



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104270942 B

(45)授权公告日 2018.02.02

(21)申请号 201380022721.6

(22)申请日 2013.03.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104270942 A

(43)申请公布日 2015.01.07

(30)优先权数据
61/613,231 2012.03.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.10.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/030893 2013.03.13

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/142196 EN 2013.09.26

(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·A·戴瑟罗斯 K·M·泰
M·R·瓦登

(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 韩威威

(51)Int.Cl.
C12N 15/11(2006.01)
A01K 67/027(2006.01)
A61N 1/30(2006.01)
A61N 5/06(2006.01)

审查员 袁海

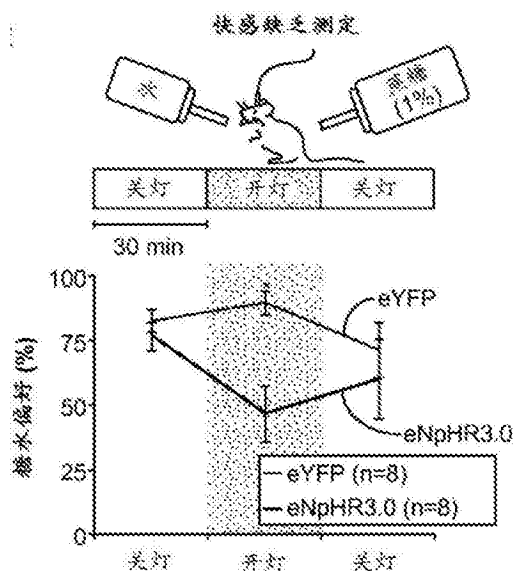
权利要求书2页 说明书41页
序列表18页 附图25页

(54)发明名称

非人类动物抑郁症模型及其使用方法

(57)摘要

本公开提供了非人类光遗传动物抑郁症模型。具体来说,非人类动物各自在动物神经元中表达光响应性视蛋白。所述动物模型用于鉴定治疗抑郁症的试剂和鉴定治疗抑郁症的治疗策略的靶标。描述了使用表达光响应性视蛋白的非人类动物的实例,所述光响应性视蛋白包括光响应性氯泵的盐细菌视紫红质家族和光响应性阳离子通道蛋白的视紫红质通道蛋白家族。



1. 一种鉴定治疗个体抑郁症的候选试剂的方法,包括:

使在腹侧被盖区 (VTA) 多巴胺能神经元中表达具有神经元活性的活性光遗传抑制因子的啮齿动物与试验试剂接触,并且

在抑郁症测定中测定所述试验试剂对所述啮齿动物行为的影响,

其中所述测定在将所述VTA暴露于激活所述光遗传抑制因子的波长的光之后或同时进行,并且

其中与尚未接触所述试验试剂的对照啮齿动物的行为相比,接触了所述试验试剂的所述啮齿动物抑郁行为减轻,表明所述试验试剂为治疗抑郁症的候选试剂。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述活性光遗传抑制因子为盐细菌视紫红质 (NpHR) 多肽,其包含与SEQ ID NO:1中列出的NpHR氨基酸序列有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述NpHR由为在多巴胺能神经元中表达NpHR而提供的启动子可操作连接的核苷酸序列编码。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述启动子是酪氨酸羟化酶启动子。

5. 根据权利要求2所述的方法,其中所述NpHR包含内质网输出信号序列和膜运输信号序列。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抑郁症测定为强迫游泳试验、悬尾试验或条件性位置厌恶试验。

7. 一种筛选试剂促进个体抑郁症的能力的方法,所述方法包括:

使在腹侧被盖区 (VTA) 多巴胺能神经元中表达具有神经元活性的活性光遗传活化因子的啮齿动物与试剂接触,并且

在抑郁症测定中测定所述试剂对所述啮齿动物行为的影响,

其中所述测定在将所述VTA暴露于激活所述光遗传活化因子的波长的光之后或同时进行,并且

其中与尚未接触所述试剂的对照啮齿动物的行为相比,接触了所述试剂的所述啮齿动物表现出抑郁行为,表明所述试剂促进抑郁症。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述活性光遗传活化因子为视紫红质通道蛋白,所述视紫红质通道蛋白包含与SEQ ID NO:5中列出的视紫红质通道蛋白氨基酸序列有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

9. 一种筛选试剂促进个体抑郁症的能力的方法,所述方法包括:

使在内侧前额叶皮质 (mPFC) 兴奋性神经元中表达具有神经元活性的活性光遗传活化因子的啮齿动物与试剂接触,

将中缝背核 (DRN) 暴露于激活所述光遗传活化因子的波长的光,其中所述接触在所述暴露之前进行或者与所述暴露同时进行,并且

在抑郁症测定中测定所述试剂对所述啮齿动物行为的影响,

其中与尚未接触所述试剂的对照啮齿动物的行为相比,接触了所述试剂的所述啮齿动物表现出抑郁行为,表明所述试剂促进抑郁症。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述活性光遗传活化因子为视紫红质通道蛋白,所述视紫红质通道蛋白包含与SEQ ID NO:5中列出的视紫红质通道蛋白氨基酸序列有至少

95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

11. 一种鉴定治疗个体不良心理状态的候选试剂的方法,所述方法包括:

使在腹侧被盖区(VTA)多巴胺能神经元中表达具有神经元活性的活性光遗传抑制因子的啮齿动物与试验试剂接触,并且

在条件性位置厌恶(CPA)试验中测定所述试验试剂对所述啮齿动物行为的影响,其中所述测定在将所述VTA暴露于激活所述光遗传抑制因子的波长的光之后或同时进行,并且其中与尚未接触所述试验试剂的对照啮齿动物的行为相比,接触了所述试验试剂的所述啮齿动物的CPA反应行为被调节,表明所述试验试剂为治疗个体不良心理状态的候选试剂。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述不良心理状态为烦躁不安、快感缺失、抑郁、自杀或焦虑。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中所述活性光遗传抑制因子为盐细菌视紫红质(NpHR)多肽,其包含与SEQIDN0:1中列出的NpHR氨基酸序列有至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述NpHR由为在多巴胺能神经元中表达NpHR而提供的启动子可操作连接的核苷酸序列编码。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述启动子是酪氨酸羟化酶启动子。

16. 根据权利要求13所述的方法,其中所述NpHR包含内质网输出信号序列和膜运输信号序列。

非人类动物抑郁症模型及其使用方法

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请要求2012年3月20日提交的美国临时专利申请第 61/613,231号的权益,该申请以引用的方式整体并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 重性抑郁障碍特征在于情绪低落,有自杀想法、职业倦怠并且无法体验快乐。尽管这种使人衰弱的精神疾病普遍,但最常用的治疗性干预、选择性血清素再摄取抑制剂往往无效并且具有严重的不良副作用。

[0005] 当前的非人类动物抑郁症模型非特异性。本领域需要改进的非人类动物抑郁症模型。

[0006] 发明概述

[0007] 本公开提供了非人类光遗传动物抑郁症模型。所述动物模型用于鉴定治疗抑郁症的试剂和鉴定治疗抑郁症的治疗策略的靶标。

[0008] 附图简述

[0009] 图1A-E描绘了通过选择性抑制腹侧被盖区 (VTA) 多巴胺 (DA) 神经元对抑郁样表现型的诱导。

[0010] 图2A-E描绘了通过稀疏阶段性光激活VTA DA神经元对应激诱导的抑郁样表现型的挽救。

[0011] 图3A-C描绘了介导逃避相关行为对多巴胺,而非谷氨酰胺受体信号序列的需要。

[0012] 图4A-I描绘了通过阶段性激活VTA DA神经元对TH::Cre大鼠逃避相关行为的NAc神经编码的调节。

[0013] 图5A-E描绘了使用自动化强迫游泳试验 (FST) 提供可与同时记录的神经数据同步的高时间分辨率读数。

[0014] 图6A和6B描绘了FST中对个体跳动的检测。

[0015] 图7A-C描绘了使用磁感应法检测笼子的固定性。

[0016] 图8A-G描绘了通过前额神经元活性对FST行为状态的编码。

[0017] 图9A-J描绘了通过光遗传刺激中缝背核 (DRN) 中的mPFC轴突而非兴奋性内侧前额叶皮质 (mPFC) 在具有挑战性的情况下诱导快速可逆的行为激活。

[0018] 图10A和10B描绘了大鼠mPFC的光遗传刺激。

[0019] 图11A和11B描绘了DRN组织学和光极记录。

[0020] 图12A-J描绘了光遗传刺激DRN投射的mPFC神经元对mPFC 编码能力的影响。

[0021] 图13A和13B描绘了THcre⁺/eNpHR3.0-eYFP小鼠和 THcre⁺/eNpHR3.0-eYFP小鼠对条件性位置厌恶试验的反应。

[0022] 定义

[0023] 如本文所使用,关于核酸的术语“异源”指并非在其自然环境中 (即,已经人为改变) 的编码基因产物的核酸 (多肽或核酸)。例如,异源核酸包括从一个物种引入另一物种的核酸。异源核酸还包括一种生物天然所有的,已经在某些方面改变 (例如,突变、添加多个拷

贝、与非天然启动子或增强子序列连接等)的基因。异源核酸可包含含核酸cDNA形式的核苷酸序列;cDNA序列可在有义(生成mRNA)或反义方向(生成与mRNA转录产物互补的反义RNA转录产物)表达。在一些实施方案中异源核酸可与内源核酸区别之处在于,异源核酸序列通常与包含调控元件例如启动子的核苷酸序列连接,未发现启动子与异源基因编码的蛋白质基因或与染色体中的基因序列自然缔合,或与自然界中不存在的染色体部分(例如,在基因一般不表达的基因座中表达的基因)缔合。

[0024] 如本文所使用,术语“非人类哺乳动物”指任何非人类哺乳动物,包括但不限于非人灵长类动物、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠等)等。在一些情况下,非人类哺乳动物为小鼠。在其它情况下,非人类哺乳动物为大鼠。

[0025] 如本文所使用,“心境障碍”指相当长一段时间个体体验的情调或情绪状态混乱。心境障碍包括但不限于重性抑郁障碍(即,单相障碍)、躁狂、烦躁不安、双相障碍、心境恶劣、躁郁症等。见,例如,Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders,第4版,(DSM IV)。

[0026] 如本文所使用,“焦虑障碍”指不愉快的情绪状态,包括表面上由未承认的内心冲突引起的,对预想不真实或想象的危险的心理生理反应。生理伴随情况包括心率增加、呼吸率改变、出汗、发抖、虚弱和疲劳;心理伴随情况包括感觉危险迫近、无力、忧惧和紧张。焦虑障碍包括但不限于恐慌症、强迫症、创伤后应激障碍、社会恐怖症、社交焦虑障碍、特定恐惧症、广泛性焦虑障碍。

[0027] “强迫症”或“OCD”是特征在于足以在个体中引起显著痛苦的反复出现的困扰或强迫的焦虑障碍。强迫症通常耗时,和/或明显干扰人的正常功能、社交活动或关系。困扰是进入意识且持续、侵入性且讨厌的反复出现的念头、想法、影象或冲击。常常,试图忽略或抑制所述想法,或用一些其它想法或举动将其中和。个体可能将困扰视为他或她自己意识的产物。强迫是响应于困扰进行的反复、有目的性的行为或动作,并且通常设计用于中和或防止不适或某种可怕事件或情形。例如,常见困扰涉及污染想法;过多、反复且非目的性的洗手是常见的强迫症。

[0028] “重性抑郁症”、“重性抑郁障碍”或“单相障碍”指牵涉下列任何症状的心境障碍:持续性悲伤、焦虑或“空虚”感;感到绝望或悲观;感到内疚、没有价值或无助;对曾经喜爱的嗜好和活动失去兴趣或乐趣,包括性;精力减少、疲劳、变得“迟钝”;难以集中精神、记忆或做决定;失眠、早醒或睡过头;食欲丧失和/或重量减轻或过食和增重;有死亡或自杀想法或企图自杀;坐立不安或烦躁或对治疗无反应的持续身体症状,例如头痛消化障碍和慢性疼痛。例如,在DSM IV中描述了各种抑郁亚型。

[0029] “双相障碍”是特征在于改变极端心境周期的心境障碍。有双相障碍的人经历通常摇摆不定地尝试过分高亢或易怒(躁狂)到悲伤和无助(抑郁),然后恢复的心境循环,期间有正常心境期。例如,在DSM IV中描述了对双相障碍的诊断。双相障碍包括双相障碍I(有或无重性抑郁的躁狂)和双相障碍II(有重性抑郁的轻度躁狂),见,例如,DSM IV。

[0030] 在进一步描述本发明之前,应理解本发明不限于描述的特定实施方案,当然这样可能会有所不同。还应理解,本文使用的术语是仅仅是为了描述特定实施方案,而非旨在限制,因为本发明的范围将仅受所附权利要求限制。

[0031] 当提供了值的范围时,应理解除非上下文另外明确指出,该范围上下限之间以下

限单位十分之一为基准的每个居中值和该规定范围中任何其它规定值或居中值均涵盖在本发明内。这些较小范围的上下限可能独立包括在较小范围内,并且也涵盖在本发明内,受规定范围中任何特别排除的限值限制。当规定范围包括一个或两个限值时,排除任一个或两个已包括的限值的范围也包括在本发明中。

[0032] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域中普通技术人员通常所理解的含义。虽然在本发明的实践或试验中也可使用与本文所述相似或等效的任何方法和材料,但是现在描述了优选方法和材料。本文提到的所有出版物以引用的方式并入本文公开内容中并且连同引用的出版物一起描述了所述方法和/或材料。

[0033] 必须指出的是,除非上下文另外明确指出,如本文和所附权利要求中所使用,单数形式“一种”、“一个”和“所述”包括复数个指示物。因此,例如,提到“一种光活化的阳离子通道”包括多个此类光活化的阳离子通道并且提到“所述抑郁行为”包括提到一种或多种抑郁行为和本领域技术人员已知的等效行为,等等。应进一步指出,起草权利要求可能是为了排除任何可选要素。同样,本声明旨在用作连同叙述权利要求要素使用诸如“只是”、“仅仅”等专用术语或使用“否定”限制的“前提”基础。

[0034] 应认识到,也可能在单个实施方案中组合提供在独立实施方案的上下文中为清楚起见描述的本发明的某些特征。相反,也可能单独或以任何适合子组合提供在单个实施方案的上下文中为简洁起见描述的本发明的各种特征。本发明具体包括了属于本发明的所有实施方案的组合并且在本文中公开,就如同单独明确地公开了每个组合一样。另外,本发明还具体包括了各实施方案的所有子组合及其要素并且在本文中公开,就如同在本文中单独明确地公开了每个此类子组合一样。

[0035] 提供本文讨论的出版物只是为了其在本申请提交日期之前的公开内容。不得将本文任何内容解释为承认本发明无权凭借先前发明而先于此类出版物。进一步地,提供的出版日期可能不同于可能需要独立确认的实际出版日期。

[0036] 发明详述

[0037] 本公开提供了非人类光遗传动物抑郁症模型。所述动物模型用于鉴定治疗抑郁症的试剂和鉴定治疗抑郁症的治疗策略的靶标。

[0038] 非人类动物抑郁症模型

[0039] 本公开提供了在动物神经元中表达光响应性视蛋白(例如,光响应性离子通道、光响应性离子泵等)的非人类动物。通过将光活化视蛋白暴光而活化光响应性视蛋白调节了动物的行为。在特定实施方案中,光活化光响应性视蛋白诱导动物抑郁。在其它实施方案中,光活化光响应性视蛋白缓解抑郁。

[0040] 在一些情况下,主题非人类动物抑郁症模型在活化光响应性视蛋白的光存在下表现出抑郁症症状。在其它情况下,主题非人类动物抑郁症模型在活化光响应性视蛋白的光缺乏时表现出抑郁症症状。

[0041] 主题非人类动物抑郁症模型可用于分析试验试剂对多种不良心理和生理状态的任一种的影响,包括但不限于烦躁不安、抑郁、快感缺失、自杀、激动、焦虑、药物成瘾戒断症状等。在一些情况下,将减轻或缓和不良状态的试验试剂视为治疗心境障碍(例如,重性抑郁症(即,单相障碍)、躁狂、烦躁不安、双相障碍、心境恶劣、躁郁症等)的候选试剂。因此,虽然讨论了抑郁症,但是主题筛选方法可用于分析试验试剂对多种不良状态的任一种的影响。

响;并且鉴定的试验试剂可视为治疗多种心境障碍的任一种和其它不良心理和生理状态的候选试剂。

[0042] 非人类动物模型中抑郁症的症状包括(例如)逃避相关行为减轻、焦虑和应激。对抑郁症和/或焦虑和/或应激的试验包括强迫游泳试验(FST)(见,例如,Porsolt等(1977) *Nature* 266:730;和Petit-Demouliere, 等(2005) *Psychopharmacology* 177:245);悬尾试验(见,例如,Cryan 等(2005) *Neurosci. Behav. Rev.* 29:571;和Li等(2001) *Neuropharmacol.* 40:1028);条件性位置厌恶(见,例如,Bechtholt-Gompf等(2010) *Neuropsychopharmacol.* 35:2049);新颖节食试验(Dulawa, 等(2005) *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29:771);社会失败应激试验(见,例如,Blanchard等(2001) *Physiol Behav.* 73:261-271;和Kudryavtseva等(1991) *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38:315);糖水偏好试验(见,例如,Kurre Nielsen, 等(2000) *Behavioural Brain Research* 107:21-33);旷场试验(见,例如,Holmes(2001) *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25:261-273);高架十字迷宫试验(见,例如,Holmes(2001)同上);等等。

[0043] 将包含编码光响应性视蛋白的核苷酸序列的核酸引入非人类哺乳动物。本文将包含编码光响应性视蛋白的核苷酸序列的核酸也称为“异源核酸”或“转基因”。表达核酸,以致在非人类哺乳动物的神经元中合成光响应性视蛋白。

[0044] 光响应性视蛋白在暴露于激活波长(激活视蛋白的波长)的光时,可以促进在其中表达光响应性视蛋白的细胞(例如,神经元)的质膜超极化或去极化。例如,当在腹侧被盖区的多巴胺能(DA)神经元中表达光活化视蛋白时,并且当光活化视蛋白在激活波长的光存在下促进超极化时,抑制了DA神经元的活性。再如,当在腹侧被盖区的DA神经元中表达光活化视蛋白时,并且当光活化视蛋白在受激活波长的光激活时促进神经元去极化时,激活了DA神经元。再如,当在内侧前额叶皮质的兴奋性(谷氨酸能)神经元中表达光活化视蛋白时,并且当光活化视蛋白在受激活波长的光激活时促进神经元去极化时,激活了兴奋性神经元。

[0045] 在一些情况下,转基因整合到非人类哺乳动物的神经元基因组中。可靶向整合到基因组中,例如,转基因整合到基因组中的特定靶位点。可非靶向整合到基因组中,例如,转基因整合到基因组的随机位点。在其它情况下,转基因仍为附加体,例如,转基因未整合到非人类哺乳动物的基因组中。在一些情况下,在哺乳动物大体上所有细胞中存在转基因;在其它情况下,仅在哺乳动物一个亚类的细胞中存在转基因(例如,仅在哺乳动物的神经元细胞群中存在转基因)。当在哺乳动物大体上所有细胞中存在转基因时,在许多实施方案中,转基因仅在一个亚类的细胞中表达,例如仅在哺乳动物的神经元细胞中表达。

[0046] 向一个亚类的细胞中引入转基因

[0047] 如上所述,在一些情况下,仅在哺乳动物一个亚类的细胞中存在转基因(例如,包含编码光响应性视蛋白的核苷酸序列的核酸)。例如,在一些情况下,仅在脑细胞中存在转基因。在这些实施方案的一些中,将转基因整合到所述亚类的细胞的基因组中(随机整合位点或靶向整合位点)。在其它情况下,转基因仍为附加体。

[0048] 在一些情况下,编码光响应性视蛋白的核苷酸序列与为细胞类型特异性表达转基因而提供的转录控制元件可操作连接。例如,在一些情况下,编码光响应性视蛋白的核苷酸序列与为神经元特异性表达转基因而提供的控制元件(例如,启动子)可操作连接。在一些情况下,神经元特异性启动子是为在一个亚型的神经元,例如多巴胺能神经元、兴奋性神经

元、侧前额叶皮质神经元等中表达转基因而提供。

[0049] 在本领域中已知神经元特异性启动子和其它控制元件(例如,增强子)。适合的神经元特异性控制序列包括但不限于神经元特异性烯醇酶(NSE)启动子(见,例如,EMBL HSEN02、X51956);芳香族氨基酸脱羧酶(AADC)启动子;神经丝启动子(见,例如,GenBank HUMNFL, L04147);突触蛋白(synapsin)启动子(见,例如,GenBank HUMSYNIB, M55301);thy-1启动子(见,例如,Chen等(1987)Cell 51:7-19;和Llewellyn等(2010)Nat. Med. 16(10): 1161-1166);血清素受体启动子(见,例如,GenBank S62283);酪氨酸羟化酶启动子(TH)(见,例如,Oh等(2009)Gene Ther 16:437;Sasaoka等(1992)Mol. Brain Res. 16:274;Boundy等(1998)J. Neurosci. 18:9989;和Kaneda等(1991)Neuron 6:583-594);GnRH启动子(见,例如,Radovick等(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3402-3406);L7启动子(见,例如, Oberdick等(1990)Science 248:223-226);DNMT启动子(见,例如, Bartge等(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3648-3652);脑啡肽启动子(见,例如,Comb等(1988)EMBO J. 17:3793-3805);髓鞘碱性蛋白(MBP)启动子;Ca²⁺-钙调素依赖型蛋白激酶II- α (CamKII α)启动子(见,例如,Mayford等(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:13250;和 Casanova等(2001)Genesis 31:37);和CMV增强子/血小板源生长因子- β 启动子(见,例如,Liu等(2004)Gene Therapy 11:52-60)。

[0050] 可将转基因(例如,包含编码光响应性视蛋白的核苷酸序列的核酸)直接注入目标组织或目标组织附近,以为在目标组织中表达光响应性视蛋白而提供。例如,可将转基因注入脑部目标区域或附近,例如可将转基因注入前额皮质、腹侧被盖区等或附近。

[0051] 整合到合子或ES细胞的基因组中

[0052] 另一方面,本发明提供了其基因组包含转基因(例如,包含编码光响应性视蛋白的核苷酸序列的核酸)的合子或胚胎干(ES)细胞。可通过任何标准方法,例如全部以引用的方式并入本文的Hogan等, "Manipulating the Mouse Embryo", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986;Kraemer等, "Genetic Manipulation of the Early Mammalian Embryo", Cold Spring harbor Laboratory Press, 1985;Wagner等, 美国专利第4,873,191号,Krimpenfort等, 美国专利第5,175,384号和 Krimpenfort等, Biotechnology, 9:88(1991)中描述的标准方法,将包含转基因的DNA构建体整合到转基因哺乳动物的基因组中。例如,可将转基因显微注射到非人类哺乳动物,例如小鼠、大鼠等的合子原核中。将注射的这些胚胎移植到假孕雌性的输卵管或子宫,由假孕雌性获得创始哺乳动物。创始哺乳动物(Fo)为转基因(杂合)并且可与相同物种的非转基因哺乳动物交配以获得比例为1:1的F1非转基因和转基因后代。来自一个转基因哺乳动物系的杂合子哺乳动物可与来自不同转基因哺乳动物系的杂合子哺乳动物杂交以产生在两个基因座杂合的哺乳动物。通过标准技术,例如聚合酶链式反应、DNA印迹测定或本领域已知的其它方法鉴定基因组包含转基因的哺乳动物。

[0053] 在一些情况下,编码光响应性视蛋白的核苷酸序列与为细胞类型特异性表达转基因而提供的转录控制元件可操作连接。例如,在一些情况下,编码光响应性视蛋白的核苷酸序列与为神经元特异性表达转基因而提供的控制元件(例如,启动子)可操作连接。在一些情况下,神经元特异性启动子是为在一个亚型的神经元,例如多巴胺能神经元、兴奋性神经元、侧前额叶皮质神经元等中表达转基因而提供。示例性启动子包括以上列出的启动子。

[0054] 光响应性视蛋白

[0055] 光遗传学指以为与功能完整的生物系统保持同步所需的瞬时精度(毫秒级),用于控制活组织靶细胞中,甚至自由移动的哺乳动物或其它动物中的特定事件的遗传和光学方法的组合。光遗传学需要向靶神经元细胞的质膜引入允许瞬时精确操纵神经元膜电位,同时通过使用特异性靶向机制维持细胞类型分辨率的快速光响应性通道或泵蛋白。可用于响应于光促进神经细胞膜超极化或去极化的任何微生物视蛋白均可使用。例如,盐细菌视紫红质家族的光响应性氯泵(例如, NpHR、NpHR2.0、NpHR3.0、NpHR3.1)和GtR3质子泵均可用于响应于光促进神经细胞膜超极化。另外,视紫红质通道蛋白家族的光响应性阳离子通道蛋白的成员(例如,ChR2、SF0、SSFO、C1V1)可用于响应于光刺激促进神经细胞膜去极化或去极化诱导的突触损耗。

[0056] 光响应性氯泵

[0057] 在一些情况下,在非人类动物模型的神经细胞中表达的光响应性视蛋白为光敏离子泵,例如光响应性氯泵。例如,光响应性氯泵的盐细菌视紫红质家族的一个或多个成员在神经细胞的质膜上表达。在一些实施方案中,一种或多种光响应性氯泵在VTA中神经元的质膜上表达。在其它实施方案中,一种或多种光响应性氯泵在mPFC中神经元的质膜上表达。

[0058] 在一些方面,在上述神经元质膜上表达的所述一种或多种光响应性氯泵蛋白可源自盐碱单孢菌(*Natronomonas pharaonis*)。在一些实施方案中,当用琥珀色光或红光照射光响应性氯泵蛋白时,光响应性氯泵蛋白可对琥珀色光以及红光有响应性并且可在神经细胞中介导超极化电流。可激活光响应性氯泵的光的波长可介于约580nm和630nm 之间。在一些实施方案中,所述光波长可为约589nm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630nm左右。在一些实施方案中,光响应性氯泵蛋白在暴露于连续光脉冲时可超极化神经膜至少约90min。在一些实施方案中,光响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,光响应性氯泵蛋白可包含引入天然氨基酸序列的取代、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/或增强或降低光响应性蛋白调节细胞质膜极化状态的能力。在一些实施方案中,光响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,光响应性蛋白含有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/或插入的光响应性蛋白适当地保留了响应于光使神经元细胞质膜超极化的能力。

[0059] 另外,在其它方面,光响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%相同的氨基酸序列和内质网(ER)输出信号序列。这种ER输出信号序列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输出信号序列通过接头与核心氨基酸序列连接。所述接头可包含长度约5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400 或500个氨基酸的任何多个。所述接头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输出信号序列可包含氨基酸序列FXYENE (SEQ ID NO:12),其中X可为任何氨基酸。在另一实施方案中,ER 输出信号序列可包含氨基酸序列可包含氨基酸序列VXXSL,其中X 可为任何氨基酸。在一些实施方案中,ER输出信号序列可包含氨基酸序列FCYENEV (SEQ ID NO:13)。

[0060] 适合用于经修饰视蛋白中的内质网 (ER) 输出序列包括 (例如) VXXSL (其中X为任何氨基酸) (例如, VKESL (SEQ ID NO:14); VLGSL (SEQ ID NO:15) 等); NANSFCYENEVALTSK (SEQ ID NO:16); FXYENE (SEQ ID NO:12; 其中X为任何氨基酸), 例如 FCYENEV (SEQ ID NO:13); 等等。ER输出序列的长度可为约5个氨基酸至约25个氨基酸, 例如约5个氨基酸至约10个氨基酸, 约 10个氨基酸至约15个氨基酸, 约15个氨基酸至约20个氨基酸, 或约20个氨基酸至约25个氨基酸。

[0061] 在其它方面, 在本发明的非人类动物模型的神经元中表达的光响应性氯泵蛋白可包含在细胞膜上表达的光响应性蛋白, 其中所述蛋白质包含与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序列 (例如, 可增强光响应性氯泵蛋白向质膜的转运的运输信号序列)。运输信号序列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, 运输信号序列可通过接头与核心氨基酸序列连接, 所述接头可包含长度约5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400或500个氨基酸的任何多个。所述接头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, 运输信号序列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, 运输信号序列可包含氨基酸序列 KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO:17)。

