



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103476456 B

(45)授权公告日 2017. 10. 03

(21)申请号 201180063262.7

(22)申请日 2011.11.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103476456 A

(43)申请公布日 2013.12.25

(30)优先权数据
61/410,692 2010.11.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.06.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/059295 2011.11.04

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/061688 EN 2012.05.10

(73)专利权人 斯坦福大学托管董事会
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 K·戴瑟罗斯 I·威滕

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.
A61N 5/06(2006.01)

(56)对比文件
WO 2010056970 A2, 2010.05.20,
WO 2010056970 A2, 2010.05.20,
CN 1079464 A, 1993.12.15,
WO 2009044271 A2, 2009.04.09,
审查员 马欣

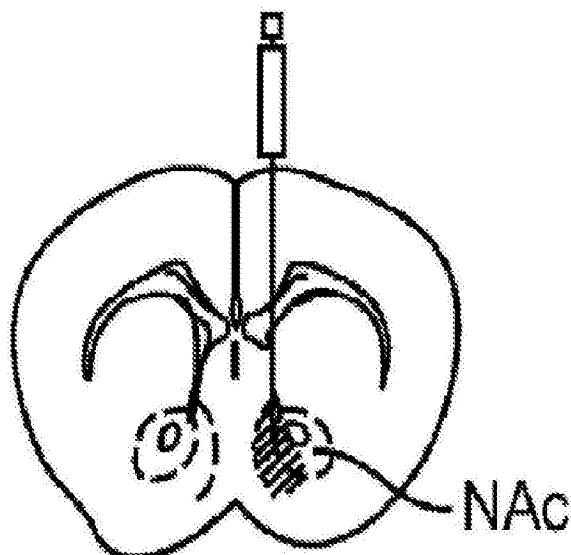
权利要求书2页 说明书35页
序列表3页 附图23页

(54)发明名称

奖赏相关行为的光遗传学控制

(57)摘要

本文提供了通过使用用于控制伏隔核或纹状体的胆碱能中间神经元的极化状态的光反应性视蛋白来破坏个体的至少一种奖赏相关行为的组合物和方法。



1. 编码光反应性视蛋白的多核苷酸在制备药剂中的用途,所述药剂用于破坏个体的奖赏相关行为,其中在向所述个体施用所述多核苷酸后,所述光反应性视蛋白在所述个体的伏隔核或纹状体中的胆碱能中间神经元的细胞膜上表达,并且其中当用光照射所述中间神经元时,所述蛋白质对光起反应并且能够诱导所述中间神经元的膜超极化,从而用光活化所述蛋白质破坏个体的至少一种奖赏相关行为。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述光反应性视蛋白包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%相同的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述多核苷酸为载体。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中所述载体为AAV载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、HSV载体或慢病毒载体。

5. 根据权利要求3所述的用途,其中所述光反应性视蛋白使所述胆碱能中间神经元的细胞膜超极化。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述光反应性视蛋白为NpHR、BR、AR或GtR3。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中NpHR为NpHR2.0、NpHR3.0或NpHR3.1。

8. 根据权利要求1所述的用途,其中所述奖赏相关行为是药物相关的成瘾行为。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述药物为可卡因。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的用途,其中所述个体为人类。

11. 根据权利要求1-9中任一项所述的用途,其中所述个体为非人类动物。

12. 编码光反应性视蛋白的多核苷酸在制备药剂中的用途,所述药剂用于治疗个体药物成瘾,其中在向所述个体施用所述多核苷酸后,所述光反应性视蛋白在所述个体的伏隔核或纹状体中的胆碱能中间神经元的细胞膜上表达,并且其中当用光照射所述中间神经元时,所述蛋白质对光起反应并且能够使所述中间神经元超极化,从而用光活化所述蛋白质破坏所述个体的至少一种奖赏相关行为并且所述个体不再想要服药。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中所述光反应性视蛋白包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%相同的氨基酸序列。

14. 根据权利要求12所述的用途,其中所述药物成瘾为可卡因成瘾。

15. 根据权利要求12所述的用途,其中所述多核苷酸为载体。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中所述载体为AAV载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、HSV载体或慢病毒载体。

17. 根据权利要求12-16中任一项所述的用途,其中所述个体为人类。

18. 根据权利要求12-16中任一项所述的用途,其中所述个体为非人类动物。

19. 一种胆碱能神经元的光传输系统,包括:

a) 经遗传修饰以表达光反应性视蛋白的一组胆碱能神经元;
b) 向所述胆碱能神经元组提供药物的药物递送设备;
c) 评估所述胆碱能神经元组响应于向所述胆碱能神经元组提供的药物的活性的监测设备;和

d) 通过活化所述光反应性视蛋白激发所述胆碱能神经元的光传输系统。

20. 根据权利要求19所述的胆碱能神经元的光传输系统,其中将所述监测设备进一步配置为通过监测乙酰胆碱的释放评估所述胆碱能神经元组的活性。

21. 根据权利要求19所述的胆碱能神经元的光传输系统,其中所述光反应性视蛋白包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%相同的氨基酸序列。

奖赏相关行为的光遗传学控制

[0001] 相关申请案的交叉引用

[0002] 本申请要求2010年11月5日提交的美国临时申请No.61/410,692的优先权,其公开内容通过引用整体并入本文。

发明领域

[0003] 本申请涉及包含在其质膜上表达光反应性视蛋白的动物细胞的组合物和使用所述组合物使留在伏隔核或背侧纹状体的微型回路中的胆碱能中间神经元选择性超极化以影响与动物的奖赏相关条件作用相关联的一种或多种行为的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 物质滥用和依赖性是世界所面临的重要社会问题。根据2008年世界毒品报告(World Drug Report 2008),约5%的世界人口使用非法药物并,且在0.6%的世界人口中,吸毒是一个问题。在美国,根据2006年物质滥用和精神健康服务管理局(Substance Abuse and Mental Health Services Administration, SAMHSA)的全美药物使用与健康调查,2360万12岁或以上的人需要对非法药物或酒精滥用问题的治疗(9.6%的12岁或以上的人)。其中,仅250万-10.8%需要治疗的人-在专业机构接受了治疗。物质滥用和依赖性导致全世界生产人力的巨大损失并且将在治疗援助、保险理赔和在预防和脱瘾项目方面的花费的成本强加于政府和社会。

[0006] 光遗传学是甚至在自由活动的哺乳动物和其它动物体内,用于控制活组织靶细胞中的特定事件的遗传和光学方法的组合,时间精度(毫秒-时间尺度)需要与功能完整的生物系统保持同步。光遗传学的特点是将快速光反应性视蛋白通道或泵蛋白引入靶神经元细胞的质膜,靶神经元细胞允许对神经元膜电位在时间上精确的操纵,同时通过使用特异性靶向机制维持细胞类型分辨率。其中可用于研究神经系统功能的微生物视蛋白为氯视紫红质蛋白(NpHR),用于促进照射时的膜超极化。短短几年内,光遗传学领域已增进了对哪些特定细胞类型有助于生物组织,例如体内神经回路的功能的基本科学理解。而且,在临床方面,光遗传学驱动的研究已经导致对为哺乳动物行为基础的神经学机制的深刻理解。

[0007] 虽然有这些进展,对复杂人类行为例如物质滥用和依赖性(成瘾)的基础的神经生理学底物仍知之甚少,尽管有关于大脑特定区域在这些行为中所起的作用的新信息。例如,伏隔核(NAc)是形成腹侧纹状体主要部分的神经元的集合。认为NAc在奖赏、快乐、欢笑、成瘾、攻击、恐惧和安慰作用中起重要作用。乙酰胆碱是重要且受广泛研究的神经递质,其对多种受体和靶细胞起作用。一些体内药理学方法已经证实,奖赏学习行为需要NAc中的胆碱能传递。NAc中的胆碱能中间神经元特别有吸引力,因为它们构成少于1%的局部神经群,但是它们投射到整个NAc中并且提供其唯一已知的胆碱能输入。局部表达相关胆碱能受体,并且烟碱和毒蕈碱药理学激动剂可对中型多棘神经元(MSN,代表>95%的局部神经群并且构成NAc的输出)施加复杂影响。然而,胆碱能中间神经元对NAc生理学或奖赏相关行为的任一方面的净效应(如果有)未知。

[0008] 因此,需要的是允许研究NAc中的胆碱能中间神经元在奖赏相关行为,例如物质依

赖性中所起的因果作用的工具。理解为成瘾基础的神经通路可帮助发现并筛选药理学疗法以治疗有此类病症的患者,以及打开使用此类工具破坏吸毒成瘾的个体脑部中的这些行为的可能性。

[0009] 在整个说明书中,引用了出版物(例如,科学论文)、专利申请、专利等,其全部通过引用整体并入本文。

[0010] 发明概述

[0011] 本文提供了通过使用稳定表达的能够改变个体的伏隔核或纹状体的胆碱能中间神经元的膜极化状态的光反应性视蛋白破坏个体的奖赏相关行为的组合物和方法,其中伏隔核或纹状体的胆碱能中间神经元的膜极化状态的改变破坏了动物的一种或多种奖赏相关行为。在一些实施方案中,奖赏相关行为是成瘾相关行为。在其它实施方案中,成瘾相关行为是可卡因成瘾。

[0012] 因此,在一些方面,本文提供了一种非人类动物,其包含在所述动物的伏隔核或纹状体中的胆碱能中间神经元的细胞膜上表达的光反应性视蛋白,其中当用光照射所述中间神经元时所述蛋白质对光起反应并且能够诱导所述中间神经元的膜超极化,其中照射所述蛋白质破坏所述动物的至少一种奖赏相关行为。

[0013] 在其它方面,本文提供了一种包含所述伏隔核或所述纹状体的横截面的脑切片,其中光反应性视蛋白在胆碱能中间神经元的细胞膜上表达,其中当用光照射所述中间神经元时所述蛋白质对光起反应并且能够诱导所述中间神经元的膜超极化,其中照射所述蛋白质破坏奖赏相关的脑功能。

[0014] 在一些方面,本文提供了一种破坏个体的奖赏相关行为的方法,包括:向所述个体施用编码光反应性视蛋白的多核苷酸,其中所述光反应性视蛋白在所述个体的伏隔核或纹状体中的胆碱能中间神经元的细胞膜上表达,并且当用光照射所述中间神经元时所述蛋白质对光起反应并且能够诱导所述中间神经元的膜超极化,从而用光活化所述蛋白质破坏个体的至少一种奖赏相关行为。在一些实施方案中,向所述个体的伏隔核或纹状体施用所述多核苷酸。

[0015] 在其它方面,本文提供了一种治疗个体药物成瘾的方法,包括:向所述个体施用编码光反应性视蛋白的多核苷酸,其中所述光反应性视蛋白在所述个体的伏隔核或纹状体中的胆碱能中间神经元的细胞膜上表达,并且当用光照射所述中间神经元时所述蛋白质对光起反应并且能够使所述中间神经元超极化,从而用光活化所述蛋白质破坏所述个体的奖赏相关行为,其中所述个体不再需要服药。在一些实施方案中,向所述个体的伏隔核或纹状体施用所述多核苷酸。

[0016] 本公开的各方面涉及对如本文所述活动物的加强行为的控制或表征。虽然本公开不一定限于这些情况,但是可通过使用这些和其它情况讨论实例,了解本发明的各个方面。

[0017] 本公开的实施方案涉及与享乐和/或加强行为相关联的特别靶向回路。更特殊的实施方案涉及对神经回路的时空控制以鉴定与奖赏记忆、快感缺失、成瘾和/或加强行为相关联且相对应的特定回路靶标之间的关联。

[0018] 本公开的特定实施方案涉及对与自然奖赏相关行为和/或奖赏学习有牵连的结构,包括但不限于伏隔核(NAc)或背侧纹状体中的靶细胞的抑制。在特定实例中,对NAc中特定胆碱能神经元的靶向尤其非常适合破坏这些胆碱能神经元对乙酰胆碱的释放。已经发

现,此类神经抑制可对靶向神经抑制有效,可减少或消除对其它行为,例如食欲的或厌恶反应的加强的不良影响。本公开的各方面涉及特定于时间、空间和/或细胞类型的刺激。在某些实施方案中,使用牵涉光反应性视蛋白在神经回路细胞中的表达的光遗传学系统进行这种抑制。在其它实施方案中,可使用直接电刺激进行抑制。还有其它实施方案允许使用时间上精确的医药品。

[0019] 附图简述

[0020] 考虑到下列描述和附图可更加充分地理解各个示例实施方案,其中:

[0021] 图1描绘了NAc的ChAT中间神经元中ChR2和eNpHR3.0的特异性、膜靶向和功能性。

(A) 将Cre-依赖型AAV (表达eNpHR3.0-eYFP或ChR2(H134R)-eYFP) 注射至NAc的中间部分。(B) 注射切片的共聚焦图像证明经4',6'-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI) 共染色,eYFP表达与ChAT抗体的共同定位。(C) $91.3 \pm 1.3\%$ 表达YFP的神经元也染有ChAT抗体($n=418$); $93.5 \pm 2.8\%$ 染有ChAT抗体的神经元也表达YFP($n=413$)。误差线指SEM。(D) 高倍放大视图显示了经ChAT抗体共染色的eNpHR3.0-eYFP(左)和ChR2-eYFP(右)的膜定位。(E) 表达ChR2-eYFP的ChAT神经元中电流注入诱导的膜电位变化。 $V_M = -48\text{mV}$ 。电流阶跃:-60、-20、+20pA。(F) 表达eNpHR3.0-eYFP的ChAT神经元中由1s的580-nm光诱导的膜电位变化(峰值超极化:-103mV)。 $V_M = -49\text{mV}$ 。(插图) 种群平均峰值超极化(平均值 $\pm$ SEM:-83.8 $\pm$ 11.9mV; $n=4$)。(G) 表达ChR2-eYFP的ChAT神经元中470-nm脉冲序列引起的连续动作电位(脉冲宽度5ms;10Hz)。(H) 表达ChR2-eYFP的ChAT神经元中,在不同刺激频率下产生动作电位的平均成功概率($n=4$;平均值 $\pm$ SEM;470-nm脉冲序列,脉冲宽度5-ms)。

[0022] 图2描绘ChAT中间神经元的光遗传学光活化增加了抑制电流的频率而抑制了MSN尖峰化。(A) 于脑切片中用蓝光(470nm) 活化经ChR2-eYFP转导的ChAT神经元,并且在MSN附近(eYFP-细胞) 为全细胞膜片钳制。(B) (左) 在ChAT神经元中表达ChR2-eYFP的切片的MSN中观察到自发突触电流。(中) 突触电流的频率响应于470-nm光脉冲(脉冲宽度5-ms;10Hz) 增大。(右) 这些电流被GABAA受体拮抗剂SR-95531(5mM) 阻断并且因此被视为IPSC。2,3-二羟基-6-硝基-7-磺酰胺基苯并[f]喹啉-2,3-二酮(NBQX)(5mM) 和(RS)-3-(2-羧基哌嗪-4-基)-丙基-1-膦酸(RS-CPP)(5 μ M) 存在于所有实验中。(C) 对于这种MSN的IPSC频率的时程,显示了光脉冲(蓝色虚线条) 和SR-95531(黑色线条) 的作用。(D) 光照期间IPSC频率根据相对于光脉冲($n=6$) 的时间增大的平均百分比(标准化为熄灭期间的平均百分比)。蓝色虚线指光脉冲开始;误差线表示SEM。(E) 光脉冲使IPSC频率增大 $525.8 \pm 154.3\%$ ($n=6$, $P=0.01$,配对双尾t检验),而自发IPSC的平均幅度变化 $21.3 \pm 28.9\%$ ($P>0.05$)。(F) 在体内使光极(与钨电极连接的光纤) 立体定位于ChAT细胞中表达ChR2-eYFP的NAc中。(G) (上) 受蓝光刺激抑制的分离单元的电压跟踪。(中) 显示了相同单元对5次重复光刺激的反应的光栅图,每个动作电位用一个点表示。(下) 随时间推移相同单元的放电率的平均值和SEM。(H) 受光刺激抑制的部位相比受光刺激激发的部位的分数的种群总结。实线表示部位上根据时间的平均放电率;每个点表示单独部位的平均放电率。所有放电率均标准化为光刺激之前的平均速率。(F-I) 光刺激的持续时间,10s;脉冲持续时间,5ms;波长,470nm;频率,10Hz。用虚线表示光刺激的时期。

[0023] 图3描绘ChAT中间神经元的光遗传学光抑制增强了体内MSN尖峰化。(A) (上) 通过eNpHR3.0对ChAT中间神经元的光遗传学光抑制激发的分离单元的电压跟踪(从体内NAc记

录)。(中)显示了相同单元对5次重复光刺激的反应的光栅图,每个动作电位用一个点表示。(下)随时间推移相同单元的放电率的平均值和SEM。(B)小波分析揭示根据频率和时间,与(A)中相同的单元的尖峰化功率(5次重复的平均值)。(C)受光刺激抑制的部位相比受光刺激激发的部位的分数的。(D)与(A)相同,对于受光刺激抑制的单元而言。(E)受光抑制(左;n=13/17)或激发(右;n=4/17)的部位对光刺激的反应的时程的种群总结。实线表示部位上根据时间的平均放电率;每个点表示单独部位的平均放电率。所有放电率均标准化为光刺激之前的平均值。(A-E)光刺激的持续时间,15s(持续光照);波长,560nm。用柱表示光刺激的时期。

[0024] 图4描绘ChAT中间神经元可在切片中用可卡因活化并且为体内可卡因条件作用所需。(A)应用可卡因浴(5 μ M)10min后,ChAT神经元中自发动作电位的频率增大。ACSF,人工脑脊髓液。(B)对于这种ChAT神经元,随时间推移的放电率。水平灰色柱,可卡因的应用;垂直点线,可卡因应用10min后,(A)和(C)中详细说明了时间点。(C)种群数据,说明了可卡因诱导的ChAT神经元中放电的增加,比较了基线放电率(可卡因应用2.5min前的平均值)与可卡因输注后的速率(可卡因开始后10至12.5min之间的平均值;灰色柱,接受了可卡因的细胞;白色柱,仅接受了ACSF的对照细胞; $P<0.005$,可卡因前后,对可卡因处理组的配对双尾t检验; $P<0.05$,比较可卡因或媒介物后,可卡因与对照细胞的非配对双尾t检验)。(D)有双光纤插入的双侧插管系统的示意图,以说明NAc的中间部分。(左侧插图)对(H)中使用的所有小鼠的插管轨迹的端点。(右侧插图)注射了Cre依赖型eNpHR3.0-eYFP的ChAT::Cre⁺小鼠的NAc中的eYFP表达。(E)可卡因CPP(H)的条件作用范例。经腹腔内用可卡因(20mg/kg),连同用eNpHR3.0进行ChAT细胞抑制(波长:590nm)条件化小鼠。(F)来自在可卡因条件作用后试验当天(第3天)代表性ChAT::Cre⁺和ChAT::Cre⁻小鼠的跟踪数据。在前一天(第2天),小鼠已经在左侧腔室内接受了可卡因,而在右侧腔室内接受了盐水。ChAT::Cre⁻小鼠(而非ChAT::Cre⁺小鼠)表现出对条件化腔室的偏爱。(G)(左)可卡因CPP(用可卡因和光条件化)第3天与第1天中,在条件化腔室内时间的倍数变化。ChAT::Cre⁺和ChAT::Cre⁻同窝小鼠的比较;在两种情况中均注射有Cre依赖型eNpHR3.0(n=10只ChAT::Cre⁺,n=12只ChAT::Cre⁻;对于双尾t检验而言, $P<0.01$;3个同期组群)。(右)单独用光条件作用第3天与第1天中,在条件化腔室内时间的倍数变化(无可卡因;n=9只ChAT::Cre⁺,n=7只ChAT::Cre⁻;对于双尾t检验而言, $P>0.05$;3个同期组群)。误差线指SEM.n.s.,不显著。(H)注射了病毒(Cre依赖型eNpHR3.0)和经光刺激的ChAT::Cre⁺和ChAT::Cre⁻小鼠在野外的速度(n=10只ChAT::Cre⁺,n=10只ChAT::Cre⁻;对于双尾t检验而言, $P>0.05$;3个同期组群)。(I)在野外的跟踪长度与(H)相同(n=10只ChAT::Cre⁺,n=10只ChAT::Cre⁻;对于双尾t检验而言, $P>0.05$;3个同期组群)。(J)在野外中央的时间与(H)相同(n=10只ChAT::Cre⁺,n=10只ChAT::Cre⁻;对于双尾t检验而言, $P>0.05$;3个同期组群)。(A-J)* $P<0.05$;** $P<0.01$ *** $P<0.005$ 。

[0025] 图5描绘了对切片中和体内ChAT中间神经元的光遗传学光活化。(A):对与图2B中相同的MSN的15次电流跟踪的覆盖图,每次跟踪与光脉冲对齐。一些IPSC并未时间锁定为光脉冲,而许多IPSC受光脉冲开始后~8ms的潜伏期时间锁定。(B):相同神经元根据相对于光脉冲的时间的IPSC发生率。空心柱对应光刺激期间记录的IPSC数量;灰色柱对应基线期间(光刺激之前)使用相同时间校准记录的IPSC数量。对于该神经元而言,除更加突出的同步增加外,IPSC频率的不同步增强明显。(C):图2D的比例尺重设图,展示了光照相对于熄灭期

间,IPSC频率根据相对于光脉冲的时间增大的种群平均百分比($n=6$)。在种群中,除更加突出的同步增加外,IPSC频率的不同步增强明显。图A-C的脉冲参数:470nm,5ms脉冲持续时间,10Hz。(D):来自体内记录的电压跟踪,显示了在10Hz(上)而非100Hz(下;470nm光;总刺激持续时间10s)跟踪脉冲蓝光光刺激的群峰电位(推测由表达ChR2的ChAT细胞产生)。

[0026] 图6描绘ChAT神经元抑制破坏可卡因CPP,而在可卡因缺乏时不影响CPP。(A):可卡因CPP,数据与图4G相同(左图),但是绘制为差异而非倍数变化。左侧:条件作用之后与条件作用之前,在经可卡因条件化的腔室内的时间差。 $(n=10$ 只ChAT::Cre⁺, $n=12$ 只ChAT::Cre⁻;对于双尾t检验而言, $p<.01$;3个同期组群)。右侧:条件作用之后与条件作用之前对经可卡因条件化的腔室的偏爱差异,其中将偏爱定义为在条件化腔室与未条件化腔室中消耗时间的差异。 $(n=10$ 只ChAT::Cre⁺, $n=12$ 只ChAT::Cre⁻;对于双尾t检验而言, $p<.01$;3个同期组群)。(B):无可卡因的CPP,数据与图4G相同(右图)并且数据呈现与A相同。(对于两个图而言, $n=9$ 只ChAT::Cre⁺, $n=7$ 只ChAT::Cre⁻;对于双尾t检验而言, $p>.05$;3个同期组群)。

[0027] 图7描绘烟碱受体拮抗作用使在MSN中记录到的ChAT中间神经元产生的IPSC减少。(A):代表性IPSC在无光、光脉冲(470nm,10Hz,5ms脉冲宽度)和具有10 μ M美加明的相同光脉冲的条件下从急性切片制剂中的典型MSN中扫过。(B):与A相同在光呈现之前,经光呈现和光和美加明或媒介物从一群MSNs记录到的IPSC的总结图。IPSC频率从3.4 $\pm$ 1.3Hz光稳定性增长到10.1 $\pm$ 1.2Hz($p<0.05$; $n=7$,配对t检验),而美加明使这种增长减少到5.1 $\pm$ 1.8Hz(与相同细胞内单独的光相比,配对t检验, $p<0.05$;与媒介物对照相比, $n=5$,非配对t检验, $p<.05$)。

