

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



T3

1 Número de publicación: 2 368 106

51 Int. CI.:	
Ă61K 38/45	
A61P 5/50	

(2006.01) (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

96 Número de solicitud europea: 08801778 .5

96 Fecha de presentación: 01.09.2008

Número de publicación de la solicitud: 2197479

Fecha de publicación de la solicitud: 23.06.2010

54 Título: PIROFOSFATOS DE INOSITOL DETERMINANTES DE LA CAPACIDAD EXOCITÓTICA.

30 Prioridad: 31.08.2007 US 969443 P	(73) Titular/es: BIOCRINE AB JOHN ERIKSSONSGATAN 9 112 22 STOCKHOLM, SE
 Fecha de publicación de la mención BOPI: 14.11.2011 	 Inventor/es: BERGGREN, Per Olof y BARKER, Christopher
 Fecha de la publicación del folleto de la patente: 14.11.2011 	Agente: Arias Sanz, Juan

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

DESCRIPCIÓN

Pirofosfatos de inositol determinantes de la capacidad exocitótica

Antecedentes de la invención

- 5 Los fosfoinosítidos, tanto en su forma soluble en agua como lipídica, desempeñan un papel destacado en los procesos de transducción de señales celulares. Los procesos importantes son la generación de inositol 1,4,5-trifosfato (Ins[1,4,5]P3) y su regulación de la homeóstasis intracelular del Ca2+ (1) y los productos lipídicos de inositol 3-fosforilado de fosfatidilinositol (PI3 quinasa) (2), con diversas funciones en la mitogénesis, la apoptosis y el tráfico vesicular. El fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (Ptdlns [4,5]P2), la principal fuente de estos dos sistemas de señalización, no acorda una productor de transducción de la envirón.
- 10 es sólo un precursor de las vías de transducción de señal que se menciona anteriormente, sino que desempeña por sí mismo papeles importantes en el tráfico vesicular, la exocitosis, las reordenaciones del citoesqueleto y la regulación de los canales iónicos (3). En la última década también se ha producido un creciente reconocimiento en el sentido de que los polifosfatos de inositol altamente fosforilados, derivados lejanos del segundo mensajero Ins(1,4,5)P3, desempeñan un papel en la transducción de señales y en la regulación celular (4-6). Quizá la perspectiva nueva más fascinante de
- 15 las que se han abierto es la relacionada con el papel de los derivados diestéricos de los inositol pentaquisfosfatos e inositol hexaquisfosfatos (InsP5 e InsP6). Habitualmente, los derivados de pirofosfato del InsP6 difosfoinositol pentaquisfosfato y del bis-(difosfo)inositol tetraquisfosfato se denominan «InsP7» e «InsP8». Estos derivados de inositol pirofosfato se regeneran rápidamente, y se calcula que tienen una energía libre de hidrólisis similar a la del ATP (4). Una consecuencia llamativa de este grupo fosfato altamente energético es la capacidad del InsP7 de fosforilar
- 20 directamente un subconjunto de proteínas de una forma independiente respecto del ATP y de las enzimas (7). La variedad de respuestas celulares, aparentemente controladas por estas moléculas (4,8), puede verse facilitada por la distribución intracelular diferencial de las quinasas que las componen (9). Las concentraciones de pirofosfatos de inositol pueden regularse dinámicamente durante fenómenos celulares fundamentales, subrayando así su importancia para la función celular. Por ejemplo, los niveles de InsP7 cambian durante la progresión del ciclo celular (10), y el InsP7
- 25 regula los complejos de ciclina/CDK (11), mientras que el InsP8 aumenta sobremanera como reacción al estrés celular (8). No obstante, los trabajos recientes también han puesto de manifiesto una función del InsP6 en forma de cofactor enzimático y, por analogía, es posible que, incluso en condiciones no estimuladoras, el InsP7 pudiera ser una molécula reguladora importante.
- 30 Los fosfoinosítidos también son reguladores básicos de las células β pancreáticas secretoras de insulina (12). Estas células son protagonistas fundamentales en la homeóstasis de la glucosa en sangre, y actúan acoplando los aumentos en la concentración de glucosa y otros reguladores circulatorios o de origen neuronal a la exocitosis de la insulina. El InsP6 altamente fosforilado es especialmente interesante, puesto que se ha demostrado que activa canales de Ca2+ de tipo L dependientes de voltaje (13), la exocitosis (14,15) y la endocitosis mediada por la dinamina (16), procesos todos
- 35 ellos fundamentales en la secreción de la insulina. Aún no se ha determinado una función del InsP7 en la célula β. No obstante, como consecuencia de la implicación sugerida de los pirofosfatos de inositol en el tráfico vesicular (4), la naturaleza fundamental de dichos fenómenos de tráfico para el proceso de exocitosis de la insulina y la alta concentración en las células β del InsP6 (13), el precursor inmediato del InsP7, planteamos como hipótesis que los pirofosfatos de inositol pueden desempeñar un importante papel en la célula β. Ahora, procedemos a demostrar una nueva función del InsP7 en la regulación de la exocitosis de la insulina.