[0062] 在一些方面, 光响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选自以下, 增强向哺乳动物细胞质膜的转运的至少一个 (例如1、2、3个或更多个) 氨基酸序列基序: ER输出信号序列、信号肽和膜运输信号序列。在一些实施方案中, 光响应性氯泵蛋白包含N端信号肽、C端ER输出信号序列和C端运输信号序列。在一些实施方案中, C端ER输出信号序列和C端运输信号序列可通过接头连接。所述接头可包含长度约5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400或500个氨基酸的任何多个。所述接头还可进一步包含荧光蛋白, 例如但不限于黄色荧光蛋白、红色荧光蛋白、绿色荧光蛋白或青色荧光蛋白。在一些实施方案中ER输出信号序列可比运输信号序列更靠近C端。在其它实施方案中运输信号序列比ER输出信号序列更靠近C端。在一些实施方案中信号肽包含氨基酸序列 MTETLPPVTESAVALQAE (SEQ ID NO:18)。在另一实施方案中, 光响应性氯泵蛋白包含与SEQ ID NO:2至少95%相同的氨基酸序列。

[0063] 而且, 在其它方面, 光响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)。光响应性蛋白可进一步包含本文所述的ER转运信号序列和/或膜运输信号序列。在一些实施方案中, 光响应性氯泵蛋白包含与SEQ ID NO:3至少95%相同的氨基酸序列。

[0064] 在一些实施方案中, 光响应性视蛋白为与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) 输出信号序列和/或膜运输信号序列。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) 输出信号序列。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接头与ER输出信号序列连接。在一些实施方案中,ER输出信号序列包含氨基酸序列 FXYENE (SEQ ID NO:12),其中X可为任何氨基酸。在另一实施方案中,ER输出信号序列包含氨基酸序列 VXXSL,其中X可为任何氨基酸。在一些实施方案中,ER输出信号序列包含氨基酸序列 FCYENEV (SEQ ID NO:13)。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 输出信号序列和膜运输信号序列。在其它实施方案中,NpHR视蛋白从N端到C端包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%相同的氨基酸序列、ER输出信号序列和膜运输信号序列。在其它实施方案中,NpHR视蛋白从N端到C端包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%相同的氨基酸序列、膜运输信号序列和ER输出信号序列。在一些实施方案中,膜运输信号序列源自人内向整流钾通道Kir2.1的氨基酸序列。在一些实施方案中,膜运输信号序列包含氨基酸序列K S R I T S E G E Y I P L D Q I D I N V (SEQ ID NO:17)。在一些实施方案中,膜运输信号序列通过接头和与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,膜运输信号序列通过接头与ER输出信号序列连接。所述接头可包含长度约5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400或500个氨基酸的任何多个。所述接头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,光响应性视蛋白进一步包含N端信号肽。在一些实施方案中,光响应性视蛋白包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在一些实施方案中,光响应性视蛋白包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0065] 在一些情况下,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输出信号序列和膜运输信号序列的光响应性蛋白可用于生成本公开的非人类动物模型。

[0066] 在美国专利申请公布第2009/0093403和2010/0145418号及国际专利公布第WO 2011/116238号中可找到关于光响应性氯泵蛋白的更多公开内容,其各自的公开内容据此以引用的方式整体并入。

[0067] 光响应性质子泵

[0068] 在一些方面,在本公开的非人类动物模型的神经元质膜上表达一种或多种光响应性质子泵。在一些实施方案中,光响应性质子泵蛋白可对蓝光有响应性并且可源自蓝隐藻 (*Guillardia theta*),其中在用蓝光照射细胞时所述质子泵蛋白能够在细胞中介导超极化电流。所述光的波长可介于约450和约495nm之间或波长可为约490nm。在其它实施方案中,光响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。光响应性质子泵蛋白可另外包含引入天然氨基酸序列的取代、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/或增强或降低光响应性质子泵蛋白调节细胞质膜极化状态的能力。另外,光响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的取代、缺失和/或插入的光响应性质子泵蛋白适当地保留了响应于光使神经元细胞质膜超极化的能力。

[0069] 在本文公开的方法的其它方面,光响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选自以下,增强向哺乳动物细胞质膜的转运的至少一个(例如1、2、3个或更

多个)氨基酸序列基序:信号肽、ER输出信号序列和膜运输信号序列。在一些实施方案中,光响应性质子泵蛋白包含N端信号肽和C端ER 输出信号序列。在一些实施方案中,光响应性质子泵蛋白包含N端信号肽和C端运输信号序列。在一些实施方案中,光响应性质子泵蛋白包含N端信号肽、C端ER输出信号序列和C端运输信号序列。在一些实施方案中,光响应性质子泵蛋白包含C端ER输出信号序列和C端运输信号序列。在一些实施方案中,C端ER输出信号序列和C 端运输信号序列可通过接头连接。所述接头可包含长度约5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400或500个氨基酸的任何多个。所述接头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输出信号序列比运输信号序列更靠近 C端。在一些实施方案中运输信号序列比ER输出信号序列更靠近C 端。

[0070] 在国际专利申请第PCT/US2011/028893号中可找到关于光响应性质子泵蛋白的更多公开内容,其公开内容据此以引用的方式整体并入。

[0071] 光响应性阳离子通道蛋白

[0072] 在一些方面,在主题非人类动物模型的神经元质膜上表达一种或多种光响应性阳离子通道。在一些方面,光响应性阳离子通道蛋白可源自莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*),在用光照射细胞时所述阳离子通道蛋白能够在细胞中介导去极化电流。在另一实施方案中,光响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。用于激活源自莱茵衣藻的光响应性阳离子通道蛋白的光的波长可介于约460和约495nm之间或波长可为约480nm。另外,所述光的强度可为至少约100Hz。在一些实施方案中,用强度为100Hz的光激活源自莱茵衣藻的光响应性阳离子通道蛋白可引起去极化诱导的表达光响应性阳离子通道的神经元的突触损耗。光响应性阳离子通道蛋白可另外包含引入天然氨基酸序列的取代、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/或增强或降低光响应性阳离子通道蛋白调节细胞质膜极化状态的能力。另外,光响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的取代、缺失和/或插入的光响应性质子泵蛋白适当地保留了响应于光使神经元细胞质膜去极化的能力。

[0073] 在美国专利申请公布第2007/0054319号和国际专利申请公布第 WO 2009/131837和WO 2007/024391号中可找到关于光响应性阳离子通道蛋白的更多公开内容,其各自的公开内容据此以引用的方式整体并入。

[0074] 阶跃函数视蛋白和稳定阶跃函数视蛋白

[0075] 在一些情况下,光响应性阳离子通道蛋白可为阶跃函数视蛋白(SF0)或稳定阶跃函数视蛋白(SSF0),其可在蛋白质的整个视网膜结合口袋的关键位置具有特定氨基酸取代。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,SF0蛋白在SEQ ID NO:5中具有C128T突变。在一些实施方案中,SF0蛋白可包含与SEQ ID NO:6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。

[0076] 在一些实施方案中,SSF0蛋白可在SEQ ID NO:5的氨基酸残基 D156处有突变。在

其它实施方案中,SSF0蛋白可在SEQ ID NO:5 的氨基酸残基C128和D156处有突变。在一个实施方案中,SSF0蛋白在SEQ ID NO:5中具有C128S和D156A突变。在另一实施方案中,SSF0蛋白可包含与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。

[0077] 在一些实施方案中,在用蓝光照射细胞时SF0或SSF0蛋白能够在细胞中介导去极化电流。在其它实施方案中,所述光的波长可为约445nm。另外,光的强度可为约100Hz。。在一些实施方案中,用强度为100Hz的光激活SF0或SSF0蛋白可引起去极化诱导的表达 SF0或SSF0蛋白的神经元的突触损耗。在一些实施方案中,公开的每种阶跃视蛋白和稳定阶跃视蛋白可具有用于响应于光使神经元细胞膜去极化的特定性质和特征。

[0078] 在国际专利申请公布第WO 2010/056970号和美国临时专利申请第61/410,704和61/511,905号中可找到关于SF0或SSF0蛋白的更多公开内容,其各自的公开内容据此以引用的方式整体并入。

[0079] C1V1嵌合阳离子通道

[0080] 在一些情况下,光响应性阳离子通道蛋白可为源自团藻(*Volvox carteri*)的VChR1蛋白和来自莱茵衣藻的ChR1蛋白的C1V1嵌合蛋白,其中所述蛋白质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;对光有响应性;并且在用光照射细胞时能够在细胞中介导去极化电流。在一些实施方案中,C1V1蛋白可在位于嵌合光响应性蛋白的第二和第三跨膜螺旋之间的细胞内环状结构域中进一步包含置换,其中至少一部分细胞内环状结构域经来自ChR1的相应部分置换。在另一实施方案中,C1V1嵌合蛋白的细胞内环状结构域的所述部分可经来自ChR1的延伸到ChR1的氨基酸残基A145的相应部分置换。在其它实施方案中,C1V1嵌合蛋白可在嵌合光响应性蛋白的第三跨膜螺旋中进一步包含置换,其中至少一部分第三跨膜螺旋经ChR1的相应序列置换。在再一实施方案中,C1V1嵌合蛋白的细胞内环状结构域的所述部分可经来自ChR1的延伸到ChR1的氨基酸残基W163的相应部分置换。在其它实施方案中,C1V1嵌合蛋白可包含与SEQ ID NO:8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。

[0081] 在一些实施方案中,在用绿光照射细胞时C1V1蛋白可在细胞中介导去极化电流。在其它实施方案中,所述光的波长可介于约540nm 和约560nm之间。在一些实施方案中,所述光的波长可为约542nm。在一些实施方案中,在用紫光照射细胞时C1V1嵌合蛋白不能够在细胞中介导去极化电流。在一些实施方案中,在用波长为约405nm的光照射细胞时C1V1嵌合蛋白不能够在细胞中介导去极化电流。另外,所述光的强度可为约100Hz。在一些实施方案中,用强度为100Hz 的光激活C1V1嵌合蛋白可引起去极化诱导的表达C1V1嵌合蛋白的神经元的突触损耗。在一些实施方案中,公开的C1V1嵌合蛋白可具有用于响应于光使神经元细胞膜去极化的特定性质和特征。

[0082] C1V1嵌合突变变体

[0083] 在一些适合使用的光响应性视蛋白中可包含经取代或突变的氨基酸序列,其中突变多肽保留了前体C1V1嵌合多肽的特征光响应特性,但是也可能具有在某些特定方面改变的性质。例如,突变光响应性C1V1嵌合蛋白可表现出在动物细胞内或在动物细胞质膜上表达水平升高;当暴露于不同波长的光,特别是红光时响应性改变;和/或性状组合,从而嵌合

C1V1多肽具有低脱敏作用、快速失活、低紫光激活,以致与其它光响应性阳离子通道中交叉激活作用最低,和/或在动物细胞中强烈表达的性质。

[0084] 例如,在嵌合多肽VChR1部分的整个视网膜结合口袋的关键位置具有特定氨基酸取代C1V1嵌合光响应性视蛋白适合使用。在一些实施方案中,C1V1蛋白可在SEQ ID NO:7的氨基酸残基E122处有突变。在一些实施方案中,C1V1蛋白可在SEQ ID NO:7的氨基酸残基E162处有突变。在其它实施方案中,C1V1蛋白可在SEQ ID NO:7 的氨基酸残基E122和E162处有突变。在其它实施方案中,C1V1蛋白可包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO: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。在一些实施方案中,公开的每种突变C1V1嵌合蛋白可具有用于响应于光使动物细胞膜去极化的特定性质和特征。

[0085] 在一些方面,在用光照射细胞时C1V1-E122突变嵌合蛋白能够在细胞中介导去极化电流。在一些实施方案中,所述光可为绿光。在其它实施方案中,所述光的波长可介于约540nm至约560nm之间。在一些实施方案中,所述光的波长可为约546nm。在其它实施方案中,在用红光照射细胞时C1V1-E122突变嵌合蛋白可以在细胞中介导去极化电流。在一些实施方案中,红光的波长可为约630nm。在一些实施方案中,在用紫光照射细胞时C1V1-E122突变嵌合蛋白未在细胞中介导去极化电流。在一些实施方案中,在用波长为约405nm的光照射细胞时嵌合蛋白未在细胞中介导去极化电流。另外,所述光的强度可为约100Hz。在一些实施方案中,用强度为100Hz的光激活 C1V1-E122突变嵌合蛋白可引起去极化诱导的表达C1V1-E122突变嵌合蛋白的神经元的突触损耗。在一些实施方案中,公开的 C1V1-E122突变嵌合蛋白可具有用于响应于光使神经元细胞膜去极化的特定性质和特征。

[0086] 在其它方面,在用光照射细胞时C1V1-E162突变嵌合蛋白能够在细胞中介导去极化电流。在一些实施方案中,所述光可为绿光。在其它实施方案中,所述光的波长可介于约540nm至约535nm之间。在一些实施方案中,所述光的波长可为约542nm。在其它实施方案中,所述光的波长可为约530nm。在一些实施方案中,在用紫光照射细胞时C1V1-E162突变嵌合蛋白未在细胞中介导去极化电流。在一些实施方案中,在用波长为约405nm的光照射细胞时嵌合蛋白未在细胞中介导去极化电流。另外,所述光的强度可为约100Hz。在一些实施方案中,用强度为100Hz的光激活C1V1-E162突变嵌合蛋白可引起去极化诱导的表达C1V1-E162突变嵌合蛋白的神经元的突触损耗。在一些实施方案中,公开的C1V1-E162突变嵌合蛋白可具有用于响应于光使神经元细胞膜去极化的特定性质和特征。

[0087] 还有其它方面,在用光照射细胞时C1V1-E122/E162突变嵌合蛋白能够在细胞中介导去极化电流。在一些实施方案中,所述光可为绿光。在其它实施方案中,所述光的波长可介于约540nm至约560nm 之间。在一些实施方案中,所述光的波长可为约546nm。在一些实施方案中,在用紫光照射细胞时C1V1-E122/E162突变嵌合蛋白未在细胞中介导去极化电流。在一些实施方案中,在用波长为约405nm的光照射细胞时嵌合蛋白未在细胞中介导去极化电流。在一些实施方案中,当暴露于紫光时,相对于在E122/E162没有突变的C1V1嵌合蛋白或相对于其它光响应性阳离子通道蛋白,C1V1-E122/E162突变嵌合蛋白可表现出更低的激活作用。另外,所述光的强度可为约100Hz。在一些实施方案中,用强度为100Hz的光激活C1V1-E122/E162突变嵌合蛋白可引起去极化诱导的表达C1V1-E122/E162突变嵌合蛋白的神经元的突触损耗。在一些实施方案中,公开的C1V1-E122/E162突变嵌合蛋白可具有用于

响应于光使神经元细胞膜去极化的特定性质和特征。

[0088] 在美国临时专利申请第61/410,736、61/410,744和61/511,912号中可找到关于C1V1嵌合阳离子通道及其突变变体的更多公开内容,其各自的公开内容据此以引用的方式整体并入。

[0089] 序列

[0090] 无信号肽的NpHR的氨基酸序列:

[0091] VTQRELFEFVLNDPLLASSLYINIALAGLSILLFVFMTRGLDDPRAKLIAVSTILVPVVSIASTYGLASGLTISVLEMPAGHFAEGSSVMLGGEEVDGVVTMWGRYLTWALSTPMILLALGLLAGSNATKLFTAITFDIAMCVTGLAAALTTSSHLMRWFWYAI SCACFLVVLYILLVEWAQDAKAA GTADMFNTLKLLTVVMWLGYPVWALGVEGIAVLPVGVT SWGYSFLDIVAKYIFAFLLLNY LTSNESVVS GSILDVPSASGTPADD (SEQ ID NO:1)

[0092] eYFP-NpHR3.0的氨基酸序列:

[0093] MTETLPPVTESAVALQAEVTQRELFEFVLNDPLLASSLYINIALAGLSILLFVFMTRGLDDPRAKLIAVSTILVPVVSIASTYGLASGLTISVLEMPAGHFAEGSSVMLGGEEVDGVVTMWGRYLTWALSTPMILLALGLLAGSNATKLFTAITFDIAMCVTGLAAALTTSSHLMRWFWYAI SCACFLVVLYILLVEWAQDAKAA GTADMFNTLKLLTVVMWLGYPVWALGVEGIAVLPVGVT SWGYSFLDIVAKYIFAFLLLNY LTSNESVVS GSILDVPSASGTPADDAAAKSRITSEGEYIPLDQIDINVVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWP TLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNIKGHKLEYNYNSHN VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQ NTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALS KDPNEKRDMVLLEFVTAAGITLGMDELYKFCYENEV (SEQ ID NO:2)

[0094] eYFP-NpHR3.1的氨基酸序列:

[0095] MVTQRELFEFVLNDPLLASSLYINIALAGLSILLFVFMTRGLDDPRAKLIAVSTILVPVVSIASTYGLASGLTISVLEMPAGHFAEGSSVMLGGEEVDGVVTMWGRYLTWALSTPMILLALGLLAGSNATKLFTAITFDIAMCVTGLAAALTTSSHLMRWFWYAI SCACFLVVLYILLVEWAQDAKAA GTADMFNTLKLLTVVMWLGYPVWALGVEGIAVLPVGVT SWGYSFLDIVAKYIFAFLLLNY LTSNESVVS GSILDVPSASGTPADDAAAKSRITSEGEYIPLDQIDINVVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWP TLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNI LGHKLEYNYNSHN VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQ NTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALS KDPNEKRDMVLLEFVTAAGTTLGMDELYKFCYENEV (SEQ ID NO:3)

[0096] GtR3的氨基酸序列:

[0097] ASSFGKALLEFVFVIFACTTLLLGINA AKSKAASRVLPATFVTG IASIA YFSMASGGGWVIAPDCRQLFVARYL

[0098] DWLTTTPLL LLDLGLVAGVSRWDIMALCLSDVLM IATGAFGSLTVGNVKVWVWFFGMCWF LHIIFALGKSWAEAAKAKGGDSASVYSKIAGITVITWFCYPVWVFAEGFGNFSVTFEVLIYG VLDVISKAVFGLILMSG AATGYESI (SEQ ID NO:4)

[0099] Chr2的氨基酸序列:

[0100] MDYGGALS AVGRELLFVTNPVVVNGSVLPEDQCYCAGWIESRG TNGAQTASNVLQWLAA

GFSILLLMFYAYQTWKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLRYA
EWLLTCPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCGLGLCYG
ANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMPILFILGPEGFGVLSVYGSTV
GHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILLHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAGAVP (SEQ ID NO:5)

[0101] SFO的氨基酸序列:

[0102] MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAA
GFSILLLMFYAYQTWKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLRYA
EWLLTSPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSDIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCGLGLCYG
ANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMPILFILGPEGFGVLSVYGSTV
GHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAGAVP (SEQ ID NO:6)

[0103] SSFO的氨基酸序列:

[0104] MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNGAQTASNVLQWLAA
GFSILLLMFYAYQTWKSTCGWEEIYVCAIEMVKVILEFFFEFKNPSMLYLATGHRVQWLRYA
EWLLTSPVILIHLSNLTGLSNDYSRRTMGLLVSAIGTIVWGATSAMATGYVKVIFFCGLGLCYG
ANTFFHAAKAYIEGYHTVPKGRCRQVVTGMAWLFFVSWGMPILFILGPEGFGVLSVYGSTV
GHTIIDLMSKNCWGLLGHYLRVLIHEHILIHGDIRKTTKLNIGGTEIEVETLVEDEAEAGAVP (SEQ ID NO:7)

[0105] C1V1的氨基酸序列:

[0106] MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYT
LENNGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKS
TCGWEEIYVATIEMIKFIIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKT VWLRYAEWLLTCPVLLIHLSNL
TGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWT KILFFLISLSYGYMYTYFHAAKVY
IEAFHTVPKGICRELVRVMAWTF FVAWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILD LIAK
NMWGV LGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEME VETLV AEEED (SEQ ID NO:8)

[0107] C1V1 (E122T) 的氨基酸序列:

[0108] MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYTLEN
NGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKSTCGWE
TTYVATTEMIKFIIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKT VWLRYAEWLLTCPVLLIHLSNLTGLKDDYS
KRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWT KILFFLISLSYGYMYTYFHAAKVYIEAFHTVPKGIC
RELVRVMAWTF FVAWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILD LIAK NMWGV LGNYLRV
KIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMHVETLV AEEED (SEQ ID NO:9)

[0109] C1V1 (E162T) 的氨基酸序列:

[0110] MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYT
LENNGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKS
TCGWEEIYVATIFMIKFIIIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKT VWLRYATWLLTCPVLLIHLSNL
TGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWT KILFFLISLSYGYMYTYFHAAKVY
IEAFHTVPKGICRELVRVMAWTF FVAWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSILD LIAK
NMWGV LGNYLRVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEME VETLV AEEED (SEQ ID NO:10)

[0111] C1V1 (E122T/E162T) 的氨基酸序列:

[0112] MSRRPWLLALALAVALAAGSAGASTGSDATVPVATQDGPDYVFHRAHERMLFQTSYT

LENNGSVICIPNNGQCFCLAWLKSNGTNAEKLAANILQWITFALSALCLMFYGYQTWKS
TCGWETIYVATIEMIKFIEYFHEFDEPAVIYSSNGNKTWVWLRATWLLTCPVLLIHLSNL
TGLKDDYSKRTMGLLVSDVGCIVWGATSAMCTGWTKILFFLISLSYGYMYTFHAAKVY
IEAFHTVPGKICRELVRVMAWTFVVAWGMFPVLFLLGTEGFGHISPYGSAIGHSLDLIAK
NMWGVNLGRVVKIHEHILLYGDIRKKQKITIAGQEMEVELVAEEED (SEQ ID NO:11)

[0113] 修饰

[0114] 光响应性视蛋白可包含各种修饰,例如添加一个或多个增强相哺乳动物细胞质膜的转运的氨基酸序列基序。哺乳动物细胞可能不表达或耐受具有源自进化较简单的生物的组分的光响应性视蛋白或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,细胞中表达的光响应性视蛋白可与选自信号肽、内质网(ER)输出信号序列、膜运输信号序列和/或N端高尔基输出信号序列的一个或多个氨基酸序列基序融合。增强光响应性蛋白向哺乳动物细胞质膜转运的所述一个或多个氨基酸序列基序可与光响应性蛋白的N端、C端或N端和C端融合。任选地,光响应性蛋白和所述一个或多个氨基酸序列基序可被接头分开。在一些实施方案中,可通过添加增强蛋白质向细胞质膜的转运的运输信号序列(ts)修饰光响应性蛋白。在一些实施方案中,运输信号序列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,运输信号序列可包含氨基酸序列 KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO:17)。

[0115] 适合使用的运输序列可包含与诸如人内向整流钾通道Kir2.1的运输序列(例如 KSRITSEGEYIPLDQIDINV;SEQ ID NO:17)的氨基酸序列有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0116] 运输序列的长度可从约10个氨基酸至约50个氨基酸,例如从约 10个氨基酸至约20个氨基酸,从约20个氨基酸至约30个氨基酸,从约30个氨基酸至约40个氨基酸,或从约40个氨基酸至约50个氨基酸。

[0117] 适合使用的信号序列可包含与例如下列之一的氨基酸序列有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

[0118] 1) hChr2的信号肽(例如,MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVN GS;SEQ ID NO:19);

[0119] 2) 神经元烟碱型乙酰胆碱受体的 $\beta 2$ 亚基信号肽(例如, MAGHSNSMALFSFSLWLCGVLGTEF;SEQ ID NO:20);

[0120] 3) 烟碱型乙酰胆碱受体信号序列(例如, MGLRALMLWLLAAAGLVRESLQG;SEQ ID NO:21);和

[0121] 4) 烟碱型乙酰胆碱受体信号序列(例如, MRGTPLLLVVSLSLQD;SEQ ID NO:22)。

[0122] 信号序列的长度可从约10个氨基酸至约50个氨基酸,例如从约 10个氨基酸至约20个氨基酸,从约20个氨基酸至约30个氨基酸,从约30个氨基酸至约40个氨基酸,或从约40个氨基酸至约50个氨基酸。

[0123] 适合用于本公开的经修饰视蛋白中的内质网(ER)输出序列包括(例如)VXXSL(其中X为任何氨基酸)(例如,VKESL (SEQ ID NO:14)、VLGSL (SEQ ID NO:15)等); NANSFCYENEVALTSK (SEQ ID NO:16); FXYENE (SEQ ID NO:12) 其中X为任何氨基酸),例如, FCYENEV (SEQ ID NO:13);等等。ER输出序列的长度可从约5个氨基酸至约25个氨基酸,例如约5个氨基酸至约10个氨基酸,约10个氨基酸至约15个氨基酸,约15个氨基酸至约20个氨

基酸,或约 20个氨基酸至约25个氨基酸。

[0124] 在美国专利申请第12/041,628号中公开了另外的可增强光响应性蛋白向细胞质膜转运的蛋白质基序,其以引用的方式整体并入本文。在一些实施方案中,蛋白质中的信号肽序列可缺失或经来自不同蛋白质的信号肽序列取代。

[0125] 融合

[0126] 在一些情况下,光活化视蛋白为融合蛋白,例如光活化视蛋白包含例如在氨基末端和/或羧基末端和/或光活化视蛋白内的异源氨基酸(例如,融合伴侣)。例如,融合蛋白可包括光活化视蛋白和融合伴侣,其中适合的融合伴侣包括酶、荧光蛋白、表位标签等。

[0127] 可与主题抗体连接的适合荧光蛋白包括但不限于来自维多利亚多管发光水母(*Aequoria victoria*)的绿色荧光蛋白(GFP)或其突变体或衍生物,例如美国专利第6,066,476、6,020,192、5,985,577、5,976,796、5,968,750、5,968,738、5,958,713、5,919,445、5,874,304号中所述,例如增强型GFP,许多此类GFP市场上可买到,例如来自Clontech, Inc.;红色荧光蛋白;黄色荧光蛋白(YFP);来自珊瑚物种的多种荧光和有色蛋白的任一种,例如Matz等(1999)*Nature Biotechnol.* 17:969-973中所述;mCherry;增强型GFP、增强型YFP;等等。

[0128] 核酸

[0129] 包含编码光响应性蛋白的核苷酸序列的多核苷酸可用于生成主题非人类动物模型。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,多核苷酸为包含上述核酸的载体。在一些实施方案中,编码光响应性视蛋白的核酸与启动子可操作连接。启动子在本领域中众所周知。在宿主细胞中起作用的任何启动子均可用于表达光响应性视蛋白和/或其任何变体。在一个实施方案中,用于驱动光响应性视蛋白表达的启动子可为对多巴胺能神经元有特异性的启动子。在其它实施方案中,所述启动子能够驱动光响应性视蛋白在兴奋性神经元中表达。对驱动光响应性视蛋白或其变体在特定动物细胞中表达有用的起始控制区或启动子有许多并且为本领域的技术人员熟知。实际上可以使用能够驱动这些核酸的任何启动子。

[0130] 在本领域中已知神经元特异性启动子和其它控制元件(例如,增强子)。适合的神经元特异性控制序列包括但不限于神经元特异性烯醇酶(NSE)启动子(见,例如,EMBL HSEN02、X51956);芳香族氨基酸脱羧酶(AADC)启动子;神经丝启动子(见,例如,GenBank HUMNFL, L04147);突触蛋白(synapsin)启动子(见,例如,GenBank HUMSYNIB, M55301);thy-1启动子(见,例如,Chen等(1987)*Cell* 51:7-19;和Llewellyn等(2010)*Nat. Med.* 16(10):1161-1166);血清素受体启动子(见,例如,GenBank S62283);酪氨酸羟化酶启动子(TH)(见,例如,Oh等(2009)*Gene Ther* 16:437;Sasaoka等(1992)*Mol. Brain Res.* 16:274;Boundy等(1998)*J. Neurosci.* 18:9989;和Kaneda等(1991)*Neuron* 6:583-594);GnRH启动子(见,例如,Radovick等(1991)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3402-3406);L7启动子(见,例如, Oberdick等(1990)*Science* 248:223-226);DNMT启动子(见,例如, Bartge等(1988)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3648-3652);脑啡肽启动子(见,例如,Comb等(1988)*EMBO J.* 17:3793-3805);髓鞘碱性蛋白(MBP)启动子;Ca²⁺-钙调素依赖型蛋白激酶II- α (CamKII α)启动子(见,例如,Mayford等(1996)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13250;和Casanova等(2001)*Genesis* 31:37);和CMV增强子/血小板源生长因子- β 启动子(见,例如,Liu等(2004)

