del canal de cationes con luz que tiene una segunda longitud de onda, en donde la segunda longitud de onda es luz verde o amarilla.

5 15. El mamífero no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde el mamífero no humano es un ratón.

16. El mamífero no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde el mamífero no humano es una rata.

10

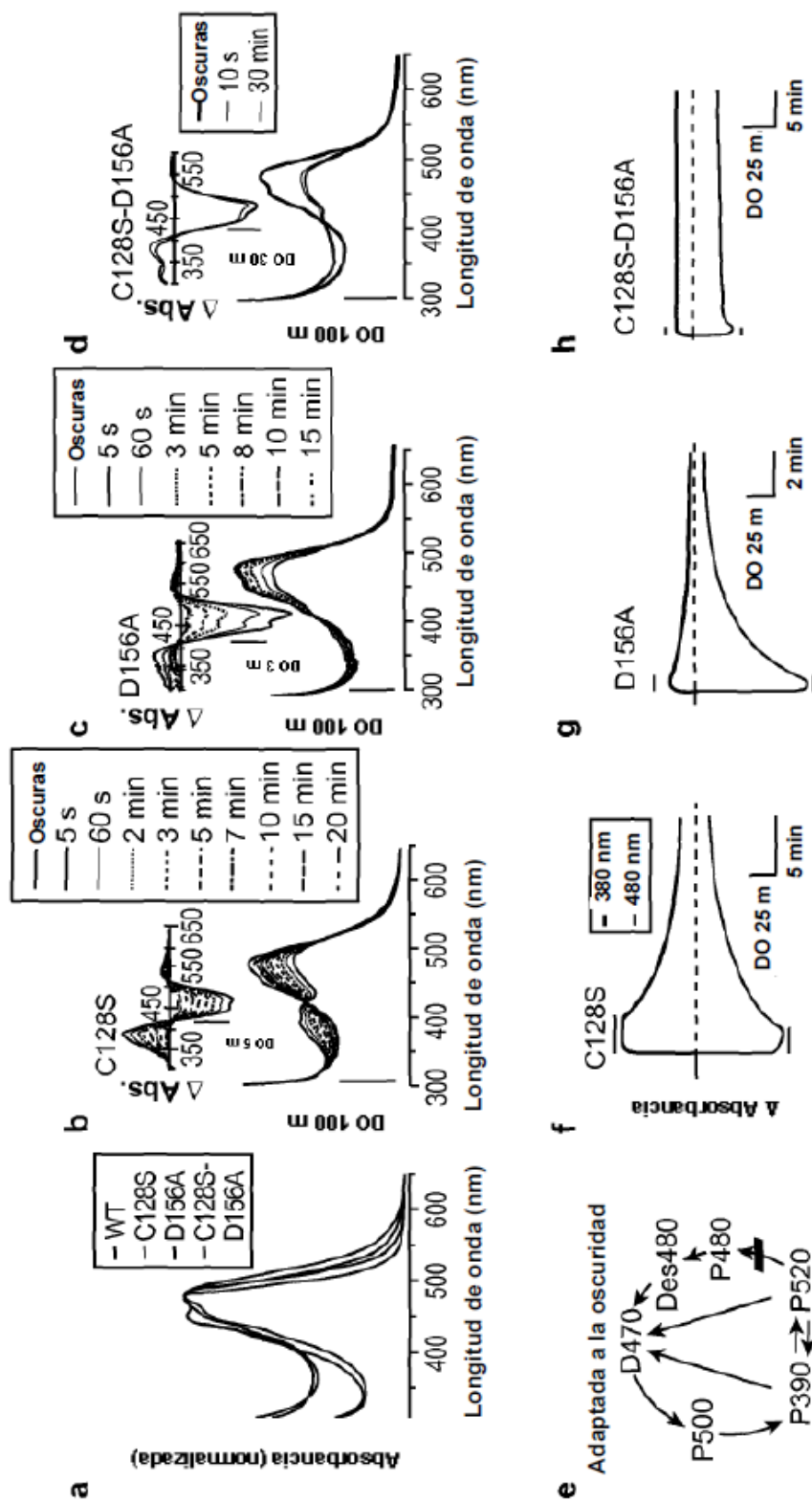


FIG. 1

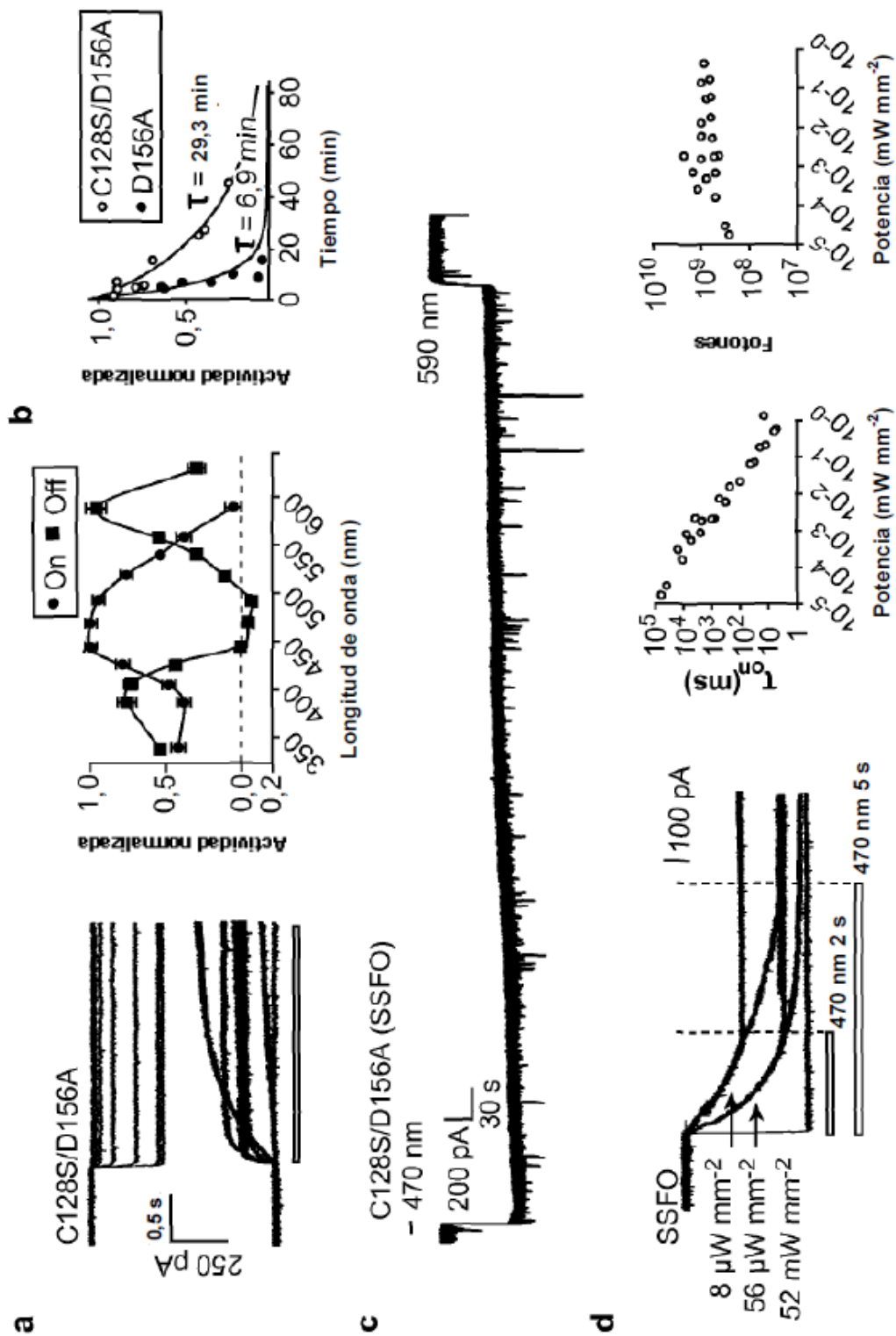


FIG. 2

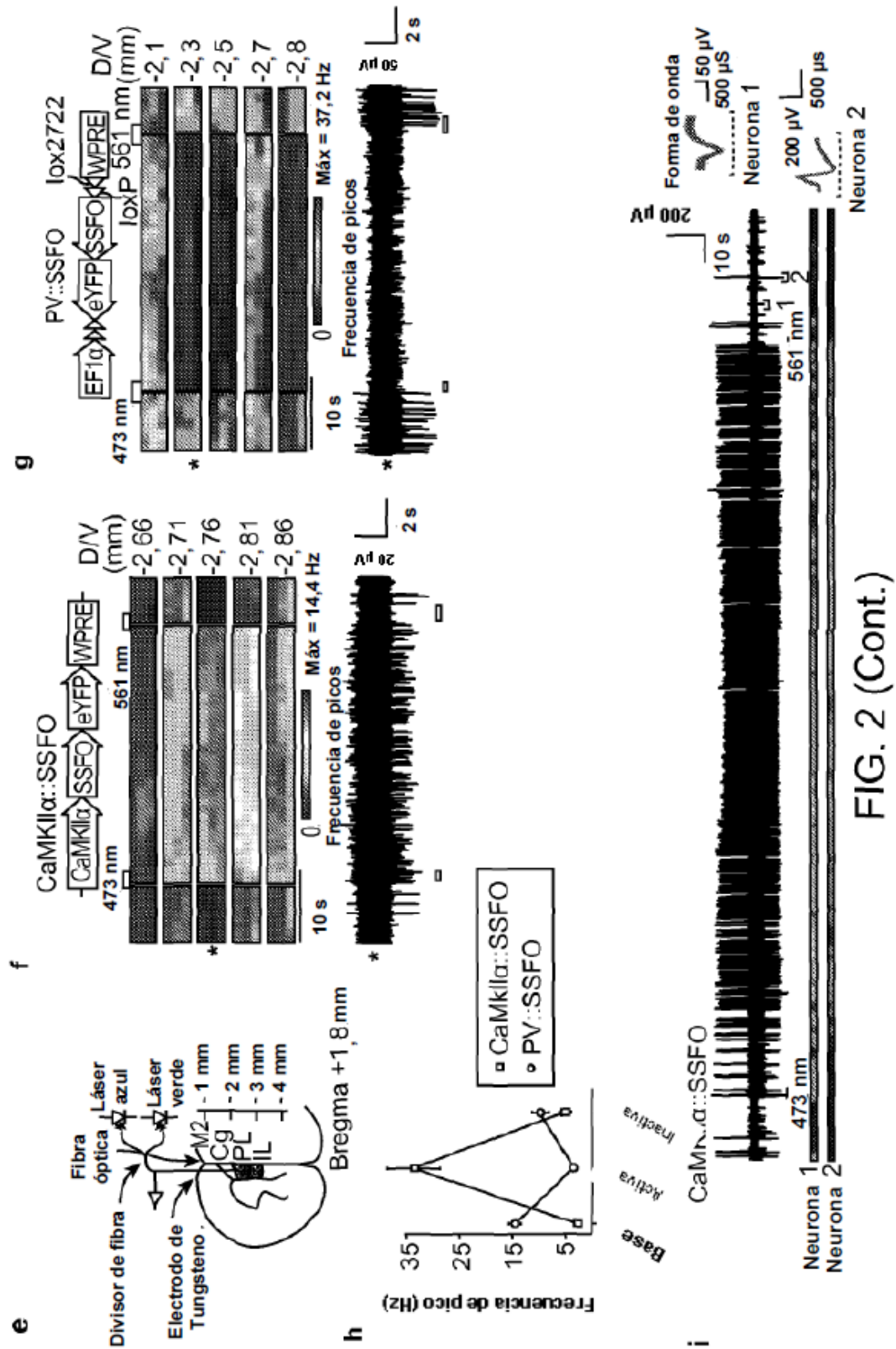
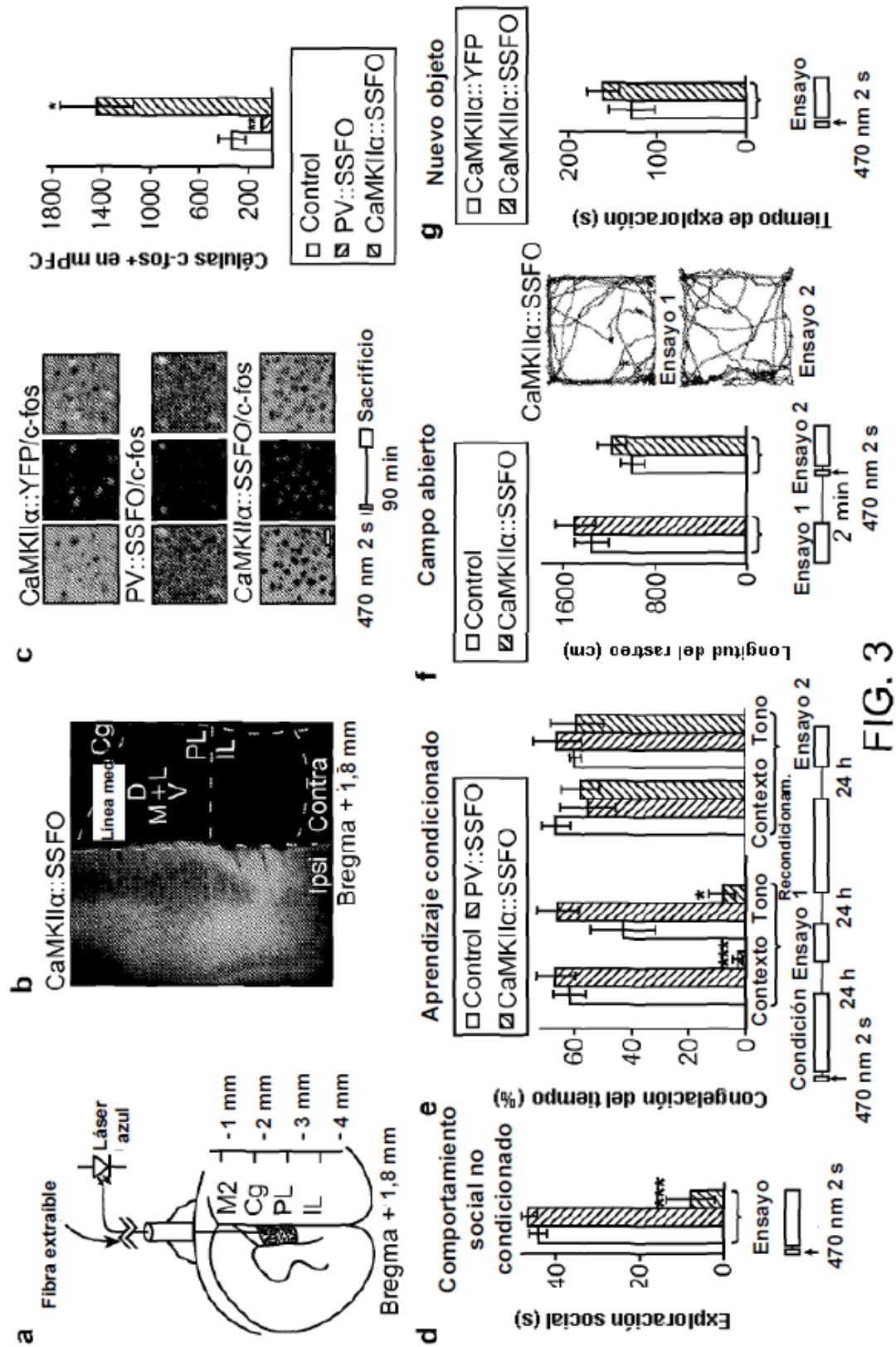


FIG. 2 (Cont.)



