



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103491770 B

(45) 授权公告日 2016.06.08

(21) 申请号 201180061699.7

(22) 申请日 2011.11.04

(30) 优先权数据

61/410,704 2010.11.05 US

61/410,711 2010.11.05 US

61/511,905 2011.07.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.06.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/059390 2011.11.04

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2012/061744 EN 2012.05.10

(73) 专利权人 斯坦福大学托管董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 K·戴瑟罗斯 O·伊扎尔 L·芬诺

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C12N 5/0793(2010.01)

C07K 14/075(2006.01)

A01K 67/027(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2010/056970 A2, 2010.05.20,

Wang et al. High-speed mapping

of synaptic connectivity using photostimulation in channelrhodopsin-2 transgenic mice, . 《PANS》. 2007, 第 104 卷 (第 19 期), 第 8143-8148 页.

Simmons et al. Localization and function of NK3 subtype tachykinin receptors of layer v pyramidal neurons of the guinea-pig medial prefrontal cortex. 《Neuroscience》. 2008, 第 156 卷第 987-994 页.

Bernd et al. Bi-stable neural switches. 《Nature Neuroscience》. 2008, 第 12 卷 (第 2 期), 第 229-234 页.

徐涛. 新型光生物技术的发展和应. 《第七届全国光生物学学术会议》. 2010, 第 6 页.

刘秀丽等. 光控制神经活动研究进展. 《生物化学与生物物理进展》. 2009, 第 36 卷 (第 12 期), 第 1509-1515.

审查员 窦碧霞

权利要求书4页 说明书44页

序列表5页 附图18页

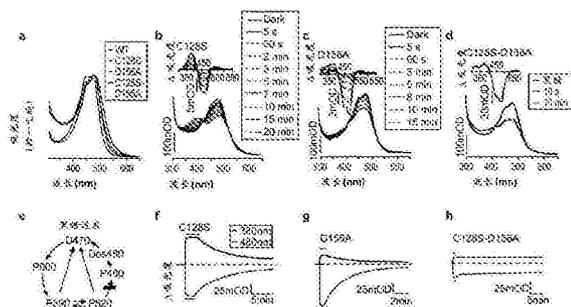
(54) 发明名称

稳定阶跃函数视蛋白及其使用方法

(57) 摘要

本文中提供了组合物和使用所述组合物对存在于前额叶皮质中的神经元进行选择去极化以影响非人动物的一种或多种社会行为、交往和/或条件性行为的方法,所述组合物包含含有在神经元质膜上表达稳定阶跃函数视蛋白的神经元的非人动物细胞。

CN 103491770 B



1. 一种产生非人哺乳动物的方法,其包括在所述哺乳动物的前额叶皮质的神经元中表达第一光活化阳离子通道蛋白,

其中所述第一光活化阳离子通道蛋白

包含与SEQ ID NO:1~4之一中所示序列具有至少95%的同一性的氨基酸序列,并且包含

对应于SEQ ID NO:1的氨基酸128处的Cys→Ser取代、

对应于SEQ ID NO:1的氨基酸156处的Asp→Ala取代,

其中所述第一光活化阳离子通道蛋白

能够通过光诱导所述神经元的去极化电流,并且

显示

响应具有第一波长的光的单脉冲的快速阶梯状活化,以及

响应具有第二波长的光的脉冲的去活化,

其中所述神经元中的所述去极化电流维持至少10分钟;以及

其中所述前额叶皮质神经元中的所述第一光活化阳离子通道蛋白的活化诱导所述哺乳动物的社会行为和/或条件性行为的改变。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述社会行为是交往行为。

3. 根据权利要求1所述的方法,

其中所述第一光活化阳离子通道蛋白包含与SEQ ID NO:1中所示序列具有至少95%的同一性的氨基酸序列,并且

其中C128被丝氨酸置换以及D156被丙氨酸置换。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一光活化阳离子通道蛋白

包含与SEQ ID NO:2~4之一中所示氨基酸序列具有至少95%的同一性的氨基酸序列,并且

包含

对应于SEQ ID NO:1的氨基酸128处的Cys→Ser取代、

对应于SEQ ID NO:1的氨基酸156处的Asp→Ala取代。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一光活化阳离子通道蛋白通过使用病毒载体递送编码所述第一光活化阳离子通道蛋白的多核苷酸序列来表达。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述病毒载体是腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或HSV载体。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述社会行为选自相互理毛、留居者-入侵者攻击、隔离诱导的打斗、性行为、亲职行为、社会认同和听觉交往。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述神经元存在于内侧前额叶皮质的缘下或缘前亚区。

9. 根据权利要求1~8中任一项所述的方法,其中所述第一光活化阳离子通道蛋白在前额叶皮质的抑制性神经元或兴奋性神经元中表达。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述兴奋性神经元是锥体神经元。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述抑制性神经元是GABA能小白蛋白神经元。

12. 根据权利要求11所述的方法,

其中所述哺乳动物还包含在所述前额叶皮质的所述抑制性神经元或所述兴奋性神经元中表达的第二光活化阳离子通道蛋白,并且

其中所述第二光活化阳离子通道蛋白与所述第一光活化阳离子通道蛋白不在相同的神经元中表达。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述第二光活化阳离子通道蛋白是C1V1。

14. 一种包含前额叶皮质的神经元的脑切片,

其中光活化阳离子通道蛋白在所述前额叶皮质的神经元中表达,

其中所述光活化阳离子通道蛋白

包含与SEQ ID NO:1~4之一中所示序列具有至少95%的同一性的氨基酸序列,并且包含

对应于SEQ ID NO:1的氨基酸128处的Cys→Ser取代、

对应于SEQ ID NO:1的氨基酸156处的Asp→Ala取代,

其中所述光活化阳离子通道蛋白

能够利用光诱导所述神经元的去极化电流,并且

显示

响应具有第一波长的光的单脉冲的快速阶梯状活化、和

响应具有第二波长的光的脉冲的去活化;

其中所述神经元的去极化电流维持至少10分钟。

15. 根据权利要求14所述的脑切片,

其中所述光活化阳离子通道蛋白包含与SEQ ID NO:1中所示序列具有至少95%的同一性的氨基酸序列,并且

其中C128被丝氨酸置换以及D156被丙氨酸置换。

16. 根据权利要求14所述的脑切片,其中所述光活化阳离子通道蛋白

包含与SEQ ID NO:2~4之一中所示氨基酸序列具有至少95%的同一性的氨基酸序列,并且

包含

对应于SEQ ID NO:1的氨基酸128处的Cys→Ser取代、

对应于SEQ ID NO:1的氨基酸156处的Asp→Ala取代。

17. 根据权利要求14~16中任一项所述的脑切片,其中所述光活化阳离子通道蛋白在前额叶皮质的抑制性神经元或兴奋性神经元中表达。

18. 一种用于鉴定抑制非人哺乳动物的前额叶皮质中的兴奋性或抑制性神经元的去极化的化合物的方法,所述方法包括

(a)使所述非人哺乳动物的前额叶皮质中的兴奋性神经元或抑制性神经元去极化,所述非人哺乳动物包含在所述哺乳动物的前额叶皮质的神经元的细胞膜上表达的第一光活化阳离子通道蛋白,

其中当用光照射所述神经元时所述第一光活化阳离子通道蛋白能够介导所述神经元的去极化电流,

其中所述第一光活化阳离子通道蛋白显示

响应具有第一波长的光的单脉冲的快速阶梯状活化、和

响应具有第二波长的光的脉冲的去活化；

其中所述神经元中的去极化电流维持至少10分钟；

其中所述第一光活化阳离子通道蛋白

包含与SEQ ID NO:1~4之一中所示序列具有至少95%的同一性的氨基酸序列,并且包含

对应于SEQ ID NO:1的氨基酸128处的Cys→Ser取代、

对应于SEQ ID NO:1的氨基酸156处的Asp→Ala取代、

其中所述前额叶皮质神经元中的所述第一光活化阳离子通道蛋白的活化诱导所述哺乳动物的社会行为和/或条件性行为的改变；

(b)测量响应选择性地使包含所述第一光活化阳离子通道蛋白的所述兴奋性神经元去极化的兴奋性突触后电位(EPSP)或抑制性突触后电流(IPSC)；

(c)将所述兴奋性或抑制性神经元与化合物接触；和

(d)测量所述兴奋性突触后电位(EPSP)或所述抑制性突触后电流(IPSC)以确定将所述兴奋性神经元与所述化合物接触是否抑制所述神经元的去极化。

19.根据权利要求18所述的方法,其中所述社会行为是交往行为。

20.根据权利要求18所述的方法,

其中所述第一光活化阳离子通道蛋白包含与SEQ ID NO:1中所示序列具有至少95%的同一性的氨基酸序列,并且

其中所述第一光活化阳离子通道蛋白在氨基酸156处具有D至A的突变。

21.根据权利要求18所述的方法,其中所述第一光活化阳离子通道蛋白

包含与SEQ ID NO:2~4之一中所示氨基酸序列具有至少95%的同一性的氨基酸序列,并且

包含

对应于SEQ ID NO:1的氨基酸128处的Cys→Ser取代、

对应于SEQ ID NO:1的氨基酸156处的Asp→Ala取代。

22.根据权利要求18所述的方法,其中具有第一波长的光的所述单脉冲持续100毫秒或更少。

23.根据权利要求18所述的方法,其中所述第一波长是蓝光并且其中所述第二波长是绿光或黄光。

24.一种用于鉴定恢复非人哺乳动物的社会行为和/或条件性行为的化合物的方法,所述方法包括:

(a)使非人哺乳动物的前额叶皮质中的兴奋性神经元去极化,所述非人哺乳动物包含在神经元的细胞膜上表达的光活化阳离子通道蛋白,

其中当用光照射所述神经元时所述光活化阳离子通道蛋白能够诱导所述神经元的去极化电流,

其中所述光活化阳离子通道蛋白显示

响应具有第一波长的光的单脉冲的快速阶梯状活化、和

响应具有第二波长的光的脉冲的去活化；

其中所述神经元中的去极化电流维持至少10分钟；

其中所述光活化阳离子通道蛋白
包含与SEQ ID NO:1~4之一中所示序列具有至少95%的同一性的氨基酸序列,并且
包含
对应于SEQ ID NO:1的氨基酸128处的Cys→Ser取代、
对应于SEQ ID NO:1的氨基酸156处的Asp→Ala取代,并且
其中使所述兴奋性神经元去极化抑制所述非人哺乳动物的一种或多种社会行为和/或
条件性行为;

(b)给所述非人哺乳动物施用化合物;和

(c)确定给所述非人哺乳动物施用所述化合物是否恢复所述非人哺乳动物的所述一种
或多种社会行为和/或条件性行为。

25.根据权利要求24所述的方法,其中所述社会行为是交往行为。

26.根据权利要求24所述的方法,其中所述社会行为选自相互理毛、留居者-入侵者攻击、
隔离诱导的打斗、性行为、亲职行为、社会认同和听觉交往。

27.根据权利要求24所述的方法,其中所述化合物的施用减少或抑制兴奋性神经元的
去极化。

28.根据权利要求24所述的方法,其中所述化合物的施用增加抑制性神经元的去极化。

稳定阶跃函数视蛋白及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2010年11月5日提交的美国临时专利申请No.61/410,704、2010年11月5日提交的美国临时专利申请No:61/410,711以及2011年7月26日提交的美国临时专利申请No:61/511,905的优先权,每篇临时专利申请的公开内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及包含在它们的质膜上表达稳定阶跃函数视蛋白(SSFO)的非人动物细胞的组合物,以及使用所述组合物对位于前额叶皮质的微回路中的神经元选择性去极化以影响非人动物的一种或多种社会行为、交往和/或条件性行为的方法。

[0004] 背景

[0005] 光遗传学是用于控制活组织的靶向细胞中,甚至在自由移动哺乳动物和其它动物内特定事件的遗传和光学方法和与完整生物系统运行同步所需的时间精度(毫秒时程)的组合。光遗传学的标志是将快速光活化通道蛋白引至靶神经元细胞的质膜,这使得可在时间上精确操作神经元膜电位,同时通过使用特异性靶向机制来维持细胞类型分辨率。可用于研究神经系统功能的微生物视蛋白有视紫红质通道蛋白(channelrhodopsin)(ChR2、ChR1、VChR1和SF0),在暴露于光时用于使膜去极化。在短短数年间,光遗传学领域已经深化对特异性细胞类型如何体内作用于生物组织(例如神经回路)的功能的基本科学理解。而且,在临床方面,光遗传学驱动的研究已引起对帕金森氏病和其它神经和精神障碍的深刻理解。

[0006] 然而,尽管取得了这些进展,但大多数精神障碍的神经生理学基础仍然知之甚少,尽管快速出现了关于与复杂行为表型(如在自闭症和精神分裂症中观察到的复杂行为表型)相关的遗传因子的信息(Cichonet等,The American Journal of Psychiatry166(5):540(2009);O'Donovan等,Human Genetics126(1):3(2009))。一个值得注意的新出现的原理是范围极广的表面上不相关的遗传异常可产生相同种类的精神病表型(例如社会行为功能障碍;Folstein&Rosen-Sheidley,Nature Reviews2(12):943(2001))。此意外的模式已表明需要发现表明需要鉴别可在共同的病理生理学原理下统一多种多样的遗传因子的简化回路级研究。

[0007] 一个这样的回路级假说是:皮质细胞兴奋与抑制的比率(细胞E/I平衡)的提高可引发自闭症的社会和认知缺陷(Rubenstein,Current Opinion in Neurology23(2):118;Rubenstein&Merzenich,Genes,Brain,and Behavior2(5):255(2003))。该假说有可能统一不同流派的病理生理学证据,包括许多自闭症相关基因与离子通道和突触蛋白的功能获得表型关联(Bourgeron,Current Opinion in Neurobiology19(2),231(2009))以及约30%的自闭症患者还显示临床上明显的发作(Gillberg&Billstedt,Acta Psychiatrica Scandinavica,102(5):321(2000))的观察。然而,现在还不清楚这样的不平衡(与疾病症状相关的)在长期(例如,在发育过程中)或急性时程上是否有效。此外,该假说绝不会被普遍接受的,这部分因为其还不太容易直接检验。药物和电干预缺乏必需的特异性来相对于抑

制性细胞选择性支持(以与受体调节根本不同的方式)大脑的新皮层兴奋细胞的活性,无论是在临床背境中还是处于社会和认知工作过程中的自由行动的实验哺乳动物中。其可能与挑战例如自闭症和精神分裂症的社会和认知缺陷已证明多半不会在临床中对常规定神药理学治疗作出反应的这样的挑战相关。

[0008] 现有光遗传学方法也不足以应对该目的;利用视紫红质通道蛋白选择性地兴奋性或抑制性细胞中驱动协调尖峰(coordinated spike)是可行的,但不会十分适合大脑的新皮层锥体细胞的零星编码和非同步触发模式(asynchronous firing pattern)。此外,光纤和其它硬件的连续存在为对针对社会行为和认知测量(例如在场景条件化(contextual conditioning)中)中常见的快速且空间上复杂的运动的长期行为测试带来挑战。相反地,双稳态阶跃函数(bistable step-function)视蛋白(SFO)基因产物相对于另一个群选择性地支持一个群体的激发可部分解决这类挑战,因为靶向群体可不通过协调的尖峰来驱动,但仅对可以是零星和不同步的天然输入致敏。SFO的使用还具有解决硬件挑战的潜力,因为SFO的在数量级上更大的光敏特征在理论上可允许非脑穿透性光递送,并且在启动(light-off)后双稳定SFO的持续作用可允许无硬件行为测试。然而,已知的SFO(C128A、S、T和D156A)的稳定性不足以在单次闪光后产生持续复杂行为测试所需的许多分钟的恒定光电流。

[0009] 因此,所需要的是可允许在体外和在体内直接检验自由移动小鼠的前额叶皮质中的E/I平衡假说的光遗传学工具。这样的光活化蛋白质可允许研究额叶前部分细胞E/I平衡的双向调节对认知和神经功能障碍相关的条件性和先天性行为的影响,以及探测所得的对回路生理学和信息的定量传输的影响。

[0010] 发明概述

[0011] 本文中提供了包含在它们的质膜上表达稳定阶跃函数视蛋白的动物细胞、非人动物、脑切片以及使用其选择性地使存在于前额叶皮质的微回路中的神经元去极化的方法。

[0012] 因此,本文中提供了包含在动物的前额叶皮质的神经元中表达的第一光活化阳离子通道蛋白的非人动物,其中所述蛋白质能够通过光在神经元中诱导去极化电流,并且显示响应具有第一波长的光的单脉冲的快速阶梯状活化以及响应具有第二波长的光的脉冲的去活化,其中神经元中的去极化电流维持至少约10分钟;并且其中前额叶皮质神经元中蛋白质的活化诱导动物的神经行为、交往和/或条件性行为的改变。

[0013] 在一些方面,提供了包含前额叶皮质的神经元的脑切片,其中光活化蛋白在前额叶皮质的神经元中表达,其中蛋白质能够通过光在神经元中诱导去极化电流,并且显示响应具有第一波长的光的单脉冲的快速阶梯状活化以及响应具有第二波长的光的脉冲的去活化;其中去极化电流维持至少约10分钟。

[0014] 在另一个方面,提供了用于鉴定抑制非人动物的前额叶皮质中的兴奋或抑制性神经元的去激化的化合物的方法,所述方法包括:(a)使包含在动物的前额叶皮质的神经元的细胞膜上表达的第一光活化蛋白质阳离子通道蛋白的非人动物的前额叶皮质中的兴奋或抑制性神经元去极化,其中当用光照射神经元时,所述蛋白质能够介导神经元的去极化电流,其中所述蛋白质显示响应具有第一波长的光的单脉冲的快速阶梯状活化以及响应具有第二波长的光的脉冲的去活化;其中神经元中的去极化电流维持至少约10分钟;其中所述蛋白包含在对应于ChR2氨基酸序列的C128和D156的氨基酸残基处具有氨基酸置换的ChR2、

ChR1、VChR1或VChR2氨基酸序列；其中前额叶皮质神经元中蛋白质的活化诱导动物的社会行为、交往和/或条件性行为的改变；(b)测量响应对包含光活化蛋白的兴奋性神经元的选择性去极化的兴奋性突触后电位(EPSP)或抑制性突触后电流(IPSC)；(c)将兴奋性或抑制性神经元与化合物接触；和(d)测量兴奋性突触后电位(EPSP)或抑制性突触后电流(IPSC)以确定将兴奋性神经元与化合物接触是否抑制神经元的去极化。

[0015] 在另一个方面,提供了用于鉴定恢复非人动物的社会行为、交往和/或条件性行为的化合物的方法:所述方法包括:(a)使包含在神经元的细胞膜上表达的光活化蛋白质阳离子通道蛋白的非人动物的前额叶皮质中的兴奋性神经元去极化,其中当用光照射神经元时,所述蛋白质能够诱导神经元的去极化电流,其中所述蛋白质显示响应具有第一波长的光的单脉冲的快速阶梯状活化以及响应具有第二波长的光的脉冲的去活化;其中神经元中的去极化电流维持至少约10分钟;并且所述蛋白包含ChR2、ChR1、VChR1或在对应于ChR2氨基酸序列的C128和D156的氨基酸残基处具有氨基酸置换的VChR2氨基酸序列,其中使兴奋性神经元去极化抑制非人动物的社会行为、交往和/或条件性行为的改变;(c)给非人动物施用化合物,和(d)确定给非人动物施用化合物是否可恢复非人动物的一种或多种社会行为、交往和/或条件化行为。

[0016] 本公开涉及对神经系统障碍(例如与社会功能障碍相关的障碍)的光学控制,如本文中描述的。虽然本公开不一定限定于这些背景中,但本公开的各个方面可通过使用这些和其它背景的实例来理解。

[0017] 本公开的各个实施方案涉及将对神经回路的时间、空间和/或细胞类型控制与可测量指标(measurable metrics)产生关系的光遗传学系统或方法。例如,各种指标或症状可能与神经障碍(例如显示神经功能障碍的各种症状的神经障碍)相关。光遗传学系统靶向受试者/患者内的神经回路以对其进行选择性控制。光遗传学系统包括监测受试者/患者的与神经障碍相关的指标或症状。这样,光遗传学系统就可提供关于神经回路、其功能和/或神经障碍的详细信息。

[0018] 与本文中论述的实施方案一致,具体实施方案涉及研究和探测障碍。其它实施方案涉及鉴定和/或研究表型及内在表型。其它实施方案涉及治疗靶的鉴定。

[0019] 本公开的方面涉及在快时间时程(fast-temporal time scale)上的障碍/疾病状态的人工诱导。这些方面允许研究另外的健康动物的疾病状态。这对于了解甚少以及另外地难以在活动物中精确建模的疾病是特别有用的。例如,由于缺乏显示疾病状态的可用的动物而可能难以测试和/或研究疾病状态。此外,某些实施方案允许对于建立基线/对照点(用于测试治疗对相同动物(当显示疾病状态和当未显示疾病状态时)的效果)是特别有用的可逆疾病状态。存在各种其它可能性,其中一些可能在本文中进行了更详细论述。

[0020] 本公开的方面涉及使用人工诱导的障碍/疾病状态研究另外的健康动物的疾病状态。这对于了解甚少和另外地难以在活动物中精确建模的疾病可以是特别有用的。例如,由于缺乏显示疾病状态的可用的动物而可能难以测试和/或研究疾病状态。此外,某些实施方案允许对于建立基线/对照点(用于测试治疗对相同动物(当显示疾病状态和当未显示疾病状态时)的效果)是特别有用的可逆疾病状态。

[0021] 本公开的某些方面涉及方法,所述方法包括改变(例如,提高或降低)受试者/患者的前额叶皮质的靶向神经回路的兴奋/抑制(E/I)平衡。例如,将E/I平衡改变至保持靶向神

经回路对内部电活性(intrinsic electrical activity)的反应同时瞬时增加障碍的症状。当E/I平衡被改变时,将刺激引入受试者/患者并且监测障碍的症状。受试者可以是健康的测试动物或障碍的动物模型。操作的结果是疾病症状的瞬时重演(在另外的健康动物中)或症状的减轻(在神经障碍的动物模型中)。在某些更具体的实施方案中,症状的监测还包括在缓解障碍的症状中评估刺激的功效。存在各种其它可能性,其中一些可能性在本文中进行了更详细论述。

[0022] 附图概述

[0023] 参考下列描述和附图可更充分地理解各示例性实施方案,其中:

[0024] 图1:完全稳定化的SF0的动力学和吸光度性质。(a)暗适应野生型ChR2、ChR2-C128S、ChR2-D156A和ChR2-C128S/D156A(SSFO)的归一化吸收谱。(b-d)在利用450nm的光照射30秒后记录的吸收谱。采自相应的吸收谱的吸收差谱(Absorption difference spectra)示于插图中。在照射结束后在指定的时间上收集光谱;注意在单突变体中在3分钟后显著的恢复,与双突变体相反。(e)简化的光循环示意图;在C128/D156突变体中,P520至P480的变迁可能减慢或被阻断,从而避免了不能被470nm的光再活化的脱敏状态Des470。(f-h)对于所有3种变体,在利用450nm的光照射之前、照射的过程中和照射之后在指定的波长上记录的单色吸收变化,突出显示了双突变体的显著稳定性。

[0025] 图2描述了体内和体外多个细胞类型的神经活性的稳定阶梯调制(step-modulation)。(a)从表达ChR2(C128S/D156A)的培养神经元记录的活化(左上)和去活化(左下)。灰色水平条棒表示光脉冲,描迹颜色(trace color)表示每一个光脉冲使用的光的波长;显示了用于ChR2(C128S/D156A)的活化和去活化的测量的概括谱(summary spectra)(右)。(b)表达ChR2(C128S/D156A)(黑色;-t=29.3min)或ChR2(D156A)(灰色;-t=6.9min)的细胞中光电流衰减的单指数拟合。(c)表达ChR2(C128S/D156A;"SSFO")的培养海马神经元的光电流的代表性全细胞膜片钳记录。条棒表示活化和去活化光脉冲;在传入突触兴奋性突触后电流(epscs)的自然设置(naturalistic setting)中进行的记录。(d)表达SSFO的培养神经元对具有指定能量的470nm光脉冲的全细胞光电流反应(左)。脉冲长度为2秒(灰色水平条棒描迹(bartraces))或5(黑色水平条棒描迹)。虚线标示光脉冲结束。将激动时间常数(T)相对光功率示于双对数坐标图(log-log plot)(n=27个来自5个细胞的记录;中间)。无论光功率是多少,到达每一个细胞的使光电流达到该细胞的指数曲线常数(63%的 I_{max})入射光子的计算的数目是恒定的(右)。每一个点代表在给定的光功率(方法)下来自单个记录的光子数目。(e)记录构型(configuration)的光极(Optrode)。通过光纤耦合器(fiber coupler)将470nm和561nm激光偶联至光纤。将钨电极连接至具有400 μ m的通过纤维头并且向前进入脑的11m突出部分的光纤。(f)在麻醉的动物中使用CaMKII α -SSFO活化兴奋性神经元稳定地提高注射位置中的神经元活性。将标有星号的示例描迹(trace)绘制在利用2s移动平均值计算的瞬时尖峰率(spike rate)热图下方。每一个热图线代表在指定的深度上的扫描(sweep)(每一个位置3次扫描);分别用蓝色和绿色条棒标示470nm活化脉冲和561nm去活化脉冲。(g)利用PV::Cre/DIO-SSFO活化PV-阳性中间神经元抑制注射位置内的局部网络活性。将加有星号的实例描迹在瞬时尖峰率热图绘制在瞬时尖峰率热图下方。(h)显示CK-SSFO(方块)和PV::Cre/DIO-SSFO(圆圈)动物(n=2只小鼠,每动物>5个记录位置)的活化之前、活化之后以及去活化之后,刺激前和刺激后活性的显著差异的描迹的平均尖峰率。(i)

显示SSF0的持续活性的代表性10-min长记录。显示了指示为神经元1和神经元2的分离的单个单位的活性的瞬时尖峰率热图；紧接相应的描述绘制指定的单位的波形。

[0026] 图3描述了提高的而非降低的额叶前部E/I平衡导致行为障碍(behavioral impairment)。(a)将利用对照CaMKII α -eYFP、CaMKII α -SSF0或DIO-SSF0病毒在mPFC中注射的和利用光纤连接器长期植入的野生型或PV::Cre转基因小鼠经历条件性恐惧实验(fear conditioning)和社会探究(social exploration)实验。(b)来自利用CaMKII α -SSF0-eYFP病毒注射的小鼠的共聚焦图像显示在缘前(PL)和缘下(infralimbic)(IL)皮层中的表达。(c)在2s470nm光脉冲后针对c-fos染色90min的PV::Cre DIO-SSF0和CaMKII α -SSF0小鼠的额叶前部切片的代表性图像；条棒=25 μ m。照片显示CaMKII α -SSF0和PV::Cre/DIO-SSF0动物的mPFC中的平均c-fos阳性细胞计数。(d)居住笼(home cage)内的幼年侵入者的对照、CaMKII α -SSF0和PV::Cre/DIO-SSF0小鼠的社会探究的汇总数据。CaMKII α -SSF0小鼠显示社会探究的显著减少。(e)第二天试验在条件性恐惧实验之前施用了一次2s470nm的光脉冲的小鼠的响应条件场景(conditioned context)或条件听觉暗示(conditioned auditory cue)的木僵行为(freezing)；CaMKII α -SSF0小鼠在响应两种条件刺激的木僵行为上受到严重妨碍。第二天,在无光刺激的情况下对小鼠重新进行条件性实验,24小时后评价木僵行为。所有小鼠在光不存在的情况下都显示类似的木僵行为。(f)在光活化之前(试验1)和之后(测试光活化),敞箱探究实验(Open-field exploration)CaMKII α -SSF0(蓝色)和CaMKII α -EYFP(灰色)对照小鼠中无差别。显示了表达CaMKII α -SSF0的动物的试验1(上图)和试验2(下图)的示例性描述。(g)在表达CaMKII α -SSF0(黑色)与CaMKII α -EYFP(灰色)的小鼠中10分钟内新事件的探究是相似的。(h)用CaMKII α -SSF0在PFC(上)或V1(下)中注射的野生型小鼠的冠状切面(coronal sections)的荧光图像。(i)在三室试验(3-chamber test)中,在2s470nm的光脉冲后,在PFC中表达CaMKII α -SSF0的小鼠(n=6)但非对照小鼠(n=8)或在V1中表达CaMKII α -SSF0的小鼠(n=8)的社会行为被妨碍。所有条形图描述平均值 \pm s.e.m. (* p <0.05, ** p <0.005, *** p <0.0005)。(j)用抗小白蛋白抗体染色的用Cre-依赖性AAV5-EF1a-DIO-SSF0-EYFP病毒双侧注射的PV::Cre小鼠的40 μ m冠状脑切片(coronal brain slice)的高倍放大共聚焦图像。箭头指示通过膜结合EYFP标记鉴定的双标记PV神经元；箭头显示不表达可检测水平的SSF0-EYFP的PV阳性神经元。(k)相同切片的低功率共聚焦图像显示于(j)中,显示了DIO-SSF0病毒在mPFC中的空间限制性表达。(l)整个PV+细胞群体中和整个YFP+细胞群全中双标记细胞的百分比,如从高放大倍数共聚焦多层光切计数的(n=7个来自4只小鼠的切片；总共617个计数的PV+细胞,191个YFP+细胞,169个双标记的细胞)计数的。该数目与该品系中~40%的表达Cre重组酶的PV神经元和约50%的病毒转导效率一致。由于PV的表达在细胞间是不均一的,因此一些PV+神经元可能表达不可检测水平的PV但仍然包含充足水平的用于活化DIO-SSF0表达的Cre。(m)利用CaMKII α ::SSF0-EYFP病毒(灰色;n=2只小鼠)单侧注射的动物和利用CaMKII α ::EYFP病毒(浅灰色;n=2只小鼠)单侧注射的对照的皮层和皮层下区域的c-fos免疫荧光的定量。显示了来自同侧(注射的)和对侧(未注射的)半球的数据。误差棒标示平均值 \pm s.e.m p =0.044)。(n)显示在利用2s473nm的光脉冲活化前和活化后,在mPFC中表达CaMKII α ::EYFP的对照小鼠的敞箱探究实验的两个代表性描述。在2s473nm的光脉冲(下; p >0.1,对于与活化前相比较的两者;配对t检验)后,探究旷场中央的运动速度和消耗的时间在CaMKII α ::SSF0和CaMKII α ::EYFP动物中都未改变,这表明