Gene Therapy 11:52-60)。

[0131] 在一些实施方案中,用于驱动光响应性蛋白表达的启动子可为 Thy1 启动子,其能够驱动转基因在神经元中稳健表达(见,例如, Llewellyn 等(2010) Nat. Med. 16 (10) :1161-1166)。在其它实施方案中,用于驱动光响应性蛋白表达的启动子可为 EF1 α 启动子、巨细胞病毒 (CMV) 启动子、CAG 启动子、突触蛋白启动子或能够驱动光响应性视蛋白在哺乳动物神经元中表达的任何其它普遍存在的启动子。

[0132] 在一些情况下,核酸为包含转基因(例如本文所述编码光响应性蛋白的核苷酸序列或其任何变体)的表达载体。可施用的载体包括包含编码在由载体的多核苷酸转录时,会导致光响应性视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、单纯疱疹病毒 (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。慢病毒可能经其它病毒的包膜蛋白假型化,包括但不限于 VSV、狂犬病、Mo-MLV、杆状病毒和埃博拉病毒 (Ebola)。可使用本领域的标准方法制备此类载体。

[0133] 在一些实施方案中,所述载体为重组 AAV 载体。AAV 载体为尺寸相对较小,可以稳定且定点的方式整合到其感染的细胞基因组中的 DNA 病毒。AAV 载体能够感染大范围的细胞,而不引起对细胞生长、形态或分化的任何影响,并且其似乎不牵涉人体病理学。已经克隆、测序和表征了 AAV 基因组。其涵盖大约 4700 个碱基并且每个末端含有用作病毒复制起点的大约 145 个碱基的反向末端重复 (ITR) 区。基因组其余部分分为两个带有衣壳化功能的基本区域:基因组左手部分,其含有涉及病毒复制和病毒基因表达的 rep 基因;和基因组右手部分,其含有编码病毒衣壳蛋白的 cap 基因。

[0134] 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 Virology 3:1, 1974; P. Tattersall "The Evolution of Parvovirus Taxonomy" In Parvoviruses (JR Kerr, SF Cotmore, ME Bloom, RM Linden, CR Parrish 编辑) 第 5-14 页, Huddersfield, 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, Huddersfield, London, UK (2006), 其各自的公开内容据此以引用的方式整体并入本文)。例如,在美国专利第 6,566,118、6,989,264 和 6,995,006 号和标题为 "Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors" 的 WO/1999/011764 中可找到纯化载体的方法,其公开内容以引用的方式整体并入本文。例如,在 PCT 公布第 PCT/US2005/027091 号中描述了杂交载体的制备,其公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0135] 已经描述了源自 AAV 的载体用于体外和体内转染基因的用途(见例如,国际专利申请公布第 91/18088 和 WO 93/09239 号;美国专利第 4,797,368、6,596,535 和 5,139,941 号;和欧洲专利第 0488528 号,其公开内容据此以引用的方式整体并入本文)。这些出版物描述了其中 rep 和/或 cap 基因缺失且经目标基因置换的各种 AAV 源构建体和这些构建体用于体外(转染到培养的细胞中)或体内(直接转染到生物体内)转染目标基因的用途。可通过将含有两侧为两个 AAV 反向末端重复 (ITR) 区的目标核酸序列的质粒和携带 AAV 衣壳化基因 (rep 和 cap 基因) 的质粒共转染至经人类辅助病毒(例如腺病毒)感染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。

[0136] 在一些实施方案中,用于生成主题非人类动物模型的载体衣壳化为病毒颗粒(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)。生成此类颗粒的方法在本领域已知并且在美国专利第6,596,535号中有描述,其公开内容据此以引用的方式整体并入。

[0137] 光响应性视蛋白的递送

[0138] 在一些方面,用针、导管或相关装置,使用本领域已知的神经外科技术,例如通过立体定位注射(见,例如,Stein等,J.Virol,73:34 243429,1999;Davidson等,PNAS,97:3428-3432,2000;Davidson等,Nat.Genet.3:219-223,1993;和Alisky&Davidson,Hum.Genet.11:2315-2329,2000,其各自的内容据此以引用的方式整体并入)或荧光透视法将编码本文公开的光响应性视蛋白的多核苷酸(例如,AAV载体)直接递送到目标神经元中(例如,腹侧被盖区(VTA)的多巴胺能神经元;内侧前额叶皮质(mPFC)的兴奋性(谷氨酸能)神经元)。在一些实施方案中,可将编码本文公开的光响应性视蛋白的多核苷酸(例如,AAV1载体)递送到VTA的多巴胺能神经元。在其它实施方案中,可将编码本文公开的光响应性视蛋白的多核苷酸(例如,AAV载体)递送到mPFC的兴奋性(谷氨酸能)神经元。

[0139] 在一些方面,可用针、导管或相关装置,使用本领域已知的神经外科技术,例如通过立体定位注射或荧光透视法将编码本文公开的光响应性视蛋白的多核苷酸(例如,AAV载体)直接递送到目标神经元。

[0140] 将光响应性视蛋白递送到目标神经元的其它方法也可使用,例如但不限于用离子脂质或聚合物转染;电穿孔;光转染;穿刺转染(例如,使用纳米材料例如碳纳米纤维、碳纳米管、纳米线等;见,例如,Melechko等(2004) Nano Letters 4(7):第1213-1219页);或经由基因枪。

[0141] 在一些实施方案中,使用病毒载体,例如腺病毒、AAV2和狂犬病毒糖蛋白假型慢病毒,其中病毒载体为肌肉细胞吸收并且向后转运到神经元(见,例如,Azzouz等,2009, Antioxid Redox Signal., 11(7):1523-34;Kaspar等,2003, Science,301(5634):839-842;Manabe等,2002.Apoptosis,7(4):329-334)。

[0142] 光源和电源

[0143] 在本发明的一些方面,可用置于表达光响应性视蛋白的神经元或控制此类神经元的神经周围或附近的可植入光源(例如光袖套)或可植入电极激活本文公开的光响应性视蛋白。用外科手术置于神经周围或附近用于电刺激那些神经的电极袖套和电极在本领域众所周知(见,例如,美国专利第4,602,624、7,142,925和6,600,956号以及美国专利公布第2008/0172116和2010/0094372号,其各自的公开内容据此以引用的方式整体并入)。正如本领域中所知,光源(例如光袖套)或电极可由任何有用组成或组成混合物构成,例如铂或不锈钢,并且可能具有刺激在神经元或控制此类神经元的神经中表达的光响应性视蛋白的任何有用构造。例如,在mPFC的兴奋性(谷氨酸能)神经元中表达光响应性视蛋白时,光源可用于将光引到表达光响应性视蛋白的mPFC兴奋性(谷氨酸能)神经元上;或光源可用于将光引到为来自mPRC的几个投射靶标之一的中缝背核(DRN)上。

[0144] 可将电极或可植入光源(例如光袖套)置于表达光响应性视蛋白的神经元(例如,VTA的多巴胺能神经元或mPFC的兴奋性神经元)周围或附近;或可将电极或可植入光源置

于DRN周围或附近。本领域的技术人员可在使用本领域的已知技术将电极或可植入光源置于脑部区域周围或附近之前,鉴定适合放置电极或可植入光源的脑部区域。

[0145] 可植入光源(例如光袖套)可包含内体,所述内体具有为电源配置的至少一个发光装置。在一些实施方案中,电源可以是为发光装置供电的内置电池。在另一实施方案中,可植入光源可包含用于接收来自为发光装置供电的外置电源的无线传输电磁能的外置天线。无线传输电磁能可为无线电波、微波或可从外置电源传输为可植入光源(例如光袖套)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。

[0146] 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可产生琥珀色光和/或黄光。在一些实施方案中,将几个微型LED嵌入可植入光源(例如光袖套)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激活在接近光源(例如光袖套)的神经质膜上表达的光响应性视蛋白的光。在一些实施方案中,发光装置产生强度为约 $0.05\text{mW}/\text{mm}^2$ 、 $0.1\text{mW}/\text{mm}^2$ 、 $0.2\text{mW}/\text{mm}^2$ 、 $0.3\text{mW}/\text{mm}^2$ 、 $0.4\text{mW}/\text{mm}^2$ 、 $0.5\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $0.6\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $0.7\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $0.8\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $0.9\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $1.0\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $1.1\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $1.2\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $1.3\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $1.4\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $1.5\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $1.6\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $1.7\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $1.8\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $1.9\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $2.0\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $2.1\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $2.2\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $2.3\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $2.4\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $2.5\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $3\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $3.5\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $4\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $4.5\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $5\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $5.5\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $6\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $7\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $8\text{mW}/\text{mm}^2$ 、约 $9\text{mW}/\text{mm}^2$ 或约 $10\text{mW}/\text{mm}^2$ 的任一值,包括这些数字之间的值的光。在其它实施方案中,发光装置产生强度为至少约100Hz的光。

[0147] 在一些方面,可在外部用外置控制器激活发光装置。外置控制器可包含可以固定到发射线圈的发电机。在外置控制器的一些实施方案中,电池可与发电机连接以为其提供电力。开关可与发电机连接,允许个人手动激活或停用发电机。在一些实施方案中,开关激活后,发电机可通过外置控制器上的发射线圈与可植入光源(例如光袖套)的外置天线之间的电磁耦合为光源上的发光装置提供电力。发射线圈可在接近时建立与可植入光源外置天线的电磁耦合,为发光装置供给电力和向可植入光源发射一个或多个控制信号。在一些实施方案中,外置控制器的发射线圈与可植入光源(例如光袖套)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,无线电波的工作频率可介于约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, Opticon 1826, (8): Spring, 2010)。

[0148] 筛选方法

[0149] 本公开提供了鉴定治疗哺乳动物抑郁症的试剂的方法。本公开还提供了鉴定在抑郁症治疗中用于治疗性干预的试剂的方法。本公开还提供了鉴定正在研发用于病症治疗的药物的方法,所述药物可在个体中诱导抑郁症。

[0150] 如本文所使用,术语“测定”指定性和定量测定并且同样,术语“测定”在本文中可

与“分析”、“测量”等交换使用。在一个具体实施方案中,所述测定在将VTA暴露于激活光遗传抑制因子的波长的光之后或同时进行。

[0151] 术语“候选试剂”、“试验试剂”、“试剂”、“物质”和“化合物”在本文中可交换使用。候选试剂涵盖许多化学类别,通常为合成、半合成或自然存在的无机或有机分子。候选试剂包括在大型合成或天然化合物库中发现的试剂。例如,合成化合物库可从Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK)、ComGenex (South San Francisco, CA) 和 MicroSource (New Milford, CT) 购买得到。罕见化学库可从Aldrich (Milwaukee, Wis.) 得到并且也可使用。可选地,呈细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物库可从Pan Labs (Bothell, WA) 得到或易于生产。

[0152] 候选试剂可为分子量大于50D且小于约2,500D的小分子有机或无机化合物。候选试剂可包含与蛋白质结构相互作用,例如氢键结合所必需的官能团,并且可能包括至少一个胺基、羰基、羟基或羧基,并且可能含有至少两个化学官能团。候选试剂可包含环碳或杂环结构和/或经以上一个或多个官能团取代的芳香或多环芳香结构。在包括肽、糖类、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶及其衍生物、结构类似物或组合在内的生物分子中发现候选试剂。

[0153] 本公开的测定法包括对照,其中适合的对照包括已经暴露于激活光,但尚未施用所述试剂的主题非人类动物模型。

[0154] 主题筛选方法也可用于分析试验试剂对多种不良心理和生理状态的任一种的影响,包括但不限于烦躁不安、抑郁、快感缺失、自杀、激动、焦虑、药物成瘾戒断症状等。在一些情况下,将减轻或缓和不良状态的试验试剂视为治疗心境障碍(例如,重性抑郁症(即,单相障碍)、躁狂、烦躁不安、双相障碍、心境恶劣、躁郁症等)的候选试剂。因此,虽然在本公开中讨论了抑郁症,但是主题筛选方法可用于分析试验试剂对多种不良状态的任一种的影响;并且鉴定的试验试剂可视为治疗多种心境障碍的任一种和其它不良心理和生理状态的候选试剂。

[0155] 非人类动物模型中抑郁症的症状包括(例如)逃避相关行为减轻、焦虑和应激。对抑郁症和/或焦虑和/或应激的试验包括强迫游泳试验(FST)(见,例如,Porsolt等(1977) *Nature* 266:730;和Petit-Demouliere, 等(2005) *Psychopharmacology* 177:245);悬尾试验(见,例如,Cryan 等(2005) *Neurosci. Behav. Rev.* 29:571;和Li等(2001) *Neuropharmacol.* 40:1028);条件性位置厌恶(见,例如,Bechtholt-Gompf等(2010) *Neuropsychopharmacol.* 35:2049);新颖节食试验(Dulawa, 等(2005) *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29:771);社会失败应激试验(见,例如,Blanchard等(2001) *Physiol Behav.* 73:261-271;和Kudryavtseva等(1991) *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38:315);糖水偏好试验(见,例如,Kurre Nielsen,等(2000) *Behavioural Brain Research* 107:21-33);旷场试验(见,例如,Holmes(2001) *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25:261-273);高架十字迷宫试验(见,例如,Holmes(2001)同上);等等。任何此类试验均可用于主题筛选方法中。

[0156] 鉴定适合治疗抑郁症的试剂的方法

[0157] 本公开提供了鉴定治疗抑郁症的候选试剂的方法。在一些情况下,所述方法通常包括:a)使在腹侧被盖区(VTA)多巴胺能(DA)神经元中表达光响应性视蛋白的主题非人类动物(例如,诸如大鼠或小鼠的啮齿动物)与试验试剂接触,和b)将抑郁症测定中啮齿动物

的行为与尚未接触试验试剂的对照啮齿动物的行为比较。接触了试验试剂的啮齿动物的抗抑郁行为表明试验试剂是治疗抑郁症的候选物。

[0158] 超极化VTA的DA神经元中表达的视蛋白

[0159] 在一些情况下,具有神经元活性的活性光遗传抑制因子(光响应性视蛋白)为在VTA处或附近用光激活时促进DA神经元超极化的盐细菌视紫红质(例如,NpHR)。DA神经元的超极化抑制这些神经元的活性。用光激活光响应性视蛋白时,非人类动物模型表现出抑郁特征。向非人类动物模型施用试验试剂。当VTA的DA神经元暴露于激活光响应性视蛋白的波长的光(例如,琥珀色光)时,为治疗抑郁症的候选试剂的试验试剂将改善非人类动物模型抑郁症的至少一种症状。

[0160] 因此,在一些情况下,主题方法包括:a)使表达在VTA处或附近用光激活时促进DA神经元超极化的盐细菌视紫红质(例如,NpHR)的主题非人类动物(例如,诸如大鼠或小鼠的啮齿动物)与试验试剂接触,和b)测定在抑郁症测定中试验试剂对啮齿动物行为的影响。与尚未接触试验试剂的对照啮齿动物的行为相比,接触了试验试剂的啮齿动物的抗抑郁行为表明试验试剂是用于治疗抑郁症的候选物。在这些实施方案中,所述测定步骤在盐细菌视紫红质暴露于会激活盐细菌视紫红质的波长的光之后或同时进行。

[0161] 本公开提供了鉴定治疗个体不良心理或生理状态的候选试剂的方法,其中所述方法通常包括使在VTA多巴胺能神经元中表达具有神经元活性的活性光遗传抑制因子的啮齿动物与试验试剂接触,并且在条件性位置厌恶(CPA)试验中测定试验试剂对啮齿动物行为的影响。与尚未接触试验试剂的对照啮齿动物的行为相比,接触了试验试剂的啮齿动物的CPA响应行为的调节表明试验试剂是治疗个体不良心理状态的候选试剂。在这些实施方案中,所述测定步骤在盐细菌视紫红质暴露于会激活盐细菌视紫红质的波长的光之后或同时进行。不良心理和生理状态包括但不限于烦躁不安、抑郁、快感缺失、自杀、激动、焦虑、药物成瘾戒断症状等。

[0162] 在一些实施方案中,盐细菌视紫红质包含ER输出和膜运输信号序列。例如,在一些情况下,盐细菌视紫红质为从N端到C端包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%相同的氨基酸序列、ER输出信号序列和膜运输信号序列的NpHR视蛋白。在其它实施方案中,盐细菌视紫红质为从N端到C端包含与SEQ ID NO:1中所示序列至少95%相同的氨基酸序列、膜运输信号序列和ER输出信号序列的NpHR视蛋白。在一些情况下,膜运输信号序列源自人内向整流钾通道Kir2.1的氨基酸序列。在一些情况下,膜运输信号序列包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV(SEQ ID NO:17)。在一些情况下,ER输出信号序列包含序列FCYENEV(SEQ ID NO:13)。

[0163] 在一些情况下,编码盐细菌视紫红质的核苷酸序列与神经元特异性启动子,例如为在神经元中表达盐细菌视紫红质而提供的启动子可操作连接。在一些实施方案中,所述启动子为酪氨酸羟化酶启动子。

[0164] 非人类动物模型中抑郁症的症状包括(例如)逃避相关行为减轻。与未用试验试剂治疗的对照动物相比,目标试验试剂(例如,为治疗抑郁症的候选试剂的试验试剂)增加了逃避相关行为。例如,在一些情况下,与未用试验试剂治疗的对照动物相比,目标试验试剂(例如,为治疗抑郁症的候选试剂的试验试剂)增加了逃避相关行为至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约2倍或大于2倍。

[0165] 对抑郁症的试验包括强迫游泳试验 (FST) (见,例如,Porsolt等 (1977) *Nature* 266:730); 悬尾试验 (见,例如,Cryan等 (2005) *Neurosci. Behav. Rev.* 29:571); 等等。

[0166] 在一些实施方案中,试验试剂增强了在悬尾试验中的性能。悬尾试验基于经受短期、无法逃避的悬尾应激的动物会形成不动姿势的事实。与未用试验试剂治疗的对照动物相比,为治疗抑郁症的候选试剂的试验试剂将降低固定性并且促进逃避相关行为的发生。

[0167] 去极化VTA的DA神经元中的视蛋白

[0168] 在一些情况下,具有神经元活性的活性光遗传抑制因子(光响应性视蛋白)为在VTA处或附近用光激活时促进VTA的DA神经元去极化的视紫红质通道蛋白(例如,ChR2)。DA神经元的去极化激活了这些神经元。未用光激活光响应性视蛋白时,非人类动物模型在慢性轻度应激(CMS)条件下表现出抑郁特征。向非人类动物模型施用试验试剂。当VTA的DA神经元未暴露于激活光响应性视蛋白去极化的波长的光时,为治疗抑郁症的候选试剂的试验试剂将改善非人类动物模型抑郁症的至少一种症状。在一些情况下,当VTA的DA神经元未暴露于激活光响应性视蛋白去极化的波长的光时,为治疗抑郁症的候选试剂的试验试剂将改善非人类动物模型抑郁症的至少一种症状,程度与暴露于激活波长的光相同。

[0169] 因此,在一些情况下,主题方法包括:a)使表达在VTA处或附近用光激活时促进DA神经元去极化的视紫红质通道蛋白(例如,ChR2)的主题非人类动物(例如,诸如大鼠或小鼠的啮齿动物)与试验试剂接触,和b)测定在抑郁症测定中试验试剂对啮齿动物行为的影响。与尚未接触试验试剂的对照啮齿动物的行为相比,接触了试验试剂的啮齿动物的抗抑郁行为表明试验试剂是用于治疗抑郁症的候选物。在这些实施方案中,所述测定步骤在视紫红质通道蛋白没有暴露于会激活视紫红质通道蛋白的波长的光时进行。在一些情况下,为治疗抑郁症的候选试剂的试验试剂缓和抑郁症的一种或多种症状,程度为通过将视紫红质通道蛋白暴露于会激活视紫红质通道蛋白的波长的光缓和抑郁症症状的程度的至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或大于90%。在一些情况下,为治疗抑郁症的候选试剂的试验试剂缓和抑郁症的一种或多种症状,程度与将视紫红质通道蛋白暴露于会激活视紫红质通道蛋白的波长的光相同。在一个具体实施方案中,所述视紫红质通道蛋白包含与SEQ ID NO:5中列出的视紫红质通道蛋白氨基酸序列有至少约95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0170] 在本领域中已经描述了CMS条件。见,例如,Forbes等(1996) *Physiol.&Behavior* 60:1481;并且在实施例中有描述。

[0171] 在一些情况下,去极化视蛋白是包含与SEQ ID NO:5所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的光响应性阳离子通道蛋白。在一些实施方案中,光响应性通道蛋白包含膜运输信号序列和/或ER输出信号序列。在一些情况下,膜运输信号序列包含氨基酸序列 KSRITSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO:17)。在一些情况下,ER输出信号序列包含序列FCYENEV (SEQ ID NO:13)。

[0172] 鉴定治疗性干预靶标的方法

[0173] 主题非人类动物模型可用于鉴定在抑郁症治疗中治疗性干预的附加靶标。因此,本公开提供了鉴定促进抑郁的蛋白质的方法,其中此类蛋白质将视为治疗抑郁的潜在治疗性靶标,例如可用于鉴定调节靶标活性并从而治疗抑郁症的药物的靶标。

[0174] 在一些情况下,本公开提供了鉴定个体中促进抑郁症的蛋白质的方法,其中所述方法通常包括:a)使在内侧前额叶皮质(mPFC)兴奋性神经元中表达具有神经元活性的活性光遗传活化因子的主题非人类动物与所述蛋白质接触,和b)将抑郁症测定中非人类动物的行为与尚未接触所述蛋白质的对照啮齿动物的行为比较。接触了所述试剂的非人类动物的抑郁行为表明所述蛋白质促进抑郁。在一个具体实施方案中,将中缝背核(DRN)暴露于激活所述光遗传活化因子的波长的光,其中上述步骤a)在所述暴露之前进行或者与所述暴露同时进行。

[0175] 可通过将蛋白质本身引入动物体内或向动物体内引入包含编码所述蛋白质的核苷酸序列的核酸使主题非人类动物与蛋白质接触。例如,可(例如,如上所述通过注射)直接将包含编码待试验抑郁症诱导作用的蛋白质的核苷酸序列的表达构建体引入神经元中。以这种方式试验cDNA库。

[0176] 在一些情况下,活性光遗传活化因子为ChR2。在一些情况下,通过在mPFC兴奋性神经元中表达具有神经元活性的活性光遗传活化因子,并且将中缝背核(DRN)暴光以激活光遗传活化因子工程化在mPFC兴奋性神经元中表达具有神经元活性的活性光遗传活化因子的非人类动物。

[0177] 在一些情况下,mPFC兴奋性神经元中具有神经元活性的活性光遗传活化因子为包含与SEQ ID NO:5中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的光响应性阳离子通道蛋白。在一些实施方案中,mPFC兴奋性神经元中具有神经元活性的活性光遗传活化因子包含膜运输信号序列和/或ER输出信号序列。在一些情况下,膜运输信号序列包含氨基酸序列KSRITSEGEYIPLDQIDINV(SEQ ID NO:17)。在一些情况下,ER输出信号序列包含序列FCYENEV(SEQ ID NO:13)。

[0178] 评估研发用于治疗除抑郁症外的病症的药物的方法

[0179] 主题非动物模型可用于试验正在研发用于治疗除抑郁症外的病症的药物的抑郁诱导作用。在主题非动物模型中诱导抑郁症症状的药物可能需要重新评估其治疗除抑郁症外的病症的适用性;可能需要经化学改性以致其不再在主题非动物模型中诱导抑郁症症状,在治疗除抑郁症外的病症中仍保持功效;或可能需要在警示标签中包括药物可能诱导抑郁症症状的可能性。

[0180] 在一些情况下,本公开提供了筛选试剂(例如,正在研发用于治疗除抑郁症外的病症的药物)促进个体抑郁的能力的方法,其中所述方法通常包括:a)使在内侧前额叶皮质(mPFC)兴奋性神经元中表达具有神经元活性的活性光遗传活化因子的主题非人类动物与所述试剂接触,和b)将抑郁症测定中非人类动物的行为与尚未接触所述试剂的对照啮齿动物的行为比较。接触了所述试剂的非人类动物的抑郁行为表明所述试剂促进抑郁。在一些情况下,活性光遗传活化因子为ChR2。在一些情况下,通过在mPFC兴奋性神经元中表达具有神经元活性的光遗传活化因子,并且将中缝背核(DRN)暴光以激活光遗传活化因子工程化在mPFC兴奋性神经元中表达具有神经元活性的活性光遗传活化因子的非人类动物。

[0181] 在一些情况下,mPFC兴奋性神经元中具有神经元活性的活性光遗传活化因子为包含与SEQ ID NO:5中所示序列至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列的光响应性阳离子通道蛋白。在一些实施方案中,mPFC兴奋性神经元中具有神经元活性的活性光遗传活化因子包含膜运输信号序列和/或ER输出信号

序列。在一些情况下,膜运输信号序列包含氨基酸序列KSRTSEGEYIPLDQIDINV (SEQ ID NO: 17)。在一些情况下,ER输出信号序列包含序列FCYENEV (SEQ ID NO:13)。

实施例

[0182] 提出下列实施例以便为本领域的普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完整公开内容和描述,而非旨在限制发明人视为其发明的范围,也非旨在表示下面的实验完全或仅为进行的实验。已经努力确保关于所用数字(例如,量、稳定等)的精确性,但是应考虑一些实验误差和偏差。除非另外指出,份数为重量份,分子量为重均分子量,温度按摄氏度计,而压力为或接近大气压。可使用标准缩写,例如 bp,碱基对;kb,千碱基;pl,皮升;s或 sec,秒;min,分钟;h 或hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基;bp,碱基对;nt,核苷酸; i.m.,肌肉内;i.p.,腹膜内;s.c.,皮下;等等。

[0183] 实施例1:多巴胺神经元调节抑郁相关行为的神经编码和表达

[0184] 研究维持正常水平的动机和快感是否需要腹侧被盖区(VTA)多巴胺神经元的活性。为试验选择性抑制VTA DA神经元的活性是否可敏锐诱导抑郁样行为,利用光遗传学技术(21-23)允许的细胞类型特异性靶向和精确瞬时操纵。为抑制VTA DA神经元,通过在用多重抑郁症测定法试验这些动物之前,将双floxed cre依赖型病毒构建体注入 TH::Cre小鼠的VTA中(24)(图1A),在酪氨酸羟化酶(TH)阳性神经元中选择性表达在用琥珀色光照射后使神经元膜超极化的表达增强型盐细菌视紫红质(eNpHR3.0)(23)。

[0185] 因为eNpHR3.0与增强型黄色荧光蛋白(eYFP)融合,通过量化表达eNpHR3.0-eYFP的VTA神经元的比例,或在为TH+的单独表达 eYFP的年龄匹配对照中,经免疫组织化学检验了在用于这些行为测定的动物中的靶向特异性(图1B)。啮齿动物中两大主要类别的抑郁症测定包括测量动机(25-28)和快感缺失(27,29,30)。已经充分验证了这些测定,因为经抗抑郁药物的慢性治疗性能得到改善(25-27,29,30)。

[0186] 在抑郁表现型的上下文中,通过为啮齿动物呈现无法逃避的应激物,例如悬挂动物的尾巴或被迫在冷水中游泳,测定动机。测定分析需要量化动物进行逃避相关行为或挣扎花费的时间相对于静止不动花费的时间比例。在历史上已经将此类测定中在悬尾试验(TST)中悬挂或在强迫游泳试验(FST)中漂浮的固定性解释为“行为绝望”的征兆(27,28)。此处,在分3个时期(包括基线关灯时期、开灯时期,然后再是关灯时期)的TST的9-min期间将具有表达eNpHR3.0的VTA DA 神经元的小鼠与eYFP对照比较,我们看到用591nm光持续照射时逃避相关行为明显减轻(双因素ANOVA揭示组×时期相互作用, $F_{4,38}=3.95$, $p=0.00089$, Bonferroni事后检验显示相对于eYFP组,在eNpHR3.0组中逃避相关行为明显减轻, $p<0.05$),一旦关灯就回到基线(图1C)。

[0187] 通过在新的但非压力环境中,用旷场试验(OFT)在关灯和开灯条件之间两次3-min相互作用的12-min期间自由探索的同时评估这些动物研究逃避相关行为的这种瞬时减轻是否是总体运动效果,而非动机增加。虽然照射时,eNpHR3.0组中已经存在减少运动的细微趋势,但是组间运动速度没有显著差异(双因素ANOVA未显示出组×时期相互作用, $F_{3,48}=1.76$, $p=0.17$)。抑制VTA DA神经元时,逃避相关行为的显著减轻和减少运动的不显著趋势可能反映动机减少。

