

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 574**

21 Número de solicitud: 201331377

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**23.09.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**24.04.2015**

Fecha de la concesión:

**22.02.2016**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**29.02.2016**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070716**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA  
(100.0%)**

**Edificio José Prat, Plaza de la Universidad nº2  
02071 Albacete (Albacete) ES**

72 Inventor/es:

**LLOPIS BORRAS, Juan Francisco y  
FERRAZ NOGUEIRA, Jose Pedro**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **BIOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDO FOSFÁTICO EN MEMBRANAS  
CELULARES**

57 Resumen:

Biosensor para la detección de ácido fosfático en membranas celulares.

La presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden un fragmento de la proteína Spo20, la proteína fluorescente ECFP y la proteína fluorescente Venus o una variante de ésta. También se refiere a la secuencia nucleotídica que las comprende. Además, también se refiere a su uso para la detección y/o cuantificación in vitro de ácido fosfático en membranas celulares, por ejemplo, membrana plasmática o membrana mitocondrial. Además, también se refiere a un método de cribado utilizando las proteínas de fusión de la invención.

ES 2 534 574 B1

Biosensor para la detección de ácido fosfatídico en membranas celulares

**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende un fragmento de la proteína Spo20 de levadura, la proteína fluorescente ECFP y la proteína fluorescente Venus o una variante de la misma, cuya expresión celular se dirige a membranas y que presenta un cambio del espectro de emisión fluorescente cuando une el ácido fosfatídico. La proteína de fusión de la invención es útil para la  
10 cuantificación de los niveles de ácido fosfatídico. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la Biomedicina.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

15 El ácido fosfatídico (AF) es un fosfolípido en forma de cono que estabiliza la curvatura negativa de las membranas, lo que ayuda en la formación de vesículas del aparato de Golgi o membrana plasmática y lleva a cabo la fusión y la fisión de orgánulos tales como las mitocondrias. Además, el AF es un mediador lipídico. Las notables propiedades de su grupo fosfomonoéster, situado más cerca del interior hidrofóbico de  
20 la bicapa lipídica que en otros fosfolípidos, proporcionan un ambiente especial para el anclaje de proteínas de unión a AF. Estas proteínas parecen utilizar residuos básicos debidamente espaciados en lugar de una secuencia de aminoácidos precisa para su unión a AF. La lista de efectores conocidos que unen AF se está expandiendo rápidamente. Cambios en los niveles de AF se han asociado con el reclutamiento y/o  
25 activación de una amplia gama de proteínas que participan en diferentes actividades celulares, tales como la remodelación del citoesqueleto de actina, el tráfico de vesículas, el crecimiento celular, la difusión, la proliferación y la supervivencia celular (revisado en Stace CL y Ktistakis NT Biochim Biophys Acta 2006;1761(8):913-926).

30 El AF también juega un papel en la biosíntesis de otros lípidos de señalización. Se piensa que la principal fuente de AF en células es la enzima fosfolipasa D (PLD, isoformas 1 y 2), que utiliza fosfatidilcolina como sustrato. El AF puede ser convertido a diacilglicerol (DAG) por fosfatasa del AF, que comprenden las lipinas y las fosfatasa de fosfato de lípidos. A su vez, el DAG puede ser reconvertido en AF por  
35 las DAG quinasas (DGKs). A partir de AF también se puede generar ácido

lisofosfatídico por la fosfolipasa A, mientras que la reacción inversa es catalizada por las acil transferasas de ácido lisofosfatídico. Esta compleja red de reacciones enzimáticas se regula por diversos bucles de retroalimentación.

- 5 El creciente interés en las moléculas de señalización lipídicas ha fomentado el desarrollo de herramientas para analizar mejor su dinámica espacio-temporal. Además de los métodos tradicionales para la determinación de los cambios en los niveles de lípidos, se han descrito biosensores contruidos con dominios de unión a lípidos unidos a proteínas fluorescentes pero que sin embargo no proporcionan información
- 10 cuantitativa del AF en las membranas celulares ni información sobre la disminución del mismo. Por ejemplo, se ha descrito un biosensor para AF, que consiste en la fusión molecular de un dominio de unión a AF (un fragmento de Spo20) y la proteína fluorescente GFP (Nakanishi H *et al.* Mol Biol Cell 2004;15(4):1802-1815). En células de mamífero, este biosensor se transloca del citoplasma y núcleo a la membrana
- 15 plasmática en respuesta al aumento de AF en la misma. Sin embargo, la fluorescencia de esta proteína quimérica se ve afectada también por factores como el fotoapagamiento de GFP, la concentración del indicador o el grosor de la célula en una u otra localización y por lo tanto, sólo proporciona información cualitativa del AF.
- 20 Otro indicador fluorescente de AF que se ha descrito está basado en transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). En este caso el biosensor tiene como dominio de unión a AF un fragmento de la proteína DOCK2, y posee dos proteínas fluorescentes. Sin embargo, el cambio de señal que se obtiene con este biosensor es de pequeña magnitud y no muestra disminuciones de AF, sino sólo aumentos del
- 25 fosfolípido (Nishioka T *et al.* J Biol Chem 2010; 285(46):35979-35987).

Por lo tanto, se hace necesario obtener biosensores más robustos, con mayor cambio de la señal fluorescente por la unión del AF que proporcionen información cuantitativa tanto del aumento como de la disminución del AF. De esta manera se avanzaría en la

30 caracterización de las funciones del AF en las células y se posibilitaría el cribado farmacológico de ligandos que modifican su concentración.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

El problema técnico que resuelve la invención es el de proporcionar una proteína de fusión fluorescente más sensible al ácido fosfatídico (AF) que las descritas en el estado del arte y que proporciona información sobre la detección y cuantificación del AF en las membranas celulares, incluidas las membranas mitocondriales.

5

El sensor fluorescente (o biosensor) de ácido fosfatídico (AF) de la presente invención está formado por la proteína de levadura Spo20 como dominio sensible a AF (los residuos 51 a 91 de esta proteína), y las proteínas fluorescentes ECFP (proteína fluorescente cian) y Venus (proteína fluorescente amarilla) como donador y receptor de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), respectivamente. La expresión de las proteínas quiméricas (o quimeras) en diferentes membranas celulares se obtuvo utilizando secuencias de direccionamiento apropiadas. Los autores de la presente invención han utilizado varias configuraciones del espaciador entre las proteínas fluorescentes y el fragmento de Spo20 para maximizar el cambio de la transferencia de energía con la variación de los niveles de AF en membranas celulares. Los biosensores de la invención son sensibles tanto al aumento como a la disminución del AF en las membranas celulares.

Los biosensores de la presente invención son útiles para la detección dinámica de AF en las membranas celulares. Se ha demostrado la invención en las membranas plasmática y mitocondrial externa. Los biosensores de la invención cambian su color de emisión fluorescente en respuesta a los estímulos que aumentan o disminuyen los niveles de AF en estas membranas, validando así su utilidad. Con esta herramienta se pueden obtener nuevos datos relativos a la dinámica de formación de AF y su relación con actividades enzimáticas de las membranas, así como las variaciones de niveles de AF durante actividades como la migración celular, la emisión de procesos de membrana y la autofagia. Además, se pueden construir líneas celulares con expresión estable del biosensor fluorescente para utilizarlas en el cribado farmacológico de las enzimas implicadas en la formación y degradación del AF. Además, es posible utilizar los biosensores para ensayos *in vivo* de la bioquímica del AF en las diferentes membranas.

La proteína fluorescente cian (ECFP) utilizada en la presente invención se refiere a una variante de la proteína fluorescente verde (GFP) que se obtiene a partir del organismo *Aequorea victoria* y cuya secuencia de ácido nucleico se refieren a la SEQ

35

ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos se refiere a la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 1 es idéntica a la secuencia nucleotídica en la base de datos *GenBank* EU422995.1. La SEQ ID NO: 2 es idéntica a la secuencia de proteína ACB12919.1 en *GenBank*. También se puede referir a cualquier variante de ECFP que guarde al menos un 70% de identidad con la misma.

La proteína Venus utilizada en la presente invención se refiere a una variante de la proteína fluorescente verde (GFP) que se obtiene a partir del organismo *Aequorea victoria* y cuya secuencia de ácido nucleico se refieren a la SEQ ID NO: 5 y la secuencia de aminoácidos se refiere a la SEQ ID NO: 6. La SEQ ID NO: 5 es idéntica a la secuencia nucleotídica en *GenBank* FJ389161.1. La SEQ ID NO: 6 es idéntica a la secuencia de proteína ACQ43942.1 en *GenBank*. También se puede referir a cualquier variante de Venus que guarde al menos un 70% de identidad con la misma.

La proteína Spo20, de la que se utiliza un fragmento que comprende los residuos 51 a 91 en la presente invención, se refiere a una proteína que se obtiene a partir del organismo *Saccharomyces cerevisiae* (Nakanishi H *et al.* Mol Biol Cell 2004;15(4):1802-1815) y cuya secuencia de ácido nucleico se refiere a la SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos se refiere a la SEQ ID NO: 4. La SEQ ID NO: 3 es idéntica a la secuencia nucleotídica en *GenBank* NM\_001182513.1. La SEQ ID NO: 4 es idéntica a la secuencia de proteína NP\_013730.1 en *GenBank*. También se puede referir a cualquiera de las variantes de Spo20 que guarden al menos un 70% de identidad con la misma, por ejemplo *Spo20-like-protein* obtenida a partir de *Saccharomyces kudriavzevii* (secuencia nucleotídica AACI03000513.1 (*GenBank*), secuencia de aminoácidos EJT43717.1 (*GenBank*)). La proteína Spo20 se une al ácido fosfatídico, es decir, es sensible al mismo por lo que es capaz de unirse al ácido fosfatídico.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una proteína de fusión fluorescente que comprende:

- a. una subunidad (a) que comprende una proteína con al menos un 70% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma;
- b. una subunidad (b) unida al extremo carboxilo terminal de la subunidad (a) que comprende una proteína que se une al ácido fosfatídico con al menos

un 70% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 4; o un fragmento de la misma;

- 5 c. y una subunidad (c) unida al extremo carboxilo terminal de la subunidad (b) que comprende una proteína con al menos un 70% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 6 o una permutación circular de la misma o un fragmento de la misma;

donde las subunidades se unen entre sí sin espaciador o con un polipéptido espaciador. Preferiblemente la unión entre las subunidades se realiza mediante enlace peptídico.

10

Esta proteína de fusión fluorescente también se denomina en la presente invención “proteína quimérica”, “proteína quimérica fluorescente”, “proteína de la invención”, “biosensor” o “biosensor de la invención”.

15

Una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a una proteína donde la subunidad (a) consiste en la SEQ ID NO: 2.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a una proteína donde la subunidad (b) consiste en la SEQ ID NO: 4.

20

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a una proteína donde la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 6.

25

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a una proteína donde la subunidad (a) consiste en la SEQ ID NO: 2, la subunidad (b) consiste en la SEQ ID NO: 4 y la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 6.

En la presente invención, la subunidad (c) también puede comprender una permutación circular de la SEQ ID NO: 6.

30

Se entiende por “permutación circular” aquella variante de una proteína que tiene un inicio de su secuencia lineal de aminoácidos distinto de la proteína silvestre, manteniendo el orden de aminoácidos y con una estructura similar en tres dimensiones. Las permutaciones circulares pueden aparecer de forma natural por eventos evolutivos, por modificaciones post-traducción, o ser producidas artificialmente

35

en el laboratorio para mejorar la estabilidad, actividad catalítica u otra característica funcional de una proteína con métodos conocidos por el experto en la materia. Se puede entender como si se hubieran unido sus extremos originales y se hubieran creado otros nuevos en otro lugar.

5

Las permutaciones circulares de Venus utilizadas en la presente invención son versiones (o variantes) de Venus que poseen los extremos N (amino) y C (carboxilo) terminales conectados por un peptapéptido (GGSGG donde la secuencia está descrita en el código de aminoácidos de una letra conocido por el experto en la materia, pero puede ser otro péptido) y los nuevos extremos N y C terminales se sitúan en regiones expuestas del barril que se forma en la estructura en tres dimensiones. Venus cp49, Venus cp157, Venus cp173, Venus cp195 y Venus cp229 tienen nuevos extremos N terminales, respectivamente en Thr-49, Gln-157, Asp-173, Leu-195, e Ile-229 y se refieren respectivamente a las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13 y 15 y a las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14 y 16 (Nagai T *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(29):10554-10559). En la presente invención la subunidad (c) también puede comprender una proteína con al menos un 70% (preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente un 90%, aún más preferiblemente un 95% de identidad) con la proteína de SEQ ID NO: 6 permutada circularmente, o un fragmento de dicha permutación circular.

20

Por lo tanto, otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a una proteína donde la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 8.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a una proteína donde la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 10.

25

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a una proteína donde la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 12.

30

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a una proteína donde la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 14.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a una proteína donde la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 16.

35

Se entiende por "proteína fluorescente" aquella proteína que tras ser excitada con una determinada longitud de onda, emite luz de una longitud de onda mayor. Se entiende por "proteína fluorescente cian" aquella proteína que tras ser excitada en una determinada longitud de onda emite luz en la zona cian (azul) del espectro visible. Se  
5 entiende por "proteína fluorescente amarilla" aquella proteína que tras ser excitada en una determinada longitud de onda emite luz en la zona amarilla del espectro visible.

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia que caracteriza a las sustancias que son  
10 capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas (luz de excitación) y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética de longitud de onda diferente (emisión fluorescente).

Luminiscencia es todo proceso de emisión de luz cuyo origen no está condicionado  
15 por un aumento de temperatura.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta descripción, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias de aminoácidos que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias de  
20 aminoácidos puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias. El porcentaje de identidad que se indica en la presente invención con respecto a la subunidad (a), (b) o (c) se refiere a la identidad con respecto a la longitud total de la subunidad (a), (b) o (c). El porcentaje de identidad puede ser al menos un  
25 70%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente un 90%, aún más preferiblemente un 95% de identidad.

El término "fragmento", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una porción de la proteína SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 4 o de la SEQ ID NO: 6 o de  
30 cualquiera de sus variante biológicamente activas, capaz de emitir fluorescencia en el caso de la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6 o bien capaz de unir AF en el caso de la SEQ ID NO: 4.

El término "polipéptido espaciador" (o "linker" o "espaciador"), tal y como se utiliza en  
35 la presente descripción, se refiere a una secuencia de aminoácidos, preferiblemente,

de hasta 60 aminoácidos de longitud (preferiblemente hasta 50 aminoácidos, más preferiblemente de entre 35 y 45 aminoácidos) situada entre la secuencia de aminoácidos de la subunidad (a) y la secuencia de aminoácidos de la subunidad (b), o entre la secuencia de aminoácidos de la subunidad (b) y la secuencia de aminoácidos de la subunidad (c). Los polipéptidos espaciadores localizados entre las subunidades pueden ser iguales o distintos. Los polipéptidos espaciadores se unen a las subunidades mediante enlaces peptídicos. El polipéptido espaciador puede comprender la secuencia de aminoácidos "EAAAR" (secuencia descrita en el código de aminoácidos de una letra conocido por el experto en la materia) y puede comprender repeticiones de la misma.

El polipéptido espaciador también puede estar situado entre la secuencia de direccionamiento y la subunidad a la que esté unida.

El término "secuencia de direccionamiento", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una secuencia de aminoácidos, preferiblemente de hasta 33 aminoácidos de longitud, situada en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal del biosensor, y cuya expresión resulta en la unión del biosensor a una membrana celular específica. Por lo tanto, la proteína de fusión de la invención puede comprender secuencias de direccionamiento a membranas, por ejemplo, secuencias de direccionamiento a membrana plasmática (por ejemplo la SEQ ID NO: 18) o a membrana mitocondrial (por ejemplo la SEQ ID NO: 22 para membrana mitocondrial externa).

Una realización aún más preferida del primer aspecto de la invención se refiere a una proteína que además comprende un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 18 unida al extremo amino terminal de la subunidad (a). Preferiblemente, comprende un polipéptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 18 unida al extremo amino terminal de la subunidad (a). La unión puede realizarse mediante un polipéptido espaciador o sin espaciador. Preferiblemente la proteína de fusión consiste en la proteína de secuencia SEQ ID NO: 20.

Otra realización aún más preferida del primer aspecto de la invención se refiere a una proteína que además comprende un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 22 unida al extremo amino terminal de la subunidad (a). Preferiblemente,

comprende un polipéptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 22 unida al extremo amino terminal de la subunidad (a). La unión puede realizarse mediante un polipéptido espaciador o sin espaciador. Preferiblemente la proteína de fusión consiste en la proteína de secuencia SEQ ID NO: 24.

5

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia que codifica la proteína de fusión del primer aspecto de la invención.

10 En la presente invención se describen las secuencias de ADN siguientes: SEQ ID : 1 se refiere a ECFP, SEQ ID NO: 3 a Spo20 fragmento 51-91, SEQ ID NO: 5 a Venus, SEQ ID NO: 7 a Venus cp49, SEQ ID NO: 9 a Venus cp157, SEQ ID NO: 11 a Venus cp173, SEQ ID NO: 13 a Venus cp195, SEQ ID NO: 15 a Venus cp229, SEQ ID NO: 17 a Lck fragmento 1-12, SEQ ID NO: 19 a la secuencia correspondiente a la proteína de fusión pmPAS, SEQ ID NO: 21 a Tom20 fragmento 1-33, SEQ ID NO: 23 a la  
15 secuencia correspondiente a la proteína de fusión mitPAS.

La secuencia nucleotídica puede ser un ácido desoxirribonucleico (ADN) o un ácido ribonucleico (ARN).

20

Una realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere a la secuencia nucleotídica donde dicha secuencia consiste en la SEQ ID NO: 19.

Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere a la  
25 secuencia nucleotídica donde dicha secuencia consiste en la SEQ ID NO: 23.

La secuencia nucleotídica puede estar comprendida en una construcción génica. Para generar construcciones génicas que comprendan la secuencia nucleotídica de la invención, se pueden utilizar las herramientas moleculares conocidas por cualquier  
30 experto en la materia, entre ellas el clonaje y la utilización de enzimas de restricción. Esta construcción génica de la invención puede comprender el ácido nucleico de la invención, operativamente unido a una secuencia reguladora de la expresión del ácido nucleico de la invención, constituyendo de este modo un *cassette* de expresión.