Breve descripción de la invención

En un aspecto, la presente invención puede utilizarse para tratar la diabetes de tipo II mediante la administración a un paciente con diabetes de tipo II de una cantidad eficaz de la quinasa IP6K1 o un fragmento activo de ésta, o bien un constructo de ácido nucleico capaz de expresar la quinasa IP6K1 o fragmentos de ésta.

45 En otro aspecto, la presente invención puede utilizarse estimulando la exocitosis de la insulina a partir de las células beta pancreáticas mediante la administración de una cantidad eficaz de la quinasa IP6K1 o de un fragmento activo de ésta, o bien de un constructo de ácido nucleico capaz de expresar la quinasa IP6K1 o fragmentos de ésta capaces de aumentar la expresión de la quinasa IP6K1, a un paciente que lo necesite.

En otro aspecto, la presente invención puede utilizarse para tratar la diabetes de tipo II mediante la administración a un paciente con diabetes de tipo II de una cantidad eficaz de la quinasa IP6K1 o un fragmento activo de ésta, o bien un constructo de ácido nucleico capaz de expresar la quinasa IP6K1 o fragmentos de ésta, capaces de aumentar la producción de InsP₇.

En otro aspecto adicional, la presente invención ofrece métodos para identificar un compuesto para tratar la diabetes de tipo II, que comprenden:

- 55 (a) poner en contacto células beta pancreáticas con uno o más compuestos de prueba; y
 - (b) determinar el nivel de expresión de la quinasa IP6K1 y/o los niveles de InsP7;

donde un incremento en el InsP7 indica que el compuesto es adecuado para tratar la diabetes de tipo II.

Breve descripción de los dibujos

30

Figura 1. En las células β pancreáticas hay altos niveles de InsP7, y las IP6K aparecen expresadas en estas células. (A) Comparación de InsP7 marcado con [3H] como porcentaje de InsP6 marcado con [3H] en islotes pancreáticos primarios o en células MIN6m9 secretoras de insulina. Los datos son de 3 experimentos independientes. (B) Los datos del islote de (A) se transformaron para tener en cuenta la diferente composición de células β en islotes normales (60%) frente a

- 5 islotes ob/ob (90 %). (C). La totalidad del ARN se extrajo de islotes y células MIN6m9, y se transcribió de forma inversa. La expresión relativa del ARN mensajero se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando sondas y cebadores adecuados. Los cebadores y las sondas para el ARNr 18S (reactivos de control del ARN ribosómico de TaqMan[™], Applied Biosystems) se utilizaron como control endógeno.
- Figura 2. La expresión de las IP6K fomenta la exocitosis en las células β pancreáticas. La IP6K1 estimula la exocitosis
 dependiente del Ca2+. (A) Las células β individuales de ratón fueron transfectadas con EGFP (simulación) o con una combinación de EGFP y bien una variante de tipo salvaje (IP6K1) o bien una variante de quinasa desactivada (IP6K1-K/A) de la IP6K, y sometidas a una serie de cuatro despolarizaciones de 500 ms utilizando la configuración de parche perforado. Los aumentos en la capacidad celular (ΔCm) se midieron con 3 mM de glucosa en el medio extracelular. (B) Histograma que resume el aumento medio en la capacidad celular trazado con respecto a las despolarizaciones
- 15 individuales, así como el incremento total en la capacidad celular al final de la serie en células transfectadas de manera simulada o que sobreexpresan la IP6K de tipo salvaje (IP6K1) o de quinasa desactivada (IP6K1-K/A). (C) Histograma que muestra una corriente integrada de Ca2+ (QCa) trazada con respecto a las despolarizaciones individuales en células transfectadas de manera simulada o que sobreexpresan el tipo salvaje o el tipo IP6K1-K/A. Los valores proceden de 8-12 experimentos. °P<0,05. (D) Histograma que resume el aumento medio total en la capacidad celular al</p>
- final de la serie en células transfectadas de manera simulada o en células que sobreexpresan el tipo salvaje (IP6Kn) o el tipo de quinasa desactivada (IP6Kn-K/A) de las quinasas de tipo 1, 2 y 3 respectivamente. Los valores proceden de 7-12 experimentos. °P<0,05. (E) Las células INS-1E fueron cotransfectadas en paralelo con pCMV5-hGH y un vector vacío (pcDNA3) (simulación) o con pCMV5-hGH y bien con el tipo salvaje (IP6Kn) o bien con la quinasa desactivada (IP6Kn-K/A) de las quinasas de tipos 1, 2 y 3 respectivamente. La secreción de hGH se midió en medio de Krebs-Ringer amortiguado con bicarbonato-BEPES, que contenía 3 mM de glucosa. La liberación de hGH se representa como hGH</p>
- secretada en porcentaje de hGH total. Valores procedentes de 3 experimentos (cada uno por triplicado). °P<0.05.