[0028] 图8描绘了在一定可卡因-CPP参数范围内对ChAT中间神经元的调节。(A):eNpHR3.0介导的对ChAT中间神经元的抑制期间,可卡因CPP的剂量反应曲线。对于腹腔内20mg/kg的标准奖赏剂量而言,可卡因CPP在ChAT::Cre⁺小鼠体内显著减少($p<.01$),但是在认为产生焦虑或不充足的其它浓度下不显著减少(590nm光,持续光照;见下文的表2)。(B):ChR2对ChAT神经元的刺激并未推动自身的位置偏爱。(470nm光,5ms脉冲宽度,每30s中10s的10Hz刺激; $n=4$, $p>0.05$ 双尾t检验)。(C):在10Hz下用ChR2刺激ChAT神经元不会显著调节腹腔内10mg/kg可卡因的可卡因位置偏爱。(470nm光,5ms脉冲宽度,可卡因条件作用期间持续10Hz刺激;ChAT::Cre⁺ $n=6$,ChAT::Cre⁻ $n=6$; $p>0.05$ 双尾t检验)。(D):在10Hz下用ChR2刺激ChAT神经元不会显著调节腹腔内20mg/kg可卡因的可卡因位置偏爱。(470nm光,5ms脉冲宽度,可卡因条件作用期间稳定10Hz刺激;ChAT::Cre⁺ $n=4$,ChAT::Cre⁻ $n=3$; $p>0.05$ 双尾t检验)。

[0029] 图9描绘eNpHR3.0对ChAT中间神经元的抑制并未削弱情境或听觉暗示的恐惧条件作用。(A):在标准情境恐惧条件作用范例中量化了耗时冻结百分比。“基线”指在首次音调冲击配对前30s。“立即”指紧接第二次(和最后一次)音调冲击配对后的30s。“情境”指冻结于条件作用期后当天相同的情境。ChAT::Cre⁺小鼠表现出立即和情境冻结增强。 $(n=9$ 只ChAT::Cre⁺, $n=8$ 只ChAT::Cre⁻;双尾t检验;比较ChAT::Cre⁺和ChAT::Cre⁻的立即和情境冻结, $p<.05$)。(B):听觉暗示的恐惧条件作用范例的耗时冻结百分比。“音调前”指音调开始前新情境中的2.5min;“音调”指音调期间的2.5min($n=9$ 只ChAT::Cre⁺, $n=8$ 只ChAT::Cre⁻;双尾t检验;比较ChAT::Cre⁺和ChAT::Cre⁻, $p>.05$)。

[0030] 图10描绘了控制伏隔核(NAc)或背侧纹状体的系统,与本公开的实施方案一致。

[0031] 图11描绘了控制乙酰胆碱释放的流程图,与本公开的实施方案一致。

[0032] 发明详述

[0033] 本发明尤其提供了通过选择性改变伏隔核或背侧纹状体的胆碱能中间神经元细胞的膜电位破坏个体的奖赏相关行为的组合物和方法。本发明基于发明人发现用光反应性视蛋白离子泵蛋白选择性超极化伏隔核的胆碱能中间神经元细胞破坏了药物成瘾动物模型追求奖赏的行为。

[0034] 虽然本公开可具有各种修改和替代形式,但是在图中已经以举例的方式示出了其细节并将进行详细描述。然而,应理解,目的不是将本公开限于描述的特定实施方案。相反,目的是包括属于本公开范围内的所有修改、等效物和替代方案,包括权利要求中定义的各个方面。

[0035] 通用技术

[0036] 除非另外指出,本发明的实践将采用本领域技术人员众所周知的分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学、核酸化学、免疫学、生理学和病理生理学药物成瘾和奖赏相关行为的常规技术。文献中充分说明了此类技术,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版(Sambrook等,1989)和Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版(Sambrook和Russel,2001), (本文共同称为“Sambrook”);Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel等编辑,1987,包括2001全年的增刊);PCR:The Polymerase Chain Reaction, (Mullis等编辑,1994);Harlow和Lane (1988) Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Publications,New York;Harlow and Lane (1999) Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY (本文共同称为“Harlow和Lane”),Beaucage等编辑,Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,John Wiley&Sons,Inc.,New York,2000),Handbook of Experimental Immunology,第4版(D.M.Weir&C.C.Blackwell编辑,Blackwell Science Inc.,1987);和Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M.Miller&M.P.Calos编辑,1987)。其它有用参考包括Harrison的Principles of Internal Medicine (McGraw Hill;J.Isseleacher等编辑)和Addiction Research Methods, (Miller等编辑,2010;Wiley-Blackwell,United Kingdom)。

[0037] 定义

[0038] 如本文所使用,“奖赏相关行为”是加强行为的过程-在执行行为后立即或不久之后通过刺激物的递送或出现以时常愉悦的反应形式增加特殊行为的速率、可能性或强度的事情。奖赏相关行为可包括但不限于获取食物、性行为、赌博行为和/或药物相关的成瘾行为。

[0039] “药物相关的成瘾行为”是由强迫性物质使用产生的行为并且特征在于,对所述物质的明显依赖性。成瘾相关行为的症状是(i)与药物使用的压倒性牵连,(ii)其供给稳固,和(iii)停止服药后复发的可能性高。

[0040] 如本文所提到,术语“药物”或“麻醉剂”旨在包括类鸦片(例如鸦片和海洛因)、去氧麻黄碱、可卡因(苯甲酰甲基爱冈宁)、克他命(ketamine)、MDMA (3,4-亚甲二氧基去氧麻黄碱;也称为“摇头丸(Ecstasy)”)、麦角酸二乙酰胺(LSD)或大麻素(cannabinoid)。另外,麻醉剂旨在包括酒精、烟碱或任何其它管制物质。

[0041] “个体”是包括人类在内的哺乳动物。哺乳动物包括但不限于家畜、运动动物、宠物、灵长类动物、小鼠和大鼠。个体还包括伴侣动物,包括但不限于狗和猫。在一些方面,个体为非人类动物,例如哺乳动物。另一方面,个体为人类。

[0042] 如本文所使用,药物、化合物或药物组合物的“有效剂量”或“有效量”是足以实现有益或预期结果的量。对于预防性使用,有益或预期结果包括例如以下的结果:消除或降低风险,减轻严重程度,或延迟所述疾病的发作,包括所述疾病的生物化学、组织学和/或行为科学症状,其并发症和所述疾病发展期间呈现的中间病理表型。对于治疗性使用,有益或预期结果包括临床结果,例如减少由所述疾病产生的一种或多种症状,提高患有所述疾病的人的生活质量,降低治疗所述疾病所需的其它药剂的剂量,例如经由靶向增强另一种药剂的作用,延迟所述疾病的进展,和/或延长生存期。为了本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效剂量是足以直接或间接实现预防或治疗处理的量。正如临床环境下理解的一样,药物、化合物或药物组合物的有效剂量可能或可能不连同另一种药物、化合物或药物组合物一起达到。因此,在施用一种或多种治疗剂的情况下可考虑“有效剂量”,并且如果连同一种或多种其它试剂,可能或实现所需结果,可考虑给予有效量的单一试剂。

[0043] 如本文所使用,“治疗”是获得有益或预期结果,包括优选临床结果的方法。为了本发明的目的,有益或预期结果包括但不限于以下的一种或多种:减少由所述疾病产生的症状,提高患有所述疾病的人的生活质量,减少治疗所述疾病所需的其它药剂的剂量,延迟所述疾病的发展,和/或延长个体的生存期。

[0044] 如本文所使用,除非另外指出,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数个指示物。

[0045] 该说明书各处给出的每个最大数值限制旨在包括每个较低数值限制,好像本文确切地写出此类较低数值限制一样。该说明书各处给出的每个最小数值限制将包括每个较高数值限制,好像本文确切地写出此类较高数值限制一样。该说明书各处给出的每个数值范围将包括属于此类更广泛的数值范围内的每个更窄的数值范围,好像本文确切地写出此类更窄的数值范围。

[0046] 伏隔核

[0047] 伏隔核 (NAc),也称为阿肯伯氏核 (accumbens nucleus) 或伏膈核 (nucleus accumbens septi),是形成腹侧纹状体主要部分的神经元的集合。认为NAc在奖赏、快乐、欢笑、成瘾、攻击、恐惧和安慰作用中起重要作用。伏隔核中发现的主要神经元细胞类型是中型多棘神经元 (MSN)。这些神经元产生的神经递质为 γ -氨基丁酸 (GABA),中枢神经系统的主要抑制神经递质之一。MSN也是伏隔核的主要透射或输出神经元。虽然伏隔核中95%的神经元为中型多棘GABA能透射神经元,但是还发现其它神经元类型,例如大无棘胆碱能中间神经元,其包含在大脑该区域中的~1%细胞。

[0048] 乙酰胆碱 (ACh) 是一类最后被称为神经递质的生化试剂的首先发现的成员。在中枢神经系统中,ACh对于各种身体机能很重要,例如感觉和运动处理、睡眠、伤害感受、心情、压力反应、注意力、觉醒、记忆、动机和奖赏。在NAc中还发现另一种神经递质,多巴胺 (DA) 并且其释放是介导刺激性药物的奖赏效应的关键事件 (Sofuoglu和Mooney, 2009, CNS Drugs, 20 (11):939-952)。胆碱能中间神经元在伏隔核中释放ACh。可通过根据受刺激的受体亚型可为激发性或抑制性的胆碱能药和多巴胺能药控制调节MSN的活性:D1多巴胺能药和

M1mAChR为激发性,而D2多巴胺能药和M4mAChR为抑制性(Calabresi等,Lancet Neurol., 2006,5(11):974-83)。胆碱能中间神经元接受来自腹侧被盖区(VTA)的多巴胺能输入和主要来自前额皮质、海马和杏仁核的谷氨酸能输入(Sofuoglu和Mooney,2009,CNS Drugs,20(11):939-952)。不受理论约束,据认为胆碱能中间神经元上这种DA和谷氨酸会聚可提供DA介导的将与谷氨酸介导的学习和情境信息相关联的奖赏机制(Berlana等,Neuroscience.2003;120(4):1149-56)。因此,据信胆碱能中间神经元调节将奖赏信号翻译为情境适当的行为。

[0049] 常滥用的药物和自然奖赏参与改变NAc中神经递质的细胞外浓度的相互作用(Di Chiara和Imperato,1988,PNAS,85(14):5274-8;Phaus,Curr Opin Neurobiol,1999,9(6):751-8)。而且,已经证实NAc的损害降低了各种刺激物和鸦片剂的奖赏效应(Kelsey等,Behav Neurosci.,1989103(6):1327-34)。尽管如此,包括将麻醉剂直接微量输注至NAc中的实验已经提供了其在奖赏相关行为奖赏状态中起作用最有力的证据。例如,啮齿动物成瘾模型将容易地将麻醉剂,例如安非他明(amphetamine)(多巴胺释放剂)、可卡因(多巴胺再摄取抑制剂)和诺米芬辛(nomifensine)(多巴胺再摄取抑制剂)直接自我施用至NAc中,从而证明多巴胺在NAc中起重要作用以调节基于奖赏和动机的行为(Carlezon和Thomas,Neuropharmacology,2009;56(增刊1):122-132)。

[0050] 然而,NAc细胞本身响应于神经递质(如多巴胺)的输入在介导这些复杂哺乳动物行为,特别是关于奖赏相关行为,例如物质滥用和依赖性(成瘾)的行为中所起的作用仍不清楚。神经递质多巴胺和乙酰胆碱在通过NAc引起奖赏相关行为中所起的特定作用也未知。奖赏是加强行为的过程-出现时,引起行为的强度增强的事情。奖赏是描述个体归于物品、行为动作或内部物理状态的积极价值的操作概念。自然奖赏包括物种生存所必需的奖赏,例如进食、交配和搏斗。NAc已经与这些类型中的许多奖赏相关行为相关联,与药物成瘾、性成瘾和赌博成瘾一样多种多样。

[0051] 光反应性视蛋白

[0052] 本文提供了使个体伏隔核和纹状体中的胆碱能神经元选择性超极化以破坏个体至少一种奖赏相关行为的基于光遗传学的组合物和方法。光遗传学指甚至在自由活动的哺乳动物和其它动物体内,用于控制活组织靶细胞中的特定事件的遗传和光学方法的组合,时间精度(毫秒-时间尺度)需要与功能完整的生物系统保持同步。光遗传学需要将快速光反应性通道或泵蛋白引入靶神经元细胞的质膜,靶神经元细胞允许对神经元膜电位在时间上精确的操纵,同时通过使用特异性靶向机制维持细胞类型分辨率。

[0053] 可用于本发明的光反应性视蛋白包括通过光诱导神经元超极化的视蛋白和通过光诱导神经元去极化的视蛋白。以下表1和2中示出了视蛋白的实例。

[0054] 表1示出了整个可见光谱中鉴定的抑制细胞活性的视蛋白:

[0055]

视蛋白类型	生物学起源	波长敏感性	定义动作
<i>NpHR</i>	嗜盐碱单孢菌 (<i>Natronomonas pharaonis</i>)	589nm 最大值	抑制(超极化)
<i>BR</i>	盐生盐杆菌 (<i>Halobacterium helobium</i>)	570nm 最大值	抑制(超极化)
<i>AR</i>	伞藻(<i>Acetabularia acetabulum</i>)	518nm 最大值	抑制(超极化)
<i>GtR3</i>	蓝隐藻(<i>Guillardia theta</i>)	472nm 最大值	抑制(超极化)
<i>Mac</i>	十字花科小球腔菌 (<i>Leptosphaeria maculans</i>)	470-500nm 最大值	抑制(超极化)
<i>NpHr3.0</i>	嗜盐碱单孢菌	680nm 效用 589nm 最大值	抑制(超极化)
<i>NpHR3.1</i>	嗜盐碱单孢菌	680nm 效用 589nm 最大值	抑制(超极化)

[0056] 表2示出了可见光谱中鉴定的用于激发和调节的视蛋白:

[0057]

视蛋白类型	生物学起源	波长敏感性	定义动作
<i>VChR1</i>	团藻(<i>Volvox carteri</i>)	589nm 效用 535nm 最大值	激发(去极化)
<i>DChR</i>	杜氏盐藻(<i>Dunaliella salina</i>)	500nm 最大值	激发(去极化)
<i>ChR2</i>	莱茵衣藻 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	470nm 最大值 380-405nm 效用	激发(去极化)
<i>ChETA</i>	莱茵衣藻	470nm 最大值	激发(去极化)

[0058]

		380-405nm 效用	
<i>SFO</i>	莱茵衣藻	470nm 最大值 530nm 最大值	激发(去极化) 灭活
<i>SSFO</i>	莱茵衣藻	445nm 最大值 590nm; 390-400nm	阶跃活化(去极化) 灭活
<i>C1V1</i>	团藻和莱茵衣藻	542nm 最大值	激发(去极化)
<i>C1V1 E122</i>	团藻和莱茵衣藻	546nm 最大值	激发(去极化)
<i>C1V1 E162</i>	团藻和莱茵衣藻	542nm 最大值	激发(去极化)
<i>C1V1 E122/E162</i>	团藻和莱茵衣藻	546nm 最大值	激发(去极化)

[0059] 如本文所使用,光反应性视蛋白(例如NpHR、BR、AR、GtR3、Mac、ChR2、VChR1、DChR和ChETA)包括自然生成的蛋白质和功能变体、片段、包含片段或全长蛋白的融合蛋白。在一些实施方案中,可去除信号肽。变体可具有与自然生成的蛋白质序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。功能变体可具有与自然生成的蛋白质相同或相似的超极化功能或去极化功能。

[0060] 增强的细胞内转运氨基酸基序

[0061] 本公开提供了通过添加增强向哺乳动物细胞质膜的转运的一个或多个氨基酸序列基序对细胞中表达的光反应性视蛋白的修饰。哺乳动物细胞可能不表达或耐受具有源自进化上更简单的生物的组分的光反应性视蛋白或者当在哺乳动物细胞中高水平表达时可能表现出亚细胞定位受损。因此,在一些实施方案中,细胞中表达的光反应性视蛋白可与选自信号肽、内质网(ER)输出信号、膜运输信号和/或N-端高尔基输出信号的一个或多个氨基酸序列基序融合。增强光反应性视蛋白向哺乳动物细胞质膜的转运的所述一个或多个氨基酸序列基序可与光反应性视蛋白的N-端、C-端或N-端和C-端融合。任选地,光反应性视蛋白和所述一个或多个氨基酸序列基序可被连接子分开。在一些实施方案中,可通过添加增强所述蛋白质向细胞质膜的转运的运输信号(ts)修饰光反应性视蛋白。在一些实施方案中,运输信号可源自人内向整流钾通道Kir2.1的氨基酸序列。在其它实施方案中,运输信号可包含氨基酸序列KSRLTSEGEYIPLDQIDINV。

[0062] 美国专利申请No.12/041,628中描述了可增强光反应性视蛋白向细胞质膜的转运的另外的蛋白质基序,其通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,可除去所述蛋白质中的信号肽序列或用来自不同蛋白质的信号肽序列取代。

[0063] 光反应性氯泵

[0064] 在本文提供的方法的一些方面,光反应性氯泵的氯视紫红质蛋白家族的一个或多个成员在伏隔核或纹状体的胆碱能中间神经元质膜上表达。

[0065] 在一些方面,在伏隔核或纹状体的胆碱能中间神经元的神经细胞质膜上表达的所述一种或多种光反应性氯泵蛋白可源自盐碱单孢菌。在一些实施方案中,当用琥珀色或红光照射光反应性氯泵蛋白时,光反应性氯泵蛋白可对琥珀色光以及红光反应并且可介导中间神经元中的超极化电流。可活化光反应性氯泵的光的波长可介于约580与630nm之间。在一些实施方案中,所述光可为约590nm波长或所述光的波长可大于约630nm(例如,小于约740nm)。在另一实施方案中,所述光的波长为约630nm。在一些实施方案中,当暴露于连续光脉冲时,光反应性氯泵蛋白可使神经膜超极化至少约90min。在一些实施方案中,光反应性氯泵蛋白可包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。另外,光反应性氯泵蛋白可包含引入天然氨基酸序列中的取代、缺失和/或插入以增强或降低对光的敏感性,增强或降低对特定波长的光的敏感性,和/或增强或降低光反应性蛋白调节细胞质膜的极化状态的能力。在一些实施方案中,光反应性氯泵蛋白含有一个或多个保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,光反应性蛋白含有一个或多个保守性氨基酸取代。包含引入天然氨基酸序列中的取代、缺失和/或插入的光反应性蛋白适当地保持了响应于光使神经元细胞质膜超极化的能力。

[0066] 另外,在其它方面中,光反应性氯泵蛋白可包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核心氨基酸序列和内质网(ER)

输出信号。这种ER输出信号可与核心氨基酸序列的C-端融合或可与核心氨基酸序列的N-端融合。在一些实施方案中,ER输出信号通过连接子与核心氨基酸序列连接。连接子可包括长度为约5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400或500个氨基酸的任一种。连接子可进一步包含荧光蛋白,例如但不限于黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、绿色荧光蛋白或青色荧光蛋白。在一些实施方案中,ER输出信号可包含氨基酸序列FXYENE,其中X可为任何氨基酸。在另一实施方案中,ER输出信号可包含氨基酸序列VXXSL,其中X可为任何氨基酸。在一些实施方案中,ER输出信号可包含氨基酸序列FCYENEV。

[0067] 在其它方面中,本文提供的光反应性氯泵蛋白可包括在细胞膜上表达的光反应性蛋白,其中所述蛋白包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核心氨基酸序列和运输信号(例如,可增强光反应性氯泵蛋白向质膜的转运的运输信号)。运输信号可与核心氨基酸序列的C-端融合或可与核心氨基酸序列的N-端融合。在一些实施方案中,运输信号可通过连接子与核心氨基酸序列连接,所述连接子可包括长度为约5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400或500个氨基酸的任一种。连接子可进一步包含荧光蛋白,例如但不限于黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、绿色荧光蛋白或青色荧光蛋白。在一些实施方案中,运输信号可源自人内向整流钾通道Kir2.1的氨基酸序列。在其它实施方案中,运输信号可包含氨基酸序列KSRLTSEGEYIPLDQIDINV。

[0068] 在一些方面,光反应性氯泵蛋白可包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核心氨基酸序列和至少一个(例如1、2、3个或更多个)选自ER输出信号、信号肽和膜运输信号的增强向哺乳动物细胞质膜的转运的氨基酸序列基序。在一些实施方案中,光反应性氯泵蛋白包含N-端信号肽、C-端ER输出信号和C-端运输信号。在一些实施方案中,C-端ER输出信号和C-端运输信号可通过连接子连接。连接子可包括长度为约5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400或500个氨基酸的任一种。连接子也可进一步包含荧光蛋白,例如但不限于黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、绿色荧光蛋白或青色荧光蛋白。在一些实施方案中,ER输出信号可比运输信号更靠近C-端。在其它实施方案中,运输信号可比ER输出信号更靠近C-端。在一些实施方案中,信号肽包含氨基酸序列MTETLPPVTESAVLQAE。在另一实施方案中,光反应性氯泵蛋白包含与SEQ ID NO:2至少95%相同的氨基酸序列。

[0069] 而且,在其它方面中,光反应性氯泵蛋白可包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核心氨基酸序列,其中SEQ ID NO:1的N-端信号肽缺失或经取代。在一些实施方案中,可使用其它信号肽(例如来自其它视蛋白的信号肽)。光反应性蛋白可进一步包含本文所述的ER转运信号和/或膜运输信号。在一些实施方案中,光反应性氯泵蛋白包含与SEQ ID NO:3至少95%相同的氨基酸序列。

[0070] 本文还提供了编码本文所述任一种光反应性氯离子泵蛋白,例如包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核心氨基酸序列、ER输出信号和膜运输信号的光反应性蛋白的多核苷酸。在另一实施方案中,多核苷酸包含编码与SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3至少95%相同的氨基酸的序列。多核苷酸可能在表达载体(例如但不限于本文所述的病毒载体)中。多核苷酸可用于在NAc或纹状体的胆碱能神经元中表达光反应性氯离子泵蛋白。

[0071] 在一些实施方案中,光反应性视蛋白是包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同的氨基酸序列的NpHR视蛋白。在一些实施方案中,NpHR视蛋白进一步包含内质网(ER)输出信号和/或膜运输信号。例如,NpHR视蛋白包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%相同的氨基酸序列和内质网(ER)输出信号。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%相同的氨基酸序列通过连接子与ER输出信号连接。在一些实施方案中,ER输出信号包含氨基酸序列FXYENE,其中X可为任何氨基酸。在另一实施方案中,ER输出信号可包含氨基酸序列VXXSL,其中X可为任何氨基酸。在一些实施方案中,ER输出信号可包含氨基酸序列FCYENEV。在一些实施方案中,NpHR视蛋白包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%相同的氨基酸序列、ER输出信号和膜运输信号。在其它实施方案中,NpHR视蛋白包含从N-端至C-端,与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%相同的氨基酸序列、ER输出信号和膜运输信号。在其它实施方案中,NpHR视蛋白包含从N-端至C-端,与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%相同的氨基酸序列、膜运输信号和ER输出信号。在一些实施方案中,膜运输信号源自人内向整流钾通道K_{ir}2.1的氨基酸序列。在一些实施方案中,膜运输信号包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV。在一些实施方案中,膜运输信号通过连接子与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%相同的氨基酸序列连接。在一些实施方案中,膜运输信号通过连接子与ER输出信号连接。连接子可包括长度为约5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400或500个氨基酸的任一种。连接子可进一步包含荧光蛋白,例如但不限于黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、绿色荧光蛋白或青色荧光蛋白。在一些实施方案中,光反应性视蛋白进一步包含N-端信号肽。在一些实施方案中,光反应性视蛋白包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在一些实施方案中,光反应性视蛋白包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0072] 在美国专利申请公布No:2009/0093403和2010/0145418以及国际专利申请No:PCT/US2011/028893中可找到涉及光反应性氯泵蛋白