SSF0活化不是引起焦虑的。

[0027] 图4描述了锥体细胞的SSF0活化通过主要神经元(principal neuron)增加网络活性和妨碍信息传输。(a)用AAV5-CaMKII α -SSF0-EYFP注射的小鼠的额叶前部皮层切片中一层2/3的锥体神经元(表达SSF0)的全细胞记录。利用470nm的光的活化触发了记录的细胞的去极化。插图包括展开的活化前(1)、活化后(2)和去活化后(3)的2s时期。(b)来自表达CaMKII α ::SSF0-EYFP的切片的非表达锥体神经元的全细胞记录显示1s470nm的光脉冲后增加的突触活性(上图),该活性被兴奋性突触阻断剂CNQX(10 μ M)和APV(25 μ M;下)消除。插图比较了活化前(1)、活化后(2)和去活化后(3)的活性。(c)样品描述显示PV::SSF0切片(表达DIO-SSF0-EYFP)中的代表性锥体神经元在基线上和在切片中的PV细胞的5510活化过程(蓝光与黄光脉冲之间)中的反应。插图比较了活化前(1)、活化后(2)和去活化后(3)3个5s时期。(d)利用SSF0活化后PV细胞的活性。

[0028] 图5描述了提高的但非下降的细胞E/I平衡中的受损的细胞信息加工。(a)显示蓝光活化之前(上图)和之后(下图)代表性表达CaMKII α ::SSF0-eYFP的细胞对sEPSC的相同确定的模式的注射的代表的描述。显示了每一个描述的静息膜电位。(b)表达SSF0锥体神经元的输入-输出曲线,其显示在SSF0活化后对更高的sEPSC率的减弱的反应(刺激前:黑色;刺激后:灰色;误差棒显示s.e.m)。(c)在1s470nm的脉冲后,6个单个表达SSF0的锥体细胞中相互传输的(EPSC-尖峰)信息的逐细胞减少。平均MI以黑色显示(平均 \pm s.e.m; $p=0.0063$,斯氏t检验;在125ms的窗口内获得的尖峰率与注射的sEPSC率之间的突变信息的减少)。(d)显示在蓝光活化之前(上图)和之后(下图)来自切片的表达DIO-SSF0-eYFP的锥体神经元对与a中相同的sEPSC的注射的代表的描述。显示了每一个描述的静息膜电位。(e)PV::SSF0切片中的锥体神经元的输入-输出曲线,其显示在PV神经元的SSF0活化后增益的线性减少(刺激前:黑色;刺激后:蓝色;误差棒显示s.e.m)。(f)在触发PV神经元的DIO-SSF0的活化的1s470nm的脉冲后,未显示锥体细胞传输的信息的显著减少(尽管存在发送抑制)的逐细胞汇总数据。均值MI以黑色显示。(g)跨一系列用于计算交互信息(mutual information)的时间框宽度的基线对SSF0-活化的条件的细胞间平均交互信息。为了进行这类比较,将输入sEPSC率的框宽度保持恒定在50Hz。星号指示SSF0活化的条件中交互信息的改变的显著性。(h)来自切片的记录的表达CaMKII α ::SSF0或PV::SSF0的细胞的交互信息(SSF0活化减去基线)的平均变化的比较。星号指示CaMKII α ::SSF0对PV::SSF0的交互信息的变化量的量级的差异的显著性。(i)与(g)中一样,但利用不同的输入sEPSC率框。此处将时间框宽度保持恒定在125ms。(j)与(h)中相同,但利用不同的输入sEPSC率框。所有条线图描述了平均值 \pm s.e.m. (* $p<0.05$; ** $p<0.01$)。

[0029] 图6描述了mPFC中的提高的细胞E/I平衡驱动自由移动的社会受损的小鼠的基线 γ 节律。(a)在病毒注射时通过小型穿颅术将非脑穿透性光纤连接器植入用CaMKII α ::SSF0或CaMKII α ::EYFP注射的野生型小鼠。(b)植入了非穿颅光纤连接器的小鼠PL皮层中SSF0-eYFP的病毒表达的代表图像。(c)在利用2s470nm的光脉冲活化后90min,对照(CaMKII α ::EYFP)小鼠或CaMKII α ::SSF0小鼠的PFC中的c-fos阳性细胞计数。(d)在于即将进行条件化时期时接受2s470nm的光脉冲的非穿颅植入小鼠中评估的木僵行为。在条件化时期后即刻(立即)、24小时后(试验1)和随后在其中不递送光的第二条件性恐惧试验期后24小时后(试验2)测量木僵行为。(e)在无光活化情况下(试验1)或在2s470nm的光脉冲后(试验2)测量社会

探究。(f)用于小鼠M2和PFC的清醒行为记录的可植入的长期多点控制器光极(multisite optrode)(CMO)。箭头指示导线终止位置;箭头显示光纤连接器的切割末端。(g)电解损伤标志着在表达CaMKII α ::SSFO的小鼠中从其获取记录的位置。(h)在利用470nm的光活化之前(灰色左直条)和之后(蓝色右直条),3只小鼠(其中进行CMO记录)(n=3只小鼠)的社会探究(左)和新事件的探究(右)。(i)在活化/去活化方案过程中来自同时记录的两个通道的多电极活性。如所揭示的,递送蓝光和黄光。选择具有显著的多单位调制(multiunit modulation)(下图)的通道用于光谱分析。(j)与在表达区域外(灰色左直条;n=4个通道(于3只小鼠中))的通道相比较的表达区域内(蓝色右直条n=4个通道(于3只小鼠中))的通道上的MUA率的平均增加。(k)来自未调制的通道的LFP小波(wavelet)光谱图。显示了基线、活化和去活化期的示例性描述。显示了3个指定时期的平均小波光谱(n=5个试验,于1只小鼠中)和3个频率范围中的功率变化的群体数据(population data)(插图;n=3只小鼠)。(l)来自调制的通道的LFP小波光谱。显示了基线、活化和去活化期的示例性描述。显示了3个指定时期的平均小波光谱(n=5个试验,于1只小鼠中)和显示了群体数据(插图;n=3只小鼠),显示了PFC锥体神经元的SSFO活化后 γ 节律的特异性增加。所有条线图描述了平均值 \pm s.e.m。将来自5个试验的(k)、(l)中的功率谱进行平均,阴影区表示记录间的标准差(* p <0.05;** p <0.005)。

[0030] 图7描述了新型旷场行为试验中的运动行为。(a)在利用1s473nm的光活化之前(深灰色条块;2.5min)和活化之后(浅灰色条块;2.5min)在mPFC中表达CaMKII α ::SSFO的小鼠的旷场行为。显示了轨道长度、在中央的时间%和在周围的时间%(n=3只小鼠)。在使SSFO去活化的第二个2.5min时期后施用黄光脉冲。(b)在活化前(黑色)、活化后(深灰色)和去活化后(浅灰色),从经测定从置于表达病毒的mPFC区中的电极产生的通道测量的平均功率谱(n=3只小鼠,阴影区表示小鼠间的s.e.m)。(c)在无SSFO的光活化(灰色)和具有活化(浅灰色)的试验中在社会行为测试中从通道测量的平均功率谱。(d)如(b)中针对新事件的探究实验(n=3只小鼠,阴影区表示小鼠间的s.e.m)一样。注意,未调制的通道在光活化后不显示功率谱的显著改变。

[0031] 图8描述了在高光密度下 γ 频率上的功率的增加。(a)利用在0mV记录的IPSC的和在-60mV下记录的EPSC的相应光谱进行的电压钳实验。(b)在具有指定的光功率密度的560nm的光的20s脉冲过程中在mPFC锥体神经元中记录的指定的频率框(frequency bin)内的突触活性的功率的变化。显示了当电压将细胞钳制至-60mV或0mV时,或在电流钳(CC)模式中,基线(光照前)期至光照期(light-on period)之间的功率差异。最强的 γ 调制在最高光功率密度时很明显,并且在0mV和CC记录中最强。(c)来自(b)的3个记录构型中的3个光功率的相对 γ 功率。

[0032] 图9描述了PFC兴奋性或抑制性细胞的抑制。(a)在居住笼中的社会探究(a;n=6,对于所有条件)和三室社交试验(three-chamber social test)(b;分别地n=3、5和6)中测试利用CaMKII α ::eNpHR3.0双侧注射的野生型小鼠、利用EF1 α ::D10-eNpHR3.0双侧注射的PV::Cre小鼠和利用CaMKII α -EYFP双侧注射的对照。居住笼中的社会行为在这类条件下未受到影响(a; p >0.5,对于与对照相比较的两个NpHR3.0组,非配对t检验),并且所有3个组在三室社交试验中显示相似的社会偏爱(b; p >0.5,对于与对照相比较的2个NpHR3.0组,未配对t-检验)并且明显更喜欢社交室(social chamber)(b; p <0.05,配对t检验)。由于表达外

显度(expression penetrance)的原因,这些实验中的PV细胞的抑制预期不会使绝大部分抑制性神经元(和甚至PV神经元)的活性发生改变。

[0033] 图10描述了正在行动的哺乳动物的组合光遗传学:提高的E/I-平衡社会行为的拯救,(a)SSF0和C1V1-E122T/E162T(C1V1)的动作光谱。重直线表示实验中使用的刺激波长。(b)实验设计和脉冲模式;将无光对照用于基线行为;将2s470nm的光用于活化SSF0,仅在光脉冲过程中瞬时活化C1V1;将10Hz470nm用于共活化SSF0和C1V1;10Hz590nm仅活化C1V1。(c)表达CaMKII α :SSF0的小鼠在基线上显示显著的社会偏爱,但在2s470nm的活化后或在10Hz470nm的活化过程中显示社会功能障碍。(d)表达CaMKII α :SSF0和(DIO)PV::C1V1的小鼠在2s470nm的脉冲后显示受损的社会行为,但在10Hz470nm的光刺激过程中显示恢复的社会行为。利用10Hz590nm的脉冲对单独的C1V1活化不损害社会行为。

[0034] 图11描述了mPFC细胞E/I平衡的组合光学对照:对照实验。简图举例说明了在4个不同的使用CaMKII α :YFP小鼠的实验中使用的刺激方案。在所有4个实验中,光刺激对这类对照小鼠对在其中放置了新的同种小鼠(n=8只小鼠)的小室中消磨时间的明显偏爱没有影响。

[0035] 图12描述了与本发明的不同的10个实施方案一致的疾病模型的测试的流程图。

[0036] 图13描述了用于评价与本公开的实施方案一致的各种神经系统障碍的治疗的模型。

[0037] 尽管本公开可具有各种修改和替代形式,但其细节已在附图中通过举例的方式示出并将进行详细描述。然而,应当理解,目的不是将本公开限于所述的具体实施方案和/或应用。相反,目的在于涵盖落入本公开的范围内的所有修改形式、等效形式和替代形式,包括权利要求中定义的方面。

[0038] 详细描述

[0039] 本发明除其它以外提供了包含在它们的质膜上表达稳定阶跃函数视蛋白的细胞的动物细胞、非人动物和脑切片,以及使用稳定阶跃函数视蛋白使存在于前额叶皮质的相同微回路中的兴奋或抑制性神经元选择性去极化的方法。阶跃函数视蛋白或SF0是ChR2光活化阳离子通道蛋白,其可在暴露于蓝光后诱导神经元的延长的稳定的易兴奋状态(excitable state),随后在暴露于绿光或黄后被逆转。SF0被开发来实现在达到野生型(wt)ChR2的时程的4个数量级的时程上操作的靶向群体的兴奋性,或更稳定的状态调制(SF0:高达10-100秒)的双稳定改变。虽然此类视蛋白质基因递送了与被设计来控制个别(individual)动作电位的常规光活化通道的光遗传学控制互补的新型光遗传学控制,但时程仍然不适合于评估持续许多分钟的延长的复杂哺乳动物行为。

[0040] 由发明人进行的后续工作已进一步发展了初步SF0概念,C128光子网络伴侣D156的突变用以额外地延长光循环和开放状态的寿命。该“稳定阶跃函数视蛋白”(SSF0)具有允许实验操作皮层E/I的提高和监测皮层切片的 γ 振荡的能力的独特生理化学性质。该新工具,称为稳定阶跃函数视蛋白(SSF0),使得能够稳定地回路调制一段时间,该时间足以进行在继续光活化、外部光纤连接不存在的情况下以及甚至根本没有任何光学硬件穿脑的情况下持续许多分钟的时间上精确并且复杂的行为实验。因此,由于光子集成的现象-使得表达SSF0的神经元能够对光极其敏感的现象-因此在它们的质膜上表达此类蛋白质的细胞能够用光脉冲来活化,所述光脉冲可具有低 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ 范围的光功率密度并且从光源深入脑组织至

少3mm。这些独特的光敏阶跃函数视蛋白可在兴奋性或抑制性神经元回路(例如在非人动物的前额叶皮质中的)中表达,其随后可响应具有特定波长的光而去极化,从而允许实验操纵皮质E/I平衡。此外,非人动物的包含表达本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的皮质兴奋性或抑制性神经元的脑切片可用于寻找化合物,所述化合物可选择性抑制存在于神经回路内的兴奋性或抑制性神经元的去极化。此类皮质神经元可负责或参与与神经障碍例如精神分裂症和/或自闭症谱系障碍相关的社会和认知行为缺陷。

[0041] 通用技术

[0042] 除非另有说明,本发明的实施将采用分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学、核酸化学、免疫学和生理学的常规技术,这些均是本领域技术人员众所周知的。这些技术完整解释在以下文献中,例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版(Sambrook等,1989)和Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版(Sambrook和Russel,2001),(在本文中统称为“Sambrook”);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等,编著,1987,包括2001年内的增刊);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等编著,1994);Harlow和Lane(1988)Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Publications,New York;Harlow和Lane(1999)Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY(在本文中统称为“Harlow和Lane”),Beaucage等编著,Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,John Wiley&Sons,Inc.,New York,2000),Handbook of Experimental Immunology,第4版(D.M.Weir&C.C.Blackwell编著,Blackwell Science Inc.,1987)和Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller&M.P.Calos编著,1987)。

[0043] 定义

[0044] 如本文中所用,除非另有说明,单数形式“一”、“一种”、和“所述”包括复数个指示物。

[0045] “动物”可以是脊椎动物例如任何常用实验室模型生物或哺乳动物。哺乳动物包括但不限人和非人灵长类动物、家畜、运动动物、宠物、小鼠、大鼠和其它啮齿类动物。

[0046] 如本文中所用,“氨基酸置换”或“突变”意指确定的氨基酸序的至少一个氨基酸组件被改变或被另一个氨基酸置换,从而导致由在细胞内具有改变的活性和表达水平的该氨基酸序列编码的蛋白质。

[0047] 本说明书中通篇所给出的每一最大数值限值包括每一较小数量限值,如同这些较小数量限值在本文中明确写出。本说明书中给出的每一最小数量限值将包括每一较大数量限值,如同这些较大数量限值在本文中明确写出。本说明书所给出的每一数值范围包括落入这些更宽数值范围内的每一较窄数值范围,如同这些较窄数值范围在本文中全部明确写出。

[0048] SSFO蛋白和表达所述蛋白的细胞

[0049] 先前描述的SFO利用更慢的通道去活化动力学,如通过ChR2-C128的突变引入的,所述突变基于视紫红质通道蛋白-2(ChR2)与细菌视紫红质蛋白(bacteriorhod)视蛋白(BR)之间的同源性选择,其中相似的突变导致光循环的适度减慢。T90,ChR2-C128的BR同源物,与BR的D115氢键键合;这两个氨基酸被认为协同作以稳定视黄醛生色团的所有反式构

象,ChR2-D156是BR D115的同源物。如果C128和D156仅通过它们的假定的共有氢键调节ChR2闭合(closure),那么预期这两个残基的组合突变对通道动力学将不产生大于单独的突变的作用。然而,与预期相反,表达ChR2-C128S D156A双突变的神经元产生远比来自仅表达单个突变的细胞的光电流更稳定的持续光电流。

[0050] 在一些方面,本发明包括包含置换的或突变的氨基酸序列的蛋白质,其中突变的蛋白质保留前体SFO蛋白的特征性光可活化的性质,但还可在一些特定方面具有改变的性质。例如,本文中描述的突变的光活化SFO蛋白可在动物细胞内或动物细胞质膜上显示升高的水平的表达;升高的水平的响应第一波长的光的持续光电流;当暴露于第二波长的光时更快但不太完全的去活化;和/或SFO蛋白籍以具有低脱敏、快速去活化和/或动物细胞中的强表达的性质的性状的组合。

[0051] 包含氨基酸置换或突变的光活化SFO蛋白包括其中一个或多个氨基酸残基已经历氨基酸置换然而保留响应光的能力和质膜的极化状态的能力的蛋白质。例如,包含氨基酸置换或突变的光活化蛋白质可通过置换对应于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸来产生。在一些实施方案中,本发明包括相较于氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的氨基酸序列包含改变的氨基酸序列的蛋白质,其中改变的光活化稳定阶跃函数视蛋白保留特征性光活化性质和/或蛋白质(具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列但可在一些特定方面具有改变的性质)的调控离子流动穿过质膜的能力。

[0052] 天然蛋白质序列的氨基酸置换可以是保守或非保守的并且此类置换的氨基酸残基可以由或可以不由遗传密码编码。可将标准20个氨基酸“字母表”分入基于它们的侧链的化学性质的化学家族。这类家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β 分枝侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异氨酸)和具有芳基的侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。“保守”氨基酸置换是其中氨基酸残基被具有化学上相似的侧链的氨基酸残基替换(即,用另一个具有碱性侧链的氨基酸替换具有碱性侧链的氨基酸)的氨基酸置换。“非保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有化学上不同的侧链的氨基酸残基替换(即,用具有芳香侧链的氨基酸替换具有碱性侧链的氨基酸)的氨基酸置换。氨基酸置换可以是保守的或非保守的。此外,氨基酸置换可位于SFO视黄醛结合袋,SFO细胞内环结构域的一个或多个中,和/或视黄醛结合袋或细胞内环结构域中。

[0053] 因此,本文中提供了可在蛋白质的整个视黄醛结合袋的关键位置具有特定的氨基酸置换的光活化稳定阶跃函数视蛋白。关于光敏多肽的视黄醛结合口袋的信息,参见Greenhalgh等,J.Biol.Chem.,268,20305-20311(1993),其公开内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,SFO蛋白可在SEQ ID NO:1的氨基酸残基C128上具有突变。在一些实施方案中,SFO蛋白可在SEQ ID NO:1的氨基酸残基D156上具有突变。在其它实施方案中,SFO蛋白可在SEQ ID NO:1的氨基酸残基C128和D156上具有突变(SSFO)。在一些实施方案中,公开的突变的稳定阶跃函数视蛋白的每一种可具有特定的性质和特征,以用于响应光而使动物

细胞膜去极化。

[0054] 因此,在此处的一个方面提供了在细胞质膜上表达的,当用光照射细胞时能够介导细胞的去极化电流的光活化SSF0蛋白,其中蛋白质显示响应具有第一波长的光的单脉冲的快速阶梯状活化,以及响应具有第二波长的光的脉冲的去活化;其中细胞的去极化电流维持长达约5、约10、约15或约20分钟。在一些实施方案中,蛋白质包含在对应于ChR2氨基酸序列的C128和D156的氨基酸残基处具有氨基酸置换的ChR2、ChR1、VChR1或VChR2氨基酸序列(参见,例如通过引用并入本文的国际专利申请公布No. W02009/131837的图1B,其举例说明了对应于视紫红质通道蛋白阳离子通道的几个种类之间的ChR2氨基酸序列的C128和D156的氨基酸残基的保守性;也参见, Kianianmomeni等, *Plant Physiol.*, 2009, 151:347-356, 其通过引用整体并入本文)。在其它实施方案中,光活化SSF0蛋白可包含与SEQ ID NO:1中显示的不具有信号肽序列的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列。在其它实施方案中,光活化SSF0蛋白可包含与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列。在其它实施方案中,光活化SSF0蛋白可包含与SEQ ID NO:2所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列。在其它实施方案中,光活化SSF0蛋白可包含与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列。在另一个实施方案中,光活化SSF0蛋白可包含与SEQ ID NO:4所示的序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,SSF0蛋白中的信号肽序列缺失,或被来自不同蛋白质的信号肽序列置换。在一些实施方案中,对应于ChR2的氨基酸序列的C128和D156的氨基酸残基处的置换是保守氨基酸置换。在其它实施方案中,对应于ChR2的氨基酸序列的C128和D156的氨基酸残基处的置换是非保守氨基酸置换。在一些实施方案中,对应于ChR2的氨基酸序列的C128的氨基酸残基处的置换是向丝氨酸的置换。在其它实施方案中,对应于ChR2的氨基酸序列的D156的氨基酸残基处的置换是向非酸性氨基酸的置换。在另一个实施方案中,对应于ChR2的氨基酸序列的D156的氨基酸残基处的置换是向丙氨酸的置换。在一些实施方案中,蛋白质还可包含C末端荧光蛋白。在一些具体的实施方案中,C末端荧光蛋白可以是增强的黄色荧光蛋白(EYFP)、绿色荧光蛋白(GFP)、蓝绿色荧光蛋白(CFP)或红色荧光蛋白(RFP)。在一些实施方案中,当用光照射细胞时,第二光活化蛋白可以能够介导细胞的超极化电流。在一些实施方案中,第二光活化蛋白可以是NpHR、eNpHR2.0、eNpHR3.0、eNpHR3.1、GtR3或C1V1嵌合蛋白(如国际专利申请No: PCT/US2011/028893和美国临时专利申请No: 61/410,736和61/410,744中所描述,每篇专利申请的公开内容通过引用整体并入本文)。

[0055] 在一些实施方案中,C1V1嵌合蛋白包括在细胞膜上表达的光活化蛋白,其中蛋白可以为来源于团藻的VChR1蛋白和莱茵衣藻的ChR1蛋白的C1V1嵌合蛋白,所述蛋白质是来源于强壮团藻(*Volvox carteri*)的VChR1与莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的ChR1的嵌合蛋白,其中蛋白包含具有被ChR1的第一和第二跨膜螺旋替代的至少第一和第二跨膜螺旋的VChR1的氨基酸序列;响应光;并且当使用光照射细胞时能够介导细胞的去极化电流。在一些实施方案中,其中蛋白质还包含位于嵌合光应答性蛋白的第二与第三跨膜螺旋之间的细胞内环状结构域内的替换,其中细胞内环状结构域的至少一部分被ChR1的对应

部分替代。在另一个实施方案中，C1V1嵌合蛋白的细胞内环状结构域的部分可被延伸至ChR1的氨基酸残基A145的ChR1的对应部分替换。在其它实施方案中，C1V1嵌合蛋白还包含嵌合光应答性蛋白的第三跨膜螺旋内的替换，其中第三跨膜螺旋的至少一部分被ChR1的对应序列替换。在另一个实施方案中，C1V1嵌合蛋白的细胞内环状结构域的部分被来自延伸至ChR1的氨基酸残基W163的ChR1的对应部分替换。

[0056] 在本文中提供的稳定阶跃函数视蛋白的一些实施方案中，具有第一波长的光可以是蓝光。在其它实施方案中，具有第一波长的所述光可以为约445nm。在另一个实施方案中，具有第二波长的所述光可以是绿光或黄光。在其它实施方案中，具有第二波长的所述光可以为约590nm。在其它实施方案中，具有第二波长的所述光可以为约390-400nm(包括390nm和400nm以及该范围内的每一个数值)。在一些实施方案中，本文中描述的光活化稳定阶跃函数视蛋白可被光脉冲活化，所述光脉冲可具有约1毫秒(ms)、约2ms、约3ms、约4ms、约5ms、约6ms、约7ms、约8ms、约9ms、约10ms、约15ms、约20ms、约25ms、约30ms、约35ms、约40ms、约45ms、约50ms、约60ms、约70ms、约80ms、约90ms、约100ms、约200ms、约300ms、约400ms、约500ms、约600ms、约700ms、约800ms、约900ms、约1秒、约1.25秒、约1.5秒或约2秒的任一时间的持续时间，包括所述时间数值以及这些数值之间的任何时间。在一些实施方案中，本文中描述的光活化稳定阶跃函数视蛋白可被光脉冲活化，所述光脉冲可具有约 $1\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $2\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $3\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $4\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $5\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $6\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $7\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $8\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $9\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $10\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $11\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $12\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $13\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $14\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $15\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $16\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $17\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $18\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $19\mu\text{W mm}^{-2}$ 或约 $20\mu\text{W mm}^{-2}$ (包括所述光功率密度在内，包括这些数值之间的任何值)的任一个的光功率密度。在其它实施方案中，光活化蛋白质可被光脉冲活化，所述光脉冲可具有约 1mW mm^{-2} 、约 2mW mm^{-2} 、约 3mW mm^{-2} 、约 4mW mm^{-2} 、约 5mW mm^{-2} 、约 6mW mm^{-2} 、约 7mW mm^{-2} 、约 8mW mm^{-2} 、约 9mW mm^{-2} 、约 10mW mm^{-2} 、约 11mW mm^{-2} 、约 12mW mm^{-2} 、约 13mW mm^{-2} 、约 14mW mm^{-2} 、约 15mW mm^{-2} 、约 16mW mm^{-2} 、约 17mW mm^{-2} 、约 18mW mm^{-2} 、约 19mW mm^{-2} 、约 20mW mm^{-2} 、约 21mW mm^{-2} 、约 22mW mm^{-2} 、约 23mW mm^{-2} 、约 24mW mm^{-2} 或约 25mW mm^{-2} (包括所述光功率密度在内，包括这些数值之间的任何值)的任一个的光功率密度。

[0057] 在一些实施方案中，本文中描述的光活化稳定阶跃函数视蛋白可维持约20分钟的持续光电流。在其它实施方案中，本文中描述的光活化稳定阶跃函数视蛋白可维持约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30分钟(包括所述时间，包括这些数值之间的任何时间)的任一个的持续光电流。在其它实施方案中，本文中描述的光活化稳定阶跃函数视蛋白的任一种的光循环进展在利用具有第一波长的光的所述单脉冲照射蛋白质后被完全阻断。

[0058] 在本文中描述的光活化稳定阶跃函数视蛋白的一些方面，细胞可以是动物细胞。在一些实施方案中，动物细胞可以是神经元细胞、心脏细胞或干细胞。在一些实施方案中，动物细胞可以是神经元细胞。在其它实施方案中，动物细胞包含当去极化时影响社会行为的神经元。在一些实施方案中，神经元细胞是当去极化时改变先天社会行为和/或条件性行为的神经元。在其它实施方案中，动物细胞包含当去极化时引发自闭症和/或精神分裂症的社会和认知缺陷的神经元。在其它实施方案中，神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质的兴奋性神经元。在其它实施方案中，兴奋性神经元可以是锥体神经元。在一些实施方案中，神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的抑制性神经元。在其它实施方案

中,抑制性神经元可以是小白蛋白神经元。在一些实施方案中,抑制性和兴奋性神经元可存在于活的非人动物中。

[0059] 在光活化稳定阶跃函数视蛋白的其它方面,细胞可以是来自非人动物的活的脑切片中的神经元。在一些实施方案中,脑切片是冠状脑切片。在一些实施方案中,脑切片来自非人动物的前额叶皮质。在其它实施方案中,脑切片包含当去极化时影响社会行为的神经元。在一些实施方案中,脑切片包含当去极化时改变先天社会行为和/或条件性行为的神经元。在其它实施方案中,脑切片包含当去极化时引发自闭症和/或精神分裂症的社会和认知缺陷的神经元。

[0060] 在一些方面,本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白可通过添加一个或多个增强至哺乳动物细胞质膜的运输的氨基酸序列基序来进行改变。光活化视蛋白来源于进化上更简单的生物,从而可能不被哺乳动物细胞表达或耐受,或可显示当以高水平在哺乳动物细胞中表达时受损的亚细胞定位。因此,在一些实施方案中,可将本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白融合至一个或多个选自可信号肽、内质网(ER)输出信号、膜运输信号和N末端高尔基输出信号的氨基酸序列基序。可将一个或多个增强光活化稳定阶跃函数视蛋白至哺乳动物细胞质膜的运输的氨基酸序列基序融合至光活化蛋白质的N末端、C末端或两端。任选地,光活化蛋白和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,稳定阶跃函数视蛋白可通过添加增强蛋白质至细胞质膜的运输的运输信号(ts)来进行改变。在一些实施方案中,运输信号来源于人内向整流型钾离子通道(inward rectifier potassium channel) Kir 2.1 的氨基酸序列。在一些实施方案中,运输信号包含氨基酸序列 KSRITSEGEYIPLDQIDINV。在其它实施方案中,光活化稳定阶跃函数视蛋白可通过添加信号肽(例如,增强至质膜的运输)来进行改变。可将信号肽融合至核心氨基酸序列的C末端或融合至核心氨基酸序列的N末端。在一些实施方案中,利用接头将信号肽连接至核心氨基酸序列。接头在长度上可包含5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400或500个氨基酸的任一个。在一些实施方案中,信号肽包含氨基酸序列 MDYGGALSAVGRELLFVTNPVVVNGSVLVPEDQCYCAGWIESRGTNG。在其它实施方案中,通过添加内质网(ER)输出信号改变光活化稳定阶跃函数视蛋白。可将ER输出信号融合至核心氨基酸序列的C末端或将其融合至核心氨基酸序列的N末端。在一些实施方案中,通过接头将ER输出信号连接至核心氨基酸序列。接头可在长度上包含5、10、20、30、40、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400或500个氨基酸的任何一个。在一些实施方案中,ER输出信号包含氨基酸序列 FXYENE,其中X可以是任意氨基酸。在一些实施方案中,ER输出信号包含氨基酸序列 VXXSL,其中X可以是任意氨基酸。在一些实施方案中,ER输出信号包含氨基酸序列 FCYENEV。

[0061] 动物细胞、非人动物和脑切片

[0062] 本文中提供了包含本文中光活化嵌合蛋白的细胞。在一些实施方案中,细胞是动物细胞。在一些实施方案中,动物细胞包含对应于SEQ ID NO:1的蛋白质。在其它实施方案中,动物细胞包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白。在一个实施方案,动物细胞可以是神经元细胞。在一些实施方案中,动物细胞来自非人动物的前额叶皮质。在其它实施方案中,动物细胞包含当去极化时影响社会行为的神经元。在一些实施方案中,神经元细胞是当去极化时改变先天性社会行为和/或条件性行为的神经元。在其它实施方案中,动物细胞包含

当去极化时引发自闭症和/或精神分裂症的社会和认知缺陷的神经元。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质中的兴奋性神经元。在其它实施方案中,兴奋性神经元可以是锥体神经元。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质的抑制性神经元。在其它实施方案中,抑制性神经元可以是小白蛋白神经元。

[0063] 本文中还提供包含本文中公开的蛋白质的非人动物。在一些实施方案中,非人动物包含对应于SEQ ID NO:1的蛋白质。在一些实施方案中,动物包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白。在一些实施方案中,包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的动物转基因地表达所述稳定阶跃函数视蛋白。在其它实施方案中,包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的动物已用具有稳定阶跃函数视蛋白的载体例如但不限于腺病毒载体病毒性转染。在一些实施方案中,当通过用光活化来使稳定阶跃函数视蛋白去极化时,包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的动物显示行为的改变。在其它实施方案中,当通过用光活化来使所述稳定阶跃函数视蛋白去极化时,包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的动物显示先天性和学习获得的社会行为的改变。在其它实施方案中,当通过用光活化来使稳定阶跃函数视蛋白去极化时,包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的动物显示条件性行为的改变。