Figura 3. El InsP7 fomenta, de forma dependiente de la dosis, la exocitosis dependiente del Ca2+. Las células p individuales de ratón fueron sometidas a una serie de cuatro despolarizaciones de 500 ms utilizando la configuración de parche estándar de célula completa. (A) La exocitosis se observó en condiciones de control y en presencia de 3 μM de 5-InsP7 en la solución que llenaba la pipeta. El 5-InsP7 pudo dispersarse dentro de la célula durante 2 minutos antes de comenzar el experimento. (B) Histograma que resume los incrementos medios en la capacidad celular trazados con respecto a las despolarizaciones individuales, así como los aumentos totales en la capacidad celular al final de la serie en ausencia o en presencia de 3 μM de 5-InsP7 en la solución que llena la pipeta. (C) Histograma que muestra una corriente integrada de Ca2+ (QCa) trazada con respecto a las despolarizaciones individuales ante la ausencia o la

- 35 presencia de 3 μM de InsP7 en la solución que llena la pipeta. (D) Dependencia de concentración de la acción estimuladora del 5-InsP7 sobre la exocitosis provocada por una sola despolarización de membrana de -70 mV a cero. La curva representa un ajuste con mínimos cuadrados de los puntos de datos medios con respecto a la ecuación de Hill. Los valores proceden de 5-7 experimentos. °P<0,05. (E) Una comparación de varios isómeros de InsP7 con una concentración de 10 μM sobre la exocitosis, utilizando los mismos protocolos que en el apartado (A) anterior.</p>
- 40 Figura 4. El silenciamiento de ARN de la IP6K1, pero no de la IP6K2, inhibe la liberación de gránulos desde el RRP (siglas inglesas del «conjunto fácilmente liberable»). (A) Las células p individuales de ratón fueron transfectadas con ARNsi contra la IP6K1 (n.º 1) a 25 nM o con un control negativo a la misma concentración y sometidas a una serie de cuatro despolarizaciones de 500 ms utilizando la configuración del parche perforado; los aumentos en la capacidad celular (ΔCm) se midieron con 3 mM de glucosa en el medio extracelular. (B) Histograma que resume los aumentos
- 45 medios en la capacidad celular trazados con respecto a las despolarizaciones individuales, así como el incremento total en la capacidad celular al final de la serie en células transfectadas de manera simulada o que sobreexpresan bien el ARNsi contra la IP6K1 o bien un control negativo. (C) Efecto sobre el incremento total de la capacidad tras el silenciamiento de la IP6K1 e IP6K2 inducido por ARN. (D) Efecto del 5-InsP7 sobre la exocitosis en condiciones de control y en células con niveles de expresión reducidos de IP6K1.
- 50 Figura 5. El efecto del 5-InsP7 sobre la exocitosis es diferente al del InsP6. Las células β individuales de ratón fueron sometidas a una serie de cuatro despolarizaciones de 500 ms utilizando la configuración de parche estándar de célula completa. La exocitosis se observó en condiciones de control y en presencia de 3 μM de 5-InsP7 o de 10 μM de InsP6 en la solución que llenaba la pipeta. Los fosfatos de inositol pudieron dispersarse dentro de la célula durante 2 minutos antes de comenzar el experimento.
- Figura 6. Análisis de ARNsi en células MIN6m9. Para cada IP6K se analizaron seis ARNsi para comprobar su capacidad de silenciamiento a 100 nM en células MIN6m. Se utilizaron posteriormente dos dirigidos contra la IP6K1 (1 y 4) y otros dos dirigidos contra la IP6K2 (3 y 5), de forma individual o en combinación, para silenciar la IP6K1 o la IP6K2, respectivamente. Esto se comparó con 2 controles negativos. Se extrajo ARNm y la expresión de los genes se cuantificó mediante el sistema RT-FCR de Taqman[™]. Los datos son medias ± error estándar de la media , n = 3).
- Figura 7. El silenciamiento de ARN de la IP6K1 o de la IP6K2 reduce los niveles celulares de InsP7. Las células MIN6m9 fueron transfectadas con ARNsi seleccionado para un control negativo o para la IP6K1 ó 2. Los ARNsi para la IP6K1 (1 y 4) se añadieron cada uno a 25 nM. Se añadieron concentraciones similares de los 2 ARNsi para la IP6K2 (3 y 5). Esto se controló mediante la adición de 50 nM de un control negativo. La totalidad de los 4 ARNsi se aplicó