[0073] 的更多公开内容,其各自的公开内容据此通过引用整体并入。

[0074] 光反应性质子泵

[0075] 在本文提供的组合物和方法的一些方面,在伏隔核或纹状体的胆碱能中间神经元的质膜上表达一种或多种光反应性质子泵。

[0076] 在一些实施方案中,光反应性质子泵蛋白可对蓝光反应并且可源自蓝隐藻,其中当用蓝光照射细胞时,质子泵蛋白可能能够介导细胞内的超极化电流。光的波长可介于约450与约495nm之间或波长可为约490nm。在另一实施方案中,光反应性质子泵蛋白可包含与SEQ ID NO:4中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。光反应性质子泵蛋白可另外包含引入天然氨基酸序列中的取代、缺失和/或插入以增强或降低对光的敏感性,增强或降低对特定波长的光的敏感性,和/或增强或降低光反应性质子泵蛋白调节细胞质膜的极化状态的能力。另外,光反应性质子泵蛋白可含有一个或多个保守性氨基酸取代和/或一个或多个非保守性氨基酸取代。包含引入天然氨基酸序列中的取代、缺失和/或插入的光反应性质子泵蛋白适当地保持了响应于光使神经元细胞质膜超极化的能力。

[0077] 在本文公开的方法的其它方面,光反应性质子泵蛋白可包含与SEQ ID NO:4中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核心氨基酸序列

和至少一个(例如1、2、3个或更多个)选自信号肽、ER输出信号和膜运输信号的增强向哺乳动物细胞质膜的转运的氨基酸序列基序。在一些实施方案中,光反应性质子泵蛋白包含N-端信号肽和C-端ER输出信号。在一些实施方案中,光反应性质子泵蛋白包含N-端信号肽和C-端运输信号。在一些实施方案中,光反应性质子泵蛋白包含N-端信号肽、C-端ER输出信号和C-端运输信号。在一些实施方案中,光反应性质子泵蛋白包含C-端ER输出信号和C-端运输信号。在一些实施方案中,C-端ER输出信号和C-端运输信号可通过连接子连接。连接子可包括长度约为5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400或500个氨基酸的任一种。连接子也可进一步包含荧光蛋白,例如但不限于黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、绿色荧光蛋白或青色荧光蛋白。在一些实施方案中,ER输出信号可比运输信号更靠近C-端。在其它实施方案中,运输信号可比ER输出信号更靠近C-端。

[0078] 本文还提供了编码本文所述任一种光反应性质子泵蛋白,例如包含与SEQ ID NO: 4中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核心氨基酸序列的光反应性质子泵蛋白的多核苷酸。本文还提供了表达载体(例如但不限于本文所述的病毒载体),其包含编码本文所述蛋白,例如包含与SEQ ID NO: 4中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核心氨基酸序列的光反应性质子泵蛋白的多核苷酸。多核苷酸可用于在神经细胞(例如NAc或纹状体的胆碱能中间神经元)中表达光反应性视蛋白。

[0079] 在国际专利申请No. PCT/US2011/028893中可找到涉及光反应性质子泵蛋白的更多公开内容,其公开内容据此通过引用整体并入。

[0080] 光反应性通道蛋白

[0081] 在本文提供的方法的一些方面,在伏隔核或纹状体的胆碱能中间神经元的质膜上表达视紫红质通道蛋白家族的光反应性离子通道的一个或多个成员。

[0082] 在一些方面,光反应性阳离子通道蛋白可源自莱茵衣藻,其中当用光照射细胞时,阳离子通道蛋白可能能够介导细胞内的超极化电流。在另一实施方案中,光反应性阳离子通道蛋白可包含与SEQ ID NO: 5中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。用于活化源自莱茵衣藻的光反应性阳离子通道蛋白的光的波长可介于约460nm与约495nm之间或波长可为约470nm。另外,光的强度可为至少约100Hz。在一些实施方案中,用强度为100Hz的光活化源自莱茵衣藻的光反应性阳离子通道可引起去极化诱导的对表达光反应性阳离子通道的神经元的突触损耗。光反应性阳离子通道蛋白可另外包含引入天然氨基酸序列中的取代、缺失和/或插入以增强或降低对光的敏感性,增强或降低对特定波长的光的敏感性,和/或增强或降低光反应性阳离子通道蛋白调节细胞质膜的极化状态的能力。另外,光反应性阳离子通道蛋白可含有一个或多个保守性氨基酸取代和/或一个或多个非保守性氨基酸取代。包含引入天然氨基酸序列中的取代、缺失和/或插入的光反应性阳离子通道蛋白适当地保持了响应于光使神经元细胞质膜超极化的能力。

[0083] 在其它实施方案中,光反应性阳离子通道蛋白可为在蛋白质的整个视网膜结合袋的关键位置可具有特异性氨基酸取代的阶跃函数视蛋白(SF0)或稳定阶跃函数视蛋白(SSF0)。在一些实施方案中,SF0蛋白可在SEQ ID NO: 5的氨基酸残基C128处有突变。在其它实施方案中,SF0蛋白在SEQ ID NO: 5中具有C128A突变。在其它实施方案中,SF0蛋白在SEQ

ID NO:5中具有C128S突变。在另一实施方案中,SFO蛋白在SEQ ID NO:5中具有C128T突变。在一些实施方案中,SFO蛋白可包含与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0084] 在其它实施方案中,光反应性阳离子通道蛋白可为源自团藻的VChR1蛋白和莱茵衣藻的ChR1蛋白的C1V1嵌合蛋白,其中所述蛋白包含至少第一和第二跨膜螺旋经ChR1的第一和第二跨膜螺旋置换的VChR1氨基酸序列;对光起反应;并且但用光照射细胞时能够介导细胞中的去极化电流。另外,在一些实施方案中,本发明可包括包含经取代或突变的氨基酸序列的多肽,其中突变多肽保持了前体C1V1嵌合多肽的特有光反应性质,但是在一些特定方面也可能具有改变的特性。例如,本文所述的突变光反应性C1V1嵌合蛋白可在动物细胞内或在动物细胞质膜上表现出更高的表达水平;当暴露于不同波长的光,尤其是红光时,表现出反应性改变;和/或特征的组合,从而嵌合C1V1多肽具有对于和其它光反应性阳离子通道的最低交叉活化而言脱敏低、失活快、紫光活化低,和/或在动物细胞中强烈表达的性质。在一些实施方案中,C1V1蛋白可包含与SEQ ID NO:8、9、10或11中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0085] 在美国专利申请公布No.2007/0054319和国际专利申请公布No.WO2009/131837和WO2007/024391中可找到涉及光反应性阳离子通道蛋白的更多公开内容。在国际专利申请公布No.WO2010/056970和美国临时专利申请No.61/410,704和61/511,905中可找到涉及SFO或SSFO蛋白的更多公开内容。在美国临时专利申请No.61/410,736、61/410,744和61/511,912中可找到涉及C1V1嵌合阳离子通道及其突变变体的更多公开内容。前述每个涉及特异性光反应性视蛋白的参考文献的公开内容据此通过引用整体并入。

[0086] 多核苷酸

[0087] 本公开还提供了包含编码本文所述光反应性视蛋白的核苷酸序列的多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸包含表达盒。在一些实施方案中,多核苷酸是包含上述核酸的载体。在一些实施方案中,编码本公开的光反应性视蛋白的核酸与启动子可操作地连接。启动子在本领域中众所周知。在胆碱能中间神经元中起作用的任何启动子可用于表达本公开的光反应性蛋白和/或其任何变体。有许多用于推动特定动物细胞中光反应性视蛋白或其变体表达的起始控制区或启动子并且为本领域技术人员所熟悉。实际上,可使用能够推动这些核酸的任何启动子。在一些实施方案中,用于推动光反应性蛋白表达的启动子可为能够推动转基因在胆碱能中间神经元中稳健表达的胆碱转乙酰酶(ChAT)启动子(见,例如,Gong等,J.Neurosci,27,9817-9823(2007))。

[0088] 本文还提供了包含编码本文所述光反应性视蛋白或其任何变体的核苷酸序列的载体。可根据本发明施用的载体还包括包含编码当从载体的多核苷酸转录时会导致光反应性蛋白在动物靶细胞质膜上积聚的RNA(例如,mRNA)的核苷酸序列的载体。可使用的载体包括但不限于慢病毒、HSV、腺病毒和腺相关病毒(AAV)载体。慢病毒包括但不限于HIV-1、HIV-2、SIV、FIV和EIAV。可用其它病毒,包括但不限于VSV、狂犬病、Mo-MLV、杆状病毒和埃博拉病毒(Ebola)的包膜蛋白假型化慢病毒。可使用本领域的标准方法制备此类载体。

[0089] 在一些实施方案中,载体为重组AAV载体。AAV载体是尺寸相对较小,可按稳定的定点方式整合至它们感染的细胞基因组中的DNA病毒。DNA病毒能够感染一系列的细胞,不会诱导对细胞生长、形态或分化的任何影响,并且它们似乎与人类病理学无牵连。已经克隆了

AAV基因组,进行了测序和表征。AAV基因组包括约4700个碱基并且每一端含有约145个碱基的反向末端重复 (ITR) 区,反向末端重复区作为病毒的复制起点。基因组的其余部分分为两个实现壳体化功能的必需区域:基因组的左手部分,含有与病毒复制和病毒基因表达有牵连的rep基因;和基因组的右手部分,含有编码病毒的衣壳蛋白的cap基因。

[0090] 可使用本领域的标准方法制备AAV载体。任何血清型的腺相关病毒均适合(见,例如,Blacklow,"Parvoviruses and Human Disease"的第165-174页,J.R.Pattison编辑(1988);Rose,Comprehensive Virology3:1,1974;P.Tattersall"The Evolution of Parvovirus Taxonomy"Parvoviruses中(JR Kerr,SF Cotmore.ME Bloom,RM Linden,CR Parrish编辑)第5-14页,Hudder Arnold,London,UK (2006);和DE Bowles,JE Rabinowitz,RJ Samulski"The Genus Dependovirus"(JR Kerr,SF Cotmore.ME Bloom,RM Linden,CR Parrish编辑)第15-23页,Hudder Arnold,London,UK (2006),其各自的公开内容据此通过引用整体并入)。例如,在美国专利No.6,566,118、6,989,264和6,995,006和标题为"Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors"的W0/1999/011764中可找到纯化载体的方法,其公开内容通过引用整体并入本文。例如,在PCT申请PCT/US2005/027091中描述了杂交载体的制备,其公开内容通过引用整体并入本文。已经描述了源自AAV的载体用于体外和体内转移基因的用途(见例如,国际专利申请公布No.:91/18088和W093/09239;美国专利No.:4,797,368、6,596,535和5,139,941;和欧洲专利No.:0488528,其全部据此通过引用整体并入本文)。这些出版物描述了其中除去了rep和/或cap基因并且用目标基因置换的各种AAV源构造,和这些构造用于体外(转移至培养细胞中)或体内(直接转移至生物体内)转移目标基因的用途。可通过将含有两侧为两个AAV反向末端重复 (ITR) 区的目标核苷酸序列的质粒和携带AAV壳体化基因(rep和cap基因)的质粒共转染至感染了人类辅助病毒(例如腺病毒)的细胞系中制备根据本发明所述的复制缺陷型重组AAV。然后通过标准技术纯化生成的AAV重组体。

[0091] 在一些实施方案中,将用于本发明方法中的载体壳体化至病毒颗粒(例如AAV病毒颗粒,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15和AAV16)中。因此,本发明包括包含本文所述任何载体的重组病毒颗粒(重组体,因为其含有重组多核苷酸)。生成此类颗粒的方法在本领域中已知并且在美国专利No.6,596,535中有描述,其公开内容据此通过引用整体并入。

[0092] 光反应性视蛋白的递送

[0093] 在一些方面,可使用针、导管或相关设备,使用本领域已知的神经外科技术,例如通过立体定向注射(见,例如,Stein等,J.Virol,73:34243429,1999;Davidson等,PNAS,97:3428-3432,2000;Davidson等,Nat.Genet.3:219-223,1993;和Alisky和Davidson, Hum.Gene Ther.11:2315-2329,2000,其各自的内容据此通过引用整体并入本文)或荧光透视法直接将编码本文公开的光反应性视蛋白的多核苷酸(例如,AAV载体)递送至伏隔核或纹状体的胆碱能中间神经元。

[0094] 在其它方面,可在转基因动物伏隔核或纹状体的胆碱能中间神经元中表达任何光反应性视蛋白。例如,可在胆碱转乙酰酶 (ChAT) 启动子的控制下使用Cre-重组酶采用转基因小鼠系。然后可将携带光反应性视蛋白基因的Cre-诱导型腺相关病毒 (AAV) 载体立体定向注射至NAc中。

[0095] 也可使用将光反应性视蛋白递送至胆碱能中间神经元的其它方法,例如但不限于用离子脂质或聚合物转染、电穿孔、光学转染、穿刺或通过基因枪。

[0096] 光源

[0097] 能够施加一定波长的光以活化在神经元中表达的光反应性蛋白的任何设备均可用于使神经元去极化和/或超极化。例如,可使用用于活化离子通道和/或离子泵以影响一个或多个神经元的膜电压的光传输设备。可配置光传输设备以向脑部的靶标区域提供光刺激。光传输设备可包括基底、与基底连接的一个插管导向装置和一个或多个通过插管导向装置与基底连接的光导管。基底可包括一个或多个光传输口,其定位为从光导管将光传输至靶向组织区域,例如伏隔核或纹状体。光导管可为光纤,其中所述光线的近端与光源连接,而远端与光传输口连通。光源可能能够提供连续光和/或脉冲光,并且可编程为按预定脉冲顺序提供光。光传输设备可具有可能需要的任何数量的光导管,例如1、2、3、4、5、10、15、20个等。光导管可各自携带相同或不同波长的光。传输的光的波长可能介于450nm与600nm之间,例如黄光或绿光或蓝光。光传输设备可具有可能需要的任何数量的光传输口,例如1、2、3、4、5、10、15、20个等。在一些变型中,可能有与光导管相同数量的光传输口,而在其它变型中,可能有不同数量的光导管和光传输口。例如,可能有单个光导管,将光输送至两个或更多个光传输口。可选地或另外,单个光导管可与单个光传输口连接。可配置插管导向装置以帮助固定光导管并且使其与光传输口对齐。在一些实施方案中,配置光传输设备以将光传输至伏隔核或纹状体以破坏个体的至少一种奖赏相关行为。光传输设备也可包括一个或多个可配置用于测量神经活性的测量电极。例如,当神经元对刺激响应时,测量电极可记录一个或多个神经元的膜上的膜电位(例如,动物电位)和/或电流变化。在一些变型中,测量电极可测量一个或多个神经元对光刺激的电反应。测量电极可为细胞外或细胞内电极。

[0098] 在其它方面,光传输设备可为不需要与外部电源物理连接的植入式光源。植入式光源可包括内体,所述内体具有至少一个为电源配置的发光装置。在一些实施方案中,电源可为为发光装置供电的内部电池。在另一实施方案中,植入式光源可包括用于从外部来源接收无线传输的电磁能为发光装置供电的外置天线。无线传输的电磁能可为无线电波、微波或可从外部来源传输为植入式光源的发光装置供电的任何其它电磁能。在一个实施方案中,通过使用半导体或本领域已知的其它工艺生产的集成电路控制发光装置。

[0099] 在一些方面,发光装置可为发光二极管(LED)。在一些实施方案中,LED可产生蓝光和/或绿光。在其它实施方案中,LED可产生琥珀色光、黄光和/或蓝光。在一些实施方案中,将几个微型LED嵌入植入式光源的内体中。在其它实施方案中,发光装置为固体激光二极管或能够发光的任何其它装置。发光装置可产生强度足以活化在光源附近的神经质膜上表达的光反应性蛋白的光。在一些实施方案中,由发光装置产生的到达NAc或纹状体的胆碱能中间神经元的光的强度为约0.05mW/mm²、0.1mW/mm²、0.2mW/mm²、0.3mW/mm²、0.4mW/mm²、0.5mW/mm²、约0.6mW/mm²、约0.7mW/mm²、约0.8mW/mm²、约0.9mW/mm²、约1.0mW/mm²、约1.1mW/mm²、约1.2mW/mm²、约1.3mW/mm²、约1.4mW/mm²、约1.5mW/mm²、约1.6mW/mm²、约1.7mW/mm²、约1.8mW/mm²、约1.9mW/mm²、约2.0mW/mm²、约2.1mW/mm²、约2.2mW/mm²、约2.3mW/mm²、约2.4mW/mm²、约2.5mW/mm²、约3mW/mm²、约3.5mW/mm²、约4mW/mm²、约4.5mW/mm²、约5mW/mm²、约5.5mW/mm²、约6mW/mm²、约7mW/mm²、约8mW/mm²、约9mW/mm²或约10mW/mm²中任一个,包括这些数字之间的值。

[0100] 在一些方面,可用外部控制器在外部激活发光装置。外部控制器可包括可安装在发射线圈上的发电机。在外部控制器的一些实施方案中,电池可与发电机连接,以为其供电。开关可与发电机连接,允许个体手动激活或关闭发电机。在一些实施方案中,一旦激活开关,发电机就可通过外部控制器上的发射线圈和植入式光源的外置天线之间的电磁耦合为光源上的发光装置供电。发射线圈可与植入式光源的外置天线(在其附近时)建立电磁耦合,为发光装置供电并且将一个或多个控制信号发射给植入式光源。在一些实施方案中,外部控制器的发射线圈和植入式光源的外置天线之间的电磁耦合可为射频磁电感耦合。当使用射频磁电感耦合时,无线电波的操作频率可介于约1和20MHz之间,包括这些数字之间的任何值(例如,约1MHz、约2MHz、约3MHz、约4MHz、约5MHz、约6MHz、约7MHz、约8MHz、约9MHz、约10MHz、约11MHz、约12MHz、约13MHz、约14MHz、约15MHz、约16MHz、约17MHz、约18MHz、约19MHz或约20MHz)。然而,可使用其它耦合技术,例如光接收器、红外线或生物医学遥测系统(见,例如,Kiourti, "Biomedical Telemetry: Communication between Implanted Devices and the External World, Opticon1826, (8): Spring, 2010)。

[0101] 在国际专利申请No: PCT/US08/50628和PCT/US09/49936和Llewellyn等, 2010, Nat. Med., 16 (10): 161-165中可找到光刺激设备的实例,包括光源,其各自的公开内容据此整体并入本文。

[0102] 胆碱能中间神经元中表达的光反应性视蛋白

[0103] 本文提供了非人类动物,包含在所述动物的伏隔核或纹状体中的胆碱能中间神经元的细胞膜上表达的光反应性视蛋白,其中当用光照射所述中间神经元时所述蛋白质对光起反应并且能够改变中间神经元的膜极化状态,其中照射所述视蛋白破坏了所述动物的至少一种奖赏相关行为。在一些实施方案中,光反应性蛋白选自本文所述的NpHR、BR、AR和GtR3。例如,本文所述的任何NpHR蛋白可在靶神经元的细胞膜上表达。在一些实施方案中,奖赏相关行为是药物相关的成瘾行为。所述药物可为任何成瘾药物,例如但不限于类鸦片(例如,鸦片和海洛因)、去氧麻黄碱、可卡因、克他命、MDMA (3,4-亚甲二氧基去氧麻黄碱)、麦角酸二乙酰胺、大麻素、酒精、烟碱或任何其它管制物质。在一个实施方案中,所述药物为可卡因。在另一实施方案中,奖赏相关行为是可卡因成瘾。

[0104] 本文提供了包含所述伏隔核或所述纹状体的脑组织切片,其中光反应性蛋白在伏隔核的胆碱能中间神经元的细胞膜上表达,其中当用光照射所述中间神经元时所述蛋白质对光起反应并且能够改变中间神经元的膜极化状态,其中照射所述蛋白质破坏了至少一种奖赏相关行为。在一些实施方案中,脑组织切片是从本文所述非人类动物取得的培养组织切片。在一些实施方案中,光反应性蛋白能够使伏隔核的胆碱能中间神经元的膜超极化并且选自本文所述的NpHR、BR、AR和GtR3。例如,本文所述的任何NpHR蛋白可在靶神经元的细胞膜上表达。在其它实施方案中,光反应性蛋白能够使伏隔核的胆碱能中间神经元的膜去极化并且选自本文所述的ChR2、SF0、SSF0和C1V1。

[0105] 本发明的方法

[0106] 在一些方面,本文提供了破坏个体的奖赏相关行为的方法,包括:向所述个体施用编码光反应性视蛋白的多核苷酸,其中所述光反应性视蛋白在所述个体的伏隔核或纹状体中的胆碱能中间神经元的细胞膜上表达,并且当用光照射所述中间神经元时所述蛋白质对光起反应

[0107] 并且能够诱导所述中间神经元的膜超极化,从而用光活化所述蛋白质破坏个体的至少一种奖赏相关行为。在一些实施方案中,向个体的伏隔核或纹状体施用多核苷酸。在一些实施方案中,光反应性蛋白选自本文所述的NpHR、BR、AR和GtR3。例如,本文所述的任何NpHR蛋白可在靶神经元的细胞膜上表达。在一些实施方案中,奖赏相关行为是药物相关的成瘾行为。所述药物可为任何成瘾药物,例如但不限于类鸦片(例如,鸦片和海洛因)、去氧麻黄碱、可卡因、克他命、MDMA (3,4-亚甲二氧基去氧麻黄碱)、麦角酸二乙酰胺、大麻素、酒精、烟碱或任何其它管制物质。在一个实施方案中,所述药物为可卡因。在另一实施方案中,奖赏相关行为是可卡因成瘾。在一些实施方案中,所述个体为非人类动物。在一些实施方案中,所述个体为人类。在一些实施方案中,所述多核苷酸进一步包含与光反应性视蛋白可操作地连接的启动子(例如,ChAT启动子)。在一些实施方案中,所述多核苷酸为载体。

[0108] 测量对奖赏相关行为的破坏的方法在本领域中众所周知(见,例如,Addiction Research Methods, (Miller等编辑,2010;Wiley-Blackwell,United Kingdom))。例如,可通过使用条件性位置偏爱(CPP;也称为环境位置)条件化评估药物相关的成瘾行为的可卡因成瘾和破坏。CPP是动物研究中评价对已经与积极或消极奖赏相关联的环境刺激的偏爱的常用技术。所述技术常用于测定药物的成瘾潜力。过程牵涉几次试验,其中在含有各种暗示(例如,触觉、视觉和/或嗅觉)的不同环境中为动物呈现与放置匹配的积极刺激(例如,食物、神经递质或滥用药物的影响)。当稍后在正常状态下试验时,先前与积极刺激相关联的方法和在内脏内花费的时间的量作为偏爱的指示和对奖赏学习的测量。

[0109] 在其它方面,本文提供了一种治疗个体药物成瘾的方法,包括:向所述个体施用编码光反应性视蛋白的多核苷酸,其中所述光反应性视蛋白在所述个体的伏隔核或纹状体中的胆碱能中间神经元的细胞膜上表达,并且当用光照射所述中间神经元时所述蛋白质对光起反应并且能够使所述中间神经元超极化,从而用光活化所述蛋白质破坏所述个体的奖赏相关行为,其中所述个体不再需要服药。在一些实施方案中,向个体的伏隔核或纹状体施用多核苷酸。在一些实施方案中,光反应性蛋白选自本文所述的NpHR、BR、AR和GtR3。例如,本文所述的任何NpHR蛋白可在靶神经元的细胞膜上表达。在一些实施方案中,奖赏相关行为是药物相关的成瘾行为。所述药物可为任何成瘾药物,例如但不限于类鸦片(例如,鸦片和海洛因)、去氧麻黄碱、可卡因、克他命、MDMA (3,4-亚甲二氧基去氧麻黄碱)、麦角酸二乙酰胺、大麻素、酒精、烟碱或任何其它管制物质。在一个实施方案中,所述药物为可卡因。在另一实施方案中,奖赏相关行为是可卡因成瘾。在一些实施方案中,所述个体为非人类动物。在另一实施方案中,所述个体为人类。在一些实施方案中,所述个体不再经历使用药物积极加强体验。在一些实施方案中,所述多核苷酸进一步包含与光反应性视蛋白可操作地连接的启动子(例如,ChAT启动子)。在一些实施方案中,所述多核苷酸为载体。