[0064] 本文中提供了来自包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的非人动物的活的脑切片。在一些实施方案中,脑切片来自转基因表达本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的非人动物。在其它实施方案中,脑切片来自已被具有所述稳定阶跃函数视蛋白的载体例如但不限于腺病毒载体病毒性转染的非人动物。在一些实施方案中,脑切片是冠状脑切片。在一些实施方案中,脑切片来自非人动物的前额叶皮质。在其它实施方案中,脑切片包含当去极化时影响社会行为的神经元。在一些实施方案中,脑切片包含当去极化时改变先天性社会行为和/或条件性行为的神经元。在其它实施方案中,脑切片包含当去极化时引发自闭症和/或精神分裂症的社会和认知缺陷的神经元。在一些实施方案中,脑切片是约100 μ m、约150 μ m、约200 μ m、约250 μ m、约300 μ m、约350 μ m、约400 μ m、约450 μ m或约500 μ m厚(包括所述厚度在内,包括这些数值之间的任何厚度)的任何厚度。

[0065] 多核苷酸、启动子和载体

[0066] 本文中提供了编码具有阶跃函数视蛋白的至少一种活性的稳定阶跃函数视蛋白的分离的多核苷酸。本公开提供了分离的、合成的或重组的多核苷酸,其包含在至少约10,例如至少约15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000个核苷酸的范围内与SEQ ID NO:2的核酸具有至少约70%,例如至少约71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或完全(100%)序列同一性的核酸序列。

[0067] 本公开特别地提供了包含编码稳定阶跃函数视蛋白和/或其突变变体的核酸序列的多核苷酸。例如,本公开提供了分离的多核苷酸分子,其中多核苷酸分子编码包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列的蛋白质。本公开还提供了分离的多核苷酸分子,其中多核苷酸分子编码包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列的蛋白。本公开还提供了分离的多核苷酸分子,其中所述多核苷酸分子编码包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列的蛋白质。本公开另外提供了分离的多核苷酸分子,其中多核苷酸分子编码蛋白质,所述蛋白质包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0068] 本公开还提供了包含上述核酸的表达盒和/或载体。适当地,编码本公开的稳定阶跃函数视蛋白的核酸有效地连接至启动子。启动子在领域是公知的。在宿主细胞中起作用的任何启动子可用于表达本公开的SSF0和/或其任何变体。对于在特定动物细胞中驱动SSF0蛋白或其变体的表达是有用的起始控制区或启动子是极其多的并且对于本领域技术人员来说熟悉的。实际上可使用能够驱动此类核酸的任意启动子。

[0069] 具体地,当期望在兴奋性神经细胞中重组表达SSF0蛋白例如本文中描述的蛋白质时,可使用人钙调素依赖性蛋白激酶II α (CaMKII α)启动子。在其它实施方案中,可将与Cre诱导重组AAV载体结合的延伸因子1a(EF-1a)启动子用于小白蛋白-Cre转基因小鼠以将SSF0蛋白靶向表达至抑制性神经元。

[0070] 本文中还提供了包含本文中公开的编码稳定阶跃函数视蛋白或其任何变体的多核苷酸的载体。可根据本发明施用的载体还包括包含编码RNA(例如,mRNA)的多核苷酸的载体,所述RNA,当从载体的多核苷酸转录时,将导致光活化稳定阶跃函数视蛋白在靶动物细胞的质膜上积累。可使用的载体包括但不限于慢病毒、HSV、腺病毒和腺伴随病毒(AAV)载体。慢病毒包括但不限于HIV-1、HIV-2、SIV、FIV和EIAV。慢病毒还可利用其它病毒(包括但不限于VSV、狂犬病病毒、Mo-MLV、杆状病毒和埃博拉病毒)的包膜蛋白进行假型化。此类载体可使用本领域的标准方法来制备。

[0071] 在一些实施方案中,载体是重组AAV载体。AAV载体是具有相对小的大小的DNA病毒,其可以以稳定和位点特异性方式整合进入它们感染的细胞的基因组。它们能够感染广谱的细胞而不诱导对细胞生长、形态学或分化的任何作用,并且它们似乎不牵涉人病理学。AAV基因组已被克隆、测序和表征。其包含约4700个碱基并且在每一个末端包含约145个碱基的反向末端重复(ITR)区域,该区域用作病毒的复制起始点。基因组的其余部分被分成具有壳体化功能的两个必需区域:基因组的左手部分,其包含参与病毒复制和病毒基因的表达的rep基因;和基因组的右手部分,其包含编码病毒的衣壳蛋白的cap基因。

[0072] 可使用本领域的标准方法制备AAV载体。任何血清型的腺伴随病毒是合适的(参见,例如,Blacklow,"Parvoviruses and Human Disease"的第165-174页,J.R.Pattison,编著(1988);Rose,Comprehensive Virology3:1,1974;P.Tattersall"The Evolution of Parvovirus Taxonomy" in Parvoviruses(JR Kerr,SF Cotmore.ME Bloom,RM Linden,CR Parrish,编著)第5-14页,Hudder Arnold,London,UK(2006);和DE Bowles,JE Rabinowitz,RJ Samulski"The Genus Dependovirus"(JR Kerr,SF Cotmore.ME Bloom,RM Linden,CR Parrish,Eds.),第15-23页,Hudder Arnold,London,UK(2006),所述文献的公开内容通过引用整体并入本文)。用于纯化载体的方法可见于例如美国专利No.6566118、6989264和6995006以及标题为"Methods for Generating High Titer Helper-free Preparation of Recombinant AAV Vectors"的国际专利申请公布No.:WO/1999/011764,所述专利和专利申请公布的公开内容通过引用整体并入本文)。杂合载体的制备描述于例如PCT申请No.PCT/US2005/027091(其公开内容通过引用整体并入本文)中。已描述了来源

于AAV的载体用于体外和体内转移基因的用途(参见例如,国际专利申请公布No:W091/18088和W093/09239;美国专利No:4,797,368、6,596,535和5,139,941;和欧洲专利No:0488528,所述专利全部通过引用整体并入本文)。这些出版物描述了其中rep和/或cap基因缺失和被目标基因替代的各种AAV衍生的构建体,以及此类构建体用于体外(进入培养的细胞)或体内(直接进入生物体)转移目标基因的用途。根据本发明的复制缺陷型重组AAV可通过将包含侧翼连接两个AAV反向末端重复(ITR)区域的目标核酸序列的质粒和具有AAV衣壳化基因(rep和cap基因)的质粒共转染入利用人辅助病毒(例如腺病毒)转染的细胞系来制备。随后利用标准技术纯化产生的AAV重组体。

[0073] 在一些实施方案中,将用于本发明白的方法的载体用壳体包裹进入病毒颗粒(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)。因此,本发明包括包含本文中描述的载体的任何载体的重组病毒载体(重组的,因为其包含重组多核苷酸)。产生此类颗粒的方法在本领域是已知的并且描述于美国专利No.6,596,535。

[0074] 对于本文中描述的动物细胞,应理解可将一个或多个载体施用至神经元细胞、心脏细胞或干细胞。如果使用超过一个载体,应理解可同时或在不同的时间将它们施用给动物细胞。

[0075] 本发明的方法

[0076] 本文中提供了用于通过在存在于微回路中的兴奋性或抑制性神经元中表达本文中描述的光活化稳定阶跃函数视蛋白来使所述神经元去极化的方法。在一些方面,提供了通过利用光活化蛋白质来使用本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的方法。本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白可在兴奋性神经元或在抑制性神经元中表达。在其它实施方案中,使用本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的方法可用于活的非人动物或用于非人动物的活的脑切片。在其它方面,提供了用于鉴定抑制非人动物的前额叶皮质中的兴奋性神经元的去极化的化合物的方法。在其它方面,提供了用于鉴定恢复非人动物的先天性社会行为和/或交往的化合物的方法。

[0077] 使用SSF0蛋白的方法

[0078] 本文中提供了使用本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的方法,包括用具有第一波长的光活化蛋白质。在一些实施方案中,蛋白质可用具有第一波长的光(其可以是蓝光)活化。在其它实施方案中,所述具有第一波长的光可以为约445nm。

[0079] 在使用本文中公开的组合物的方法的另一个方面,可用具有第二波长的光使本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白去活化。在一些实施方案中,所述具有第二波长的光可以是绿光或黄光。在其它实施方案中,所述具有第二波长的光可以为约590nm。在其它实施方案中,所述具有第二波长的光可以为约390-400nm,包括所述波长在内以及该范围内的每一个数值。

[0080] 在本文中提供的方法的一些方面,可利用光脉冲活化稳定阶跃函数视蛋白,所述光脉冲可具有约1毫秒(ms)、约2ms、约3ms、约4ms、约5ms、约6ms、约7ms、约8ms、约9ms、约10ms、约15ms、约20ms、约25ms、约30ms、约35ms、约40ms、约45ms、约50ms、约60ms、约70ms、约80ms、约90ms、约100ms、约200ms、约300ms、约400ms、约500ms、约600ms、约700ms、约800ms、约900ms、约1秒、约1.25秒、约1.5秒或约2秒(包括所述时间在内,包括这些数值之间的任何

时间)的任一个的持续时间。在本文中提供的方法的一些实施方案中,稳定阶跃函数视蛋白可利用光脉冲来活化,所述光脉冲可具有约 $1\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $2\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $3\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $4\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $5\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $6\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $7\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $8\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $9\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $10\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $11\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $12\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $13\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $14\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $15\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $16\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $17\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $18\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $19\mu\text{W mm}^{-2}$ 或约 $20\mu\text{W mm}^{-2}$ (包括所述光功率密度在内,包括这些数值之间的任何值)的任一个的光功率密度。在其它实施方案中,光活化稳定阶跃函数视蛋白可被光脉冲活化,所述光脉冲可具有约 1mW mm^{-2} 、约 2mW mm^{-2} 、约 3mW mm^{-2} 、约 4mW mm^{-2} 、约 5mW mm^{-2} 、约 6mW mm^{-2} 、约 7mW mm^{-2} 、约 8mW mm^{-2} 、约 9mW mm^{-2} 、约 10mW mm^{-2} 、约 11mW mm^{-2} 、约 12mW mm^{-2} 、约 13mW mm^{-2} 、约 14mW mm^{-2} 、约 15mW mm^{-2} 、约 16mW mm^{-2} 、约 17mW mm^{-2} 、约 18mW mm^{-2} 、约 19mW mm^{-2} 、约 20mW mm^{-2} 、约 21mW mm^{-2} 、约 22mW mm^{-2} 、约 23mW mm^{-2} 、约 24mW mm^{-2} 或约 25mW mm^{-2} (包括所述光功率密度在内,包括这些数值之间的任何值)的任一个的光功率密度。

[0081] 在一些实施方案中,本文中描述的方法的光活化稳定阶跃函数视蛋白可维持恒定的光电流约10分钟或更长。在其它实施方案中,本文中描述的光活化稳定阶跃函数视蛋白可维持恒定的光电流约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30分钟(包括所述时间在内,包括这些数值之间的任何时间)。在其它实施方案中,本文中描述的方法包括在用具有第一波长的光的单脉冲照射蛋白质后,完全阻断本文中描述的光活化稳定阶跃函数视蛋白的任一种的光循环进展。

[0082] 在本文中描述的方法的一些方面,动物细胞可以是神经元细胞、心脏细胞或干细胞。在一些实施方案中,动物细胞可以是神经元细胞。在其它实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质的兴奋性神经元。在其它实施方案中,兴奋性神经元可以是锥体神经元。在其它实施方案中,动物细胞包含当去极化时影响社会行为的神经元。在一些实施方案中,神经元细胞是当去极化时改变先天社会行为和/或条件性行为的神经元。在其它实施方案中,动物细胞包含当去极化时引发自闭症和/或精神分裂症的社会和认知缺陷的神经元。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质的抑制性神经元。在其它实施方案中,抑制性神经元可以是小白蛋白神经元。在一些实施方案中,抑制性和兴奋性神经元可存在于活的非人动物中。在其它实施方案中,抑制性和兴奋性神经元可以是非人动物的脑切片。

[0083] 用于鉴定抑制前额叶皮质中的兴奋性或抑制性神经元的去极化的化合物的方法

[0084] 本文中提供了用于鉴定抑制非人动物的前额叶皮质中的兴奋性或抑制性神经元的去极化的化合物的方法,所述方法包括:(a)使非人动物的前额叶皮质或来自非人动物的活组织切片中的兴奋性或抑制性神经元去极化,所述非人动物包含在细胞膜上表达的光活化蛋白质阳离子通道,当用光照射细胞时其能够介导细胞的去极化电流,其中蛋白质显示响应具有第一波长的光的单脉冲的快速阶梯状活化和响应具有第二波长的光的脉冲的去活化;其中细胞中的去极化电流维持达约20分钟;并且其中蛋白质包含在对应于ChR2氨基酸序列的C128和D156的氨基酸残基处具有氨基酸置换的ChR2、ChR1、VChR1或VChR2氨基酸序列;(b)测量响应选择性地使包含光活化蛋白质的兴奋性或抑制性神经元去极化的兴奋性突触后电位(EPSP)或抑制性突触后电流(IPSC);(c)将兴奋性神经元与化合物接触;和(d)测量兴奋性突触后电位(EPSP)或抑制性突触后电流(IPSC)以确定将兴奋性神经元与化合物接触是否抑制神经元的去极化。在一些实施方案中,蛋白质可用具有第一波长的光活

化,所述光可以是蓝光。在其它实施方案中,所述具有第一波长的光可以为约445nm。在其它实施方案中,所述具有第二波长的光可以是绿光或黄光。在其它实施方案中,所述具有第二波的光可以为约590nm。在其它实施方案中,所述具有第二波长的光可以为约390-400nm,包括所述波长在内,以及在该范围内的任何数值。在一些实施方案中,化合物可以是组合化学药品文库的成员。

[0085] 在本文中提供的方法的一些方面,光活化稳定阶跃函数视蛋白可用光脉冲活化,所述光脉冲可具有1毫秒(ms)、约2ms、约3ms、约4ms、约5ms、约6ms、约7ms、约8ms、约9ms、约10ms、约15ms、约20ms、约25ms、约30ms、约35ms、约40ms、约45ms、约50ms、约60ms、约70ms、约80ms、约90ms、约100ms、约200ms、约300ms、约400ms、约500ms、约600ms、约700ms、约800ms、约900ms、约1秒、约1.25秒、约1.5秒或约2秒(包括所述时间在内,包括这些数值之间的任何时间)的任一个的持续时间。在本文中提供的方法的一些实施方案中,光活化稳定阶跃函数视蛋白可利用光脉冲来活化,所述光脉冲可具有约 $1\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $2\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $3\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $4\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $5\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $6\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $7\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $8\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $9\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $10\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $11\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $12\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $13\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $14\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $15\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $16\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $17\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $18\mu\text{W mm}^{-2}$ 、约 $19\mu\text{W mm}^{-2}$ 或约 $20\mu\text{W mm}^{-2}$ (包括所述光功率密度在内,包括这些数值之间的值)的任一个的光功率密度。在其它实施方案中,光活化稳定阶跃函数视蛋白可被光脉冲活化,所述光脉冲可具有约 1mW mm^{-2} 、约 2mW mm^{-2} 、约 3mW mm^{-2} 、约 4mW mm^{-2} 、约 5mW mm^{-2} 、约 6mW mm^{-2} 、约 7mW mm^{-2} 、约 8mW mm^{-2} 、约 9mW mm^{-2} 、约 10mW mm^{-2} 、约 11mW mm^{-2} 、约 12mW mm^{-2} 、约 13mW mm^{-2} 、约 14mW mm^{-2} 、约 15mW mm^{-2} 、约 16mW mm^{-2} 、约 17mW mm^{-2} 、约 18mW mm^{-2} 、约 19mW mm^{-2} 、约 20mW mm^{-2} 、约 21mW mm^{-2} 、约 22mW mm^{-2} 、约 23mW mm^{-2} 、约 24mW mm^{-2} 或约 25mW mm^{-2} (包括所述光功率密度在内,包括这些数值之间的任何值)的任一个的光功率密度。

[0086] 在本文中描述的方法的一些方面,动物细胞可以是神经元细胞、心脏细胞或干细胞。在一些实施方案中,动物细胞可以是神经元细胞。在其它实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质的兴奋性神经元。在其它实施方案中,兴奋性神经元可以是锥体神经元。在一些实施方案中,神经元细胞可以是位于非人动物的前额叶皮质的抑制性神经元。在其它实施方案中,抑制性神经元可以是小白蛋白神经元。在一些实施方案中,抑制性和兴奋性神经元可以存在于活的非人动物中。在其它实施方案中,抑制性和兴奋性神经元可存在于非人动物的脑切片中。在其它实施方案中,脑切片包含当去极化时影响社会行为的神经元。在一些实施方案中,神经元细胞是当去极化时改变先天社会行为和/或条件性行为的神经元。

[0087] 在其它实施方案中,脑切片包含当去极化时引发自闭症和/或精神分裂症的社会和认知缺陷的神经元。

[0088] 用于鉴定恢复非人动物的先天性社会行为和/或交往的化合物的方法

[0089] 本文中提供了用于鉴定恢复非人动物的一种或多种社会行为、交往和/或条件性行为的化合物的方法,方法包括:(a)使非人动物的前额叶皮质中的兴奋性神经元去极化,所述非人动物包含在细胞膜上表达的光活化蛋白质阳离子通道,当用光照射细胞时其能够介导细胞的去极化电流,其中蛋白质显示响应具有第一波长的光的单脉冲的快速阶梯状活化和响应具有第二波长的光的脉冲的去活化;其中细胞中的去极化电流维持达约20分钟;并且其中蛋白质包含在对应于ChR2氨基酸序列的C128和D156的氨基酸残基处具有氨基酸

置换的ChR2、ChR1、VChR1或VChR2氨基酸序列,其中使兴奋性神经元去极化抑制非人动物的一种或多种社会行为、交往和/或条件性行为;(b)给非人动物施用化合物;和(c)确定给非人动物施用化合物是否恢复非人动物的所述一种或多种社会行为、交往和/或条件性行为。在一些方面,社会行为是先天性社会行为并且选自:相互理毛、留居者-入侵者攻击(resident-intruder aggression)、隔离诱导的打斗、性行为、亲职行为(parental behavior)、社会认同(social recognition)和听觉交往(auditory communication)。关于小鼠和其它实验先天性行为测试的信息可见于Crawley, Social Behavior Tests for Mice, 行为神经科学实验室(Laboratory of Behavioral Neuroscience), 国立精神卫生研究所(National Institute of Mental Health), (Bethesda, MD; 2007), 将其公开内容通过引用整体并入本文。在其它实施方案中,行为是条件性行为,例如但不限于条件性恐惧反应(conditioned fear response)。在一些实施方案中,非人动物在步骤(b)至(c)的过程中不受任何硬件限制。在一些实施方案中,硬件是连接至光缆的光源。在其它实施方案中,在稳定阶跃函数视蛋白响应具有第一波长的光的所述单脉冲而被活化后,立即将非人动物与硬件分开。在一些实施方案中,动物细胞位于生物组织的表面上。在一些实施方案中,组织是神经组织或脑组织。在一些实施方案中,化合物可以是组合化学药品文库的成员。

[0090] 在一些实施方案中,本文中描述的方法的非人动物包含对应于SEQ ID NO:1的蛋白质。在其它实施方案中,动物包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白。在一些实施方案中,包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的动物转基因地表达所述稳定阶跃函数视蛋白。在其它实施方案中,包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的动物已被具有稳定阶跃函数视蛋白的载体包括但不限于腺病毒载体或腺伴随病毒载体病毒性转染。在一些实施方案中,当通过用光活化来使所述稳定阶跃函数视蛋白去极化时,包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的动物显示行为的改变。在其它实施方案中,当通过用光活化来使所述稳定阶跃函数视蛋白去极化时,包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的动物显示先天性和学习获得的社会行为的改变。在其它实施方案中,当通过用光活化来使所述稳定阶跃函数视蛋白去极化时,包含本文中描述的稳定阶跃函数视蛋白的动物显示条件性行为的改变。

[0091] 示例性实施方案

[0092] 据信本公开可用于对神经系统障碍进行光控制。本发明的具体应用涉及使对神经回路的时间、空间和/或细胞类型控制与可测量指标发生关系的光遗传学系统或方法。由于本文所公开的示例性实施方案的许多方面涉及并广泛依赖于本领域之前的发展,因此以下论述对此类之前的发展进行了概述,以提供对可从中引出实施方式详情和修改(包括见于Yizhar等, Nature, 2011, 477(7363):171-8(将其本公开通过引用整体并入本文)中的教导)的基础和潜在教导内容的切实理解。以下论述均在此背景下提供,而参考文献中的教导内容以引用方式并入本文中。虽然本发明不一定限于此类应用,但是通过对使用此背景的各种实例的论述可认识到本发明的各个方面。

[0093] 本公开的各种实施方案涉及使对神经回路的时间、空间和/或细胞类型控制与可测量指标发生关系的光遗传学系统或方法。例如,各种指标或症状可能与显示社会功能障碍的各种症状的神经障碍相关。光遗传学系统靶向受试者/患者内的神经回路以选择性控制其。光遗传学系统包括监测受试者/患者的与神经障碍相关的指标或症状。这样,光遗传学系统就可提供关于神经回路、其功能和/或神经障碍的详细信息。

[0094] 图12描述了与本公开的各种实施方案一致的疾病模型的测试的流程图。在102, 鉴定或选择一个或多个疾病模型。疾病模型可用于一种或多种中枢神经系统(CNS)障碍。模型可包括各种障碍、疾病或甚至患者的一般性格(例如, 情绪、记忆、运动或社会行为)。在104, 鉴定一个或多个CNS靶。如本文中所示, CNS靶包括待作为评估、测试或另外地涉及疾病模型的部分提供的刺激的性质。靶的非限定性实例可以是空间靶(spatial target)、细胞类型靶、时间靶及其组合。

[0095] 随后可将靶106-118的性质用于从光遗传学工具箱120选择特定的视蛋白。光遗传学工具箱120包括多种不同的视蛋白, 可将所述视蛋白与性质106-118的一种或多种进行比对。本文中论述了视蛋白的各种非限定性实例。选择的视蛋白122可以是与CNS靶和/或刺激性性质最密切匹配的那些视蛋白。例如, 期望的靶可以是大脑的一部分在较长的一段时间内的兴奋/抑制(E/I)平衡的改变。如本文中所述, 可选择视蛋白C1V1(在本文中更详述地论述的)及其变体。在下文中, 选择的视蛋白在靶CNS位置/细胞类型124中表达。随后测试疾病模块126, 例如通过表达的视蛋白的光学刺激。

[0096] 本公开的实施方案涉及大脑的新皮层内的细胞兴奋/抑制(E/I)平衡的控制。这样的E/I平衡控制对于与兴奋的提高关联的社会和认知缺陷(例如, 自闭症和精神分裂症)的建模和/或治疗是特别有用的。

[0097] 本公开的实施方案涉及视蛋白用于提供通过特异性空间和时间控制来诱导提高的细胞E/I平衡的机制的用途。这可包括光敏视蛋白在与一种或多种严重的神经精神性疾病关联的兴奋性神经元中的表达。

[0098] 各种实施方案涉及用于在自由运动的哺乳动物中控制E/I平衡的工具和方法, 所述工具和方法对于探究潜在的回路生理学机制可以是特别有用的。本公开的特定方面涉及通过选择性空间控制相对于抑制性神经元的兴奋性增加兴奋性神经元的兴奋性。这对于增加兴奋性神经元对原来备有的刺激的易感性, 从而保留天然触发模式(firing pattern)可以是特别有用的。在一些实现中, 该兴奋是可逆的。

[0099] 某些实施方案涉及作为光可控制的离子通道的用途。当在神经元中表达时, 离子通道被设计来增加神经元对原来备有的刺激的易感性, 以长时间维持增加的易感性。本公开的实施方案涉及SSFO(稳定阶跃函数视蛋白)及其用于复杂行为测试的用途, 所述SSFO的稳定性足以在单次闪光后产生持续许多分钟的恒定光电流。在具体的实现中, 增加的易感性可在施加光刺激后维持许多分钟。

[0100] 各种实施方案涉及治疗、建模和其它方面, 所述其它方面涉及发现: 可从E/I平衡的靶向提高诱导自由移动的小鼠的特定社会关系和认知行为的损害。

[0101] 其它实施方案涉及治疗、建模和其它方面, 所述其它方面涉及发现: 当将相同的兴奋性有利方面选择性提供给抑制性神经时, 无论对局部回路活性的影响有多深, 未看到这样的行为影响。

[0102] 本公开的其它实施方案涉及治疗、建模和其它方面, 所述其它方面涉及发现: 行为上显著的E/I平衡干预的主要回路级影响是基线 γ 频段(约40-60Hz)回返性突触兴奋(recurrent synaptic excitation)的特异性提高, 与在自闭症和精神分裂症中基线上看到的提高的 γ 节律类似, 伴随着微回路信息传输的定量妨碍。

[0103] 本公开的实施方案涉及视蛋白用于驱动E/I的提高和监测皮质切片中的 γ 振荡的

用途。特定的实施方案涉及C1V1(本文中更详述论述的)及其变体的用途,其因1)使得能够进行剂量-反应试验的高效能;2)允许E/I平衡的阶梯状改变的低脱敏作用和3)允许分别驱动相同制剂中的不同群体的红移激发,而对于驱动E/I的提高和监测皮质切片的 γ 振荡可以是特别有用的。

[0104] 本公开的实施方案涉及对提高的(或降低的)细胞E/I平衡的控制。这对于与神经障碍例如自闭症和精神分裂症的药物无反应(medication-unresponsive)社会和认识障碍的研究、测试和治疗是特别有用的。特定的方面涉及研究和区分对回路的发育和成熟的长期效应与关于牵涉的神经元回路功能的E/I异常的瞬即效应。其它方面涉及作为在各种疾病模型和患者(人或另外的动物)中观察到的认知缺陷的核心组分的提高的细胞E/I平衡的确认。特定实施方案提供了足以检验哺乳动物脑(例如,前额叶皮质)中的提高的细胞E/I平衡和鉴定的回路-生理表现的时机和特异性。

[0105] 特定方面涉及双突变SSF0(在本文中更详细论述的)的用途,其对于提供稳定的回路调制进行足以进行瞬时精度和复杂行为实验的时间是特别有用的。例如,调制和行为实验回路调制可在进行光活化、外部纤维光学附件和/或光学硬脑穿透(例如,使用完全在脑外的光递送设备)不存在的情况下持续数分钟。具体实现使用光子集成(photon integration)的性质,所述光子集成可有助于以低光强度(例如,以低的 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$)活化细胞。该活化可以以相对深的光至脑组织内的穿透(例如,相对于光于3mm或更多)发生。兴奋性(但非抑制性)神经元的SSF0活化可用于产生深重的可逆的社会和认知功能障碍。在某些实施方案中,可产生具有小的(如果有的话)运动异常或改变的恐惧/焦虑行为的障碍。

[0106] 本公开的实施方案还涉及SSF0用于体外探测回路性质的变化的用途。例如,可将SSF0用于评估细胞E/I平衡和测量锥体神经元的转移功能。实验结果表明这样的提高以低兴奋性突触后电流(EPSC)率饱和了锥体神经元的转移功能,妨碍了皮质回路内的信息传输,与E/I平衡的降低的结果相反。

[0107] 这些和其它方面对于解决药物无反应的障碍如自闭症中的症状和治疗挑战是特别有用的,例如相对于E/I平衡的提高和其中脑出现超兴奋并且其处理信息的能力受损的情形。

[0108] 与实验性实施方案一致,比较表达C1V1-E162T(在下文中更详细地描述的)与不表达C1V1-E162T的锥体细胞(PYR细胞)的光引起的活性。表达C1V1-E162T的PYR细胞出现响应2ms561nm的光脉冲的尖峰,虽然相同的刺激范例可靠地在相同切片内的非表达细胞中引起兴奋性突触后电位(EPSP)。

[0109] 本公开的特定实施方案涉及SSF0基因产物相对于另一个神经元群(neural population)选择性地偏爱一个神经元群的用途。靶向群体的选择性偏爱可被构造来防止SSF0淹没固有至靶向群的兴奋输入。这样,靶向群体将不被由视蛋白直接引起的协同尖峰驱动。相反,靶向群体可显示增加对可以是零星和不同步的自然输出(native input)的敏感性。

[0110] 本公开的实施方案涉及SF0解决各种硬件挑战的用途。例如,光敏感性的显著增加(例如,数量级增更大)可有利于备用光递送机制和无硬件行为测试的使用。

[0111] 本公开的某些实施方案的方面涉及光门控通道的特定部分的鉴定和改变。此类改变包括鉴定鉴定通道的关键部分。可使用通道的三级结构的高分辨率成像来鉴定通道。或

者,可使用类似通道的结构的知识。下列描述提供了特定实验实现和方法的详细内容。本公开不限于任何一个实现并且与本文中的教导一致可用于在不同位置进行许多不同的分子修饰。

[0112] 本公开的特定方面涉及适合用于神经科学的微生物视蛋白基因(例如,视紫红质通道蛋白(ChR2)、团藻视紫红质通道蛋白(VChR1)和氯视紫红质蛋白(NpHR)),其允许将光脉冲序列转导成未受损的哺乳动物脑内的特定细胞类型的毫秒-时程的膜电位变化。ChR2是来源于单细胞绿藻的视紫质莱茵衣藻。如本文中所用,术语“视紫红质蛋白”是包含至少两个构件块视蛋白和共价结合的辅因子(通常视网膜的(视黄醛))的蛋白质。视紫红质蛋白ChR2来源于衣藻基因组中的视蛋白通道视蛋白-2(Chop2),原名Chlamyopsin-4(Cop4)。一个使视紫红质通道蛋白ChR2去极化的时间性质包括活化和去活化的快速动力学,从而提供了精确同步的动作电位序列的产生。对于寻求长时间量活化的应用,已发现视紫红质通道蛋白的通常快速的关动力学(off-kinetic)可被减慢。例如,视紫红质通道蛋白的某些实现应用 $1\text{mW}/\text{mm}^2$ 的光,进行实际上其中期望去极化的整个时间,这可能是不合乎要求的。

[0113] 本文中的大部分论述涉及ChR2。除非另外指明,否则本公开包括许多相似的变体。实例包括但不限于Chop2、ChR2-310、Chop2-310和团藻视紫红质通道蛋白(VChR1)。关于VChR1的更详细内容,参考“Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*,”*Nat Neurosci.*, June 2008, 11(6):631-3. 2008年4月23日电子出版,其通过引用整体并入本文。在其它实现中,可对其它视蛋白分子进行类似的改变。例如,可对ChR2或VChR1变体进行改变/突变。此外,可将改变的变体与光活化离子泵组合使用。