[0188] 除测定面对无法逃避的应激物的逃避相关行为外,研发了对充分验证的快感缺失

测定法,糖水偏好试验(29-34)的新变化以测定选择性抑制VTA DA神经元是否可以敏锐诱导快感缺失。为增强我们糖水偏好试验的灵敏性,通过自动化检测量化90-min期间在输送水或1%蔗糖溶液的喷口上的舔食次数,以测定基线30-min关灯期,接着是30-min开灯期,最后再是30-min关灯期内的糖水偏好(图1E)。显著地,观察到在eNpHR3.0而非eYFP对照小鼠在照射期间糖水偏好显著降低(图1E;双因素ANOVA揭示视蛋白的显著作用, $F_{1,42}=6.31$, $p=0.016$;Bonferroni事后检验揭示仅在开灯期间组间有显著差异, $p<0.05$)。因此,通过减轻糖水偏好测定,抑制VTA DA神经元显著降低了面对无法逃避的应激物的逃避相关行为,以及敏锐引起快感缺失。总之,这里显示在增加“行为绝望”和快感缺失的测量方面,选择性抑制VTA DA神经元敏锐模拟了抑郁样表现型(27,28)。

[0189] 接着,研究了阶段性激活VTA DA神经元是否可用于挽救不可预见性慢性轻度应激(CMS)(31,32,34,35)诱导的抑郁样表现型。在人类中,患有抑郁症的大多数患者陈述慢性应激逐渐引发长期抑郁状态(几个月),而非短暂的(几天)应激性事件(36-40,19,41)。为如实地模仿在人类中观察到的抑郁样状态,使用不可预见性慢性轻度应激(CMS)范例在啮齿动物中诱导抑郁样状态(32,34-36,42-47),其中在成年啮齿动物中每天递送不可预见性轻度应激物2次,8-12周。已经证实CMS引起如同通过面对无法逃避的应激物的逃避相关行为减少测定的动机减少以及如同通过糖水偏好测量的快感缺失(27,29-32,34,44,18)。

[0190] 因为证明抑制VTA DA神经元敏锐地产生抑郁样表现型(图1),然后确定激活VTA DA神经元是否可以挽救慢性应激诱导的抑郁样表现型。为选择性激活VTA DA神经元,使用病毒转导方法选择性表达视紫红质通道蛋白(ChR2),使膜去极化并且以毫秒级精度产生动作电位(22,48)的一种光活化阳离子通道,并且已经证实使用的参数下,在VTA TH+中表达时,在伏隔核(NAc)中释放多巴胺瞬态物(24,49,50)。为测试这一点,包括了4个实验组(图2A):1)在VTA中具有经ChR2-转导的TH+神经元的组,其暴露于慢性轻度应激(CMS)方案8-12周,2)作为对照,单独在VTA DA神经元中表达的eYFP荧光团;用CMS方案处理这些动物,养在低应激环境(非CMS)中8-12周的动物的VTA DA神经元中单独表达的3)ChR2或4)eYFP。

[0191] 为试验VTA DA神经元中阶段性放电是否可以挽救CMS诱导的抑郁样表现型,我们在多重抑郁症测定法中的基线(关灯)、阶段性照射(开灯)和照射后(关灯)时期(图2B)检查了动物。为在VTA DA神经元中产生阶段性放电,使用稀疏、爆发照明模式(图2B;每5s,30Hz的8个脉冲,5-ms脉冲宽度)以在照射(开灯)期间引起阶段性脉冲24和释放多巴胺瞬态物(24,49)。为检查VTA DA神经元中阶段性放电对动机的影响,使全部4组动物经受悬尾试验(TST)并且量化了每个时期挣扎或逃避相关行为的量。

[0192] 在基线时,与先前的研究一致(25,32,33,43),观察到相对于非CMS对照,CMS使挣扎量减少~50% (eYFP CMS = 33.8 ± 6.1 ; ChR2 CMS = 31.3 ± 3.9 ; ChR2非CMS = 61.7 ± 7.3 ; eYFP非CMS 61.3 ± 7.6 ;图2C)。双因素ANOVA不仅揭示了显著的组 $\times$ 时期相互作用, $F_{6,108}=3.36$, $p=0.0045$,而且揭示了组非常强的影响, $F_{3,108}=16.92$, $p<0.0001$ 。照射时,ChR2 CMS组相对于eYFP CMS组在逃避相关行为上显示出显著增加($p<0.001$, Bonferroni事后检验)。因此,ChR2 CMS小鼠而非eYFP CMS小鼠体内VTA DA神经元的阶段性照射以秒级挽救CMS诱导的抑郁样表现型(图2C)。重要的是,未观察到照射时(Bonferroni事后检验)eYFP非CMS和ChR2非CMS小鼠之间挣扎的显著差异,表明逃避相关行为是展现出应激诱导的抑郁样

表现型的动物特有的。

[0193] 因为DA系统也与运动相关联,所以测试了TST期间使用的刺激参数是否为总运动效果。在与两个3-min关灯时期交错的两个3-min 开灯时期,使用上述相同的阶段性照射参数,在旷场腔室内检查了 TST测定中包括的所有小鼠的运动(图2D)。虽然照射时ChR2组存在速度增加的趋势,但是在双因素ANOVA中未观察到显著的组 $\times$ 时期相互作用($F_{9,152}=0.99, p=0.4493$),并且通过Bonferroni事后检验未揭示出可检测的差异。然而,观察到组的显著影响($F_{3,152}=5.06, p=0.0023$),其可能反映了CMS和非CMS组间在旷场腔室内(图2D) 初始探索的差异。

[0194] 接下来,问到阶段性激活VTA DA神经元是否也可挽救CMS-诱导的糖水偏好降低。为检测糖水偏好的剧烈变化,研发了对糖水偏好试验的新变化以增强该测定法的灵敏性。使用测舔仪(lickometer)检测在输送水或1%蔗糖溶液的喷口上的舔食次数,在跨3个30-min时期的单个90-min期内测定糖水偏好(图2E)。双因素ANOVA揭示了显著的组 $\times$ 时期相互作用($F_{6,62}=4.33, p=0.001$)以及组的显著影响($F_{3,31}=3.40, p=0.0299$)。与先前的研究一致,基线测量显示在测舔仪测定中照射之前,eYFP和ChR2 CMS小鼠与eYFP和ChR2非CMS小鼠相比具有明显更低的糖水偏好(Bonferroni事后检验,分别为 $p<0.05$ 和 $p<0.01$)。然而,阶段性激活VTA DA神经元敏锐地挽救了 ChR2 CMS而非eYFP CMS动物中CMS诱导的快感缺乏作用(单因素 ANOVA,Dunn事后检验将基线与开灯时期比较,对于ChR2 CMS 小鼠而言 $p<0.01$,对于eYFP CMS小鼠而言 $p=0.2851$)。

[0195] 上面提供的数据证明对抑郁相关行为的多重测定中,VTA DA神经元活性的双向作用。然而,因为VTA DA神经元投射到整个脑部的多个区域(51-54),所以不清楚哪些下游靶标可能有助于这种行为。此外,有证据证明VTA DA神经元在腹侧纹状体中辅助释放谷氨酸(55-57)。考虑到腹侧纹状体,特别是诊断患有重性抑郁障碍的人类患者的伏隔核(NAc)中的深部脑刺激有助于缓和抑郁症的症状(58,59),测试了NAc中谷氨酸或多巴胺传输是否在小鼠中介导了光诱导的对这种抑郁样表现型的挽救。

[0196] 为研究TST期间NAc中VTA DA神经元传输的作用,包括了另一组小鼠,除病毒转导VTA DA神经元和针对VTA慢性植入光纤电缆(图3A)外,在经历8-12周不可预见性慢性轻度应激之前,在NAc 中植入了双侧引导插管。为研究阶段性激活VTA DA神经元时谷氨酸传输的功能性作用,进行了受试者内比较(within-subject comparison),对于顺序进行平衡,并且就在TST中试验之前向NAc输注盐水或 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸受体(AMPA)拮抗剂、2,3-二羟基-6-硝基-7-氨磺酰-苯并[f]喹啉-2,3-二酮(NBQX)和N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)拮抗剂、(2R)-氨基-5-磷酸基戊酸(AP5)的混合物。

[0197] 双因素ANOVA揭示了显著的组 $\times$ 时期相互作用($F_{2,28}=3.69, p=0.0379$)、组的显著影响($F_{1,14}=7.24, p=0.0176$)和时期的显著影响($F_{2,28}=38.98, p<0.0001$)。NAc内盐水处理之后,我们重复在VTA 照射时挽救应激诱导的抑郁样表现型(单因素ANOVA, $p<0.001$,Dunn 事后检验比较基线与开灯时期, $p<0.01$;图3B)。NAc内谷氨酸受体阻滞剂后,还观察到照射时挽救了应激诱导的抑郁样表现型(单因素 ANOVA, $p<0.001$,Dunn事后检验比较基线与开灯时期, $p<0.001$;图3B)。实际上,通过组的显著影响所见,在用谷氨酸受体拮抗剂处理的动物中挣扎花费的时间量总体上更长。

[0198] 因为NAc接受了来自许多区域,包括PFC、扁桃体和海马的稳健谷氨酸能神经支配,

所以推测这些输入的净效应可能用于阻遏TST中的逃避相关行为。而且,本文提出的发现与最近证实克他命(ketamine),一种NMDAR拮抗剂,可敏锐地改善人类中抑郁样症状的研究一致(60-62)。

[0199] 因为证明,悬尾期间介导我们光诱导的逃避相关行为增加不需要NAc中的谷氨酸传输,然后测试NAc中的多巴胺信号是否主要牵涉于介导逃避相关行为。为此,在NAc内盐水或NAc内多巴胺受体拮抗后,在TST中试验之前,使用SCH 23390 (D1受体拮抗剂)或奎丙灵(raclopride) (D2受体拮抗剂)的混合物进行受试者内比较。在基线和照射时期经NAc多巴胺受体阻滞观察到逃避相关行为明显减弱(双因素ANOVA揭示了显著的药物 $\times$ 时期相互作用, $F_{2,44}=3.52$, $p=0.0381$,药物的显著影响, $F_{1,22}=53.74$, $p<0.0001$ 和时期的显著影响, $F_{2,44}=3.48$, $p=0.0395$;图3C)。

[0200] 这些发现与从VTA到NAc的多巴胺能神经支配对维持基线水平的逃避相关行为以及增强VTA DA神经元的阶段性活性后挽救CMS诱导的逃避相关行为减少很重要的假设一致。数据也与多巴胺信号损耗在往往在似帕金森氏病症状发作之前经历抑郁的前期似帕金森氏病(pre-Parkinsonian)患者中引起抑郁样症状的报道一致。

[0201] 以上数据已经证明,在动机和快感缺失的测量方面,选择性抑制VTA DA神经元敏锐地引起了抑郁相关行为,并且阶段性激活VTA DA神经元敏锐地挽救了NAc中多巴胺能信号介导的不可预见性慢性轻度应激诱导的抑郁样表现型。然而,NAc中多巴胺受体阻滞减弱了光诱导和基线水平的逃避相关行为,使得难以解释NAc中多巴胺信号在这种动机测定中介导光诱导的抑郁相关行为的挽救的作用。因此,研究了两种基线条件下抑郁症测定期间和阶段性激活VTA DA神经元期间NAc神经元的活性。为此,组合了几种新的工具。

[0202] 在饲养笼中在基线活性期间对最近研发的TH::Cre大鼠(50)进行首次体内电生理记录,在旷场试验和强迫游泳试验(图4A)的新环境中探索,同时在CMS后间歇性照射表达ChR2的VTA DA神经元(图4B)。因为强迫游泳试验(FST)的量化传统上已经是固定时期的低分辨率测量27,所以我们需要研发在FST中对逃避相关行为的毫秒精度时间分辨率检测的新方法。为此,利用磁感应新方法,使用强迫游泳池外的磁性线圈和与大鼠足部连接的小磁体测量游泳踢腿或逃避相关行为,并且为体内电生理记录探头防水(图4B)。

[0203] 与对小鼠的TST中的发现类似,发现照射5只CMS TH::Cre大鼠体内表达ChR2的VTA DA神经元增加了FST中的逃避相关行为(配对检验, $p=0.0088$;图4C和D),但是开灯运动对OFT没有可检测的影响(图4D)。虽然有相当比例的编码光和踢腿的神经元,但是正如关于以30Hz,每5s输送8个脉冲序列的光脉冲序列的刺激事件后踢腿光栅直方图所例证那样,光脉冲和踢腿事件未在秒级锁时(图4E)。因为我们观察到相对于关灯时期,在开灯时期踢腿频率稳健增加,但是未观察到对激光脉冲的锁时踢腿行为,所以我们推测总体上由多巴胺音调而非分离的多巴胺瞬态物调节逃避相关行为。

[0204] 然后我们研究了开灯时期相对于关灯时期逃避相关行为的增加与记录的每只动物编码阶段性VTA DA神经元激活的所有神经元的比例之间的关系。我们使用Spearman相关性检验发现了显著相关性($p=0.0167$),每只大鼠对VTA DA神经元激活显示出阶段性响应的NAc神经元越多,VTA DA神经元激活时逃避相关行为相对增加越多(图4F)。这可能是由于个别动物的解剖变异以及实验变异例如视蛋白表达。我们在5只CMS TH::Cre大鼠体内,在整个期间记录到总共123个NAc神经元并且检查了FST中对输送到VTA的光脉冲或踢腿显

示出阶段性响应的神经元的比例。

[0205] 我们发现123个NAc神经元中的75个(61%;图4G和4H)对光显示出阶段性响应:这些75个神经元中的15个对光显示出阶段性抑制(20%光响应性神经元),而75个神经元中的60个为阶段性兴奋(80%光响应性神经元)。正如通过对踢腿事件的阶段性响应所见,123个NAc神经元中的83个(67%;图4G和4H)编码逃避相关行为:这些神经元中的14个(17%)在对踢腿显示出阶段性抑制而这些神经元中的69个(83%)响应于踢腿显示出阶段性兴奋。正如在代表性刺激事件后光栅直方图(图4G和4H)所见,54个神经元编码光脉冲和踢腿事件。

[0206] 为检查VTA DA神经元的阶段性放电是否可以调节NAc中逃避相关行为的编码,我们将开灯时期发生的踢腿事件与关灯时期发生的踢腿事件分开。虽然123个神经元中的34个(28%)编码开灯和关灯时期的踢腿,我们发现激活VTA DA神经元调节了两个神经元亚群中踢腿事件的编码(图4G和4I)。123个神经元中的21个(17%)仅选择性编码开灯时期的逃避相关行为,而123个神经元中的22个(18%)仅选择性编码关灯时期的逃避相关行为(图4G和4I)。

[0207] 接下来,我们检查了在同一时间段内的不同时期的放电率动力学。因为有在不同时期增加或降低放电率的神经元亚群,所以虽然在各个时期NAc神经元群体中放电率的分布有相对轻微的变化,但是分布的净变化并未引起个别神经元的放电变化。神经元亚群在从饲养笼移到新环境(旷场腔室)中时显示出放电率变化(33%;18个增大而22个降低放电率),并且神经元亚群在OFT(24%;24个增大而6个降低放电率)和FST(30%;18个增大而19个降低放电率)中经照射时显示出放电率变化。然而,当将大鼠从新环境(旷场腔室)中移到应激环境(强迫游泳池)时,不管是否在关灯时期(86%;27个增大而79个降低放电率)或开灯时期(75%;19个增大而73个降低放电率)比较,更大比例的神经元显示出放电率的变化。在此为了总结我们的发现,选择性抑制VTA DA神经元敏锐地诱导了抑郁相关行为,反映了“行为绝望”(63)和快感缺失增加。

[0208] 不可预见性轻度应激物的慢性呈现诱导了长期的抑郁样表现型,通过阶段性激活VTA DA神经元进行挽救。介导逃避相关行为需要NAc中多巴胺而非谷氨酸受体激活。NAc神经元编码VTA DA神经元的阶段性激活以及逃避相关行为。重要的是,通过VTA DA神经元激活调节逃避相关行为的编码。我们还证实大部分NAc神经元在暴露于无法逃避的应急物时显示出放电率显著变化,并且在更多的NAc神经元在紧张放电率方面显示出降低而非增加。

[0209] 我们的发现与大鼠抑郁症模型中的其它体内电生理记录一致,显示用抗抑郁去郁敏(desipramine)(64)处理后记录到的爆发活性降低。虽然已经有一些报道表明在对抑郁症10天社会失败模型敏感的小鼠中VTA DA神经元放电和爆发增加(65,66),但是这些发现的差异可源于动物模型、范例持续时间、中脑内的特定记录部位的差异或其它实验差异。我们的数据还支持在成瘾和奖赏相关行为的情况下多巴胺功能的现有模型介导动机和感情反应(11-13,15,20,67-69),以及VTA多巴胺放电构成预期或接受奖赏(70,71)或体验快乐(24)或寻求奖赏(48,49)的基础。更重要的是,我们的结果可能对通过NAc中深部脑刺激实现的抗抑郁效果提供机械解释(57,58)。与亚属扣带皮层中深部脑刺激的抗抑郁作用(71)并行的这些研究表明,由一系列不同类别的症状定义的精神病由多种神经回路病理介导。心境障碍的复杂性和构建动物精神病模型的挑战代表查明介导抑郁症症状的准确神经功

能异常的障碍。然而,鉴定即使介导一个亚类的抑郁相关症状的回路机制的潜在影响意义深刻。研究啮齿动物和人类之间保存良好的回路,例如中脑缘多巴胺系统,提高了啮齿动物模型中抗抑郁操纵将有助于研发改良的对人类治疗性干预的可能性。

[0210] 图1.选择性抑制腹侧被盖区(VTA)多巴胺神经元诱导了抑郁样表现型。A,Cre依赖性AAV的示意图。递送到TH::IRES-Cre转基因中后,eNpHR3.0将在酪氨酸羟化酶阳性神经元中选择性表达。B,中脑多巴胺神经元的共聚焦图像;橙色带点矩形指出了对准照射VTA的光纤的位置。下面,在光线轨迹正下方的VTA神经元的特写图像。C,光抑制VTA DA神经元敏锐地诱导逃避相关行为减少,* $P<0.05$ 。图1C中,每一组中左侧柱为eYFP;每一组中右侧柱为eNpHR3.0。D,抑制VTA DA神经元并未引起旷场试验中运动的可检测差异。E,90-min快感缺失测定的示意图和结果。光抑制VTA DA神经元诱导糖水偏好剧烈降低,* $P<0.05$ 。

[0211] 图2.稀疏阶段性光激活VTA DA神经元挽救了应激诱导的抑郁样表现型。A,实验中包括的4个实验组的图解。B,用473nm光,用于在表达ChR2的VTA DA神经元中引起活性阶段性爆发的照射模式的示意图。C,阶段性照射VTA DA神经元挽救了ChR2 CMS小鼠而非eYFP CMS小鼠在悬尾试验(TST)中应激诱导的挣扎减少,** $P<0.001$ 。图2C中,每个“关灯”和“开灯”组从左至右的柱为:eYFP CMS;ChR2 CMS;ChR2非CMS;和eYFP非CMS。D,TST中使用的照射参数并未引起在旷场腔室内运动活性的可检测变化。E,阶段性激活VTA DA神经元敏锐地挽救了ChR2 CMS而非eYFP CMS 动物应激诱导的糖水偏好降低,对于ChR2 CMS小鼠而言** $P<0.01$ 。

[0212] 图3.介导逃避相关行为需要多巴胺而非谷氨酸受体信号。A,在经CMS处理的动物中两侧NAc药理学操纵连同VTA DA神经元照射的示意图。B,NAc中AMPA和NMDAR谷氨酸受体(GluR α)的拮抗不防碍基线水平的挣扎,也不妨碍悬尾试验中光诱导的逃避相关行为的增加。图3B中,每个“关灯”和“开灯”数据组中的左侧柱为GluR α ;每个数据组中的右侧柱为盐水。C,NAc中D1和D2多巴胺受体(D1 α +D2 α)的拮抗减弱了逃避相关行为,*** $P<0.0001$ 。图3C中,每个“关灯”和“开灯”数据组中的左侧柱为盐水;每个数据组中的右侧柱为D1 α +D2 α 。

[0213] 图4.阶段性激活VTA多巴胺神经元调节了TH::Cre大鼠中逃避相关行为的NAc神经编码。A,体内电生理记录期的示意概况图。B,经CMS处理的TH::Cre大鼠中,NAc中体内电生理记录、表达ChR2的VTA DA神经元的照射和游泳行为的精确测量的整合。C,强迫游泳试验中阶段性照射表达ChR2的VTA DA神经元增加了TH::Cre大鼠的逃避相关行为。D,阶段性照射表达ChR2的VTA DA神经元增加了强迫游泳试验中的踢腿速率,但是未增加旷场试验中的步行速率。E,蓝色线条所示,示出了关于8个光脉冲序列的踢腿事件的刺激事件后光栅直方图显示踢腿事件未与光脉冲锁时。F,散点图,示出了每只大鼠游泳行为受VTA DA神经元激活调节的程度相对于从指定受试者记录的所有神经元的比例之间的相关性, $P=0.0167$ 。G,对光脉冲和踢腿事件显示出阶段性兴奋的代表性神经元(实例细胞1)和选择性编码开灯时期(实例细胞2)或关灯时期(实例细胞3)的踢腿事件的神经元的刺激事件后光栅直方图。H,对光脉冲和踢腿事件显示出阶段性响应的神经元的群体汇总,示出了从5只CMS TH::Cre大鼠记录的123个NAc神经元的群体汇总,在75个NAc神经元中看到对VTA照射的阶段性响应,并且在83个NAc神经元中看到对踢腿行为的阶段性响应,54个神经元对光和踢腿事件均显示出阶段性响应。I,在强迫游泳试验的开灯和关灯时期显示出对逃避相关行为的差分编码的神经元比例的群体汇总。123个NAc神经元中的55个在开灯时期对踢腿响应,123个NAc

神经元中的56个在关灯时期显示出对踢腿的阶段性的响应,并且123个NAc神经元中的34个在开灯和关灯时期对踢腿响应。21个NAc神经元选择性编码开灯时期的踢腿事件,而123个神经元中的22个选择性编码关灯时期的踢腿事件。

- [0214] 1.Kessler等,JAMA:the journal of the American Medical Association 289: 3095 (2003)
- [0215] 2.Kendler等,The American journal of psychiatry (1998)
- [0216] 3.Kessler等,Arch Gen Psychiatry 62:617-627 (2005)
- [0217] 4.van Geffen等,The Annals of Pharmacotherapy 42:218-225 (2008)
- [0218] 5.Maddox等,Journal of Psychopharmacology 8:48-51 (1994)
- [0219] 6.Smits等,Mol Psychiatry 9:433-441 (2004)
- [0220] 7.Jick等,The Journal of the American Medical Association 292: 338-343 (2004)
- [0221] 8.Hall.The Lancet 367:1959-1962 (2006)
- [0222] 9.Martinez等,BMJ 330:389-0 (2005)
- [0223] 10.Jick等,BMJ 310:215-218 (1995)
- [0224] 11.Phillips等,Pharmacology Biochemistry and Behavior 90: 236-249 (2008)
- [0225] 12.Wise.Nature Reviews Neuroscience 4:483-494 (2004)
- [0226] 13.Koob等,Molecular psychiatry 1:186 (1996)
- [0227] 14.Willner等,The mesolimbic dopamine system:from motivation to action (1991)
- [0228] 15.Ikemoto等,Neuropharmacology 47 (附录1):190-201 (2004)
- [0229] 16.Nestler等,Biological Psychiatry 59:1151-1159 (2006)
- [0230] 17.Willner等,European Neuropsychopharmacology 1:295-296 (1991)
- [0231] 18.Muscat等,Biological Psychiatry 28:223-230 (1990)
- [0232] 19.Cabib等,Psychopharmacology 128:331-342 (1996)
- [0233] 20.Ikemoto等,Brain Research Reviews 31:6-41 (1999)
- [0234] 21.Zhang等,Nature 446:633-639 (2007)
- [0235] 22.Boyden等,Nat Neurosci 8:1263-1268 (2005)
- [0236] 23.Gradinaru等,141:154-165 (2010)
- [0237] 24.Tsai等,Science 324:1080-1084 (2009)
- [0238] 25.Cryan等,Neuroscience&Biobehavioral Reviews 29:571-625 (2005)
- [0239] 26.Steru等,Psychopharmacology 85:367-370 (1985)
- [0240] 27.Porsolt等,European Journal of Pharmacology 47:379-391 (1978)
- [0241] 28.Porsolt等,Nature 266:730-732 (1977)
- [0242] 29.Willner等,Neuroscience&Biobehavioral Reviews 16:525-534 (1992)
- [0243] 30.Willner.Psychopharmacology 83:1-16 (1984)
- [0244] 31.Papp等,Psychopharmacology 104:255-259 (1991)
- [0245] 32.Forbes等,Physiology&behavior 60:1481-1484 (1996)

- [0246] 33.Strekalova等,Neuropsychopharmacology 29:2007-2017 (2004)
- [0247] 34.Willner等,Psychopharmacology 93:358-364(1987)
- [0248] 35.Rygula等,Behavioural brain research 162:127-134(2005)
- [0249] 36.Jesberger等,Biological Psychiatry 20:764-784(1985)
- [0250] 37.Cohen等,Psychological bulletin 98:310(1985)
- [0251] 38.Beck等,University of Pennsylvania Press (2009)
- [0252] 39.Johnson等,Journal of Psychosomatic research 22:205-208 (1978)
- [0253] 40.MRCP等,Journal of Human Stress 2:3-12(1976)
- [0254] 41.Swaab等,Ageing research reviews 4:141-194(2005)
- [0255] 42.Paul.Trends in Pharmacological Sciences 12:131-136(1991)
- [0256] 43.Paul.Pharmacology&Therapeutics 45:425-455(1990)
- [0257] 44.Moreau等,European Neuropsychopharmacology 2:43-49 (1992)
- [0258] 45.Willner,等,Neuroscience&Biobehavioral Reviews 16:525-534 (1992)
- [0259] 46.Muscat等,Psychopharmacology 109:433-438(1992)
- [0260] 47.Anisman等,Neuroscience&Biobehavioral Reviews 29: 525-546(2005)
- [0261] 48.Nagel等,Proceedings of the National Academy of Sciences 100: 13940-13945 (2003)
- [0262] 49.Adamantidis等,The Journal of Neuroscience 31:10829-10835 (2011)
- [0263] 50.Witten等,Neuron 72:721-733(2011)
- [0264] 51.Borgkvist等,Neuron 70:803-805(2011)
- [0265] 52.Lammel等,Neuron 57:760-773(2008)
- [0266] 53.Lammel等,Neuron 70:855-862(2011)
- [0267] 54.Fields等,Annu.Rev.Neurosci.30:289-316(2007)
- [0268] 55.Stuber等,The Journal of Neuroscience 30:8229-8233(2010)
- [0269] 56.Tecuapetla等,The Journal of Neuroscience 30:7105-7110 (2010)
- [0270] 57.Hnasko等,Neuron 65:643-656(2010)
- [0271] 58.Malone Jr.等,Biological Psychiatry 65L 267-275(2009)
- [0272] 59.Bewernick等,Biological Psychiatry 67:110-116(2010)
- [0273] 60.Berman等,Biological Psychiatry 47:351-354(2000)
- [0274] 61.Maeng等,Biological Psychiatry 63:349-352(2008)
- [0275] 62.Zarate等,Arch Gen Psychiatry 63:856-864(2006)
- [0276] 63.Porsolt等,European Journal of Pharmacology 47:379-391 (1978)
- [0277] 64.Friedman等,Journal of Molecular Neuroscience 34:201-209 (2008)
- [0278] 65.Cao等,The Journal of Neuroscience 30:16453-16458(2010)
- [0279] 66.Krishnan等,Cell 131:391-404(2007)
- [0280] 67.Depue等,Behavioral and Brain Sciences 22:491-517(1999)
- [0281] 68.Fibiger等,Comprehensive Physiology(1986)
- [0282] 69.Salamone等,Behavioural Brain Research 61:117-133(1994)
- [0283] 70.Schultz等,Science 275:1593-1599(1997)

[0284] 71.Stuber等,Science 321:1690-1692 (2008)

[0285] 72.Mayberg等,Neuron 45:651-660 (2005)