[0110] 示例性实施方案

[0111] 据信本公开对控制或表征活动物的加强行为有用。本发明的特定应用利于评估活动物的成瘾和其它加强行为。因为本文公开的示例性实施方案的许多方面涉及并且明显建立于该领域的先前研发,以下讨论总结了此类先前研发以提供对从中得到执行细节和修改的根本和基础教学的可靠理解。关于这一点,提供了以下讨论并且参考中的教学通过引用并入本文。虽然本发明不一定限于此类应用,但是可使用该上下文,通过对各实例的讨论了解本发明的各个方面。

[0112] 图10描绘了控制伏隔核 (NAc) 或背侧纹状体的系统,与本公开的实施方案一致。刺激源102与目标位置106连接104。该目标位置可位于NAc或背侧纹状体上或附近,例如描述的位置通常与NAc对齐,但是不一定限于此。

[0113] 与本公开的实施方案一致,刺激源102可包括光源。所述光源可与目标位置106 (例如,使用光线) 光学连接。将目标位置106配置为包括对光刺激反应的细胞。这些细胞可包括表达光反应性视蛋白的细胞,包括但不限于离子泵 (例如,NpHR和NpHR变体) 和/或离子通道 (例如,ChR2/ChR1和ChR2/ChR1变体)。

[0114] 与本公开的实施方案一致,刺激源102可包括药物/药理学递送设备。所述递送设备与目标位置 (例如,使用递送腔) 连接。

[0115] 本公开的某些实施方案涉及使用刺激源靶向与自然奖赏相关行为和/或奖赏学习有牵连的结构 (例如,NAc或背侧纹状体) 的胆碱能神经元。刺激源102提供了控制所述结构内乙酰胆碱的释放的刺激。在某些实施方案中,以对于破坏物质滥用的成瘾性质特别有用,而不会显著影响其它行为,例如食欲或厌恶反应的加强的局部时空方式实现这种控制。可由许多不同刺激源提供刺激。非限制性实例包括活化在胆碱能神经元中表达的光反应性视蛋白,通过位于胆碱能神经元附近的一个或多个电极施加电脉冲,在靠近胆碱能神经元的位置释放药物,向靠近胆碱能神经元的位置施加磁场和/或基于这种理解的外科替代方案。

[0116] 图11描绘了控制乙酰胆碱释放的流程图,与本公开的实施方案一致。基于奖赏的事件202提供了评估或控制奖赏相关行为和/或奖赏学习的基础。虽然不限于此,但是基于奖赏的事件202可为向患者引入成瘾物质。控制指令204确定刺激源206如何根据可由时间属性、空间位置和/或细胞类型中的一项或多项限定的靶标施加刺激208。刺激208导致乙酰胆碱210的释放变化。然后可监测212刺激的影响。监测可用于调节控制指令,从而对预期结果细微调节刺激。本文讨论的各个实施方案进一步提供了可连同此类工艺 (或除此类工艺外) 使用的实例。

[0117] 本公开的实施方案涉及对物质成瘾性质的评估。对特别靶向的神经结构中 (或源自其中) 的胆碱能神经元的活性的控制和/或监测可用于预测物质的成瘾特性。例如,可使伏隔核的胆碱能神经元暴露于研究的物质。然后在暴露于所述物质后监测伏隔核的胆碱能神经元的活性。这种监测可包括但不限于乙酰胆碱的电活性 (例如,动作电位/放电) 和/或释放。

[0118] 与本公开的其它实施方案一致,可评估治疗对成瘾物质的作用。例如,可连同伏隔核的胆碱能神经元对所述物质的暴露使用潜在治疗。可连同所述治疗监测伏隔核的胆碱能神经元的活性以评估其有效性。

[0119] 根据本公开的实施方案,可通过激发动物伏隔核的胆碱能神经元,同时对所述动物教导条件反应,人工诱导动物的物质依赖性评估治疗对物质依赖性的作用。然后通过施加所述治疗,并且监测患者的条件反应评估治疗的作用。

[0120] 本公开的各方面涉及一种系统的实施方案,所述系统包括一组胆碱能神经元;向所述胆碱能神经元组提供药物的药物递送设备;和评估所述胆碱能神经元组响应于向所述胆碱能神经元组提供的药物的活性的监测设备。与某些实施方案一致,所述胆碱能神经元组包括光反应性视蛋白,并且所述系统进一步包括通过活化所述光反应性视蛋白激发所述胆碱能神经元的光传输系统。

[0121] 与本公开的各个实施方案一致,对神经回路的控制可包括抑制或激发,可各自包括协调放电和/或改变对外部电路输入的感受性。例如,可使用光反应性视蛋白,例如离子泵(例如,NpHR和NpHR变体)实现抑制。此类离子泵使神经元的膜电位远离其阈值电压以阻止或抑制动作电位。在另一例子中,可使用光反应性视蛋白,例如离子通道(例如,ChR2和ChR2变体)实现激发。此类离子通道可引起膜电位接近和/或超过阈值电压,从而激发或激励动作电位。与各个实施方案一致,光反应性视蛋白可用于(暂时)改变神经元的静息电位以增强或降低其对外部电路输入的感受性。这些不同选项可组合使用。

[0122] 本公开的各个实施方案涉及使对神经回路的时间控制与可测量指标相互关联的光遗传学系统或方法。例如,特殊记忆功能可能与神经障碍相关。光遗传学系统靶向患者体内的神经回路以对其选择性控制。光遗传学系统牵涉监测患者与神经障碍相关的指标(例如,症状)。以这种方式,光遗传学系统可提供关于神经回路、其功能和/或神经障碍的详细信息。

[0123] 本公开的实施方案涉及联合解决方案,其中对与奖赏相关行为和/或奖赏学习相关联的神经结构的控制联合对与奖赏相关行为相关联的记忆获取和回忆的破坏一起使用。例如,可研究可卡因成瘾和/或当神经结构暴露于可卡因时,通过抑制与奖赏相关行为和/或奖赏学习相关联的神经结构治疗可卡因成瘾。而且,在向患者引入可卡因时,可破坏与可卡因使用相关联的记忆获取。例如,也可响应于可卡因使用相关联的触发事件,破坏与可卡因使用相关联的记忆回忆。虽然可卡因作为实例呈现,但是此类解决方案的应用不限于此。下文更加详细地讨论了关于记忆破坏的实施方案和实验结果。

[0124] 本公开的实施方案涉及破坏记忆获取、回忆和/或记忆与情绪反应之间的关联,例如基于成瘾或基于恐惧的记忆。在一个特定实施方案中,通过在其中表达光反应性视蛋白靶向特定神经回路。通过活化表达的可抑制神经回路功能(例如,使用NpHR和NpHR变体)的视蛋白破坏神经回路功能。在其它实施方案中,通过在特定神经回路附近植入电极靶向特定神经回路。通过向电极施加电信号破坏神经回路的功能。在其它实施方案中,通过在特定神经回路附近植入递送快速作用药物的设备靶向特定神经回路。通过激活释放快速作用药物的设备破坏神经回路的功能,从而抑制神经回路的功能。

[0125] 在某些实施方案中,可在记忆产生期间实施这种破坏。在其它实施方案中,可在记忆回忆之前或期间实施这种破坏。这可能对牵涉记忆回忆的精神病或神经障碍,例如创伤后精神紧张性障碍(PTSD)特别有用。与某些实施方案一致,可响应于记忆触发事件或为了破坏而呈现和/或控制的其它外部刺激触发破坏。例如,可响应于向条件化为对触发反应的动物/患者引入对记忆的触发提供破坏。在另一例子中,患者可主动触发破坏。例如,当经历与PTSD相关联的记忆时,患者可触发破坏。本公开的其它实施方案涉及激励记忆获取、回忆和/或记忆与情绪反应之间的关联。例如,表达的视蛋白可用于增强神经回路对内在刺激的感受性(例如,使用本文讨论的稳定阶跃函数视蛋白(SSFO))。可提供激励以加强记忆的获取、形成或回忆。这可用于确定所述回路的作用或治疗与记忆损伤相关联的病症。已经发现背侧CA1海马回路的(暂时)破坏对防止情境恐惧记忆获取有效。与此一致,流行的神经网络理论表明,记忆巩固过程从海马与皮质之间连接的短期改变开始,这使得海马能够活化有助于完整记忆,而不是存储记忆本身的有关皮质部位。虽然重复共活化了这些皮质跟踪,但是它们之间的连接发生了逐渐长期的变化,直至最终这些连接足够牢固以支持无任何海马

参与的记忆。令人惊讶的是,已经发现,甚至在认为皮质重组已经发生后,破坏背侧CA1海马回路对阻断恐惧记忆回忆有效。

[0126] 以下讨论,包括对几个实验性实施方案的讨论,呈现了这些和其它实施方案的许多实例。然而,这些实例并非旨在限制。一个此类实施方案关于慢病毒载体的生成。这种慢病毒载体带有编码光可活化eNpHR3.1的基因,eNpHR3.1在对激发性谷氨酸能神经元有选择性的钙/钙调素依赖蛋白激酶IIa (CaMKIIa) 启动子的控制下与增强型黄色荧光蛋白(eNpHR3.1-EYFP)在框内融合。eNpHR3.1是eNpHR3.0缺失了固有N-端信号肽的截端形式,并且其在神经元中诱导的光电流和超极化方面与eNpHR3.0相似。CaMKIIa::eNpHR3.1的立体定向递送导致CA1特定表达,包括其整个背侧片段。在转染区内,94%的CaMKIIa细胞表达eNpHR3.1,并且启动子提供了完全特异性,即,所有eNpHR3.1-EYFP细胞也为CaMKIIa阳性(图1B)。麻醉小鼠的光极记录确认,连续绿(561nm)光照射激发CA1神经元以时间上精确且可逆的方式强烈抑制了尖峰化(降低73%),而不影响尖峰幅度。为证明光遗传学抑制也可按区域特异性方式阻断FC诱导的神经元活性,并且在训练期间经由插入靶向背侧CA1的双插管的两根光纤递送双侧连续绿光,并且为突触活化标记染色cFos。表达eNpHR3.1的小鼠展示特别是在CA1,而非FC中牵连的另外两个脑部区域,杏仁基底外侧核(BLA)和前扣带皮质(ACC)中的cFos表达减少。

[0127] 证实光遗传学抑制通过在训练期间在定制FC腔室内,向自由活动的小鼠施用双侧连续绿光调节认知功能。训练期间,将小鼠引入情境A,然后在连续双侧光递送下呈现两次语音,接着进行足底点击。然后在第二天,在无光时评估恐惧记忆。训练期间背侧CA1光遗传学抑制防止了情境恐惧获取。通过在未施用光的相同情况下再次训练小鼠,并且在第二天再次试验证实光遗传学抑制的作用可逆。当在训练期间未施用光时,表达eNpHR3.1的小鼠表现出完整的情境记忆。还证实背侧CA1光遗传学抑制干扰记忆回忆。再次试验相同小鼠,这一次在回忆期间进行光传输,并且发现前一天存在的记忆在照射下变得不能回忆。

[0128] 经证实,通过在不同情境下测试相同小鼠的音调记忆,恐惧获取和恐惧表达机制很可能不受影响。表达eNpHR3.1的小鼠在训练期间的光抑制后展示出完整听觉暗示的恐惧记忆获取,以及试验期间经照射后的完整暗示的恐惧回忆。使用空间探测与情境恐惧获取之间的相关性,在训练期间于光刺激下测量条件化腔室的探测时间。在表达eNpHR3.1的小鼠及其对照之间未发现显著差异。据信,当用光施用测试小鼠的野外探测时,CA1光遗传学抑制没有抗焦虑作用。在表达eNpHR3.1的小鼠和对照小鼠之间未发现路径长度、速度或在场地中央花费的时间百分比的显著差异(作为焦虑的征兆)。

[0129] 为测试当eNpHR在不同脑结构中表达时,光遗传学抑制是否可导致不同行为表型,为小鼠双侧注射带有CaMKIIa::eNpHR3.0-EYFP的腺相关病毒(AAV5)至BLA中。恐惧本身的获取,即厌恶刺激与任何中性刺激,以及近期和遥远恐惧的表达之间的关联取决于杏仁核,并且光遗传学活化BLA足以诱导来自中性刺激的恐惧。经证实,光遗传学抑制BLA干扰情境和听觉暗示的FC获取。

[0130] 因此,本公开的实施方案涉及以细胞类型和区域特异性方式引入第三代eNpHR,并且使用CA1光遗传学抑制干扰获取和近期记忆回忆。

[0131] 本公开的实施方案还涉及使用此类方面改善目前对海马在遥远记忆回忆中的作用的理解。与本公开的实验性实施方案一致,训练一组小鼠,然后于4周后测试。经证实,回

忆期间CA1关闭似乎(完全)阻断了遥远恐惧记忆。还证实这种对回忆的干扰可逆,因为当在第二天无照射下再次测试小鼠时,它们似乎与对照类似地表达恐惧。表达eNpHr3.1的小鼠在暗示试验期间经照射展示出听觉暗示的完整遥远恐惧记忆回忆,表明它们的恐惧表达机制保持完整。令人惊讶的是,这表明海马参与遥远恐惧记忆。

[0132] 本公开的实施方案还涉及CA1抑制(光遗传学或其它)通过在重复回忆和重新巩固后防止实时回忆长期记忆可逆性影响遥远恐惧回忆的能力。通过训练另一组小鼠,然后于5周后对其进行测试以检验记忆痕迹的持续(训练和测试中均无光)获得实验结果。在两个组中发现类似表现。第二天,在照射下测试相同小鼠,并且eNpHR3.1组似乎不能回忆厌恶记忆。经证实这种作用可逆,因为在第二天,无光传输时测试,表达eNpHR3.1的小鼠展示出完整的情境记忆。而且,在小鼠已经回忆厌恶情境并表现出恐惧后,一从检查试验中间及以后再次传输光时,恐惧反应就迅速停止。

[0133] 从而本公开的实施方案涉及甚至在已经恢复记忆后,对遥远恐惧记忆的实时可逆干扰。这可对治疗性处理特别有用,例如,其中(例如)在PTSD患者中出现时,可终止令人不安的记忆,而不会永久性影响储存在相同脑部结构中的其它记忆。

[0134] 海马明显直接参与评估遥远记忆,表明完整海马仍然是记忆痕迹的默认活化因子的惊人发现。进行实验性试验以测定抑制的时间性质和/或的分辨率的影响。仅在试验持续过程中(如以前)经精确照射,或延长光暴露重复遥远记忆实验,其中在测试之前施用光30min,然后在整个试验中连续施用。精确光遗传学抑制显著抑制遥远记忆恢复,而延长抑制对遥远记忆恢复无显著影响。当在第二天,在精确光施用(仅在试验期间)下再次测试延长组小鼠时,它们显示出恐惧回忆受抑制。据信缺乏延长光施用的作用可归因于随时间推移受eNpHR3.1的抑制减少或由于延长光暴露细胞健康降低,因为由相同小鼠制备的切片中的eNpHR3.1阳性细胞上的全细胞膜片记录显示,在30min期间eNpHR抑制尖峰化的能力保持相同并且可逆。该数据表明,尽管完整海马是遥远记忆痕迹的默认活化因子,但是记忆痕迹并不储存在海马中,因为当给予足够时间补偿其灭活时,其它脑部结构仍可恢复记忆痕迹。

[0135] 本公开的实施方案涉及通过抑制前扣带皮质(ACC)抑制遥远记忆。通过用CaMKIIa::eNpHR3.0-EYFP病毒靶向ACC,并且在训练ACC的1天和1个月之后测试光遗传学抑制的作用进行实验。ACC光遗传学抑制对近期记忆无明显影响,但是显著损伤了遥远记忆。总之,这些发现表明,甚至在皮质重组后,激活记忆痕迹最有效的途径仍然牵涉海马。

[0136] 据信海马对皮质提供了连续输入。因此,进行实验以确定遥远回忆破坏是否是从海马向皮质的输入突然减少的副作用,即使这种输入与回忆任务无关。用CaMKIIa::eNpHR3.0-EYFP病毒靶向另一主要皮质输入来源,嗅球(OB),并且在近期和遥远恐惧回忆期间测试了光遗传学抑制的作用。在任一时间点,OB光遗传学抑制对记忆回忆均无显著作用,表明向皮质的其它无关激发性输入的突然减少不足以干扰回忆。当恢复遥远记忆时,它们变得可用于重新巩固,这致使其易受破坏影响,但是这也可能增强痕迹。本公开的各方面涉及对PTSD患者的治疗,其中可在其出现时,通过在重新巩固之前和之后实时,或在其恢复后实时可逆性停止遥远恐惧记忆终止反复性令人不安的记忆。

[0137] 与本公开的另一实施方案一致,可抑制与滥用药物有关的记忆以减少觅药行为。其它实施方案涉及通过光遗传学调节不同脑部区域瞬时影响识别的能力以便研究记忆过程中特定神经元群体的作用并且使位于其下方的神经元回路的更好的时间、遗传和空间解

剖成为可能。

[0138] 本发明的特定方面涉及使用适合神经科学的微生物视蛋白基因转换记忆,使完整哺乳动物脑部中的特定细胞类型(例如,紫红质通道蛋白(ChR2)、团藻紫红质通道蛋白(VChR1)和氯视紫红质蛋白(NpHR))中的光脉冲序列转换为毫秒-时间尺度膜电位变化。ChR2是源自单细胞绿藻莱茵衣藻的视紫红质。如本文所使用的术语“视紫红质”是包含至少两个构件的蛋白质,视蛋白和共价结合的辅因子,通常为视网膜(视黄醛)。视紫红质ChR2源自衣藻(*Chlamydomonas*)基因组中的视蛋白通道视蛋白-2(Chop2),原名为衣原体视蛋白-4(Cop4)。一种去极化紫红质通道蛋白ChR2的时间特性包括活化和灭活的快速动力学,产生精确定时的动作电位序列。

[0139] 对于寻求长时间活化的应用,已经发现可减缓紫红质通道蛋白的正常快速关断动力学。例如,紫红质通道蛋白的某些实施方案在需要去极化的几乎整个时间施加1mW/mm²光,这可比预期的低。本文的许多讨论涉及ChR2。除非另外说明,本发明(30)包括许多类似变体。实例包括但不限于Chop2、ChR2-310、Chop2-310和团藻紫红质通道蛋白(VChR1)。关于VChR1的更多详情,可参考“Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*,”*Nat Neurosci.* 2008年6月,11(6):631-3. 2008年4月23日电子出版物,其全部通过引用并入本文。在其它实施方案中,可对其它视蛋白分子进行类似修饰。例如,可对ChR2或VChR1变体进行修饰/突变。而且,经修饰变体可与光活化的离子泵联合使用。

[0140] 本发明的实施方案包括自然生成的序列的相对较小的氨基酸变体。在一个例子中,变体与自然生成的序列的蛋白质序列的同源性大于约75%。在其它变体中,同源性大于约80%。还有其它变体的同源性大于约85%、大于90%或甚至高达约93%至约95%或约98%。关于这一点,同源性指序列相似性或同一性,优选同一性。可使用序列分析领域中已知的标准技术测定这种同源性。本发明实施方案的组合物包括本文提供的蛋白质和核酸序列,包括与提供的序列的同源性大于约50%,与提供的序列的同源性大于约55%,与提供的序列的同源性大于约60%,与提供的序列的同源性大于约65%,与提供的序列的同源性大于约70%,与提供的序列的同源性大于约75%,与提供的序列的同源性大于约80%,与提供的序列的同源性大于约85%,与提供的序列的同源性大于约90%,或与提供的序列的同源性大于约95%的变体。

[0141] 如本文所使用,对靶细胞的刺激通常用于描述对细胞性质的改变。例如,对靶细胞的刺激可导致细胞膜的性质变化,所述变化可导致靶细胞去极化或极化。在一个特殊例子中,靶细胞为神经元并且刺激通过促进或抑制神经元产生冲动(动作电位)影响冲动的传递。

[0142] 关于光反应性视蛋白的更多影响,可参考Deisseroth等的标题为“Optically-Based Stimulation of Target Cells and Modifications Thereto”的PCT公布No. W02010/056970,其全部通过引用并入本文。

[0143] 本公开的实施方案涉及靶向群体可激发性的双稳态变化的实现。这包括但不限于双突变ChR2-C128S/D156A。已经发现这种双突变ChR2-C128S/D156A在培养的海马神经元中耐受良好并且保护了用单个简短蓝光脉冲进行迅速阶跃活化和用绿光或黄光进行灭活的必需SF0性质。具体而言,ChR2-C128S/D156A的活化光谱的峰值为445nm。在390-400nm

下发现第二灭活峰值,与590nm灭活峰值相比,灭活更快但是不太完全。发现表达ChR2-C128S/D156A的细胞中的峰值光电流强健并且比得上ChR2-D156A的峰值光电流(分别为 231.08 ± 31.19 平均数标准误差;n=9个细胞和 320.96 ± 78.26 平均数标准误差;n=7个细胞)。

[0144] 接着用100ms的470nm光脉冲活化单独转染的和膜片钳制的神经元,并且为了确保在很长时间的记录中,电流衰减不可归因细胞衰弱,以不同间隔用延长的590nm光脉冲灭活每个细胞以测定每个时间点剩余SF0电流的大小。令人惊讶的是,表达ChR2-C128S/D156A的神经元产生比来自单独表达任一单个突变体的细胞的光电流更稳定的持续光电流。将单指数衰减曲线拟合为随时间推移I灭活/I活化的比例显示了ChR2-C128S/D156A的自发衰减时间常数为29.3min,表明C128和D156突变协同作用以延迟开放态的ChR2的衰减。

[0145] 与需要改进对复杂哺乳动物行为的预期应用一致,在单个光活化脉冲后双突变SF0电流的重要部分仍存在长达20min。基于这些惊人的缓慢衰减动力学,双突变基因称为SSF0(稳定阶跃函数视蛋白)基因。SSF0也用作活化蛋白的速记。两个残基很可能与ChR2通道闭合(门控)有牵连,并且两个突变很可能稳定通道的开放态构造。不受理论限制,本公开的各方面涉及发现光循环进展中SSF0可能完全阻断,并且因此可能经光循环工程表现出最大稳定性。例如,与ChR2-C128X和ChR2-D156A相反,SSF0光循环似乎不会接近另外的无活性的去质子化副产物,所述副产物很可能在该突变体中未达到的光循环后期分离光循环,依次使得SSF0用于体内重复使用比亲本单一突变更可靠。

[0146] 本公开的实施方案涉及SSF0对光的敏感性。例如,具有缓慢衰减常数的紫红质通道蛋白有效地用作光子集成器。这对光遗传学电路调制的更敏感的微创方法特别有用,通过调节光脉冲长度仍易于对靶神经元群体进行可滴定作用。已经发现,甚至在格外低的光强度下(低至 $8\text{pW}/\text{mm}^2$),也可从表达SSF0的神经元获得几百皮安的全细胞光电流,在整个照射期间,全细胞光电流响应于470nm光随单指数动力学增加。其它方面涉及在重对数图尺上与活化光功率呈线性相关的活化时间常数的用途,这表示了幂函数关系并且表明SSF0为纯集成器,随时间推移的总光子暴露作为光电流的唯一决定因素。例如,据信不管活化光功率如何,每个膜区域中光电流达到指定次最大活化(时间至T)所需的光子数量恒定。