“Unidos operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” al ácido nucleico, está ligada al mismo de tal manera que se consigue la expresión de la secuencia codificadora del  
5 ácido nucleico.

“Secuencia de control” se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que afectan la expresión de las secuencias a las que están ligadas. Dichas secuencias de control incluyen, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores, señales de iniciación, señales de  
10 terminación, intensificadores o silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya aquellos componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

15 En una realización preferida, la construcción génica de la invención comprende el ácido nucleico de la invención unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:

- a. un promotor,
- 20 b. una señal de inicio de la transcripción,
- c. una señal de terminación de la transcripción,
- d. una señal de poliadenilación, o
- e. un activador transcripcional.

25 Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región de ADN situada en posición 5' con respecto al punto de inicio de la transcripción y que resulta necesaria o facilita dicha transcripción en una célula animal. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles.

30 Las secuencias de control dependen del origen de la célula en la que se quiere expresar el ácido nucleico de la invención. En una realización particular, las secuencias de control de expresión unidas al ácido nucleico de la invención son funcionales en células y organismos procariotas, (bacterias); mientras que en otra

realización particular, dichas secuencias de control de expresión son funcionales en células y organismos eucariotas, por ejemplo, células de levadura o células animales.

5 El ácido nucleico de la invención o la construcción génica de la invención pueden ser introducidos al interior de una célula, denominada célula hospedadora, por ejemplo, pero sin limitarse, como ácido nucleico desnudo o mediante un vector.

10 El término “vector de clonación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. Ejemplos de vectores de expresión son, pero sin limitarse, plásmidos, cósmidos, fagos de ADN o cromosomas artificiales de levadura.

15 El término “vector de expresión”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un vector de clonaje adecuado para expresar un ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo tras ser introducido en una célula, denominada célula hospedadora. Dicho ácido nucleico se encuentra, por lo general, unido operativamente a secuencias de control.

20 El término “célula hospedadora”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier organismo procariota o eucariota que es recipiente de un vector de expresión, de clonación o de cualquier otra molécula de ADN o de ARN

25 Un tercer aspecto de la invención se refiere a una célula que comprende la secuencia nucleotídica del segundo aspecto de la invención. La introducción de dichas construcciones génicas se puede realizar con los métodos conocidos en el estado de la técnica. La presente invención también se refiere a la célula que al comprender la proteína de la invención emite fluorescencia. También se refiere esta invención, a la población celular que comprende la célula de la invención.

30

Un cuarto aspecto de la presente invención, se refiere al uso de la proteína de fusión del primer aspecto de la invención o de la secuencia nucleotídica del segundo aspecto de la invención para la detección y/o cuantificación *in vitro* del ácido fosfatídico en una célula (procariota o eucariota, por ejemplo células HeLa o HEK), en un tejido o en un  
35 extracto celular.

Preferiblemente el ácido fosfatídico que se detecta se localiza en una membrana en la superficie o el interior de una célula, por ejemplo pero sin limitarse a la membrana plasmática, membrana mitocondrial, retículo endoplásmico o sarcoplásmico, membrana nuclear, membrana del aparato de Golgi, membrana de vesículas secretoras, membrana de gránulos de secreción, u otros dominios subcelulares. En todos estos casos, se añaden secuencias de direccionamiento subcelular en el extremo 5' o 3' de las secuencias nucleotídicas que codifican para las proteínas de la invención. Un ejemplo de direccionamiento subcelular es el direccionamiento a la membrana plasmática o a la membrana mitocondrial por unión de una secuencia en el extremo amino-terminal. En la presente invención se muestran ejemplos, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 que se refieren a la secuencia nucleotídica y a la proteína respectivamente de Lck1-12, que está presente en el extremo amino terminal de la proteína de fusión pmPAS (el biosensor PAS con señal de localización de membrana plasmática, secuencias nucleotídica y de proteína SEQ ID NO 19 y 20, respectivamente) y también SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 que se refieren a la secuencia nucleotídica y a la proteína respectivamente de Tom20 (residuos 1-33), que está presente en el extremo amino terminal de la proteína de fusión mitPAS (el biosensor PAS con señal de localización de membrana mitocondrial externa: secuencia nucleotídica y de proteína SEQ ID NO 23 y 24, respectivamente).

Una realización preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere al uso donde el ácido fosfatídico se localiza en la membrana plasmática de la célula.

Otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere al uso donde el ácido fosfatídico se localiza en la membrana mitocondrial, preferiblemente la membrana mitocondrial externa de la célula.

La presente invención también se refiere al uso de la proteína de fusión del primer aspecto de la invención o de la secuencia nucleotídica del segundo aspecto de la invención para la detección y/o cuantificación *in vivo* del ácido fosfatídico.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende la proteína de fusión del primer aspecto de la invención o la secuencia nucleotídica del segundo aspecto de la invención o la célula del tercer aspecto de la invención. La proteína de

fusión de la invención puede estar inmovilizada en un soporte, dicho soporte puede formar parte del kit del quinto aspecto de la invención.

5 Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso del kit del quinto aspecto de la invención para la detección y/o cuantificación *in vitro* del ácido fosfatídico en una célula o en un tejido o en un extracto celular.

10 Una realización preferida del sexto aspecto de la invención se refiere al uso donde el ácido fosfatídico se localiza en la membrana plasmática.

Otra realización preferida del sexto aspecto de la invención se refiere al uso donde el ácido fosfatídico se localiza en la membrana mitocondrial, preferiblemente externa.

15 La presente invención también se refiere al uso del kit del quinto aspecto de la invención para la detección y/o cuantificación *in vivo* del ácido fosfatídico.

20 Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de la proteína de fusión del primer aspecto de la invención que comprende cultivar una célula del tercer aspecto de la invención en condiciones que permiten la expresión de dichas proteínas. Por ejemplo, dicha expresión se produce en bacterias (por ejemplo en *E. coli*), levaduras, baculovirus, células de mamífero en cultivo o cualquier otro sistema de expresión de proteína recombinante. Ejemplos no limitantes de células de mamífero son líneas celulares como HeLa o HEK, células musculares, astrocitos, neuronas, células epiteliales y endoteliales.

25 En una realización preferida del procedimiento del séptimo aspecto de la invención, además comprende aislar y/o purificar dichas proteínas obtenidas. Las técnicas de aislamiento o purificación que pueden utilizarse para las proteínas de la invención son las conocidas por el experto en la materia. Por este motivo, las proteínas de la invención pueden estar unidas a secuencias de etiquetado ("tag sequences"), por ejemplo etiqueta de polihistidina.

Un octavo aspecto de la invención se refiere a un método para el análisis cuantitativo de los niveles de ácido fosfatídico que comprende:

- a. poner en contacto una célula o tejido o extracto celular con la proteína de fusión del primer aspecto de la invención o con la secuencia nucleotídica del segundo aspecto de la invención;
  - b. anclaje de la proteína de fusión del primer aspecto de la invención a una membrana celular;
  - c. detección y cuantificación de la fluorescencia emitida, proporcional a la presencia de ácido fosfatídico, preferiblemente por microscopía de fluorescencia o por fluorimetría.
- 10 En el paso (a) la introducción de la secuencia nucleotídica en la célula o tejido de la invención se realiza mediante métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, transfección o transformación. La secuencia nucleotídica se ha de expresar en el interior de la célula.
- 15 La detección por microscopía de fluorescencia se puede realizar de la siguiente manera: se toman dos imágenes mediante un microscopio de fluorescencia, la primera imagen corresponde a la emisión de ECFP (que forma parte de la proteína de la invención) que se excita directamente mediante iluminación de una longitud de onda apropiada (centrada en 430 nm) y la segunda imagen corresponde a la fluorescencia de la proteína Venus (o una de sus variantes) pero excitada indirectamente, por transferencia de energía resonante (FRET) de la proteína ECFP. A continuación, se cuantifica la FRET, por ejemplo mediante la división pixel por pixel de las dos imágenes citadas  $\text{imagen}_{\text{ECFP}}/\text{imagen}_{\text{FRET}}$ , obteniendo una imagen cociente o ratio de ambas, cuya intensidad es proporcional a la concentración de ácido fosfatídico.
- 25 La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) depende de la distancia entre ECFP (donador de energía) y Venus (aceptor de energía) y de la orientación entre ambas. El ácido fosfatídico de la membrana se une a la secuencia Spo20 de la proteína de la invención, de forma que cambios en los niveles de ácido fosfatídico resultan en un cambio de FRET y, por tanto, un cambio del color de emisión de la proteína de la invención, de cian a amarillo, es decir la unión al AF hace que aumente el color cian. De esta forma se asocian los niveles de ácido fosfatídico en la membrana celular a una señal óptica (en la detección por microscopía, el cociente de las imágenes microscópicas descritas).

Una realización preferida del octavo aspecto de la invención se refiere al método que además comprende entre el paso (b) y (c) estimular la célula o el tejido con una sustancia, por ejemplo, una hormona o una sustancia obtenida de una librería de compuestos para *screening*, con potencial inhibidor o activador de un receptor de membrana o una enzima cuya respuesta sobre los niveles de ácido fosfatídico sea conocida, donde la célula o el tejido expresan un receptor de membrana acoplado a la liberación o metabolización de ácido fosfatídico, o una enzima que sintetice o degrade el ácido fosfatídico.

10 Por lo tanto, este método se refiere a un método de cribado de ligandos de receptores de membrana.

Una realización aún más preferida del octavo aspecto de la invención se refiere al método donde además se estimula la célula o el tejido con un agonista conocido del receptor, cuya respuesta sobre los niveles de ácido fosfatídico sea conocida.

El método del octavo aspecto de la invención se puede utilizar para determinar las propiedades farmacológicas de sustancias de prueba que actúen sobre receptores o enzimas implicados en la liberación o metabolización de ácido fosfatídico en las membranas celulares. Por ejemplo, el ensayo es adecuado para encontrar ligandos (activadores o inhibidores) de receptores acoplados a fosfolipasa D, otros receptores de membrana acoplados a diacilglicerolquinasa, y moduladores de estas u otras enzimas implicadas en la regulación de los niveles de ácido fosfatídico (por ejemplo, algunas de ellas se muestran en la Fig. 1).

25 El término "acoplado" significa una comunicación o interacción molecular entre el receptor y la proteína G, o entre ésta y una enzima como la fosfolipasa D, donde las enzimas sintetizan o metabolizan ácido fosfatídico. Los receptores acoplados a proteínas G y enzimas forman parte de la transmisión de señales desde el exterior al interior de la célula.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la

invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Metabolismo del ácido fosfatídico. Las enzimas que producen o metabolizan ácido fosfatídico se indican en cursiva. Los activadores o inhibidores de las citadas enzimas se indican en negrita, con un signo “+” para indicar activación y un signo “-” para indicar inhibición. Los intermediarios lipídicos son: Glic3P, glicerol 3-fosfato; AG-CoA, ácido graso-coenzima-A; PC, fosfatidilcolina; AF, ácido fosfatídico; ALF, ácido lisofosfatídico; DAG, diacilglicerol; PI, fosfatidilinositol; PI(4,5)P<sub>2</sub>, fosfatidilinositol-4,5-difosfato; PI4P, fosfatidilinositol-4-fosfato; PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; CDP-DAG, citidina difosfato diacilglicerol. Las flechas indican la dirección de la reacción enzimática correspondiente.

Figura 2: Células HeLa fueron transfectadas con GFP-Spo20 y estimuladas con PMA 100 nM. A, Fluorescencia de una célula HeLa representativa, 1 min antes y 30 min después de estimulación con PMA. B, transcurso temporal del ratio: intensidad de zonas de membrana / intensidad del núcleo celular. Los valores se normalizaron a 1 justo antes de la estimulación con PMA. En algunas células se realizó una incubación con FIPI 1  $\mu$ M durante 30 minutos previamente a la adición de PMA.

Figura 3: A, Valores basales del cociente ECFP/FRET de las diferentes quimeras de pmPAS expresadas en células HeLa. B, células HeLa transfectadas transitoriamente con diferentes quimeras que difieren en la proteína fluorescente aceptora (Venus o sus formas permutadas circularmente) fueron estimuladas con propranolol 100 mM + PMA 100 nM. Se muestra el valor del cociente ECFP/FRET en el tiempo (cociente normalizado a 1 antes de la adición de propranolol+PMA).

Figura 4: A, Extractos de células HeLa transfectadas con vector vacío, pmPAS y mitPAS se sometieron a electroforesis en gel de agarosa con SDS y se probaron con anticuerpo anti-GFP, confirmando el tamaño e integridad de las quimeras. B, imagen confocal de una célula HeLa expresando pmPAS, confirmando la localización en membrana plasmática. C, colocalización de mitPAS con mitTdT (TdTTomato fusionada

con una señal de importación mitocondrial) en células HeLa, confirmando la localización en la mitocondria.

Figura 5: A, Estructura esquemática del biosensor basado en FRET, pmPAS (*plasma membrane PA sensor*): Lck, *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*; Ln, espaciador. B, Estructura del biosensor basado en FRET, mitPAS (*mitochondrial PA sensor*): Tom20, translocasa de la membrana mitocondrial externa-20; Ln, espaciador.

Figura 6: Células HeLa transfectadas transitoriamente con pmPAS se lisaron y se sometieron a ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (se detalla en Material y Métodos), con el fin de comprobar la localización de pmPAS en subdominios de la membrana plasmática de diferente densidad, comparados con el marcador caveolina.

Figura 7: A, curso temporal de los valores normalizados del cociente ECFP/FRET de células HeLa transfectadas transitoriamente con pmPAS y sometidas a estimulación secuencial con propranolol (100  $\mu$ M) y luego PMA (100 nM). B, células HeLa expresando pmPAS se estimularon con PMA (100 nM) con o sin preincubación (30 min) con FIPI (1  $\mu$ M). Células HeLa expresando pmPAS juntamente con PLD1 o PLD2 también se estimularon con PMA (100 nM). C, células HeLa transfectadas transitoriamente con pmPAS fueron estimuladas con el factor de crecimiento epidérmico, EGF (100 ng / ml) con o sin preincubación (30 min) con FIPI (1  $\mu$ M). D, efecto de la introducción de la mutación puntual L67P dentro del dominio de unión a AF de Spo20 en el transcurso temporal de ECFP/FRET en células HeLa expresando pmPAS, ante estimulación con propranolol 100  $\mu$ M + PMA 100 nM.

Figura 8: A-C, transcurso temporal de los valores de ECFP/FRET normalizados de células HeLa transfectadas transitoriamente con pmPAS estimuladas con lipoDOPA (liposomas que contienen ácido dioleoilfosfatídico, 200  $\mu$ M). Se muestra la respuesta de tres células individuales (A-C) representativas de los resultados obtenidos.

Figura 9: A, transcurso temporal de los valores de ECFP/FRET normalizados de células HeLa transfectadas transitoriamente con pmPAS estimuladas con liposomas que contienen solamente fosfadidilcolina (lipoPC), o fosfadidilcolina y 500  $\mu$ M de ácido oleico (lipoOA). B, transcurso temporal de los valores de ECFP/FRET normalizados de

una célula HeLa transfectada transitoriamente con pmPAS estimulada con lipoOA (liposomas que contienen ácido oleico, 500  $\mu$ M).

Figura 10: células HeLa transfectadas transitoriamente con pmPAS o mitPAS se analizaron antes (control sin ayuno), o después de 4 y 14 horas de privación de suero (ayuno) (pmPAS: control sin ayuno:  $n=45$  células, 4h de privación de suero  $n=65$  células, 14h de privación de suero  $n=41$  células; mitPAS: control sin ayuno:  $n=32$  células, 4h de privación de suero  $n=43$  células, 14h de privación de suero  $n=43$  células; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  mediante el test  $t$  para determinar la significación estadística).

Figura 11: A, transcurso temporal de los valores ECFP/FRET normalizados, de células HeLa transfectadas con mitPAS, estimuladas con propranolol (100  $\mu$ M). B, transcurso temporal de los valores ECFP/FRET normalizados de células HeLa transfectadas con mitPAS, estimuladas con EGF (100 ng / ml) con o sin preincubación (30 min) con FIPI (1  $\mu$ M). C, transcurso temporal de los valores ECFP/FRET normalizados de células HeLa transfectadas con mitPAS, estimuladas con PMA (100 nM) con o sin preincubación (30 min) con FIPI (1  $\mu$ M). D, transcurso temporal de los valores ECFP/FRET normalizados, de células HeLa transfectadas con mitPAS o pmPAS, estimuladas con el compuesto R59949, un inhibidor de diacilglicerolquinasas (DGKs) (40 mM, previamente mezclado con ácido plurónico 20% 1:1, para aumentar su solubilidad en agua).

Figura 12: Niveles basales de ácido fosfatídico y respuesta a inhibidores en tres líneas celulares de cáncer humano. A, se analizaron varias células transfectadas transitoriamente con pmPAS y se realizó un análisis estadístico de los niveles ECFP/FRET basales (HeLa  $n=45$  células; HT29,  $n=48$  células; HCT116  $n=53$  células, \*\*\*  $p < 0,0001$  usando *one-way* ANOVA para determinar la significación estadística). B, transcurso temporal de los valores ECFP/FRET normalizados de células HeLa, HT29 o HCT116, transfectadas con pmPAS, estimuladas con FIPI (1  $\mu$ M). C, transcurso temporal de los valores ECFP/FRET normalizados de células HeLa, HT29 o HCT116, transfectadas con pmPAS, estimuladas con PMA (100 nM).

Figura 13: A-B, se analizaron células HeLa, transfectadas con pmPAS. Se seleccionaron las células que presentaban una migración en una dirección y se realizó

un análisis comparativo entre los niveles de ECFP/FRET en los bordes delanteros (BD) y traseros (BT) ( $n=18$ ,  $p<0.01$  utilizando  $t$ -test). C, valores ECFP/FRET de los bordes delantero y trasero de una célula HeLa que detiene su migración. D, valores ECFP/FRET totales de células HeLa en división o mitosis ( $n=4$  divisiones: 4 células madre, 8 células hijas. Los valores fueron normalizados a 1 justo antes de la división celular). La imagen muestra una de estas células antes y después de la división celular (fluorescencia de la proteína Venus).