[0286] 实施例2:在面向目标的行为状态中前额皮质向脑干神经投射的作用

[0287] 材料和方法

[0288] 受试者。从查尔斯河(Charles River)得到重200-225g(大约6-8周)的雌性朗伊凡氏大鼠(Long-Evans rat)。使大鼠保持标准的12h光暗循环并且随意给予食物和水。最初每个笼子饲养两只大鼠。植入了四极管微型硬盘或固定线阵列的动物在移植后单独饲养以对记录用硬件的损害减到最小。仅植入了光纤的动物在移植后继续每只笼子饲养两只。所有程序遵照国立卫生研究院(National Institutes of Health)确定的指导方针并且已经得到斯坦福大学动物保护与应用委员会(Stanford Institutional Animal Care and Use Committee)批准。

[0289] 自动化强迫游泳试验(FST) 9英寸直径的水池(Tap Plastics, Mountain View, CA)周围是由10磅26号规格漆包铜线构成的10英寸直径的线圈。用温暖舒适的橡皮圈将2g稀土磁体置于大鼠的后足部。在行为试验之前立即进行磁体放置并且醒来的大鼠耐受良好。FST期间,发现游泳期间磁体在线圈内的移动在线圈中感应强电流。线圈电压是1和300Hz之间滤波的带通,在2kHz下数字化并且使用数字 Lynx数据采集系统(Neuralynx, Bozeman, MT)记录进行后期分析。同时从参考线圈收集数据,并且离线进行参考以减少线路噪声。通过将感应线圈放在笼子的正下方使用相同系统测量在熟悉笼子中的运动活性;先前已经使用了类似方法测量大鼠的帕金森氏病震颤(1)。对所有实验收集了线圈数据和视频数据。在对实验条件和自动评分固定性/踢腿频率不知道的情况下,进行用于验证自动化方法的手动评分。手动评分期间每5s进行目视观察,并且将固定时期定义为没有移动或保持飘浮所需最少必须移动。

[0290] 四极管微型硬盘或固定线阵列放置 对于图2所示数据,大鼠在手术之前达到最少400g。对于图4所示数据,在8-10周在mPFC中(如下所述)为大鼠两侧注射病毒,并且在电极移植之前使病毒最少表达4个月(通常大鼠达到>400g重量)。最初用5%异氟烷麻醉大鼠。刮头皮并将大鼠放在具有非破裂性耳棒的立体定位架中。使用加热板预防体温过低。整个手术中递送1-3%的异氟烷;调节该水平以维持恒定手术平面。使用眼用软膏保护眼睛。手术开始之前给予丁丙诺啡(buprenorphine)(0.05mg/kg,皮下)和恩诺沙星(enrofloxacin)(5mg/kg,皮下)。沿着切口线皮下注射0.5%利多卡因(lidocaine)和0.25%布比卡因(bupivacaine)的混合物(100μL)。用聚维酮碘(betadine)和醇为头皮消毒。正中切口露出颅骨,其经彻底清洁。在暴露的颅骨外周植入8-11个颅骨螺钉以确保稳定记录,在右侧mPFC上钻2-mm颅骨切孔,并且小心切除硬脑膜。在颅骨切孔(AP:2.7-3.3ML:0.8DV:4.0)上植入从13μm镍铬合金缠绕有四极管的4-四极管微型硬盘(Neuralynx, Bozeman, MT)或具有50μm不锈钢电极的24-电极固定线(NB Labs, Denison, TX)并且用牙科用丙烯酸树脂固定。对于图4所示数据,此时还植入了靶向DRN的光纤跳线(如下所述)。使丙烯酸树脂成形以在颅骨和电极接口板之间产生细小脖颈,以便利于防水。缝合皮肤并且给予大鼠卡洛芬(carprofen)(5mg/kg,皮下)和乳酸林格氏液(lactated ringer's solution)(2.5mL,皮下)并且在加热灯下恢复。移植后每天调节四极管。

[0291] 自由移动的神经生理学用异氟烷简单麻醉大鼠。探头和绳索(Neuralynx,

Bozeman, MT) 与微型硬盘或固定线阵列连接并且用线固定以预防“湿狗”抖动期间分离。为保护电子设备免受水渍,将切去两端的橡胶套固定在用橡皮圈紧紧缠绕的探头连接点周围。此时,将磁体连接到后足部进行行为读数。异氟烷麻醉的总时间限制为小于 10min,并且在开始记录之前使速率恢复至少1h。对于图4记录,在 FST之前立即连接光线电缆以便将旋转期间因为扭转的破损减到最少,并且在记录之后立即检查光功率以确认光纤完整。用64通道数字Lynx数据采集系统 (Neuralynx, Bozeman, MT) 采集神经数据。首先将强化通道引用到未表现出强化活性的电极以减少行为噪声。然后在 600和6000Hz之间带通滤波信号并且在32kHz下数字化。还在所有时期记录了感应线圈数据和视频数据以便验证感应线圈方法对FST 和熟悉笼子活动的用途。根据实验对可变数量的时期记录数据。对于图2,我们记录了FST前在熟悉笼子中15min, FST期间15min和FST 后在熟悉笼子中15min的数据。对于图4,我们记录了FST前在熟悉笼子中的15min, FST期间有刺激的20min (与5个2-min刺激时期交错的5个2-min无刺激时期), FST后在熟悉笼子中的15min和FST 后在熟悉笼子中有刺激的20min (与5个2-min刺激时期交错的5个 2-min无刺激时期)。在熟悉笼子与游泳池之间转移期间轻轻触摸大鼠以将神经漂移减到最小。完成记录后,去除防水材料并且将大鼠置于加热灯下10min干燥。处死进行组织学分析之前,深度麻醉大鼠并且电流通过所有电极 (50 μ A, 30s) 以产生电解损伤进行解剖定位。

[0292] 病毒构建和包装在北卡罗来纳大学 (University of North Carolina) 用AAV5外壳蛋白对重组AAV载体进行血清分型并且用病毒载体核包装。对于AAV5-CaMKII α -hChR2 (H134R)-EYFP和AAV5-CaMKI I α -EYFP而言,病毒滴度分别为 2×10^{12} 个颗粒/mL和 3×10^{12} 个颗粒/mL。在www(dot)optogenetics(dot)org上图谱在线可用。

[0293] 立体定位病毒注射和光纤移植将大鼠准备好手术并如上所述给予镇痛剂和流体。正中切口露出颅骨,并且在mPFC上两侧产生颅骨切孔。用10 μ L注射器和斜面面向前面的33号规格斜面针,以 150nL/min使用注射泵注射病毒。在AP 2.2mm、ML 0.5、DV 5.2和 AP 2.2、ML 0.5、DV 4.2处递送两次1 μ L注射,每只大鼠总计4 μ L。每次注射后,将针留在原处7min,然后缓慢抽出。缝合皮肤。使病毒表达最少4个月以便允许有时间在轴突上积聚足够的视蛋白。在行为试验之前至少10天,如先前所述2,在目标靶结构上植入具有外部金属箍的光纤 (200 μ m直径, 0.22NA, Doric Lenses, Québec, Canada)。mPFC移植的坐标为AP 2.7、ML 0.5、DV 3.8。在从右侧30度处植入DRN光纤以避免中央窦和脑导水管,并且光纤尖端的坐标为AP -7.8、ML 0.5、DV 5.9。将大鼠准备好手术并如上所述给予镇痛剂和流体。产生正中切口,彻底清洗颅骨并且在mPFC或DRN上产生颅骨切孔。连接4个颅骨螺钉,并且在mPFC或DRN上降低光纤。使用环氧树脂类粘合剂薄层牢牢地将硬件连接到颅骨上,接着是较厚的牙科用丙烯酸树脂层用于结构支撑。

[0294] 光递送行为试验期间,用氧化锆套管将外部光纤 (200 μ m直径, 0.22NA, Doric Lenses, Québec, Canada) 偶联到植入的光纤。光学转换器允许不受限制的旋转 (Doric Lenses, Québec, Canada) (3)。用100mW 473nm二极管泵浦固体激光器 (OEM Laser Systems, Inc., Salt Lake City, UT) 提供光学刺激并且用Master-8刺激发生器 (A.M.P.I., Jerusalem, Israel) 控制。用数字Lynx数据采集系统 (Neuralynx, Bozeman, CA), 与行为和神经数据一起同时记录光脉冲。20Hz的5ms 长光脉冲的脉冲序列用于所有实验。mPFC细胞体刺激实验使用3mW 光 (光纤尖端为24mW/mm²)。mPFC-DRN轴突刺激实验使用20mW 光 (光纤

尖端为 $159\text{mW}/\text{mm}^2$)。由于在这个部位荧光较低,这是视蛋白表达较低的指标,所以DRN轴突刺激实验期间需要更强的光功率。

[0295] 强迫游泳试验 我们利用Porsolt强迫游泳试验进行这些实验4。游泳池装入 25°C 水至40cm高度。将感应线圈放在所述池周围,并且如上所述,将小磁体连接到大鼠的后足部。第一天在光/暗循环的光部分期间将大鼠置于FST中15min进行预曝光。然后用毛巾将其擦干并且在回到饲养笼之前置于加热灯下10min暖和。在24h后进行的第二个15-20min试验期间收集数据。将外部光纤悬挂在FST池上并用氧化锆套管连接到植入的光纤上。用光刺激的实验期间,刺激在2min时期的开灯和关灯期间交替,开始没有刺激,使用上述参数总计20min。对所有实验收集感应线圈数据、视频数据和激光脉冲时间数据。每只动物间更换FST池。

[0296] 旷场试验 将外部光纤悬挂在旷场上并用氧化锆套管连接到植入的光纤上。将大鼠放在白色、光线昏暗的旷场腔室($105\times 105\text{cm}$)的中央并允许自由探索环境。光刺激在3min时期的开灯和关灯期间交替,开始没有刺激,总计15min。将摄像机放在旷场正上,并且用Viewer2 软件(BiObserve,Fort Lee,NJ)检测和分析运动活性。收集激光脉冲时间数据并与行为数据同步。

[0297] 体内麻醉记录 如先前所述3,对在mPFC中用AAV5 CaMKII α -ChR2-EYFP构建体转导的麻醉大鼠进行mPFC和DRN的同时双位记录和光学刺激。开始记录之前用异氟烷深度麻醉大鼠。产生正中切口并且皮肤反射。在mPFC(垂直穿透)和DRN(30° 穿透)上产生2-3mm直径颅骨切孔。立体定向降低与 $200\mu\text{m}$ 0.37 NA光纤(Thorlabs Inc.,Newton,NJ)偶联的1Mohm环氧涂层钨电极(A-M Systems,Sequim,WA),直至对于mPFC记录而言在AP 2.7、ML 0.5、DV 3.6处和对于DRN记录而言在AP-7.8、ML 0.5、DV 6.0处(30° 穿透)开始分离一个单元。记录的信号在0.3和10kHz之间经带通滤波,放大 $10000\times$ (A-M Systems),在30kHz下数字化(Molecular Devices, Sunnyvale,CA)并且用Clampex软件(Molecular Devices)记录。用100mW 473nm二极管泵浦固体激光器(OEM Laser Systems,Inc.,Salt Lake City,UT)提供光学刺激。Clampex软件用于记录神经数据并控制激光输出。使用介于1mW(在光纤尖端为 $8\text{mW}/\text{mm}^2$)和20mW($159\text{mW}/\text{mm}^2$)之间的光功率。在所有实验结束时,电流通过电极($50\mu\text{A}$,30s)以产生电解损伤进行解剖定位。

[0298] 组织学、免疫组织化学和共聚焦成像 用Beuthanasia-D深度麻醉大鼠并且穿心灌注4%于PBS(pH 7.4)中的冰冷多聚甲醛(PFA)。将脑部于PFA中固定整夜,然后转移到30%于PBS中的蔗糖中以平衡至少3天。在冷冻切片机上切通过mPFC和DRN的 $40\mu\text{m}$ 冠状切片并且在 4°C 下储存在防冻剂中。用PBS洗涤切片并在于PBS中的0.3% Triton X-100和3%常规驴血清(NDS)中培育30min。在 4°C 下,在于PBS中的3%NDS(兔抗5HT 1:1000,ImmunoStar,Hudson,WI)中用一次抗体培育切片整夜。然后将其在PBS中洗涤并在室温下用与Cy5 偶联的二次抗体培育3h(1:500,Jackson Laboratories,West Grove, PA)。于PBS中洗涤切片并且在DAPI(1:50000)中培育10min,然后再次洗涤并用PVA-DABCO固定在载玻片上。使用具有 $10\times$ 空气物镜或 $40\times$ 油浸物镜的Leica TCS SP5扫描激光显微镜获取图像。

[0299] 数据分析 将峰值导入离线分类软件(Plexon Inc,Dallas,TX)并使用波形特征(峰谷高度)和主要组成部分离线分类。使用自定义编写的 Matlab(Mathworks,Natick,MA)脚本和Neuroexplorer数据分析包(Nex Technologies,Littleton,MA)进行神经数据和行

为数据的分析。对于所有分析而言,统计显著性定义为 $p \leq 0.05$ 。参考感应线圈数据并且在1-6Hz下离线零相位过滤,这样保护了个体踢腿的形状,同时降低了高频线路噪声。然后整合参考且过滤的线圈数据并且阈值化(最大偏差的10%)并且检测了与个体踢腿相对应的峰值(图1)。挣扎期间进行的踢腿与记录的信号中的大偏转相对应并且可易于和被动漂浮期分开。将瞬时踢腿频率定义为10s期内每秒钟踢腿的平均次数。通过将踢腿间隔大于1s的时期评分为固定,测定自动评分的固定性。对熟悉笼子记录期间收集的感应线圈数据进行相同分析。在这种情况下,在1-20Hz下过滤感应线圈数据,在4%最大偏差下阈值化,并且因为使用这些参数更易于检测单极步波形,所以并未整合。对手动评分的行为数据回归自动评分的行为数据以测定评分方法之间的一致性。由该回归分析导出R平方和F统计量和p值。使用Wilcoxon秩和检验进行不同行为时期之间神经放电统计显著差异的测定。首先测试神经元在FST前期和FST时期之间放电率的差异。对于该分析,将神经和行为数据归入10s间期。然后测试神经元在FST期间移动和固定状态之间放电率的差异。对于该分析,将移动和固定行为时期分为两个不同的连续数据流,然后如以上使用10s期进行统计试验。

[0300] 将图2中使用的选择性指数定义为条件之间放电率的差异除以总和。鉴定假定的快速尖峰形成抑制神经元的标准是放电率高于20Hz和窄波形5。使用Wilcoxon符号秩检验测定图3中行为数据的统计显著性。数据首先经线性除趋势。在10s期内计算图4中描绘的瞬时平均放电率,并且再次使用Wilcoxon秩和检验计算个体神经元的统计显著性。使用对方差的F检验,测试移动性-固定性差异的分布在刺激和非刺激条件之间方差的变化。用协方差分析(ANCOVA)测试斜率的差异。

[0301] 结果

[0302] 在充满挑战的条件下以积极努力采取行动消耗能量表示生物的重要决定,尤其是因为这种行为并不总是代表大部分适应性行为。即使在极其困难的情况下选择有力的行为模式时(而非更节能的被动或抑郁型模式),评估可能已经出现预期结果证明能量消耗。相反,当生物在充满挑战的情形下选择不活跃的行为模式时,决定可能代表预计努力很可能徒劳。而且,在人类中导致不活动的预期可变得不适应,包括临床症状例如精神运动性阻滞和绝望(重性抑郁症的核心定义特征,终生患病率近20%且具有广泛社会经济分支的疾病(9))。

[0303] 我们设法探查在自由移动的哺乳动物中以受限制的电路元件组的靶向控制,支配行为状态选择的高水平过程。关于此类决策的神经基础的了解很少,也不存在特别靶向这些行为的广泛有效的医学疗法。然而,越来越多证据表明可能牵涉前额皮质(PFC);PFC负责协调思想和行为,并且已经证实对目标导向行为、计划和认知控制至关重要(10,11)—在病理状态例如抑郁症中其全部受损(12-17),与疾病相关的额叶功能低下(hypofrontality)(5,18)一致。

[0304] 而且,认为与啮齿动物内侧PFC(mPFC)的边缘下区类似的胼胝体下扣带的深部脑刺激(DBS)在难治性患者(19)中引起抗抑郁作用。啮齿动物mPFC的电刺激诱导强迫游泳试验(20,21)中固定性的抗抑郁样降低,mPFC的光遗传刺激对糖水消耗量和社会失败有抗抑郁样作用(如果同时刺激兴奋性和抑制性神经元)(22),并且啮齿动物体内的mPFC似乎介导了恢复和行为代理对习得性无助获得的保护作用(23,24)(被认为模仿重性抑郁的主要特征)(25)。最后,对人类患者的神经成像研究已经有助于集中对脑部区域的关注,包括在抑

郁症和忧郁状态中表现出异常活性的PFC (5,6,26)。

[0305] 尽管这些开创性努力针对PFC (具有许多作用和不同传入和传出神经的广泛而复杂的区域),对充满挑战的情形的目标导向行为响应的实时选择牵涉哪个特定神经通路仍不清楚。与在啮齿动物中广泛采用的行为试验一样 (27),强迫游泳试验 (FST) 与这个组织有关。在FST 中,啮齿动物置于无法逃避的水池中,并且认为反映了行为绝望状态 (27) 的被动漂浮或固定时期与有主动逃避行为时期穿插;FST中的固定性受抗抑郁药物 (28) 和应激 (29) 影响。将FST中主动逃避和行为绝望状态之间的过渡清楚地划开界限,原则上提供了行为状态的明确瞬时分类和研究成为决定对挑战采取主动行为响应的基础的神经动力学的机会。然而,就我们所知,由于在自由游泳的动物中记录和控制神经活动的基本技术障碍,在行为动物中尚未在FST期间记录到神经活动。

[0306] 为应对这种挑战,我们研发了一套新的记录FST期间随着光遗传控制的毫秒精度神经和行为数据的方法 (图5)。我们设计了磁感应法检测个体游泳踢腿,其中用感应线圈包围FST水池并且将小磁体连接到后爪 (图5a)。FST期间,每次踢腿在线圈中感应电流 (图5b);可能干净地分离单次踢腿 (图6),并且踢腿频率与手动评分的固定性对应良好 (图5c),提供了对行为状态的可靠测量 (图5d)。我们另外采用这种方法记录在熟悉笼子中活动期间的移动和固定状态,正如先前在似帕金森氏病大鼠 (30) 中对震颤测量观察到的那样,这与手动记录的数据良好符合 (图7)。为了记录游泳期间很好分离的单个单元和局部场电位,植入了四极管微型硬盘或固定线阵列,然后防水。

[0307] 在这些条件下,我们能够容易地分离FST固定和移动状态期间的单个单元 (图5e);事实上,我们能够以高时间精度检测主动逃避行为和固定状态之间的过渡并且将这些行为与正在进行的神经活动相关联 (图8)。我们使用靶向mPFC的4-四极管微型硬盘 (6只大鼠) 或24-电极固定线阵列 (5只大鼠) 记录神经活动 (图8a)。定期记录3个时期的数据 (图8b):在熟悉笼子中FST之前的15min,FST期间的15min 和FST后回到熟悉笼子中的15min。我们发现许多mPFC神经元在行为期间以似乎明确反映FST期间动作或克制动作的决定的方式受强烈调节。示出了实例神经元 (图8c-d)。这种神经元在FST之前和之后以固定为主的时期有高活性,但是在FST期间其在移动状态期间保持活性而在固定状态期间受抑制。因此这种神经元不仅仅编码运动活性,但是相反在对应于传统定义的行为绝望状态的FST固定期间受特异性抑制。我们发现在记录群体中许多表现出这种惊人的活性性质的神经元 (23/160,14%)。所有大鼠均在FST前期表现出最低的运动活性 (对于所有大鼠而言大于88%固定性,平均97%固定性) 而在FST 期间表现出高水平的运动活性 (对于所有大鼠而言小于79%固定性,平均39%固定性,图8e)。记录的大多数神经元 (129/160,81%) 在FST 前和FST时期之间的放电率上显示出显著变化 (图8f,上)。平均来说,在FST时期这群神经元受抑制 (80/129,62%),但是记录到选择性反映时期整个范围的神经元。许多神经元 (70/160,44%) 也在FST时期移动和固定状态之间放电率上显示出差异 (图8f,下)。这些神经元大部分在移动状态受激活而在固定状态受抑制 (51/70,73%),但是也检测到在移动状态受抑制的神经元。

[0308] 然后我们检查了4个象限中具有时期和移动性依赖性神经选择性的联合分布 (图8g),并且发现其非常不对称。其中两个,右上和左下象限,在运动活性和神经活性之间表现出直接对应;例如,右上象限中的神经元在很大程度移动的FST时期比在FST之前的固定时期更具活性,并且,在FST时期内,在移动状态下更具活性。另外两个象限 (左上和右下象限)

显示出反向对应。在左上象限中,在更具活性的FST时期静止的神经元实际上在FST中的逃避行为期间激活,并且右下象限中的神经元相反。因此这些组中发现的活性性质不仅仅取决于运动活性。有趣的是,根据原始数量和个体神经元表现出的选择性强度,似乎存在的在固定、行为绝望样状态期间受抑制的神经元比存在的在这些状态期间激活的神经元更多。最后我们注意到,假定快速尖峰形成的中间神经元沿两个选择性维度表现出调节程度降低,表明在兴奋性或投射神经元中反映对挑战的行为响应的信号占据了更大的比例。

[0309] 因为记录到的mPFC神经元表现出一系列选择性,所以mPFC中光遗传激活性局部神经元不一定在FST期间对行为有净效应并不明显。为测试这一点,我们使用在CaMKII α 启动子的控制下,表达与增强型黄色荧光蛋白融合的视紫红质通道蛋白-2 (ChR2-EYFP) 的腺相关病毒载体 (AAV5),对mPFC中的兴奋性神经元限制视蛋白表达。将病毒输注到mPFC中并且在缘前区上植入微型光纤 (图9a-b)。通过在mPFC中的麻醉光极记录和经照射证明尖峰形成活性确认这些神经元的功能靶向 (图10a),但是令人惊讶的是,当在FST期间的2-min 时期照射这些神经元时,我们发现刺激甚至不足以引起固定性的略微降低 (图9c)。我们还用旷场试验 (OFT) 测试了这些大鼠以评估刺激诱导的运动活性变化并且类似地没有找到总运动效果的证据 (图10b)。这些FST结果的一种解释是局部PFC神经元可能与移动性和固定性相关的行为状态变化相关联,但不是因果上牵涉其中;可选地,可能如此牵涉一些局部PFC神经元,但是其它的在因果关系函数中不存在或相反,并且当一起驱动时,未看到对行为的净效应。

[0310] 因此接下来我们假设通过限制对更小mPFC神经元群体的光遗传刺激,可能诱导有动机的行为状态的变化。已知mPFC投射到已经牵涉于有动机的行为和抑郁的几个下游脑部区域 (31);其中为中缝背核 (DRN) (32),9个血清素能核中最大的一个 (33,34) 并且牵涉于重性抑郁障碍8。mPFC对DRN中的神经活性和细胞外5-HT水平施加控制 (23,35),并且mPFC电刺激的抗抑郁样作用似乎取决于完整的5-HT 系统 (20),但是从未直接证实从mPFC投射到DRN对行为有影响。

[0311] 为了特异性激活mPFC-DRN投射,我们首先使用AAV5病毒载体,用受CaMKII α 启动子控制的ChR2-EYFP转导mPFC中的兴奋性神经元 (图9d),这导致在DRN的mPFC轴突中ChR2-EYFP稳健表达 (图9e;图11a)。我们通过在DRN上植入微型光纤并且选择性照射这个区域中的mPFC轴突,限制对mPFC中投射到DRN的兴奋性神经元亚群的激活 (图9d)。通过在DRN中的麻醉光极记录和经照射 mPFC轴突证明DRN神经元的尖峰形成活性确认功能靶向 (图10b)。

[0312] 当在FST期间刺激DRN中表达ChR2-EYFP的mPFC神经元的轴突时,产生深刻的行为效应。示出了来自两只大鼠 (一只ChR2-EYFP 大鼠和一只EYFP大鼠,图9f-g) 的实例感应线圈行为轨迹,证明 ChR2-EYFP情况而非对照EYFP情况下,每个开灯时期踢腿频率强劲增长。这种行为效应存在于大多数大鼠中并且迅速、可逆且可重复 (图9h-i)。重要的是,这种投射的刺激不影响在旷场中的运动活性 (图 9j),再次证明在FST期间所见的逃避行为不是非特异性运动激活的结果。如图9c所示,这种结果仍与经非特异性驱动所有mPFC兴奋性神经元看到缺乏效果形成鲜明对比,证明了拆分投射靶标限定的亚群的重要性,并且说明了在驱动对充满挑战的环境的目标导向行为响应中特定PFC-脑干神经通路的因果作用。

[0313] 最后,我们探索了这种光遗传诱导的行为效应可能如何影响FST 期间行为状态的mPFC神经编码。对于该实验,我们在mPFC主神经元中表达ChR2-EYFP并且在DRN上植入光纤

以便特异性激活具有这种投射的细胞。另外,我们在mPFC上植入了24-电极固定线阵列以记录在这些神经元中的神经活性,同时刺激mPFC-DRN投射(图 12a)。我们记录了来自3只大鼠的神经活性,其全部显示稳健的光诱导行为效应(图12b)。而且,在几乎全部记录的mPFC神经元中光影响了放电率(31/34,91%)。虽然比通过刺激激发(9/31,29%),有更多神经元明显受抑制(22/31,71%),但是群体间的平均放电率在刺激时期略微增加(图12c),与特定行为状态的选择一致并且表明 mPFC→DRN刺激对mPFC的净效应是普遍微弱抑制,加上mPFC网络相对强烈的稀疏激发。我们还注意到,在刺激时期PFC中关于行为状态的信息减少。

[0314] 在FST中没有刺激的时期测试了移动和固定状态之间放电率的差异时,62% (21/34) 神经元明显受调节。然而,当测试这些相同神经元在光刺激期间移动和固定状态之间放电率的差异时,有显著选择性的比例急剧下降到21% (7/34)。对每个神经元固定与移动放电率的检查说明了这种影响(图12d);刺激期间的放电率显示出对固定状态的依赖性低于没有刺激的时期的放电率;这些点在最佳拟合线周围有更紧密的分布。我们检查了移动和固定状态之间放电率的原始差异并且观察到刺激期间这种差异的分布明显更窄(图12e-f)。刺激和非刺激条件之间斜率无明显差异(ANCOVA, $p = .2041$)。

[0315] 将记录的神经元群体分为图8g所述的4个象限,我们注意到移动-固定性编码的减少对于所有细胞类型适用(图12g),并且无论神经元增大、降低还是维持其平均放电率,都看到这种减少。光刺激期间行为状态的mPFC编码的这种减少可能反映在外源应用的驱动目标导向的刺激的存在下,对进一步恢复这种特定内源性PFC活性模式的需要降低。有趣的是,光刺激对FST后的时期中移动性编码没有影响(图12h-j)。

[0316] 在这里,我们已经使用在强迫游泳试验中允许电记录和光遗传控制的新技术,连同瞬时行为状态的高速读数,探查了牵涉于在充满挑战的情形下选择目标导向行为的神经关联和因果神经通路。我们已经证明不同生理学定义的mPFC神经群体的存在——一种在行为绝望样状态期受选择性抑制,而另一种选择性激活。我们还已证明,虽然激活mPFC中的所有兴奋性神经元对这种行为没有净效应,但是投射到 DRN的那些mPFC神经元的选择性激活对响应于没有非特异性运动激活的挑战,积极行为状态的选择具有深刻、快速且可逆的影响。

[0317] 总之,这些生理和行为结果描述了成为对充满挑战的情形的行为响应的基础的神经动力学并且证明了DRN的mPFC控制在执行这种响应中的因果重要性,对理解行为模式选择的正常和病理状态有潜在含义。

[0318] 图5A-E:自动化FST提供了可与同时记录的神经数据同步的高时间分辨率行为读数。a) 自动化FST的示意图。用线圈包围水池并且将磁体舒适地连接到大鼠的后爪。游泳期间磁体在线圈中的运动感应出可记录到的电流。为了允许同时神经记录,为探头防水。可将光纤包括在内用于同时光学刺激。b) 实例FST线圈轨迹。描绘了线圈电压。上:描绘了个体踢腿的短时6s行为线圈轨迹。中:描绘了在较长时间尺度的活性的较长5min行为线圈轨迹。下:由5min线圈轨迹估计的瞬时踢腿频率。c) 平均踢腿频率与手动评分的固定性估计值良好对应。d) 源自感应线圈的FST固定性估计值与手动评分的固定性估计值密切对应。e) FST期间记录的4个良好分离的单mPFC单元。