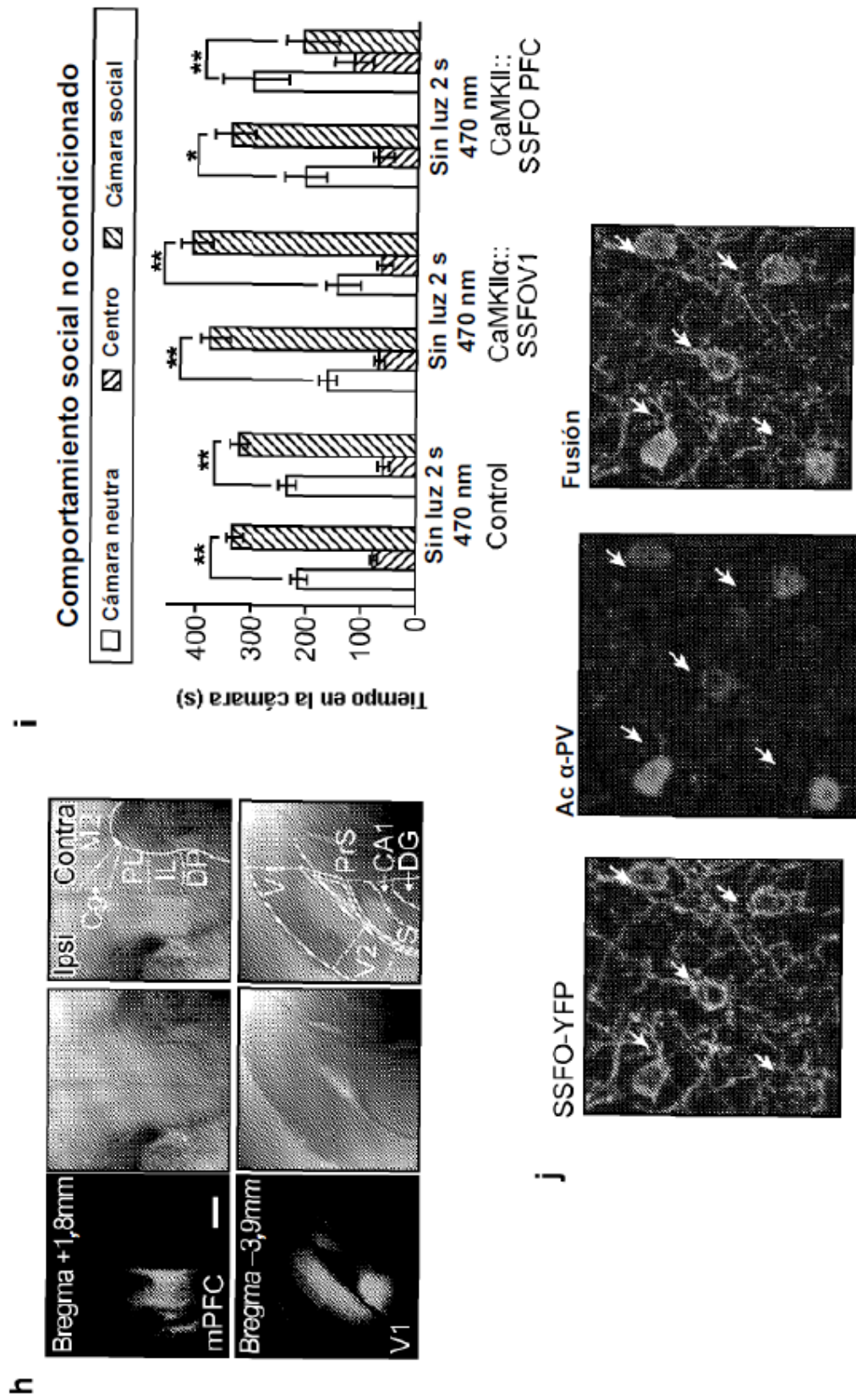
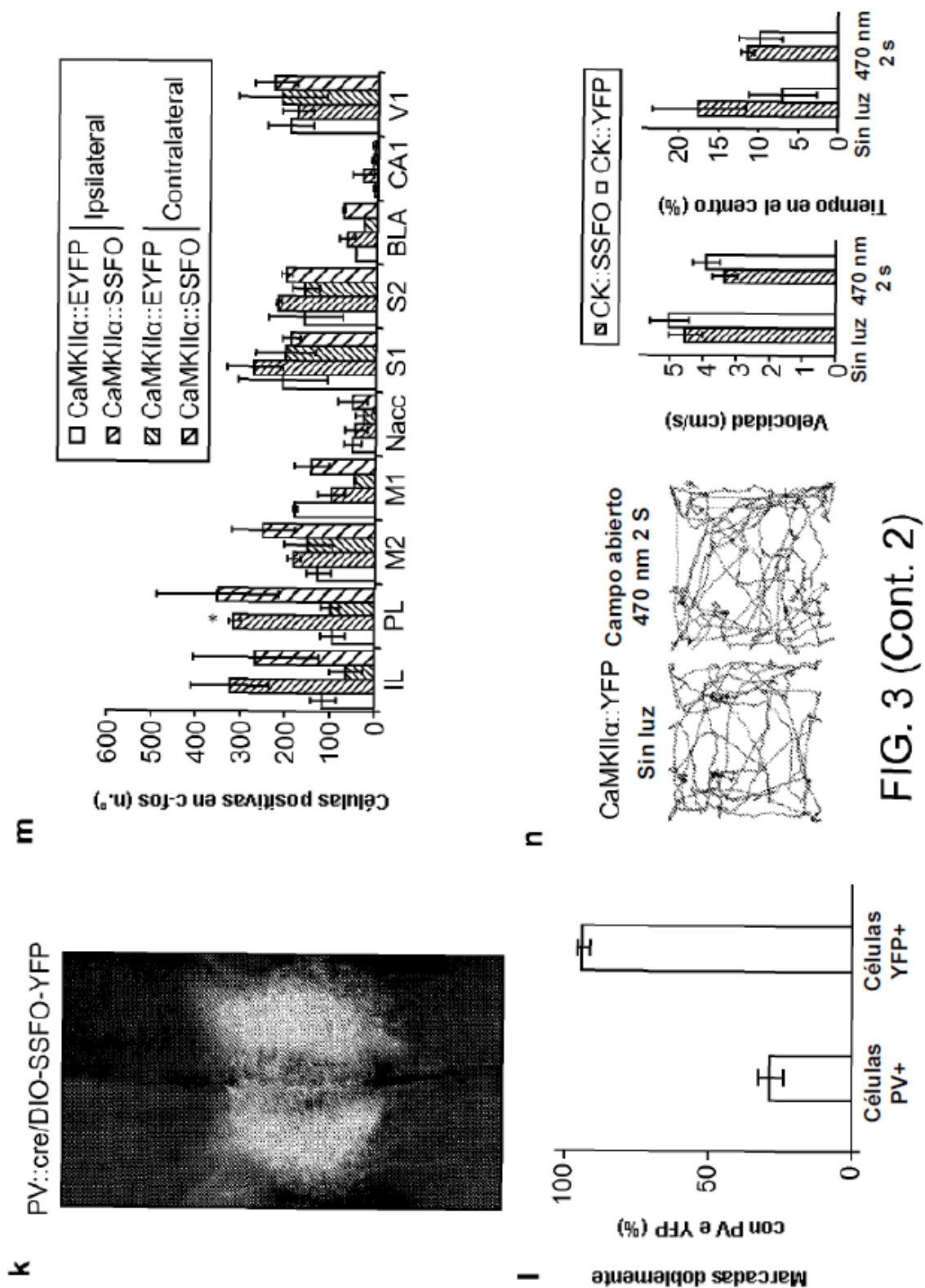
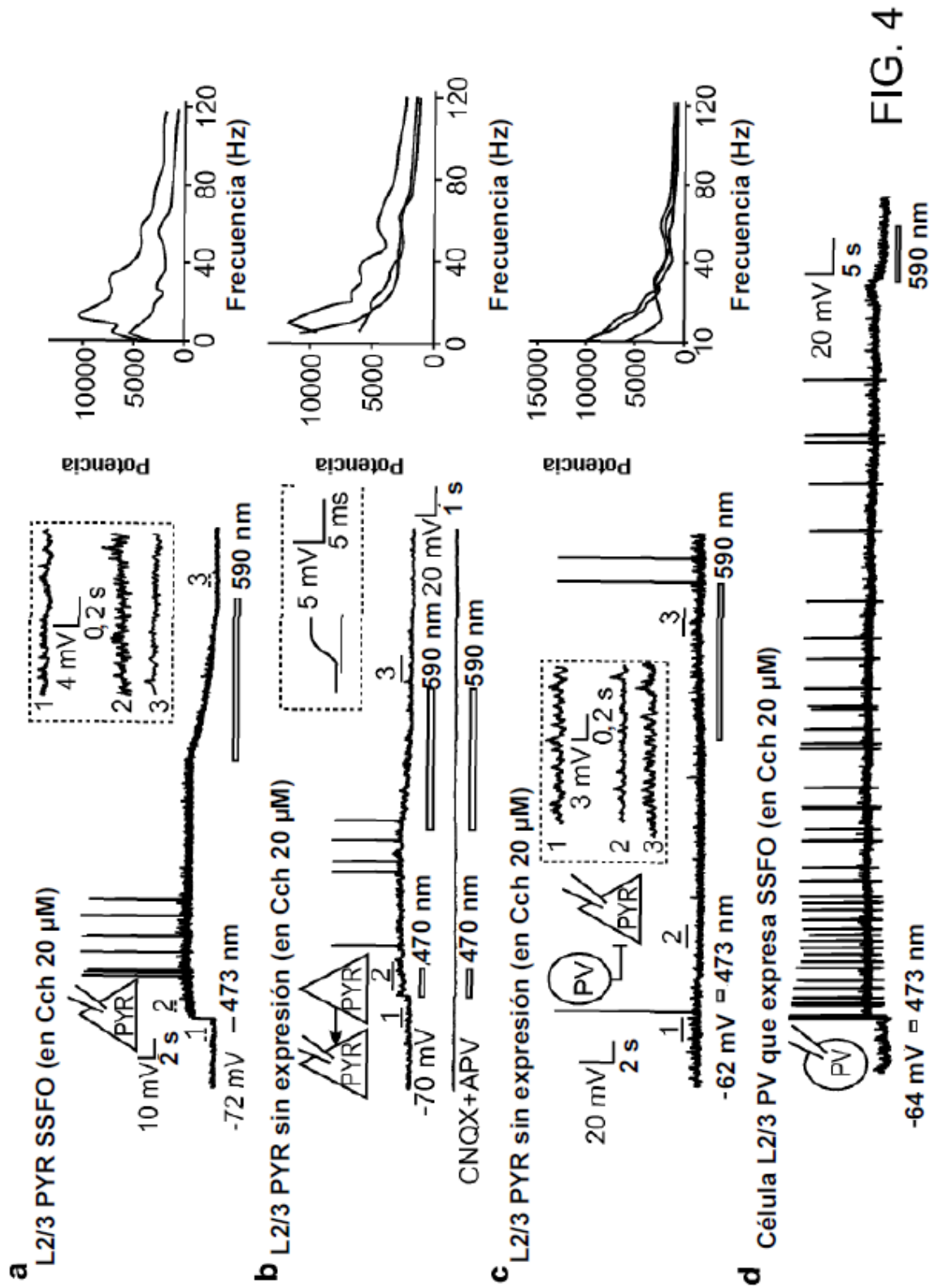