[0114] 本公开的实施方案包括天然存在的序列的相对少的氨基酸变体。在一种情况下,变体与天然存在的序列的蛋白质序列具有大于约75%的同源性。在其它变体中,同源性大于约80%。其它变体也具有大于约85%、大于90%或甚至高至约93%至约95%或约98%的同源性。该上下文中的同源性意指序列相似性或同一性,同一性是优选的。该同源性可使用序列分析中已知的标准技术来测定。本公开的实施方案的组合物包括本文中提供的蛋白质和核酸序列,包括与提供的序列具有超过约50%的同源性,与提供的序列具有超过约55%的同源性,与提供的序列具有超过约60%的同源性,与提供的序列具有超过约65%的同源性,与提供的序列具有超过约70%的同源性,与提供的序列具有超过约75%的同源性,与提供的序列具有超过约80%的同源性,与提供的序列具有超过约85%的同源性,与提供的序列具有超过约90%的同源性或与提供的序列具有超过约95%的同源性的变体。

[0115] 如本文中所用,靶细胞的刺激通常用于描述细胞性质的改变。例如,靶细胞的刺激可导致细胞膜的性质的改变,这可导致靶细胞的去极化或极化。在特定情况下,靶细胞是神经元并且刺激通过促进或抑制神经元产生冲动(动作电位)来影响冲动传播。

[0116] 关于光应答性视蛋白的更详细内容,可参考授予Deisseroth等的标题为“Optically-Based Stimulation of Target Cells and Modifications Thereto”的PCT公布No. W02010/056970,其通过引用整体并入本文。

[0117] 本公开的实施方案涉及靶向群体的兴奋性的双稳态改变的实施方式。这包括但不限于双突变体ChR2-C128S/D156A。已发现该双突变体ChR2-C128S/D156A在培养的海马神经元中可被良好耐受,并且保留必需的SFO性质:利用蓝光的单次短暂脉冲产生的快速阶

梯状活化和利用绿光或黄光产生的去活化。具体地,ChR2-C128S/D156A的活化谱(activation spectrum)在445nm处达到峰值。第二去活化峰见于390-400nm,相较于590nm去活化峰更快但不太完全的去活化。发现表达ChR2-C128S/D156A的细胞中的峰值光电流是强劲的,并且可与ChR2-D156A的峰电流相比较(分别地 $231.08 \pm 31.19 \text{ s.e.m}$; $n=9$ 个细胞和 $320.96 \pm 78.26 \text{ s.e.m}$; $n=7$ 个细胞)。其它实施方案涉及VChR1的相似突变。例如,可在C123S/D151A处提供VChR1的突变,以提供具有可与ChR2相比较的慢动力学的红移光电流。

[0118] 随后用100ms的470nm的光的脉冲活化单个转染的和膜片钳制的神经元,以在非常长的记录中确保电流减弱不是由细胞衰减(cell rundown)引起的,以不同的间隔用延长的590nm光脉冲使每一个细胞去活化,以测定在每一个时间点上剩余的SF0电流的量值。令人惊讶地,表达ChR2-C128S/D156A的神经元产生比来自单独地表达任一单个突变体的细胞的光电流更稳定的持续光电流。将单指数衰减曲线与随时间的I去活化/I活化的比率拟合显示了29.3min(对于ChR2-C128S/D156A)的自发衰减时间常数,表明C128和D156突变协同作用以延迟ChR2的开放状态的衰减。

[0119] 与对复杂哺乳动物行为的预期应用所需的改进一致,大部分双突变SF0电流在单次光活化脉冲后仍然存在长达20分钟。基于这些令人惊讶的慢衰减动力学,双突变基因称为SSF0(对于稳定阶跃函数视蛋白)基因。SSF0也被用作活性蛋白制裁的速记。两个残基可能参与ChR2通道的关闭(门控),并且两个突变可能稳定通道的开放状态构象。

[0120] 不受理论束缚,本公开的方面涉及发现:SSF0可在光循环进展中被完全阻断,因此对于光循环工程可代表可能最大稳定性。例如,与ChR2-C128X和ChR2-D156A相反,SSF0光循环似乎不进入可能在该突变体中不能到达的更后的光循环阶段分裂光循环的另外的无活性副产品,这反过来使得SSF0甚至比亲代单突变更易于在体内重复使用。

[0121] 本公开的实施方案涉及SSF0对光的敏感性。例如,具有慢衰减常数的视紫红质通道蛋白有效地用作光子集成器(photon integrator)。这对于更灵敏的侵入性更小(但通过光脉冲长度的调制仍然具有易滴定的对靶神经元群的作用)的进行光遗传学回路调制的方法可以是特别有用的。已发现即使在极其低的光强度(低至 $8 \mu\text{W}/\text{mm}^2$)上,仍可从表达SSF0的神经元获得数百皮安(picoamp)全细胞光电流,该光电流在整个照射时间中响应470nm的光以单指数动力学增加。其它方面涉及激动时间常数的用途,所述激动时间常数在表示幂律关系的重对数图尺上与激动光功率线性相关,并且表明SSF0是纯的集成器,随时间的总的光子暴露为光电流的唯一决定因素。例如,据信无论激动光功率是多少,光电流达到给定的亚最大活化(至T时间)所需的每膜面积光子数目都是恒定的。

[0122] 本公开的示例性实施方案涉及杂合ChR1/VChR1嵌合体的用途,所述嵌合体根本不包含ChR2序列,来源于单独地不能良好表达的两个视蛋白基因,在本文中称为C1V1。本公开的实施方案还涉及通过添加来源于 $\text{Kir}2.1$ 通道的膜运输信号进行的VChR1的膜靶向的改进。来自表达VChR1-EYFP的培养的神经元的共聚焦图像显示相较于ChR2大比例的细胞内蛋白质;因此,将来源 $\text{Kir}2.1$ 通道的膜运输信号用于改善VChR1的膜靶向。该VChR1-ts-EYFP的膜靶向相较于VChR1-EYFP得到少许增强;然而,从表达VChR1-ts-EYFP的培养的海马神经元记录的平均光电流仅比VChR1-EYFP的平均光电流略微更大。

[0123] 因此,本公开的实施方案涉及通过与来自其它ChR的对应螺旋交换螺旋改善的VChR1。例如,已在两个嵌合体(其中螺旋1和2被来自ChR1的同源区段替换)中发现强劲的改

善。发现无论剪接位点在螺旋2与3之间的细胞内环(在ChR1残基Ala145处)还是在螺旋3内(在ChR1残基Trp163处),所得嵌合体都强劲地表达,并且显示相似地增强的光电流和谱性质。该结果是出乎预料的,因为ChR1仅微弱地表达并且极少整合入大多数哺乳动物宿主细胞的膜内。所得的杂合ChR1IVChR1嵌合体在本文中称为C1V1。

[0124] 本公开的方面涉及C1V1在培养的海马神经元中的表达。实验性测试已显示许多令人惊讶和有用的结果,所述结果在下文中进行更详细地论述。相较于VChR1-EYFP,C1V1-EYFP显示令人惊讶的提高了的平均荧光。表达C1V1的神经元中的全细胞光电流远大于VChR1-EYFP和VChR1-ts-EYFP的全细胞光电流,并且离子选择性与ChR2和VChR1的类似。在C1V1与YFP之间添加Kir2.1运输信号进一步使光电流增强额外的41%(C1V1-ts-EYFP平均光电流极大,几乎为野生型(WT)VChR1的10倍)。平均荧光水平与测量的光电流十分匹配(对于VChR1-EYFP、VChR1-ts-EYFP、C1V1-EYFP和C1V1-ts-EYFP,平均荧光分别为 9.3 ± 1 、 19.6 ± 3.4 、 19.8 ± 2.8 和 36.3 ± 3.8),这表明光电流大小的增加主要因哺乳动物神经元的这些通道的提高的表达引起。在不同构建体(VChR1、VChR1-ts-EYFP、C1V1、C1V1-ts-EYFP)中,总的胞体荧光(测量为积分像素密度)与单个记录的/成像的细胞中的光电流大小线性相关。这表明(不受理论束缚)C1V1的增加的光电流由神经元中功能性表达的改变而引起。

[0125] 本公开的各种实施方案涉及具有快速衰减常数的视蛋白。该性质对于提供尖峰的精确控制(例如以最低限度干扰固有电导,触发单个峰每光脉冲和/或在光脉冲序列过程中使平台电位降至最低)可以是特别有用的。实验性结果表明C1V1-ts-EYFP中记录的光引起的光电流以与VChR1的时间常数相似的时间常数衰减。本公开的方面因此涉及生色团区域的改进以提高光循环动力学、减少的去活化和/或可能地进一步的红移吸收。

[0126] 一个实施方案涉及对应的ChETA突变E162T,该实验表明提供了加速的光循环(例如,几乎3倍);可参考Gunaydin等,Ultrafast optogenetic control,Nat Neurosci,2010,将所述文献通过引用整体并入本文。令人惊讶地,该突变经显示将动作光谱蓝移至530nm,然而ChR2或其它微生物视紫质中的类似突变已引起红移。另一个实施方案涉及谷氨酸-122至苏氨酸的突变(C1V1-E122T)。实验性测试显示C1V1-E122T仅被灭活26%(相较于ChR2的46%的灭活);此外,光谱被进一步线移至546nm。

[0127] 本公开的另一个实施方案涉及C1V1的双突变体(包括E122T和E162T突变)。实验性测试已显示电流的灭活甚至低于E122T突变体,并且光循环比E162T快。这表明单个突变的多个用性质一起保留在双突变体中。

[0128] 本公开的实施方案包括各种光反性视蛋白在神经元中的表达。通过产生编码C1V1-ts-EYFP和本文中论述的各种点突变组合的慢病毒载体来在神经元中进行C1V1视蛋白基因的实验性测试。随后在培养的海马神经元中表达视蛋白,在相同的刺激条件(2ms的脉冲、542nm的光、 $5.5\text{mW}/\text{mm}^2$)下记录其全细胞光电流。表达C1V1、C1V1-E162T和C1V1-E122T E162T的细胞的光电流全都很强劲,并且倾向于比ChR2-H134R的光电流更大。实验还包括比较积分胞体YFP荧光与来自表达C1V1-E122T E162T的细胞和来自表达ChR2-H134R的细胞的光电流。令人惊讶地,C1V1-E122T E162T细胞在等同的荧光水平上显示比ChR2-H134R细胞更强的光电流。这表明C1V1可具有比ChR2-H134R更高的单一电导率(unitary conductance)。测试结果表明C1V1-E122T的动力学比C1V1-E122T E162T的慢并且表达C1V1-E122T的细胞对红光(630nm)的反应比表达双突变体的细胞强。这对于产生响应红光

的光遗传学尖峰是特别有用的。

[0129] 与本公开的各种实施方案一致,存在于相同微回路中的抑制性和/或兴奋性神经元将被各种视蛋白的引入靶向。通过在培养的海马神经元单独表达处于CaMKII α 启动子下的C1V1-E122T E162T和ChR2-H134R来进行实验性测试。表达C1V1-E122T/E162T的细胞响应2ms绿光脉冲(560nm)而非紫色光脉冲(405nm)产生尖峰。相反地,表达ChR2-H134R的细胞响应2ms405nm的光脉冲而非响应2ms561nm的光脉冲产生尖峰。

[0130] 本公开的各种实施方案涉及活的脑切片内两个神经元群的独立活化。在PV::Cre小鼠的mPFC中利用CaMKII α -C1V1-E122T/E162Tts-eYFP和EF1 α -DIO-ChR2-H134REYFP进行实验性测试。在非表达YPR细胞中,405nm的光脉冲因PV细胞的直接活化而触发强劲的快速抑制性突触后电流,然而561nm的光脉冲仅触发预期的长潜伏期多突触IPSC(从驱动局部抑制性神经元的表达C1V1的锥体细胞产生)。

[0131] 与本公开的其它实施方案一致,可体内进行独立细胞元件的激动作用。使用光极记录进行实验性测试。为了检查PV细胞活性对锥体神经元尖峰的抑制作用,使用其中以不同的脉冲间间隔在5Hz绿光脉冲(以活化兴奋性锥体神经元中的C1V1)之间进行5Hz紫色光脉冲(以活化PV细胞中的ChR2)的实验方案。测试结果表明当紫色与绿光脉冲相隔100ms时,对绿光脉冲的反应不受紫色脉冲影响。然而,随着紫色与绿色脉冲之间的延迟减小,绿光诱导的事件变得更容易被抑制,直至当同时提供光脉冲时被有效/完全消除。

[0132] 如本文中所论述的,本公开的各种实施方案涉及使对神经回路的时间、空间和/或细胞类型控制与可测量指标发生关系的光遗传学系统或方法。与本文中论述的其它实施方案一致,特定实施方案涉及研究和探究障碍。示例性实施方案的非穷举列表以及与此类实施方案一致的实验结果提供于Yizhar等,Nature,2011,477(7363):171-8(将其本公开通过引用整体并入本文)中。本文中所列的参考资料可有助于提供关于多个领域的一般信息,所述领域可涉及本公开的一个或多个实施方案,并且还可提供关于一个或多个此类实施方案(如下一份或多份参考资料可适用于其的)的应用的专用信息。因此,这些参考资料的每一份通过引用整体并入本文。

[0133] 可一起和/或以其它方式实施上述和附图中显示的各种实施方案。附图/图中描述的项的一项或多项也可以以更独立的或集成的方式进行,或在某些情况下除去和/或被使得不能操作,根据具体应用这是非常有用的。根据本文中的描述,本领域技术人员将意识到可在不背离本公开的精神和范围的情况下对其进行许多改变。

[0134] 据信,本公开是有用的,因为其涉及对神经系统障碍例如与社会功能障碍相关的障碍的控制,如本文中所描述的。本发明的专有应用涉及使对神经回路的时间、空间和/或细胞类型特异性控制与可测量指标发生关系的光遗传学系统或方法。由于本文所公开的示例性实施方案的许多方面涉及并广泛依赖于本领域之前的发展,因此以下论述对此类之前的发展进行了概述,以提供对可从中引出实施方式详情和修改的基础和潜在教导内容(包括见于附录中的教导)的切实理解。以下论述均在此背景下提供,而参考文献中的教导内容以引用方式并入本文中。虽然本发明不一定限于此类应用,但是通过对使用此背景的各种实例的论述可认识到本发明的各个方面。

[0135] 图13描述了用于评估各种神经系统障碍的刺激和/或潜在治疗的模型。基线观察220获自受试者/患者的行为和/或细胞反应的202。选择靶细胞群体,对其进行改变以表达

光应答性分子。在具体的实现中,选择靶细胞群体以提供对受试者脑的前额叶皮质中的E/I平衡的控制,如如下文中更详细论述的。随后可通过将改变的靶细胞群体暴露于光来改变204(例如,提高或降低)靶细胞群体内的兴奋性/抑制性(E/I)平衡。可提供基于光应答性分子的吸收特征的预定范围内的光。再次获取受试者的行为和/或细胞反应的观察220。这些观察提供了关于受试者如何在无刺激或治疗下作用的参照点。

[0136] 为了评估潜在治疗,选择206用于受试者的刺激和/或潜在治疗。刺激和治疗的非限定性实例包括药剂/药物208、行为210和/或电刺激212。随后通过观察受试者响应治疗的行为和/或靶细胞群体响应治疗的行为来评估214刺激/治疗。基于所述观察,可对需要刺激或治疗216还是期望测试另外的和/或不同的治疗作出决定。在已收集观察220后,可将来自各种治疗的观察220彼此之间以及与基线观察和E/I提高后的行为的观察相比较218。观察220的比较可用于评估各种潜在治疗的功效。

[0137] 在某些更具体的实施方案中,E/I平衡的提高导致社会和认知缺陷(与在基线观察过程中的行为相比较)。E/I平衡的有目的和受控的提高允许测试哺乳动物测试受试者(例如否则不显示待建模的疾病的症状的小鼠)的潜在治疗。

[0138] 本公开的方面涉及各种刺激对神经疾病的症状的作用。如本公开通篇中所论述的,受试者的脑的前额叶皮质中的E/I平衡的改变导致与各种神经障碍例如自闭症和精神分裂症的症状类似的症状。在本公开的某些方面,使用一种或多种技术包括药理学、电子、磁性、手术和光遗传法来操作鉴定为影响E/I平衡的神经回路。监测显示的的症状的操作的作用。

[0139] 在某些更具体的方面,将锥体神经元和表达小白蛋白的抑制性中间神经元的操作用于建立疾病状态的模型和鉴定已知疾病的新型治疗。例如,提高(或降低)前额叶皮质的E/I平衡,随后给受试者施用潜在治疗。可监测治疗对观察到的症状或对神经回路(或两者的)的效果。从监测症状和/或神经回路获得的信息可用于提供引起观察到的症状的神经通路的更好理解。还可将信息用于测定潜在治疗的功效。基于潜在治疗的功效或其不存在,可产生改变,从而导致待测试的新型潜在治疗。

[0140] 在本公开的某些实施方案中,例如,给显示神经疾病例如精神分裂症或自闭症的症状的受试者提供刺激。刺激可以是例如药理学、电子、磁性、手术、光遗传学或行为的刺激。

[0141] 与本公开的各种实施方案一样,对神经回路的控制可包括抑制或激动,其各自可包括协同触发作用、和/或改变的对外部回路输入的易感性。例如,可使用光应答性视蛋白例如离子泵(例如,NpHR和NpHR变体)来实现抑制。此类离子泵使神经元的膜电位从其临阈电压移开以劝阻或抑制动作电位。在另一种情况下,可使用光反应视蛋白例如离子通道(例如,ChR2和ChR2变体)实现激动作用。此类离子通道可使膜电位移向和/或通过临阈电压,从而激发或激动动作电位。与各种实施方案一致,光应答性视蛋白可用于(短暂)转换将神经元的静自电位以增加或减少其对外部回路输入的易感性。此类各种选择也可组合使用。

实施例

[0142] 实施例1:稳定阶跃函数视蛋白的产生和表征

[0143] 最初开发了在长达野生型(wt)ChR2(SF0或阶跃函数视蛋白基因产物;-r-off=

2.5-102秒)的时程的4个数量级的时程上操作的长时程(实际上双稳态的)光遗传学工具;ChR2的C128位置上的此类突变导致增加的光敏感性(通过去活化时间常数(deactivation time constant)测量的)。后续工作进一步开发了初步的SFO概念,突变C128质子网络化伴侣(proton networking partner)D156(图1A)以延长光循环和开放状的寿命。然而,两个突变种类都没有在哺乳动物-行为时程上产生完全稳定性-两者在前5-10min过程中都显示显著的衰减,并且表达SFO的神经元的延长的照射在一些情况下,可导致通过生色团的去质子化和光循环副产品在副反应(来自后期光循环中间产物)中的积累引起的视紫红质通道蛋白的去活化。因此,假定组合突变体可潜在地显示开放状态的充足稳定化,尝试通过突变C128和D156产生适当地稳定的用于哺乳动物系统的组合光遗传学的蓝光活化SFO。由于SFO可用蓝光活化,但实际上可用黄光进行灭活,因此如果维持该额外的性质,则这样的稳定的SFO也可在谱域(spectral domain)递送可进一步增强组合控制的侧抑制(lateral-inhibition)。

[0144] 材料和方法

[0145] 通过使用定点诱变(Quikchange II XL;Stratagene)将点突变引入pLentiCaMKII α -ChR2-EYFP-WPRE来产生ChR2(D156A)和SSFO。膜运输信号来源于Kir2.1通道。通过对编码序列和剪接位点进行测序来确认突变。对于AAV-介导的基因递送,将视蛋白-EYFP融合物与CaMKII α 启动子一起亚克隆入pAAV2-MCS载体的改良形式。Cre依赖性视蛋白表达可通过以相反方向将视蛋白-EYFP盒克隆在成对的不相容的lox位点(loxF和lox2722)之间,以产生处于延伸因子1 α (EF-1 α)启动子的控制之下的延伸因子双锚定(doublefloxed)反向开放阅读框架(inverted open reading frame)(D10)来实现。所有构建体可获自Deisseroth Lab (www.optogenetics.org)。

[0146] 为了在毕赤酵母细胞(株系1168H,购自Invitrogen)中异源表达ChR,将编码氨基酸1-315(参见登录号AF461397)的人密码子最优化合成ChR-片段通过其EcoRI和NotI限制位点克隆在pPICZ载体(Invitrogen)。将载体上编码的C末端多组氨酸标签改变成12His序列。通过定点诱变(QuickChange试剂盒,Stratagene)产生ChR的突变体。进行转化、细胞培养和蛋白质纯化。在诱导蛋白质表达进行24小时后,收获细胞,使用高压匀浆器(Avastin)进行温和裂解。收集膜级分,匀浆,溶解在1%(w/v)十二烷基麦芽糖苷中。在将ChR蛋白结合至Ni-NTA树脂(Qiagen)并且用200mM咪唑洗涤柱子后,用500mM咪唑洗脱ChR。将包含蛋白质的级分混合,脱盐(Float-a-lyzer,Roth),浓缩(Amicon Ultra,Millipore)至在480nm处具有1的光密度。在Cary50Bio分光光度计(Varian Inc.)中记录光谱。

[0147] 结果

[0148] 从毕赤酵母产生和纯化ChR2突变体C128S、D156A和双突变体128S/156A,以首先测量在潜在混杂的细胞性质不存在的情况下的固有开放状态稳定性。吸收光谱显示预期的响应短暂光递送的快速改变,对于单突变体C128S(图1B、F)和D156A(图1C、G)所述快速改变在3分钟内大部分恢复。然而,与两个单突变体相反,双突变体C128S D156A显示活化状态的非常完全的稳定性,甚至在30分钟后,基本上无可检测的至暗态(dark state)的返回(图1D、H)。这些吸收光谱的特征性的两个峰可归因于导通状态和去质子化种类的形成(P390;图1B、C),变体之间具有一些有趣的差异。首先,与C128S相比较,对于双突变体注意到导通状态相对于暗态的减小的红移(图1A、D),从而产生利用红移的光去活化的重要性质对于双突

变体是多么有效的相关问题。关于潜在有益的方面,还要指出的是相对于导通状态,来自非导通(P390)状态的减少的贡献存在于双突变体(相较于C128S)中(图1B、D),可预测减少的非导通通道的积累和表明可消耗导通状态(例如P520-*P480脱敏状态(Des480);图1E)的光循环的晚期步骤可以几乎被完全阻断的有用性质(图1E)的有用性质。双突变体C128S/D156A的独特稳定性通过所有3个突变体在35分钟的记录中的连续单色吸收测量来进一步举例说明(图1H)。

[0149] 实施例2:神经元中和体内的活化的确认

[0150] 双突变体因而似乎在哺乳动物行为时程上具有显著不同的、几乎最佳的稳定性,但对于红移的光的去活化具有潜在减小的决定性能力;此类组织全部需要神经元中和体内的验证。

[0151] 材料和方法

[0152] 海马和皮质神经元的全细胞膜片钳电生理学

[0153] 从P0 Sprague-Dawley大鼠分离原代海马培养物,将其涂铺在基质胶(Matrigel)(Invitrogen)包被的玻璃盖玻片上,用FUDR处理以抑制胶质过度生长。使用HEPES缓冲盐溶液/CaPO₄混合物将无内毒素质粒DNA转染进入培养的神经元。在3-5MΩ玻璃移液管中使用标准内部溶液([mM]130葡萄糖、10KCl、10HEPES、10EGTA、2MgCl₂,pH7.3(利用KOH),于Tyrode培养基([mM]150NaCl、4KCl、2MgCl₂、2MgCl₂,10D-葡萄糖、10HEPES,pH7.35(利用NaOH))中获得通过荧光蛋白质表达鉴定的单个神经元的电生理记录。对于皮质切片生理学,使用振动切片器(Vibratome)(Leica),在冰冷的蔗糖切削液([mM]11D-葡萄糖、234蔗糖、2.5KCl、1.25NaH₂PO₄、10MgSO₄、0.5CaCl₂、26NaHCO₃)中获得将先前已注射了病毒的8-9周龄野生型C57BL/6J或PV::Cre小鼠的急性(acute)300μm冠状切片。将切片在32°C下于充氧的人工脑脊液(ACSF;[mM]124NaCl、3KCl、1.3MgCl₂、2.4CaCl₂、1.25NaH₂PO₄、26NaHCO₃、10D-葡萄糖)中恢复1小时。在持续的ACSF灌注下,在鉴定荧光蛋白质表达后,从指定的额叶前部皮质层获得单个神经元膜片(neuron patches)。将来自宽波长氙气灯源(Sutter Instruments DG-4)的滤过光偶联至显微镜(Leica DM-LFSA)的荧光端口。带通滤色片(Semrock)具有20nm带宽,利用另外的中性滤色片(neutral density filter)(ThorLabs)调整其以使光谱间的光功率输出相等。在操作表达SSFO的细胞或组织的同时,必需小心使光暴露降至最低限度以防止被环境光活化。在每一个实验之前,将590nm的光的20s秒脉冲用于将所有SSFO通道转化成暗态并且阻止光电流的衰减。为了获得SSFO活化和去活化光谱,在电压钳模式中记录培养的神经元。为了记录活化光谱,施用1s的不同波长的脉冲,随后施用10s590nm的脉冲。通过首先施用1s470nm的脉冲以活化SSFO,随后施用10s的不同波长的脉冲来获得去活化光谱。通过将第一或第二脉冲后光电流的变化分别除以针对该细胞的峰波长诱导的最大光电流变化来计算静活化或静去活化。由描述产生的去活化光谱中的阴性值,其中,例如,10s470nm的脉冲导致光电流的略微增加而非使通道去活化。这可以用于这些记录(使用Sutter DG-4)的相对宽(20nm)的带通滤色片的结果。出于相同的原因,预期中间波长(470nm与520nm之间)对通道群体具有混合效应。

[0154] 使用Retiga Exi CCD照相机(Qimaging, Inc.)以100ms曝光(具有30的增益)在相同的显微镜上获得培养的细胞的图像。在500nm处,照射功率密度为12mW mm⁻²,使用标准EYFP滤光器片组。利用ImageJ软件,通过标记包含胞体和近端神经突的区域和计算每一个

细胞在该区域的总积分像素密度而非平均荧光来进行荧光的定量,因为光电流可能与膜结合的通道的总数目而非与每面积平均通道表达相关。通过计算在每一个光功率下通过显微镜物镜的光子通量,随后基于记录的细胞的直径扣除穿过细胞表面达到光子能量,并且将细胞的形状大致视为球形来进行SSF0集成性质的光子能量计算。

[0155] 病毒基因的转染

[0156] 将慢病毒和AAV介导的基因递送用于在小鼠中异源表达视蛋白。利用靶向皮质兴奋性神经元的人钙调蛋白依赖性蛋白激酶II α (CaMKII α)启动子或与Cre诱导盒和随后早发肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)结合的延伸因子1 α (EF-1 α)来驱动指定的视蛋白。Cre诱导重组AAV载体由University of North Carolina Vector Core(Chapel Hill,NC,USA)产生,并且将其与小白蛋白::Cre转基因小鼠结合使用以靶向小白蛋白阳性中间神经元。简而言之,将SSF0-eYFP以相反方向插入在成对的不相容lox位点(loxP和lox2722)之间。在北卡罗来大学(University of North Carolina)将AAV构建体亚克隆进入pAAV2-MCS的改进形式,利用AAV5外壳蛋白进行血清分型,利用病毒载体核心进行包装。AAV载体的终病毒浓度是 1×10^{12} 个基因组拷贝(gc)/mL。如所报导的,产生慢病毒构建体。所有构建体可获自Deisseroth Lab(www.optogenetics.org)。在由斯坦福大学(Stanford University)批准的方案下进行立体定位病毒注射。将保持在异氟烷麻醉下的幼年(4-6周)小鼠放置在立体定位框架(Kopf装置)中,使用前囟点和 λ 颅骨界标调整水平。进行颅骨切开术以使对皮层组织的损伤最小。使用10 μ L注射器和35g斜口针(Word Precision Instruments)靶向缘下前额叶皮质(IL;离前囟点:前1.8mm、侧0.35mm、腹侧-2.85mm)。以0.111L/min的速率输注病毒。用长期光纤偶联装置额外地植入利用病毒注射以进行行为研究的受试者,以有利于利用或不利用用于局部递送至指定的靶皮层区的连接的穿脑纤维进行光递送(Doric Lenses,Canada)。将穿透纤维立体定位地插入离相同的前、侧坐标-2.5mm的深度,在头皮粘合封闭前(Vetbond,3M)使用粘合剂封闭水门汀(luting cement)(C&B MetaBond)进行粘附。在从手术恢复后给动物施用镇痛剂(analgesic relief)。

[0157] 结果

[0158] 与野生型ChR2、C128突变体和D156突变体一样,发现双突变体ChR2-C128S/D156A在培养的海马神经元中良好表达并且保持快速阶梯状活化(通过单次蓝光的短暂脉冲)以及去活化(通过绿光或黄光)的必需SF0性质。实际上,尽管在双突变体的开放状态吸光度上存在减少的红移,但仍然要使用红移的光(在该情况下利用黄光,最佳地在590nm处)来实现完全去活化,这是潜在的组合对照目的所必需的。由于存在大量P390种类,因此利用390nm的光以比黄光更快的速率进行去活化也是可能的,但由于在该波长上的暗态的残余吸光度因而也是不完全的(图1A)。此外,在利用390nm的光去活化后,利用470nm的复活不如在590nm去活化后有效,从而指出了可能地在红移的光去活化后未达到的因捕获在去质子化/脱敏同种型(在红移的光去活化后未达到)中而可利用紫外光进行的光化学去活化(图1E中举例说明的),并且再次支持黄光去活化用于潜在地增强光谱分离的用途。

[0159] 表达ChR2-C128S/D156A的细胞中的峰值光电流与ChR2-D156A的相当(231.08 ± 31.19 ;n=9个细胞和 320.96 ± 78.26 ;n=7个细胞,分别地 $p=0.26$,非配对t检验)。与分光镜数据一致,表达ChR2-C128S/D156A的神经元产生远比来自单独表达任一单个突变体的细胞的光电流更稳定的持续光电流(图2B)。将单指数衰减曲线与作为时间的函数的去活化/活化

比率拟合显示了在并排比较(side-by-side comparison)中长度为D156A(6.9min , $r^2=0.8357$;图2B)的4.2倍的ChR2-C128S/D156A($r^2=0.9139$)的 29.3min 的表观自发衰减时间常数。实际上,考虑到光谱学显示在该时程上基本上无至暗态的逆转的事实,剩余的衰减可能部分归因于细胞决定的性质例如蛋白质周转。与用于复杂哺乳动物行为的预期应用所需的改进一致,图2C显示了在传入异步突触活性(incoming asynchronous synaptic activity)的装置中利用蓝光活化和黄化去活化的典型的长全细胞记录。基于此类令人惊讶地延长的时间性质,双突变体被称为SSF0(对于稳定阶跃函数视蛋白)基因,并且为了简化起见,也将SSF0用作蛋白质的速记。