Figura 14: Células de las líneas MSC80 y OLN93 se transfectaron con pmPAS y se compararon los valores ECFP/FRET entre los procesos y el cuerpo celular. Se representan los valores ECFP/FRET en los procesos, normalizados a los valores ECFP/FRET del cuerpo celular de la misma célula (MSC80:  $n=58$  células; OLN93:  $n=64$  células). Las imágenes corresponden a células MSC80 y OLN93 representativas, con las regiones de interés (procesos y cuerpo celular) señaladas.

15

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

25

### **Ejemplo 1: Generación de las proteínas de fusión de la invención**

#### MATERIALES Y MÉTODOS

#### REACTIVOS:

30 4-fluoro-N-(2 - (4 - (5-fluoro-1H-indol-1-il) piperidin-1-il) etil) benzamida (FIPI), ácido dioleoil-fosfatídico (DOPA), fosfatidilcolina de yema de huevo (PC), ácido oleico (OA), factor de crecimiento epidérmico humano (EGF), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), propranolol y el inhibidor de diacilglicerol quinasa (R59949) se adquirieron de Sigma-Aldrich. Ácido plurónico F-127 se adquirió de Molecular Probes.

35

CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIÓN:

Las líneas celulares humanas de adenocarcinoma de cuello de útero HeLa, y las líneas celulares de cáncer de colon HT29 y HCT116 (proporcionadas por el Dr. Ricardo Sánchez Prieto) y las células MSC80 y OLN93 (proporcionadas por el Dr. Joao Relvas) se cultivaron en “Dulbecco Modified Eagle Medium” (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U / ml de penicilina y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina (todos ellos de Lonza) a 37 ° C con 5% de CO<sub>2</sub> en una atmósfera húmeda. Las células fueron transfectadas con “Lipofectamine® 2000” (Invitrogen) o con jetPrime® (PolyPlus) de acuerdo con los protocolos de los fabricantes.

ADQUISICIÓN DE IMÁGENES POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN CÉLULAS VIVAS:

Los ensayos se realizaron con las células sembradas en placas de fondo de cristal (ibidi GmbH) 24 a 48 horas después de la transfección. El medio celular se reemplazó con la solución salina “Hanks Balanced Salt Solution” (HBSS, Gibco) suplementada con 10 mM de HEPES y 5,55 mM de D-glucosa, con el pH ajustado a 7,4. Los agentes químicos se diluyeron directamente en el medio de la placa sobre las células. Alternativamente, se utilizó un sistema de perfusión de flujo impulsado por la gravedad acoplado a una bomba de vacío para la retirada de las soluciones.

La toma de imágenes de fluorescencia de las células se realizó utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia (DMIRE-2, Leica) con objetivos de inmersión en aceite PlanApo 40x (apertura numérica 1.25) o PlanApo 63x (apertura numérica 1.4). La fuente de luz de excitación fue un policromador equipado con una lámpara de Xe (C7773, Hamamatsu Photonics). Una rueda de filtros de emisión se controló mediante un dispositivo Lambda-10 (Sutter Instruments). El detector para la adquisición de imágenes fue una cámara EM-CCD (C9100-13, Hamamatsu Photonics). El software AQUACOSMOS 2.6 (Hamamatsu Photonics) se utilizó para controlar todos los dispositivos.

Durante los experimentos de imagen en las células que expresaban los biosensores fluorescentes, se tomaron secuencialmente tres imágenes en cada punto temporal:

“imagen ECFP” se refiere a la imagen obtenida excitando el donador de FRET (ECFP, a 430 nm) y monitorizando su emisión (filtro de emisión de 475/20 nm). La “imagen Venus” se refiere a la imagen que se obtiene excitando el aceptor de FRET (la proteína fluorescente amarilla llamada “Venus”, a 500 nm) y monitorizando su emisión (filtro de emisión de 535/22 nm). Por último, la “imagen FRET” se refiere a la imagen obtenida excitando el donador de FRET (ECFP, a 430 nm) y monitorizando la emisión del aceptor de FRET (Venus, filtro de emisión de 535/22 nm). Se utilizó un espejo dicróico “Brightline” de triple paso y filtros de emisión “Brightline” de una sola banda (todos ellos de Semrock).

10

El *software ImageJ* con macros personalizadas se utilizó para el procesamiento de imagen, se restó la intensidad de una imagen sin iluminación (el fondo) a las imágenes adquiridas según se describe en el párrafo anterior. Se generó la imagen “cociente (o ratio) ECFP/FRET” dividiendo pixel por pixel la “imagen ECFP” por la “imagen FRET” (previa sustracción del fondo a cada una de ellas).

15

#### PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS:

Para los liposomas de ácido oleico (lipoOA), el ácido oleico se mezcló con una mezcla de cloroformo:metanol (1:1) conteniendo una cantidad equimolar de fosfatidilcolina. Para los liposomas de ácido dioleoil-fosfatídico (lipoDOPA), alícuotas de 5 mg/ml de ácido dioleoil-fosfatídico se disolvieron en cloroformo:metanol (1:1). Estas soluciones se secaron al vacío y las películas resultantes se hidrataron en 150 µl de tampón de resuspensión de liposomas (Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) durante 30 minutos a 37°C. Las suspensiones se pipetearon varias veces y se sometieron a 3 ciclos de 1 min de agitación en vórtex a la velocidad máxima. Las suspensiones lechosas resultantes (que contienen en su mayoría vesículas multilamelares) se transfirieron a tubos Falcon™ conteniendo 450 µl de tampón HBSS. Los liposomas se generaron utilizando una sonda de ultrasonidos UP200S (Dr. Hielscher GmbH). Se aplicaron nueve ciclos de 20 pulsos de 0,5 s cada uno (30% de la amplitud máxima) con una pausa de 20 s entre ellos. Los tubos se mantuvieron en hielo durante la sonicación para evitar el sobrecalentamiento y se sometieron a un corto centrifugado cada 3 ciclos. Los liposomas se añadieron a las células sobre el microscopio de fluorescencia inmediatamente después de la preparación.

35

## CLONAJE Y PREPARACIÓN DE LOS BIOSENSORES EN PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN:

Todos los biosensores contienen un dominio de unión a AF obtenido de la proteína SNARE Spo20 de *Saccharomyces cerevisiae*, que comprende los aminoácidos 51-91 de esta proteína, y las proteínas fluorescentes ECFP y Venus, en este orden (de amino a carboxi-terminal): ECFP-Spo20(51-91)-Venus. Además, al extremo N-terminal de la quimera anterior se añadió una señal de direccionamiento para su expresión en diferentes membranas celulares. Los cuatro dominios proteicos anteriores (señal de direccionamiento, ECFP, Spo20(51-91), y Venus o cpVenus) están unidos por tres espaciadores, como se indica en la Fig. 5A. El espaciador 1 une la señal de localización en la membrana con ECFP, el espaciador 2 conecta ECFP y el fragmento Spo20(51-91), mientras que el espaciador 3 conecta Spo20(51-91) con la proteína fluorescente Venus.

15

Para el clonaje se utilizó una batería de seis construcciones de los sensores de calcio llamados *Yellow Cameleon* en el vector de expresión pRSETB (Invitrogen), proporcionada por el Dr. Atsushi Miyawaki (BSI, RIKEN, Saitama, Japón). Todos los oligonucleótidos utilizados en los clonajes se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific. Para insertar el espaciador 2, se hibridaron los oligonucleótidos SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, se fosforilaron en el extremo 5' y se clonaron en el sitio de restricción SphI de la batería de *Yellow Cameleon* en pRSETB (en el extremo 3' de ECFP). Con el fin de insertar el espaciador 3, los oligonucleótidos SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 se hibridaron, se fosforilaron en 5' y se clonaron en el sitio de restricción de SacI (en el extremo 5' de Venus o una de sus permutaciones circulares). Las construcciones resultantes se clonaron en los sitios de restricción BamHI/EcoRI del plásmido pcDNA3.1 (Invitrogen), un vector de expresión para células de mamífero.

Respecto a las señales de direccionamiento para la expresión del biosensor en diferentes membranas celulares, para la membrana plasmática se clonaron los doce aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (Lck). El péptido Lck (1-12) contiene una señal de acilación que conduce al anclaje de la proteína quimérica en la membrana plasmática intracelularmente. Los oligonucleótidos SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 se hibridaron, se fosforilaron en 5' y se clonaron en los sitios de restricción HindIII/BamHI de la batería de construcciones

35

en pcDNA3.1. Luego, el espaciador 1 fue insertado entre la secuencia del péptido Lck(1-12) y ECFP. Para ello, los oligonucleótidos SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32 se hibridaron, se fosforilaron en 5' y se clonaron en el sitio de restricción BamHI de la batería de plásmidos en pcDNA3.1.

5

A continuación, el sitio de restricción SphI existente antes del espaciador 2 y el sitio restricción SacI después del espaciador 3 se mutaron en toda la batería de construcciones, para generar dos sitios de restricción BsiWI, utilizando los oligonucleótidos SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34, respectivamente. La secuencia nucleotídica que codifica para los aminoácidos 51-91 de Spo20 y la misma secuencia con la mutación puntual de Leucina en posición 67 a Prolina (L67P), se extrajeron de GFP\_Spo20(51-91) y GFP\_Spo20(51-91)\_L67P (Nakanishi H *et al.* Mol Biol Cell 2004;15(4):1802-1815) utilizando los oligonucleótidos SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36, y se clonaron en los sitios de restricción BsiWI de la batería de plásmidos pcDNA3.1, entre los espaciadores 2 y 3. La secuencia mutada Spo20(51-91) L67P dará lugar a un biosensor poseyendo menor afinidad por AF (Nakanishi H *et al.* Mol Biol Cell 2004;15(4):1802-1815).

Para garantizar buenos niveles de expresión y que el 100% de la traducción empiece en la primera metionina del péptido Lck(1-12), se diseñó una secuencia de Kozac alrededor del codón de iniciación. Sin embargo, en *Western blots* de extractos celulares de esta quimera, apareció una banda de peso molecular ligeramente más bajo inmunorreactiva con el anticuerpo anti-GFP, así como una pequeña cantidad de proteína no localizada en la membrana, visible con microscopía de fluorescencia, lo que sugiere que la iniciación de la traducción se llevaba a cabo también en la primera metionina de ECFP. Este problema se resolvió utilizando el oligonucleótido SEQ ID NO: 37 para mutar la primera metionina de ECFP a una valina con el fin de alterar su secuencia Kozac menos precisa, pero aún válida.

De las seis construcciones anteriores, en experimentos posteriores se seleccionó aquella con Venus cp173, por presentar mayor cambio del espectro de fluorescencia por la unión del AF, la cual se denominó pmPAS (Fig. 3) (ver resultados).

A partir de pmPAS, se generó el biosensor mitPAS mediante la sustitución de la señal de direccionamiento Lck(1-12) por la secuencia que codifica para los aminoácidos 1-33

de la proteína mitocondrial Tom20. La proteína resultante de su expresión lleva la señal de direccionamiento para la membrana mitocondrial externa, con la porción ECFP-Spo20-cpVenus orientada al citoplasma. Para preparar mitPAS, el sitio de restricción HindIII existente en medio del dominio de unión a AF y el sitio de restricción BamHI en el extremo 3' del espaciador 1 del pmPAS fueron mutados, sin alterar la secuencia de aminoácidos, utilizando los oligonucleótidos SEQ ID NO: 38 y 39, para que los oligonucleótidos SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41 pudieran ser hibridados, fosforilados en 5' y clonados directamente en los sitios de restricción HindIII y BamHI de pmPAS, sustituyendo el péptido Lck (1-12) por los aminoácidos 1-33 de la proteína mitocondrial Tom20.

La hibridación de oligonucleótidos se realizó en tampón de hibridación (NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, TrisHCl 10 mM, pH 8,0) mezclando cantidades equimolares de oligonucleótidos complementarios, calentando la mezcla a 95 °C durante 5 minutos y dejando que se enfríe lentamente hasta temperatura ambiente. Las digestiones por enzimas de restricción (Fermentas), ligaciones (ligasa T4 de Promega), fosforilaciones (PNK de Fermentas), desfosforilaciones (SAP de Fermentas), reacción de polimerasa en cadena (PCR) (Pfu de Fermentas) y mutagénesis (*QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* de Agilent Technologies) se realizaron de acuerdo con los protocolos de los fabricantes. El éxito de los clones se rastreó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), digestión enzimática y por secuenciación (realizada por MacroGen, Corea del Sur, o StabVida, Portugal).

Se verificó el tamaño, integridad y la localización de pmPAS y mitPAS en líneas celulares de mamífero transfectadas (Fig 4). Los plásmidos que codifican para PLD1 y PLD2 fueron descritos anteriormente en la literatura.

#### ULTRACENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD:

Dos placas de cultivo de 100 mm de diámetro conteniendo células HeLa transfectadas confluentes se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo. Las células se desprendieron mecánicamente de la placa y se recogieron en 1 ml de tampón de lisis (10 mM de Tris, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 20 µg/ml leupeptina, y 20 µg/ml de aprotinina, 1% de Triton X100) y se dejaron en hielo durante 1 h, mezclando periódicamente. Se prepararon soluciones

de sacarosa al 80%, 35% y 5% (masa/volumen) en tampón de lisis sin detergente o inhibidores de proteasas. El lisado se centrifugó (700 x g, 10 min, 4 °C) y el sobrenadante postnuclear resultante se diluyó 1:1 con la solución de sacarosa al 80% y se colocó en la parte inferior de un tubo de ultracentrifuga. La solución de sacarosa al 40% resultante que contiene la muestra se estratificó con 4 ml de 35% de sacarosa, 1 ml de 5% de sacarosa y 5,5 ml de tampón de lisis sin inhibidores de proteasas o detergentes. Los tubos se centrifugaron a 39.000 rpm durante 18 horas a 4 °C (rotor SW41Ti, Beckman). Después de la centrifugación, se desecharon los primeros 4,5 ml (la parte superior del tubo) y el contenido del tubo se recogió en nueve fracciones de igual volumen partiendo de la parte superior. Las fracciones se analizaron por *Western blot* y *dot blot* (ver *SDS-PAGE*, *Western blot* y *dot blot*).

#### PREPARACIÓN DE LISADOS CELULARES, ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA, *WESTERN-BLOT* Y *DOT-BLOT*

Para comprobar el tamaño de las construcciones, las células transfectadas con los biosensores se trataron con tampón de lisis (el mismo utilizado para la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa) en hielo durante 1 h mezclando periódicamente. Los lisados celulares se centrifugaron a 700 x g a 4 °C durante 10 minutos. 20 µl de los lisados celulares anteriormente referidos o 30 µl de fracciones de ultracentrifugación se aplicaron en geles de poliacrilamida a 10% de sodio dodecil sulfato (SDS). Después de la electroforesis, las proteínas en los geles se transfirieron a membranas Hybond-P (Amersham Biosciences) utilizando un método semisecco (BioRad). Las membranas se bloquearon con 5% de leche desnatada en TBS + 0,1% Tween® 20 y se sondearon con anticuerpo anti-GFP (Covance, 1:1.000 en 1% de leche desnatada en TBS + 0,1% Tween® 20) durante la noche a 4 °C. Para el análisis de *dot-blot*, 2 µl de cada fracción de ultracentrifugación se aplicaron en membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon como se detalla para membranas de PVDF y se sondearon con anticuerpo anti-caveolina-1 (Abcam, 1:1.000 en 1% de leche desnatada en TBS + 0,1% Tween® 20). Las inmunotransferencias se incubaron a continuación con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (1:1.000 en 1% de leche desnatada en TBS + 0,1% Tween® 20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, las transferencias se incubaron con *ECL Super Signal West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Scientific) y se detectó la quimioluminiscencia con una cámara CCD Fujifilm LAS-3000.

**Ejemplo 1.1: Medición de ácido fosfatídico en la membrana plasmática en células individuales.**

5 La proteína Spo20, una proteína SNARE de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se une específicamente al AF *in vivo* (Nakanishi H *et al.* Mol Biol Cell 2004;15(4):1802-1815) y, de hecho, los residuos 51-91 de Spo20 se han fusionado a la proteína fluorescente GFP (GFP-Spo20) para crear un sensor que se transloca del núcleo y citoplasma a la membrana al aumentar los niveles de AF (Du G & Frohman MA Mol Biol Cell 2009;20(1):200-208) (Fig. 2). El sensor de translocación GFP-Spo20, a diferencia del biosensor de la invención, no se puede expresar en compartimentos subcelulares como la mitocondria. Hemos utilizado los residuos 51-91 de Spo20, como dominio de unión a AF, para construir sensores de AF capaces de informar dinámicamente sobre los niveles de este fosfolípido en las membranas celulares. La unión del AF a este dominio se traduce en una señal fluorescente por el fenómeno de transferencia de energía por resonancia entre dos proteínas fluorescentes incorporadas al biosensor. Como se ha detallado en Materiales y Métodos, las proteínas quiméricas para determinar AF en la membrana plasmática contienen, desde el extremo N- a C-terminal los siguientes elementos: los residuos 1-12 de la proteína

10 Lck (secuencia de direccionamiento a la membrana plasmática), la proteína fluorescente cian ECFP (donador de energía), los residuos 51-91 de Spo20 (dominio de unión a AF), y la proteína fluorescente amarilla Venus (o una de sus variantes permutadas circularmente, cpVenus) (el aceptor de energía) (la Fig. 5A muestra la fusión con Venus cp173). Estos fragmentos están unidos entre sí por tres

15 espaciadores de 37-41 aminoácidos, que sirven para proporcionar flexibilidad entre los dominios descritos anteriormente. Además, dado que la orientación ECFP-Venus (donador-aceptor) en la proteína quimérica es importante para determinar la eficiencia de la transferencia de energía por resonancia, se han ensayado varias orientaciones del aceptor utilizando cinco permutaciones circulares de Venus.