simultáneamente, y se controló mediante 100 nM de ARNsi de control negativo. Dos horas después de la transfección con ARNsi, el medio se cambió por medio que contenía 50 µCi/ml de [3H]-inositol, y las células se cultivaron de 48 a 72 horas. Las células se extrajeron y se sometieron a HPLC. Los datos se expresan en relación con el total de lípidos de inositol, y son medias de 3 experimentos independientes \pm error estándar de la media, n = 3).

- 5 Figura 8. Efecto del IP6K1-ARNsi sobre la actividad de un canal único de Ca2+ de tipo L en células MIN3m9. Las células MIN3m9 fueron transfectadas con ARNsi seleccionado para un control negativo de 50 nM o ARNsi para la IP6K1 (1 y 4), cada uno a 25 nM. (A) Ejemplos de corrientes de canal único de Ca2+ registradas a partir de parches adheridos a la célula en una célula de control (transfección de ARNsi de control negativo, izquierda) y una célula tratada con IP6K1-ARNsi (derecha). Ambos parches contienen un canal de Ca2+ de tipo L. (8) Parámetros de corriente de canal
- 10 simple de Ca2+ de tipo L en células de control MIN6m9 (n = 30) y en células tratadas con IP6K1-ARNsi (n = 30). No existe una diferencia significativa en el número de canales por parche, probabilidad abierta, tiempo medio de cerrado y tiempo medio de apertura entre las células de control MIN6m9 y las tratadas con IP6K1-ARNsi (P > 0,05). Los datos se presentan como medias ± 5 EM. La significación estadística fue evaluada por la prueba de la U de Mann-Whitney o por la prueba de la t de Student con datos no emparejados.

15 Descripción detallada de la invención

En el marco de esta solicitud, a menos que se especifique lo contrario, las técnicas utilizadas pueden encontrarse en cualquiera de diversas referencias bien conocidas, como por ejemplo: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, vol. 185, editado por D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, Calif.), «Guide to Protein Purification» en Methods

- in Enzymology (M. P. Deutshcer, ed., (1990) Academic Press, Inc.); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, Calif.), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic 20 Technique, 2ª ed. (R. I. Freshney, 1987, Liss, Inc. Nueva York, N.Y.), Gene Transfer and Expression Protocols, pp. 109-128, ed. E. J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.), y el catálago de Ambion de 1998 (Ambion, Austin, Tex.).
- 25 En un aspecto, la presente invención puede utilizarse para tratar la diabetes de tipo II mediante la administración a un sujeto con diabetes de tipo II de una cantidad, eficaz para tratar la diabetes de tipo II, de una sustancia terapéutica capaz de aumentar el InsP7 en las células beta pancreáticas de dicho sujeto.

En otro aspecto, la presente invención puede utilizarse para tratar la diabetes de tipo II mediante la administración a un 30 sujeto con diabetes de tipo II de una cantidad, eficaz para tratar la diabetes de tipo II, de una sustancia terapéutica capaz de aumentar la expresión de quinasa IP6K1 en las células beta pancreáticas de dicho sujeto.

Tal y como han demostrado los inventores en el documento adjunto, la célula β pancreática mantiene altos niveles de InsP7. Posteriormente, este pirofosfato hace las veces de protagonista esencial en el proceso secretor de la insulina 35 mediante la regulación del conjunto rápidamente liberable de los gránulos que contienen insulina, manteniendo así la capacidad exocitótica inmediata de la célula β. Además, los inventores demostraron que el InsP7 endógeno generado por la IP6K1 es el responsable del aumento de la capacidad exocitótica en las células beta pancreáticas; así pues, los productos terapéuticos capaces de aumentar la expresión de la quinasa IP6K1 pueden utilizarse para tratar la diabetes de tipo II mediante la generación de InsP7, lo cual desemboca en un aumento de la capacidad exocitótica en las células 40 beta pancreáticas.