FIG. 3 (Cont. 1)





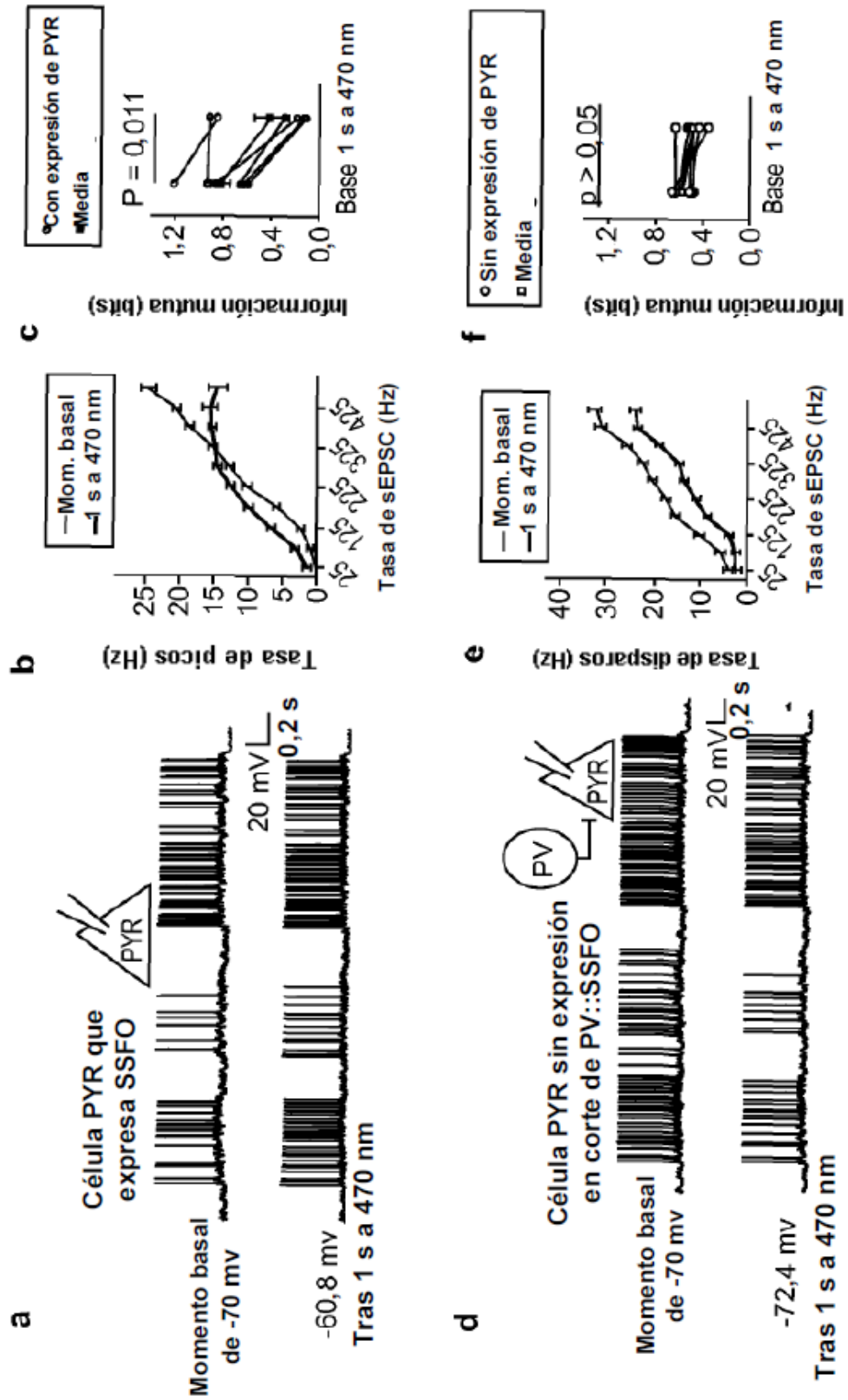


FIG. 5

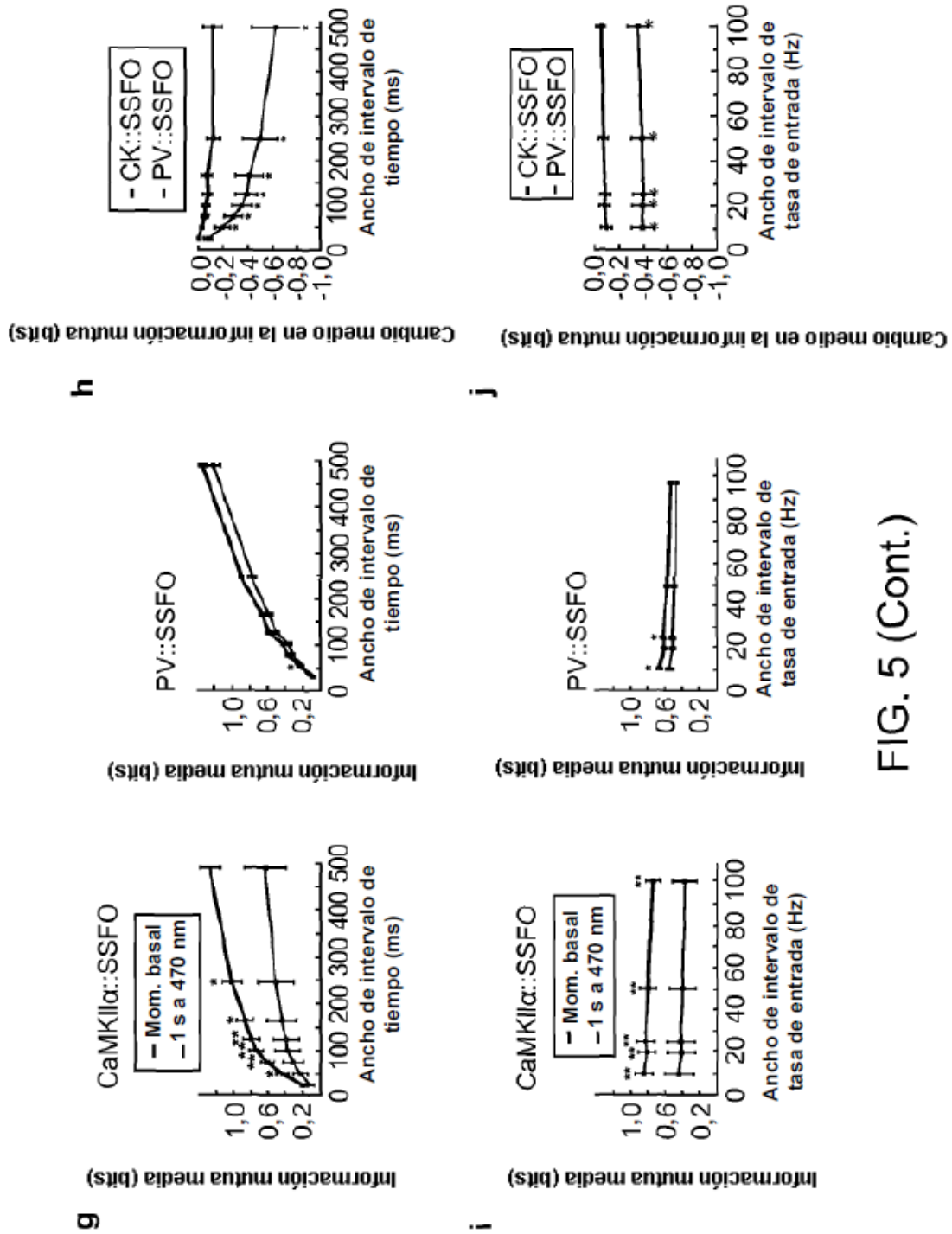


FIG. 5 (Cont.)