[0319] 图6A和6B:强迫游泳试验中个体踢腿的检测。a) 首先过滤感应线圈轨迹(1-6Hz),然后整合以在每次踢腿的中点产生峰值。然后阈值化整合的轨迹(最大偏差的10%)并检测峰值。阈值以灰色示出。b) 整合之前过滤的线圈轨迹。踢腿时间与每次踢腿的中点对应。

[0320] 图7A-C:磁感应法可用于检测在笼中的固定性。a) 过滤感应线圈轨迹(1-20Hz), 阈值化(最大偏差的4%), 并检测峰值。由于单极波形与步骤相关, 所以在峰值检测之前未整合笼子线圈轨迹。b) 自动化评分的笼子固定性与手动评分的笼子固定性对应良好。c) 平均步进频率与手动评分的固定性对应良好。

[0321] 图8A-G:前额叶神经元活性编码FST行为状态。a) 在mPFC 上植入4-四极管微型硬盘(6只大鼠)或24-电极固定线阵列(5只大鼠)。b) 我们记录了FST前在熟悉笼子中15min (FST前), FST期间 15min (FST) 和FST后在熟悉笼子中15min (FST后) 的数据。c) 在FST 的固定状态期间受特异性抑制的实例神经元的柱状图。这种神经元在 FST前后基本固定的时期和FST移动状态期间以高速率放电, 但是在FST固定状态期间受特异性抑制(Wilcoxon秩和检验, $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$; $****p<0.0001$)。d) 相同神经元的光栅图。线圈轨迹为黑色, 移动状态为紫色, 尖峰为红色。上: FST前在熟悉笼子中的活性。这种神经元在FST前的整个时期以高速率放电, 其中大鼠几乎完全不动(98%固定性)。中: FST期间的活性。这种神经元在移动状态期间以高速率放电, 但是在与行为绝望样状态对应的固定状态期间受抑制。下: FST后在熟悉笼子中的活性。这种神经元在 FST后的整个时期再次稳健放电, 其中大鼠大部分不动(94%固定性)。e) FST前和FST试验时期来自全部11只大鼠的行为数据。大鼠在FST 前的时期在熟悉的笼子中几乎完全不动(97%固定), 但是在FST期间活跃得多(39%固定)。f) 群体选择性指数的分布(见补充方法)。上: FST前与FST时期。示出了对于FST前与FST有显著选择性的所有神经元。提出了各种选择性性质。下: 移动与固定FST状态。示出了对于移动与固定FST状态有显著选择性的所有神经元。大多数神经元在移动FST状态期间放电比在固定FST状态期间多。g) 选择性指数的联合分布。左上象限对应在FST的固定状态期间受特异性抑制的神经元, 而右下象限描绘了在这些状态期间特异性激活的神经元。黑色圆圈: 对任务时期和移动性均有选择性的神经元。红色圆圈: 实例神经元。蓝色圆圈: 假定抑制性快速尖峰形成的神经元。回收圆圈: 非显著选择性神经元。示出了记录的所有神经元。

[0322] 图9A-J:光遗传刺激DRN中的mPFC轴突, 而非兴奋性mPFC 细胞体, 在具有挑战性的情况下诱导快速可逆的行为激活。a) 在 mPFC中两侧输注AAV5CaMKII α -Chr2-EYFP或CaMKII α -EYFP并且在感染细胞体上植入光纤。b) mPFC中的EYFP荧光。c) 来自 Chr2-EYFP(左侧, $n=10$) 和EYFP(右侧, $n=8$) 大鼠的行为数据。照射 Chr2-EYFP大鼠体内的兴奋性mPFC细胞体未诱导行为效应(去趋势数据, 开灯与关灯, Wilcoxon符号秩检验, $p=0.23$)。灰线代表个别大鼠, 而较粗的线描绘了Chr2-EYFP(红色)或EYFP(黑色) 大鼠的行为平均值。蓝色柱指示开灯。d) 在mPFC中两侧输注AAV5 CaMKII α -Chr2-EYFP或CaMKII α -EYFP并且在DRN上植入光纤以便特异性激活mPFC-DRN轴突。e) DRN中的mPFC轴突中的EYFP 荧光(对5-HT免疫染色)。f) 来自一只表达Chr2-EYFP的大鼠的行为数据。上、中: 线圈轨迹。下: 踢腿频率。光刺激期间踢腿频率增加。蓝色柱指示开灯。g) 来自一只表达EYFP的大鼠的行为数据。上: 线圈轨迹。下: 踢腿频率。踢腿频率不受光刺激影响。h) 来自所有大鼠的行为数据。左: Chr2-EYFP大鼠($n=16$)。照射DRN中表达Chr2 的mPFC轴突在FST中诱导快速可逆的行为激活。右: EYFP大鼠($n=12$)。照射DRN中表达EYFP的mPFC轴突不影响行为。i) 来自 h) 的线性去趋势数据。在Chr2-EYFP大鼠(Wilcoxon符号秩检验, $p=1.04e-11$), 而非EYFP大鼠(Wilcoxon符号秩检验, $p=0.39$; $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$; $****p<0.0001$) 中光刺激期间的踢腿频率在照射期间显著增加。j) 旷场试验。光刺激投射DRN的mPFC神经元对 Chr2-EYFP大鼠($n=12$,

Wilcoxon符号秩检验, $p=0.59$)或EYFP大鼠 ($n=12$,Wilcoxon符号秩检验, $p=0.71$)的运动活性没有非特异性影响。

[0323] 图10A和10B:大鼠mPFC的光遗传刺激。a)在mPFC中两侧输注AAV5CaMKII α -ChR2-EYFP。光极记录检测局部细胞体照射诱导的mPFC中的尖峰形成活性。b)旷场试验。在mPFC中两侧输注 AAV5CaMKII α -ChR2-EYFP或AAV5CaMKII α -EYFP。光刺激mPFC 不影响ChR2-EYFP大鼠 (Wilcoxon符号秩检验, $p=0.50$, $n=10$)或EYFP 大鼠 (Wilcoxon符号秩检验, $p=0.09$, $n=8$)的速度。红线指示 ChR2-EYFP组平均值。灰线指示EYFP组平均值。蓝色柱指示开灯。对去趋势数据进行显著性计算。

[0324] 图11A和11B:DRN组织学和光极记录。a)在mPFC中两侧输注AAV5CaMKII α -ChR2-EYFP。用绿色示出DRN中mPFC轴突中的EYFP荧光,红色示出了对5-HT的免疫染色,并且用白色示出了对核的DAPI染色。b)在mPFC中两侧输注AAV5 CaMKII α -ChR2-EYFP。DRN中的光极记录检测照射DRN中的mPFC 轴突诱导的局部尖峰形成活性。每个光脉冲均未引出尖峰。示出了 12条重叠轨迹。

[0325] 图12A-J:光遗传刺激投射DRN的mPFC神经元降低了移动性的mPFC编码。a)向mPFC两侧输注AAV5CaMKII α -ChR2-EYFP 并且在DRN上植入光纤。使24电极固定线阵列靶向mPFC。b)3只经注射和植入的大鼠全部在刺激期间在FST移动性上显示出稳健增加。c)光刺激mPFC-DRN诱导了平均mPFC放电率的适度增大(但是见文本)。d)照射DRN中的mPFC轴突降低了FST期间移动状态的mPFC编码。每个点代表一个神经元。黑色矩形描绘了无光刺激神经元的移动与固定放电率,而蓝色圆圈描绘了有光刺激的移动与固定放电率。光刺激使这些点在最佳拟合线周围紧密集群。经光刺激斜率没有显著变化(ANCOVA, $p=0.20$)。e-f)移动和固定状态间放电率变化的直方图。上:无光刺激。下:有光刺激。照射减小了这种分布的方差(等方差F检验, $p=2.11e-4$),表明在这些神经元中移动状态的编码减少。g)神经元的4个象限(参见图12f)全部显示经光照射移动状态的编码减少。h-j)当大鼠在熟悉的笼子中,并且未进行FST时,刺激对移动状态编码没有显著影响。

[0326] 参考文献

[0327] 1.McGuire等,Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:7922-6(2010)

[0328] 2.Ridderinkhof等,Brain and cognition 56:129-40(2004)

[0329] 3.Rubia等,NeuroImage 20:351-358(2003)

[0330] 4.Aron等,Nature neuroscience 6:115-6(2003)

[0331] 5.Baxter等,Archives of general psychiatry 46:243-50(1989)

[0332] 6.Mayberg等,The American journal of psychiatry 156:675-82(1999)

[0333] 7.Starkstein等,Brain:a journal of neurology 110(Pt 4):1045-59(1987)

[0334] 8.Maes等,Psychopharmacology:the fourth generation of progress 933-44(1995)

[0335] 9.Kessler等,World psychiatry:official journal of the World Psychiatric Association(WPA)6:168-76(2007)

[0336] 10.Miller等,Annual review of neuroscience 24:167-202(2001)

[0337] 11.Fuster.The Prefrontal Cortex,第4版(2008)

- [0338] 12.Davidson等,Annual review of psychology 53:545-74(2002)
- [0339] 13.Elliot等,Psychological medicine 27L 931042(1997)
- [0340] 14.Austin.The British Journal of Psychiatry 178:200-206(2001)
- [0341] 15.Ingram等,Cognitive Therapy and Research 18:317-332(1994)
- [0342] 16.Dalgleish等,Clinical Psychology Review 10:589-604(1990)
- [0343] 17.Fales等,Biological Psychiatry 63:377-384(2008)
- [0344] 18.Bench等,Psychological medicine 22:607-15(1992)
- [0345] 19.Mayberg等,Neuron 45:651-60(2005)
- [0346] 20.Hamani等,Biological psychiatry 67:117-24(2010)
- [0347] 21.Hamani等,Journal of psychiatric research 44:683-7(2010)
- [0348] 22.Covington等,The Journal of neuroscience:the official journal of the Society for Neuroscience 30:16082-90(2010)
- [0349] 23.Amat等,Nature neuroscience 8:365-71(2005)
- [0350] 24.Amat等,Neuroscience 154:1178-86(2008)
- [0351] 25.Abramson等,Journal of abnormal psychology 87:49-74(1978)
- [0352] 26.Drevets.Current opinion in neurobiology 22:240-9(2001)
- [0353] 27.Porsolt等,Nature 266:730-732(1977)
- [0354] 28.Cryan等,Neuroscience and biobehavioral reviews 29:547-69(2005)
- [0355] 29.Willner.Neuropsychobiology 52:90-110(2005)
- [0356] 30.Dill等,Journal of applied physiology 24:598-9(1968)
- [0357] 31.Vertes.Synapse(New York,N.Y.) 51:32-58(2004)
- [0358] 32.Gonçalves等,Brain research bulletin 78:240-7(2009)
- [0359] 33.Lidov等,Neuroscience 5:207-27(1980)
- [0360] 34.Michelsen等,Brain research reviews 55:329-42(2007)
- [0361] 35.Celada等,The Journal of neuroscience:the official journal of the Society for Neuroscience 21:9917-29(2001)
- [0362] 36.Ressler等,Nature neuroscience 10:1116-24(2007)
- [0363] 实施例3:多巴胺神经元在条件性位置厌恶中的作用
- [0364] 小鼠如实施例1中所述。THcre⁺/eNpHR3.0-eYFP小鼠和 THcre⁺/eNpHR3.0-eYFP小鼠经受条件性位置试验。结果示于图13A 和13B中。
- [0365] 图13A.VTA中感染了AAV5-flox-eNpHR3.0-eYFP或 AAV5-flox-eYFP的THcre+小鼠。所述两个组表现出明显不同的行为 ($F(1,16)=5, p \leq 0.001$)。两个条件形成期(琥珀色箱)足以在 THcre⁺/eNpHR3.0-eYFP小鼠中诱导条件形成腔室的厌恶 ($**p \leq 0.01, t(3.3; 14)$)。仅THcre⁺/eNpHR3.0-eYFP小鼠在整个实验期间表现出厌恶 ($F(3,21)=7.7, **p \leq 0.001$) (THcre⁺/eNpHR3.0-eYFP与THcre⁺/eYFP 在条件形成第2天, $*p \leq 0.05, t(2.3; 16)$; THcre⁺/eNpHR3.0-eYFP与 THcre⁺/eYFP在试验当天, $*p \leq 0.05, t(2.2; 16)$)。图13A中,上方的线为Thcre/eYFP;下方的线为THcre/eNpHR2.0-eYFP。图13B.注意到在试验前,当小鼠在两个腔室内所花时间相等时,没有初始厌恶。条件形成后,在VTA DA细胞中表达eNpHR3.0-eYFP的小鼠在试验当天对条件性腔室显示出明显厌恶(对于THcre⁺/eNpHR3.0-eYFP小鼠而

言,试验前一天与试验当天 $*p \leq 0.05$, $t(2.5;14)$,但对照小鼠未显示 (THcre+/eNpHR3.0-eYFP与THcre+/eYFP在试验当天, $*p \leq 0.05$ $t(2.2;16n=10)$)。图13B中,“试验前”和“试验”数据集中的左侧柱为 THcre/eYFP;“试验前”和“试验”数据集中的右侧柱为 THcre/eNpHR3.0-eYFP。

[0366] 虽然已经参考其具体实施方案描述了本发明,但是本领域的技术人员应理解,在不背离本发明的精神和范围的前提下可做各种变化并且可代用等效方案。另外,可做许多修改以使特定情况、材料、物质组成、工艺、工艺步骤适于本发明的目的、精神和范围。旨在使所有此类修改均属于所附权利要求的范围之内。

序列表

<110> Deisseroth, Karl A.
Tye, Kay M.
Warden, Melissa R.

<120> 非人类动物抑郁症模型及其使用方法

<130> STAN-940WO

<150> 61/613, 231

<151> 2012-03-20

<160> 22

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 273

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Thr Leu Lys Leu Leu Thr Val Val Met Trp Leu Gly Tyr Pro

[0001]

Ile Val Trp Ala Leu Gly Val Glu Gly Ile Ala Val Leu Pro Val Gly	195	200	205
210	215	220	
Val Thr Ser Trp Gly Tyr Ser Phe Leu Asp Ile Val Ala Lys Tyr Ile	225	230	235
			240
Phe Ala Phe Leu Leu Leu Asn Tyr Leu Thr Ser Asn Glu Ser Val Val	245	250	255
Ser Gly Ser Ile Leu Asp Val Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Ala Asp	260	265	270
Asp			

<210> 2
 <211> 559
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成氨基酸序列

<400> 2

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

[0002]

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

[0003]

Trp	Phe	Trp	Tyr	Ala	Ile	Ser	Cys	Ala	Cys	Phe	Leu	Val	Val	Leu	Tyr	180	185	190
Ile	Leu	Leu	Val	Glu	Trp	Ala	Gln	Asp	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	195	200	205
Asp	Met	Phe	Asn	Thr	Leu	Lys	Leu	Leu	Thr	Val	Val	Met	Trp	Leu	Gly	210	215	220
Tyr	Pro	Ile	Val	Trp	Ala	Leu	Gly	Val	Glu	Gly	Ile	Ala	Val	Leu	Pro	225	230	235
Val	Gly	Val	Thr	Ser	Trp	Gly	Tyr	Ser	Phe	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Lys	245	250	255
Tyr	Ile	Phe	Ala	Phe	Leu	Leu	Leu	Asn	Tyr	Leu	Thr	Ser	Asn	Glu	Ser	260	265	270
Val	Val	Ser	Gly	Ser	Ile	Leu	Asp	Val	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	275	280	285
Ala	Asp	Asp	Ala	Ala	Ala	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ser	Glu	Gly	Glu	Tyr	290	295	300
Ile	Pro	Leu	Asp	Gln	Ile	Asp	Ile	Asn	Val	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	305	310	315
Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	325	330	335
Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	340	345	350
Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	355	360	365
Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Phe	Gly	Tyr	Gly	Leu	Gln	Cys	370	375	380
Phe	Ala	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	385	390	395
Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	405	410	415
Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	420	425	430
Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	435	440	445
Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	450	455	460
Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	465	470	475

Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr
 485 490 495
 Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn
 500 505 510
 His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys
 515 520 525
 Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr
 530 535 540
 Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val
 545 550 555
 <210> 3
 <211> 542
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成氨基酸序列
 <400> 3
 Met Val Thr Gln Arg Glu Leu Phe Glu Phe Val Leu Asn Asp Pro Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Ser Ser Leu Tyr Ile Asn Ile Ala Leu Ala Gly Leu Ser Ile
 20 25 30
 Leu Leu Phe Val Phe Met Thr Arg Gly Leu Asp Asp Pro Arg Ala Lys
 35 40 45
 Leu Ile Ala Val Ser Thr Ile Leu Val Pro Val Val Ser Ile Ala Ser
 50 55 60
 Tyr Thr Gly Leu Ala Ser Gly Leu Thr Ile Ser Val Leu Glu Met Pro
 65 70 75 80
 Ala Gly His Phe Ala Glu Gly Ser Ser Val Met Leu Gly Gly Glu Glu
 85 90 95
 Val Asp Gly Val Val Thr Met Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Trp Ala Leu
 100 105 110
 Ser Thr Pro Met Ile Leu Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ser Asn
 115 120 125
 Ala Thr Lys Leu Phe Thr Ala Ile Thr Phe Asp Ile Ala Met Cys Val
 130 135 140
 Thr Gly Leu Ala Ala Ala Leu Thr Thr Ser Ser His Leu Met Arg Trp
 145 150 155 160
 Phe Trp Tyr Ala Ile Ser Cys Ala Cys Phe Leu Val Val Leu Tyr Ile
 165 170 175
 Leu Leu Val Glu Trp Ala Gln Asp Ala Lys Ala Ala Gly Thr Ala Asp

[0004]

	180	185	190
Met Phe Asn Thr Leu Lys Leu Leu Thr Val Val Met Trp Leu Gly Tyr	195	200	205
Pro Ile Val Trp Ala Leu Gly Val Glu Gly Ile Ala Val Leu Pro Val	210	215	220
Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Ser Phe Leu Asp Ile Val Ala Lys Tyr	225	230	235
Ile Phe Ala Phe Leu Leu Leu Asn Tyr Leu Thr Ser Asn Glu Ser Val	245	250	255
Val Ser Gly Ser Ile Leu Asp Val Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Ala	260	265	270
Asp Asp Ala Ala Ala Lys Ser Arg Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr Ile	275	280	285
Pro Leu Asp Gln Ile Asp Ile Asn Val Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu	290	295	300
Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn	305	310	315
Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr	325	330	335
Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val	340	345	350
Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe	355	360	365
Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala	370	375	380
Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp	385	390	395
Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu	405	410	415
Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn	420	425	430
Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr	435	440	445
Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile	450	455	460
Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln	465	470	475
Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His			

[0005]

	485	490	495
	Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg		
	500	505	510
	Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu		
	515	520	525
	Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val		
	530	535	540
	<210> 4		
	<211> 223		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成氨基酸序列		
	<400> 4		
	Ala Ser Ser Phe Gly Lys Ala Leu Leu Glu Phe Val Phe Ile Val Phe		
	1	5	10 15
	Ala Cys Ile Thr Leu Leu Leu Gly Ile Asn Ala Ala Lys Ser Lys Ala		
	20	25	30
	Ala Ser Arg Val Leu Phe Pro Ala Thr Phe Val Thr Gly Ile Ala Ser		
	35	40	45
[0006]	Ile Ala Tyr Phe Ser Met Ala Ser Gly Gly Gly Trp Val Ile Ala Pro		
	50	55	60
	Asp Cys Arg Gln Leu Phe Val Ala Arg Tyr Leu Asp Trp Leu Ile Thr		
	65	70	75 80
	Thr Pro Leu Leu Leu Ile Asp Leu Gly Leu Val Ala Gly Val Ser Arg		
	85	90	95
	Trp Asp Ile Met Ala Leu Cys Leu Ser Asp Val Leu Met Ile Ala Thr		
	100	105	110
	Gly Ala Phe Gly Ser Leu Thr Val Gly Asn Val Lys Trp Val Trp Trp		
	115	120	125
	Phe Phe Gly Met Cys Trp Phe Leu His Ile Ile Phe Ala Leu Gly Lys		
	130	135	140
	Ser Trp Ala Glu Ala Ala Lys Ala Lys Gly Gly Asp Ser Ala Ser Val		
	145	150	155 160
	Tyr Ser Lys Ile Ala Gly Ile Thr Val Ile Thr Trp Phe Cys Tyr Pro		
	165	170	175
	Val Val Trp Val Phe Ala Glu Gly Phe Gly Asn Phe Ser Val Thr Phe		
	180	185	190
	Glu Val Leu Ile Tyr Gly Val Leu Asp Val Ile Ser Lys Ala Val Phe		
	195	200	205

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

<210> 5
<211> 310
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成氨基酸序列

<400> 5

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

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

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

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

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

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

[0007]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser

	245	250	255
	Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His		
	260	265	270
	Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn		
	275	280	285
	Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala		
	290	295	300
	Glu Ala Gly Ala Val Pro		
	305	310	
	<210> 6		
	<211> 310		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成氨基酸序列		
	<400> 6		
	Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe		
	1	5	10
	Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp		
	20	25	30
[0008]	Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala		
	35	40	45
	Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile		
	50	55	60
	Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly		
	65	70	75
	Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu		
	85	90	95
	Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr		
	100	105	110
	Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Ser		
	115	120	125
	Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp		
	130	135	140
	Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile		
	145	150	155
	Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile		
	165	170	175
	Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala		
	180	185	190

Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys
 195 200 205
 Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly
 210 215 220
 Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
 225 230 235 240
 Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
 245 250 255
 Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
 260 265 270
 Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
 275 280 285
 Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
 290 295 300
 Glu Ala Gly Ala Val Pro
 305 310
 <210> 7
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 [0009] <220>
 <223> 合成氨基酸序列
 <400> 7
 Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp
 20 25 30
 Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala
 35 40 45
 Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile
 50 55 60
 Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly
 65 70 75 80
 Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu
 85 90 95
 Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr
 100 105 110
 Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Ser
 115 120 125
 Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp

[0010]

130	135	140
Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Ala Ile Gly Thr Ile		
145	150	155 160
Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile		
	165	170 175
Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala		
	180	185 190
Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys		
	195	200 205
Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly		
	210	215 220
Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu		
	225	230 235 240
Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser		
	245	250 255
Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His		
	260	265 270
Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn		
	275	280 285
Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala		
	290	295 300
Glu Ala Gly Ala Val Pro		
305	310	
<210> 8		
<211> 344		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成氨基酸序列		
<400> 8		
Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu		
1	5	10 15
Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro		
	20	25 30
Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu		
	35	40 45
Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val		
	50	55 60
Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys		
65	70	75 80

Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp
 85 90 95
 Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln
 100 105 110
 Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Glu Ile Tyr Val Ala Thr Ile
 115 120 125
 Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro
 130 135 140
 Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr
 145 150 155 160
 Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn
 165 170 175
 Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu
 180 185 190
 Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys
 195 200 205
 Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
 210 215 220
 Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp
 245 250 255
 Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
 260 265 270
 Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His
 275 280 285
 Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn
 290 295 300
 Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
 305 310 315 320
 Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
 325 330 335
 Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp
 340

[0011]

<210> 9
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成氨基酸序列

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0012]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn

	290	295	300
	Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile		
	305	310	315 320
	Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu		
		325	330 335
	Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp		
		340	
	<210> 10		
	<211> 344		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成氨基酸序列		
	<400> 10		
	Met Ser Arg Arg Pro Trp Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala Leu		
	1	5	10 15
	Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Ser Thr Gly Ser Asp Ala Thr Val Pro		
		20	25 30
	Val Ala Thr Gln Asp Gly Pro Asp Tyr Val Phe His Arg Ala His Glu		
		35	40 45
[0013]	Arg Met Leu Phe Gln Thr Ser Tyr Thr Leu Glu Asn Asn Gly Ser Val		
	50	55	60
	Ile Cys Ile Pro Asn Asn Gly Gln Cys Phe Cys Leu Ala Trp Leu Lys		
	65	70	75 80
	Ser Asn Gly Thr Asn Ala Glu Lys Leu Ala Ala Asn Ile Leu Gln Trp		
		85	90 95
	Ile Thr Phe Ala Leu Ser Ala Leu Cys Leu Met Phe Tyr Gly Tyr Gln		
		100	105 110
	Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly Trp Glu Glu Ile Tyr Val Ala Thr Ile		
		115	120 125
	Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro		
		130	135 140
	Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr		
		145	150 155 160
	Ala Thr Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn		
		165	170 175
	Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu		
		180	185 190
	Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys		
		195	200 205

Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly
 210 215 220
 Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp
 245 250 255
 Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly
 260 265 270
 Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His
 275 280 285
 Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn
 290 295 300
 Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile
 305 310 315 320
 Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu
 325 330 335
 Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp
 340

[0014]

<210> II
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成氨基酸序列

<400> II

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

115	120	125
Glu Met Ile Lys Phe Ile Ile Glu Tyr Phe His Glu Phe Asp Glu Pro 130	135	140
Ala Val Ile Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Lys Thr Val Trp Leu Arg Tyr 145	150	155 160
Ala Thr Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile His Leu Ser Asn 165	170	175
Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr Met Gly Leu Leu 180	185	190
Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Cys 195	200	205
Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser Leu Ser Tyr Gly 210	215	220
Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile Glu Ala Phe His 225	230	235 240
Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg Val Met Ala Trp 245	250	255
Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu Phe Leu Leu Gly 260	265	270
Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Ala Ile Gly His 275	280	285
Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly Val Leu Gly Asn 290	295	300
Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu Tyr Gly Asp Ile 305	310	315 320
Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gln Glu Met Glu Val Glu 325	330	335
Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp 340		

[0015]

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成氨基酸序列

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa可为任何自然存在的氨基酸

 <400> 12
 Phe Xaa Tyr Glu Asn Glu

	1	5
	<210>	13
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成氨基酸序列
	<400>	13
	Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val	
	1	5
	<210>	14
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成氨基酸序列
	<400>	14
	Val Lys Glu Ser Leu	
	1	5
	<210>	15
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
[0016]	<223>	合成氨基酸序列
	<400>	15
	Val Leu Gly Ser Leu	
	1	5
	<210>	16
	<211>	16
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成氨基酸序列
	<400>	16
	Asn Ala Asn Ser Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val Ala Leu Thr Ser Lys	
	1	5 10 15
	<210>	17
	<211>	20
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成氨基酸序列
	<400>	17
	Lys Ser Arg Ile Thr Ser Glu Gly Glu Tyr Ile Pro Leu Asp Gln Ile	
	1	5 10 15
	Asp Ile Asn Val	
		20

<210> 18
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成氨基酸序列

<400> 18

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

Ala Glu

<210> 19
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成氨基酸序列

<400> 19

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

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

[0017]

<210> 20
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成氨基酸序列

<400> 20

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

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

<210> 21
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成氨基酸序列

<400> 21

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

Val Arg Glu Ser Leu Gln Gly
 20

<210> 22
 <211> 18
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成氨基酸序列

[0018]