[0160] 具有此类低衰减常数的视紫红质通道蛋白可以使得转导细胞能够用作光子集成器,其具以 T_{off} 标定的有有效的光敏感性(即光电流振幅每细胞吸收的光子)。SSF0因而可使得能够产生更灵敏的不太具有侵入性的进行光遗传学回路调制,但仍然具有作用的瞬间精确开始和补偿以及具有具有可容易滴定的对靶神经元群的作用(通过光脉冲长度的调制)的方法。实际上,已发现通过利用极低的光强度(低至 $8\mu\text{Wmm}^{-2}$),可从表达SSF0的神经元获得数百皮安的全细胞光电流(图2D)。光电流在整个照射时间过程中以单指数动力学响应 470nm 的光增加(图2D,左),重对数图尺上激动时间常数线性地依赖于激动光功率,直至达到通道固有的毫秒级,这表明SSF0达到了纯集成器的状态,随时间的总的光子暴露为光电流的唯一决定因素(图2D,中间; $n=27$ 个记录,来自5个细胞)。然而,这也意味着在开始实验之前必须使表达视蛋白的组织保持在完全黑暗中(对于哺乳动物体内实验无关紧要,但对于体外工作需要更加留意)。当数据表示为光电流达到记录的细胞的 I_{max} 的固定分数所需的光子的总数(递送至单个神经元胞体并且随时间的集成的)时,该光子特征数目是恒定的,无论激动光功率是多少图2D,右; $9.1 \times 10^8 \pm 1.6 \times 10^8$ 个光子; $n=27$ 个记录,来自5个细胞),再次证明SSF0的纯光子集成性质。

[0161] 为了在体内验证该新型光遗传学工具,将皮质激动和抑制的调控用作实验系统在哺乳动物中探究SSF0在体内实现稳定的细胞类型特异性调制的能力。作为读出,在于内侧前额叶皮质(mPFC;图2E)的缘前(PL)和缘下(IL)亚区中表达SSF0的麻醉的小鼠中进行光极记录。为了调制激动,首先表达处于兴奋性神经元特异性CaMKIIa启动子的控制之下的锥体神经元的SSF0-eYFP。第二,为了调制抑制,使用双锚定的反向开放阅读框架(DIO)病毒来表达PV::Cre转基因小鼠中的SSF0-eYFP;在这些小鼠中,SSF0仅在GABA能Cre-阳性小白蛋白神经元中表达。为了绘制光调制图谱,使用先进的两激光光极(图2E)和蓝/绿活化/去活化激光方案(图2F-G),在于内侧前额叶皮质(mPFC)中用AAV5-CaMKIIa::SSF0-EYFP注射的小鼠中在逐渐更腹侧的位置上进行记录。这些小鼠的mPFC中的多单位活性仅在转导区域中响应 1s 的 473nm 的光的脉冲(95mW mm^{-2} ,对应于电极尖处的 10mW mm^{-2})而显著且稳定地增加。该增加的活性利用 2s 的 561nm 的光脉冲(112mW mm^{-2} ;图2F)来有效地终止。多单位尖峰率(Hz)的显著增加被限制于mPFC(图2)并且在蓝光刺激后在任何记录位置都未观察到尖峰率的显著减少。在mPFC记录位置中(但非在mPFC的背侧的位置中),平均多单位尖峰率如所预期地被光调制;在显示活性的显著调制的描述中,在活化之前、活化之后和去活化后,尖峰率分别为 $2.60 \pm 0.39\text{Hz}$ 、 $33.82 \pm 4.83\text{Hz}$ 和 $5.04 \pm 1.23\text{Hz}$ (图2H;2只小鼠中 $n=46$ 个记录;活化后 $p=3\text{e}-8$ 和去活化后 $p=0.048$,两者都与活化前基线相比较;斯氏配对t检验)。

[0162] 相反地,在利用AAV5-EF1a-DIO-::SSF0-eYFP于mPFC中注射的PV::Cre小鼠中,在

相同的1s的470nm的光的脉冲后多单位活性减少,在2s561nm的脉冲后回复至基线水平(图2G)。在这些小鼠中,多单位尖峰率的减小也被高度限制于mPFC(n=沿着全背腹侧描述的54个记录位置中的5个)并且在蓝光调制后在任何记录位置中未观察到尖峰率的显著增加。在显示活性的显著调制的描述中,活化之前、活化之后和去活化之后的平均多单位尖峰率分别为 $14.82 \pm 1.26\text{Hz}$ 、 $3.66 \pm 0.58\text{Hz}$ 和 $9.69 \pm 1.77\text{Hz}$ (图2H;活化后 $p=0.002$ 和去活化后 $p=0.088$,两者都与活化前基线相比较;斯氏配对t检验)。再次地拟合预测的SSF0光电流的高稳定性,发现在短暂脉冲后体内活化率的调制稳定地持续许多分钟(图2I)。

[0163] 实施例3:SSF0对自由移动的小鼠的行为和回路动力学的影响

[0164] 已确立SSF0可在行为相关时程上用于双向调制额叶前部的兴奋性后,将SSF0用于检查提高的细胞E/I平衡对自由移动的小鼠的行为和回路动力学的影响(图3)。使用兴奋性神经元特异性CaMKII α 启动子在额叶前部皮层兴奋性神经元中,或使用与PV::Cre转基因小鼠结合的双锚定反向开放阅读框架(DIO)病毒在表达小白蛋白(PV)的抑制性神经元中表达SSF0(图3J-L)。如上所述在mPFC中注射病毒,随后进行延伸通过紧邻mPFC的背部的颅骨以进行光递送的长期光纤植入(图3A、B)。

[0165] 材料和方法

[0166] 交互信息的计算

[0167] 为了研究SSF0对sEPSC-尖峰率信息的影响,在mPFC的第V层从可视地鉴定的锥体细胞进行全细胞膜记录。通过使用电流钳,利用一连串模拟的EPSC波形刺激单个锥体细胞。单个sEPSC事件具有200pA的峰值电流量级,并且以2ms的时间常数衰减。将每一个实验分成10次扫描,每次10秒长并且间隔5秒以使衰减降至最低。每一次扫描分成500ms的段(segment)。每一个500ms的段中的sEPSC的总数随机地选自0与250之间的均匀分布。于是500ms的段内的sEPSC的次数随机地选自延伸通过整个段的均匀分布,刺激来自一组非同步化的神经元的兴奋性输入。凭借经验,这些刺激参数可靠地以0-30Hz的发射率驱动锥体神经元。在标记为基线的条件中,在进行sEPSC方案之前递送590nm的光的10秒脉冲以完全来活视蛋白。在其中活化视蛋白的条件中,在sEPSC方案之前进行470nm的光的1秒脉冲。

[0168] 为了理解改变的E/I平衡对信息加工的净影响,计算每一个神经元的输入sEPSC率与输出尖峰率之间的交互信息,这捕获了IO曲线的形状和反应变异性的相关变化。首先,通过及时框并(bin)ing)sEPSC率和尖峰率以及建立联合直方图来评估sEPSC率与尖峰率的联合分布。时间框为125ms宽,将sEPSC率分成从0至500Hz的10个等间隔的框,虽然交互信息结果在范围宽广的框并参数间是恒定的。使用在给定的时间框宽度下最小有意义的框宽度(例如,对于125ms的时间框,8Hz的框)对尖峰率进行分框。根据该联合直方图,交互信息经计算等于反应熵与噪声熵(noise entropy)之间的差异。反应熵确定了神经元的输出尖峰率中的不确定性的总量。噪声熵确定了保留在在给定的输入率下的输出尖峰率中的不确定性的量。要指出的是,神经元反应可传输至输入刺激附近的最大信息为为刺激定势(stimulus set)的熵。对于10个等间隔的输入sEPSC率框和在这些框上的输入速率的均匀分布,输入速率的熵是 $\log_2(10)=3.322$ 比特。从取样不足的概率分布(undersampled probability distribution)计算的交互信息可以是上偏。因此,要修正交互信息、反应熵和噪声熵的所有报导的值的因取样不足造成的偏差。该修正通过从更小分数(从1/2至1/8)的完全数据计算值,将其外推至无限数据的极限来进行。使用125ms的时间窗,校正因子总

是小于0.07比特。

[0169] 还通过利用相似的输入sEPSC率计算时间框间的输出尖峰率来评估每一个神经元的输入-输出传输函数。通过计算每一个神经元的动态范围和饱和点,单独地处理基线和视蛋白活化的条件来定量输入-输出函数的形状。动态范围定义为整个输入sEPSC率的范围内的最大与最小尖峰率之间的差异。饱和点定义为以90%的其在该条件内的最大输出尖峰率驱动神经元的最低输出sEPSC率。减少的饱和点不可能不是因增益或动态范围的乘性约化导致的,相反显示了输入-输出函数在更高的输入sEPSC率上变得更平。

[0170] 行为试验

[0171] 使将要经历行为实验的所有动物适应12小时的相反光照/黑暗周期。在行为试验之前,使动物在开始实验前适应其中将进行实验的房间至少1小时。

[0172] 条件性恐惧实验装置由环绕有听力测验室(acoustic chamber)(Coulburn instruments,PA,USA)的正方形条件化笼(conditioning cage)(18×18×30cm)组成,该条件化笼的格子地板(grid floor)通过导线连接至冲击发生器(shock generator)和振荡器(scrambler)。改进该装置以使得能够在训练和/测试过程中递送光。为了诱导条件性恐惧,将小鼠置于笼中进行120秒,随后播放纯音(2.9kHz),进行20秒,随后进行2秒电足休克(0.5mA)。随后重复该方法,在递送第二电足休克之后将小鼠送回其居住笼之前监测立即木僵行为(immediate freezing behavior),进行另外30秒。24小时后通过连续测量木僵(完全不动)(主要行为恐惧反应)评估条件性恐惧。为了测试场景条件性恐惧实验,将小鼠置于原始条件化笼中,测量木僵5分钟。为了测试听觉暗示条件化试验,将小鼠置于不同的场景-具有光滑地板的锥体形笼。作为新环境的影响的对照,在该新笼子中测量木僵,进行2.5min,随后播放2.9kHz的音调2.5分钟,在该过程中,测量条件性木僵。通过连接至473nm的激光的定制的转接线递送光来施用通过光纤连接器进行的光刺激。以在纤维尖头处98mW mm⁻²的功率递送光脉冲,进行2秒。利用斯氏 t 检验分析场景和暗示条件化测试的结果。

[0173] 分析居住笼中的社会关系。简而言之,在笼顶不存在的情况下使居住笼中的单个小鼠自由地闲逛1分钟。将新来的幼年(3-4周龄)雄性入侵者引入与常住雄性受试者相对的角落,让其自由闲逛2分钟。可视地定量两只小鼠之间总的身体相互作用,将社会关系评分为在该过程中常住小鼠主动地探究入侵者的时间。通过添加473nm的光的2秒脉冲(通过偶联至长期植入的光缆或长期植入的非侵入性颅骨纤维偶联设备(如所指示的)光缆(Doric Lenses)递送的)进行刺激试验。在实验和1分钟的适应期之前解开纤维。

[0174] 进行三室社交试验。将测试小鼠引入三室装置的中央室,使其适应10分钟,通往两侧室的门关闭。在10分钟的适应期开始和结束时施用光脉冲。在适应期结束时,将新来的同种雄性小鼠引入内置金属网杯(Galaxy Pencil/Utility cup,Spectrum Diversified Designs)的“社会”室。在其它(非社会)室中,放置相同的空杯。在每一个测试中随机选择社会和非社交室的名称以防止室偏向性(chamber bias)。在测试之间,用20%乙醇清洁室,在开始下一次测试之前使其完全干燥。使用自动跟踪软件Viewer II(BiObserve,Fort Lee,NJ)定量在非社交室、中央室和社交室中消磨的时间。将在基线上未显示社会探究偏爱的小鼠排除免于分析。

[0175] 在用于社会行为测试的相同的三室装置中,使用相同的一般方法进行新奇物体探究实验。将小鼠置于通向两侧室的门关闭的中央室中。在10分钟的适应期中递送光脉冲,之

后打开门,使老鼠探究整个装置。换掉金属网杯,将新奇物体随机地置于两个终室(end-chamber)的任一个中。在10分钟的时间内评定将每一只小鼠的新奇物体的探究评分为其中小鼠在其中主动地探究该物体所花费的时间。使用的物体可以是塑料球、立方块或陶瓷小像,全都具有大致相似的尺寸。在测试之间充分清洁物体以防止留下气味痕迹。

[0176] 将旷场室(50×50cm)分成中心场(中心,23×23cm)和外场(周边)。将各只小鼠置于旷场周边,通过摄像机记录动物的路径。通过使用Viewer2(BiObserve, Fort Lee, NJ)对总行进距离进行分析。每只小鼠的旷场试验由分成两个2.5分钟的节段的5分钟的一段时间(session)组成,在两个节段之间递送2s473nm的光脉冲。对每一只小鼠的跟踪长度、速度和在中心花费的时间%进行评分,针对每一个条件计算小鼠间的平均值。

[0177] 高架十字迷宫由塑料制成,并且由从中央平台(5×5×5cm)以十字形式呈90度延伸的两个浅灰色开臂(30×5cm)、两个黑色闭臂(30×5×30cm)组成。迷宫置于地板以上30cm高。对于每一只小鼠,当小鼠在居住笼中时,递送2s473nm的光脉冲。5分钟后,分离光纤连接器,将小鼠单个地置于迷宫中央进行15分钟的测试持续时间。将视频跟踪软件(Viewer II, BiObserve, Fort Lee, NJ)用于跟踪小鼠位置。所有显示的测量都是相对于整个小鼠身体的。

[0178] 清醒小鼠中的长期电生理记录

[0179] 为了同时从位于病毒转导组织内和转导区外部的两个位置记录,新型长期多点控制器光极(CMO)被设计来与光递送组合用于清醒动物记录。使用缠绕在一起并且以约500gm增量切割的4根25μm钨丝(California Fine Wire Company, Grover Beach, CA)的阵列,将这些4-导线束偶联至由2.5mm的直径的金属加固环(metal ferrule)组成的可植入的光纤光导装置(IFL; Doric Lenses, Quebec, Canada),将200μm-核心光缆从所述金属加固环展开。将4-导线束反向供给到已向其中插入了光缆的250gm-直径的导向管。使用金钉(gold pin)将导线连接至Mill-Max连接器,也将不锈钢地线与其连接。将在病毒注射(参见上文)后立体定位地植入装置,以便纤维尖头仅延伸通过颅骨但不进入脑组织。通过小脑上方小颅骨切开术插入地线。在实验开始之前,使小鼠恢复2周。

[0180] 为了记录行为过程中的神经活性,首先使小鼠在数天内适应支架(headstage)和光缆的附着。使小鼠探究附着支架的居住笼,每天1-2小时。在术后2-4周进行记录。将信号在支架多路传输进入通过电换向器(electrical commutator)(PlasticsOne)的3-金属电缆,使用解多路复用板(demultiplexing board)(Triangle BioSystems, Inc.)进行多路解编,随后使用Neuralynx Digital Cheetah进行数字化。将光纤和电换向器用负重臂(weighted arm)(Harvard Apparatus)悬挂以使小鼠自由地探究大区域(例如在旷场试验中)。该配置还防止了记录的小鼠和幼年入侵者(在社会关系测试中)接触任何多余的金属或光导纤维,使对硬件的损害降至最低。使用Neuralynx Cheetah软件记录录像,利用Viewer II(BiObserve, Fort Lee, NJ)进行离线分析以定量旷场行为。对社会关系和新鲜事物探究进行手工评分,如在其它行为实验中一样。以1至500Hz对LFP进行滤过,以6.5kHz的频率进行取样。在32kHz处记录多单位活性,对于所有通道以40μV的阈值收集单个事件。

[0181] 如上所述,通过每隔2s对功率谱进行取样,进行记录的持续时间来分析LFP记录的小波功率光谱图。利用2Hz的框宽度计算2Hz与120Hz之间的功率。在所有小鼠中,使用进行2分钟的基线记录,随后以纤维尖头处56mW mm⁻²的发光进行1s473nm的脉冲的方案来记录

SSF0活化的影响。在蓝光脉冲后,记录活性,进行2分钟,随后以具有相似强度的594nm波长的光进行30s的去活化光脉冲。随后记录活性,再进行另外2分钟。对于每一只小鼠,重复该方案至少4次,计算4个重复间的3个时期(活化前、活化后和去活化后)的每一个时间的功率谱的平均值。

[0182] 使用居住笼范例进行利用植入电极的小鼠的社会行为实验,如上所述的。无光和有关试验间隔至少24小时,在每一次试验中使用新的幼年小鼠。试验由2分钟的基线记录,随后在1s的活化光脉冲后进行1分钟的记录,之后引入幼年入侵者组成。记录社会行为,进行2分钟,随后取出幼年小鼠,利用30s594nm的光脉冲使SSF0去活化。在整个时间过程中获取记录,以与针对上述居住笼记录所描述的相同的方式分析记录。对于无光和有关试验都计算小鼠间的2分钟社会关系期的功率谱的平均值。以相同的方式,利用无生命的物体替代新的幼年小鼠来在这些小鼠中时行新奇物体实验。

[0183] 数据分析

[0184] 适用时,使用配对或未配对双尾t检验计算统计显著性。使用Matlab统计学工具箱或Microsoft Excel分析数据。

[0185] 免疫组织化学

[0186] 用氯胺酮/赛拉嗪麻醉已经历行为分析的动物,利用冰冷的PBS,随后用4%的PBS中的多聚甲醛(4%PFA)经心脏灌注小鼠。将分离的脑在4°C下于4%PFA中进行后固定过夜,随后浸没在由30%的PBS中的蔗糖组成的无菌冷冻保护剂直至沉降(在4°C下进行2至3天)。使用冷冻切片(Leica)收集40 μ m冠状切片,将其在PBS中进行洗涤,于0.3%Triton X-100(PBST)中进行透化,在室温下于3%的溶解在PBS中的正常驴血清中封闭1小时。对动物使用兔抗-c-fos(Calbiochem)来测定c-fos的细胞核定位,所述动物已在灌注前经历了1s473nm的光刺激90分钟;使用小鼠抗-白蛋白(Sigma Aldrich)与荧光蛋白的共定位来确认小白蛋白靶向。在Leica SP5共聚焦显微镜上使染色的切片可视化。为了计算不同解剖学亚区中的平均荧光,使用ImageJ分析组织学图像。以固定的阈值水平设定单个亚区图像的阈值。计算高于阈值的平均荧光,计算小鼠之间每区域的荧光的平均值。使用用以鉴定区域的标准化标志物进行c-fos计数,并且在计数之前进行匿名处理。对整个切片体积的多层光切(z-stack)进行计数。在其中在同一天和以相同的物理条件进行c-fos诱导和其中在标准化条件下进行组织制备、染色和成像的实验中仅比较实验条件间的数据。

[0187] 结果

[0188] 首先,为了在细胞水平上评估神经元群中SSF0诱导的活性的作用,体内检查2s470nm的光脉冲刺激后90分钟立即早期基因产物c-fos的表达(图3C)。在病毒转导的和光刺激的半球中定量整个缘前/缘下子域(图3B中分隔的)c-fos中阳性神经元的数目。在用(对照)CaMKII α -YFP病毒注射的动物中,335 \pm 107个mPFC细胞在基线上表达可检测的c-fos。相比之下,在PV神经元表达SSF0的小鼠(PV::SSF0小鼠)相对于对照在mPFC中显示显著更少的表达c-fos的细胞(81 \pm 7个细胞,n=5只小鼠;p<0.005,双侧t检验)。令人惊讶地,大分数的此类细胞实际上是YFP阳性的(61 \pm 8%的总c-fos阳性群体;图3C),表明甚至绝大部分此类活性细胞实际上是被病毒递送的SSF0直接活化的PV阳性神经元。相反地,在兴奋性细胞中表达SSF0的小鼠(CaMKII α ::SSF0小鼠)在病毒转导的半球(1455 \pm 305个细胞;n=3只小鼠;p<0.05,双侧t检验;图2C)和对侧半球(617 \pm 97个细胞;n=3只小鼠;p<0.05)中都显示

c-fos阳性细胞核的显著增加,但不超过脑的其它区域(图3M),表明活化主要在局部传送以及传送至对侧半球。这些发现验证了SSF0在清醒的小鼠中的预期靶向、功效和定向性(directionality)。

[0189] 进行行为测试的三组动物(图3D-G):CaMKII α ::SSF0小鼠、PV::SSF0小鼠和对照小鼠(利用AAV5-CaMKII α -eYFP病毒注射的或不用病毒注射的)。在术后2至4周,测试条件性学习和非条件性社会行为以及新奇物体和运动功能的探究(图3D-G);所有动物通过置入的光纤连接器接受单次1s470nm的光脉冲,随后在引入行为室之前1分钟除去光缆,有效利用SSF0的稳定性。

[0190] 选择性地具有提高的细胞E/I平衡的小鼠中观察到社会行为和条件化的显著缺乏(图3D-G)。首先探索已被引入实验动物的居住笼的相同性别的幼年小鼠的第一非条件性社会探究⁴⁹。与对照相比较,在1s470nm的光脉冲后,在提高的E/I(CaMKII α ::SSF0)组中,新的小鼠的探究实际上已被消除($n=8$,CaMKII α ::SSF0小鼠和 $n=6$,对照; $p<0.0005$,非配对t检验),然而PV::SSF0小鼠在该行为中未显示作用(图3D和2; $n=6$ PV::SSF0小鼠; $p>0.1$;非配对t检验)。随后使相同小鼠经历在递送1s470nm的光脉冲后立即进行的条件化方案。24小时后,当在改变的E/I状态下时,评估对条件性音调和场景的反应以评价小鼠学会使条件性与非条件性刺激发生关系所达到程度。提高的E/I(CaMKII α ::SSF0)动物未显示条件性反应(对于场景: $p<0.0005$ 或音调: $p<0.05$,与对照相比较;双侧t检验)。此外,缺乏是完全可逆的;可在SSF0活化不存在的条件下在24小时后重新条件化相同的动物,从而显示当第二天测试时与对照组的恐惧条件化无区别的恐惧条件化(图3E; $p>0.1$,暗示和场景;非配对t检验)。相反地,其中E/I平衡下降的PV::SSF0组与对照相比较在响应音调和场景的木僵化行为中未显示显著的妨碍(图3E;分别地 $p=0.09$ 和 $p=0.56$;双侧t检验),正如社会行为中的一样。与提高的E/I平衡相关的行为缺乏不归因于运动功能的改变,因为在相同小鼠中,旷场行为是正常的($n=8$ CaMKII α ::SSF0小鼠和 $n=6$ CaMKII α ::YFP小鼠;图3F和图3N)。

[0191] 实施例4:细胞E/I的提高但非下降导致信息加工的定量减少

[0192] 随后,研究由额叶前部的E/I平衡改变引起的行为障碍的神经生理学支撑。在自闭症中,30%的具有虚弱发作(debilitating seizures)的共病(comorbidity)的发现已导致建议:过度兴奋参与疾病,并且已提出改变的皮质兴奋或抑制是自闭症和精神分裂症中一些核心行为缺乏的原因。

[0193] 材料和方法

[0194] 使用振动切片器(Leica),在冰冷的蔗糖切削液([mM]11D-葡萄糖、234蔗糖、2.5KCl、1.25NaH₂PO₄、10MgSO₄、0.5CaCl₂、26NaHCO₃)中获得从先前已注射了病毒的8-9周龄野生型C57BL/6J或PV::Cre小鼠分离的急性300 μ m冠状切片。将切片在32°C下于充氧的人工脑脊液(ACSF;[mM]124NaCl、3KCl、1.3MgCl₂、2.4CaCl₂、1.25NaH₂PO₄、26NaHCO₃、10D-葡萄糖)中恢复1小时。在持续的ACSF灌注下,在鉴定荧光蛋白质表达后,从指定的额叶前部皮质层获得单个神经元膜片。将来自宽波长氙气光源(Sutter Instruments DG-4)的滤过光偶联至显微镜(Leica DM-LFSA)的荧光端口。在进行每一个实验之前,将20s590nm的光脉冲用于将所有SSF0通道转化成暗态并且阻止光电流的衰减。使用Retiga Exi CCD照相机(Qimaging inc.)以100ms曝光(具有30的增益)在相同的显微镜上获得培养的细胞的图像。在500nm处,照射功率密度为12mW mm⁻²,使用标准EYFP滤光器片组。利用ImageJ软件,通过标

记包含胞体和近端神经突的区域,计算每一个细胞在该区域的总积分像素密度而非平均荧光来进行荧光的定量,因为光电流可能与膜结合的通道的总数目而非与每面积平均通道表达相关。通过计算在每一个光功率下通过显微镜物镜的光子通量,随后基于单个钳制的细胞的电容划分到达穿过细胞膜的光子通量来进行SSFO集成性质的光子通量计算。

[0195] 对于活动物研究,在先前已用指定的上述病毒构建体转导的野生型成年C57/BL6雄性小鼠的前额叶皮质中同时进行光刺激和电录声(electrical recording)。简而言之,在颅骨切开术之前利用异氟烷深度麻醉动物。在于立体定位下对齐小鼠和手术除去前额叶皮质背部的颅骨(在前面1.8mm、侧面0.35mm居中)后,将M00.005英寸细胞外钨电极(A-M系统)(以其尖端偶联至0.2N.A.200 μ m核心直径光缆(ThorLabs;“光极”)的平端下约400 μ m)在立体定位下插入病毒转导的脑区域。将信号在300Hz与20kHz之间进行带通滤波,交往放大10000x(A-M Systems1800),并数字化(Molecular Devices Digidata1322A),然后使用Clampex软件(Molecular Devices)记录。将Clampex软件用于记录场信号(field signal)和控制耦合到光极的473nm(OEM Laser Systems)及561nm(CrystalLaser)-10mW固态激光二极管光源。在将异氟烷麻醉降低到1%的恒定水平后,在Cg/PL界面(前面1.8mm、侧面0.35mm、腹侧-2.0mm)开始电生理学记录。将光极以-0.1mm的步长(step)腹侧降低。在Matlab(Math Works)使用定制软件,利用高于基线噪声(25至40 μ V)设置的阈值分离事件。在Matlab以200ms的步长从2s的未加权的移动平均值(unweighted moving average)产生热图图像。在外部操作开始时(扫描的开始,光脉冲的起始)重新设定移动平均值。

[0196] 结果

[0197] 为了探测额叶前部微回路内导致行为障碍的E/I平衡的改变的回路生理学表现,制备来自CaMKII α ::SSFO小鼠的急性额叶前部皮质切片。在由20 μ M52-54的胆碱能激动剂卡巴胆碱诱导的进行性异步突触活性(ongoing asynchronous synaptic activity)存在的情况下进行全细胞记录;对于单独的SSFO活化从未观察到尖峰出现。利用单个蓝光脉冲的回路宽广的(Circuit-wide)SSFO活化具有使记录的表达SSFO的神经元去极化 9.8 ± 1.4 mV的作用($n=7$ 个细胞;图4A),部分地通过触发传入突触活性(incoming synaptic activity)的增加(图4A,插图);利用黄光终止两种作用。对表达和非表达细胞中的SSFO的反应的光谱分析显示该增加的活性显示了具有高于20Hz的峰值的宽广光谱范围(图4A-B)。相反地,在PV细胞中表达SSFO的切片中的锥体细胞显示突触活性的强劲减少以及在低频率下功率的减小(图4C),与利用SSFO的活化后增加的PV细胞的活性一致(图4D)。

[0198] 综上所述,这些数据和图3中的c-fos数据显示提高或降低mPFC中的E:I平衡的干预强劲地影响大脑的新皮层神经元活性,但由于只有提高mPFC中的细胞E:I平衡才诱导行为缺陷,因此决定尝试在更深的水平上理解mPFC中的信息加工在任一情况下被改变的原因。为了检查改变的E/I平衡对额叶前部微回路中信息传输的影响,在来自CaMKII α ::SSFO小鼠的急性切片中进行全细胞记录,其中通过形态学和荧光鉴定表达视蛋白的锥体神经元。利用经设计涵盖范围广泛的表达SSFO的细胞随时间的sEPSC率(图5A)的系列模拟EPSC来模拟全细胞膜片钳中的神经元,蓝光活化确实在低sEPSC率上增强兴奋性,但在更高的sEPSC率上导致输入-输出(I/O)曲线的饱和(图5B),从而引起输入EPSC的比率与所得尖峰的比率之间的交互信息的显著减少(-0.40 ± 0.09 比特; $p=0.011$,配对斯氏t-检验;图5C),并且证明增加的细胞E/I平衡定量地妨碍大脑的新皮层主细胞的信息加工。随后,为了检查降

低的细胞E/I平衡对大脑的新皮层主细胞的信息加工的影响,如先前一样记录来自PV::SSFO小鼠的急性切片和具有sEPSC系列的模拟非表达锥体细胞(图5D)。PV细胞中SSFO的活化通过突触抑制在如所预期的记录的锥体细胞中引起IO曲线增益的显著减小(图5E),但在该情况下保持了IO曲线的总体形状而无饱和,并且令人惊讶地对锥体细胞中输入sEPSC的比率与所得的尖峰率之间的交互信息的作用没有显著影响(图5F)。

[0199] 在范围宽广的用于计算交互信息的时间框宽度(图5G-H)间和输入速率框宽度(图5I-J)间,在光活化后,主要mPFC细胞的信息通量的减少在CaMKII α ::SSFO小鼠中相对于在PV::SSFO小鼠中显著更大(4.8倍, $p=0.0144$,非配对t检验),尽管对于PV::SSFO活化而言,存在更大的对尖峰率的影响(如果有的话)(图5B、E)。这些行为和信息数据综合起来举例说明了尽管自然地直觉推测有利于抑制将对信息加工更具破坏性,但事实是对于mPFC回路和行为性能有害的E/I平衡的提高,与障碍例如自闭症与增强的兴奋性表型的临床关联性一致。如果此处显示的细胞E/I平衡诱导的社会功能障碍与在严重的人神经精神性疾病状态例如自闭症和精神分裂症中看到的回路过程和社会功能障碍相关,那么重要的预测可以是这些人疾病状态的特征性电生理学标志也可在该动物模型中看到。由于自闭症和精神分裂症的共同临床电生理学标志是提高的基线(非诱发的) γ 功率(30-80Hz),因此可通过测量清醒的自由移动的小鼠(其具有明确提高的细胞E/I平衡)中的该一致的临床标志来检验该电生理学标志假说。

[0200] 以必需的灵敏性检验该可能性需要额外地将多位点记录电极插入mPFC。虽然这样的与用于光递送的穿透光纤组合的装置的额外存在对于较小的小鼠mPFC回路来说可能太具破坏性和空间侵入性了,但开发和应用了具有两个使得能够进行该实验的重要特征的策略。首先,设计了用于长期植入的记录装置,这样可在习惯于记录电极的动物中进行记录。第二,利用SSFO的光子集成性质,从而使得不仅能够在无需光学硬件的情况下进行行为试验,而且(甚至对于较深的结构如IL和PL)无论在任何时间无需大脑本身的任何光学硬件穿透。为了验证确实可能在深皮层结构中调制表达SSFO的细胞,将CaMKII α ::SSFO或CaMKII α ::EYFP病毒注射和植入仅延伸通过颅骨(图6A)但不进入皮质表面(图6B)的光纤连接器。通过这类动物中的c-fos分析($n=3$ CaMKII α ::SSFO和 $n=4$ CaMKII α ::EYFP对照小鼠; $p=0.034$,双侧t检验;图6C)验证了E/I平衡的提高在该侵入程度最低的构造中的定向性。在条件化过程中提高的细胞E/I平衡显示对于针对电足休克的木僵反应没有影响(这表明完好的对有害非条件刺激的感官知觉);图6D),但对场景($p<0.005$;方差不剂非配对t检验(unpaired t-test with unequal variance))和听觉条件化($p<0.005$;方差不剂非配对t检验;图6D)显示了显著和完全可逆的影响。至关重要地,在在试验之前接受非侵入性光刺激的小鼠中社会行为也受到妨碍($p<0.005$;非配对t检验;图6E),这证明了由SSFO的极度光敏感性提供的机会。