30

En primer lugar se transfectaron transitoriamente células HeLa con las quimeras descritas. Las proteínas de fusión mostraron bandas únicas del tamaño previsto en extractos de células transfectadas sometidos a *Western blot* (Fig. 4A), lo que da muestra de su estabilidad en el ambiente celular. Las células transfectadas con

35 pmPAS mostraron tinción de membrana plasmática cuando se observaron mediante

microscopía confocal (Fig. 4B). Se ha demostrado que los ésteres de forbol (como el PMA) activan la proteína quinasa C y aumentan la actividad de la fosfolipasa D (PLD), y por lo tanto incrementan los niveles de AF en la membrana plasmática. Por otro lado, el propranolol inhibe rápidamente la conversión de AF a DAG por las AF fosfatasas (Nishioka T *et al.* J Biol Chem 2010;285(46):35979-35987) (véase la Fig. 1 con las vías de síntesis y degradación de AF). Por lo tanto, añadimos estos dos compuestos juntos para aumentar los niveles de AF en las células. La adición de PMA y propranolol a las células que expresan las seis quimeras descritas anteriormente (con Venus como aceptor de FRET o con cada una de las cinco variantes de Venus permutadas circularmente) resultó en una disminución de la emisión de la proteína fluorescente Venus (imagen de FRET) y el aumento de ECFP (donador de energía), es decir, la relación ECFP/FRET aumentó (Fig. 3B). La variante que mostró un cambio mayor fue la que contiene Venus permutada circularmente en el residuo 173 (Venus cp173). Esta quimera se denominó pmPAS (plasma membrane PA Sensor) y se utilizó en experimentos posteriores. pmPAS mostró la relación ECFP/FRET basal más baja (Fig. 3A) y el mayor aumento de esta relación tras la estimulación (mostró el mayor rango dinámico) (Fig. 3B). Cuanto mayor es el rango dinámico de un biosensor en respuesta al ligando, es más fácil de detectar. Los biosensores de la invención presentan el mayor rango dinámico descrito con AF.

20

La acilación del dominio N-terminal de Lck, la secuencia de direccionamiento presente en pmPAS, debe favorecer el anclaje del biosensor en las balsas de lípidos, como se ha demostrado con este dominio en una fusión con GFP. Después de la ultracentrifugación de extractos de células en gradiente de sacarosa, se halló que pmPAS colocaliza con caveolina-1 (un marcador de las balsas lipídicas) en las fracciones de baja densidad (Fig. 6) aunque ambas proteínas también estaban presentes a densidades más altas de dicho gradiente de sacarosa. La presencia de una parte de pmPAS en las balsas de lípidos permite la detección de AF en estos subdominios funcionales.

30

El aumento de AF por inhibición de la AF fosfatasa por el propranolol fue rápido (segundos), y el propranolol potenció el efecto de los ésteres de forbol (Fig. 7A). Estos resultados sugieren que las células HeLa en reposo tienen actividad basal AF fosfatasa y, cuando ésta se inhibe, los niveles de AF aumentan. Al sobreexpresar PLD1 o PLD2 (por co-transfección con pmPAS) se observó un mayor aumento en los

35

niveles de AF por PMA (Fig. 7B). Por otra parte, el aumento de AF por PMA fue inhibido parcialmente por la preincubación de las células con FIPI, un inhibidor de la PLD (1  $\mu$ M) (Fig. 7B).

5 Tras ensayar la estimulación farmacológica de las enzimas citadas, se hizo una estimulación fisiológica con el factor de crecimiento epidérmico, EGF, que se ha utilizado en la literatura para activar la PLD y aumentar los niveles de AF en la membrana. En células HeLa privadas de suero que expresan pmPAS, la adición de EGF resultó en un aumento de la relación de ECFP/FRET (Fig. 7C). Este efecto se  
10 bloqueó por la preincubación con el inhibidor de PLD FIPI, lo que sugiere que está mediado por la activación de PLD. También se evaluó el efecto de la introducción de una mutación puntual en el dominio Spo20 de la quimera, que confiere menor afinidad por el AF (Nakanishi H *et al.* Mol Biol Cell 2004;15(4):1802-1815). El cambio de Leu 67 a Pro (L67P) en el dominio Spo20 en pmPAS ralentizó la respuesta al propranolol y  
15 PMA y disminuyó la magnitud del cambio (Fig. 7D).

Una forma de ensayar la respuesta de los biosensores de AF, además de la manipulación farmacológica o fisiológica descrita anteriormente, fue añadir liposomas con este fosfolípido directamente a las células. La Figura 8 muestra experimentos  
20 representativos en células HeLa incubadas con liposomas que contienen ácido dioleoilfosfatídico (lipoDOPA, 200  $\mu$ M), lo que resultó en un rápido aumento de la relación de ECFP/FRET, seguido por una recuperación parcial en cuestión de minutos. La respuesta a lipoDOPA fue heterogénea de célula a célula, probablemente debido a la variabilidad en el tamaño de los liposomas y su fusión con las células. El aumento  
25 de la relación ECFP/FRET en respuesta a estos liposomas confirma de forma directa la respuesta del biosensor pmPAS a AF.

Referencias de la literatura sugieren que el ácido oleico activa las lipinas (fosfatasas de AF que lo convierten en DAG) probablemente mediante la inducción de su  
30 translocación a la membrana plasmática (Fig. 1). De este modo, el ácido oleico debe disminuir los niveles de AF, el efecto contrario del obtenido con propranolol. La incubación de las células con liposomas que contienen una mezcla de fosfatidilcolina y ácido oleico (lipoOA, 500  $\mu$ M) dio lugar a una rápida disminución de la relación ECFP/FRET, seguida de una lenta recuperación (Fig. 9A y B). No se observó ningún  
35 efecto con liposomas que contienen solo fosfatidilcolina (Fig. 9A).

El biosensor de FRET pmPAS, por lo tanto, es sensible tanto al aumento como a la disminución de los niveles de AF en la membrana plasmática. El resto de variantes de Venus y cpVenus también funcionan como biosensores de AF (Fig. 3), aunque con un menor cambio de FRET para un mismo estímulo.

**Ejemplo 1.2: Detección de ácido fosfatídico en la membrana mitocondrial externa a nivel de células individuales.**

Las mitocondrias expresan PLD6, también conocida como mitoPLD, una fosfolipasa atípica que genera AF utilizando cardiolipina como sustrato (Fig. 1). En las mitocondrias, la producción de AF se ha implicado en la fusión y fisión de las mismas. Dado que los niveles de AF en la membrana externa mitocondrial pueden ser regulados o no en concierto con el AF de la membrana plasmática, se hace necesaria la obtención de una proteína de fusión capaz de detectar el AF en la membrana mitocondrial. Por este motivo, dirigimos la expresión del sensor de AF a la membrana externa mitocondrial mediante el uso de un pequeño fragmento de la translocasa Tom20, que es suficiente para dirigir la expresión de una proteína a esta membrana. El fragmento N-terminal de Lck utilizado en la construcción pmPAS fue reemplazado por los residuos 1-33 de Tom20 para producir el indicador *mitPAS* (*mitochondrial PA sensor*) (Fig. 5B). La quimera debe anclarse en la membrana mitocondrial externa como una proteína integral de membrana, con los dominios ECFP-Spo20-cpVenus orientados al citoplasma. Las células transfectadas con mitPAS mostraron fluorescencia mitocondrial (cian y amarillo) (Fig. 4C), por lo que la secuencia de direccionamiento funcionó correctamente. La relación ECFP/FRET del biosensor mitPAS en células no estimuladas fue mayor que la de pmPAS (Fig. 10, sin ayuno). Esto podría indicar mayores niveles de AF en estado estacionario en la membrana mitocondrial externa que en la membrana plasmática, pero también podría deberse al diferente modo de anclaje de la porción ECFP-Spo20-Venus a estas membranas.

En la membrana mitocondrial externa, como en la membrana plasmática, el propranolol (inhibidor de la AF fosfatasa) causó un aumento rápido en los niveles de AF (Fig. 11A). Tanto la membrana mitocondrial externa como la membrana plasmática parecen tener conversión tónica de AF en DAG. Además, cuando las células fueron estimuladas con EGF aumentaron los niveles de AF, pero con un retraso más largo

que en la membrana plasmática (Fig. 11B). Este cambio se bloqueó por la preincubación con FIPI, como en la membrana plasmática. Tras la estimulación de PLD con ésteres de forbol (PMA), aumentaron los niveles de AF en la mitocondria sin un retraso significativo (Fig. 11C) y la preincubación con FIPI disminuyó tanto la tasa  
5 como la magnitud del cambio de AF inducido por PMA.

Las diacilglicerol quinazas (DGKs) catalizan la conversión de DAG en AF, aumentando los niveles de este último (Fig. 1). El tratamiento de las células con el compuesto R59949 (40 mM), inhibidor de DGK (Fig. 1), disminuyó la relación ECFP/FRET de mitPAS, pero no tuvo ningún efecto sobre pmPAS (Fig. 11D). Este hallazgo sugiere  
10 que las células HeLa muestran una síntesis tónica de AF a partir de DAG en la membrana mitocondrial externa, pero no en la membrana plasmática.

Se ha usado la retirada del suero del medio de cultivo celular para inducir la autofagia, un proceso en el que mTOR, una proteína regulada positivamente por AF, está involucrada. En la membrana plasmática, la privación de suero durante 14 horas dio como resultado una pequeña, pero estadísticamente significativa, disminución de AF (Fig. 10). Sin embargo, en la membrana mitocondrial externa la relación ECFP/FRET de mitPAS disminuyó significativamente ya después de la privación de suero durante 4  
20 horas (Fig. 10). El mecanismo o las enzimas que participan en esta disminución en los niveles de AF no están establecidos.

Por lo tanto, se demostró que las proteínas de fusión de la invención son útiles para detectar y cuantificar AF en la membrana mitocondrial externa.

25

**Ejemplo 1.3: Diferencia en los niveles de AF en la membrana plasmática en varias líneas celulares de cáncer.**

Se compararon los niveles basales de AF en la membrana plasmática de las células HeLa, derivadas de un adenocarcinoma de cuello de útero humano, y las derivadas de  
30 cáncer de colon humano HT29 y HCT116. Las células HeLa y las HT29 exhibieron los niveles más bajos y más altos, respectivamente, mientras que las células HCT116 mostraron un valor intermedio (Fig. 12A). Varios tipos de cánceres humanos tienen aumentada la actividad de PLD, lo que sugiere una alta producción de AF. Mientras  
35 que las células HeLa no mostraron cambios en los niveles de AF por incubación con

FIPI, un inhibidor de PLD, los niveles de AF en membrana plasmática de células HT29 disminuyeron (Fig. 12B), lo que sugiere una alta actividad basal de PLD1/2 en estas células. Al igual que en células HeLa, las células HCT116 no mostraron respuesta a la adición de FIPI.

5

También se estimularon las líneas celulares derivadas de cáncer de colon con PMA. Los niveles de AF en células HT29 no aumentaron tanto como en células HeLa tratadas con PMA (Fig. 12C), lo que apoya que tienen una elevada actividad basal PLD, como se ha indicado anteriormente. De acuerdo con estos resultados, se ha descrito en la literatura una elevada actividad PLD en las balsas lipídicas de células HT29 resistentes a múltiples fármacos. Este resultado sugiere que los biosensores de la invención pueden ser útiles en la caracterización de los niveles de AF en células cancerosas.

15 **Ejemplo 1.4: Niveles basales de AF durante la migración celular y la división celular (mitosis).**

Durante la migración celular se distingue un polo anterior, en la dirección del movimiento de la célula (*leading edge*) y un polo posterior (*trailing edge*), y ambos presentan características bioquímicas diferenciadas. En células HeLa que presentaban polarización, con bordes anterior y posterior bien definidos, se observó un gradiente en los niveles de AF: niveles de AF más altos (mayor ECFP/FRET) en el borde posterior y más bajos (menor ECFP/FRET) en el borde delantero (Fig. 13A y B). Esta diferencia bioquímica se mantuvo mientras la células permanecían polarizadas. En la figura 13C se representan los valores de ECFP/FRET de una célula que detiene su migración. A medida que la célula retrajo el borde anterior, el gradiente de AF se anuló (Fig. 13C). Por otra parte, durante los experimentos se observaron algunas células en mitosis, en el proceso de división celular de una célula madre a dos células hijas. Antes de la división, las células se redondean y se desprenden de la matriz o superficie de la placa de cultivo, lo que supone una ausencia completa de polarización de la membrana plasmática. De acuerdo con los resultados anteriores, los niveles de AF en la membrana plasmática aumentaron durante la retracción de membrana justo antes de la división y volvieron a disminuir cuando las dos células hijas comenzaron a emitir contactos y extenderse sobre la placa de cultivo (Fig. 13D).

35

**Ejemplo 1.5: Heterogeneidad intracelular en los niveles de AF en células formadoras de procesos de membrana especiales.**

Las células de Schwann y oligodendrocitos, *in vivo*, son las responsables de la  
 5 mielinización de los axones de las neuronas en el sistema nervioso periférico y  
 sistema nervioso central, respectivamente. Para ello, estas células emiten procesos  
 membranares que exploran el ambiente y que son los responsables de seleccionar y  
 establecer una relación con el axón durante el proceso de mielinización. Así, la  
 producción de estos procesos es crucial para una correcta mielinización.

10 Hemos transfectado pmPAS en células MSC80, una línea celular de células de  
 Schwann, y en células OLN93, una línea celular de oligodendrocitos (ambas de ratón).  
 El análisis del ratio ECFP/FRET en estas células mostró que, en ambas, los niveles de  
 AF son menores en los procesos en comparación con el cuerpo celular (Fig. 14). Así  
 pues, con el uso de los biosensores de la invención, se detecta una menor  
 15 concentración de AF tanto en el polo anterior de células Hela durante la migración  
 celular, como durante la emisión de procesos en líneas de células de Schwann y  
 oligodendrocitos.

**CONCLUSIONES**

20

En la presente invención se han desarrollado nuevos biosensores basados en FRET  
 sensibles a los cambios de los niveles de AF en membranas celulares.

El dominio 51-91 de Spo20 se ha fusionado en el pasado a la proteína fluorescente  
 GFP y se ha utilizado como sensor de AF basado en translocación (GFP-Spo20). Los  
 25 sensores de translocación pueden inducir a falsos positivos cuando se utiliza  
 microscopía de fluorescencia no confocal, por ejemplo en zonas de membrana  
 plasmática con alta actividad dinámica, donde se provoca localmente un aumento del  
 volumen citoplasmático que se puede confundir con una mayor localización del sensor  
 en membrana. Además, los sensores de translocación poseen menor cociente  
 30 señal/ruido, mayor susceptibilidad de interferencia por autofluorescencia, y menor  
 resolución espacial que los sensores de la invención basados en FRET. La utilización  
 de etiquetas de anclaje a distintos tipos de membrana en los biosensores de la  
 invención permite que la señal emitida refleje solamente niveles de AF presente en un

determinado compartimento celular, lo que es imposible en sensores basados en translocación.

Se han introducido espaciadores de 37-41 aminoácidos entre las subunidades del biosensor. Estos espaciadores están diseñados para introducir las etiquetas de anclaje en el extremo N-terminal de la proteína quimérica, por ejemplo, la etiqueta Lck1-12 para el anclaje a la membrana plasmática, y para permitir movilidad de los distintos dominios del biosensor ante la unión del AF.

El aumento de AF inducido farmacológicamente en la membrana plasmática provoca un aumento de intensidad de la fluorescencia de la proteína dadora de energía (ECFP) y una disminución de intensidad de la fluorescencia de la proteína aceptora (Venus o versiones permutadas de Venus) en toda la batería de construcciones probadas, resultando en un aumento del ratio de intensidad ECFP/intensidad de Venus a través de FRET.

La construcción que contiene Spo20(51-91) fusionada entre ECFP y Venus cp173 (pmPAS) mostró un mayor rango dinámico en respuesta a estímulos que aumentan AF en la membrana plasmática. El biosensor pmPAS ha demostrado sensibilidad y capacidad de percibir aumentos y disminuciones de AF en la membrana plasmática.

La presencia de una etiqueta Lck1-12 ha permitido anclar la proteína quimérica en balsas lipídicas de la membrana plasmática pero también en dominios de la membrana plasmática no pertenecientes a balsas lipídicas (Fig. 6), garantizando que no se dejan subdominios fuera del rango de sensibilidad del sensor. Un sensor de FRET para AF desarrollado en el pasado (Nishioka T *et al.* J Biol Chem 2010;285(46):35979-35987) posee un anclaje de membrana C-terminal CAAX box, que localiza el sensor en subdominios no pertenecientes a balsas lipídicas, limitando el rango de sensibilidad del sensor a esos subdominios.

Los biosensores de la invención han permitido por primera vez detectar cambios en los niveles de AF en la membrana plasmática durante la polarización celular, así como durante la división celular. Se han hallado niveles disminuidos en el polo anterior de células HeLa durante la migración celular, así como en los procesos emitidos por líneas celulares de Schwann y oligodendrocitos. Durante la mitosis, las células se redondean y aumentan los niveles de AF en la membrana plasmática.

La sustitución en pmPAS de la etiqueta Lck1-12 por los aminoácidos 1-33 de la proteína Tom20 ha permitido anclar el biosensor en la membrana mitocondrial externa (mitPAS), el cual ha permitido detectar aumentos y disminuciones de AF en esta membrana. Este es el primer biosensor capaz de monitorizar niveles de AF en la

5 membrana mitocondrial externa.

## REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión fluorescente que comprende:
  - a. una subunidad (a) que comprende una proteína con al menos un 70% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma;
  - b. una subunidad (b) unida al extremo carboxilo terminal de la subunidad (a) que comprende una proteína que se une al ácido fosfatídico con al menos un 70% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 4; o un fragmento de la misma;
  - c. y una subunidad (c) unida al extremo carboxilo terminal de la subunidad (b) que comprende una proteína con al menos un 70% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 6 o una permutación circular de la misma o un fragmento de la misma;donde las subunidades se unen entre sí sin espaciador o con un polipéptido espaciador.
2. Proteína según la reivindicación 1 donde la subunidad (a) consiste en la SEQ ID NO: 2.
3. Proteína según la reivindicación 1 donde la subunidad (b) consiste en la SEQ ID NO: 4.
4. Proteína según la reivindicación 1 donde la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 6.
5. Proteína según la reivindicación 1 donde la subunidad (a) consiste en la SEQ ID NO: 2, la subunidad (b) consiste en la SEQ ID NO: 4 y la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 6.
6. Proteína según la reivindicación 1 donde la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 8.
7. Proteína según la reivindicación 1 donde la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 10.