[0147] 本公开的示例性实施方案涉及使用根本不含ChR2序列,源自不能很好地单独表达的两个视蛋白基因并且本文称为C1V1的杂交ChR1/VChR1嵌合体。本公开的实施方案还涉及通过添加源自Kir2.1通道的膜运输信号改善VChR1的膜靶向。来自培养的表达VChR1-EYFP的神经元的共聚焦图像显示与ChR2相比,很大比例的细胞内蛋白;因此,为改善VChR1的膜靶向,我们添加源自Kir2.1通道的膜运输信号。与VChR1-EYFP相比,这种VChR1-is-EYFP的膜靶向稍微增强。然而,由培养的表达VChR1ts-EYFP的海马神经元记录的平均电流仅仅稍微大于VChR1-EYFP。因此,本公开的实施方案涉及通过将螺旋交换为来自其它ChR的相应螺旋修饰的VChR1。例如,在两个嵌合体中已经发现稳健改善,其中用来自ChR1的同源片段置换螺旋1和2。发现无论剪切位点是在螺旋2和3之间的胞内环(在ChR1残基Ala145处)中还是在螺旋3(在ChR1残基Trp163处)中,所得嵌合体均稳健表达并且显示出类似增强的光电流和光谱性质。因为ChR1仅弱表达并且弱整合至多数哺乳动物宿主细胞的膜中,所以未预料到这个结果。本文将所得杂交ChR1/VChR1嵌合体称为C1V1。

[0148] 本公开的各方面涉及C1V1在培养的海马神经元中的表达。实验已经证实下文更加

详细地讨论的许多惊人而有用的结果。与VChR1-EYFP相比,C1V1-EYFP惊人地表现出更高的平均荧光。表达C1V1的神经元中的全细胞光电流比VChR1-EYFP和VChR1-ts-EYFP大得多,并且离子选择性与ChR2和VChR1类似。在C1V1和YFP之间添加Kir2.1运输信号进一步使光电流再增大41%(C1V1-tsEYFP平均光电流极大,几乎比野生型(WT)VChR1大10倍)。平均荧光水平与测量的光电流密切匹配(VChR1-EYFP、VChR1-ts-EYFP、C1V1-EYFP和C1V1-ts-EYFP的平均荧光分别为 9.3 ± 1 、 19.6 ± 3.4 、 19.8 ± 2.8 和 36.3 ± 3.8),表明电流大小增大主要是由这些通道在哺乳动物神经元中的表达增强产生。总体细胞荧光(根据集成像素密度测量)与不同构造上(VChR1、VChR1-ts-EYFP、C1V1、C1V1-ts-EYFP)单独记录/成像的细胞中的光电流大小呈线性相关。这表明(不受理论限制),C1V1的光电流增大由神经元中的功能表达变化产生。

[0149] 本公开的各个实施方案涉及具有快速衰减常数的视蛋白。这种性质可对尖峰化提供精确控制特别有用,例如以便最低限度地干扰固有导电率,触发每个光脉冲的单个尖峰和/或将光脉冲序列期间的平台期电位减到最小。实验结果表明,在C1V1-ts-EYFP中记录的光诱发的光电流衰减的时间常数与VChR1类似。因此本公开的各方面涉及发色团区域中提高光循环动力学,减少灭活和/或可能进一步红移吸收的修饰。

[0150] 一个实施方案涉及相应的ChETA突变E162T,实验表明提供了加速光循环(例如,将近3倍),(可参考Gunaydin等,Ultrafast optogenetic control,Nat Neurosci,2010,并且通过引用将其全部并入本文)。令人惊讶的是,经证实这种突变使作用光谱蓝移至530nm,而ChR2或其它微生物视紫红质中的类似突变引起红移。

[0151] 另一实施方案涉及谷氨酸-122突变为苏氨酸(C1V1-E122T)。实验证实,与ChR2的46%灭活相比,仅有26%C1V1-E122T灭活;另外,光谱进一步红移至546nm。

[0152] 本公开的另一实施方案涉及C1V1的双突变体,包括E122T和E162T突变。实验已经证实,电流灭活甚至低于E122T突变体并且光循环比E162T快。这表明,单独突变的多种有用性质一起保存在双突变体中。

[0153] 本公开的实施方案包括各种光反应性视蛋白在神经元中的表达。通过生成编码C1V1-ts-EYFP的慢病毒载体和本文讨论的各种点突变组合对神经元中的C1V1视蛋白基因进行实验。然后使视蛋白在培养的海马神经元中表达并且在相同刺激条件下记录全细胞光电流(2ms脉冲,542nm光, $5.5\text{mW}/\text{mm}^2$)。表达C1V1、C1V1-E162T和C1V1-E122T/E162T的细胞中的光电流均稳健并且倾向于比ChR2-H134R的光电流更大。实验还包括比较来自表达C1V1-E122T/E162T的细胞和来自表达ChR2H134R的细胞的集成体细胞YFP荧光和光电流。令人惊讶的是,C1V1-E122T/E162T细胞在同等荧光水平下显示出比ChR2H134R细胞更强的光电流。这表明,与ChR2-H134R相比,C1V1可具有更高的单位导电率。试验结果表明,C1V1-E122T的动力学比C1V1-E122T/E162T慢并且表达C1V1-E122T的细胞对红光(630nm)的反应比表达双突变体的细胞更强。这可对响应于红光产生光遗传学尖峰特别有用。

[0154] 与本公开的各个实施方案一致,引入各种视蛋白靶向留在相同微型回路中的抑制和/或激发神经元。用在培养的海马神经元中,在CaMKIIa启动子下单独表达的C1V1-E122T/E162T和ChR2-H134R进行实验。表达C1V1-E122T/E162T的细胞响应于2ms绿色光脉冲(560nm),而不是紫色光脉冲(405nm)尖峰化。相反,表达ChR2-H134R的细胞响应于2ms405nm光脉冲,而不是2ms561nm光脉冲尖峰化。

[0155] 本公开的各个实施方案涉及对活脑切片中两个神经元群体的独立活化。用PV::Cre小鼠的mPFC中的CaMKIIa-C1V1-E122T/E162Ts-eYFP和EF1a-DIO-ChR2-H134R-EYFP进行实验。在非表达性PYR细胞中,由于PV细胞直接活化,405nm光脉冲触发了稳健且快速的抑制突触后电流(IPSCs),而561nm光脉冲仅触发由局部抑制神经元推动的表达C1V1的锥体细胞产生的预期长潜时多突触IPSC。

[0156] 可一起和/或以其它方式实施以上描述的或图中所示的各个实施方案。根据特殊应用有用,图画/图形中描绘的一项或多项也可以更加分离或整合的方式实施,或在某些情况下不可操作时可去除和/或放弃。鉴于本文的描述,本领域的技术人员将认识到,在不背离本发明的精神和范围的前提下可对其做许多改变。

实施例

[0157] 采用神经递质乙酰胆碱的神经元分布广泛,但是相对罕见,细胞体和投射稀疏地分布与大部分哺乳动物脑部中。已知各种乙酰胆碱受体的药理学调节会影响许多大脑过程,但是由于对受体类型和靶细胞群的药物特异性的限制往往有副作用,以致不清楚胆碱能神经元在回路功能和行为中的最终因果作用。在典型案例中,伏隔核(NAc)的巨大胆碱能中间神经元是一组结构独特且稀疏分布的神经元,由于在实验中不能准确活化或灭活活组织或行为动物的这些细胞,其功能仍然难以捉摸。在此我们结合了几种光学控制技术设置自由活动的哺乳动物的行为,体内电生理学和切片生理学,以高细胞和时间精度通过直接激发或抑制有原因地探查这些神经元的功能。显著地,尽管代表很小部分(<1%)的局部神经元群体,但是我们发现NAc中的胆碱能神经元具有主要控制作用,在周围回路中施加对活性的有力、双向调节。此外,我们发现可用可卡因直接活化这些神经元,并且使自由活动的哺乳动物在可卡因暴露期间的这种药物诱导的活性沉默破坏了可卡因奖赏。重要的是,对胆碱能中间神经元的操纵本身不令人厌恶,表明这些独特细胞通过其对NAc回路的有力影响在特别实施的与滥用药物相关的享乐行为中起作用。

[0158] 乙酰胆碱是重要的且受广泛研究的神经递质,其对受体和靶细胞(1-8)的巨大多样性起作用。开拓性药理学和遗传学研究已经阐明了毒蕈碱和烟碱的乙酰胆碱受体单独亚型对许多生物学过程(9-15)的复杂且通常相反的影响,,尽管假设了这些神经元在学习、记忆、注意力和奖赏(16-22)中的作用,但是仍无研究解决CNS组织中胆碱能神经元本身的因果作用这一截然不同的问题。解决这个问题需要选择性和时间上精确地控制(活化和抑制)活哺乳动物组织中的胆碱能神经元的新范例,因为很可能是因为受特异性和时间分辨率的挑战,先前的调查导致结果矛盾。例如,一流的体内药理学方法(23-26)已经报道,奖赏学习需要NAc中(与自然奖赏相关行为和对药物,例如可卡因(27-33)的反应有牵连的结构)的胆碱能传递,但是对NAc中胆碱能中间神经元的分子消融的新型研究已经报道奖赏学习增强(34)。NAc中的胆碱能中间神经元特别有吸引力,因为它们构成少于1%的局部神经群(35),然而它们投射到整个NAc中并提供其唯一已知的胆碱能输入(36,37)。局部表达相关胆碱能受体,并且烟碱和毒蕈碱药理学激动剂可对中型多棘神经元(MSN,代表>95%的局部神经群并且构成NAc的输出)(38-41)施加复杂影响,但是与其它脑部区域一样,稀罕见的胆碱能中间神经元对NAc生理学或奖赏的任一方面的净效应(如果有)未知。

[0159] 实施例1:光反应性视蛋白在伏隔核的胆碱能中间神经元中的表达

[0160] 我们采用光遗传学方法(42-44)通过以高时间分辨率和高细胞类型特异性选择性推动或阻断这些细胞中的动作电位放电解决这个问题。为使微生物视蛋白基因在胆碱能中间神经元中特异性表达,我们采用在胆碱转乙酰酶(ChAT)启动子下表达Cre重组酶的转基因小鼠(45)。我们将携带与增强型黄色荧光蛋白(eYFP)的编码序列在框内融合的视蛋白基因的Cre诱导型腺相关病毒(AAV)载体立体定向注射至向NAc(图1A)中(46,47);视蛋白基因编码蓝光门控阳离子通道紫红质通道蛋白-2(ChR2)(48,49)或黄光门控第三代氯泵氯视紫红质蛋白(eNpHR3.0)(50)。

[0161] 材料和方法

[0162] 受试者

[0163] 从GENSAT(储存名称:Tg(Chat-cre)24Gsat/Mmcd)(Gong等,J.Neurosci27,9817-9823(2007))获得BAC转基因胆碱转乙酰酶(ChAT)::Cre小鼠并且与来自Charles River的C57BL6小鼠交配。实验小鼠为Cre(+/-)杂合或对照同窝小鼠(-/-)。小鼠分组群居,保持逆12h光/暗循环并且随意给予食物和水。实验方案经斯坦福大学IACUC批准满足美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)的实验动物护理和使用指南(guide for the Care and Use of Laboratory Animals)的指导方针。

[0164] 病毒生成

[0165] 如前所述(Tsai等,Science324,1080-1084(2009);Sohal等,Nature459,698-702(2009)),Cre诱导型重组AAV载体基于携带两对不相容的lox位点(loxP和lox2722)的DNA盒,在lox位点中从相反方向插入了视蛋白(ChR2(H134R)或eNpHR3.0)。将这种双floxed反向视蛋白盒克隆至携带EF-1 α 启动子和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)的pAAV2-MCS载体中以增强表达。Cre诱导型ChR2AAV构造以及eNpHR3.0转基因的完整图谱在www.stanford.edu/group/dlab/optogenetics/sequence_info.html上可用。在北卡罗来纳大学(University of North Carolina)把重组AAV载体按血清型分类为AAV5外壳蛋白并且用病毒载体核心包装。ChR2病毒的最终病毒浓度为 3×10^{12} 个颗粒/mL而eNpHR3.0病毒的最终病毒浓度为 1.5×10^{12} 个颗粒/mL。

[0166] 病毒立体定向注射、插管/跳线植入和光传输

[0167] 用克他命/甲苯噻嗪麻醉小鼠(每只小鼠60 μ l的80mg/ml克他命和12mg/ml甲苯噻嗪的混合物),然后置于立体定向头装置。对4-6周龄小鼠进行手术以进行生理学实验并且对8-12周龄小鼠进行手术以进行行为实验。涂眼用软膏以防眼干。进行中线头皮切开,接着进行颅骨切开术,然后用10 μ l注射器和34规金属针头注射病毒。用注射泵控制注射体积和流量(1 μ l,0.15 μ l/min)。每个NAc接受两次注射(第1次注射:AP1.15mm、ML.8mm、DV-4.8mm;第2次注射:AP1.15mm、ML.8mm、DV-4.2mm)。选择病毒注射和光纤位置,以致刺激几乎整个壳。假设小鼠的壳尺寸较小,不可能使病毒分布和光完全限于内侧壳,并且将核心的内侧部分包括在内(前连合内侧)。注射后,将针头再留在原处5min,然后非常缓慢的拔出。对于行为实验,从两侧为小鼠注射,然后将中心距离为1.5mm的两侧插管放置在注射部位上方(AP1.15mm,DV3.8mm)。为了操纵行为期间的神经元活性,从两侧通过两根300 μ m直径的光纤(0.37N.A.)传输光,光纤通过插管插入以使所述光纤伸出超过插管末端200-300 μ m。

[0168] 免疫组织化学

[0169] 为测定ChAT神经元中视蛋白表达的特异性,用beuthanasia麻醉小鼠,先经心脏灌

注PBS,然后经心脏灌注溶于磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH7.4)中的4%多聚甲醛(PFA)。摘除脑部并且在4℃下后固定于4%PFA中过夜,然后于30%于PBS中的蔗糖中平衡。在冷冻切片机(Leica)上制备40μm厚的冠状切片并且在4℃下储存于冷冻保护剂(于PBS中的25%甘油和30%乙二醇)中。于PBS中洗涤自由浮动切片,然后于0.3%Triton X-100(T×100)和3%常规驴血清(NDS)中培育30min。在4℃下用于3%NDS中的一次抗体(山羊抗ChAT1:200,Millipore)培育切片过夜。然后用PBS洗涤切片并且在室温下用二次抗体(与Cy3或Cy5偶联的驴抗山羊抗体,Jackson Laboratories)培育2h。然后洗涤切片,用DAPI(1:50,000)培育20min,再次洗涤,并用PVA-DABCO固定在载玻片上。在扫描激光显微镜上,使用5X或10X空气物镜或40X油浸物镜获得共聚焦荧光图像。

[0170] 结果

[0171] 我们验证了这种体内靶向方案的特异性和功能性,并且发现eYFP表达对表达ChAT的神经元有高度特异性;而且,绝大部分表达ChAT的神经元也表达eYFP(图1B、C)。对于此类稀少的神经群体观察到的特异性特别令人印象深刻,因为任何指定细胞为ChAT中间神经元并且因此甚至很少的靶向漏洞将使有效靶向特异性显著降低的验前概率非常低。两种视蛋白在ChAT神经元的表面膜上表达(图1D),并且靶向神经元以与背侧纹状体中胆碱能中间神经元先前建立的反应相对应的方式对电流注射反应(图1E)(51)。与背侧纹状体生理学更加一致,ChAT神经元(YFP+神经元)的静息电位和输入电阻高于MSN(鉴定为YFP-神经元;表S1;对于 V_M , $p<10^{-4}$ 并且对于 R_{input} 而言 $p=0.004$,双尾t检验)。最后,因为eNpHR3.0推动大量超极化(图1F;平均值±平均数标准误差: -83.8 ± 11.9 mV, $n=4$)而ChR2可靠推动高达20–30Hz的尖峰化(图1G、H),两种视蛋白在ChAT细胞中的功能性很强。

[0172] 表3:表达ChR2-eYFP的ChAT神经元和不表达荧光团的MSN的脑切片中的膜电压(V_M)和输入电阻(R_{INPUT})。ChAT神经元的 V_M 和 R_{INPUT} 高于MSN(对于 V_M 而言, $p=0.00003$;对于 R_{INPUT} 而言, $p=0.002$;双尾t检验;平均值±平均数标准误差)

[0173]

ChAT (ChR2-eYFP) (n=19)		MSN(n=13)	
V_M (mV)	R_{INPUT} (MΩ)	V_M (mV)	R_{INPUT} (MΩ)
-49.47 ± 1.07	382.02 ± 47.30	-65.43 ± 2.88	223.64 ± 31.92

[0174] 实施例2:胆碱转乙酰酶(ChAT)中间神经元的去极化作用

[0175] 认为ChAT中间神经元在体内有紧张性活性(3–10Hz(52,53)),但是它对稀少ChAT细胞中的这类缓慢活性如何(或即使)有原因地牵连于影响局部回路活性或行为保持神秘。我们利用光遗传学控制解决这个关于切片电生理学、体内电生理学和自由活动行为的组合的问题。

[0176] 材料和方法

[0177] 脑切片急性生理学

[0178] 由先前注射了病毒(切片前>2周)的成年小鼠,使用标准技术,严格按照斯坦福大学的动物饲养和使用委员会(Animal Care and Use Committee at Stanford University)批准的方法制备冠状大脑切片。用振动切片机,使用蓝宝石刀片,于含有135mM NMDG、1mM KCl、1.2mM KH_2PO_4 、20mM胆碱碳酸氢盐、10mM葡萄糖、1.5mM $MgCl_2$ 和0.5mM $CaCl_2$ 的冰冷N-甲基-D-葡萄糖胺(NMDG)基切削液中切割250μm厚的冠状切片。此后将切片保持在含

有119mM NaCl、2.5mM KCl、2.5mM CaCl₂、1.3mM MgCl₂、1mM NaH₂PO₄、26.2mM NaHCO₃和11mM 葡萄糖的人工脑脊液(ACSF)中。将切片保持在37℃、ACSF中30min,此后保持在室温下。对于所有实验而言,用95%O₂/5%CO₂使ACSF不断冒泡并且加热至34℃。在装备有DIC光学装置和滤波器的立式显微镜(Leica DM-LFSA)上可见神经元,以使用×40水浸物镜和电荷耦合装置(CCD)照相机可视化eYFP。使用含有120mM谷氨酸钾、20mM HEPES、10mM EGTA、1mM MgCl₂、2mM Na-ATP和0.2mM Na-GTP的电极溶液(pH7.3,290mOsm/L)由神经元产生全细胞记录;在记录IPSC的实验中,使用KCl代替葡萄糖酸钾。移液管电阻为3–5MΩ,并且进行记录,无需串联电阻补偿。已经修正了膜电位由液体接界电位产生的误差。电压钳实验的保持电压(VM)为–70mV。按指示添加下列试剂:5μM SR-95531;5μM 2,3-二羟基-6-硝基-7-胺基-苯并(F)喹喔啉(NBQX);5μM (R,S)-CPP;美加明(10μM);5μM可卡因盐酸盐。按几个标准仔细选择5μM的可卡因浓度。第一,与先前切片研究中的选择一致(Thompson等,Neuropharmacology49,185–194(2005))。第二,明显更高的浓度将导致局部麻醉效果(Thompson等,Neuropharmacology49,185–194(2005))。最后,根据对小鼠的可卡因药代动力学的研究,腹腔内注射10mg/kg将在15min后在脑部中产生4.7μM可卡因,并且腹腔内注射20mg/kg将产生9.4μM可卡因,比得上行为实验中所使用的水平(Shah等,Toxicology and Applied Pharmacology53,279–284(1980))。使用光学开关,连同300W氙气灯和470±20nm或580±20nm带通滤波器诱发光电流;样品上的光功率为11.52mW mm⁻²(470nm)或10.64mW mm⁻²(580nm)。在2kHz下过滤电流,在50kHz下数字化,并且使用pClamp10软件(Axon Instruments)记录到磁盘中。将数据表示为平均值±平均数标准误差,并且视情况而定,使用配对或非配对t检验测定统计显著性。对于MSN中的IPSC测量(图2B–E和图5A–B),在有光重复10次之前无光重复10次。每次重复长度为5s并且间隔5s休眠期。为测试切片中ChAT细胞的可卡因反应(图4A–C),从内侧壳的腹侧部分获得全细胞记录,其中如图4所总结,尖峰的上升可变,但是与对照条件中尖峰典型下降形成对比;探索性研究表明,壳的核心和其它地方的ChAT细胞对可卡因的反应较低。

[0179] 体外光极记录

[0180] 如先前所述进行同时光刺激和细胞外电记录(Gradinaru等,J.Neurosci27,14231–14238(2007))。光极由与光纤(300μm核心直径,0.37N.A.)粘合的钨电极(1MΩ; .005英寸;聚对二甲苯绝缘)组成,电极的尖端伸出光纤外300–500μm。使电极下降通过NAc,增量为约100μm,并且记录每个增量的光学反应。光纤与473nm或560nm激光耦合。对于两个波长而言,光纤尖端的功率密度为~140mW/mm²,与电极尖端的密度相对应,对于470nm光而言为~7–17mW/mm²而对于560nm光而言为~10–22mW/mm²。在数字化和记录至磁盘之前,放大信号并进行带通过滤(下限300Hz、上限10kHz)。在每个部位,呈现并保存5次刺激重复。每个刺激时期持续10–15s,每次重复起始时间之间的恢复期为80–90s,而对于每次重复将50s的数据记录至磁盘中。

[0181] 结果

[0182] 首先,如图1所指,在表达ChR2-eYFP的ChAT细胞的光遗传学光刺激期间于急性NAc切片(不表达ChR2-eYFP的细胞)中监测MSN中的突触后电流(图2A)。在这种背景下刺激ChAT神经元使得在MSN中记录的A型γ-氨基丁酸(GABA_A)受体介导的抑制性突触后电流(IPSC)的频率稳健增大(图2B和C)。诱发的抑制电流通常同步化到光脉冲,模态潜伏期为6ms(图

2D),与较小增强的异步IPSC耦合(图5A-C)。在所有记录细胞中,在MSN中观察到的IPSC平均频率在ChAT神经元的光刺激期间增大 $525.8 \pm 154.3\%$ ($n=7$; 平均值 $\pm$ 平均数标准误差, $P=0.01$, 配对t检验), 而平均IPSC幅度不受影响 ($P>0.05$, 配对t检验; $n=7$, 图2E)。烟碱拮抗剂美加明削弱了这种作用(图7, $n=5$, $P<0.05$, 配对t检验)。

[0183] 接着问题是,抑制电流频率的这些显著变化是否和如何转化为体内MSN尖峰的变化。我们记录了体内ChAT中间神经元的光遗传学活化期间NAc中细胞外光极的神经活性(图2F)。在未分离单一单元的部位,我们观察到跟踪10Hz而非100Hz的光刺激的神经群体放电(图5D),很可能表示电极附近的稀少,但经同步活化的ChAT细胞的群峰电位。与群峰电位相反,NAc中分离的单元对光遗传学光刺激展现出明显不同的反应。与在切片中观察到MSN中的IPSC频率增大一致,在刺激体内ChAT细胞(代表性细胞,图2G)期间我们观察到体内对本底放电的极大抑制。整个群体中,最显著调节的部位显示出本底放电的抑制,虽然很少以增强放电来回应(图2H和I),但是与ChAT神经元推动期间,MSN中的已知循环抑制和更大的MSN群体先前施加的抑制的相应释放一致。