<400> 22

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

Gln Asp

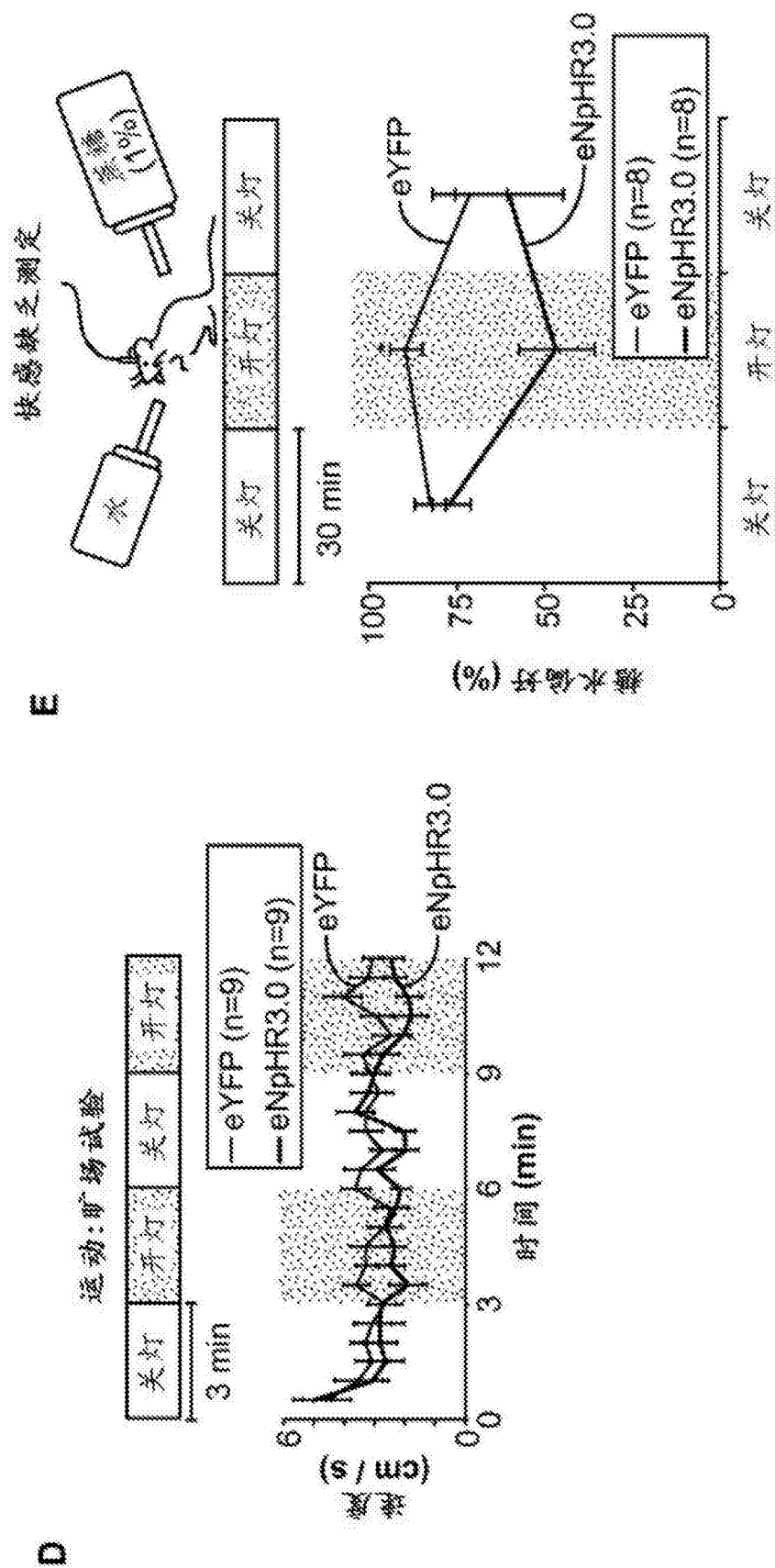


图1 (续)

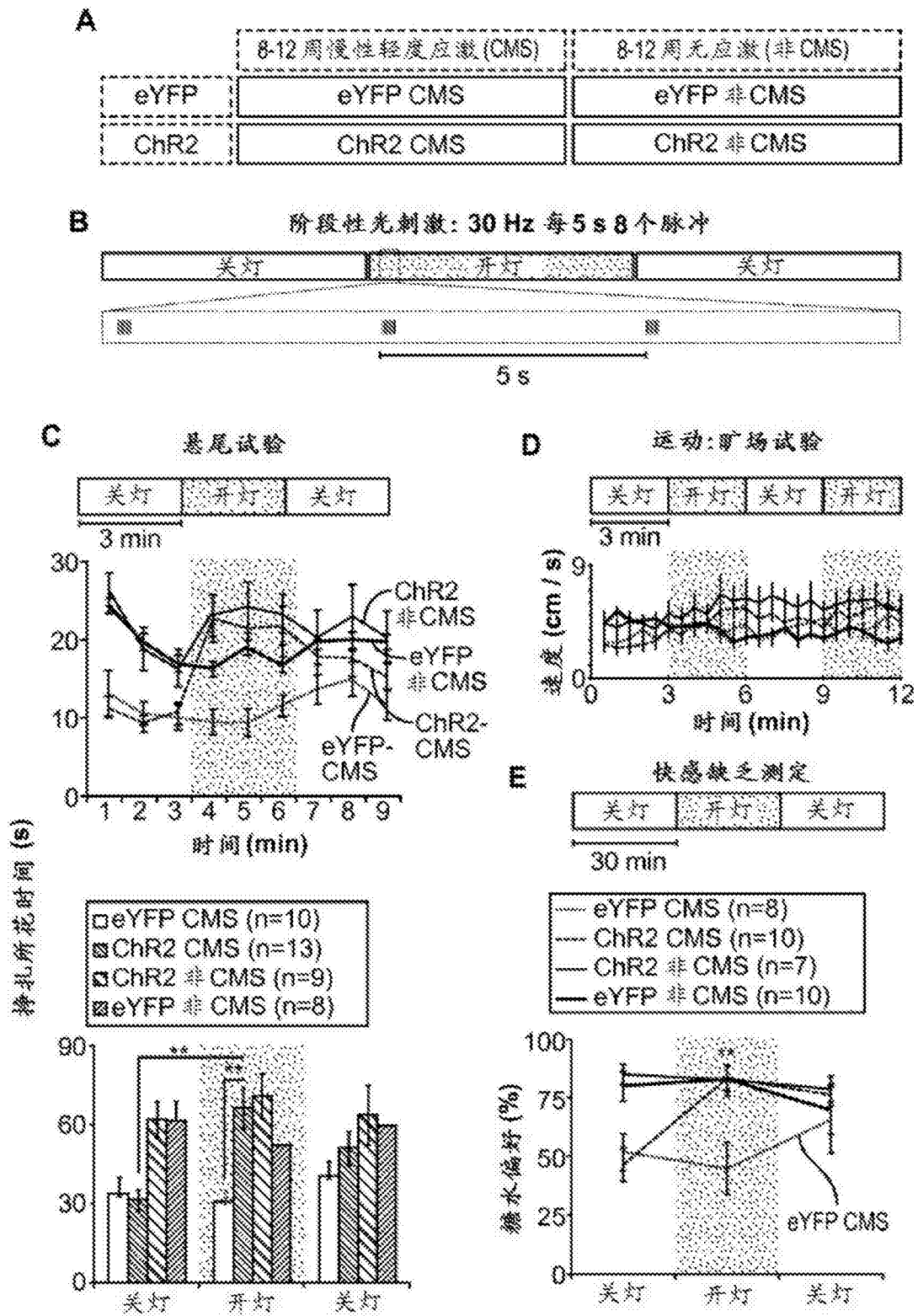


图2

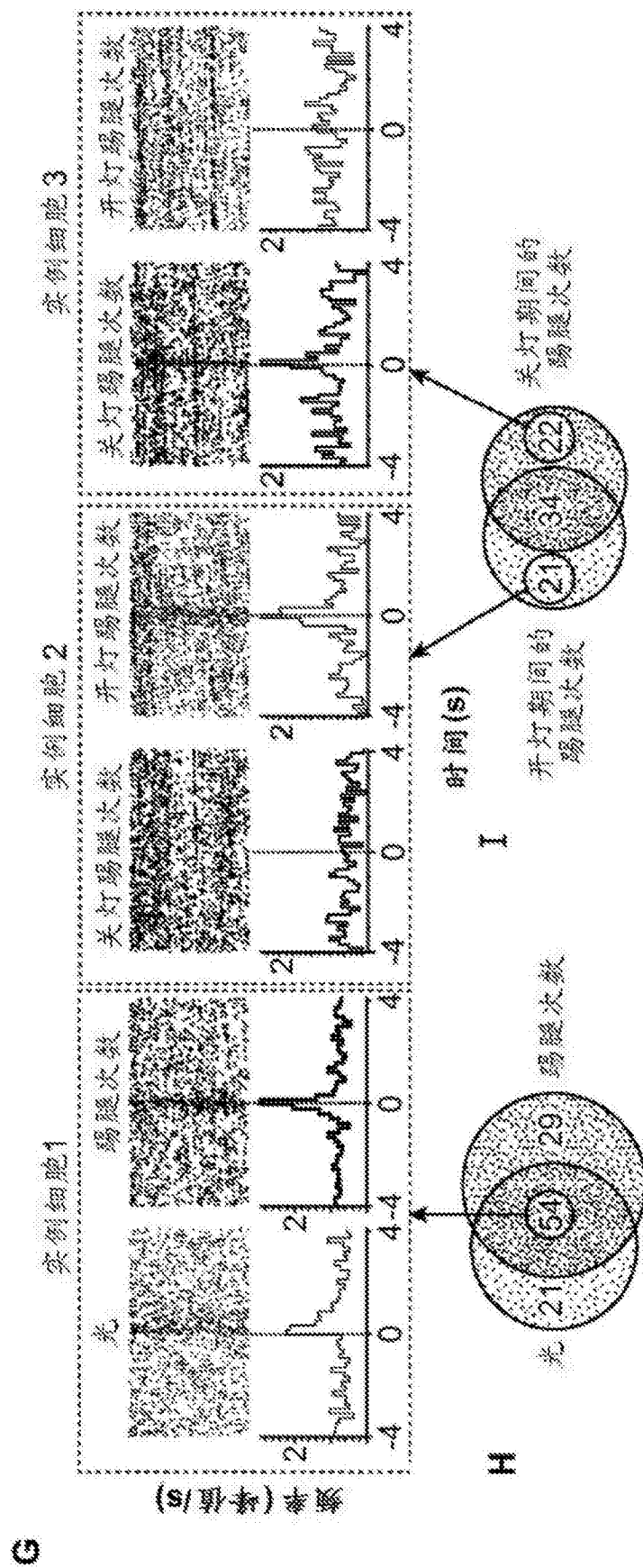


图4(续)