8. Proteína según la reivindicación 1 donde la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 12.
9. Proteína según la reivindicación 1 donde la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 14.
10. Proteína según la reivindicación 1 donde la subunidad (c) consiste en la SEQ ID NO: 16.
11. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que además comprende la secuencia SEQ ID NO: 18 unida al extremo amino terminal de la subunidad (a).
12. Proteína según la reivindicación 1 donde la proteína de fusión consiste en la proteína de secuencia SEQ ID NO: 20.
13. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que además comprende la secuencia SEQ ID NO: 22 unida al extremo amino terminal de la subunidad (a).
14. Proteína según la reivindicación 1 donde la proteína de fusión consiste en la proteína de secuencia SEQ ID NO: 24.
15. Secuencia nucleotídica que comprende la secuencia que codifica una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
16. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 15 donde dicha secuencia consiste en la SEQ ID NO: 19.
17. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 15 donde dicha secuencia consiste en la SEQ ID NO: 23.
18. Célula que comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17.
19. Uso de la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 para la

detección y/o cuantificación *in vitro* del ácido fosfatídico en una célula o en un tejido.

20. Uso según la reivindicación 19 donde el ácido fosfatídico se localiza en la  
5 membrana plasmática.

21. Uso según la reivindicación 19 donde el ácido fosfatídico se localiza en la membrana mitocondrial.

10 22. Kit que comprende la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 o la célula según la reivindicación 18.

23. Uso del kit según la reivindicación 22 para la detección y/o cuantificación *in vitro*  
15 del ácido fosfatídico en una célula o en un tejido o en un extracto celular.

24. Uso según la reivindicación 23 donde el ácido fosfatídico se localiza en la membrana plasmática.

20 25. Uso según la reivindicación 23 donde el ácido fosfatídico se localiza en la membrana mitocondrial.

26. Procedimiento de obtención de la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que comprende cultivar una célula según la reivindicación  
25 18 en condiciones que permiten la expresión de dichas proteínas.

27. Método para el análisis cuantitativo de los niveles de ácido fosfatídico que comprende:

- 30 a. poner en contacto una célula o tejido o extracto celular con la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o con la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17;
- b. anclaje de la proteína de fusión a una membrana celular;
- c. detectar y cuantificar la fluorescencia emitida, proporcional a la presencia de ácido fosfatídico.

35

28. Método según la reivindicación 27 que además comprende, para el cribado de ligandos de receptores de membrana o de enzimas, entre el paso (b) y el paso (c) estimular la célula o el tejido con una sustancia, donde la célula o el tejido expresa un receptor de membrana acoplado a la liberación o metabolización de ácido fosfatídico, o una enzima que sintetiza o degrada el ácido fosfatídico.
- 5

FIG. 1

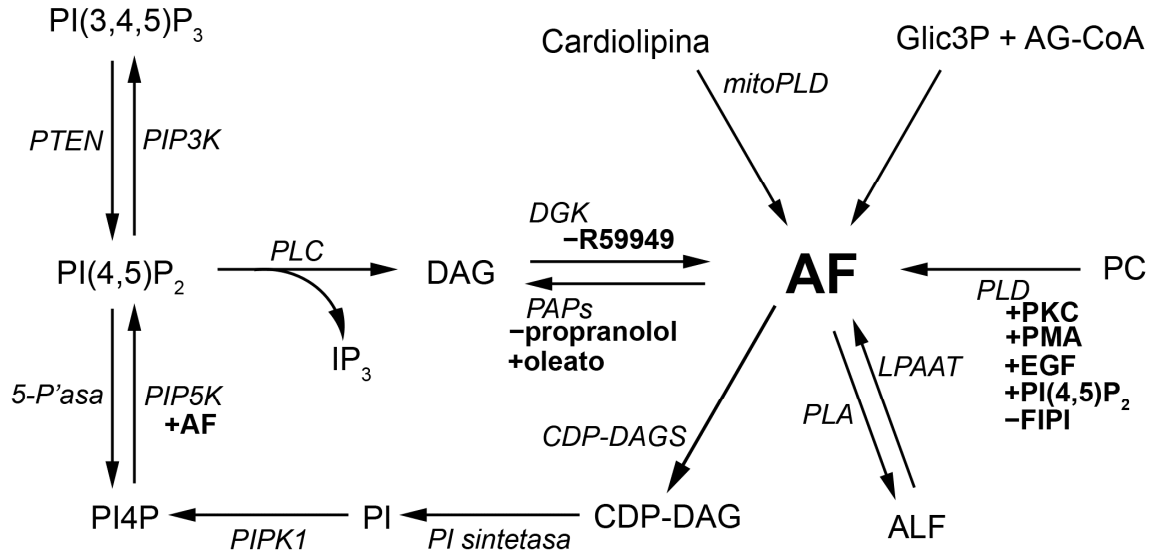


FIG. 2

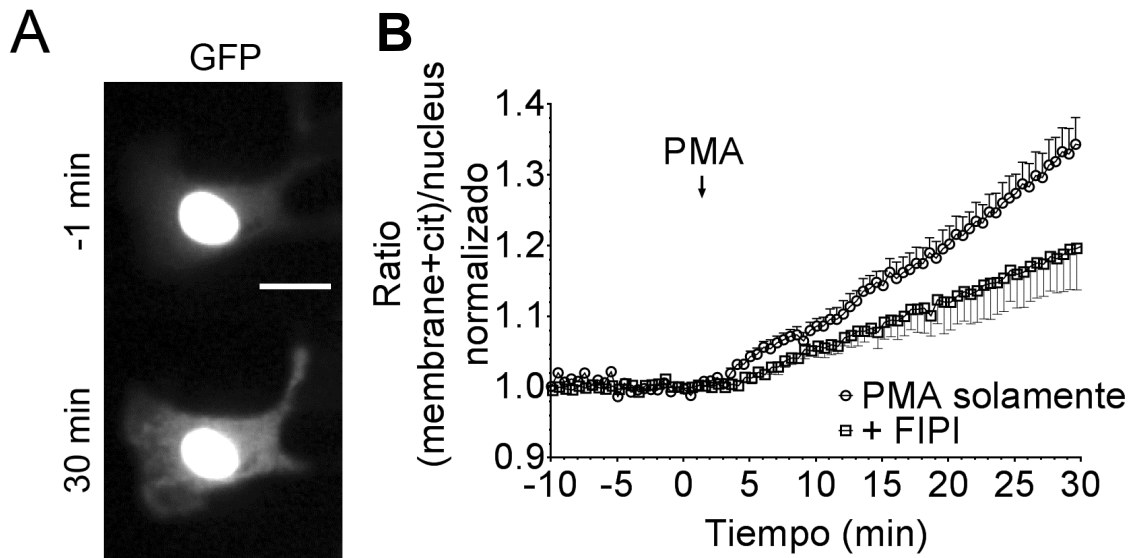
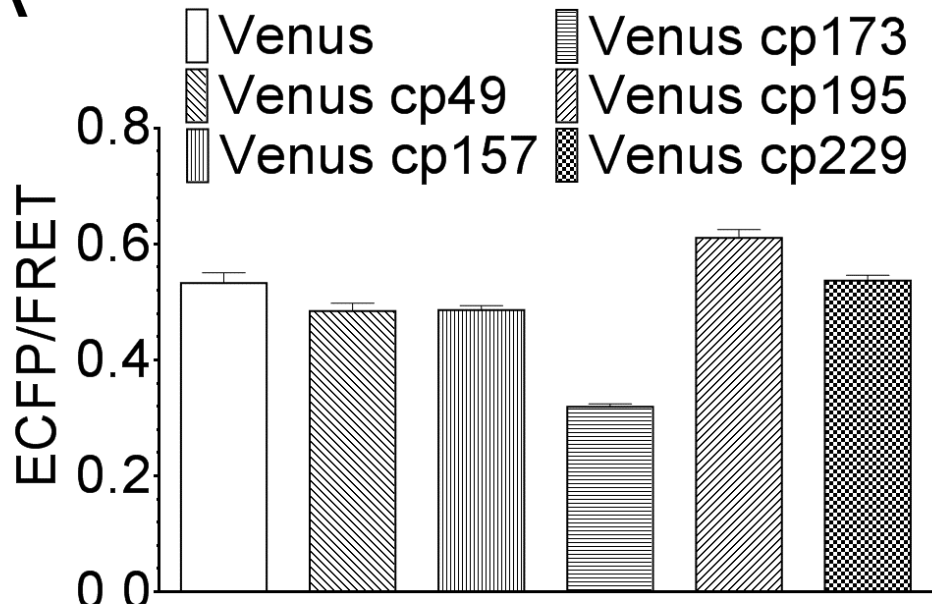