[0184] 实施例3:胆碱转乙酰酶(ChAT)中间神经元的超极化作用

[0185] 其次,采用体内Cre依赖型eNpHR3.0表达探究了特异性抑制ChAT中间神经元的结果。

[0186] 材料和方法

[0187] 如以上准备好小鼠、光极记录和脑切片。

[0188] 结果

[0189] 与对ChAT神经元激发观察到的相反,通常很可能通过光遗传学抑制ChAT细胞增强MSN中NAc神经元的放电;图3A)中示出了代表性细胞。功率谱分析显示了体内记录中这些细胞中放电模式的引弧频率峰值为 $\sim 4\text{Hz}$ (图3B)。图3C中呈现了汇总数据;在显著调节部位群体中,通过光遗传学抑制ChAT神经元激发大多数神经元($n=17$)。我们能够从罕见的假定ChAT中间神经元获得单细胞记录,所述罕见假定ChAT中间神经元完全被eNpHR3.0关闭(图3D)并且表现出ChAT中间神经元的长动作电位持续特征(37)(对于该细胞而言为 2.0ms ,而我们的记录中MSN的尖峰持续时间范围为 $1.1\text{--}1.7\text{ms}$)。汇总数据(图3E)显示了对所有记录部位的激发和抑制的动力学,说明了主要激发模式(在受光激发的部位中放电增加 $130.5 \pm 17.5\%$)。总之,来自ChAT神经元的体内光遗传学激发和抑制的结果与我们从切片生理学的发现一致,表明这些罕见细胞在控制NAc中的局部回路活性中的惊人有力作用。

[0190] 实施例4:自由活动小鼠中胆碱能中间神经元操纵对奖赏行为的作用

[0191] 决定测试这种有效NAc控制机制是否与自由活动小鼠的伏隔依赖性奖赏行为有关。首先,测试急性施用的可卡因对急性NAc切片中这些经鉴定的ChAT神经元的活性的影响。接着,使用eNpHR3.0测试在动物学习将环境与可卡因联系起来的可卡因条件性位置偏爱(CPP)的奖赏相关行为中ChAT细胞的这种可卡因诱导的活性或基线活性中的因果作用。

[0192] 材料和方法

[0193] 条件性位置偏爱

[0194] 在动物的黑暗(活性)循环期间,在病毒注射4-6周后进行所有行为学实验。条件性位置偏爱(CPP)方法与来自无偏、平衡位置偏爱的先前报道的方法相似(Bardo等, *Neurosci Biobehav Rev* 19, 39-51 (1995))。CPP装置由以下组成:矩形腔室,其具有测量为 $23\text{cm} \times$

26cm,具有黑色墙和在地上的光栅的一个侧面腔室;中心腔室,其测量为23cm×11cm,具有干净树脂玻璃墙和树脂玻璃地板;和另一侧面腔室,其测量为23cm×26cm,具有白色墙壁和穿孔金属地板。使用视频跟踪系统监测每一天测试期间的小鼠位置。选择地板,以致小鼠未展现出对特殊腔室的平均基线偏爱,并且排除了对腔室有强烈初始偏爱的任何小鼠(第1天在侧面腔室内花费的时间差异大于5min)。CPP试验由以下组成。第1天,将每只小鼠置于中心腔室内并使其自由探索整个装置20min(验前)。第2天由条件化组成。上午,将每只小鼠限制在其中一个侧面腔室20min,并且在下午限制在另一侧面腔室相同时间。对于可卡因CPP实验,在置于一个腔室内之前受试者经腹腔接受可卡因注射(除非另外说明,为20mg/kg),而在置于另一腔室内之前受试者经腹腔接受相等体积的盐水注射。(在对照动物中,可卡因的这个浓度允许通过一天的训练进行稳健条件化,促进光遗传学干预)。小鼠探索与可卡因注射匹配的腔室的20min期间,小鼠接受黄光或蓝光,然而当探索另一腔室时小鼠与不发光的“假”光纤连接。选择蓝光强度(470nm)以在光纤尖端产生140–200mW/mm²的功率密度,这应与NAc中部~4–7mW/mm²的功率密度相对应。选择黄光强度(590nm),以致在光纤尖端的功率密度为70–140mW/mm²,这应与NAc中部~3.5–7mW/mm²的功率密度相对应。第3天,正如第1天,将小鼠置于中心腔室内并使其自由探索整个装置20min(验后)。同样进行不牵涉可卡因的CPP实验,除略去腹腔内注射可卡因或盐水外。

[0195] 户外

[0196] 在户外塑料场所(50cm长×50cm宽×40cm深)中进行户外试验。单独将小鼠置于腔室的中心并使其自由探索3min。使用自动化视频跟踪系统(Viewer II, Biobserve)测量场地中心和周围的活性。在中心的时间指小鼠在户外35×35cm中心区域中花费的时间。

[0197] 恐惧条件化

[0198] 恐惧条件化装置由具有与冲击发生器连接的格式地板的正方形条件化笼(18×18×30cm)和被隔音室包围的扰频器组成。修改腔室顶部以在训练期间通过为光纤引入开口使得光传输成为可能。在第二天所有小鼠在训练期间,而非不是在测试期间接受连续黄光(590nm;与CPP实验的功率密度相同)。为诱导恐惧条件化,将小鼠置于笼中120s;然后播放纯音(2.9KHz)20s,接着立即进行2s足底电击(0.5mA)。重复这个过程,并且在传输第二次电击30s后,将小鼠放回其饲养笼中。在条件化当天,在第一次之前量化冷冻(完全固定)30s以评估基线冷冻,以及在条件化当天在最后电击后立即量化30s以评估立即冷冻。在条件化后第二天评估情境和听觉暗示的恐惧条件化。为测试情境恐惧条件化,将小鼠置于原条件化笼中,并测量冷冻5min。为测试听觉暗示的恐惧条件化,将小鼠置于不同情境中:具有树脂玻璃地板的锥形笼。作为新型环境影响的对照,在这个新笼中测量冷冻2.5min,然后播放2.9KHz音调2.5min,期间测量了条件化冷冻。

[0199] 结果

[0200] 在腹内侧NAc ChAT细胞中,发现可卡因使自发放电明显增加(图4A和B中示出了代表性ChAT神经元)。汇总数据显示,在10min时在ChAT神经元中可卡因使放电率从 $0.60 \pm 0.41\text{Hz}$ 增加到 $1.74 \pm 0.56\text{Hz}$ ($n=7$; $P<0.005$, 配对t检验);而在仅接受了媒介物的对照组细胞中,在相同时间段内放电率从 $0.69 \pm 0.24\text{Hz}$ 降低到 $0.09 \pm 0.09\text{Hz}$ ($n=6$; $P<0.05$ 比较两个组, 配对t检验)(图4C)。

[0201] 接着我们使用eNpHR3.0测试在动物学习将环境与可卡因联系起来的条件性位置

偏爱 (CPP) 的奖赏相关行为中ChAT细胞的这种可卡因诱导的活性或基线活性中的因果作用。在可卡因暴露期间 (图4E) 注射病毒并在双侧植入插管 (图4D) 以使ChAT神经元沉默后, 我们发现, 在ChAT细胞中表达eNpHR3.0的小鼠表现出的可卡因诱导的条件化位置偏爱 (CPP) 显著低于接受了相同病毒、手术和光传输方法的其对照 (Cre重组酶阴性) 同窝小鼠 [20mg/kg经腹腔内 (ip), 图4F和G; n=10只ChAT::Cre⁺, n=12只ChAT::Cre⁻ (左图); 对于双尾t检验而言, $P < 0.01$; 3个同期组群; 同样见图6A]。在无可卡因时我们未观察到抑制ChAT细胞的行为学作用, 并且ChAT神经元抑制本身不令人厌恶, 因为用单独的eNpHR3.0条件化并不影响位置偏爱 (图4G, 右图; n=9只ChAT::Cre⁺, n=7只ChAT::Cre⁻; 对于双尾t检验而言, $P > 0.05$; 3个同期组群; 图6B; 可卡因剂量-反应曲线同样见图8A)。在10Hz下用ChR2活化细胞不足以推动位置偏爱本身或增强可卡因位置偏爱 (10和20mg/kg腹腔内, 图8B-D; 表4), 我们来自ChAT细胞抑制的数据反而证明了这些细胞的必要性。最后, 在对照实验中, 我们发现ChAT神经元抑制本身对户外活动性或焦虑无影响 (图4, H和J), 并且抑制ChAT细胞未破坏情境和听觉暗示的恐惧条件化 (图9)。

[0202] 表4: 当 (用eNpHR3.0) 抑制ChAT神经元与可卡因暴露配对时, 在可卡因位置偏爱范例的测试当天 (对于不同可卡因浓度), 在可卡因配对侧花费的总时间。

[0203]

	mg/kg	0	10	20	40
ChAT::Cre ⁺	N		11	10	4
	条件侧 (min)		10.3	10.7	10.5
ChAT::Cre ⁻	N		12	12	3
	条件侧 (min)		8.5	14.2	9.2

[0204] 讨论

[0205] 总之, 这些来自特异性和急性光遗传学控制限定ChAT神经元群体的结果表明在自由活动的哺乳动物中这些罕见且稀疏分布的神经元在控制局部回路活性和执行奖赏相关行为中的有力作用。ChAT中间神经元的急性沉默破坏了药物相关的学习, 而在无药物时不影响位置偏爱的事实表明对这种微型回路的控制可用于选择性破坏滥用药物的成瘾性质, 而通常不影响食欲或厌恶反应的诱人可能性, 将具有巨大临床利益的可能性。有趣的是, 行为结果不支持由胆碱能中间神经元慢性消融产生的结论 (34), 但是相反与由NAc中更快速, 但是更少细胞靶向的药理学调节产生的解释更加一致 (23-26)。胆碱能中间神经元的消融可导致间接影响, 例如NAc中的多巴胺补偿性增加, 这可依次增强可卡因奖赏。事实上, 急性和慢性操纵之间的根本区别可解释我们对脑部中乙酰胆碱/多巴胺平衡的理解中临床相关的明显矛盾, 例如烟碱 (可能对胆碱能受体起作用) 急性增加引起多巴胺相应急性增加 (54, 55), 然而多巴胺或乙酰胆碱水平的慢性变化可引起其它神经调质的水平的相反变化 (56), 例如在帕金森氏症 (Parkinson's disease) 的多巴胺损耗中所见 (57)。

[0206] 这种方法的速度和特异性也可使得能够阐明在神经系统其它区域中, 乙酰胆碱神经元在健康和患病神经回路中的因果作用。例如, 与投射到纹状体的多巴胺神经元很像 (58, 59), 认为背侧纹状体中的ChAT中间神经元携带了关于奖赏和预测奖赏的刺激的信息 (60)。常常在激发性活性爆发之后和之前, 在灵长类动物中, 此类刺激使纹状体紧张活性神经元的活性产生短暂停顿 (16, 17)。背侧和腹侧纹状体之间的结构同源性表明, 与此处概述

的NAc原理相似的原理可扩展到腹侧纹状体中的ChAT细胞活性,实际上情况就是如此(English等,所附原稿)。这些结果,加上我们发现这些细胞在NAc中的活性推动了有力的定时抑制并控制了奖赏学习行为,表明ChAT神经元作为适合对哺乳动物脑部中的回路活性和行为进行多方面神经调节的有力控制结节。

[0207] 旨在仅仅为了说明本发明,因此不得视为以任何方式限制本发明的实施例也描述并详述了以上讨论的本发明的各方面和实施方案。通过举例说明的方式而不通过限制的方式提供了前述实施例和详细描述。本说明书中引用的所有出版物、专利申请和专利均如同特别单独地指出将每个单独的出版物、专利申请或专利通过引用并入的相同程度通过引用并入本文。具体而言,本文引用的所有出版物确切地通过引用并入本文用于描述和公开可连同本发明使用的组合物和方法。虽然为了理解清楚,已经通过举例说明的方式相当详细地描述了前述发明,但是对于本领域的普通技术人员而言,根据本发明的教学显而易见的是,在不背离所附权利要求的精神或范围的前提下可对本发明进行某些变化和修改。

[0208] 参考文献

- [0209] 1.S.Ikemoto,R.A.Wise,Neuropharmacology47增刊1,190-201(2004) .
- [0210] 2.J.Changeux,C.R.Biol332,421-425(2009) .
- [0211] 3.M.P.Kilgard,M.M.Merzenich,Science279,1714-1718(1998) .
- [0212] 4.J.S.Bakin,N.M.Weinberger,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A93,11219-11224(1996) .
- [0213] 5.M.E.Hasselmo,L.M.Giocomo,I MoL Neurosci30,133-135(2006) .
- [0214] 6.U.Maskos,Br.J.Pharmacol153增刊1,S438-445(2008) .
- [0215] 7.M.R.Picciotto等,Nature391,173-177(1998) .
- [0216] 8.J.M.Fellous,T.J.Sejnowski,Hippocampus10,187-197(2000) .
- [0217] 9.J.P.Changeux等,Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol61,343-362(1996) .
- [0218] 10.J.P.Changeux等,Brain Res.Brain Res.Rev26,198-216(1998) .
- [0219] 11.A.Kamsler,T.J.McHugh,D.Gerber,S.Y.Huang,S.Tonegawa,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A107,1618-1623(2010) .
- [0220] 12.S.J.Moore,D.C.Cooper,N.Spruston,Neuron61,287-300(2009) .
- [0221] 13.P.H.Tiesinga,J.M.Fellous,J.V.Jose,T.J.Sejnowski,Hippocampus11,251-274(2001) .
- [0222] 14.B.J.Everitt,T.W.Robbins,Annu.Rev.Psychol.48,649-684(1997) .
- [0223] 15.Z.Wang等,Neuron50,443-452(2006) .
- [0224] 16.G.Morris,D.Arkadir,A.Nevet,E.Vaadia,H.Bergman,Neuron43,133-143(2004) .
- [0225] 17.T.Aosaki等,J.Neurosci14,3969-3984(1994) .
- [0226] 18.M.L.Furey,P.Pietrini,J.V.Haxby,W.C.Drevets,Neuropsychopharmacology33,913-923(2008) .
- [0227] 19.S.G.Anagnostaras等,Nat.Neurosci6,51-58(2003) .
- [0228] 20.S.Ikemoto,B.S.Glazier,J.M.Murphy,W.J.McBride,Physiol.Behav63,811-814(1998) .

- [0229] 21.M.J.Williams,B.Adinoff,Neuropsychopharmacology33,1779-1797 (2008) .
- [0230] 22.A.Vale-Martinez,M.G.Baxter,H.Eichenbaum,Eur.J Neurosci16,983-998 (2002) .
- [0231] 23.V.Zachariou等,Neuropsychopharmacology24,576-589 (2001) .
- [0232] 24.W.E.Pratt,R.C.Spencer,A.E.Kelley,Behav.Neurosci121,1215-1223 (2007) .
- [0233] 25.J.A.Crespo,K.Sturm,A.Saria,G.Zernig,J.Neurosci26,6004-6010 (2006) .
- [0234] 26.W.E.Pratt,A.E.Kelley,Behav.Neurosci118,730-739 (2004) .
- [0235] 27.F.E.Pontieri,G.Tanda,F.Orzi,G.Di Chiara,Nature382,255-257 (1996) .
- [0236] 28.M.B.Kelz等,Nature401,272-276 (1999) .
- [0237] 29.B.T.Chen,F.W.Hopf,A.Bonci,Ann.N.Y.Acad.Sci1187,129-139 (2010) .
- [0238] 30.R.A.Wise,NIDA Res.Monogr50,15-33 (1984) .
- [0239] 31.A.A.Grace,C.R.Gerfen,G.Aston-Jones,Adv.Pharmacol42,655-670 (1998) .
- [0240] 32.T.W.Robbins,K.D.Ersche,B.J.Everitt,Ann.N.Y.Acad.Sci1141,1-21 (2008) .
- [0241] 33.E.J.Nestler,G.K.Aghajanian,Science278,58-63 (1997) .
- [0242] 34.T.Hikida等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A98,13351-13354 (2001) .
- [0243] 35.V.V.Rymar,R.Sasseville,K.C.Luk,A.F.Sadikot,J.Comp.Neurol469,325-339 (2004) .
- [0244] 36.J.M.Tepper,J.P.Bolam,Curr.Opin.Neurobiol14,685-692 (2004) .
- [0245] 37.F.Zhou,C.J.Wilson,J.A.Dani,J.Neurobiol53,590-605 (2002) .
- [0246] 38.F.Zhou,C.Wilson,J.A.Dani,Neuroscientist9,23-36 (2003) .
- [0247] 39.T.Koos,J.M.Tepper,J.Neurosci22,529-535 (2002) .
- [0248] 40.M.de Rover,J.C.Lodder,K.S.Kits,A.N.M.Schoffelman,A.B.Brussaard, Eur.J.Neurosci16,2279-2290 (2002) .
- [0249] 41.N.Uchimura,R.A.North,J.Physiol. (Lond.) 422,369-380 (1990) .
- [0250] 42.Y.Zhang,T.G.Oertner,Nat.Methods4,139-141 (2007) .
- [0251] 43.F.Zhang等,Nat Protoc5,439-456 (2010) .
- [0252] 44.A.R.Adamantidis,F.Zhang,A.M.Aravanis,K.Deisseroth,L.de Lecea, Nature450,420-424 (2007) .
- [0253] 45.S.Gong等,J.Neurosci27,9817-9823 (2007) .
- [0254] 46.H.Tsai等,Science324,1080-1084 (2009) .
- [0255] 47.D.Atasoy,Y.Aponte,H.H.Su,S.M.Stemson,J.Neurosci28,7025-7030 (2008) .
- [0256] 48.G.Nagel等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A100,13940-13945 (2003) .
- [0257] 49.E.S.Boyden,F.Zhang,E.Bamberg,G.Nagel,K.Deisseroth,Nat.Neurosci8, 1263-1268 (2005) .
- [0258] 50.V.Gradinaru等,Cell141,154-165 (2010) .
- [0259] 51.Y.Kawaguchi,J.Neurosci13,4908-4923 (1993) .
- [0260] 52.C.J.Wilson,H.T.Chang,S.T.Kitai,J.Neurosci10,508-519 (1990) .

- [0261] 53.H.Inokawa,H.Yamada,N.Matsumoto,M.Muranishi,M.Kimura,Neuroscience (2010) www.ncbi.nlm.nih.gov/laneproxy.stanford.edu/pubmed/20371269.
- [0262] 54.M.Nisell,M.Marcus,G.G.Nomikos,T.H.Svensson,J Neural Transm104,1-10 (1997) .
- [0263] 55.R.Exley,M.A.Clements,H.Hartung,J.M.Mcintosh,S.J.Cragg,
- [0264] Neuropsychopharmacology33,2158-2166 (2008) .
- [0265] 56.A.Hrabovska等,Chem.Biol.Interact183,194-201 (2010) .
- [0266] 57.B.G.Hoebel,N.M.Avena,P.Rada,Curr Opin Pharmacol7,617-627 (2007) .
- [0267] 58.W.Schultz,J Neurophysiol80,1-27 (1998) .
- [0268] 59.W.Pan,R.Schmidt,J.R.Wickens,B.I.Hyland,J.Neurosci25,6235-6242 (2005) .
- [0269] 60.M.Kimura,J.Rajkowski,E.Evarts,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A81,4998-5001 (1984) .

[0001] 序列

[0002] 不具有信号肽的NpHR的氨基酸序列：

[0003]

VTQRELFEFVLNDPLLASSLYINIALAGLSILLFVFMTRGLDDPRAKLI AVSTILVPVVS IASYTGLASGLTISVLE
MPAGHFAEGSSVMLGGEEVDGVVTMWGRYLTWALSTPMILLALGLLAGSNATKLFTAITFDIAMCVTGLAAVLEMPA
GHFAEGSSVMLGGEEVDGVVTMWGRYLTWALSTPMILLALGLLAGSNATKLFTAITFDIAMCVTGLAAALTSSHLM
RWFWYAI SCACFLVVL YILLVEWAQDAKAAGTADM FNTL KLLTVVMWLGYP I VWALGVEG IAVLPVGVT SWGYSFLD
IVAKYIFAFLLLNYLTSNESVVS GSIL DVPSASGTPADD (SEQ ID NO:1)

[0004] eYFP-NpHR3.0的氨基酸序列

[0005]

MTETLPPVTESAVALQAEVTQRELEEFVLNDPLLASSLYINIALAGLSILLFVFMTRGLDDPRAKLI AVSTILVPV
S I A S Y T G L A S G L T I S V L E M P A G H F A E G S S V M L G G E E V D G V V T M W G R Y L T W A L S T P ,
ILLALGLLAGSNATKLFTAITFDIAMCVTGLAAALTSSHLMRWFWYAI SCACFLVVL YILLVEWAQDAKAAGTADM
FNTL KLLTVVMWLGYP I VWALGVEG IAVLPVGVT SWGYSFLD I VAKYIFAFLLLNYLTSNESVVS GSIL DVPSASG
T PADDAAAKSRITSEGEYIPLDQIDINNVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVS GEGEGDATY GKLTLKFICTT
GKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAFVKFEGDTLVNRIELKG
IDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRNHIEDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQ
SALSKDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITLGMDELYKFCYENEV (SEQ ID NO:2)

[0006] eYFP-NpHR3.1的氨基酸序列：

[0007]

MVTQRELFRFVLNDPLLASSLYINIALAGLSILLFVFMTRGLDDPRAKLI AVSTILVPVVS IASYTGLASGLTISVL
EMPAGHFAEGSSVMLGGEEVDGVVTMWGRYLTWALSTPMILLALGLLAGSNATKLFTAITFDIAMCVTGLAAALTSS
SHLMRWFWYAI SCACFLVVL YILLVEWAQDAKAAGTADM FNTL KLLTWWMWLGYP I VWALGVEG IAVLPVGVT SWGY
SFLDIVAKYIFAFLLLNYLTSNESVVS GSIL DVPSASGTPADDAAAKSRITSEGEYIPLDQIDINNVSKGEELFTGV
VPILVELDGDVNGHKFSVS GEGEGDATY GKLTLKTICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAM
PEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNF
KIRHNIEDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITLGMDELYKFCYE
NEV (SEQ ID NO:3)

[0008] GtR3的氨基酸序列：

[0009] ASSFGKALLEFVFIVFACITLLLGINAAKSKAASRVLPATFVTG IAS IAYFSMASGGGWVIAPDCRQL
FVARYL

[0010]

DWLITTPLLLIDLGLVAGVSRWDIMALCLSDVLM IATGAFGSLTVGNVKVWWFFGMCWFLHI IFALGKSWAEAAKA
KGGDSASVYSKIAGITVITWFCYPVWVFAEGFGNFSVTFEVLIYGVLDVISKAVFGLILMSG AATGYESI (SEQ
ID NO:4)

[0011] Chr2的氨基酸序列：

[0012]

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAAGFSILLMFYAYQTWKS
TCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLRYAEWLLTCPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLV

SDIGTIVWGATSAMWAGYVKVIFFCGLGCLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPILFI
LGPEFGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAGA
VP (SEQ ID NO:5)

[0013] SF0的氨基酸序列:

[0014]

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAAGFSILLMFYAYQTWKS
TCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLRYAEWLLTSPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLV
SDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCGLGCLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPILFI
LGPEFGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAGA
VP (SEQ ID NO:6)

[0015] SSF0的氨基酸序列:

[0016]

MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAAGFSILLMFYAYQTWKS
TCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLRYAEWLLTSPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLV
SAIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCGLGCLCYGANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMFPILFI
LGPEFGVLSVYGSTVGHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAGA
VP (SEQ ID NO:7)

[0017] C1V1的氨基酸序列:

[0018]

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVICIPNNGQCFCLA
WLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWEEIYVATIEMIKFII EYFHEFDEPAVIYSSNGNK
TVWLRYAEWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSYGYMYTYFHA
AKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVAVGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDLIAKNMWGVLGNYLRV
KIEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVE TLVAEEED (SEQ ID NO:8)

[0019] C1V1 (E122T) 的氨基酸序列:

[0020]

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVICIPNNGQCEDLA
WLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWETIYVATIEMIKFII EYFHEFDEPAVIYSSNGNK
TVWLRYAEWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSYGYMYTYFHA
AKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVAVGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDLIAKNMWGVLGNYLRV
KIEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVE TLVAEEED (SEQ ID NO:9)

[0021] C1V1 (E162T) 的氨基酸序列:

[0022] MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVICIPN
NGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWEEIYVATIEMIKFII EYFHEFDEPAV
IYSSNGNKTVWLRYATWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILF

[0023]

LISLSYGYMYTYFHA AKVYIEAFHTVPKGICRELVRVMAWTFVAVGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILDLI
AKNMWGV LGNYLRVKI EHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVE TLVAEEED (SEQ ID NO:10)

[0024] C1V1 (E122T/E162T) 的氨基酸序列:

[0025]

MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLNNGSVICIPNNGQCFCLA
WLKSGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWETIYVATIEMIKFII EYFHEFDEPAVIYSSNGNK
TVWLRyatWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTkILFFLISLSYGMtyFHA
AKVYIEAFHTVPKGICRELVPVMAWTFFVAWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHsILDLIakNMwGVLgNYLRV
KIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEvetLVaEEED (SEQ ID NO:11)

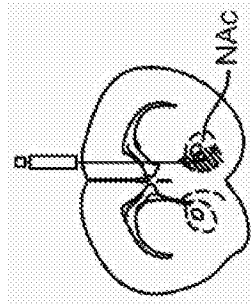


图1A

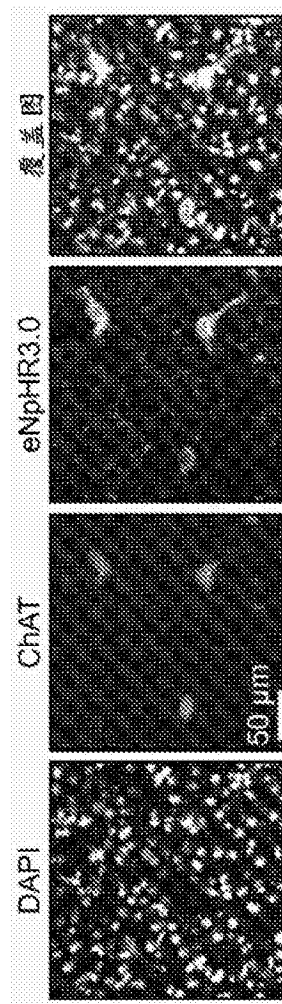


图1B

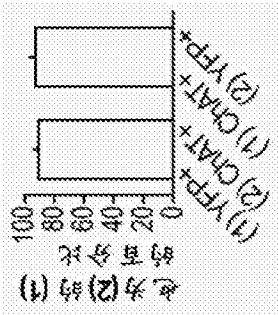


图1C

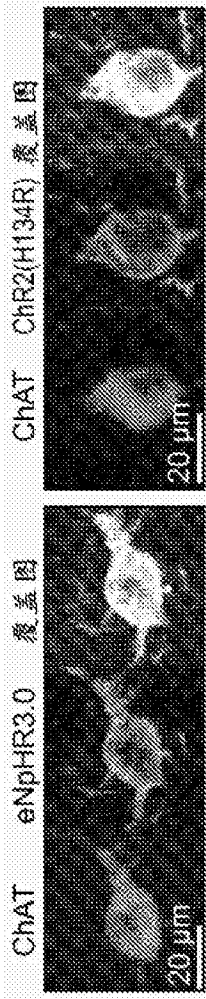


图1D

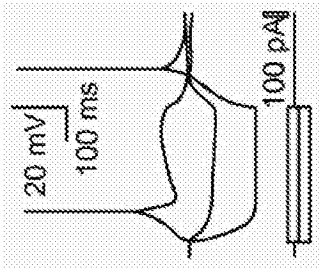


图1E

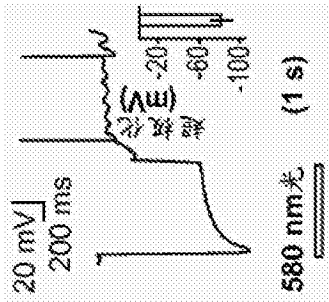


图1F

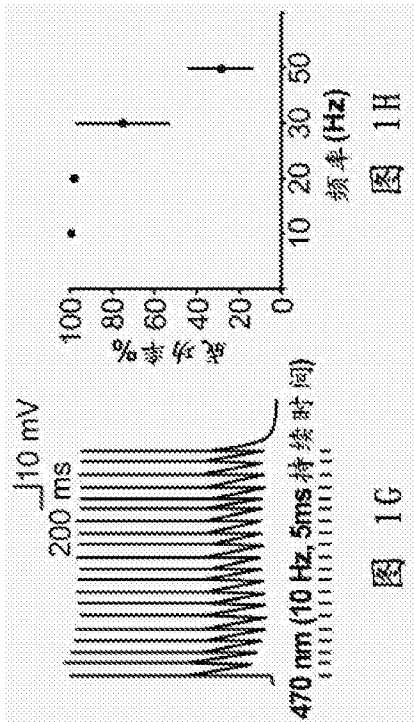


图 1G

图 1H

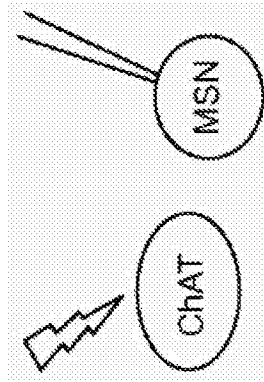


图2A

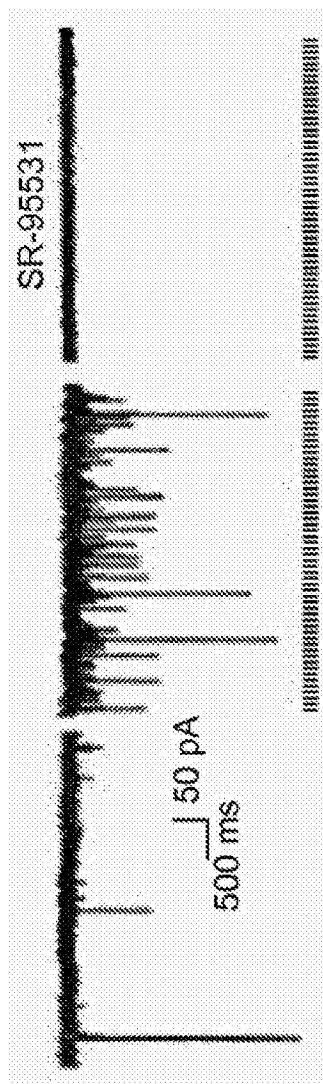


图2B

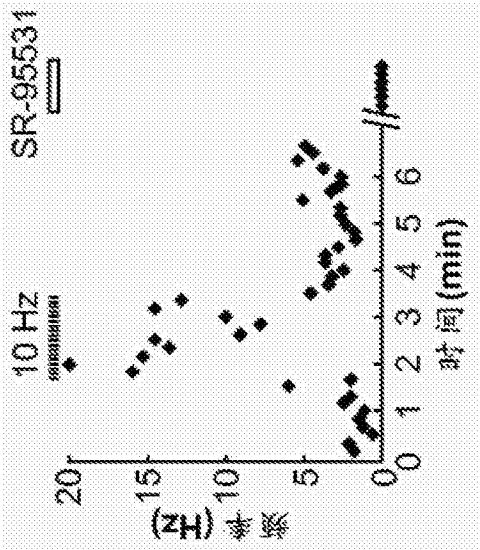


图2C

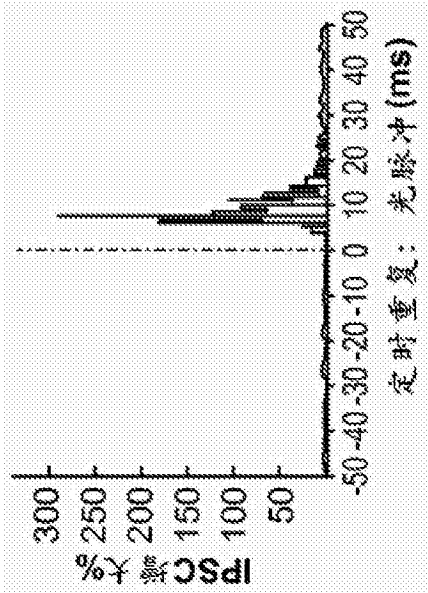


图2D

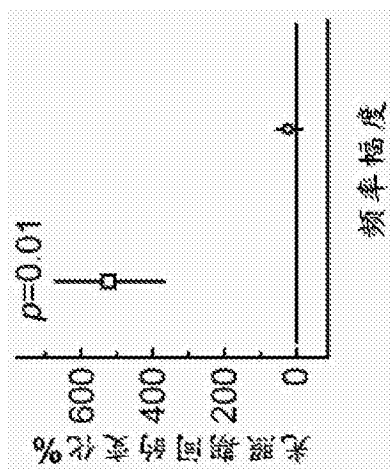


图2E

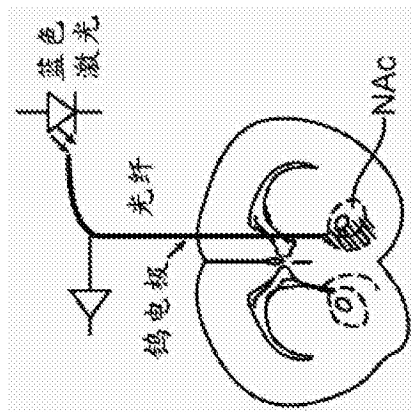


图2F

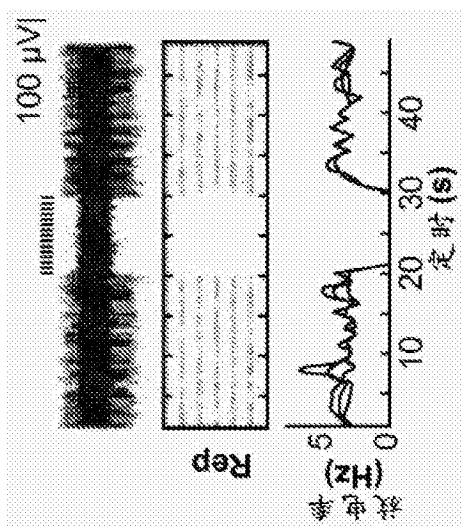


图2G

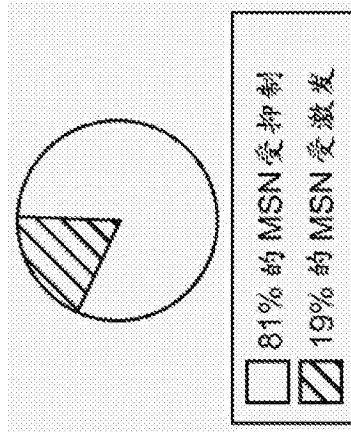


图2H

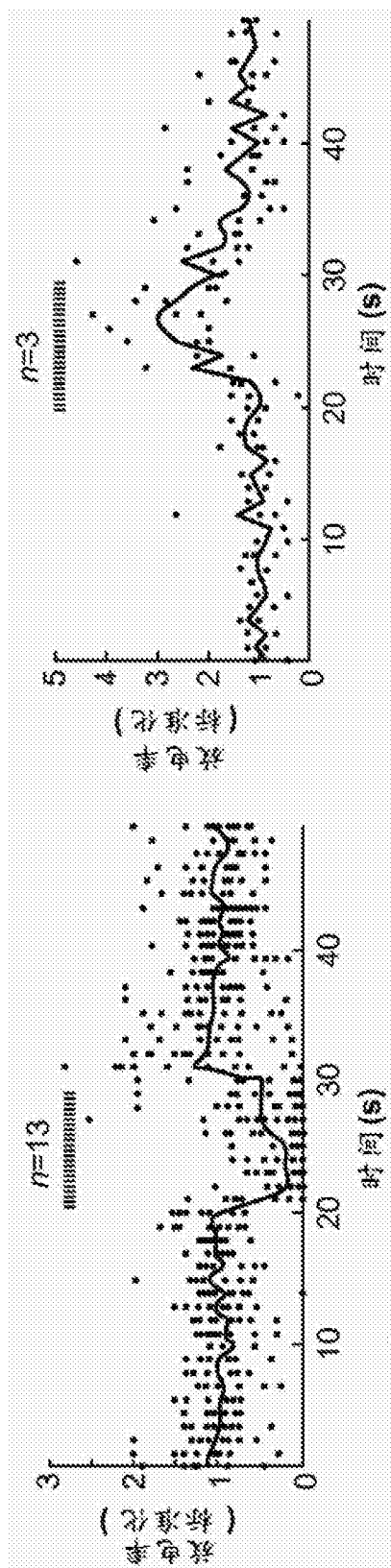


图2I