[0201] 为了从此类小鼠获得直接电生理学读出,设计新型长期多点控制器光极(CMO),其中将光纤连接器通过导向管与4根25- μ m钨丝(从纤维尖端开始以0.5mm距离增量切割)偶联,以在照射的组织内同时在不同的深度对神经活性取样(图6F)。在实验结束时,使用电解损毁标记电极位置(图6G),这允许我们鉴定单个记录被采集所处的解剖学位置;不允许发生组织的光纤穿透。在3只注射了CaMKII α ::SSFO病毒并且植入了深度取样光极的小鼠中,首先确认社会行为在基线时是正常的,并且在1s470nm的脉冲后受损(图6H; $p=0.044$,配对

斯氏t检验)。相同的动物显示光对于新型特体的探究没有影响,然而,与我们先前的发现一致(图6H; $p=0.82$,配对斯氏t检验)。此外,在熟悉的居住笼中(未显示)和新型旷场中的运动行为1s的活化脉冲(图7A)后未被显著改变,虽然出现朝向减少的焦虑的倾向(在中心所花的时间%增加;图7A)。在这些在CMO植入的背景中验证行为表型的实验过程中,同时记录所有通道上的活性,分析由SSF0活化引起的变化。

[0202] 首先使用方案分析动物的居住笼中的记录,所述方案由2分钟活化前基线、1s470nm的光脉冲、2分钟的连续记录和随后30s590nm的光脉冲至完全使SSF0去活化组成。在每一只小鼠中重复该方案4次,计算试验间的单位活性描述的平均值(图6I)。在来自表达SSF0的区域内的通道的多单位记录中,响应蓝光脉冲的尖峰显著增加(图6I-J;在调制的通道上观察到 $77 \pm 18\%$,相较于未调制的通道上的 $-3.4 \pm 4.4\%$;在3只记录的小鼠中, $n=4$ 个调制的和4个未调制的通道; $p=0.02$;双侧t检验)。

[0203] 还观察到来自调制的通道的局部场电位(LFP)记录的明显变化。使用小波光谱分析产生每一个通道上的LFP活性的时间分辨谱图(图6K-L;左),并且所述分析定量活化前基线与活化后时期之间的平均变化。在未调制的通道中,不存在明显的活化脉冲对LFP的效应(图6K,左),与基线时期相比较,在活化后和去活化后时期中所有频率间功率仅有少量平均减小(图6K,右)。相反地,位于病毒转导的区域内的调制的通道显示了利用SSF0活化后 γ 频段活性的显著增加(图6L),该增加在时间上严格限制于活化期并且可被590nm去活化脉冲终止(图6L,右)。 γ 频段活性的增加与相同通道内更低频率的功率的减小相关,所述通道显示增加的 γ 活性(图6L,右;插图)。在利用此类动物进行的行为实验过程中进行的记录的类似分析在实验中显示一致增加的 γ 频段活性,在所述实验中,在旷场实验中的行为试验(图7B)、社会探究试验(图7C)和新鲜事物探究试验(图7D)的过程中递送1s470nm的光脉冲。这些数据综合起来显示了在自闭症和精神分裂症中看到的生理学生物标志(提高的基线 γ 频段活性)对于具有社交困难的自由行动的哺乳动物的选择性提高的细胞E/I平衡是保守的。

[0204] 最后测试在其它脑区域不存在的情况下,脑的新皮层回路(其在体内诱导和表达提高的E/I平衡诱导的 γ)(图6)是否就本身也可产生该生理现象。虽然急性切片比体内制剂更难以诱导清晰的振荡模式,因此即使在该简化的制剂中,在中等CaMKII::SSF0活化(图4A-B)的条件下电流钳膜电位中20-80Hz频段功率的提高是明显的,使用可获得的最有效的视紫红质通道蛋白(CaMKII::C1V1-E162T)在电流钳膜电位中获得30-80Hz γ 的提高。

[0205] 在高光功率密度(12mW mm^{-2})上,在 γ 频率(30-80Hz;图8B)上观察到功率的最大增加。在更低的光功率(4.3mW mm^{-2} 和 0.6mWmm^{-2})上,观察到在 γ 功率随着更低频率上的功率相对增加而单调减小(θ ,8-12Hz和 β ,15-25Hz;图8B-C)。在电压钳条件下,在0mV下记录的IPSC和在-60mV下的EPSC的对应光谱都得到了分辨(图8A)。这些结果综合起来和前额叶皮质中的稳定的E/I平衡的提高与内在产生的 γ 振荡的生理学生物标志之间单调关系一致。

[0206] 此处所示数据意味着作为mPFC中提高的E/I比率的结果的社会行为的特定妨碍。原则上,提高的E/I比率也可通过抑制抑制性细胞来实现,尽管可预期该功能丢失法仅在不可能事件中显示作用,即存在抑制性细胞的高度稳定的基线活性模式。实际上,当将AAV5-EF1 α -DIO-eNpHR3.0-EYFP病毒在PV::Cre小鼠的两个半球中注射进入mPFC(产生PV::eNpHR3.0小鼠)和植入双侧光纤连接器以进行居住笼或三室社交探究范例时,未发现行为障碍与在这些条件下eNpHR3.0的活化相关(图9),这正如已预期的一样。然而,对于提高的

细胞E/I比率极为重要的一个更重要的问题是预测:增加的抑制可在拯救与提高的E/I平衡(由兴奋性神经细胞中的SSFO活化引起的)相关的行为缺陷的方向上起作用(图3)。

[0207] C1V1是从强壮团藻的VChR1阳离子通道与莱茵衣藻的ChR1阳离子通道衍生的嵌合光敏蛋白。C1V1及其变体允许以高效能(因此使得能够进行剂量-反应试验)、低脱敏作用(从而允许诱导E/I平衡的阶梯状变化)和红移激发(以允许在相同神经回路内驱不同的群体),来进行皮质E/I的提高的实验操作和皮质切片中的 γ 振荡。对本实施例,选择具有最高的使得能够进行最可靠的剂量-反应的效能的C1V1变体。为了检验上述预测,设计用于自由移动的小鼠的组合光遗传学实验,将C1V1和SSFO的独特光谱和时间性质组合,以用SSFO驱动锥体细胞和使用C1V1-E122T/E162T共活化(或不)PV细胞来进行最大光谱分离。用AAV5-CaMKII α -SSFO与AAV5-EF1 α -DIO-C1V1-E122T E162T的组合注射入PV::Cre小鼠的mPFC以在锥体神经元中表达SSFO和在PV细胞中表达C1V1(此处称为SSFO/C1V1小鼠;n=7)。仅用CaMKII α -SSFO病毒(CaMKII α ::SSFO,n=9)注射第二组小鼠,用CaMKII α -EYFP(n=10)注射对照小鼠。2至4周后,在三室社交试验中,在4个不同的照射范例下,利用用于C1V1-E122T/E162T(利用590nm的光驱动的)与SSFO(驱动强大电流,在470nm具有峰值;图10A)之间分离的时间频谱(spectrotemporal)策略测试小鼠。在无递送的光的情况下进行初始表征以获得基线社会偏爱(图10B)。在该试验中,全部小鼠显示明显的对社交室的偏爱(图10B,图11;CaMKII α -SSFO小鼠,p=0.002;SSFO/C1V1小鼠,p=0.0003;CaMKII α -EYFP小鼠,p=0.032)。

[0208] 随后利用新来的幼年小鼠测试相同范例中的小鼠,同时递送590nm的脉冲激光来仅活化SSFO/C1V1小鼠的PV细胞中的C1V1-E122T/E162T(图10B)。在该试验中,所有小鼠都显示对新来的幼年小鼠的正常偏爱(图10C和图11;CaMKII α -SSFO小鼠,p=0.008;SSFO/C1V1小鼠,p=0.005;CaMKII α -EYFP小鼠,p=0.014),与早期PV::SSFO实验一致。在第3试验中,在试验前的适应期中利用2s470nm的光脉冲活化SSFO(图10B)。在该试验中,CaMKII α ::SSFO组和SSFO/C1V1组都未显示对社交室的偏爱(图10C-D;分别地p=0.21和p=0.87),与我们先前在CaMKII α ::SSFO小鼠中的观察一致的严重社会行为缺陷(图3I)。注意,此处时间频谱分离的重要性:虽然使用470nm光以最大地驱动SSFO将同样必然也包括驱动C1V1-E122T/E162T,但C1V1-E122T/E162T的对比瞬态和SSFO稳定性确保在2s470nm的光脉冲后进行的行为测试仅在SSFO活性存在的情况下进行。最后,通过补偿细胞E/I平衡,通过在整个行为测试期中递送10Hz的470nm的光的脉冲在于兴奋性细胞中活化SSFO的同时再在抑制性细胞中另外活化C1V1-E122T/E162T来寻求拯救行为缺陷(图10A-B)。在这些照射条件下,CaMKII α ::SSFO小鼠(不具有待活化的C1V1-E122T/E162T,经历纯的细胞E/I平衡的提高)显示对社交室不具有明显偏爱的严重社会行为障碍(图10C;p=0.59)但相反地,在SSFO/C1V1小鼠中,通过抑制性神经元的该补偿增加的活性恢复了对社交室的偏爱(图10D;p=0.005)。如所预期的,对照CaMKII α -EYFP小鼠在2s470nm和10Hz470nm的刺激范例下显示明显的对社交室的偏爱(图11)。

[0209] 讨论

[0210] 多重证据已表明提高的细胞兴奋-抑制(E/I)平衡牵涉自闭症和精神分裂症的药物治疗无反应的社会和信息加工障碍的病因学。但无1)对个别细胞类型的选择性控制和2)区分这样的控制对回路的发育和成熟的长期效应与E/I异常对牵涉的神经回路的操作的瞬即效应的情况下,难以正式地检验该假说。皮质微回路内的兴奋与抑制的密切相互作用和

药理学复杂性已排除了提高的细胞E/I平衡作为在各种疾病模型和人患者中观察到的行为缺陷的核心组成的确认。此处,通过使用两个新型光遗传学工具,获得对提高的细胞E/I平衡假说的直接支持,并且所得的社会功能障碍的回路-生理学表现得到了鉴定。

[0211] 为了更全面理解提高的E/I状态,在体外和体内探测潜在的回路生理学表现,鉴于细胞E/I平衡的提高可引发的范围广泛的回路现象,这无疑将是非常复杂的。已发现细胞E/I平衡的提高以在皮质回路内定量妨碍信息传输的方式改变主要神经元的传递函数。明显相反地,E/I平衡的下降(其不影响社会功能,尽管对主细胞尖峰率存在极大影响)不妨碍信息传输并且保持主要神经元传递函数的总体形状。还鉴定了与社会功能障碍关联的疾病状态的临床标志(提高的基线 γ 功率)与处于提高的细胞E/I状态中的自由行为过程中的电生理发现之间的对应。通过使用新型长期多点控制器光极(CMO)装置进行清醒的行动(behaving)小鼠的组合记录和光学调制,已发现提高的E/I状态与通过直接经历提高的细胞E/I平衡的区域产生的和该区域内表现的强劲稳定的 γ 振荡相关。在此类小鼠中,观察到在提高的E/I- γ 状态下社会行为的特定妨碍但无运动行为或对无生命物体的探究的总体改变。

[0212] 提高的E/I平衡对社会行为的影响显示了对于PFC的特异性的证据,因为在主视皮质中的其它地方增加E/I比率不妨碍社会行为。PFC网络,因其广泛的皮质下连接性,从而可能特别容易在E/I平衡微妙变化的背景中诱发精神病相关症状,一个得到与精神病相关的PFC抑制性标志的改变的观察和自闭症个体中观察到的改变的PFC节律支持的概念。未观察到在其中PV阳性神经元被抑制的条件下的行为障碍;值得注意地,完全抑制PV阳性神经元的能力受到表达外显率(DIO::SSFO在约25%的PV阳性细胞中表达)和影响将取决于靶向细胞的基线活性水平的事实限制。

[0213] 最后,为了尝试恢复由提高的E/I平衡产生的障碍,使用一个家族的新型广泛工程化的红光活化视紫红质通道蛋白(统称为C1V1变体)来独立地调制兴奋性神经元(使用SSFO)和抑制性PV神经元(使用aC1V1变体)。通过使用两个光遗传学工具的活性的集成时间频谱分离的创新形式,发现增加的细胞抑制改善了已经历细胞E/I平衡的提高的小鼠的社会行为缺陷。

[0214] 意在为本发明的纯粹示例并因而应当不被认为以任何方式限制本发明的实施例也说明和详述了上述本发明的方面和实施方案。上述实施例和详细描述通过举例说明的方式但非限制的方式来提供。本说明书中引述的所有公开案、专利申请和专利通过引用并入本文,就如同每一个个别的公开案、专利申请或专利特别地且单个地通过引用并入一样。具体地,本文中引用的所有公开案为了描述和公开可能与本发明结合使用的组合物和方法的目的明确地通过引用并入本文。虽然前述发明已通过举例说明和实施例(目的是为了清楚地理解)进行了一定详细地描述,但根据本发明的教导对于本领域技术人员来说很明显的是,可在不背离所述权利要求的精神和范围的情况下对其进行某些改变和变动。

[0215] 1.Pardo,C.A.&Eberhart,C.G.The neurobiology of autism.Brain Pathol17,434-447(2007).

[0216] 2.O'Donovan,M.C.,Craddock,N.J.&Owen,M.J.Genetics of psychosis; insights from views across the genome.Hum Genet126,3-12(2009).

[0217] 3.Sudhof,T.C.Neuroligins and neuroligins link synaptic function to

cognitive disease. *Nature* 455, 903–911 (2008).

[0218] 4. Patterson, P.H. Modeling autistic features in animals. *Pediatr Res* 69, 34R–40R, doi:10.1203/PDR.0b013e318212b80f (2011).

[0219] 5. Folstein, S.E. & Rosen-Sheidley, B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet* 2, 943–955 (2001).

[0220] 6. Walsh, T. 等, Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science* 320, 539–543 (2008).

[0221] 7. Markram, K. & Markram, H. The intense world theory—a unifying theory of the neurobiology of autism. *Front Hum Neurosci* 4, 224 (2010).

[0222] 8. Vattikuti, S. & Chow, C.C. A computational model for cerebral cortical dysfunction in autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry* 67, 672–678 (2010).

[0223] 9. Kehrer, C., Maziashvili, N., Dugladze, T. & Gloveli, T. Altered Excitatory–Inhibitory Balance in the NMDA–Hypofunction Model of Schizophrenia. *Front Mol Neurosci* 1, 6 (2008).

[0224] 10. Rubenstein, J.L. Three hypotheses for developmental defects that may underlie some forms of autism spectrum disorder. *Curr Opin Neurol* 23, 118–123 (2010).

[0225] 11. Rubenstein, J.L. & Merzenich, M.M. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* 2, 255–267 (2003).

[0226] 12. Gogolla, N. 等, Common circuit defect of excitatory–inhibitory balance in mouse models of autism. *J Neurodev Disord* 1, 172–181 (2009).

[0227] 13. Hashimoto, T. 等, Conserved regional patterns of GABA-related transcript expression in the neocortex of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 165, 479–489 (2008).

[0228] 14. Hashimoto, T. 等, Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J Neurosci* 23, 6315–6326 (2003).

[0229] 15. Lewis, D.A., Hashimoto, T. & Volk, D.W. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6, 312–324 (2005).

[0230] 16. Lewis, D.A., Volk, D.W. & Hashimoto, T. Selective alterations in prefrontal cortical GABA neurotransmission in schizophrenia: a novel target for the treatment of working memory dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 174, 143–150 (2004).

[0231] 17. Lisman, J.E. 等, Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci* 31, 234–242 (2008).

[0232] 18. Belforte, J.E. 等, Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat Neurosci* 13, 76–83 (2010).

- [0233] 19. Blatt, G. J. 等, Density and distribution of hippocampal neurotransmitter receptors in autism: an autoradiographic study. *J Autism Dev Disord* 31, 537-543 (2001).
- [0234] 20. Bourgeron, T. A synaptic trek to autism. *Curr Opin Neurobiol* 19, 231-234 (2009).
- [0235] 21. Belmonte, M. K., Gomot, M. & Baron-Cohen, S. Visual attention in autism families: unaffected'sibs share atypical frontal activation. *J Child Psychol Psychiatry* 51, 259-276 (2010).
- [0236] 22. Gomot, M., Belmonte, M. K., Bullmore, E. T., Bernard, F. A. & Baron-Cohen, S. Brain hyper-reactivity to auditory novel targets in children with high-functioning autism. *Brain* 131, 2479-2488 (2008).
- [0237] 23. Dichter, G. S., Felder, J. N. & Bodfish, J. W. Autism is characterized by dorsal anterior cingulate hyperactivation during social target detection. *Soc Cogn Affect Neurosci* 4, 215-226 (2009).
- [0238] 24. Orekhova, E. V. 等, Excess of high frequency electroencephalogram oscillations in boys with autism. *Biol Psychiatry* 62, 1022-1029 (2007).
- [0239] 25. Rojas, D. C., Maharajh, K., Teale, P. & Rogers, S. J. Reduced neural synchronization of gamma-band MEG oscillations in first-degree relatives of children with autism. *BMC Psychiatry* 8, 66 (2008).
- [0240] 26. Gillberg, C. & Billstedt, E. Autism and Asperger syndrome: coexistence with other clinical disorders. *Acta Psychiatr Scand* 102, 321-330 (2000).
- [0241] 27. Canitano, R. Epilepsy in autism spectrum disorders. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 16, 61-66 (2007).
- [0242] 28. Rippon, G., Brock, J., Brown, C. & Boucher, J. Disordered connectivity in the autistic brain: challenges for the "new psychophysiology". *Intl J Psychophysiol* 63, 164-172 (2007).
- [0243] 29. Dani, V. S. 等, Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 12560-12565 (2005).
- [0244] 30. Etherton, M. R., Blaiss, C. A., Powell, C. M. & Sudhof, T. C. Mouse neurexin-1alpha deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 17998-18003 (2009).
- [0245] 31. Tabuchi, K. 等, A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* 318, 71-76 (2007).
- [0246] 32. Chao, H. T. 等, Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* 468, 263-269 (2010).
- [0247] 33. Moretti, P. 等, Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci* 26, 319-327 (2006).

- [0248] 34. Rinaldi, T., Perrodin, C. & Markram, H. Hyper-connectivity and hyper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valproic Acid animal model of autism. *Front Neural Circuits* 2, 4 (2008).
- [0249] 35. Rinaldi, T., Silberberg, G. & Markram, H. Hyperconnectivity of local neocortical microcircuitry induced by prenatal exposure to valproic acid. *Cereb Cortex* 18, 763–770 (2008).
- [0250] 36. Adamantidis, A. R., Zhang, F., Aravanis, A. M., Deisseroth, K. & de Lecea, L. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450, 420–424 (2007).
- [0251] 37. Huber, D. 等, Sparse optical microstimulation in barrel cortex drives learned behaviour in freely moving mice. *Nature* 451, 61–64 (2008).
- [0252] 38. Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O. & Deisseroth, K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698–702 (2009).
- [0253] 39. Tsai, H. C. 等, Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* 324, 1080–1084 (2009).
- [0254] 40. Hira, R. 等, Transcranial optogenetic stimulation for functional mapping of the motor cortex. *J Neurosci Methods* 179, 258–263 (2009).
- [0255] 41. Covington, H. E., 3rd 等, Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 30, 16082–16090 (2010).
- [0256] 42. Cruikshank, S. J., Urabe, H., Nurmikko, A. V. & Connors, B. W. Pathway-specific feedforward circuits between thalamus and neocortex revealed by selective optical stimulation of axons. *Neuron* 65, 230–245 (2010).
- [0257] 43. Haubensak, W. 等, Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. *Nature* 468, 270–276 (2010).
- [0258] 44. Kravitz, A. V. & Kreitzer, A. C. Optogenetic manipulation of neural circuitry in vivo. *Curr Opin Neurobiol* (2011).
- [0259] 45. Berndt, A., Yizhar, O., Gunaydin, L. A., Hegemann, P. & Deisseroth, K. Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci* 12, 229–234 (2009).
- [0260] 46. Diester, I. 等, An optogenetic toolbox designed for primates. *Nat Neurosci* 14, 387–397 (2011).
- [0261] 47. Bamann, C., Gueta, R., Kleinlogel, S., Nagel, G. & Bamberg, E. Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry* 49, 267–278 (2010).
- [0262] 48. Dittgen, T. 等, Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 18206–18211 (2004).
- [0263] 49. Winslow, J. T. Mouse social recognition and preference. *Curr Protoc Neurosci* 第8章第8单元16 (2003).
- [0264] 50. Ni, A. M. & Maunsell, J. H. Microstimulation reveals limits in detecting

different signals from a local cortical region. *Curr Biol* 20, 824-828 (2010).

[0265] 51. May, S.S. 等, Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav* 3, 287-302 (2004).

[0266] 52. Ben-Ari, Y., Krnjevic, K., Reinhardt, W. & Ropert, N. Intracellular observations on the disinhibitory action of acetylcholine in the hippocampus. *Neuroscience* 6, 2475-2484 (1981).

[0267] 53. Buhl, E.H., Tamas, G. & Fisahn, A. Cholinergic activation and tonic excitation induce persistent gamma oscillations in mouse somatosensory cortex in vitro. *J Physiol* 513 (第1部分), 117-126 (1998).

[0268] 54. van Aerde, K.I. 等, Flexible spike timing of layer 5 neurons during dynamic beta oscillation shifts in rat prefrontal cortex. *J Physiol* 587, 5177-5196 (2009).

[0269] 55. Wilson, T.W., Rojas, D.C., Reite, M.L., Teale, P.D. & Rogers, S.J. Children and adolescents with autism exhibit reduced MEG steady-state gamma responses. *Biol Psychiatry* 62, 192-197 (2007).

序列表

<110> DEISSEROTH, KARL
YIZHAR, OFER
FENNO, LIEF

<120> 稳定阶跃函数视蛋白及其使用方法

<130> STAN-901W0

<140> US2011/059390

<141>

<150> US10/43128

<151> 2010-07-23

<150> 61/228,027

<151> 2009-07-23

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows 4.0版

<210> 1

<211> 310

<212> PRT

<213> 莱茵衣藻

<400> 1

Met Asp Tyr Gly Gly Ala Leu Ser Ala Val Gly Arg Glu Leu Leu Phe
1 5 10 15
Val Thr Asn Pro Val Val Val Asn Gly Ser Val Leu Val Pro Glu Asp
20 25 30
Gln Cys Tyr Cys Ala Gly Trp Ile Glu Ser Arg Gly Thr Asn Gly Ala
35 40 45
Gln Thr Ala Ser Asn Val Leu Gln Trp Leu Ala Ala Gly Phe Ser Ile
50 55 60
Leu Leu Leu Met Phe Tyr Ala Tyr Gln Thr Trp Lys Ser Thr Cys Gly
65 70 75 80
Trp Glu Glu Ile Tyr Val Cys Ala Ile Glu Met Val Lys Val Ile Leu
85 90 95
Glu Phe Phe Phe Glu Phe Lys Asn Pro Ser Met Leu Tyr Leu Ala Thr
100 105 110
Gly His Arg Val Gln Trp Leu Arg Tyr Ala Glu Trp Leu Leu Thr Cys
115 120 125
Pro Val Ile Leu Ile His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Ser Asn Asp
130 135 140
Tyr Ser Arg Arg Thr Met Gly Leu Leu Val Ser Asp Ile Gly Thr Ile
145 150 155 160
Val Trp Gly Ala Thr Ser Ala Met Ala Thr Gly Tyr Val Lys Val Ile
165 170 175
Phe Phe Cys Leu Gly Leu Cys Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala
180 185 190
Ala Lys Ala Tyr Ile Glu Gly Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Arg Cys
195 200 205
Arg Gln Val Val Thr Gly Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly
210 215 220
Met Phe Pro Ile Leu Phe Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly Val Leu
225 230 235 240
Ser Val Tyr Gly Ser Thr Val Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Met Ser
245 250 255
Lys Asn Cys Trp Gly Leu Leu Gly His Tyr Leu Arg Val Leu Ile His
260 265 270
Glu His Ile Leu Ile His Gly Asp Ile Arg Lys Thr Thr Lys Leu Asn
275 280 285
Ile Gly Gly Thr Glu Ile Glu Val Glu Thr Leu Val Glu Asp Glu Ala
290 295 300
Glu Ala Gly Ala Val Pro
305 310

[0001]

<210> 2

<211> 344

<212> PRT

<213> 菜茵衣藻

<400> 2

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

[0002]

<210> 3

<211> 300

<212> PRT

<213> 强壮团藻

<400> 3

Met Asp Tyr Pro Val Ala Arg Ser Leu Ile Val Arg Tyr Pro Thr Asp
 1 5 10 15
 Leu Gly Asn Gly Thr Val Cys Met Pro Arg Gly Gln Cys Tyr Cys Glu
 20 25 30
 Gly Trp Leu Arg Ser Arg Gly Thr Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ala Ile
 35 40 45
 Thr Leu Gln Trp Val Val Phe Ala Leu Ser Val Ala Cys Leu Gly Trp
 50 55 60
 Tyr Ala Tyr Gln Ala Trp Arg Ala Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val Tyr
 65 70 75 80
 Val Ala Leu Ile Glu Met Met Lys Ser Ile Ile Glu Ala Phe His Glu
 85 90 95
 Phe Asp Ser Pro Ala Thr Leu Trp Leu Ser Ser Gly Asn Gly Val Val
 100 105 110
 Trp Met Arg Tyr Gly Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Leu Leu Ile
 115 120 125
 His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Ser Lys Arg Thr
 130 135 140
 Met Gly Leu Leu Val Ser Asp Val Gly Cys Ile Val Trp Gly Ala Thr
 145 150 155 160
 Ser Ala Met Cys Thr Gly Trp Thr Lys Ile Leu Phe Phe Leu Ile Ser

```

165          170          175
Leu Ser Tyr Gly Met Tyr Thr Tyr Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile
180          185          190
Glu Ala Phe His Thr Val Pro Lys Gly Ile Cys Arg Glu Leu Val Arg
195          200          205
Val Met Ala Trp Thr Phe Phe Val Ala Trp Gly Met Phe Pro Val Leu
210          215          220
Phe Leu Leu Gly Thr Glu Gly Phe Gly His Ile Ser Pro Tyr Gly Ser
225          230          235          240
Ala Ile Gly His Ser Ile Leu Asp Leu Ile Ala Lys Asn Met Trp Gly
245          250          255
Val Leu Gly Asn Tyr Leu Arg Val Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu
260          265          270
Tyr Gly Asp Ile Arg Lys Lys Gln Lys Ile Thr Ile Ala Gly Glu Glu
275          280          285
Met Glu Val Glu Thr Leu Val Ala Glu Glu Glu Asp
290          295          300

```

```

<210> 4
<211> 747
<212> PRT
<213> 强壮团藻

```

```

<400> 4
Met Asp His Pro Val Ala Arg Ser Leu Ile Gly Ser Ser Tyr Thr Asn
1          5          10          15
Leu Asn Asn Gly Ser Ile Val Ile Pro Ser Asp Ala Cys Phe Cys Met
20          25          30
Lys Trp Leu Lys Ser Lys Gly Ser Pro Val Ala Leu Lys Met Ala Asn
35          40          45
Ala Leu Gln Trp Ala Ala Phe Ala Leu Ser Val Ile Ile Leu Ile Tyr
50          55          60
Tyr Ala Tyr Ala Thr Trp Arg Thr Thr Cys Gly Trp Glu Glu Val Tyr
65          70          75          80
Val Cys Cys Val Glu Leu Thr Lys Val Val Ile Glu Phe Phe His Glu
85          90          95
Phe Asp Glu Pro Gly Met Leu Tyr Leu Ala Asn Gly Asn Arg Val Leu
100          105          110
Trp Leu Arg Tyr Gly Glu Trp Leu Leu Thr Cys Pro Val Ile Leu Ile
115          120          125
His Leu Ser Asn Leu Thr Gly Leu Lys Asp Asp Tyr Asn Lys Arg Thr
130          135          140
Met Arg Leu Leu Val Ser Asp Val Gly Thr Ile Val Trp Gly Ala Thr
145          150          155          160
Ala Ala Met Ser Thr Gly Tyr Ile Lys Val Ile Phe Phe Leu Leu Gly
165          170          175
Cys Met Tyr Gly Ala Asn Thr Phe Phe His Ala Ala Lys Val Tyr Ile
180          185          190
Glu Ser Tyr His Thr Val Pro Lys Gly Leu Cys Arg Gln Leu Val Arg
195          200          205
Ala Met Ala Trp Leu Phe Phe Val Ser Trp Gly Met Phe Pro Val Leu
210          215          220
Phe Leu Leu Gly Pro Glu Gly Phe Gly His Leu Ser Val Tyr Gly Ser
225          230          235          240
Thr Ile Gly His Thr Ile Ile Asp Leu Leu Ser Lys Asn Cys Trp Gly
245          250          255
Leu Leu Gly His Phe Leu Arg Leu Lys Ile His Glu His Ile Leu Leu
260          265          270
Tyr Gly Asp Ile Arg Lys Val Gln Lys Ile Arg Val Ala Gly Glu Glu
275          280          285
Leu Glu Val Glu Thr Leu Met Thr Glu Glu Ala Pro Asp Thr Val Lys
290          295          300
Lys Ser Thr Ala Gln Tyr Ala Asn Arg Glu Ser Phe Leu Thr Met Arg
305          310          315          320
Asp Lys Leu Lys Glu Lys Gly Phe Glu Val Arg Ala Ser Leu Asp Asn
325          330          335
Ser Gly Ile Asp Ala Val Ile Asn His Asn Asn Tyr Asn Asn Ala
340          345          350
Leu Ala Asn Ala Ala Ala Val Gly Lys Pro Gly Met Glu Leu Ser
355          360          365
Lys Leu Asp His Val Ala Ala Asn Ala Ala Gly Met Gly Gly Ile Ala
370          375          380
Asp His Val Ala Thr Thr Ser Gly Ala Ile Ser Pro Gly Arg Val Ile
385          390          395          400
Leu Ala Val Pro Asp Ile Ser Met Val Asp Tyr Phe Arg Glu Gln Phe

```

[0003]