FIG. 3

**A**



**B**

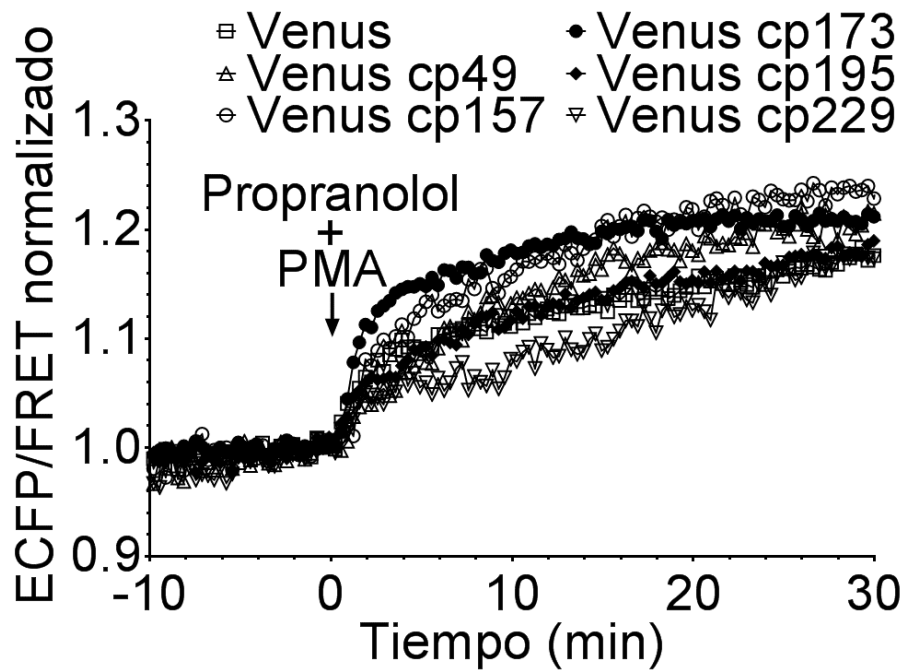


FIG. 4

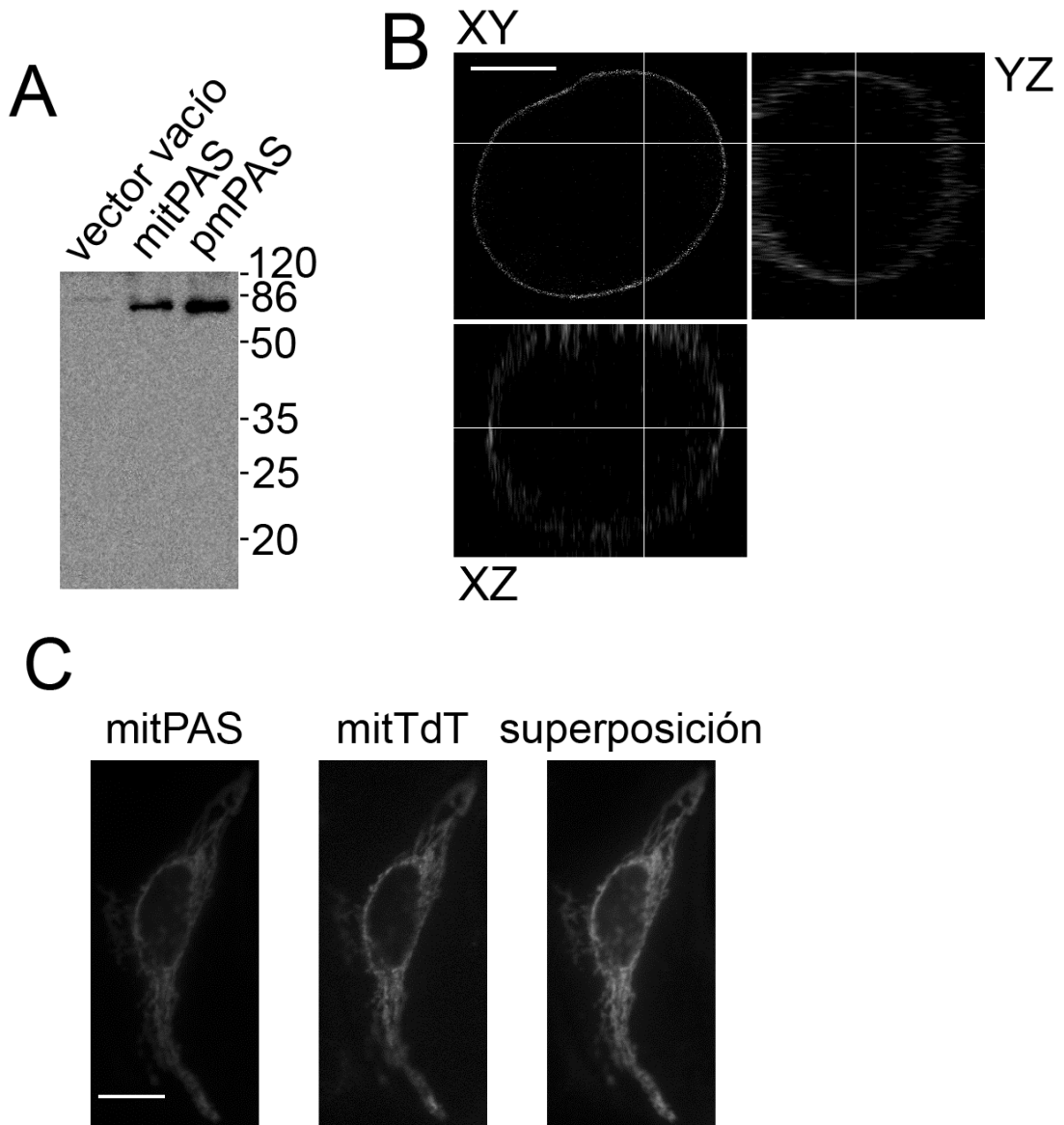


FIG. 5

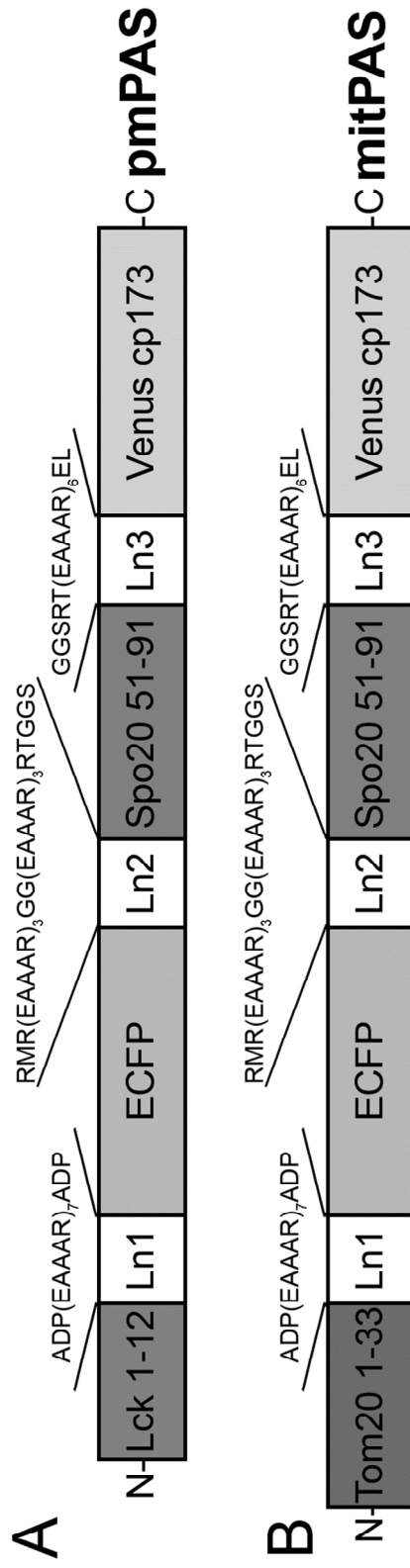


FIG. 6

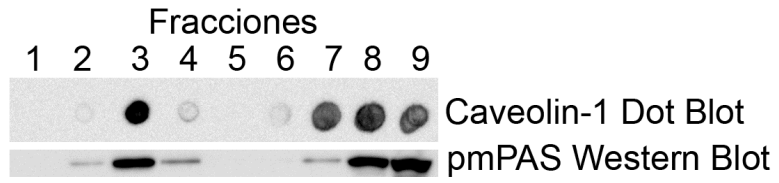


FIG. 7

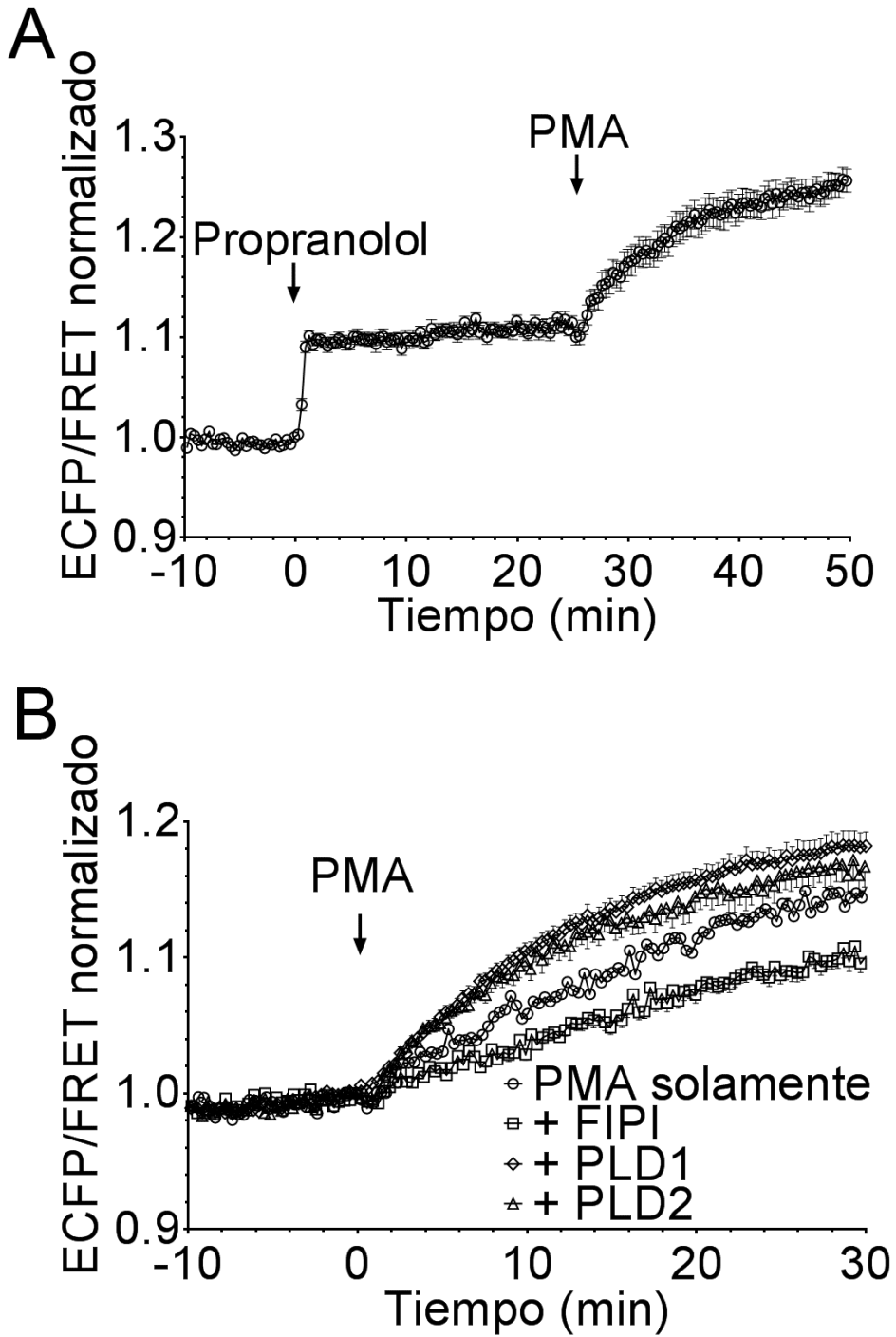


FIG. 7 (continuación)

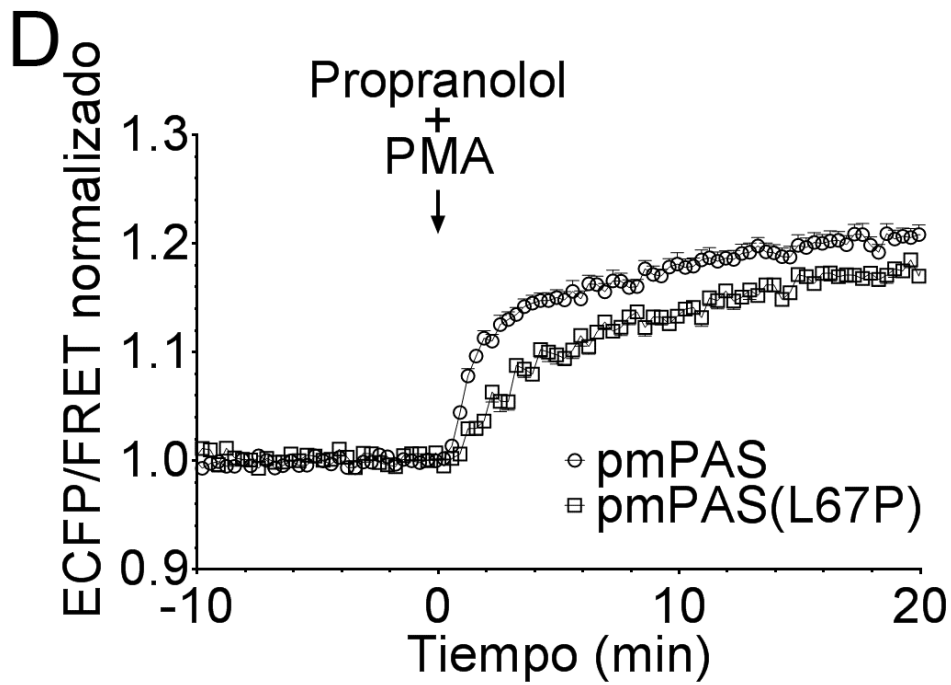
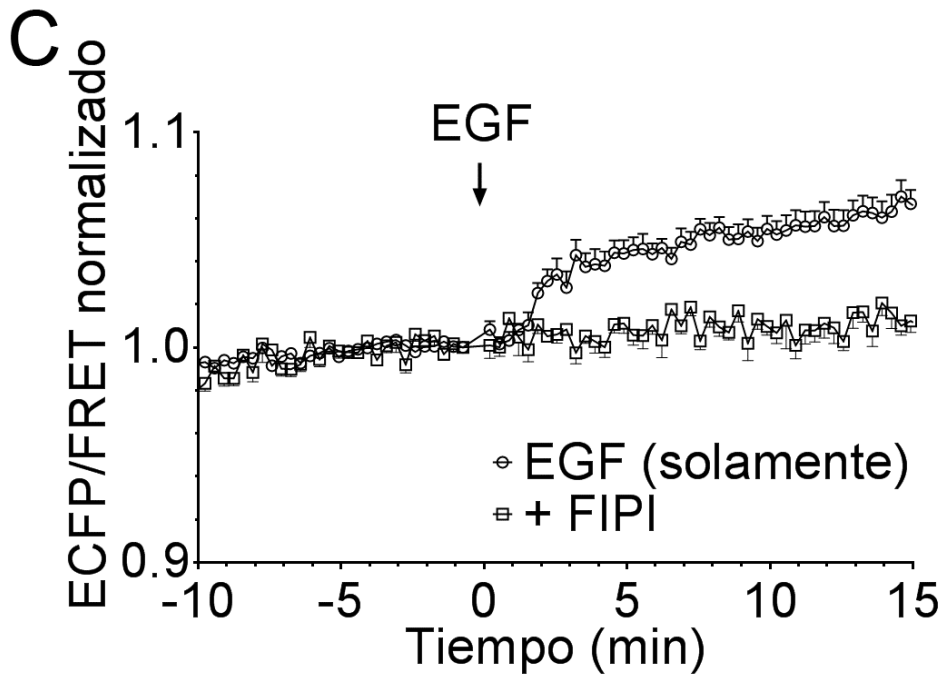


FIG. 8

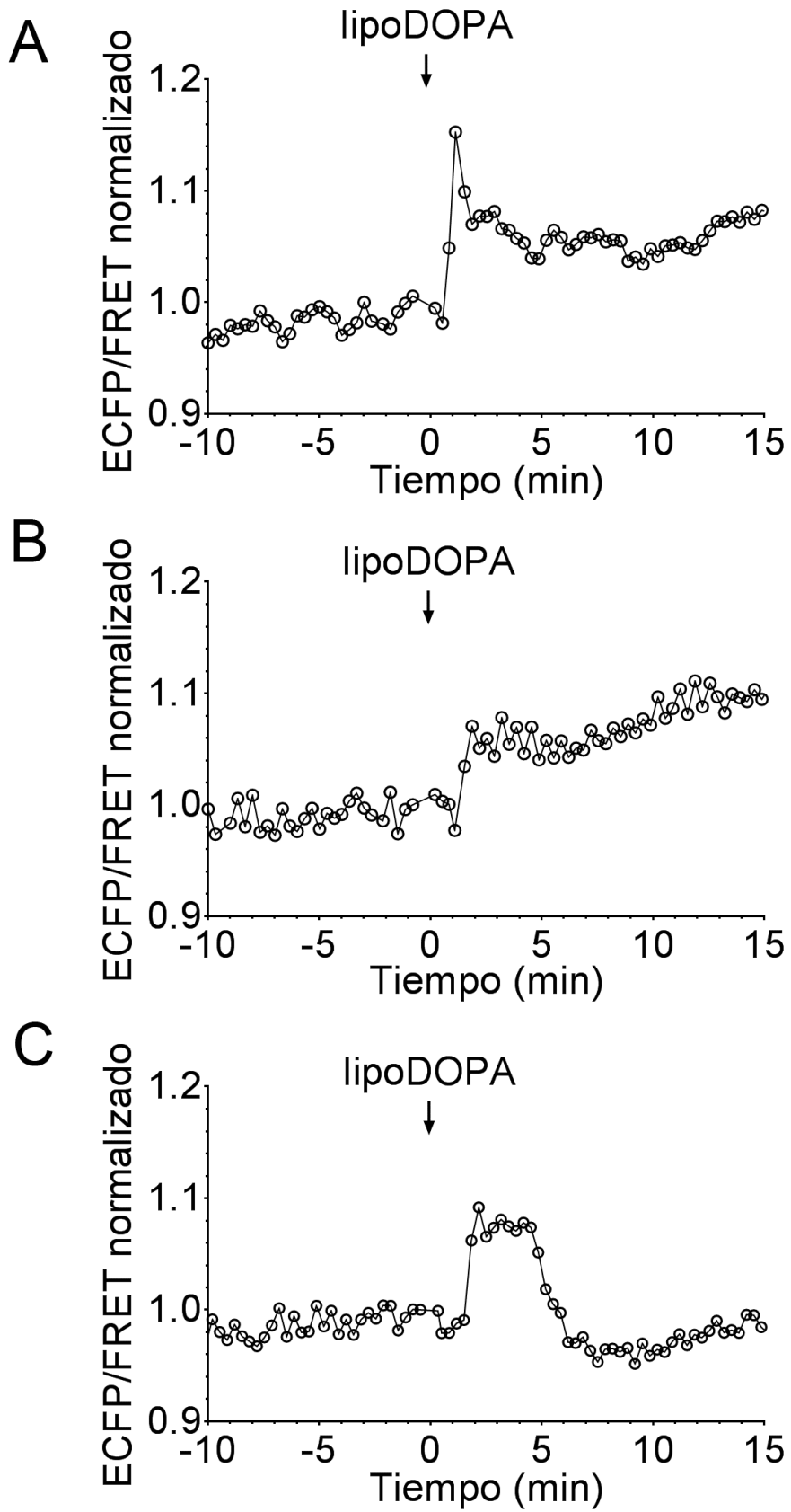


FIG. 9

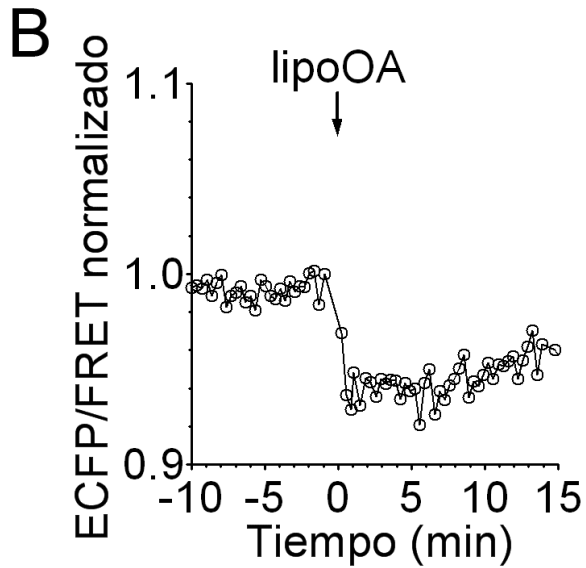
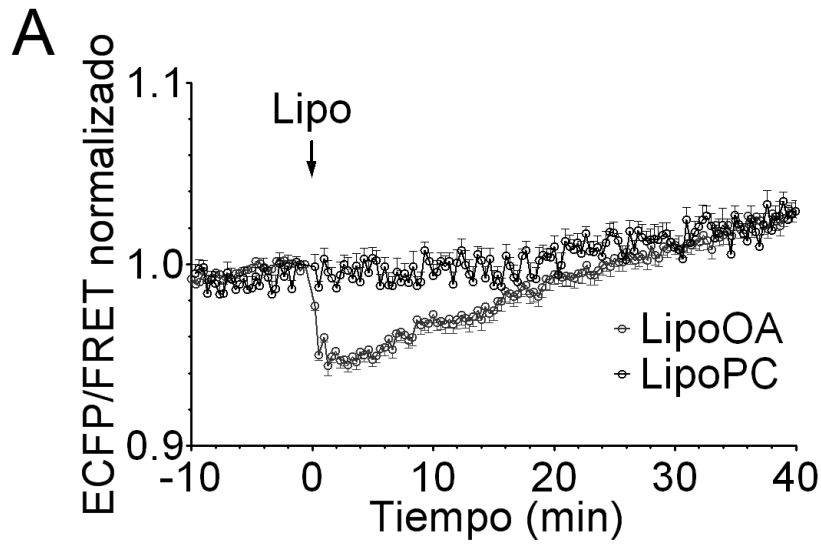


FIG. 10

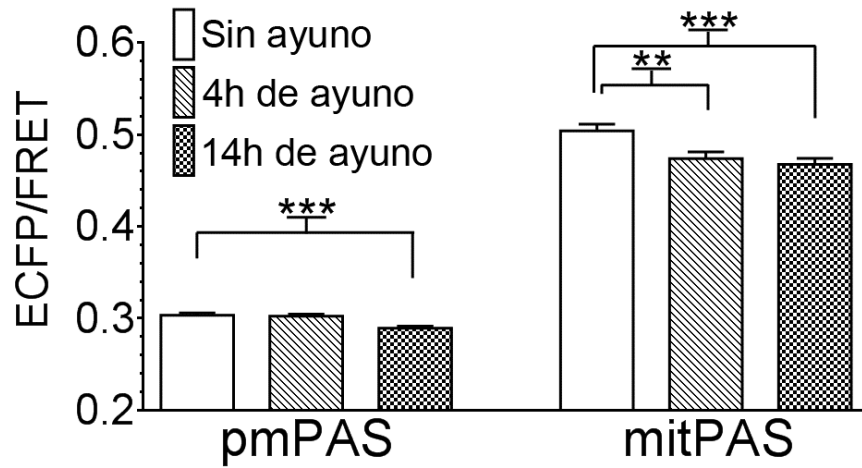


FIG. 11

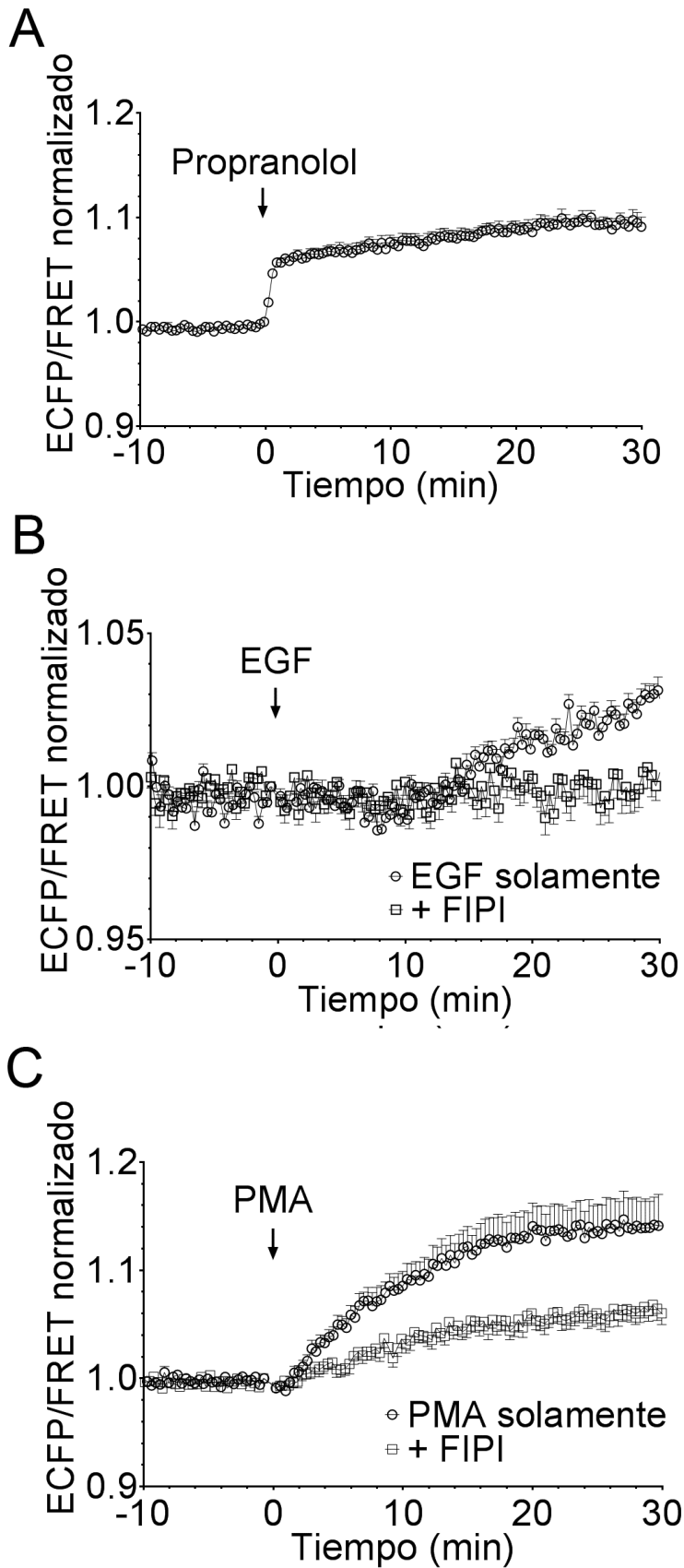


FIG. 11 (continuación)