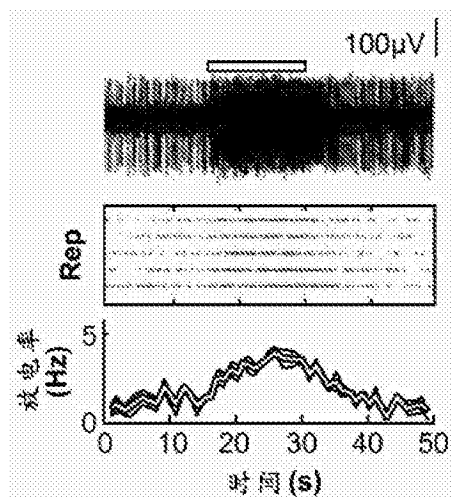


图3A

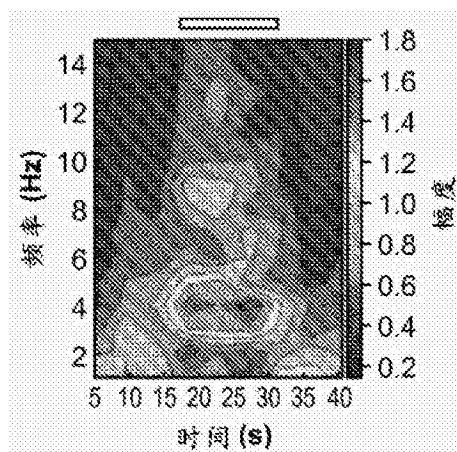


图3B

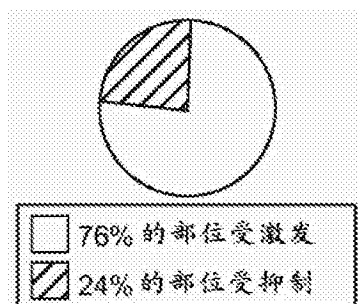


图3C

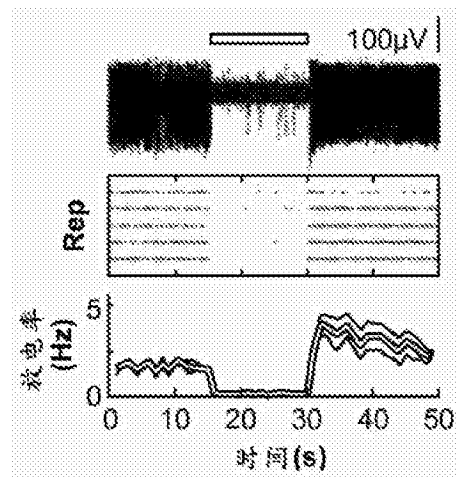


图3D

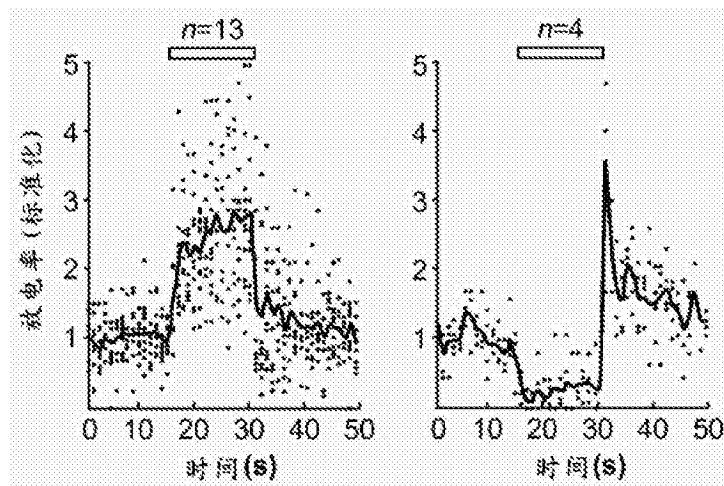


图3E

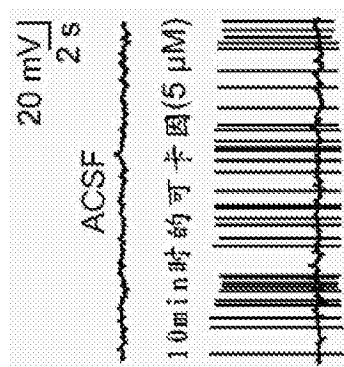


图4A

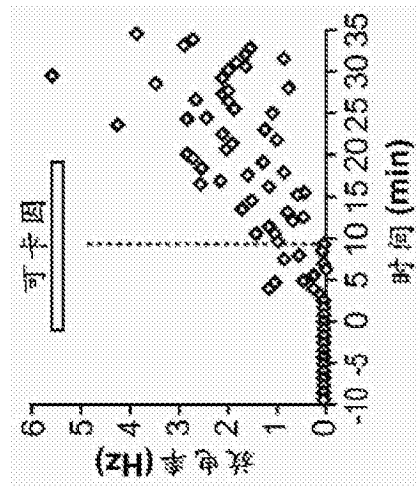


图4B

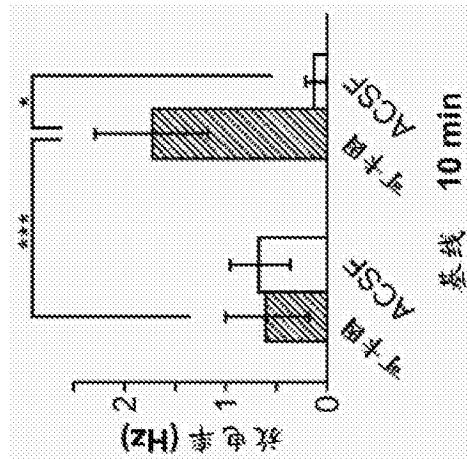


图4C

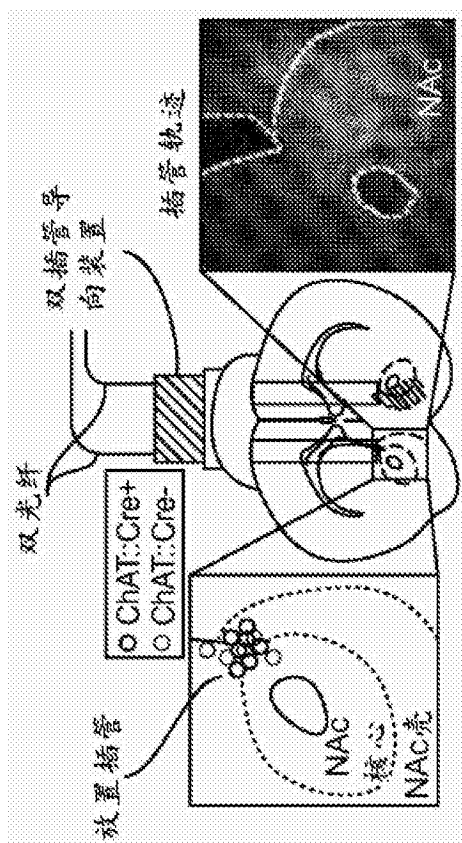


图4D

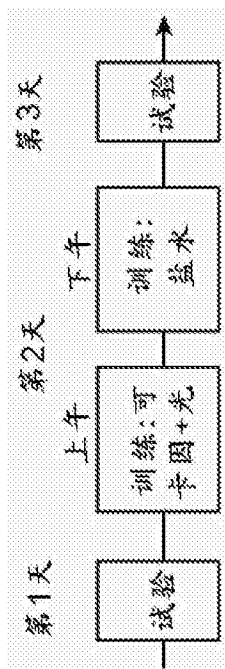


图4E

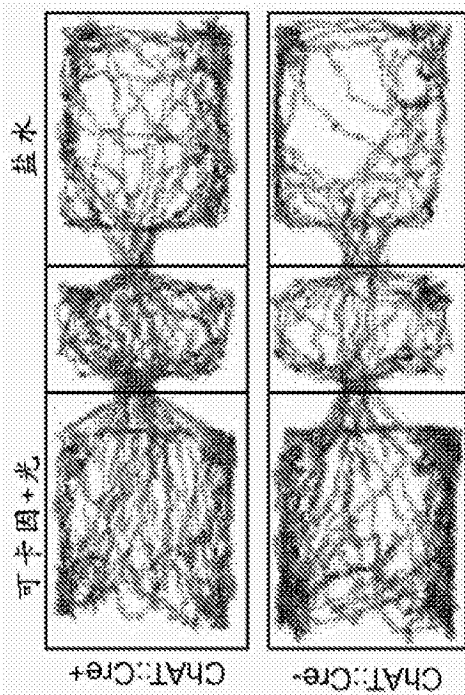


图4F

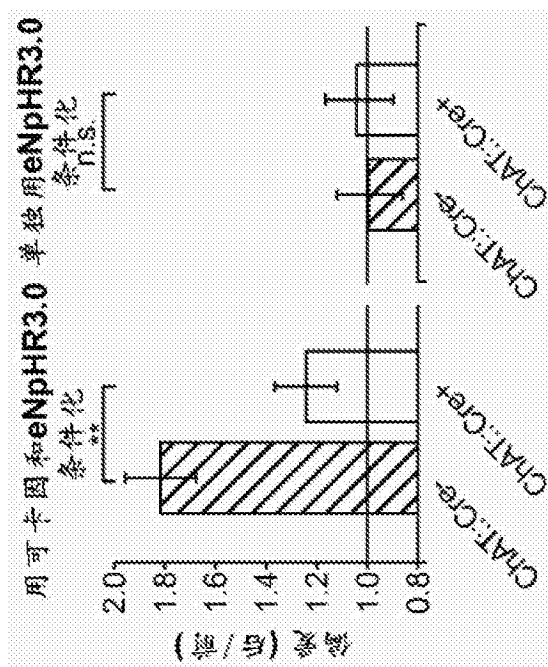


图4G

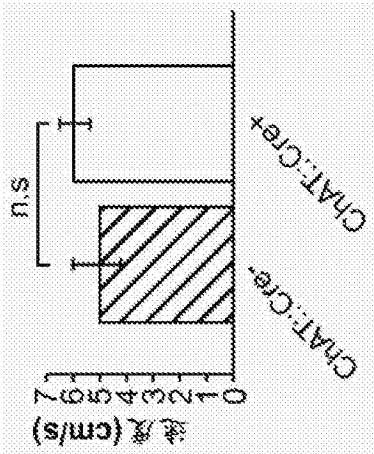


图4H

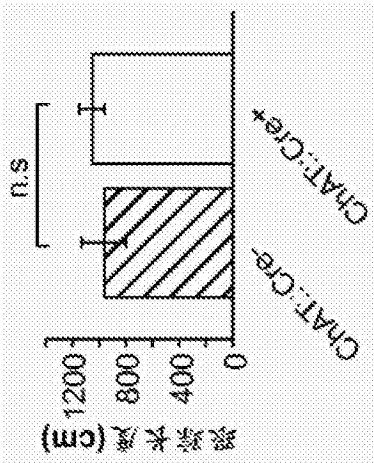


图4I

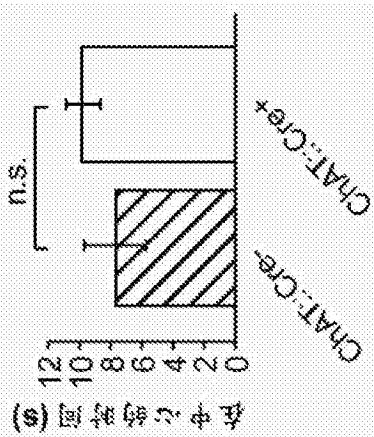


图4J

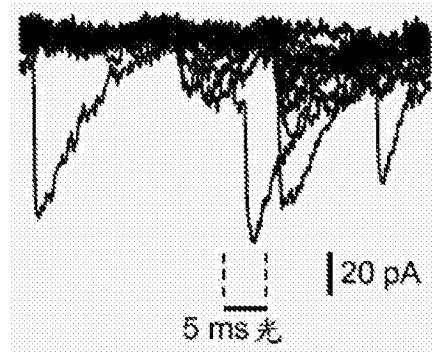


图5A

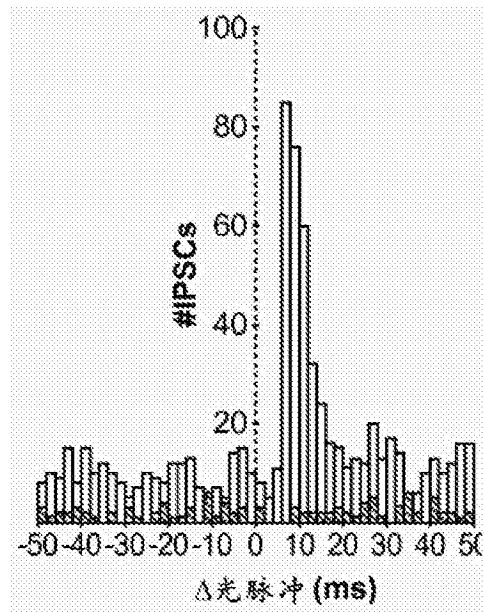


图5B

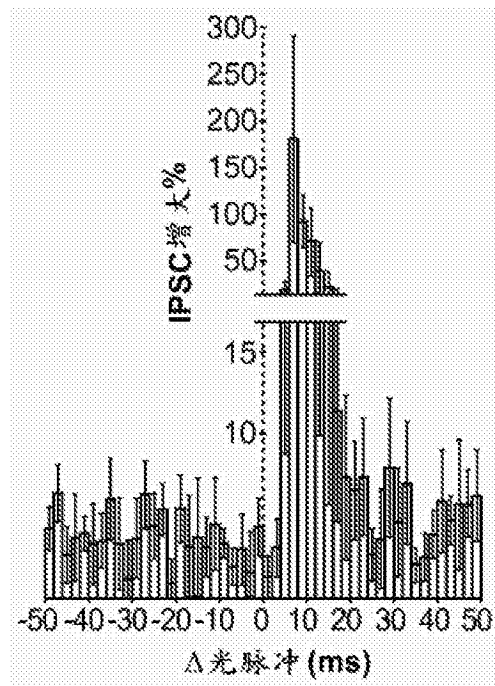


图5C

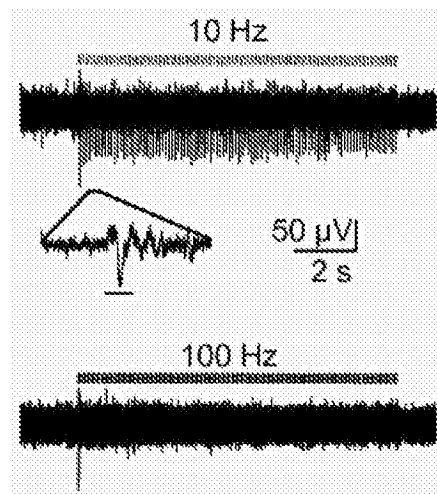


图5D

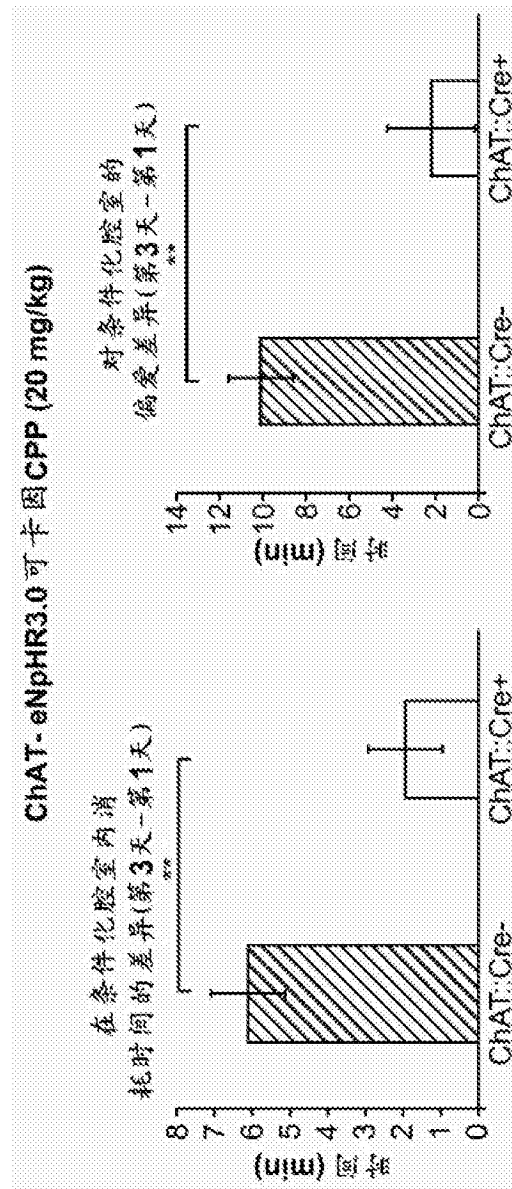


图6A

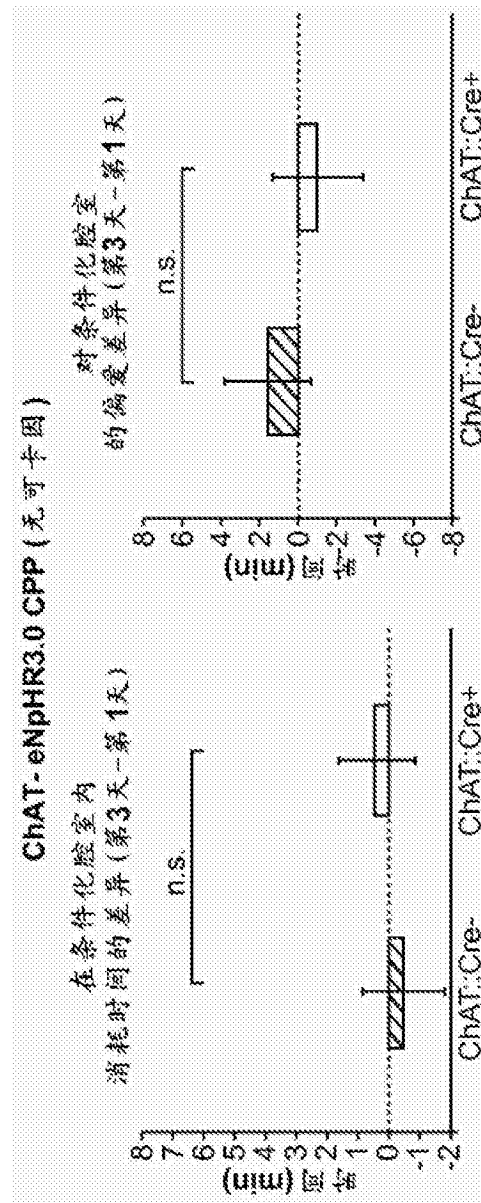


图6B

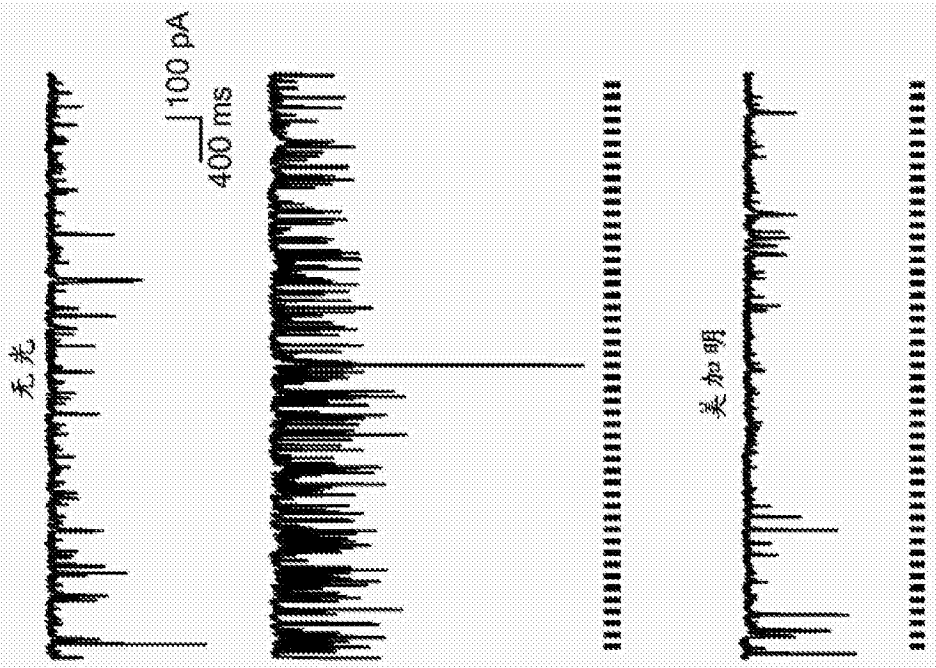


图7A

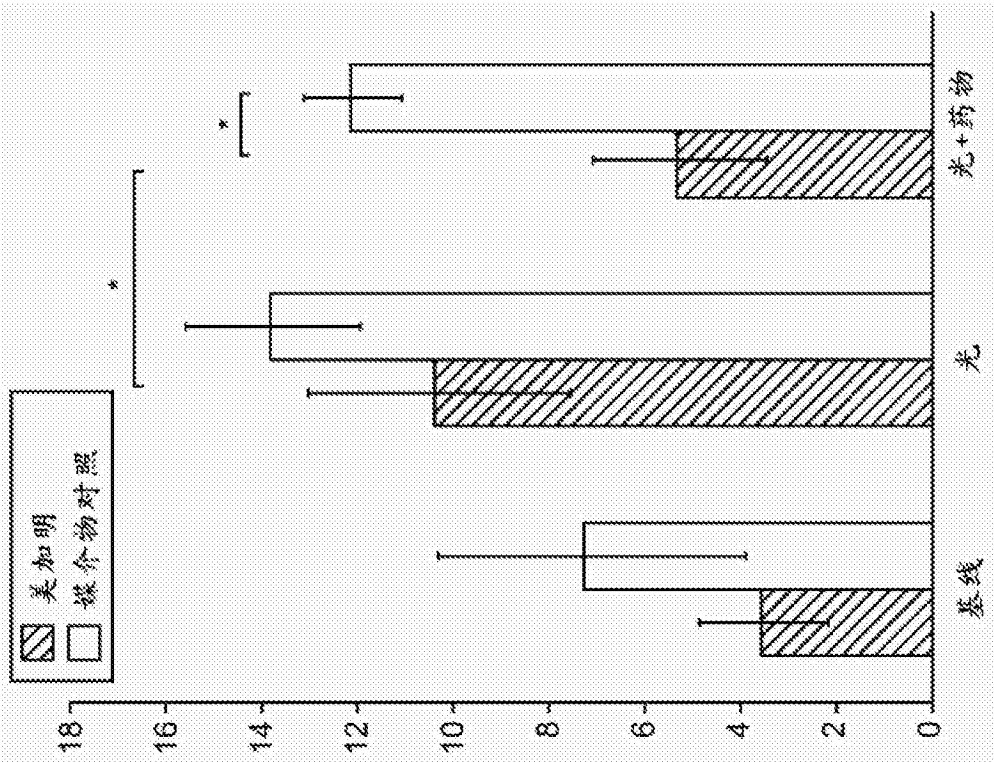


图7B

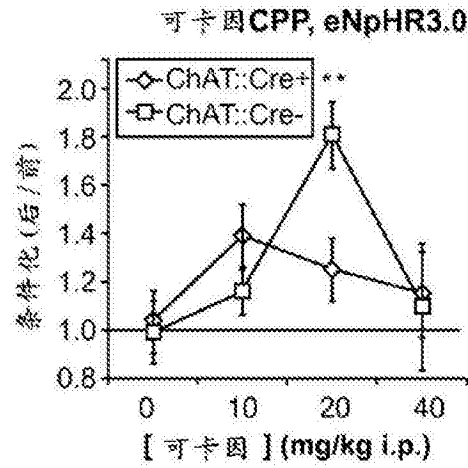


图8A

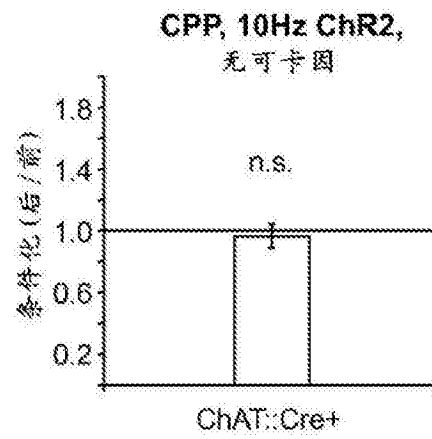


图8B

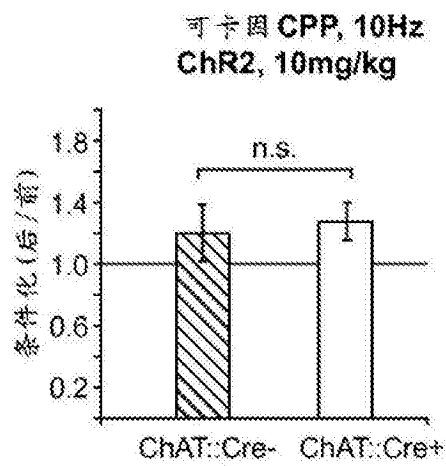


图8C

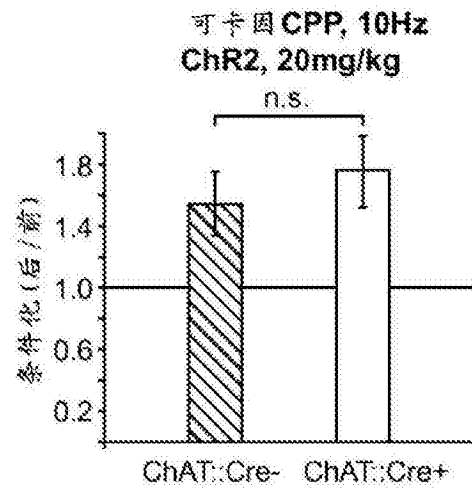


图8D

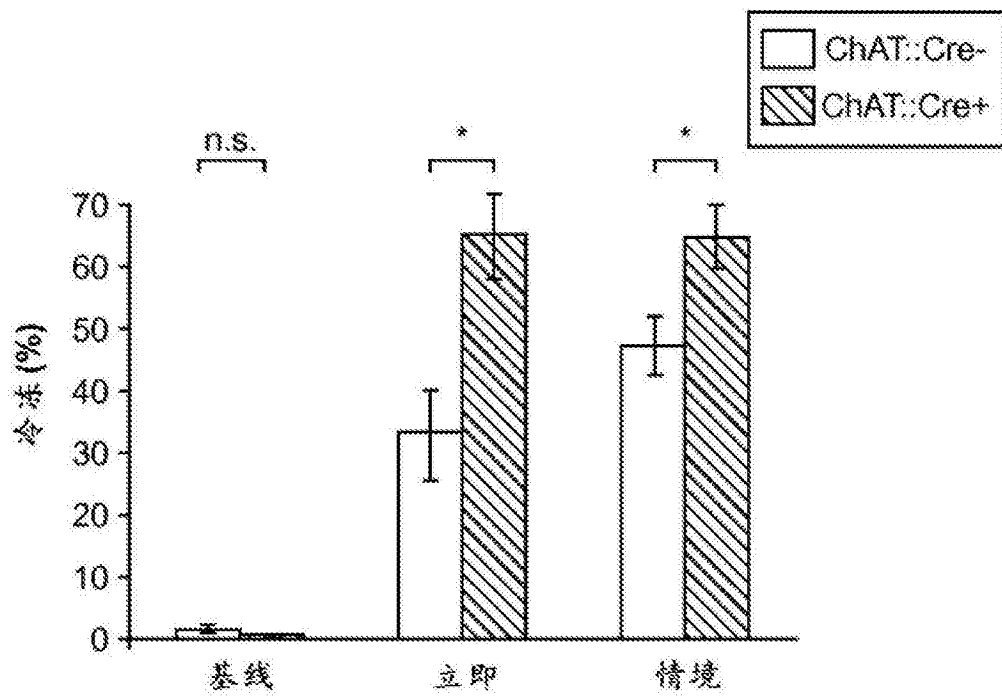


图9A

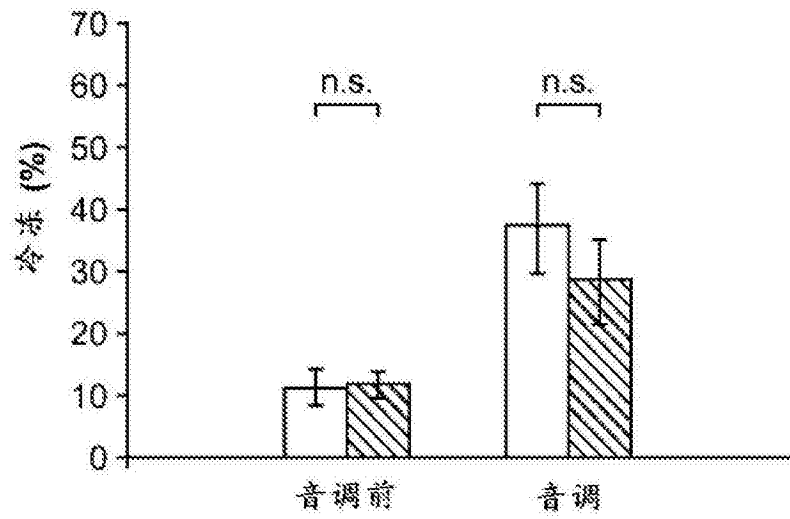


图9B

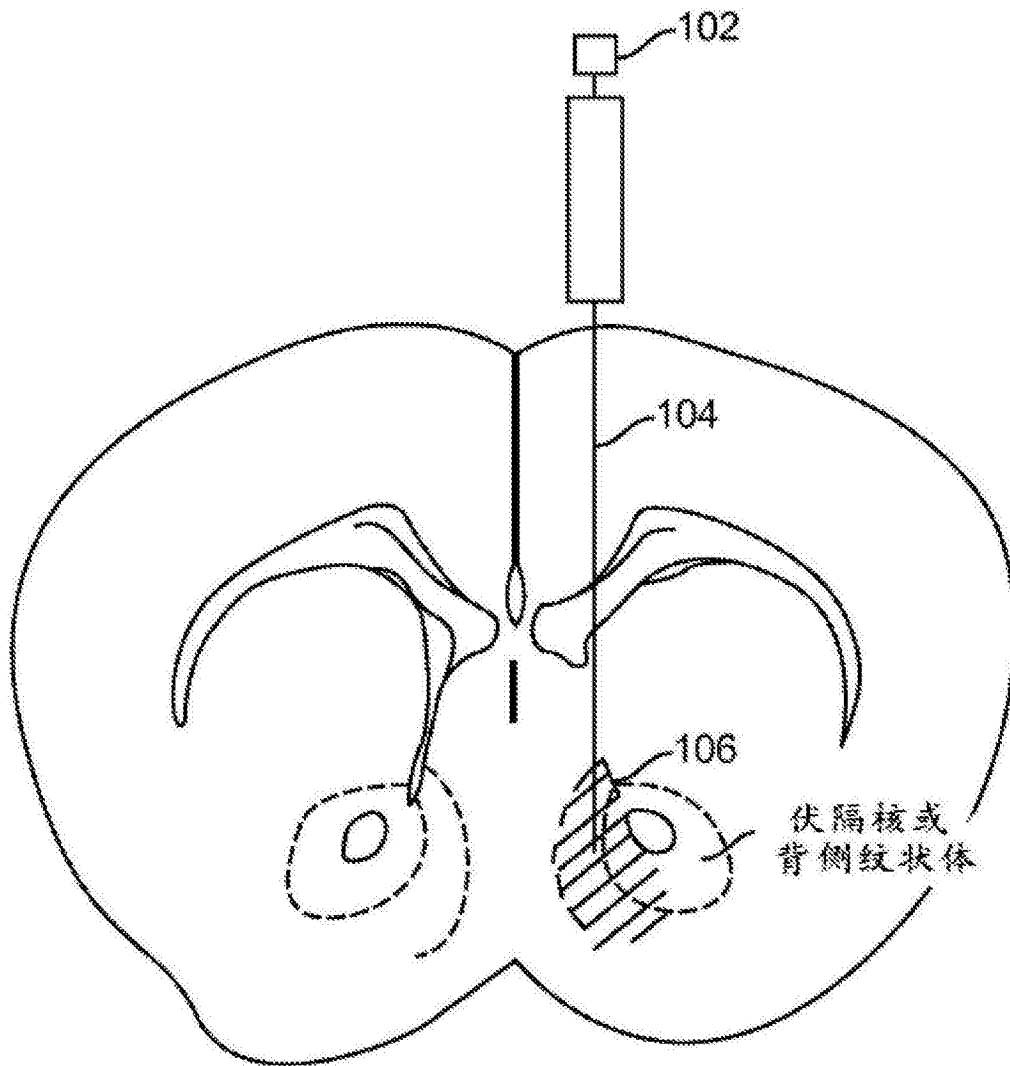


图10

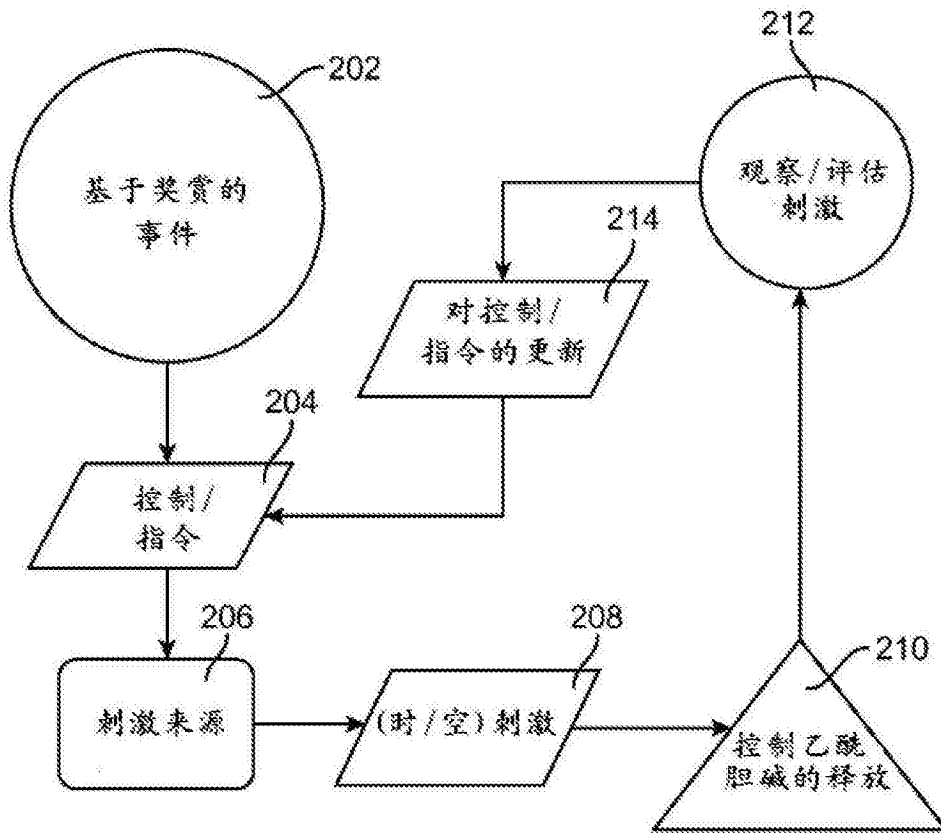


图11