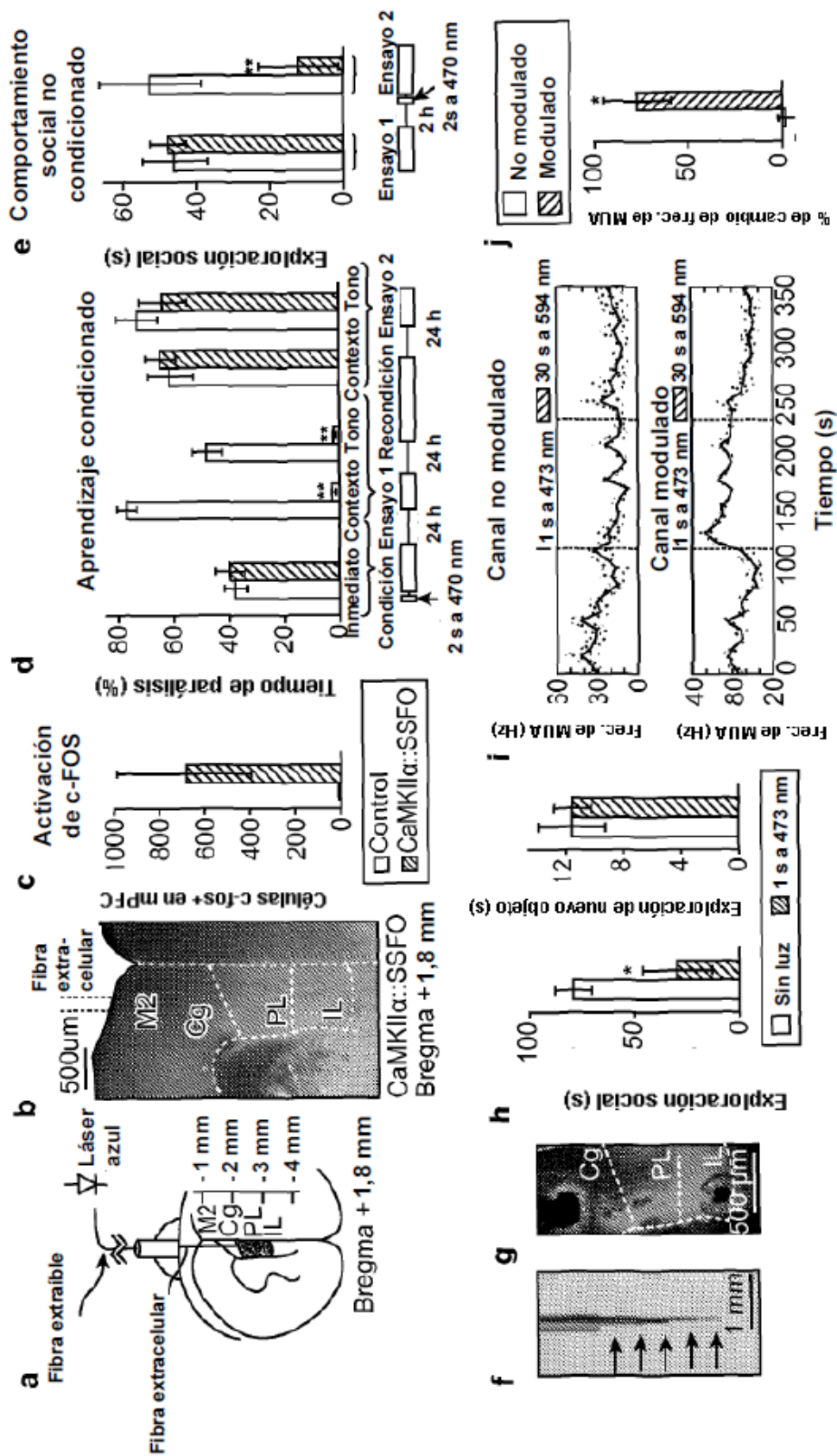


FIG. 6

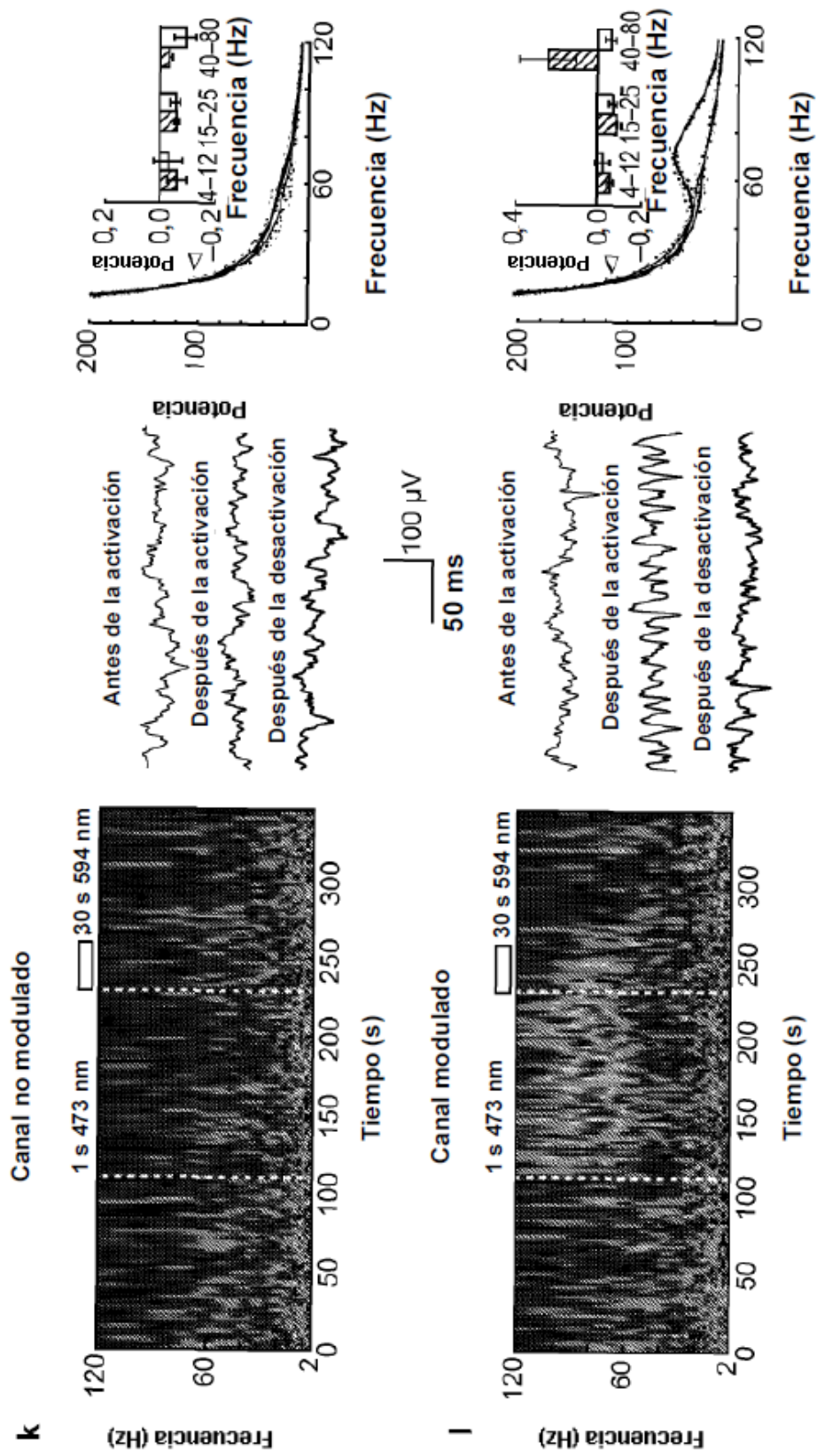


FIG. 6 (Cont.)