405 410 415
 Ala Gln Leu Pro Val Gln Tyr Glu Val Val Pro Ala Leu Gly Ala Asp
 420 425 430
 Asn Ala Val Gln Leu Val Val Gln Ala Ala Gly Leu Gly Gly Cys Asp
 435 440 445
 Phe Val Leu Leu His Pro Glu Phe Leu Arg Asp Lys Ser Ser Thr Ser
 450 455 460
 Leu Pro Ala Arg Leu Arg Ser Ile Gly Gln Arg Val Ala Ala Phe Gly
 465 470 475 480
 Trp Ser Pro Val Gly Pro Val Arg Asp Leu Ile Glu Ser Ala Gly Leu
 485 490 495
 Asp Gly Trp Leu Glu Gly Pro Ser Phe Gly Leu Gly Ile Ser Leu Pro
 500 505 510
 Asn Leu Ala Ser Leu Val Leu Arg Met Gln His Ala Arg Lys Met Ala
 515 520 525
 Ala Met Leu Gly Gly Met Gly Gly Met Leu Gly Ser Asn Leu Met Ser
 530 535 540
 Gly Ser Gly Gly Val Gly Leu Met Gly Ala Gly Ser Pro Gly Gly Gly
 545 550 555 560
 Gly Gly Ala Met Gly Val Gly Met Thr Gly Met Gly Met Val Gly Thr
 565 570 575
 Asn Ala Met Gly Arg Gly Ala Val Gly Asn Ser Val Ala Asn Ala Ser
 580 585 590
 Met Gly Gly Gly Ser Ala Gly Met Gly Met Gly Met Met Gly Met Val
 595 600 605
 Gly Ala Gly Val Gly Gly Gln Gln Gln Met Gly Ala Asn Gly Met Gly
 610 615 620
 Pro Thr Ser Phe Gln Leu Gly Ser Asn Pro Leu Tyr Asn Thr Ala Pro
 625 630 635 640
 Ser Pro Leu Ser Ser Gln Pro Gly Gly Asp Ala Ser Ala Ala Ala Ala
 645 650 655
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ser Asn Ser Met Asn
 660 665 670
 Ala Met Gln Ala Gly Gly Ser Val Arg Asn Ser Gly Ile Leu Ala Gly
 675 680 685
 Gly Leu Gly Ser Met Met Gly Pro Pro Gly Ala Pro Ala Ala Pro Thr
 690 695 700
 Ala Ala Ala Thr Ala Ala Pro Ala Val Thr Met Gly Ala Pro Gly Gly
 705 710 715 720
 Gly Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ala Glu Met Leu Gln Gln Leu Met Ala
 725 730 735
 Glu Ile Asn Arg Leu Lys Ser Glu Leu Gly Glu
 740 745

[0004]

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 5
 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> 6
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 6
 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
 35 40 45

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 变体
<222> (2)... (2)
<223> xaa = 任意氨基酸

[0005]

<400> 7
Phe Xaa Tyr Glu Asn Glu
1 5

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 8
Phe Cys Tyr Glu Asn Glu Val
1 5

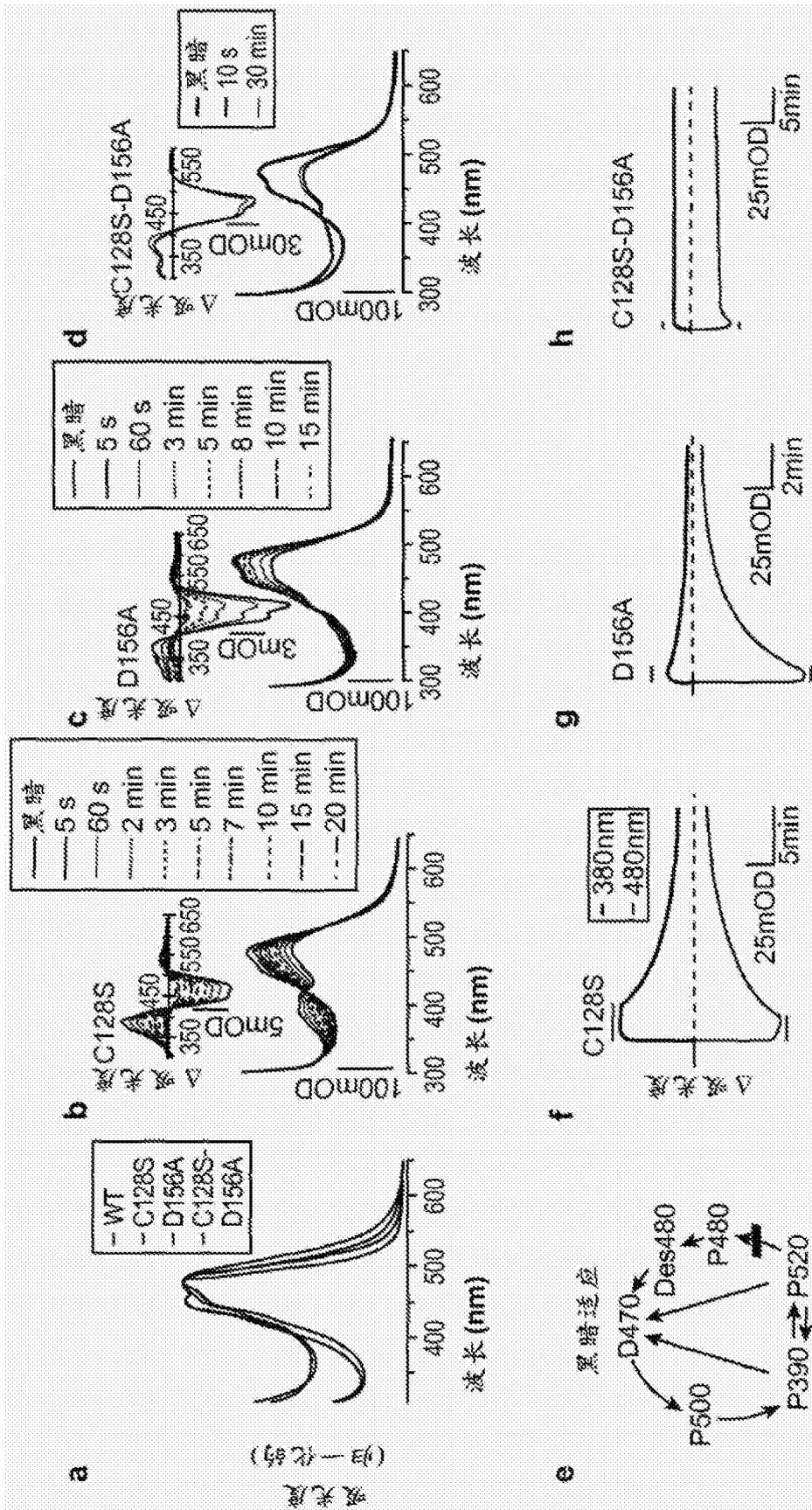


图1

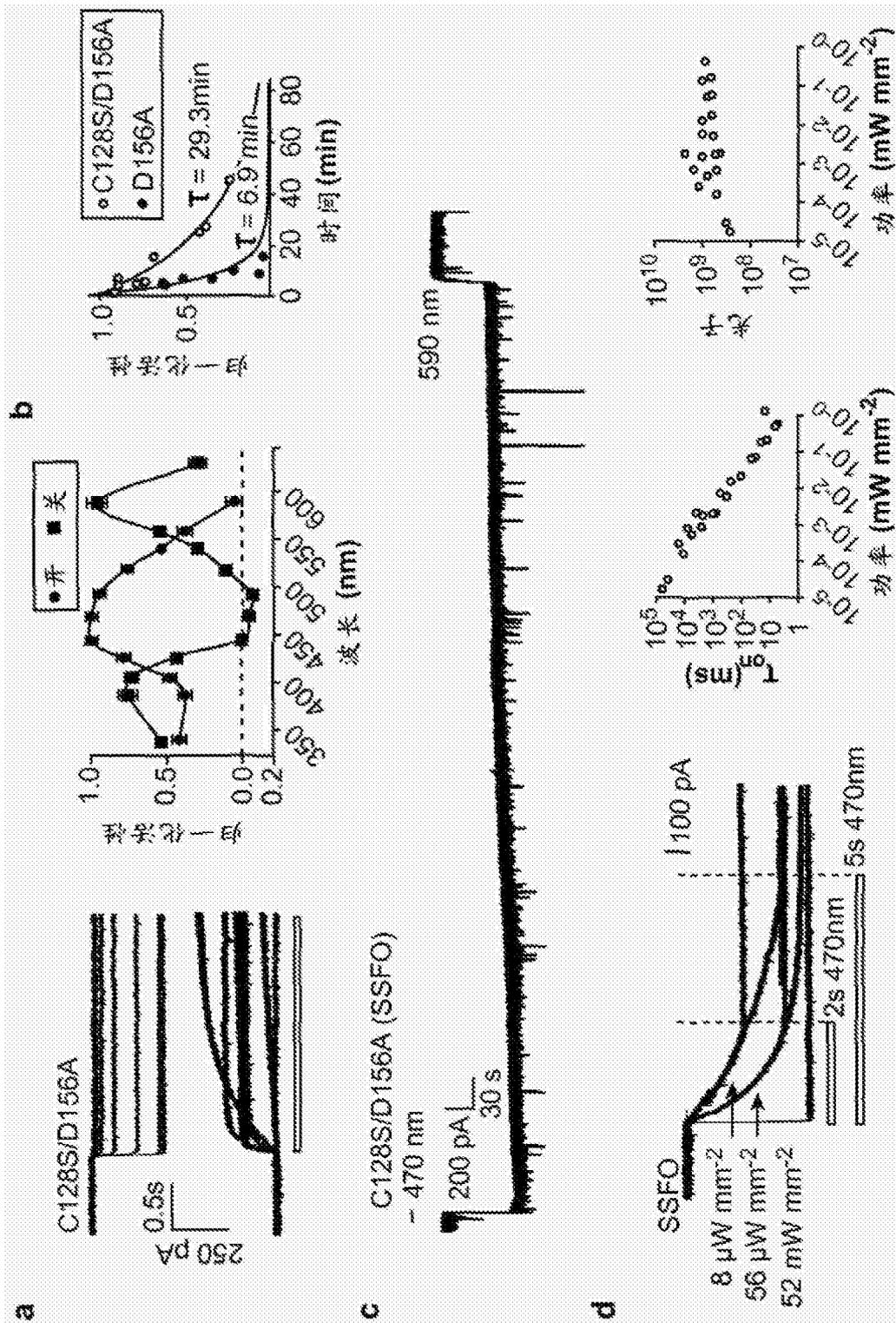


图2

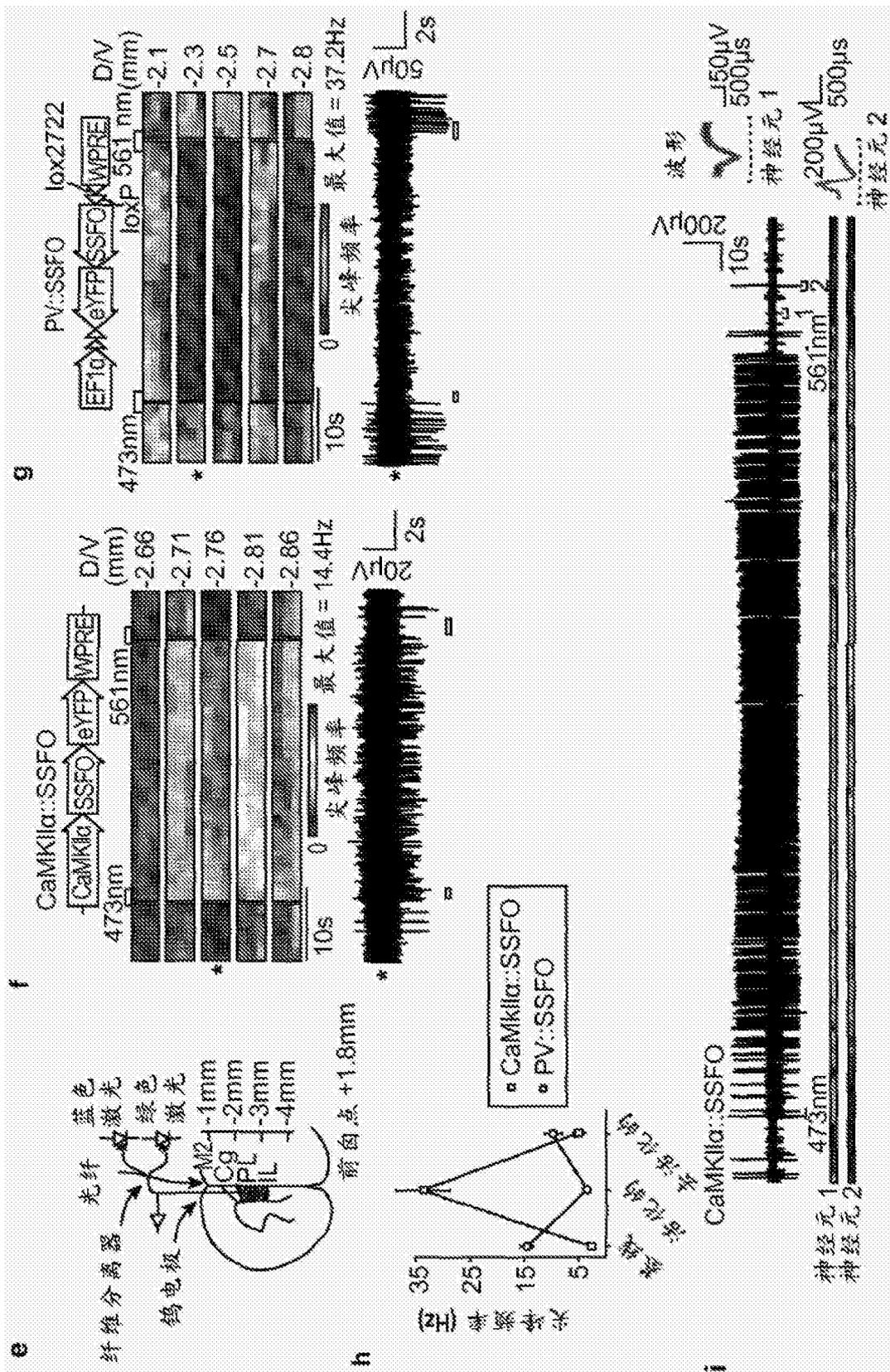


图2(续)

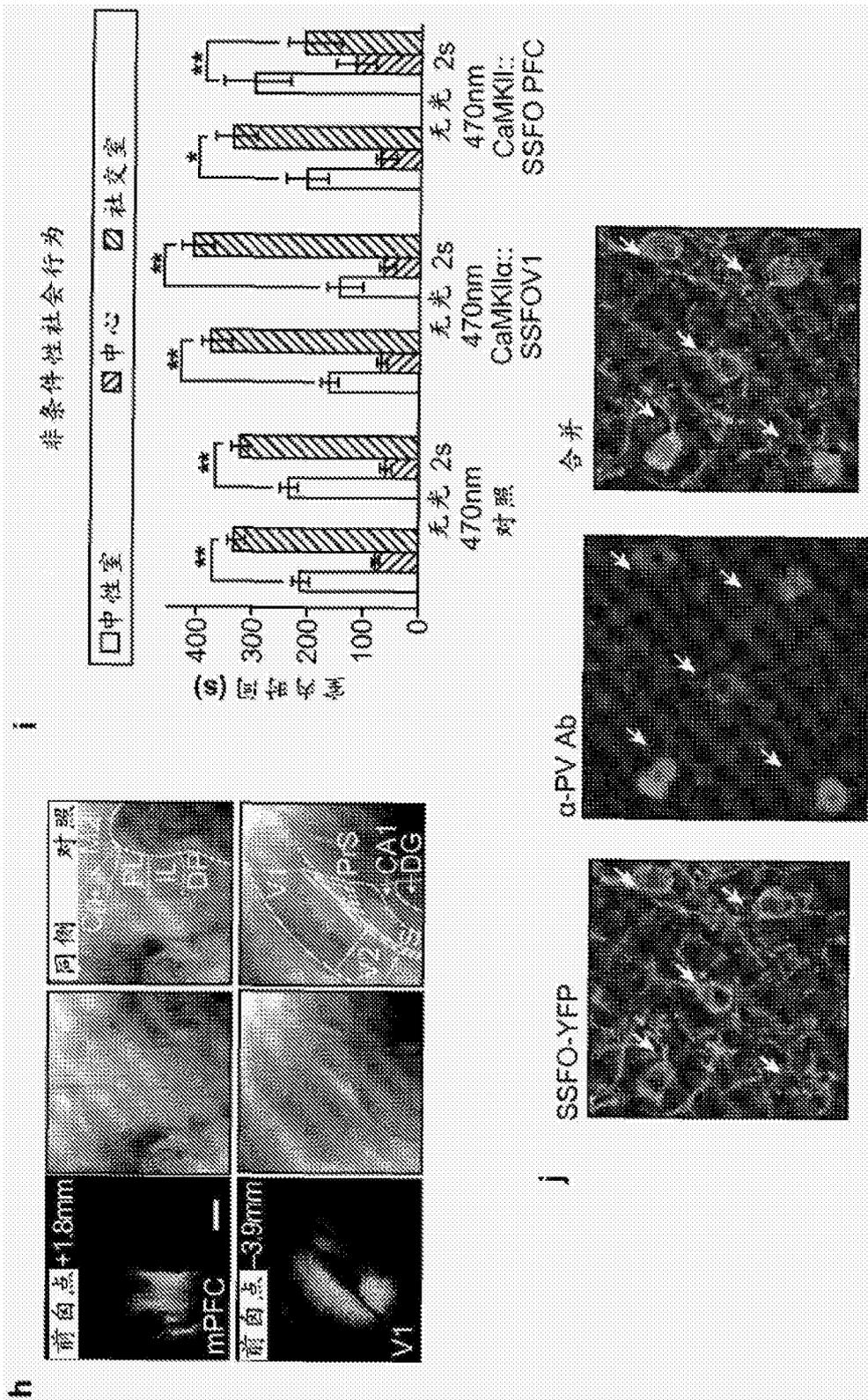


图3(续1)

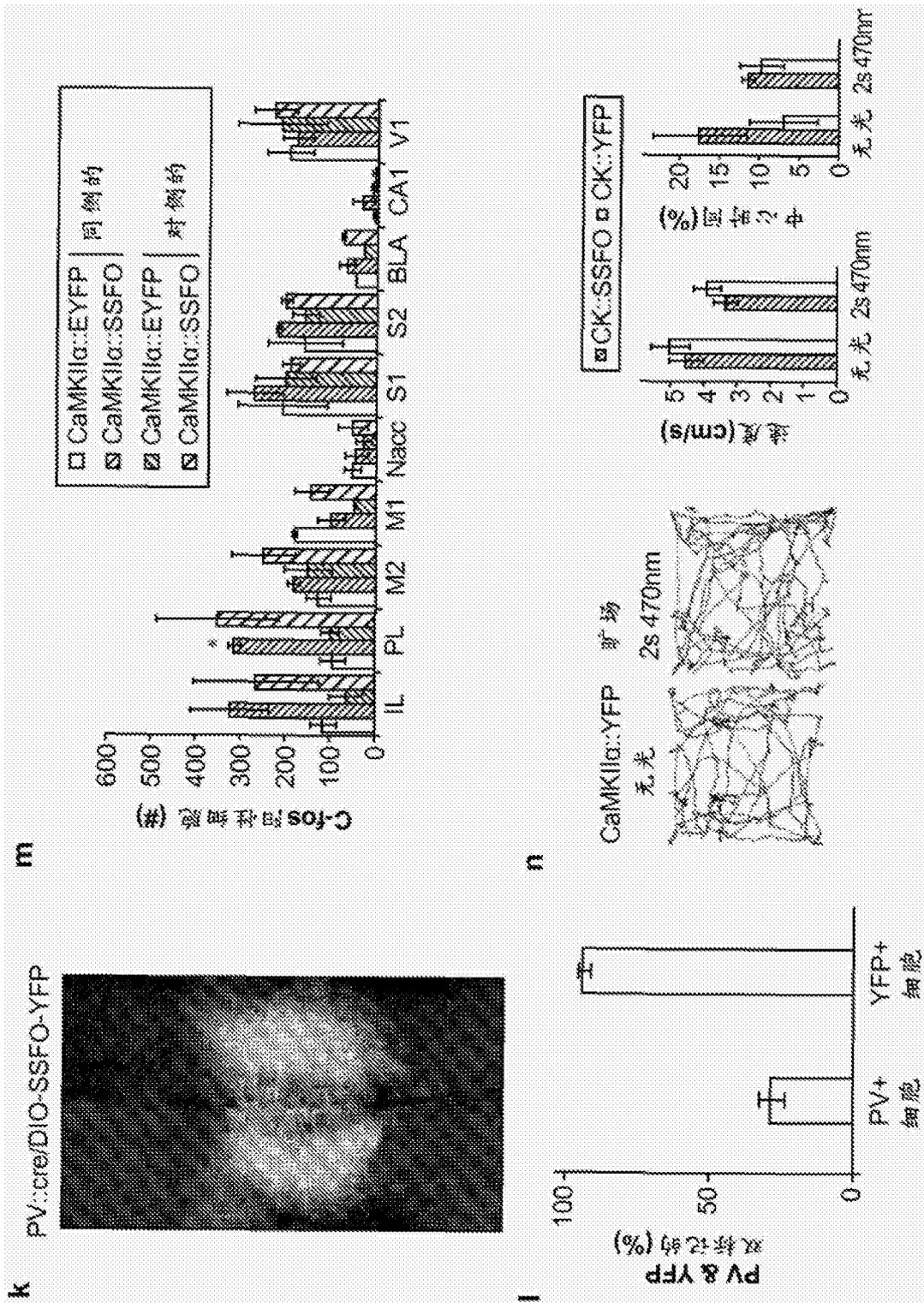


图3(续2)

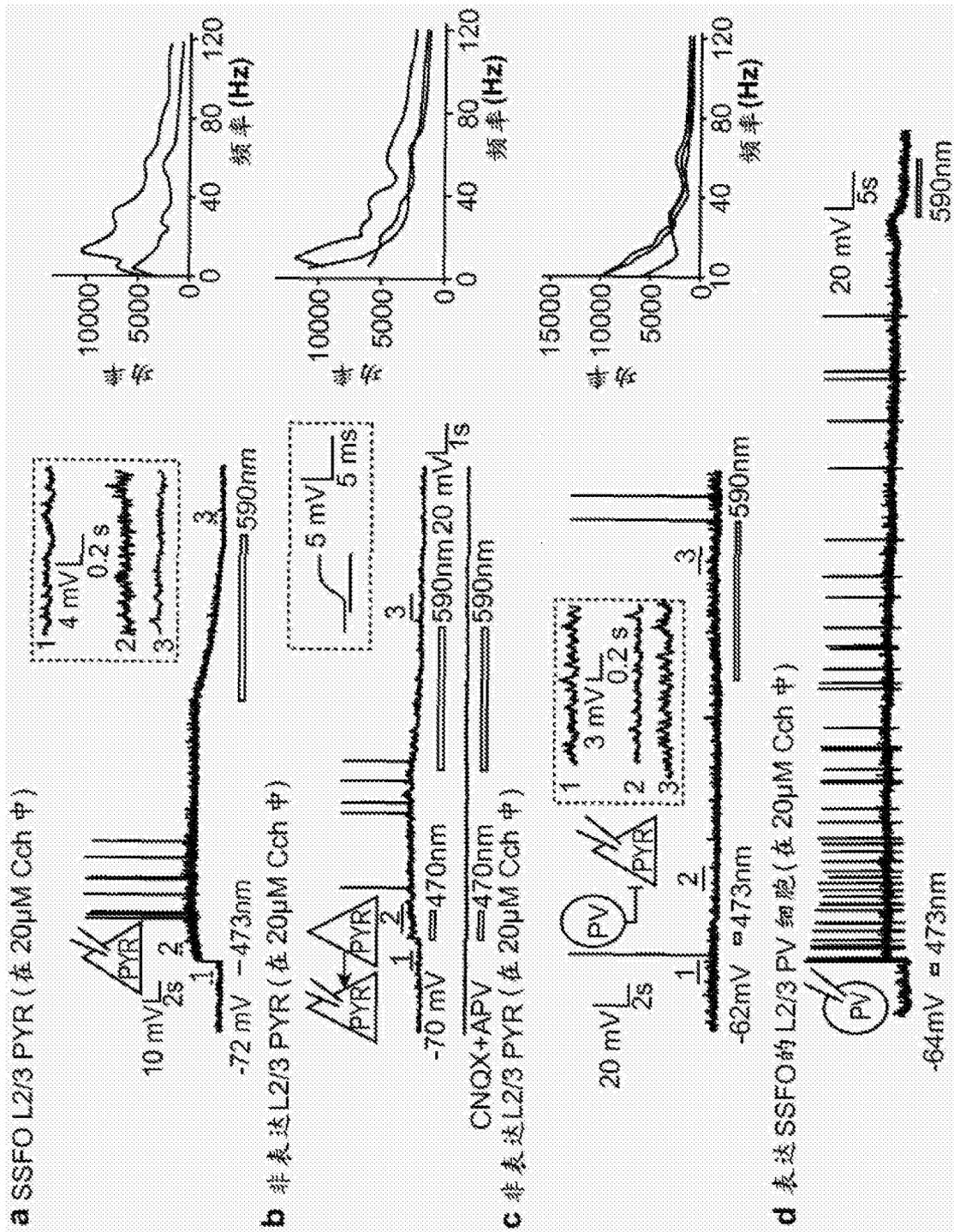


图4

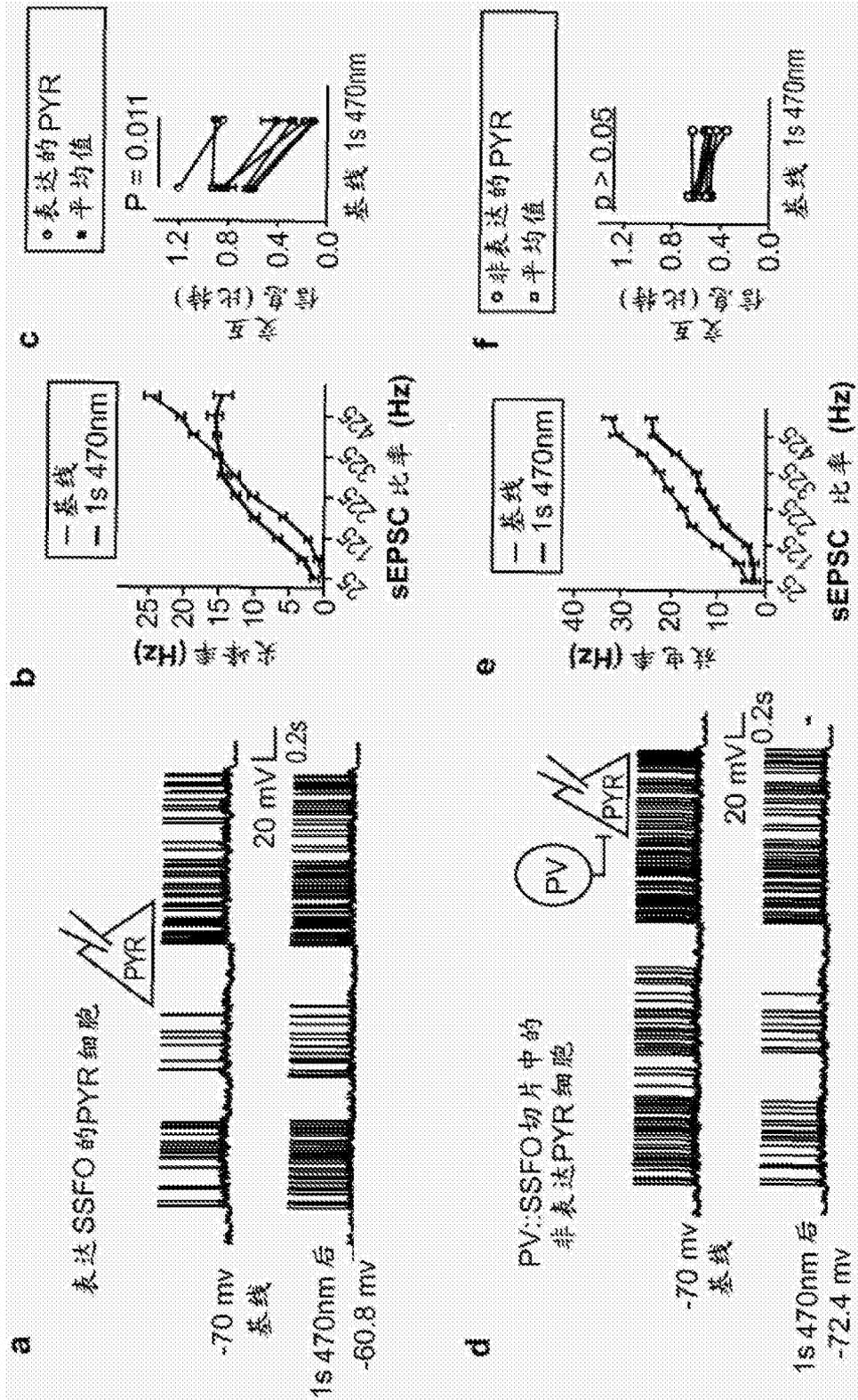


图5

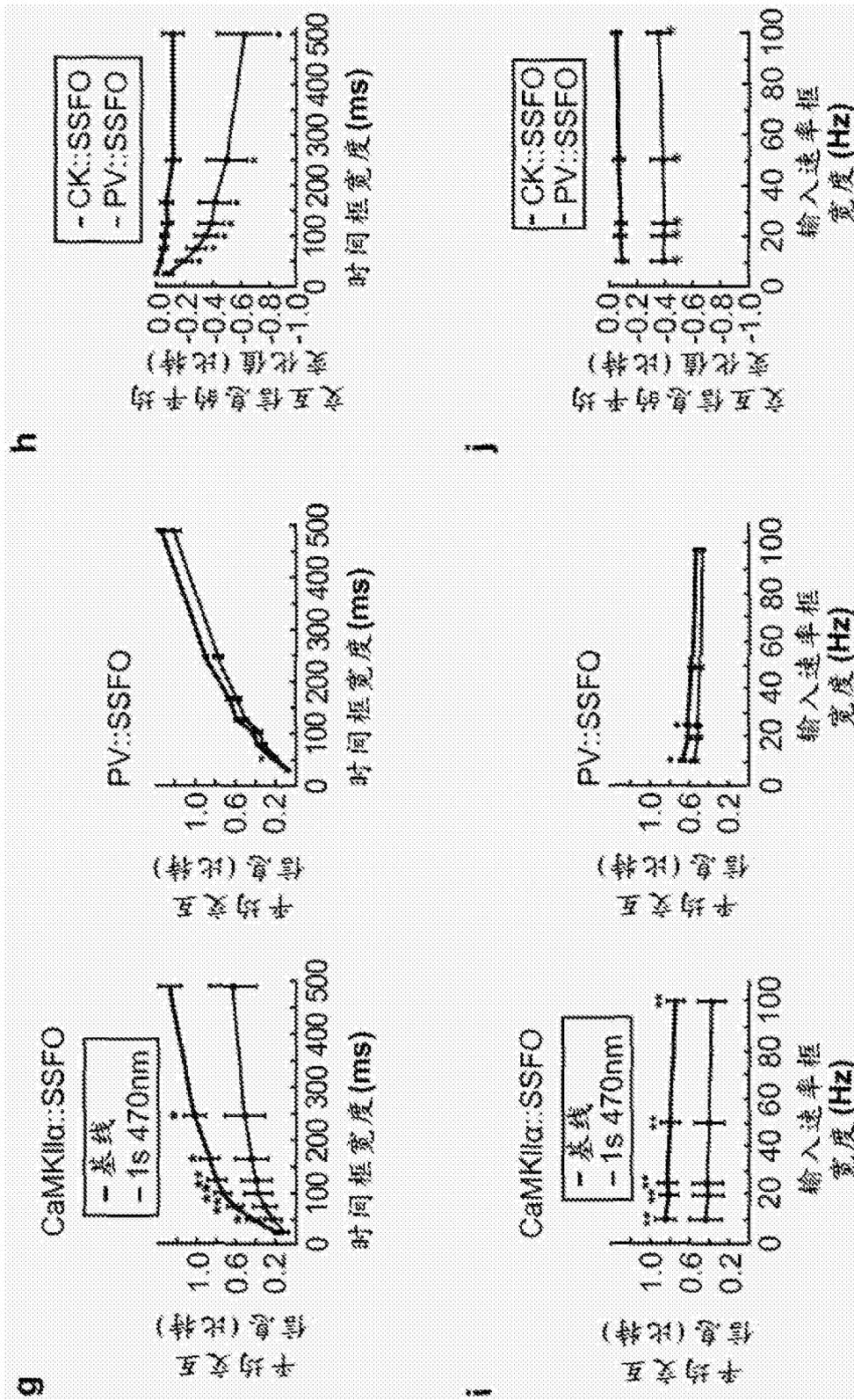


图5(续)