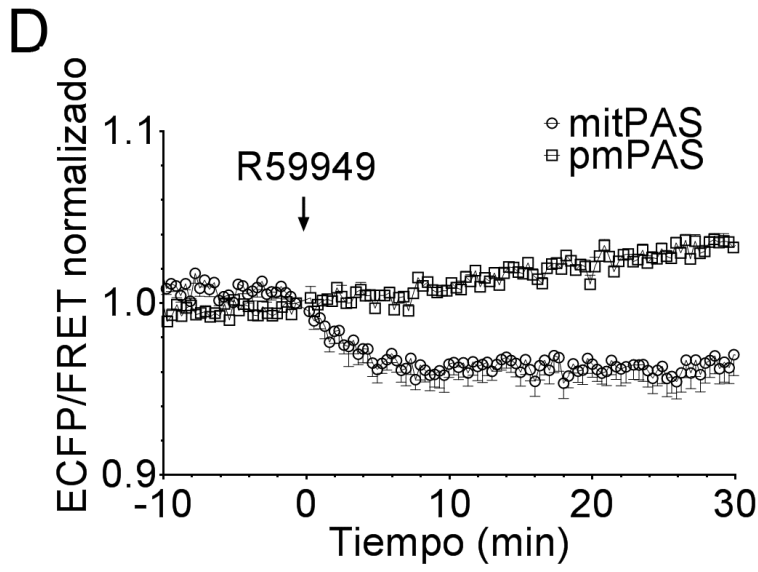


FIG. 12

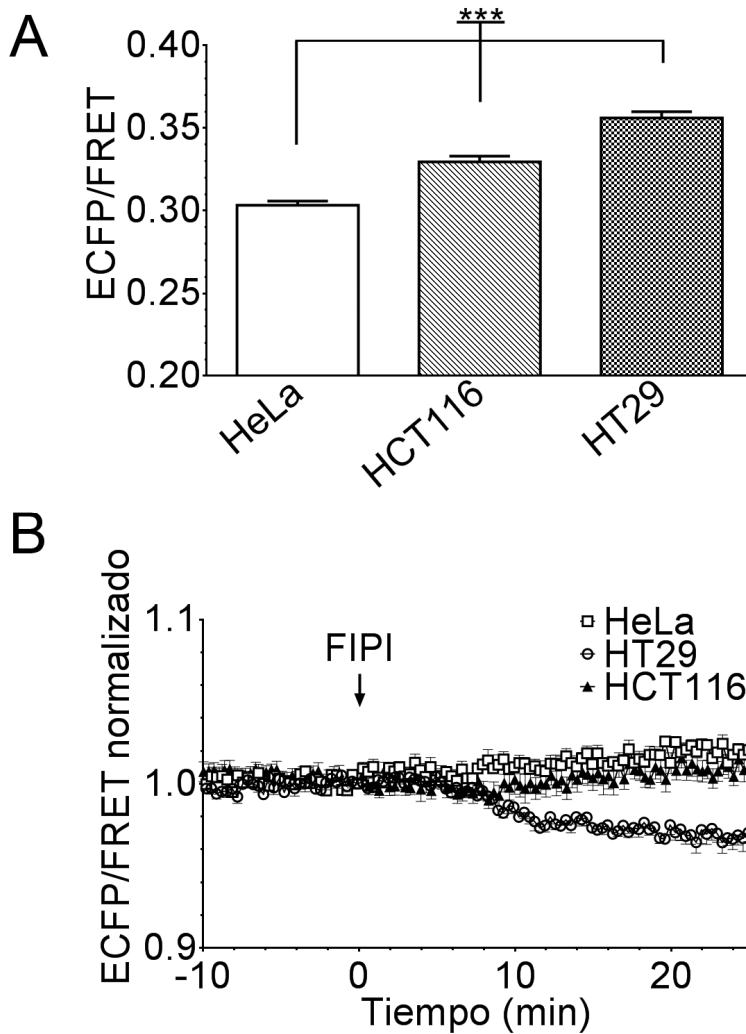


FIG. 12 (continuación)

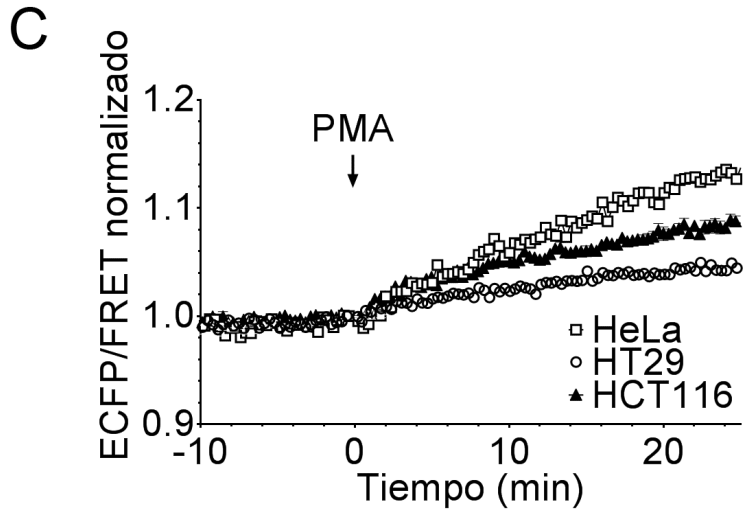


FIG. 13

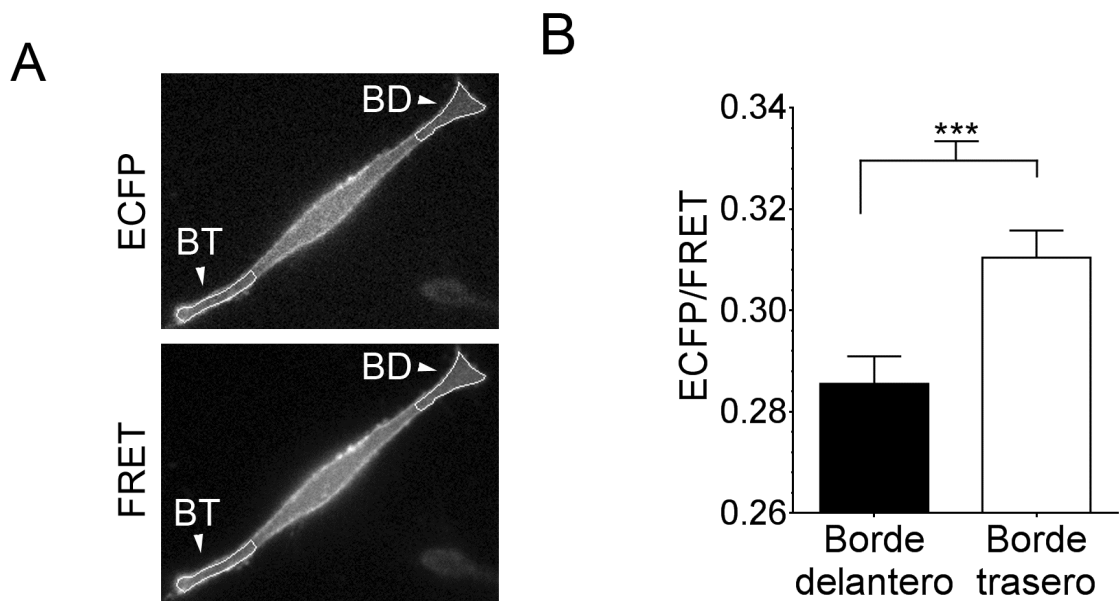
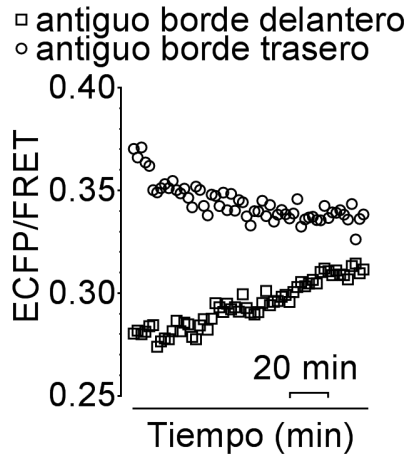


FIG. 13 (continuación)

C



D

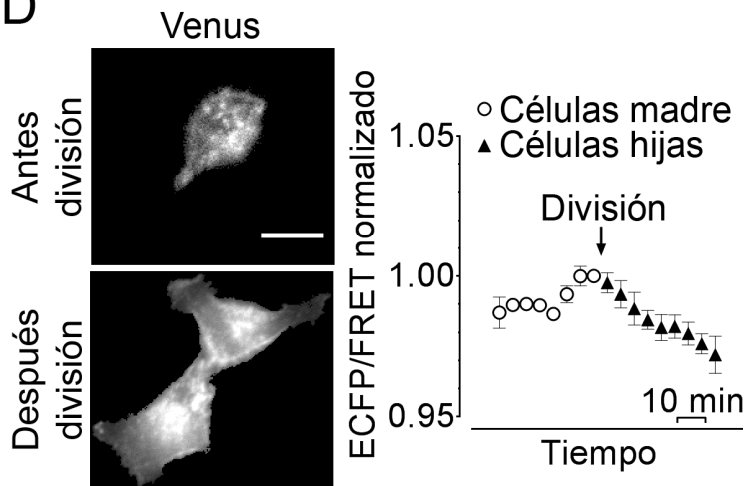
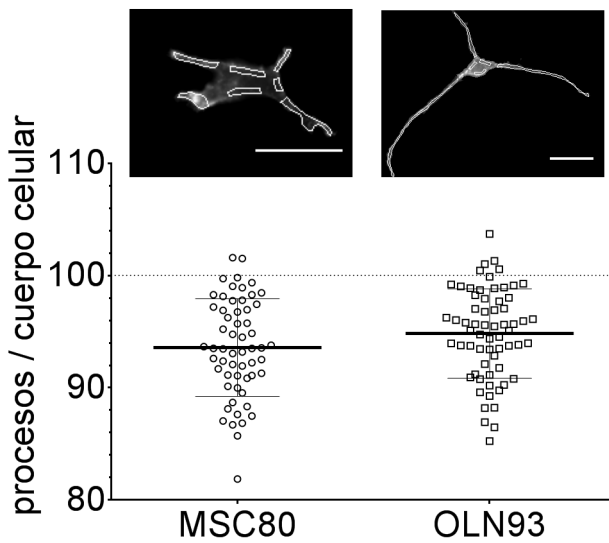


FIG. 14



# ES 2 534 574 B1

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Castilla la Mancha

<120> Biosensor para la detección de ácido fosfatídico en membranas celulares

<130> ES1874.26

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 684  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ECFP

<400> 1  
 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60  
 ggcgacgtaa acggccacag gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120  
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180  
 ctcgtgacca ccctgacctg gggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240  
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg taccatcttc 300  
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360  
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420  
 aagctggagt acaactacat cagccacaac gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac 480  
 ggcatcaagg cccacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540  
 gaccactacc agcagaacac cccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600  
 tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc 660  
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgcc 684

<210> 2  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ECFP

<400> 2

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu  
 1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly  
 20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile  
 35 40 45

ES 2 534 574 B1

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr  
50 55 60

Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys  
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu  
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu  
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly  
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr  
130 135 140

Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn  
145 150 155 160

Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser  
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly  
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu  
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe  
210 215 220

Val Thr Ala Ala  
225

<210> 3  
<211> 123  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> SPo20 fragmento 51-91

<400> 3  
atggacaatt gttcaggaag cagaagacgt gataggctac atgtgaagct taaatccttg 60  
aggaataaaa tccacaaaca acttcacca aactgtcggg tcatgacgc cactaagact 120  
agt 123

<210> 4  
<211> 41  
<212> PRT

ES 2 534 574 B1

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SPo20 fragmento 51-91

<400> 4

Met Asp Asn Cys Ser Gly Ser Arg Arg Arg Asp Arg Leu His Val Lys  
1 5 10 15

Leu Lys Ser Leu Arg Asn Lys Ile His Lys Gln Leu His Pro Asn Cys  
20 25 30

Arg Phe Asp Asp Ala Thr Lys Thr Ser  
35 40

<210> 5

<211> 717

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Venus

<400> 5

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60  
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120  
ggcaagctga ccctgaagct gatctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180  
ctcgtgacca ccctgggcta cggcctgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag 240  
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300  
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360  
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420  
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac 480  
ggcatcaagg ccaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcggcgt gcagctcgcc 540  
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600  
tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660  
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaag 717

<210> 6

<211> 239

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Venus

<400> 6

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu  
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

ES 2 534 574 B1

20 25 30  
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile  
 35 40 45  
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr  
 50 55 60  
 Leu Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys  
 65 70 75 80  
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu  
 85 90 95  
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu  
 100 105 110  
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly  
 115 120 125  
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr  
 130 135 140  
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn  
 145 150 155 160 165  
 Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly  
 165 170 175  
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly  
 180 185 190  
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu  
 195 200 205  
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe  
 210 215 220  
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
 225 230 235

<210> 7  
 <211> 735  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Venus cp49

<400> 7  
 atgaccggca agctgcccgt gccctggccc accctcgtga ccaccctggg ctacggcgtg 60  
 atgtgcttcg cccgctaccc cgaccacatg aagcagcacg acttcttcaa gtccgccatg 120  
 cccgaaggct acgtccagga gcgaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc 180

ES 2 534 574 B1

cgcgccgagg tgaagtcca gggcgacacc ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcatc 240  
gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac 300  
aacgtctata tcaccgccga caagcagaag aacggcatca aggccaactt caagatccgc 360  
cacaacatcg aggacggcgg cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa caccctcatc 420  
ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga gctaccagtc cgccctgagc 480  
aaagaccca acgagaagcg cgatcacatg gtcctgctgg agttcgtgac cgccgcccgg 540  
atcactctcg gcatggacga gctgtacaag ggtggcagcg gtggcatggt gagcaagggc 600  
gaggagctgt tcaccggggg ggtgcccac ctggtcgagc tggacggcga cgtaaaggc 660  
cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg 720  
aagctgatct gcacc 735

<210> 8  
<211> 245  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Venus cp49

<400> 8

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

ES 2 534 574 B1

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser  
145 150 155 160

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val  
165 170 175

Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly  
180 185 190

Ser Gly Gly Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val  
195 200 205

Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser  
210 215 220

Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu  
225 230 235 240

Lys Leu Ile Cys Thr  
245

<210> 9  
<211> 735  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Venus cp157

<400> 9  
atgcagaaga acggcatcaa ggccaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcggc 60  
gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg 120  
cccgacaacc actacctgag ctaccagtcc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc 180  
gatcacatgg tctgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcaactctcg catggacgag 240  
ctgtacaagg gtggcagcgg tggcatggtg agcaagggcg aggagctggt caccgggggtg 300  
gtgcccattc tggtcgagct ggacggcgac gtaaacggcc acaagttcag cgtgtccggc 360  
gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agctgatctg caccaccggc 420  
aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccctgg gctacggcct gatgtgcttc 480  
gcccgtacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgcat gccgaaggc 540  
tacgtccagg agcgcacat cttcttcaag gacgacggca actacaagac ccgcgccgag 600  
gtgaagtctg agggcgacac cctggtgaac cgcatcgagc tgaagggcat cgacttcaag 660  
gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca caacgtctat 720  
atcaccgccg acaag 735

<210> 10  
<211> 245  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 534 574 B1

<220>

<223> Venus cp157

<400> 10

Met Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile  
1 5 10 15

Glu Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro  
20 25 30

Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr  
35 40 45

Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val  
50 55 60

Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu  
65 70 75 80

Leu Tyr Lys Gly Gly Ser Gly Gly Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu  
85 90 95

Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn  
100 105 110

Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr  
115 120 125

Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val  
130 135 140

Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe  
145 150 155 160

Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala  
165 170 175

Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp  
180 185 190

Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu  
195 200 205

Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn  
210 215 220

Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr  
225 230 235 240

Ile Thr Ala Asp Lys  
245

ES 2 534 574 B1

<210> 11  
 <211> 735  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Venus cp173

<400> 11  
 atggacggcg gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga acaccccat cggcgacggc 60  
 cccgtgctgc tgcccgaaa cactacctg agctaccagt ccgccctgag caaagacccc 120  
 aacgagaagc gcatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgccgccgg gatcactctc 180  
 ggcatggacg agctgtacaa ggggtggcagc ggtggcatgg tgagcaaggg cgaggagctg 240  
 ttcaccgggg tggtgccat cctggctgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc 300  
 agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagctgac 360  
 tgaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg cccaccctcg tgaccaccct gggctacggc 420  
 ctgcagtgct tcgcccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc 480  
 atgccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag 540  
 acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc 600  
 atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc 660  
 cacaacgtct atatcaccgc cgacaagcag aagaacggca tcaaggccaa cttcaagatc 720  
 cgccacaaca tcgag 735

<210> 12  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Venus cp173

<400> 12

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

ES 2 534 574 B1

Phe Thr Gly Val Val<sub>85</sub> Pro Ile Leu Val<sub>90</sub> Glu Leu Asp Gly Asp Val<sub>95</sub> Asn  
 Gly His Lys Phe<sub>100</sub> Ser Val Ser Gly Glu<sub>105</sub> Gly Glu Gly Asp Ala<sub>110</sub> Thr Tyr  
 Gly Lys Leu<sub>115</sub> Thr Leu Lys Leu Ile<sub>120</sub> Cys Thr Thr Gly Lys<sub>125</sub> Leu Pro Val  
 Pro Trp<sub>130</sub> Pro Thr Leu Val<sub>135</sub> Thr Thr Leu Gly Tyr Gly<sub>140</sub> Leu Gln Cys Phe  
 Ala<sub>145</sub> Arg Tyr Pro Asp His<sub>150</sub> Met Lys Gln His Asp<sub>155</sub> Phe Phe Lys Ser Ala<sub>160</sub>  
 Met Pro Glu Gly Tyr<sub>165</sub> Val Gln Glu Arg Thr<sub>170</sub> Ile Phe Phe Lys Asp<sub>175</sub> Asp  
 Gly Asn Tyr Lys<sub>180</sub> Thr Arg Ala Glu Val<sub>185</sub> Lys Phe Glu Gly Asp<sub>190</sub> Thr Leu  
 Val Asn Arg<sub>195</sub> Ile Glu Leu Lys Gly<sub>200</sub> Ile Asp Phe Lys Glu<sub>205</sub> Asp Gly Asn  
 Ile Leu<sub>210</sub> Gly His Lys Leu Glu<sub>215</sub> Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr  
 Ile Thr Ala Asp Lys Gln<sub>230</sub> Lys Asn Gly Ile Lys<sub>235</sub> Ala Asn Phe Lys Ile<sub>240</sub>  
 Arg His Asn Ile Glu<sub>245</sub>