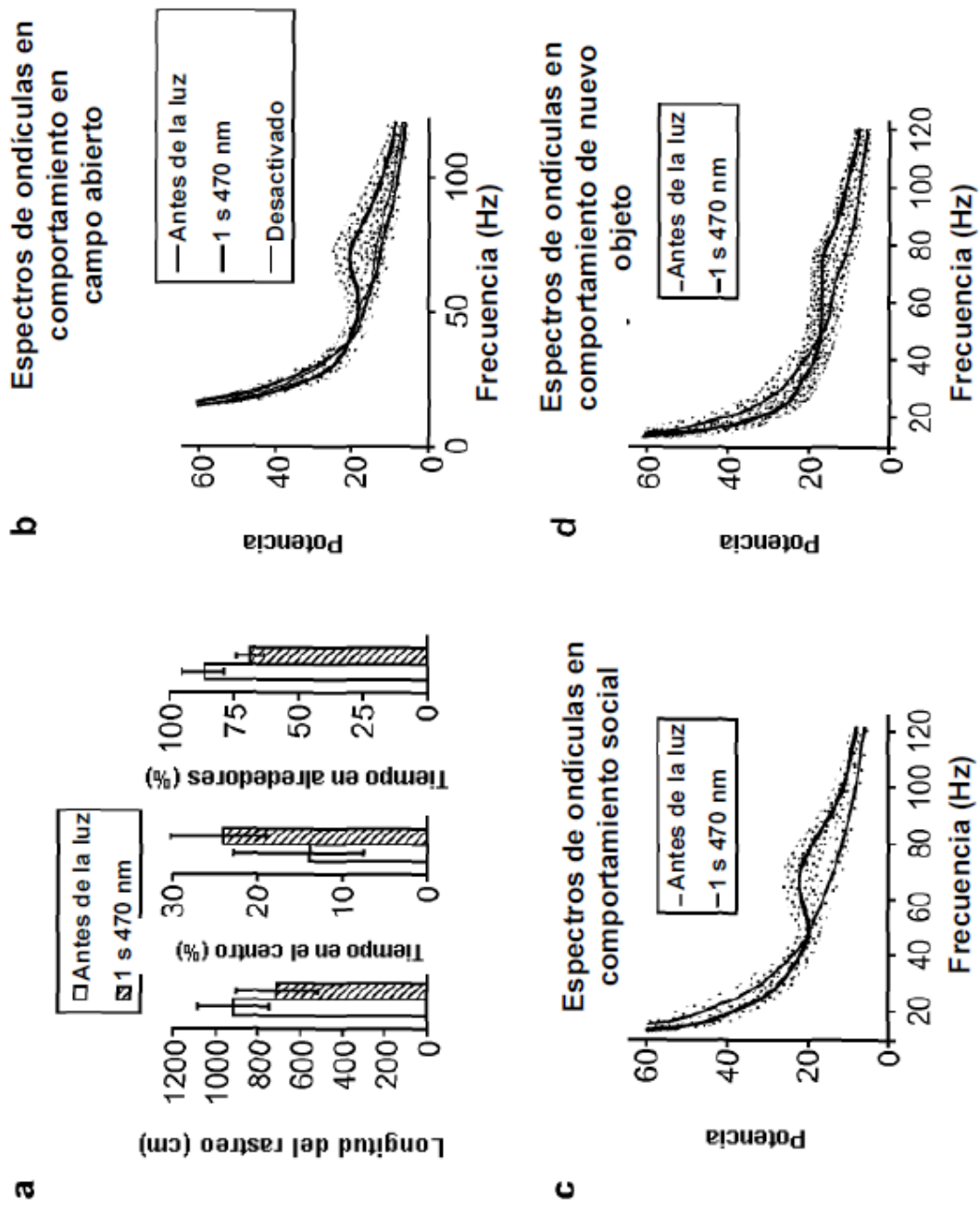
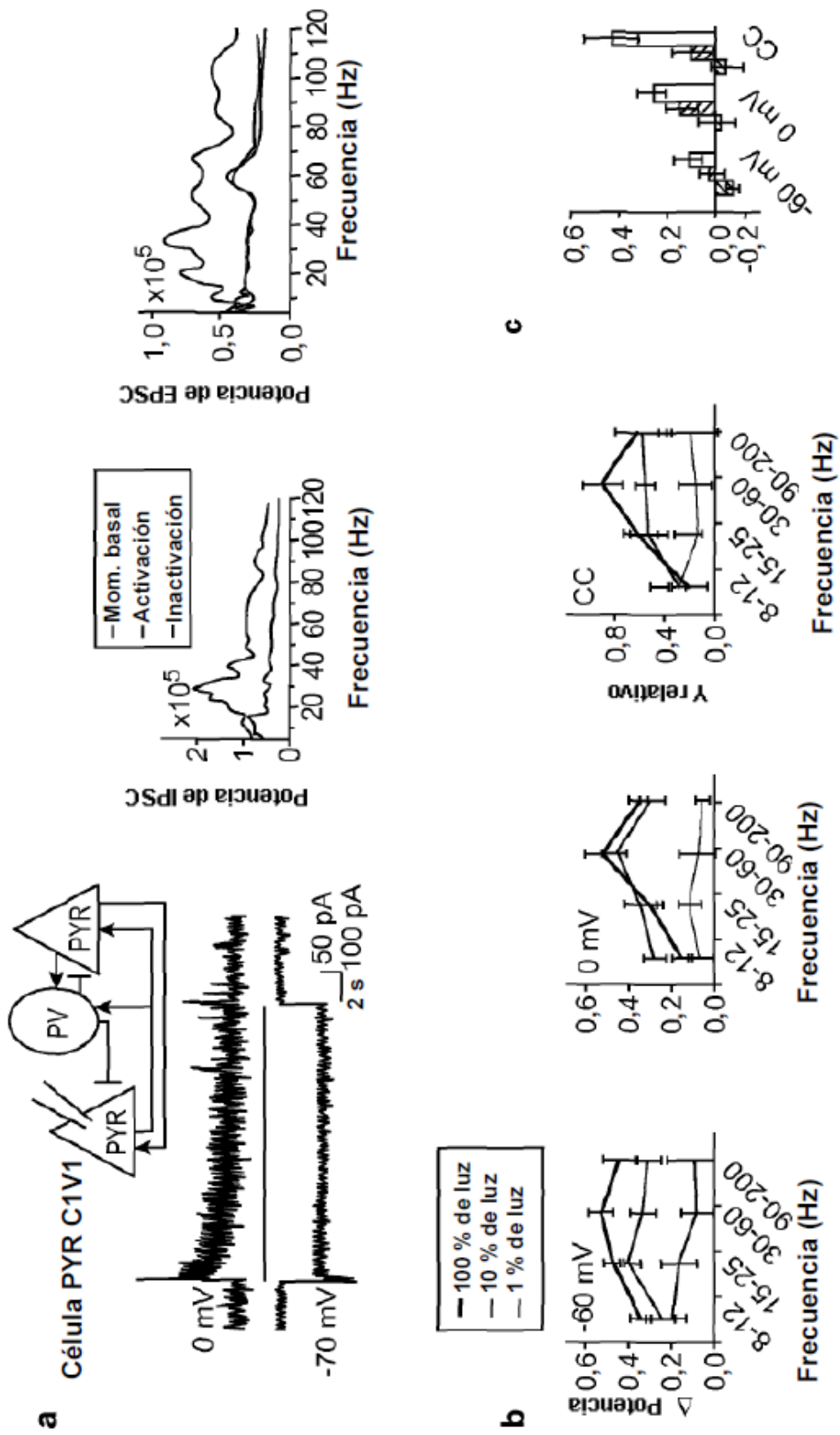