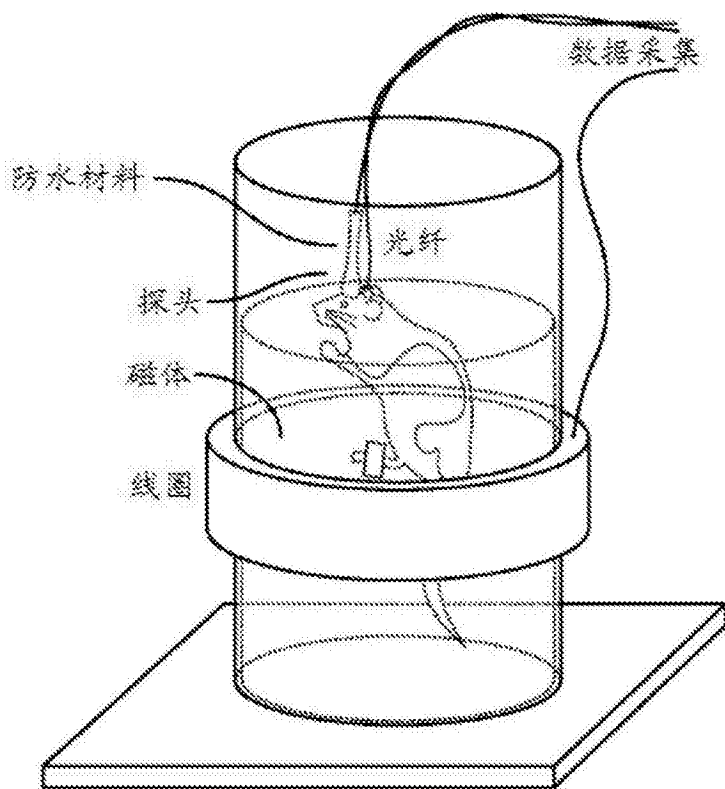


图5A

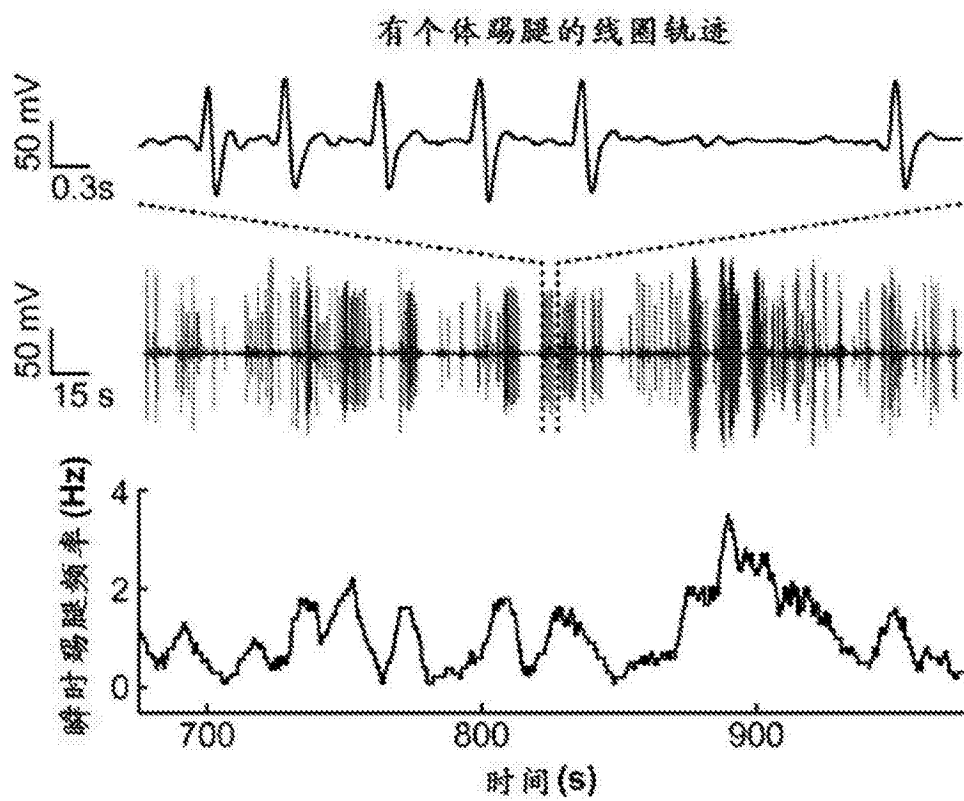


图5B

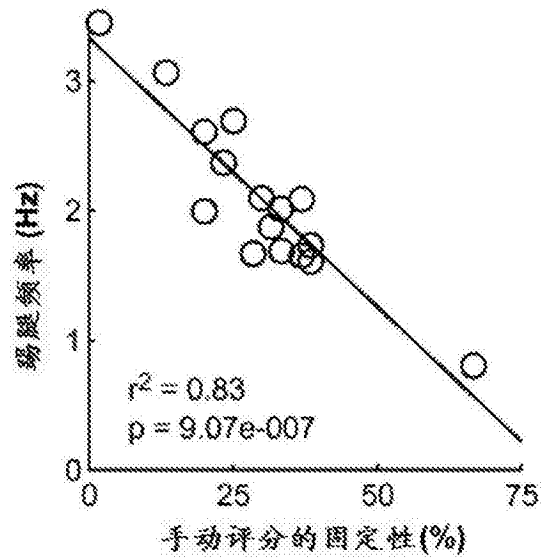


图5C

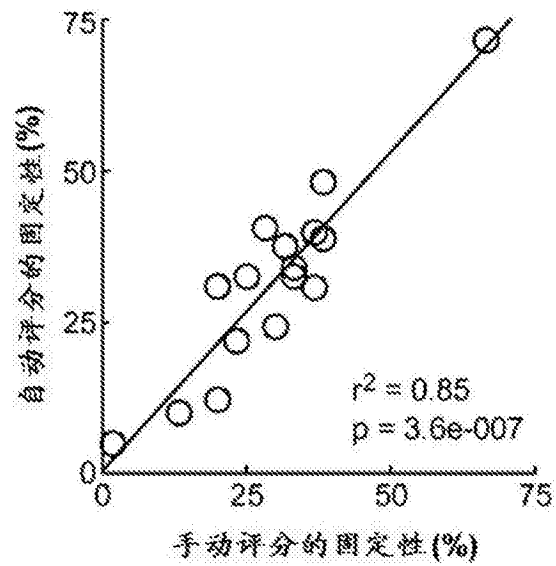


图5D

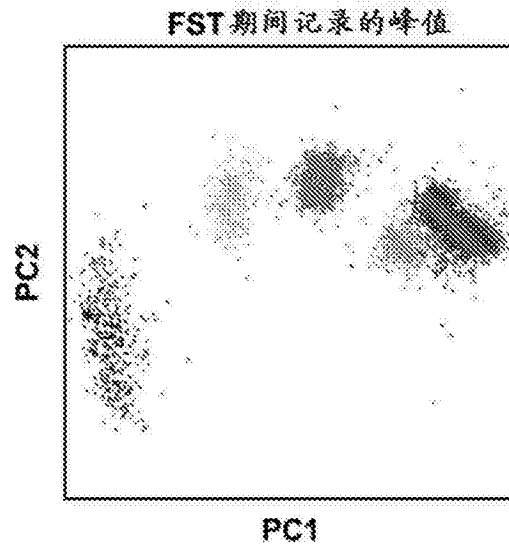


图5E

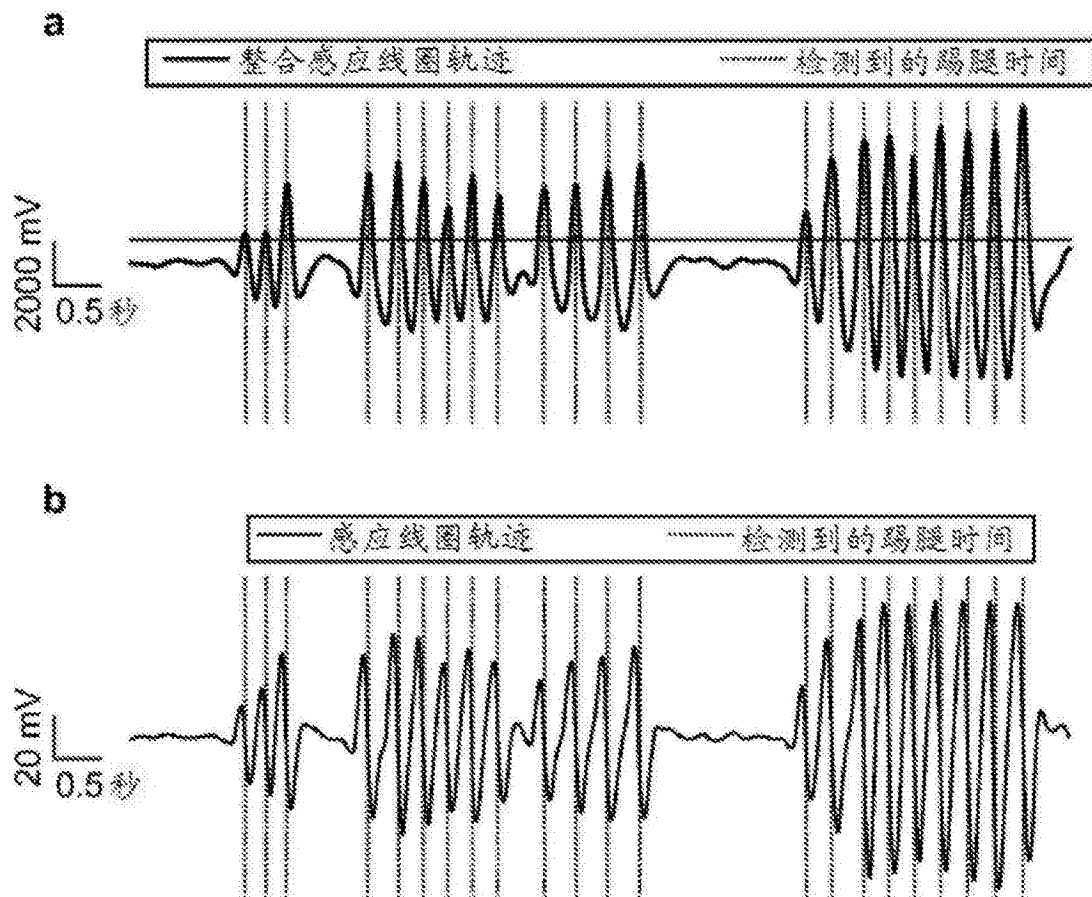


图6

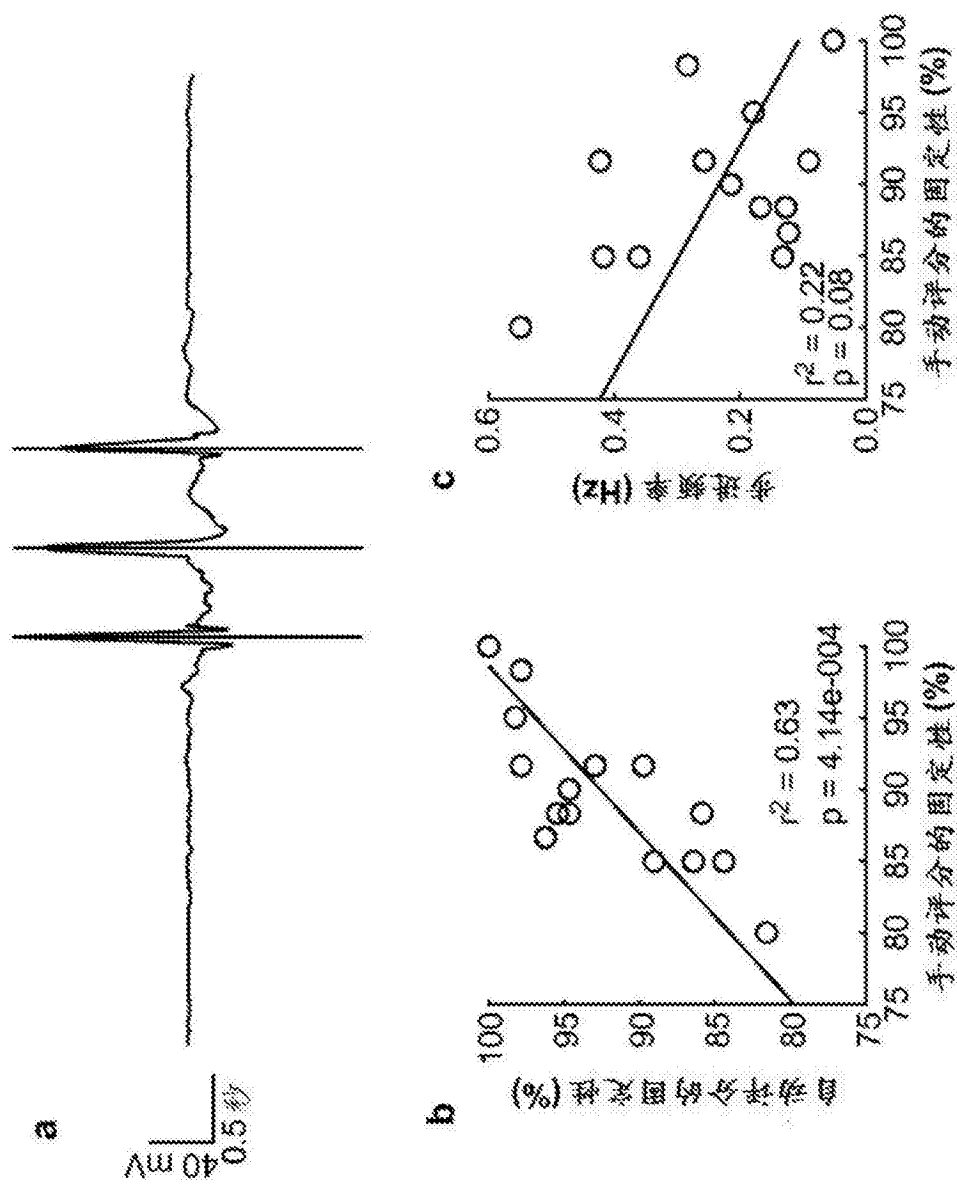


图7



图8A

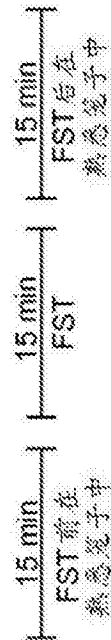


图8B

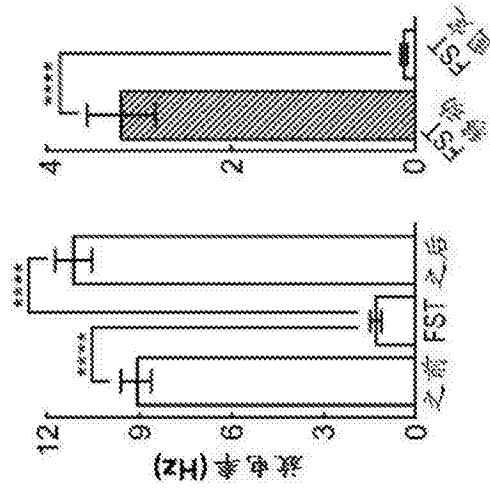


图8C

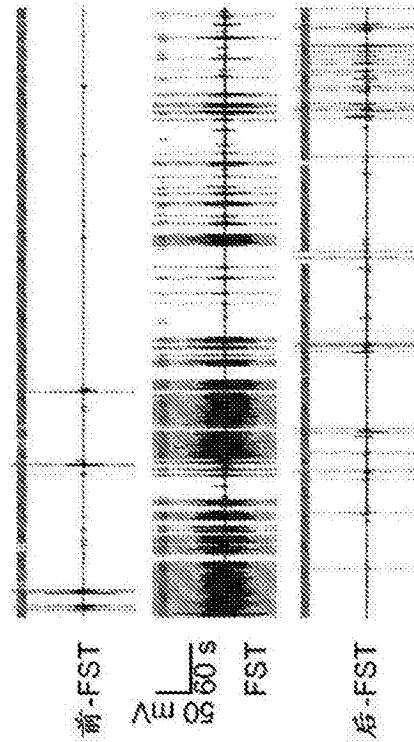


图8D

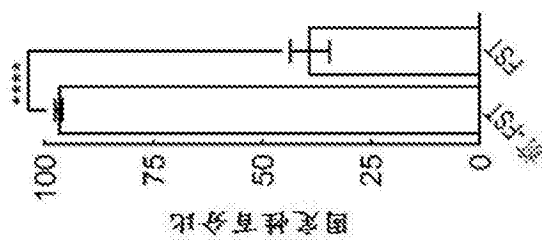


图8E

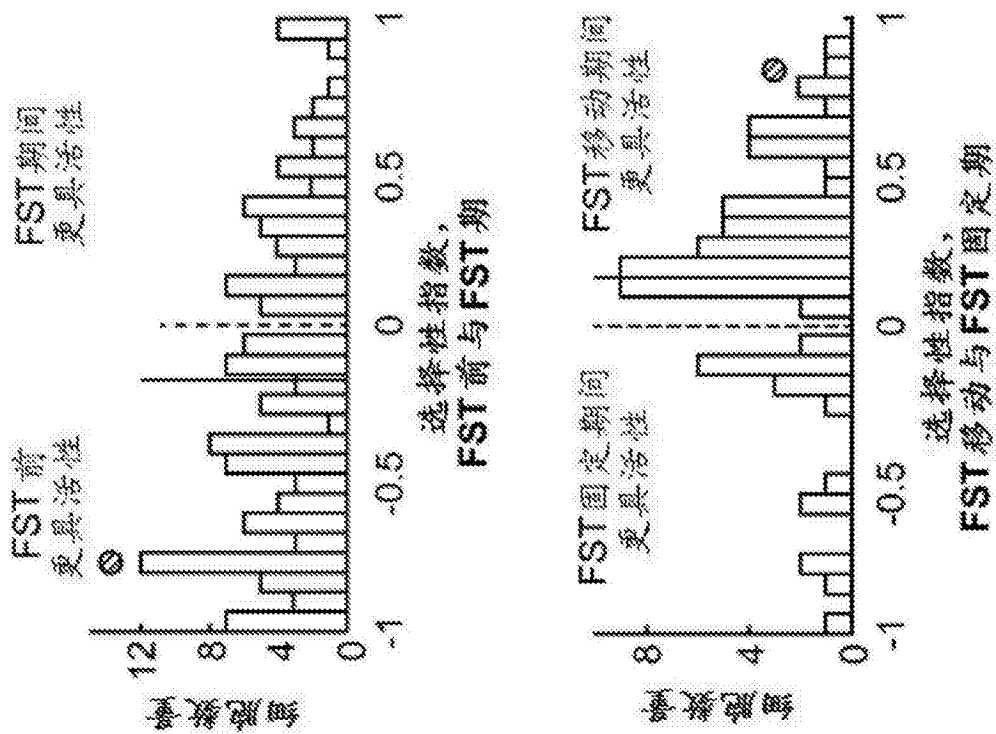


图8F

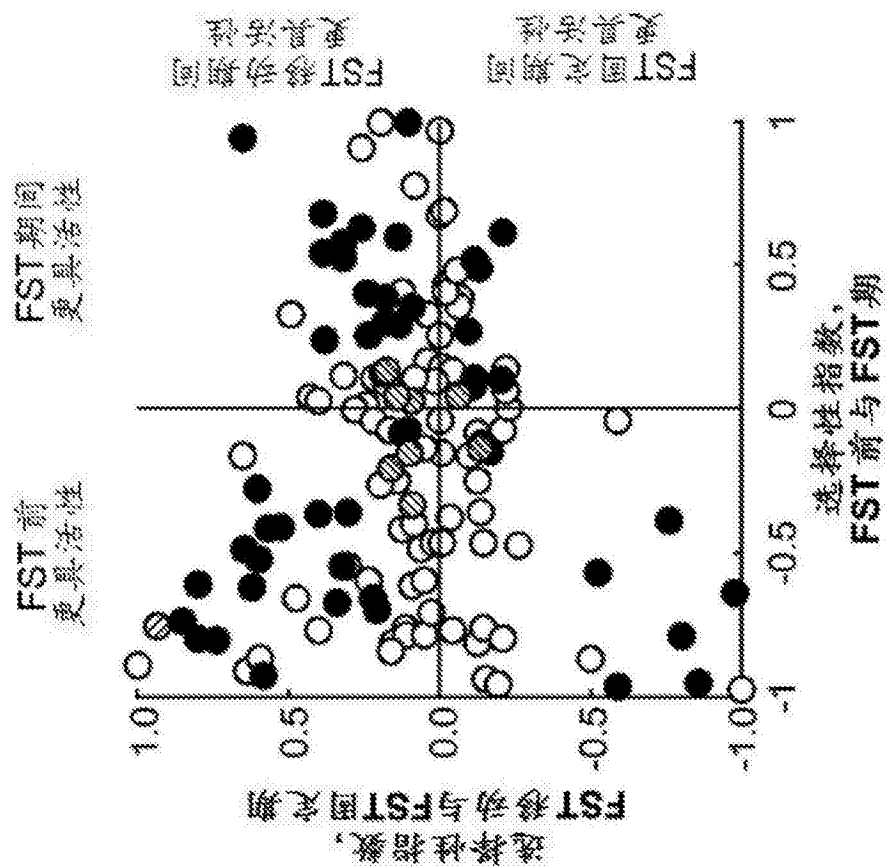


图8G

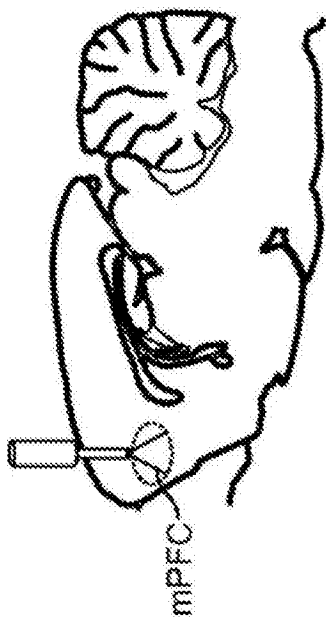


图9A



图9B

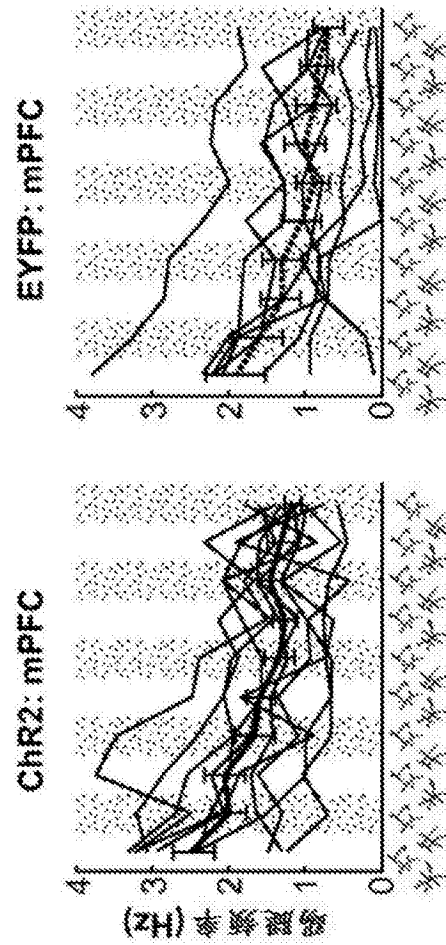


图9C

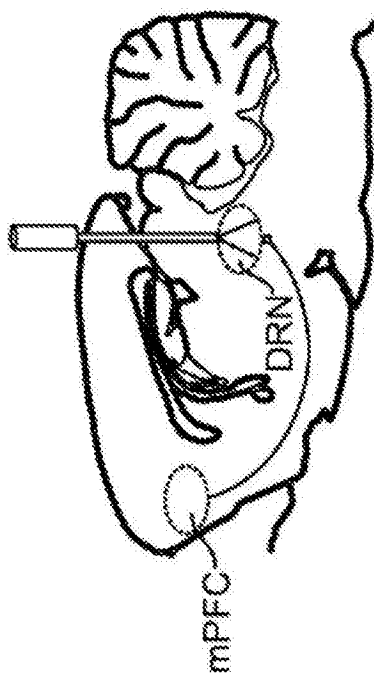


图9D

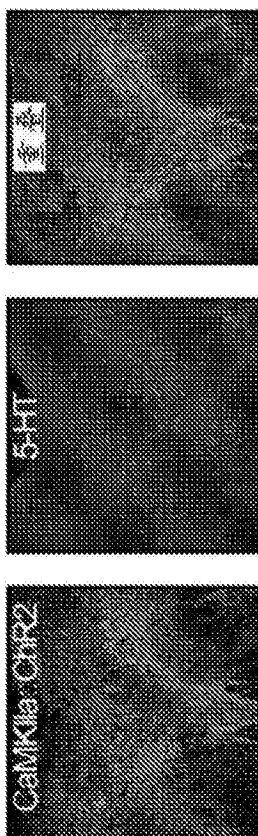


图9E

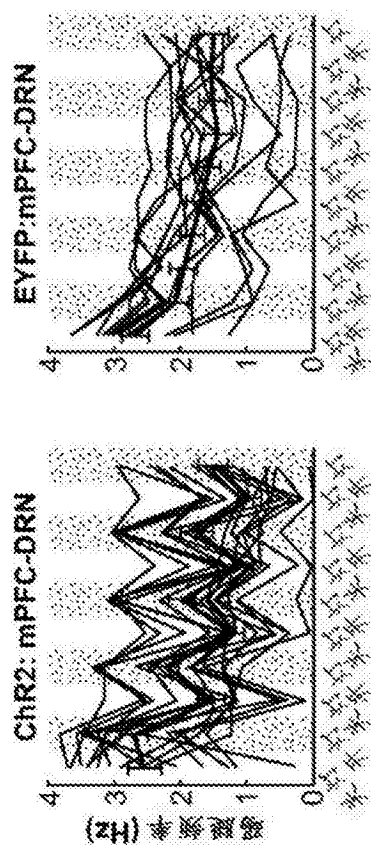
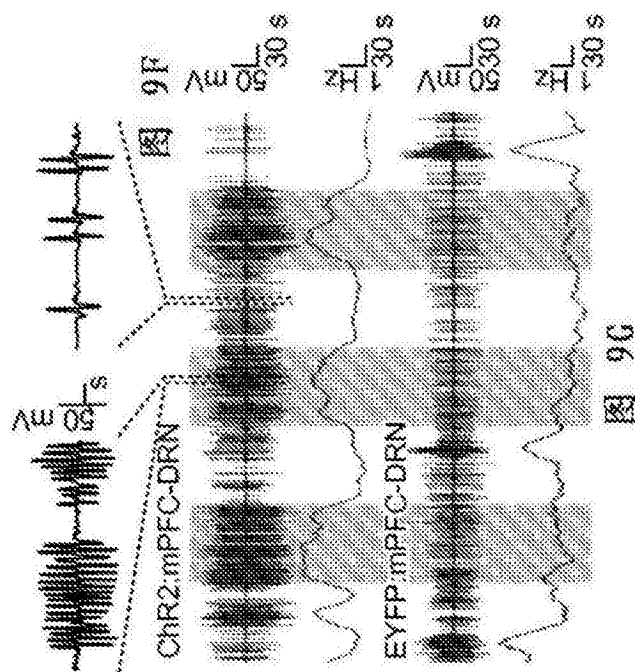


图9H

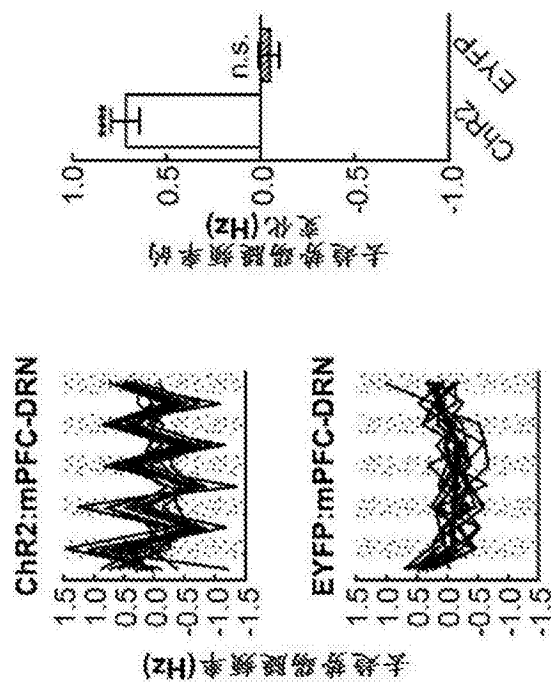


图9I

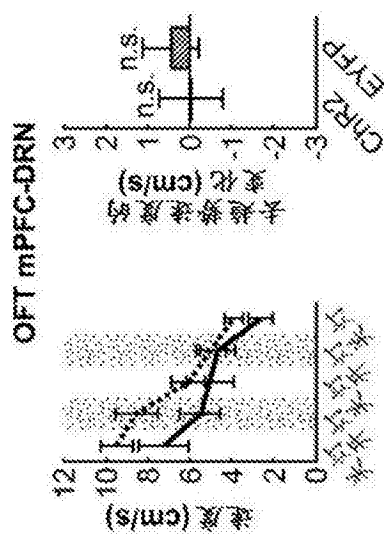


图9J

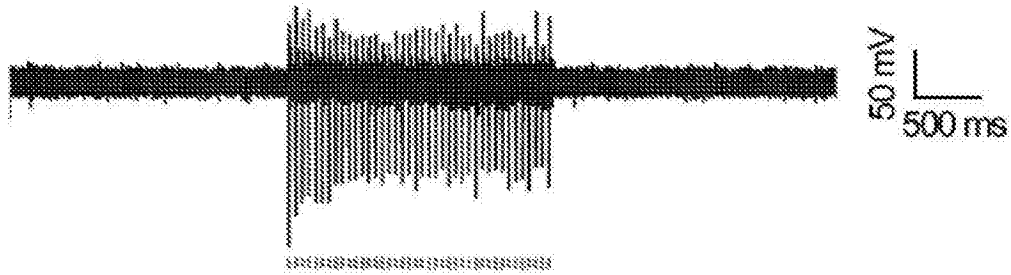


图10A

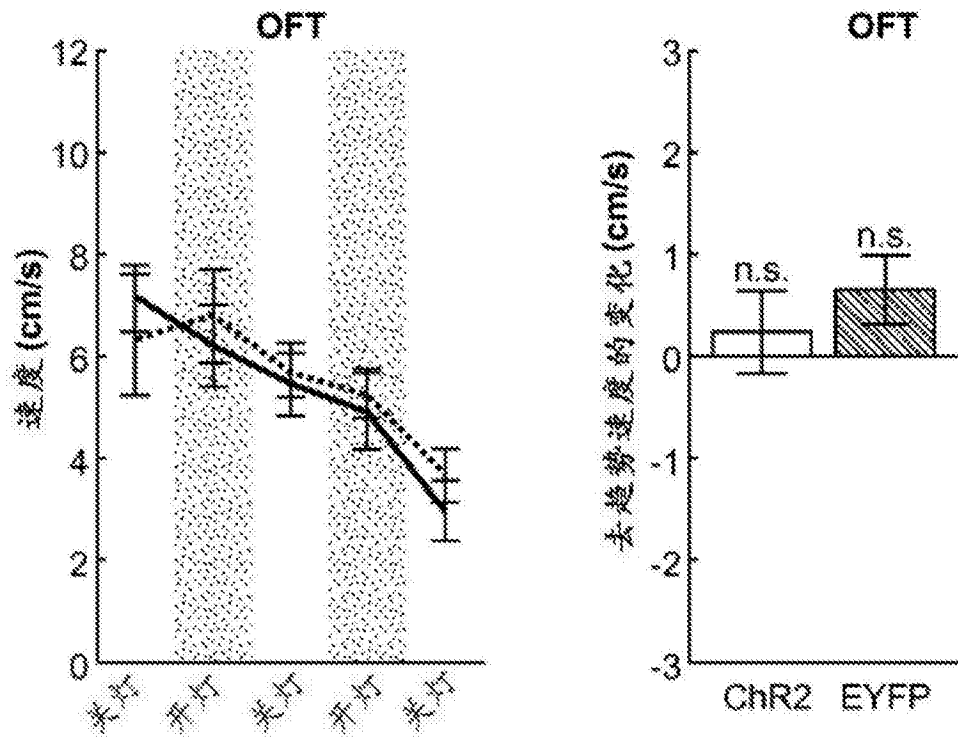


图10B

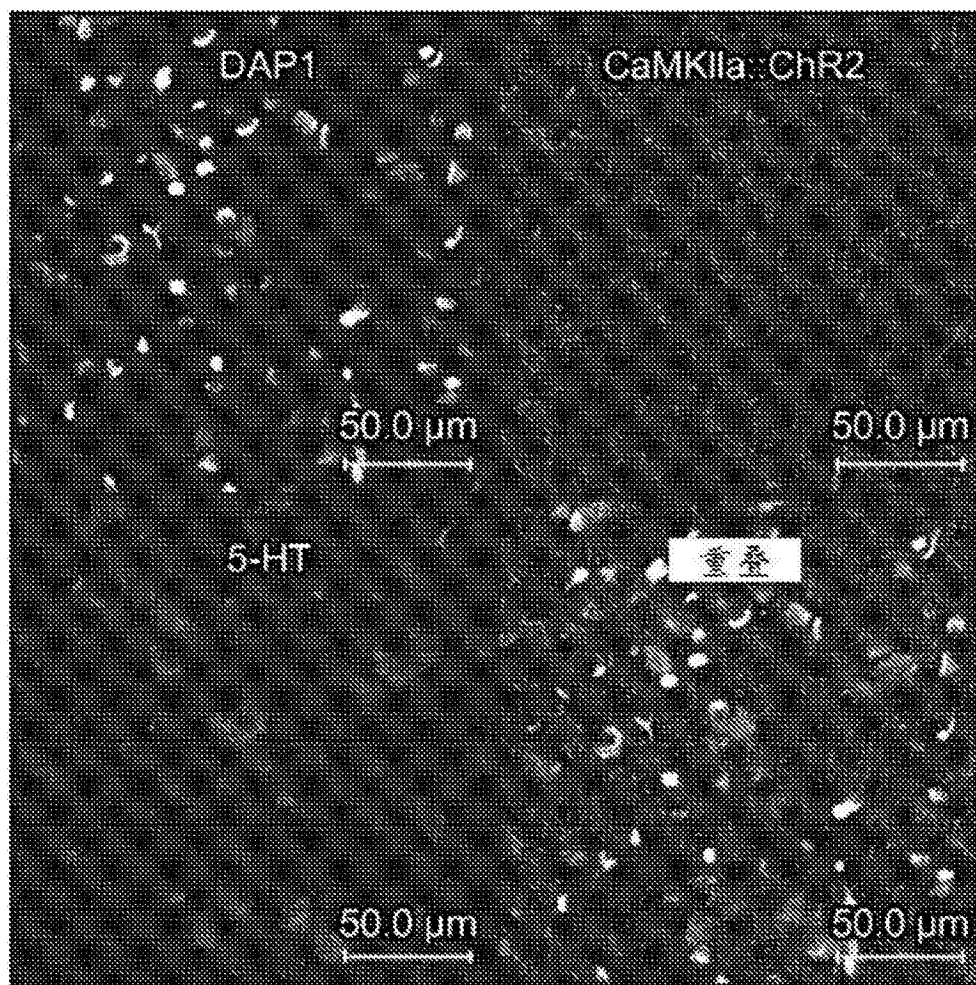


图11A

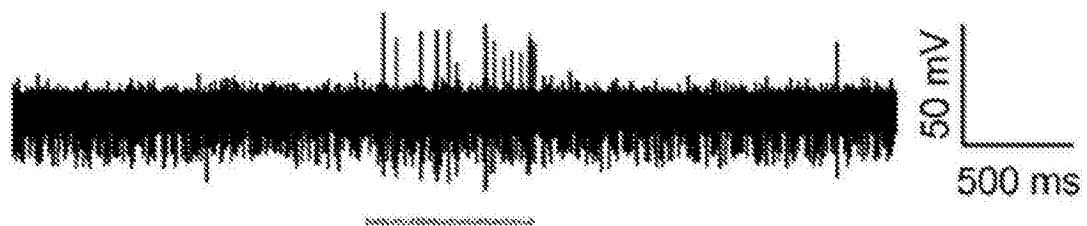


图11B

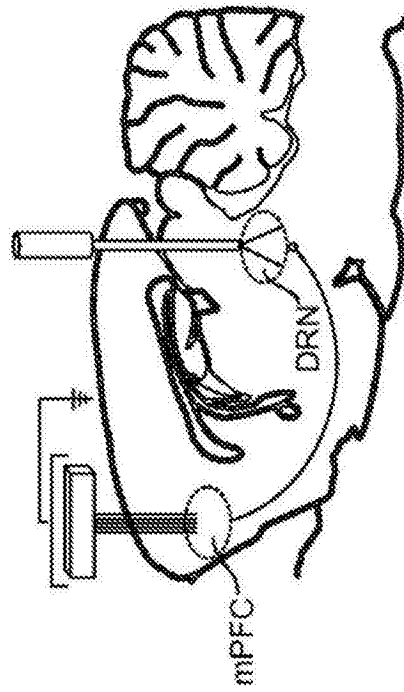


图12A

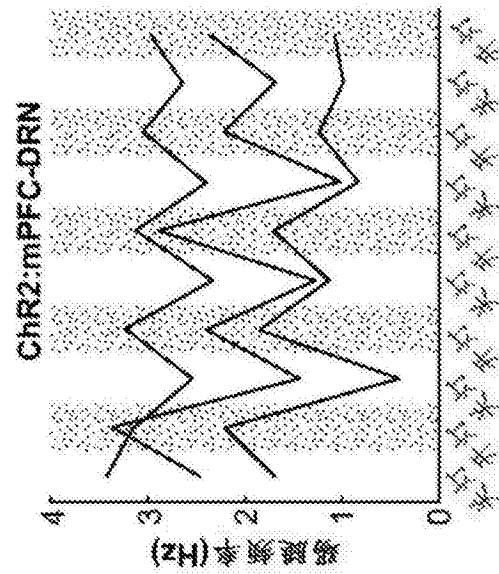


图12B

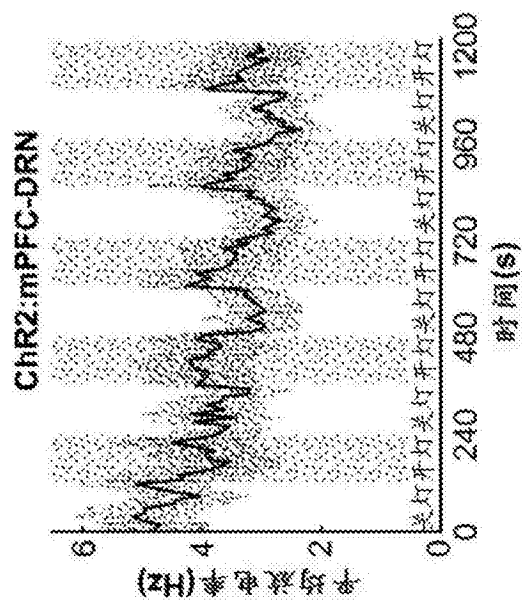


图12C

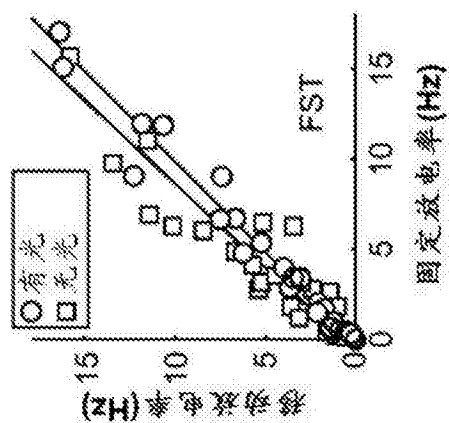


图12D

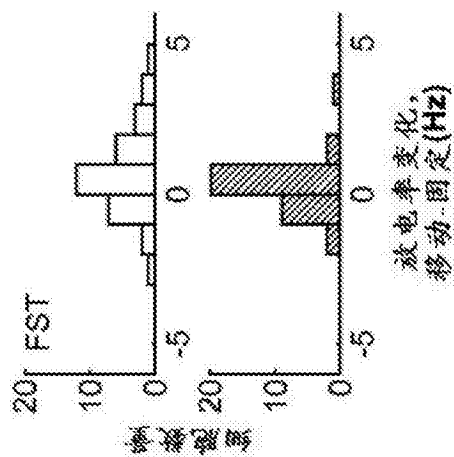


图12E

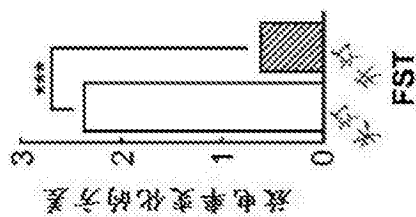


图12F

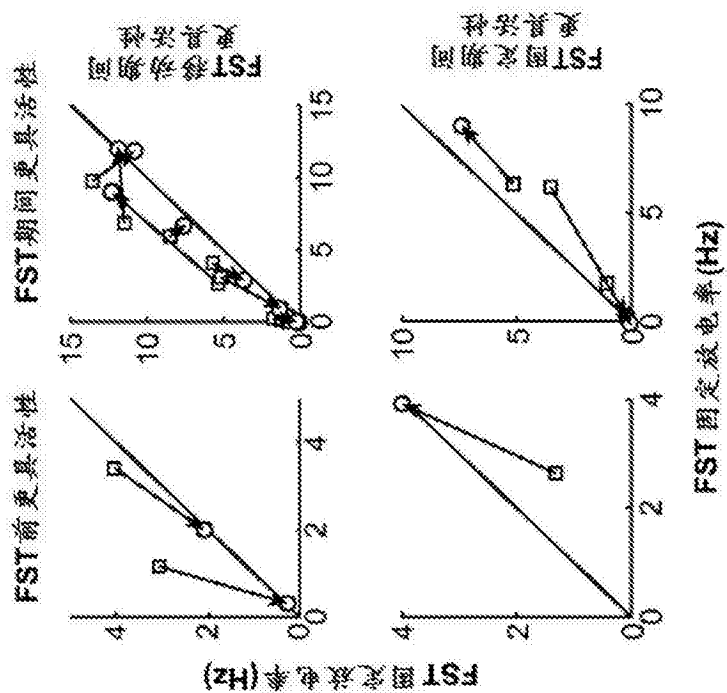


图12G

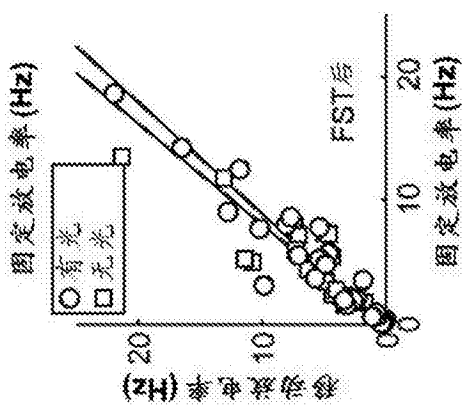


图12H

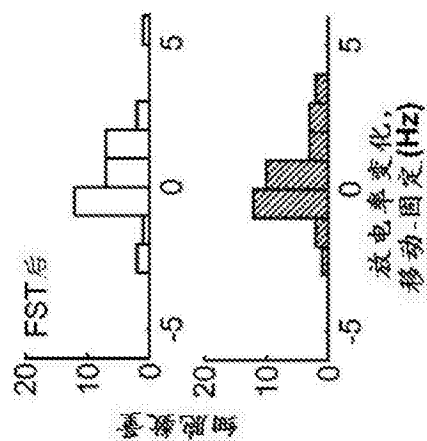


图12I

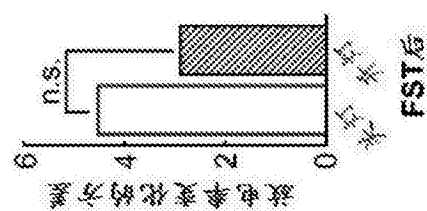


图12J

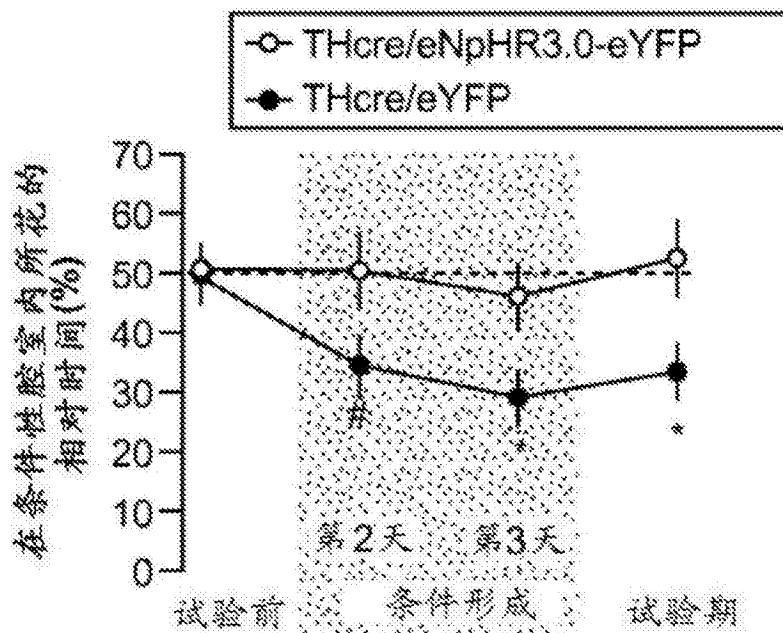


图13A

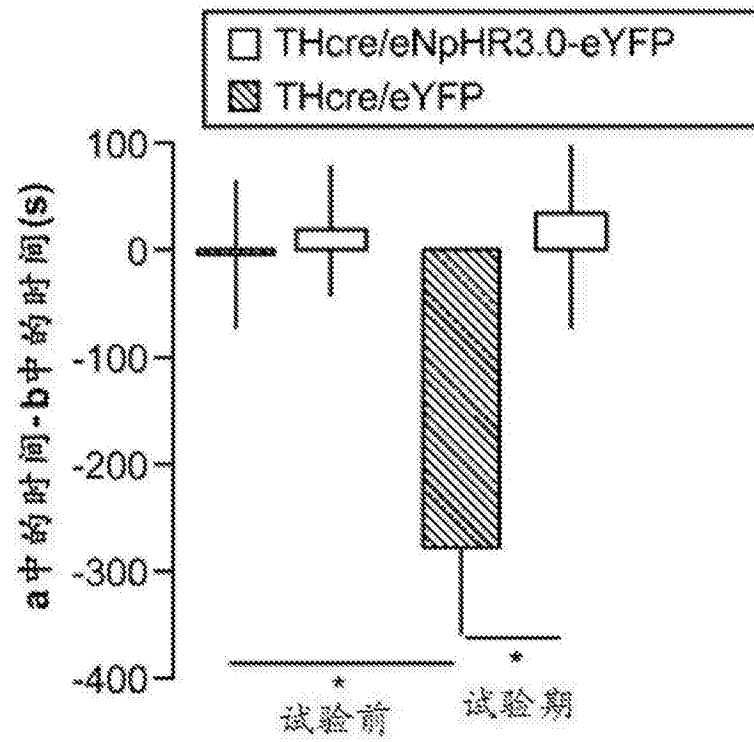


图13B