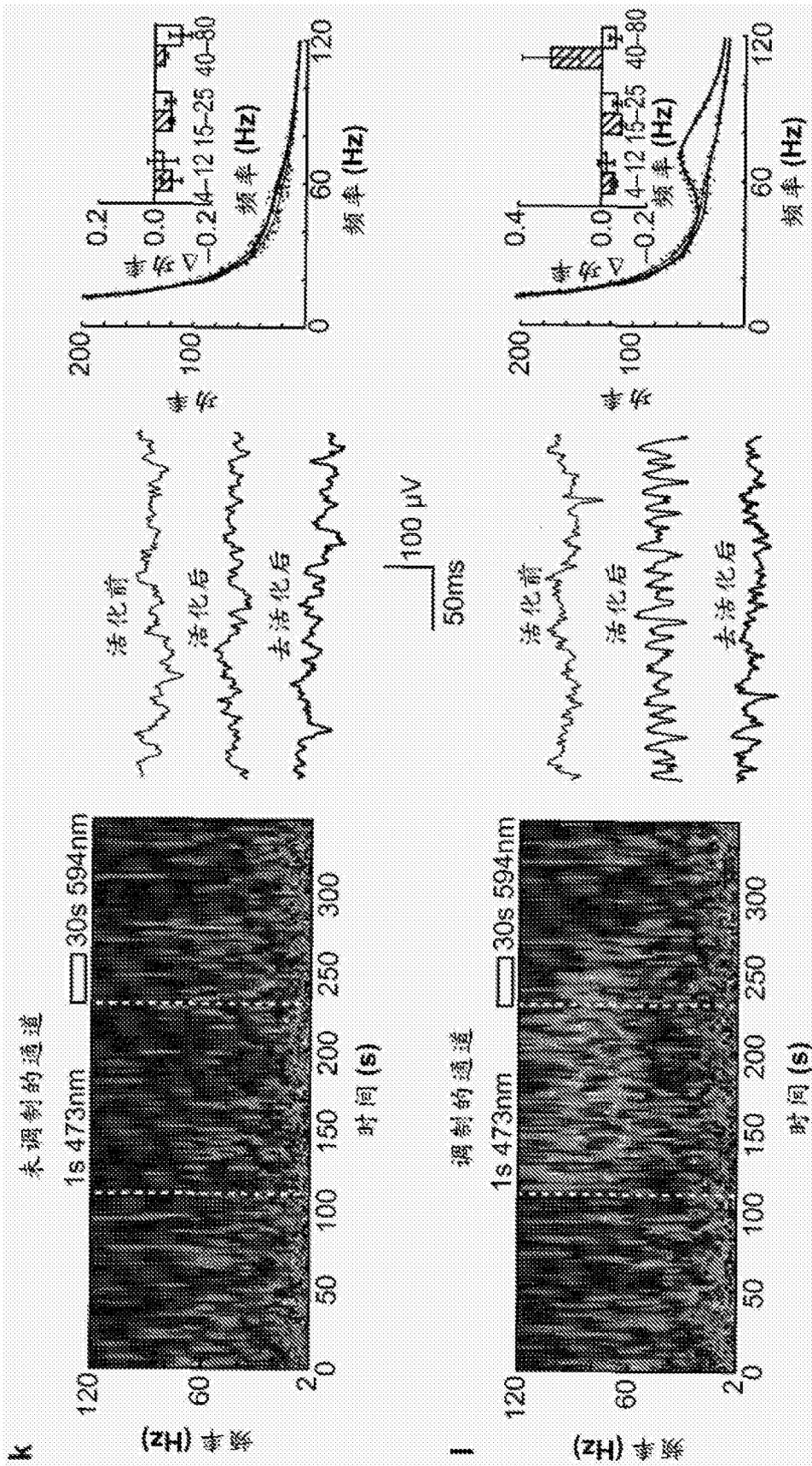


图6(续)

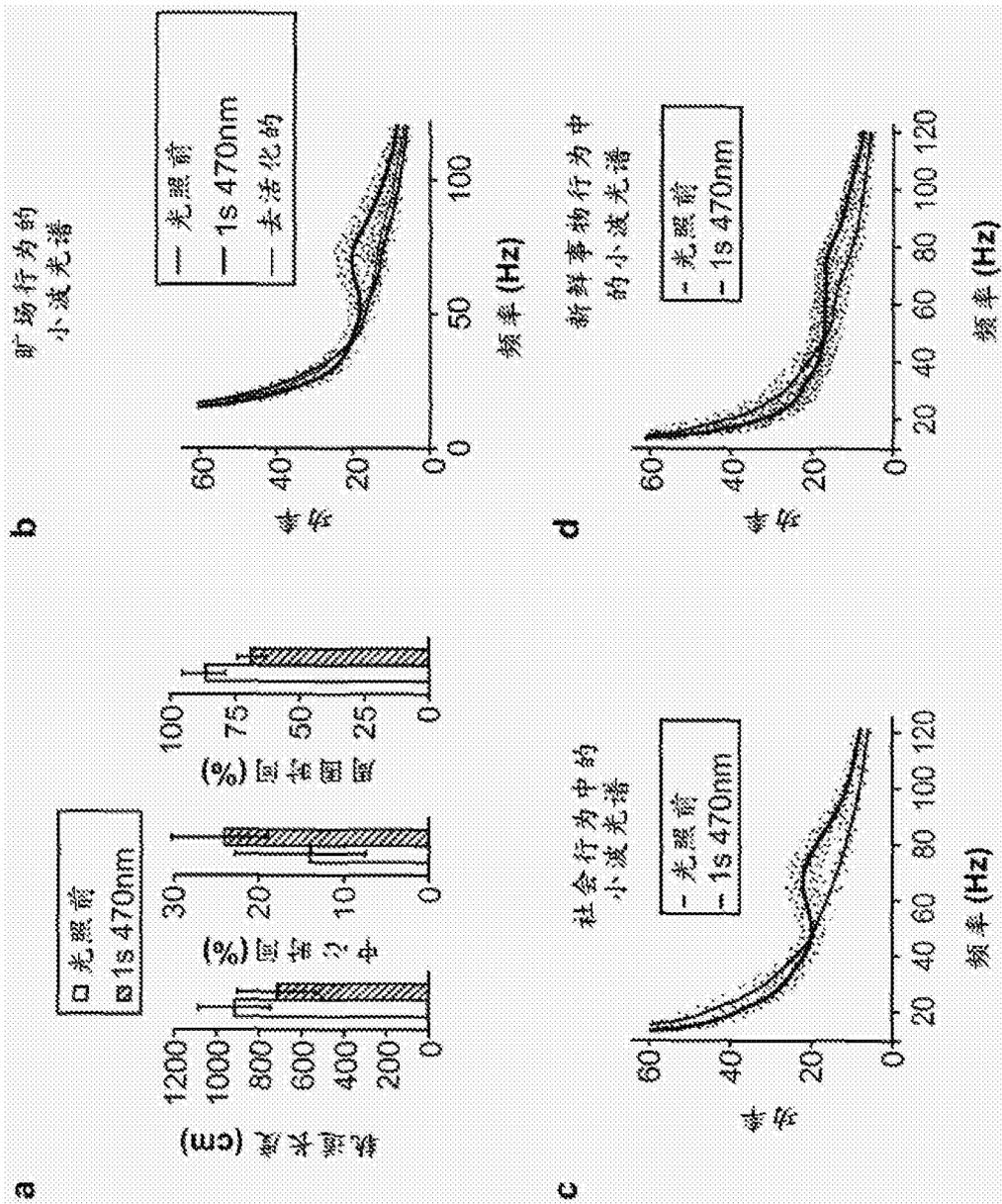


图7

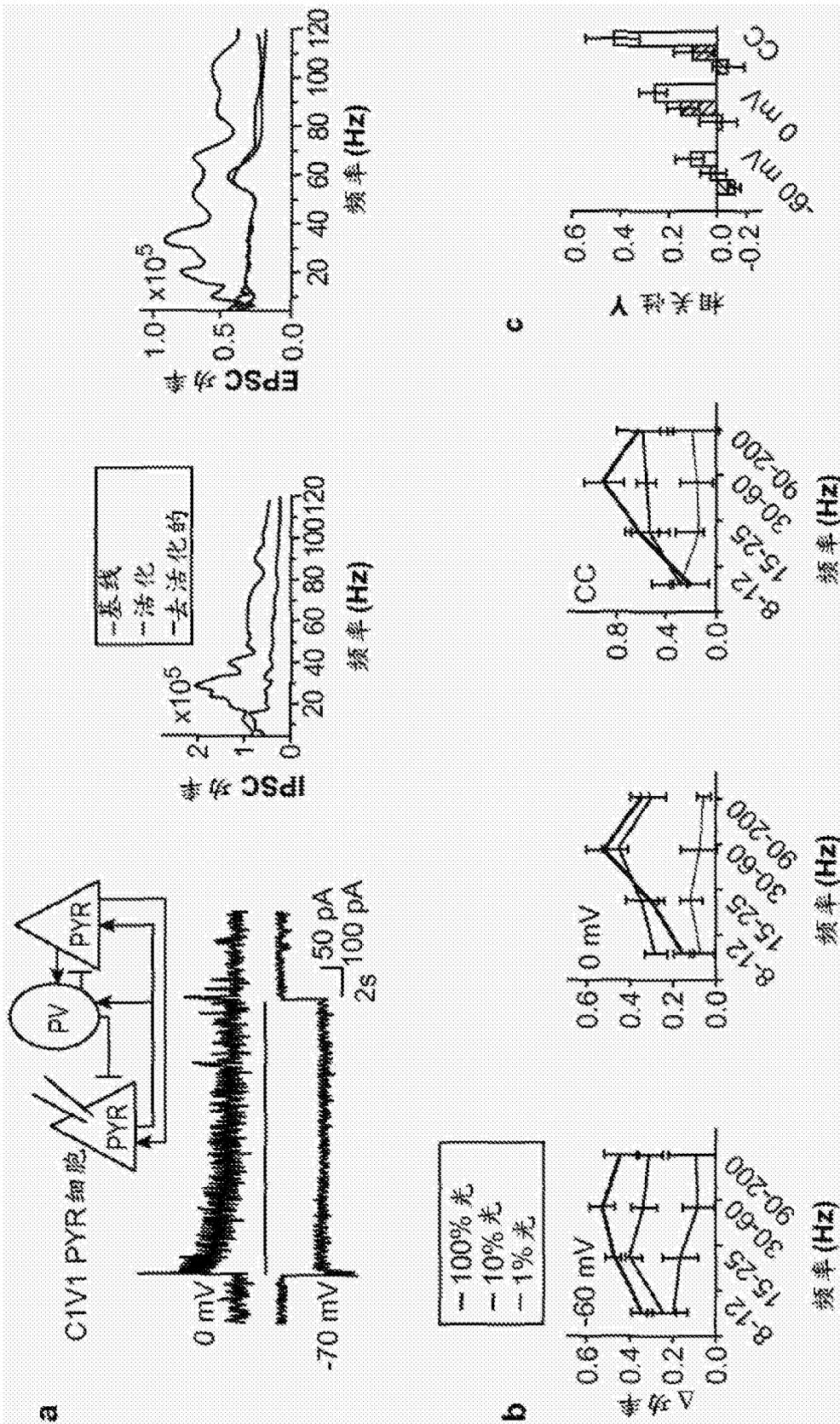


图8

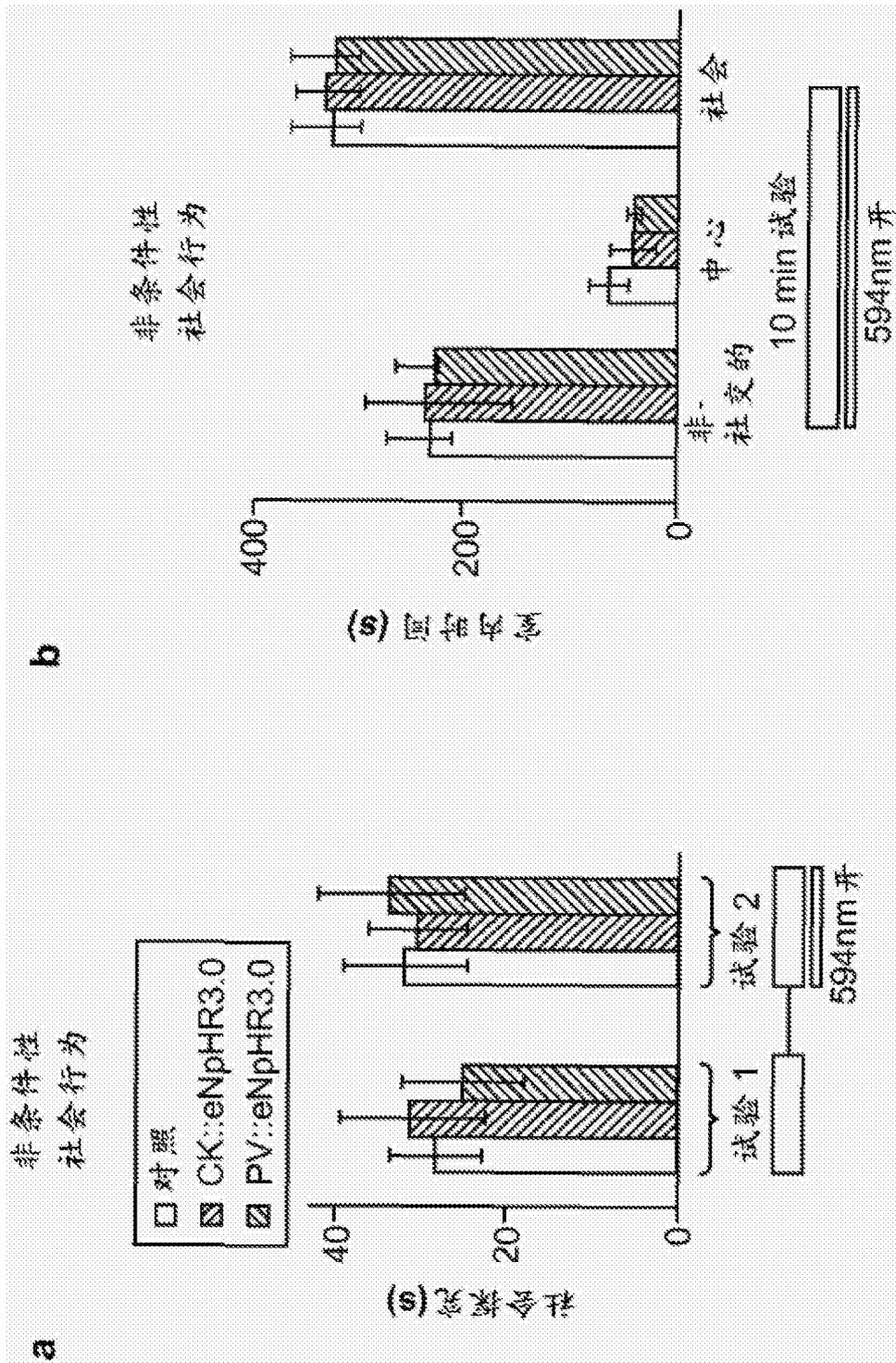


图9

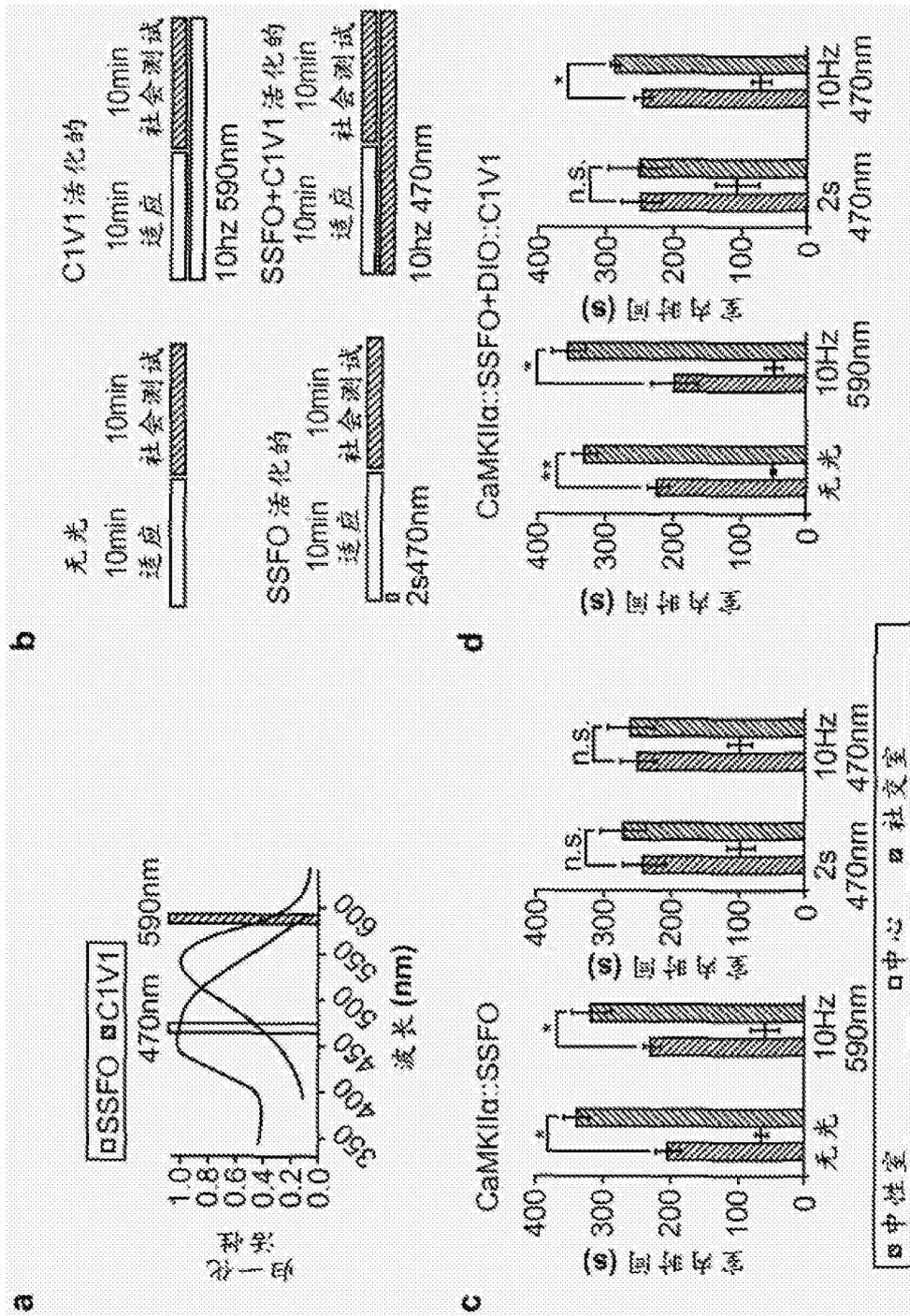


图10

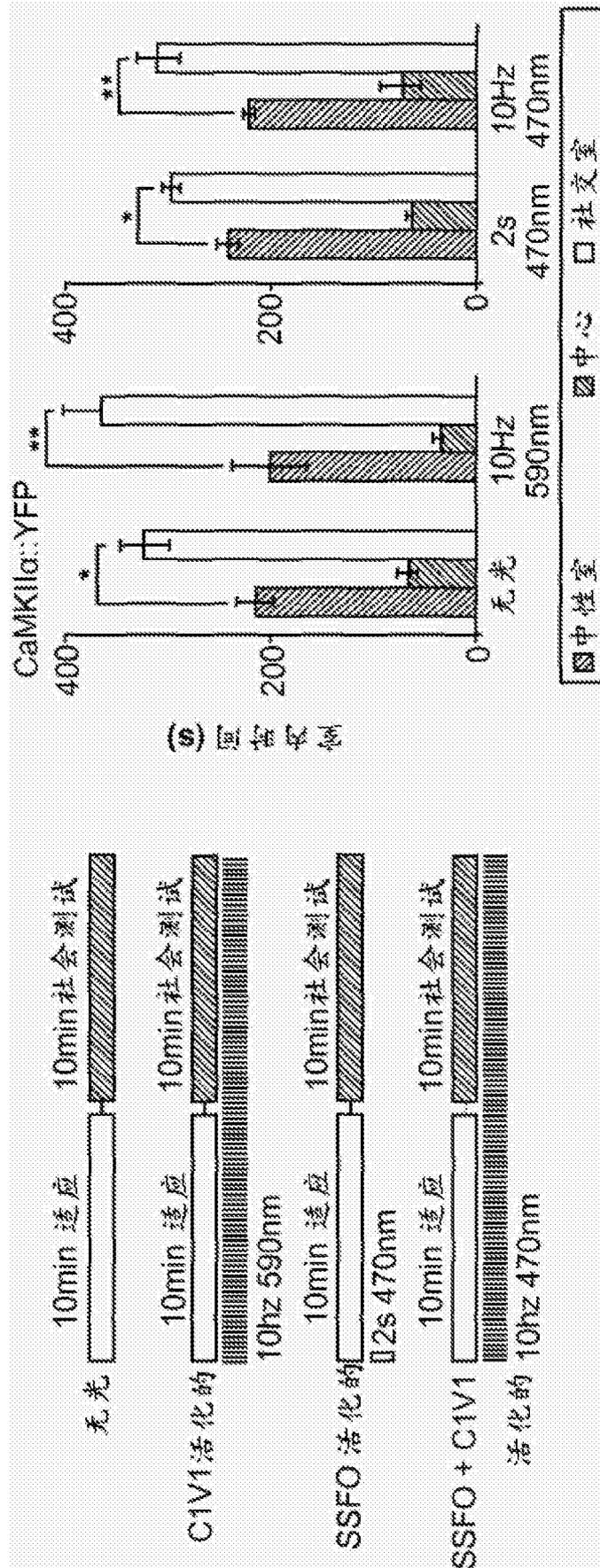


图11

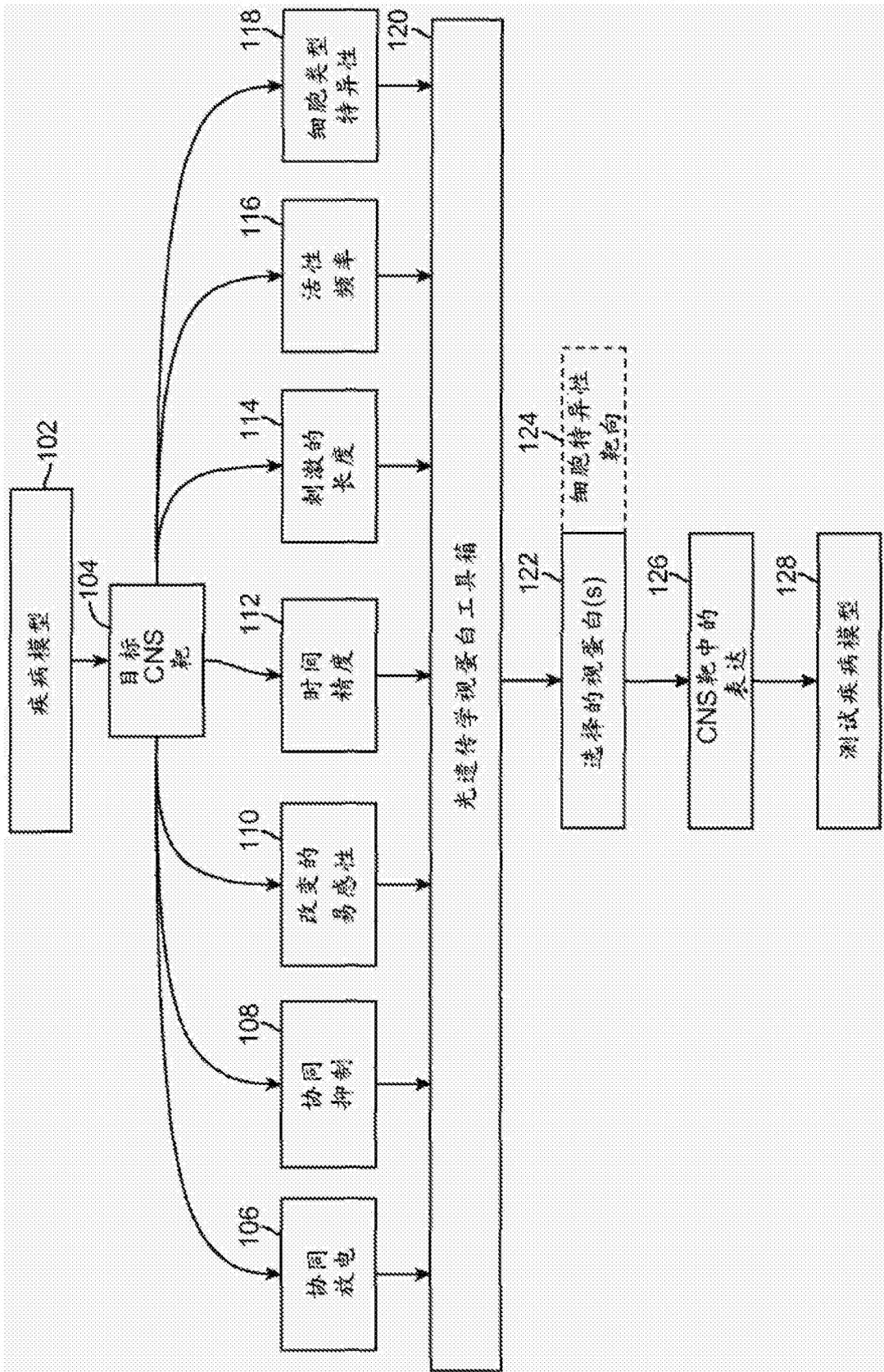


图12

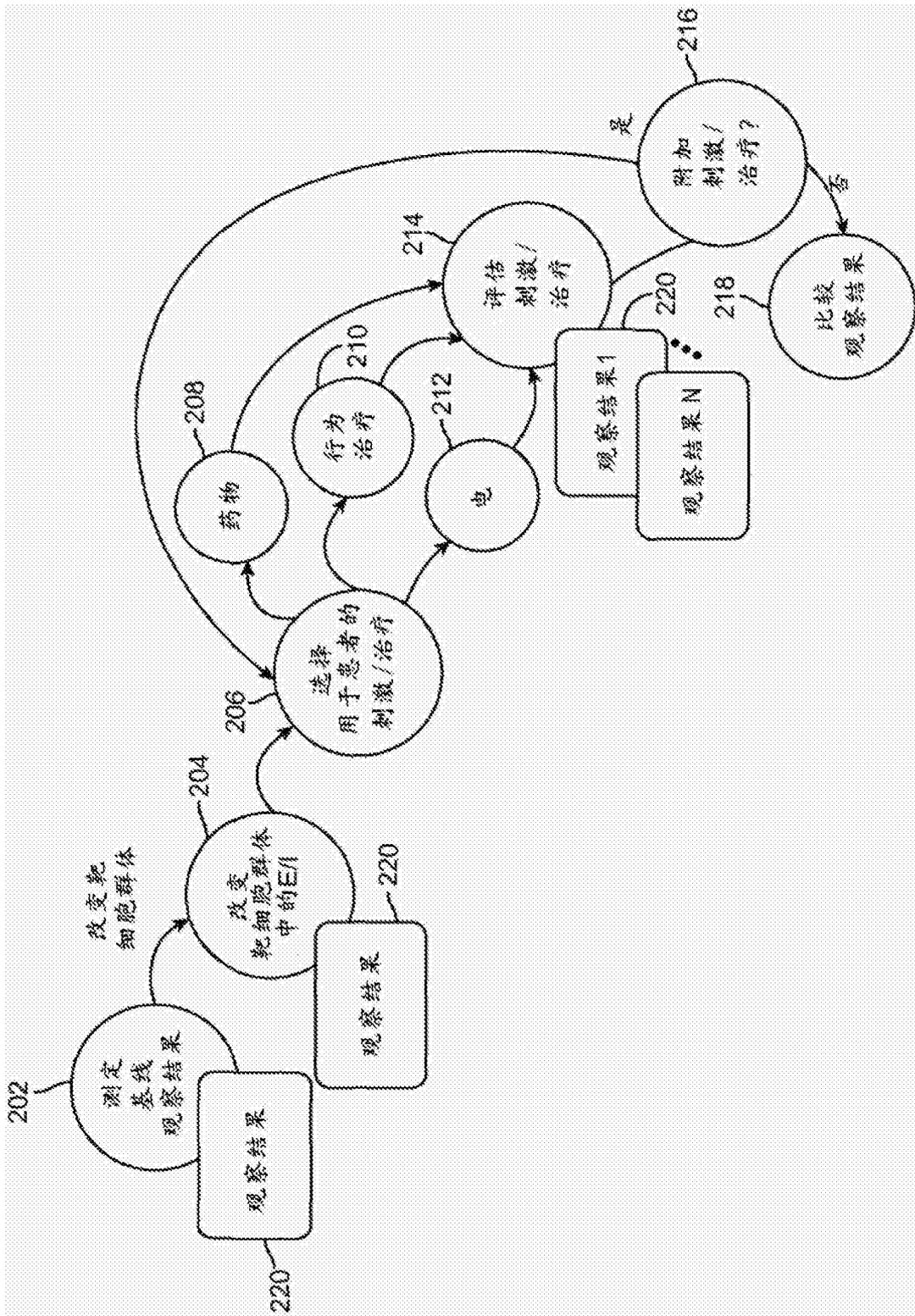


图13