FIG. 7



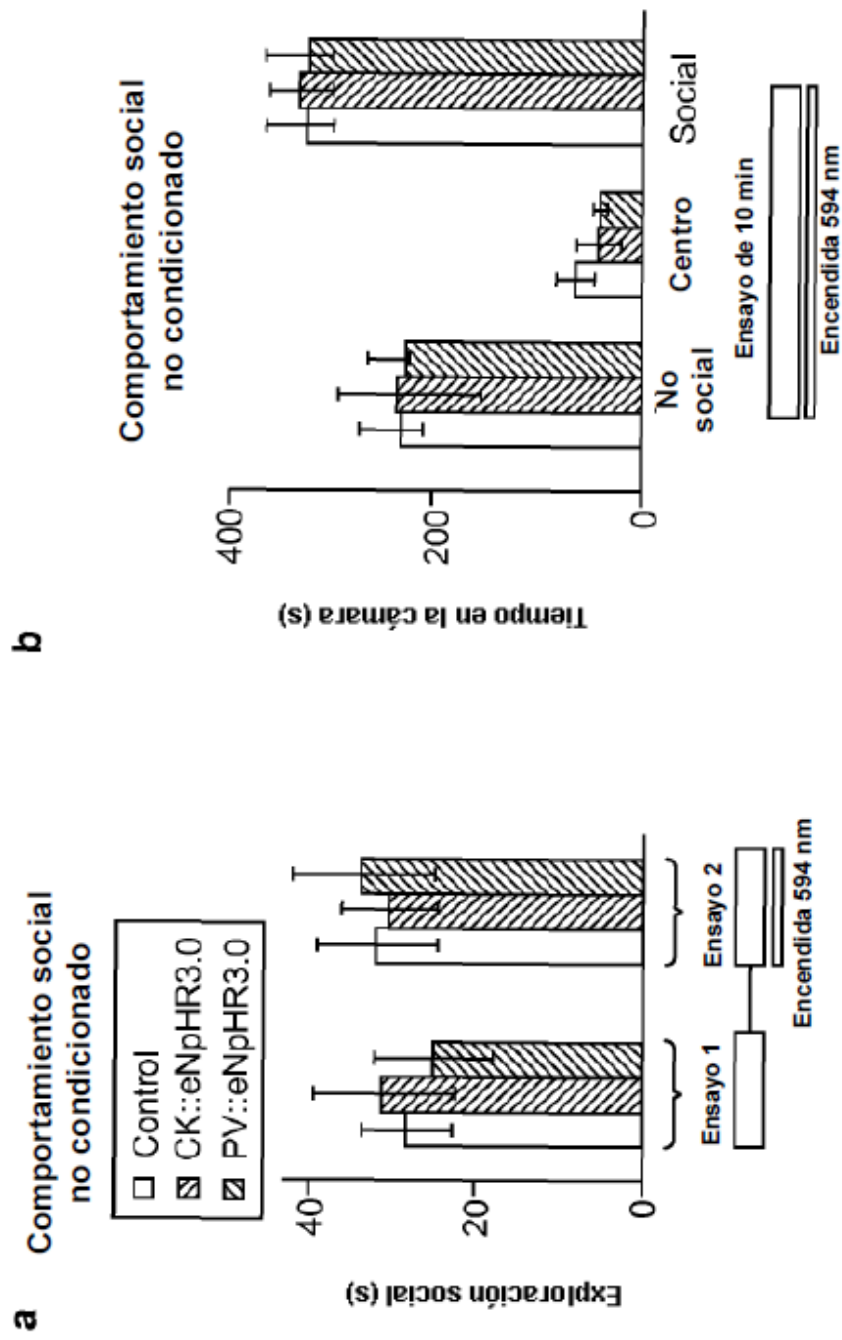


FIG. 9

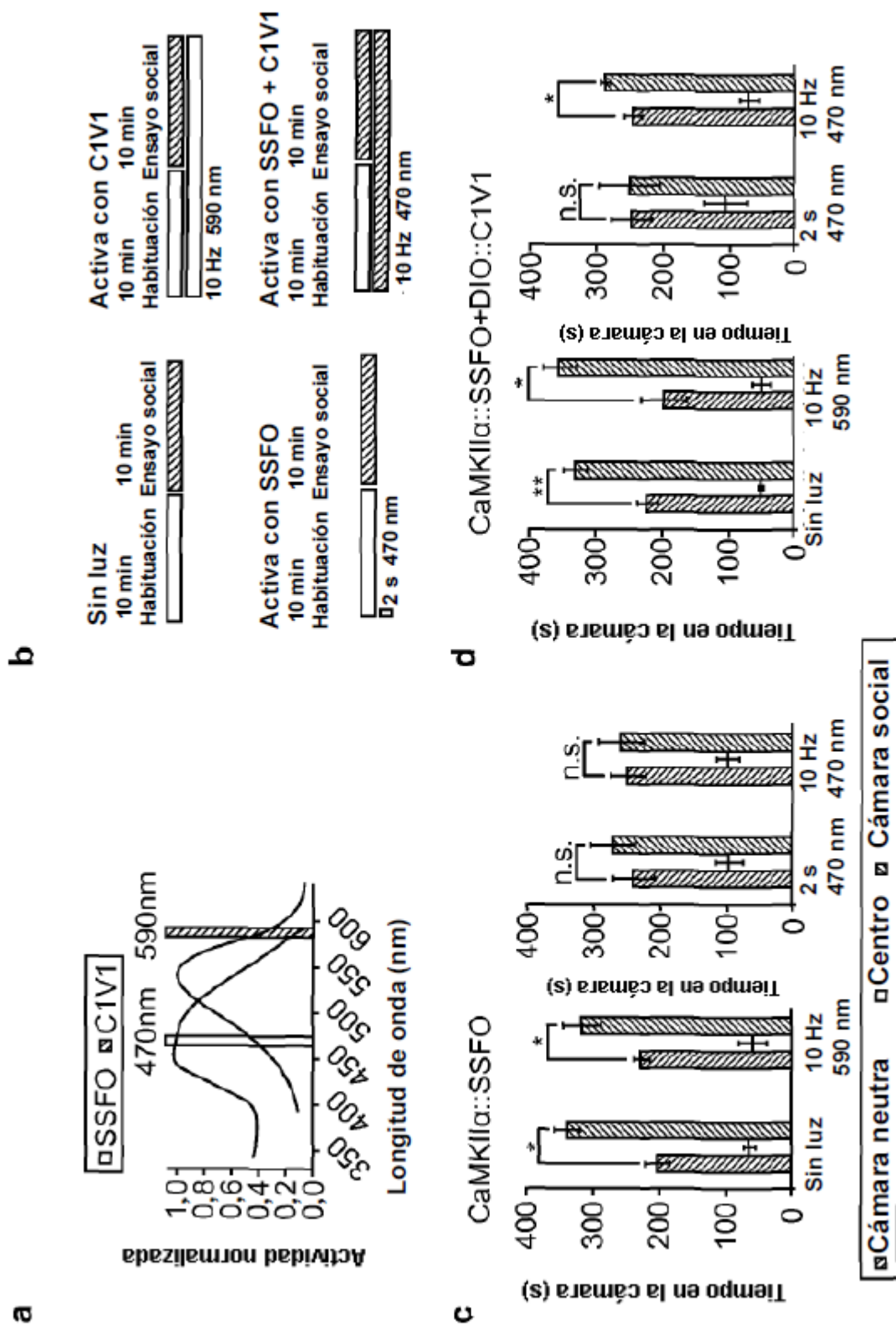


FIG. 10

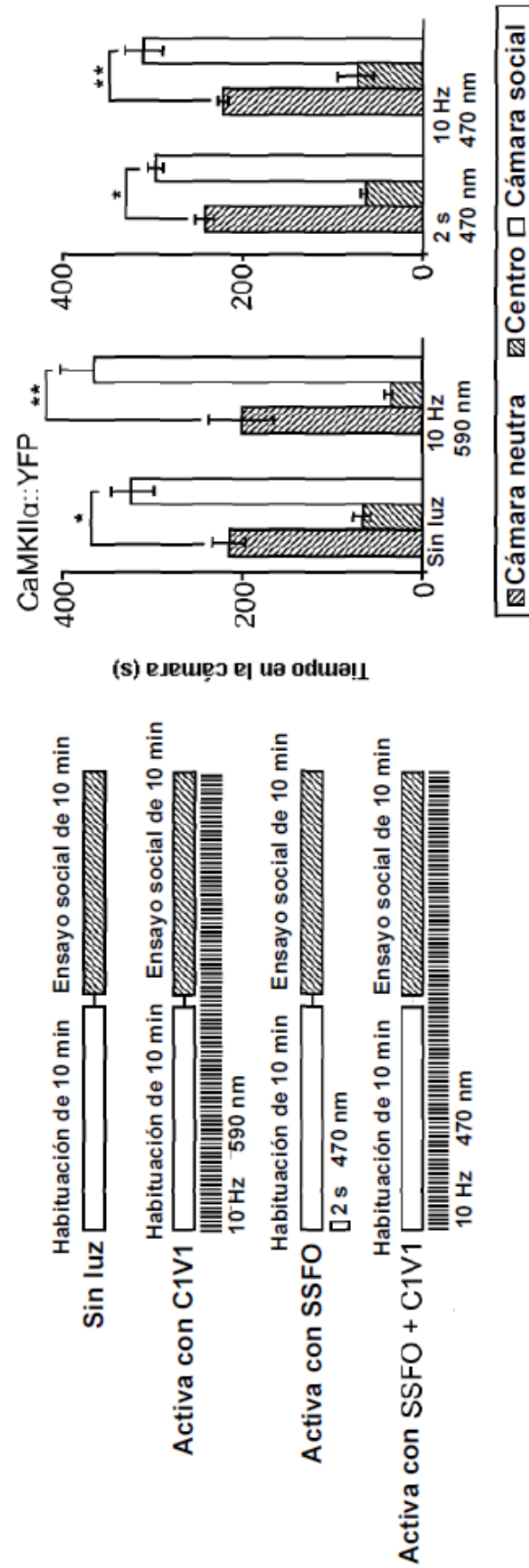