<210> 13  
 <211> 735  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Venus cp195

<400> 13  
 atgctgcccg acaaccacta cctgagctac cagtccgccc tgagcaaaga cccaacgag 60  
 aagcgcgatc acatggtcct gctggagttc gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg 120  
 gacgagctgt acaaggtgag cagcgggtggc atggtgagca agggcgagga gctgttcacc 180  
 ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg 240  
 tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagct gatctgcacc 300  
 accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc ctcgtgacca ccctgggcta cggcctgatg 360  
 tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag cagcagcact tcttcaagtc cgccatgccc 420  
 gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg 480

ES 2 534 574 B1

gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac 540  
 ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacaac 600  
 gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac ggcatacagg ccaacttcaa gatccgccac 660  
 aacatcgagg acggcggcgt gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc 720  
 gacggccccg tgctg 735

<210> 14  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Venus cp195

<400> 14

Met Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys  
 1 5 10 15

Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr  
 20 25 30

Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Ser  
 35 40 45

Gly Gly Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro  
 50 55 60

Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val  
 65 70 75 80

Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys  
 85 90 95

Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His  
 115 120 125

Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val  
 130 135 140

Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg  
 145 150 155 160

Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu  
 165 170 175

Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu  
 180 185 190

ES 2 534 574 B1

Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln  
 195 200 205

Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp  
 210 215 220

Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly  
 225 230 235 240

Asp Gly Pro Val Leu  
 245

<210> 15  
 <211> 735  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Venus cp229

<400> 15  
 atgatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagggtggca gcggtggcat ggtgagcaag 60  
 ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac 120  
 ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc 180  
 ctgaagctga tctgcaccac cggcaagctg cccgtgcctt ggcccaccct cgtgaccacc 240  
 ctgggctacg gcctgatgtg cttcgcccgc taccctgacc acatgaagca gcacgacttc 300  
 ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca ccatcttctt caaggacgac 360  
 ggcaactaca agaccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcatc 420  
 gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacia gctggagtac 480  
 aactacaaca gccacaacgt ctatatcacc gccgacaagc agaagaacgg catcaaggcc 540  
 aactcaaga tccgccaaa catcgaggac ggcggcgtgc agctcgccga cactaccag 600  
 cagaacacc ccatcggcga cggccccgtg ctgctgccg acaaccacta cctgagctac 660  
 cagtccgcc tgagcaaaga cccaacgag aagcgcgatc acatggtcct gctggagttc 720  
 gtgaccgccg ccggg 735

<210> 16  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Venus cp229

<400> 16

Met Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Ser Gly Gly  
 1 5 10 15

ES 2 534 574 B1

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu  
 20 25 30

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly  
 35 40 45

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile  
 50 55 60

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr  
 65 70 75 80

Leu Gly Tyr Gly Leu Met Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys  
 85 90 95

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu  
 100 105 110

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu  
 115 120 125

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly  
 130 135 140

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr  
 145 150 155 160

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn  
 165 170 175

Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly  
 180 185 190

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly  
 195 200 205

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu  
 210 215 220

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe  
 225 230 235 240

Val Thr Ala Ala Gly  
 245

<210> 17  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Lck (1-12)

ES 2 534 574 B1

<400> 17  
atgggctgcg ggtgtagttc tcatccgga gacgac 36

<210> 18  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Lck (1-12)

<400> 18  
Met Gly Cys Gly Cys Ser Ser His Pro Glu Asp Asp  
1 5 10

<210> 19  
<211> 1932  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> pmPAS

<400> 19  
atgggctgcg ggtgtagttc tcatccgga gacgacgcg atcccgaagc agcagcaaga 60  
gaagcagcag caagagaagc agcagcaaga gaagcagcag caagagaagc agcagcaaga 120  
gaagcagcag caagagaagc agcagcaaga gcggatcccg tggtagcaa gggcgaggag 180  
ctgttcaccg gggtaggtcc catcctggtc gagctggacg gcgacgtaaa cggccacagg 240  
ttcagcgtgt ccggcgaggg cgagggcgat gccacctacg gcaagctgac cctgaagttc 300  
atctgcacca ccggcaagct gcccgtgccc tggcccacc tcgtgaccac cctgacctgg 360  
ggcgtgcagt gcttcagccg ctaccccgac cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc 420  
gccatgcccg aaggctacgt ccaggagcgt accatcttct tcaaggacga cggcaactac 480  
aagacccgcg ccgaggtgaa gttcagggc gacaccctgg tgaaccgat cgagctgaag 540  
ggcatcgact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta caactacatc 600  
agccacaacg tctatatcac cgccgacaag cagaagaacg gcatcaaggc ccaacttaag 660  
atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg cagctcgccg accactacca gcagaacacc 720  
cccacggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcac ccagtccgcc 780  
ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcc 840  
gcccgcgatg gggaagcagc agcaagagaa gcagcagcaa gagaagcagc agcaagagggc 900  
ggcgaagcag cagcaagaga agcagcagca agagaagcag cagcaagacg tacgggcgga 960  
tctatggaca attgttcagg aagcagaaga cgtgataggc tacatgtgaa gcttaaatcc 1020  
ttgaggaata aatccacaa acaacttcac ccaactgtc ggttcgatga cgccactaag 1080  
actagtggag gatctctgac ggaagcagca gcaagagaag cagcagcaag agaagcagca 1140  
gcaagagaag cagcagcaag agaagcagca gcaagagaag cagcagcaag agagctcatg 1200  
gacggcggcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg cgacggcccc 1260

ES 2 534 574 B1

gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc taccagtccg ccctgagcaa agaccccaac 1320  
gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc 1380  
atggacgagc tgtacaaggg tggcagcggg ggcattggtga gcaagggcga ggagctgttc 1440  
accggggtgg tgcccatcct ggtcagactg gacggcgacg taaacggcca caagttcagc 1500  
gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc tgaccctgaa gctgatctgc 1560  
accaccggca agctgcccgt gccctggccc accctcgtga ccaccctggg ctacggcctg 1620  
cagtgtctcg cccgctaccg cgaccacatg aagcagcagc actttcttcaa gtccgccatg 1680  
cccgaaggct acgtccagga gcgaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc 1740  
cgcgccgagg tgaagtctga gggcgacacc ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcatc 1800  
gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac 1860  
aacgtctata tcaccgccga caagcagaag aacggcatca aggccaactt caagatccgc 1920  
cacaacatcg ag 1932

<210> 20  
<211> 644  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> pmPAS

<400> 20

Met Gly Cys Gly Cys Ser Ser His Pro Glu Asp Asp Ala Asp Pro Glu  
1 5 10 15

Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala  
20 25 30

Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala  
35 40 45

Ala Arg Ala Asp Pro Val Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly  
50 55 60

Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg  
65 70 75 80

Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu  
85 90 95

Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr  
115 120 125

ES 2 534 574 B1

Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu  
 130 135 140  
 Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr  
 145 150 155 160  
 Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg  
 165 170 175  
 Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly  
 180 185 190  
 His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala  
 195 200 205  
 Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn  
 210 215 220  
 Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr  
 225 230 235 240  
 Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser  
 245 250 255  
 Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met  
 260 265 270  
 Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Arg Met Arg Glu Ala Ala Ala  
 275 280 285  
 Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Glu Ala Ala  
 290 295 300  
 Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Arg Thr Gly Gly  
 305 310 315 320  
 Ser Met Asp Asn Cys Ser Gly Ser Arg Arg Arg Asp Arg Leu His Val  
 325 330 335  
 Lys Leu Lys Ser Leu Arg Asn Lys Ile His Lys Gln Leu His Pro Asn  
 340 345 350  
 Cys Arg Phe Asp Asp Ala Thr Lys Thr Ser Gly Gly Ser Arg Thr Glu  
 355 360 365  
 Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala  
 370 375 380  
 Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Met  
 385 390 395 400

ES 2 534 574 B1

Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile  
405 410 415

Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln  
420 425 430

Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu  
435 440 445

Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu  
450 455 460

Tyr Lys Gly Gly Ser Gly Gly Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe  
465 470 475 480

Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly  
485 490 495

His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly  
500 505 510

Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro  
515 520 525

Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala  
530 535 540

Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met  
545 550 555 560

Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly  
565 570 575

Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val  
580 585 590

Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile  
595 600 605

Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile  
610 615 620

Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg  
625 630 635 640

His Asn Ile Glu

<210> 21  
<211> 99  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

ES 2 534 574 B1

<220>  
 <223> Tom20 (1-33)  
 <400> 21  
 atggtgggcc ggaacagcgc catcgccgcg ggcgtgtgcg gtgccctctt catagggtag 60  
 tgcattact ttgaccgcaa aaggcggagt gacccaac 99

<210> 22  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Tom20 (1-33)  
 <400> 22  
 Met Val Gly Arg Asn Ser Ala Ile Ala Ala Gly Val Cys Gly Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Phe Ile Gly Tyr Cys Ile Tyr Phe Asp Arg Lys Arg Arg Ser Asp Pro  
 20 25 30

Asn

<210> 23  
 <211> 1995  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> mitPAS  
 <400> 23  
 atggtgggcc ggaacagcgc catcgccgcg ggcgtgtgcg gtgccctctt catagggtag 60  
 tgcattact ttgaccgcaa aaggcggagt gacccaacg cggatcccga agcagcagca 120  
 agagaagcag cagcaagaga agcagcagca agagaagcag cagcaagaga agcagcagca 180  
 agagaagcag cagcaagaga agcagcagca agagcggtag ccgtggtgag caagggcgag 240  
 gagctgttca ccgggggtgt gccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac 300  
 aggttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag 360  
 ttcatctgca ccaccgcaa gctgcccgtg ccctggcca ccctcgtgac caccctgacc 420  
 tggggcgtgc agtgcttcag ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag 480  
 tccgcatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgtaccatct tcttcaagga cgacggcaac 540  
 tacaagacc gcgccgaggt gaagtctgag ggcgacacc tggatgaacc catcgagctg 600  
 aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac 660  
 atcagccaca acgtctatat caccgcccgc aagcagaaga acggcatcaa ggcccacttc 720  
 aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac 780  
 acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagctcc 840

ES 2 534 574 B1

gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc 900  
 gccgcccgca tgcgggaagc agcagcaaga gaagcagcag caagagaagc agcagcaaga 960  
 ggcggcgaag cagcagcaag agaagcagca gcaagagaag cagcagcaag acgtacgggc 1020  
 ggatctatgg acaattgttc aggaagcaga agacgtgata ggctacatgt gaagctgaaa 1080  
 tccttgagga ataaaatcca caaacaactt cacccaaact gtcggttcga tgacgccact 1140  
 aagactagtg gaggatctcg tacggaagca gcagcaagag aagcagcagc aagagaagca 1200  
 gcagcaagag aagcagcagc aagagaagca gcagcaagag aagcagcagc aagagagctc 1260  
 atggacggcg gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga acaccccat cggcgacggc 1320  
 cccgtgctgc tgcccgacaa ccactacctg agctaccagt ccgccctgag caaagacccc 1380  
 aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgccgccgg gatcactctc 1440  
 ggcatggacg agctgtacaa ggggtggcagc ggtggcatgg tgagcaaggg cgaggagctg 1500  
 ttcaccgggg tggtgcccat cctggctgag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc 1560  
 agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagctgatc 1620  
 tgaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg cccaccctcg tgaccaccct gggctacggc 1680  
 ctgcagtgct tcgcccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc 1740  
 atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag 1800  
 acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc 1860  
 atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc 1920  
 cacaacgtct atatcaccgc cgacaagcag aagaacggca tcaaggccaa cttcaagatc 1980  
 cgccacaaca tcgag 1995

<210> 24  
 <211> 665  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> mitPAS

<400> 24

Met Val Gly Arg Asn Ser Ala Ile Ala Ala Gly Val Cys Gly Ala Leu  
 1 5 10 15

Phe Ile Gly Tyr Cys Ile Tyr Phe Asp Arg Lys Arg Arg Ser Asp Pro  
 20 25 30

Asn Ala Asp Pro Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala  
 35 40 45

Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala  
 50 55 60

ES 2 534 574 B1

Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Ala Val Pro Val Val Ser Lys Gly Glu  
65 70 75 80

Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp  
85 90 95

Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala  
100 105 110

Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu  
115 120 125

Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln  
130 135 140

Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys  
145 150 155 160

Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys  
165 170 175

Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp  
180 185 190

Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp  
195 200 205

Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn  
210 215 220

Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala His Phe  
225 230 235 240

Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His  
245 250 255

Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp  
260 265 270

Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu  
275 280 285

Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Arg Met  
290 295 300

Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg  
305 310 315 320

Gly Gly Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala  
325 330 335

ES 2 534 574 B1

Arg Arg Thr Gly Gly Ser Met Asp Asn Cys Ser Gly Ser Arg Arg Arg  
340 345 350

Asp Arg Leu His Val Lys Leu Lys Ser Leu Arg Asn Lys Ile His Lys  
355 360 365

Gln Leu His Pro Asn Cys Arg Phe Asp Asp Ala Thr Lys Thr Ser Gly  
370 375 380

Gly Ser Arg Thr Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala  
385 390 395 400

Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Ala  
405 410 415

Ala Arg Glu Leu Met Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln  
420 425 430

Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His  
435 440 445

Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg  
450 455 460

Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu  
465 470 475 480

Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Ser Gly Gly Met Val Ser Lys  
485 490 495

Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp  
500 505 510

Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly  
515 520 525

Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly  
530 535 540

Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly  
545 550 555 560

Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe  
565 570 575

Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe  
580 585 590

Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu  
595 600 605

ES 2 534 574 B1

Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys  
 610 615 620

Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser  
 625 630 635 640

His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala  
 645 650 655

Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu  
 660 665

<210> 25  
 <211> 105  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido SphI\_Ln2\_SphI\_FW

<400> 25  
 cgggaagcag cagcaagaga agcagcagca agagaagcag cagcaagagg cggcgaagca 60  
 gcagcaagag aagcagcagc aagagaagca gcagcaagac gcatg 105

<210> 26  
 <211> 105  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido SphI\_Ln2\_SphI\_REV

<400> 26  
 cgtcttgctg ctgcttctct tgctgctgct tctcttgctg ctgcttcgcc gcctcttgct 60  
 gctgcttctc ttgctgctgc ttctcttgct gctgcttccc gcatg 105

<210> 27  
 <211> 96  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> (oligonucleótido SacI\_Ln3\_SacI\_FW

<400> 27  
 cgaagcagca gcaagagaag cagcagcaag agaagcagca gcaagagaag cagcagcaag 60  
 agaagcagca gcaagagaag cagcagcaag agagct 96

<210> 28  
 <211> 96  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido SacI\_Ln3\_SacI\_REV

<400> 28  
 ctcttgctgc tgcttctctt gctgctgctt ctcttgctgc tgcttctctt gctgctgctt 60

ES 2 534 574 B1

ctcttgctgc tgcttctctt gctgctgctt cgagct 96

<210> 29  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido HIndIII\_Lck(1-12)\_BamHI\_FW

<400> 29  
 agcttaccat gggctgcggg tgtagttctc atccggaaga cgacgcg 47

<210> 30  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido HIndIII\_Lck(1-12)\_BamHI\_REV

<400> 30  
 gatccgcgtc gtcttccgga tgagaactac acccgagcc catggta 47

<210> 31  
 <211> 114  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido BamHI\_Ln1\_BamHI\_FW

<400> 31  
 gatcccgaag cagcagcaag agaagcagca gcaagagaag cagcagcaag agaagcagca 60

gcaagagaag cagcagcaag agaagcagca gcaagagaag cagcagcaag agcg 114

<210> 32  
 <211> 114  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido BamHI\_Ln1\_BamHI\_REV

<400> 32  
 gatccgctct tgctgctgct tctcttgctg ctgcttctct tgctgctgct tctcttgctg 60

ctgcttctct tgctgctgct tctcttgctg ctgcttctct tgctgctgct tcgg 114

<210> 33  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido mutLn2\_SphI>BsiWI

<400> 33  
 cagcagcaag acgtacgcgg gactgctg 28

<210> 34

<211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido mutSacI>BsiWI\_Ln3  
  
 <400> 34  
 cccagcggag atgcgtacgg aagcagcagc aagag 35  
  
  
 <210> 35  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido BsiWI\_Spo20(51-91)\_BsiWI\_FW  
  
 <400> 35  
 acattcgtac gggcggatct atggacaatt gttcagg 37  
  
  
 <210> 36  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido BsiWI\_Spo20(51-91)\_BsiWI\_REV  
  
 <400> 36  
 ctattcgtac gagatcctcc actagtctta gtggcg 36  
  
  
 <210> 37  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido mutECFP\_M1V  
  
 <400> 37  
 caagagcggg tcccgtggtg agcaagg 27  
  
  
 <210> 38  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido mutSpo20\_noHindIII  
  
 <400> 38  
 ggctacatgt gaagctgaaa tccttgagg 29  
  
  
 <210> 39  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido mutLn1end\_BamHItoKpnI  
  
 <400> 39

ES 2 534 574 B1

gcagcaagag cggtagccgt ggtgagc 27

<210> 40  
<211> 110  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> oligonucleótido HindIII\_Tom20(1-33)\_BamHI\_FW

<400> 40  
agcttaccat ggtgggccgg aacagcgcca tcgccgctgg cgtgtgctgt gccctcttca 60

taggtactg catctacttt gaccgcaaaa ggcggagtga cccaacgcg 110

<210> 41  
<211> 110  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> oligonucleótido HindIII\_Tom20(1-33)\_BamHI\_REV

<400> 41  
gatccgcgtt ggggtcactc cgccttttgc ggtcaaagta gatgcagtac cctatgaaga 60

gggcaccgca cacgcccgcg gcgatggcgc tgttccggcc caccatggta 110