FIG. 11

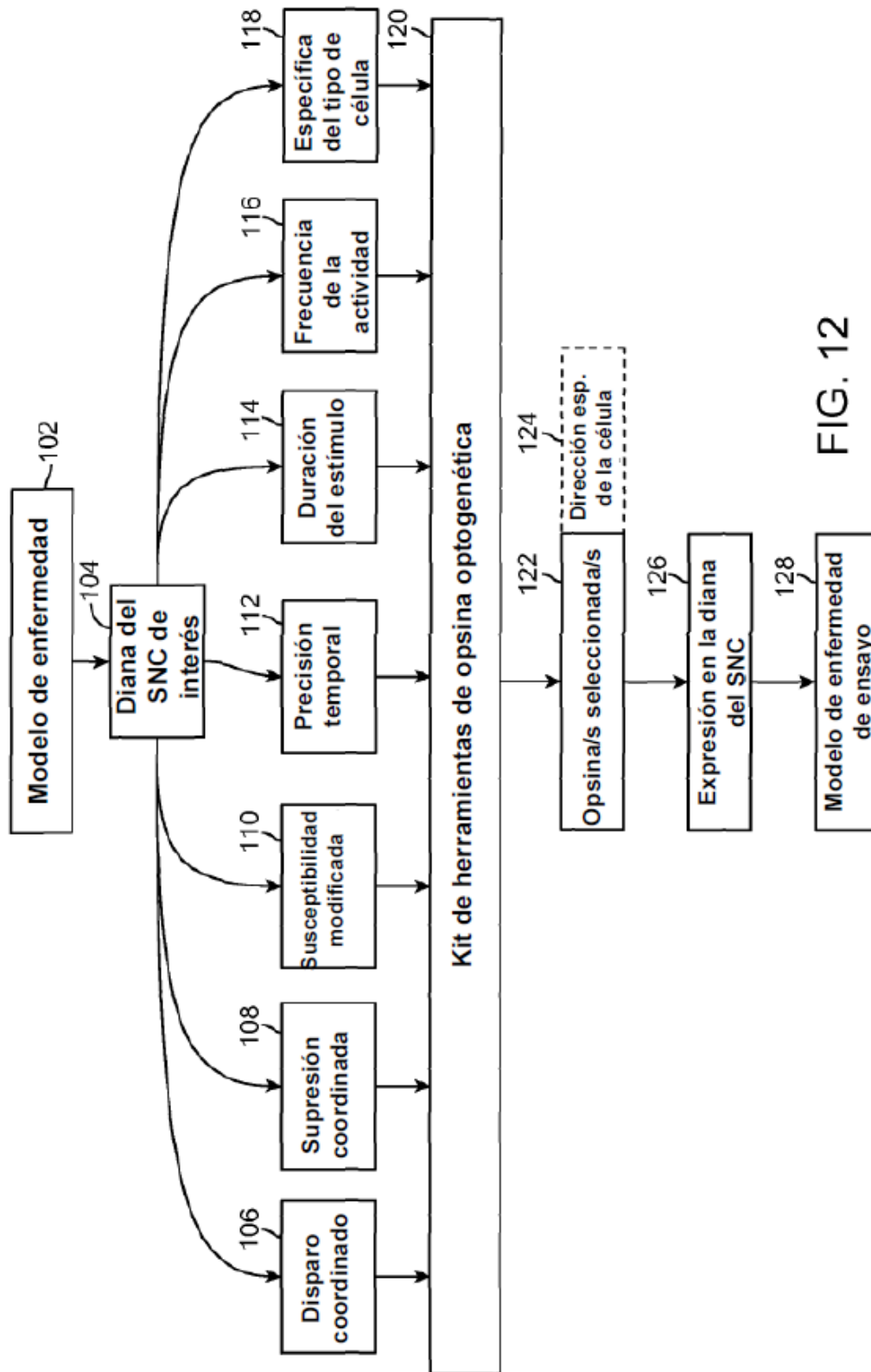


FIG. 12

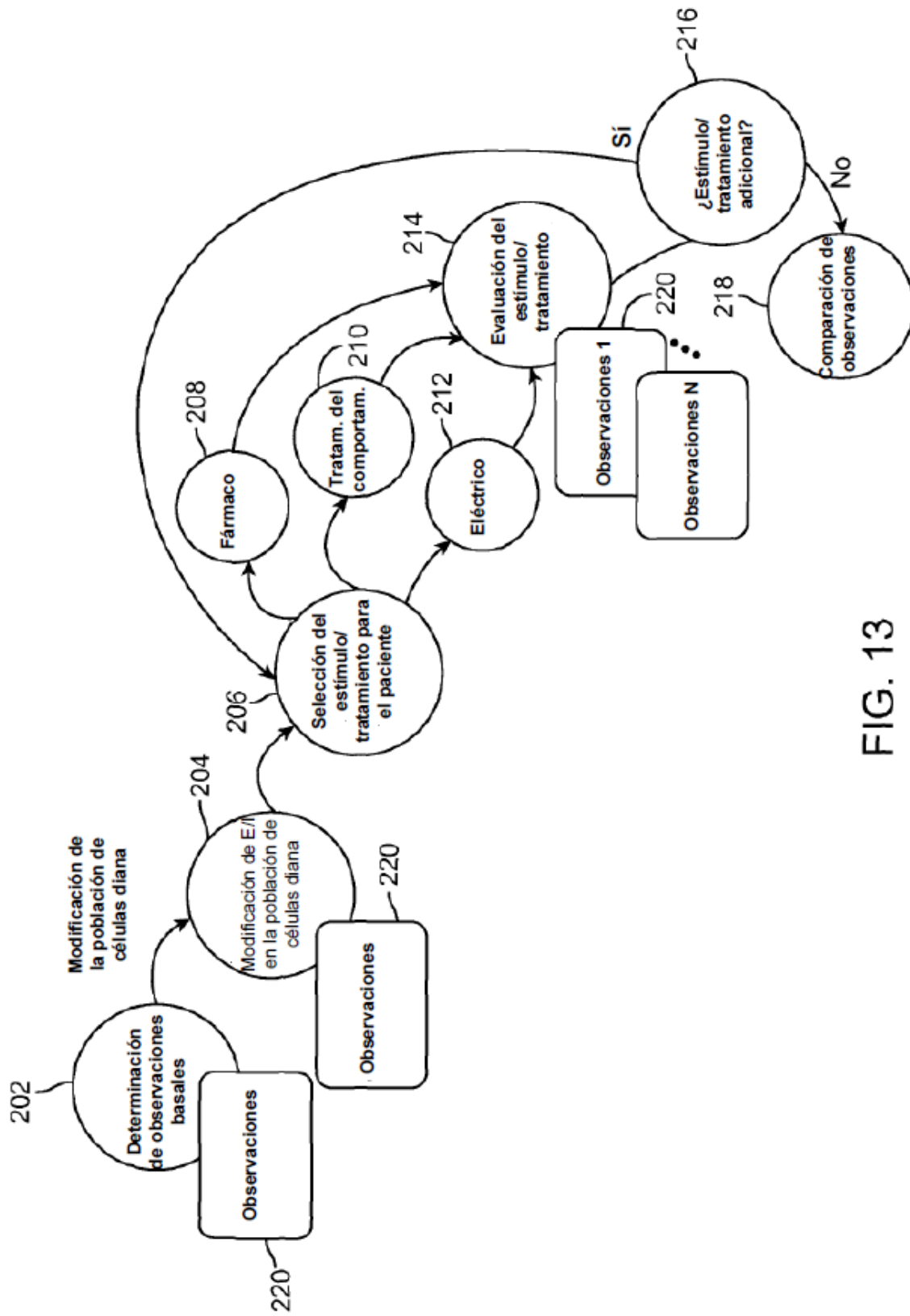


FIG. 13