En una modalidad, el producto terapéutico consta de un vector de terapia génica que dirige la expresión de IP6K1 o de fragmentos activos de ésta (información de registro de la proteína: Q 92551 (SEQ ID n.º: 1); información de registro ADNc (variantes de empalme alternativo) 1. NM - 153273.3 (SEQ ID n.º: 3), 2. NM - 001006115 (SEQ ID n.º: 2)) consta de un vector de terapia génica que dirige la expresión de IP6K1 o de fragmentos activos de ésta. El método de terapia

- 45 génica consta de la administración de un constructo de ácido nucleico capaz de expresar la IP6K1 o fragmentos activos de ésta en el sujeto, y preferiblemente en células beta pancreáticas de dicho sujeto. En un ejemplo, las secuencias de ADNc pueden estar unidas operativamente con un promotor de la insulina (Leibiger, Mol. Cell. 1: 933-938 (1998)). Esta terapia génica y las técnicas de suministro son conocidas por los expertos; consulte, por ejemplo, el documento
- WO90/11092, que se incluye aquí como referencia, o: M. I. Phillips (Ed.): Gene Therapy Methods. Methods in 50 Enzymology, vol. 346, Academic Press, San Diego 2002. Así, por ejemplo, las células procedentes del sujeto pueden ser sometidas a ingeniería ex vivo con un constructo de ácido nucleico que conste de un promotor unido operativamente a la molécula de ácido nucleico correspondiente a la molécula que vaya a introducirse, suministrando posteriormente las células sometidas a ingeniería al sujeto que vaya a tratarse. Estos métodos son bien conocidos por los expertos en la
- 55 materia. Por ejemplo, consulte Belidegrun, A., et al., J. Natl. Cancer Inst. 85: 207-216 (1993); Ferrantini, M. et al., Cancer Research 53: 1107-1112 (1993); Ferrantini, M. et al., J. Immunology 153: 4604-4615 (1994); Kaido, T., et al., Int. J. Cancer 60: 221-229 (1995); Ogura, H., et al., Cancer Research 50: 5102-5106 (1990); Santodonato, L., et al., Human Gene Therapy 7: 1-10 (1996); Santodonato, L., et al., Gene Therapy 4: 1246-1255 (1997); y Zhang, J.-F. et al., Cancer Gene Therapy 3: 31-38 (1996)), que se incluyen aquí a modo de referencia. Las células sometidas a ingeniería pueden

60 ser, por ejemplo, células beta pancreáticas.

Las moléculas de ácido nucleico también pueden suministrarse como una molécula de ácido nucleico desnudo. El término molécula de ácido nucleico «desnudo» hace referencia a secuencias libres de cualquier vehículo de suministro que actúe para ayudar, favorecer o facilitar la entrada en la célula, incluyendo secuencias virales, partículas virales,

5 formulaciones de liposomas, lipofectinas, agentes de precipitación y similares. No obstante, las moléculas de ácido nucleico utilizadas en terapia génica también pueden suministrarse en formulaciones de liposomas, de lipofectinas y similares, que pueden ser elaboradas a través de métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en las patentes de EUA con números 5.593.972, 5.589.466 y 5.580.859, que se incluyen aquí a modo de referencia.

10

15

20

35

45

Las moléculas de ácido nucleico desnudo se suministran mediante cualquier método conocido por los expertos, incluyendo, a título enunciativo, inyección directa con aguja en el lugar de suministro, inyección intravenosa, administración tópica, infusión por catéter y las denominadas «pistolas de genes». Estos métodos de suministro son conocidos en la técnica. Los constructos también pueden suministrarse mediante vehículos de suministro como secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, lipofectinas, agentes de precipitación, etc.

En otra modalidad, el producto terapéutico consta de IP6K1 o de fragmentos activos de ésta. Los polipéptidos pueden administrarse a través de cualquier técnica adecuada, entre las que se incluyen, a título enunciativo, suministro como conjugado con un dominio de transducción, que son una o más secuencias de aminoácidos o cualquier otra molécula que pueda transportar un dominio activo a través de las membranas celulares. Estos dominios pueden estar unidos a otros polipéptidos para dirigir el movimiento del polipéptido unido a través de las membranas celulares (consulte, por ejemplo, Cell 55: 1179-1188, 1988; Cell 55: 1189-1193, 1988; Proc Natl Acad Sci U S A 91: 664-668, 1994; Science

- 25 En otro aspecto adicional, la presente invención ofrece métodos para identificar un compuesto para tratar la diabetes de tipo II, que comprenden:
 - (a) poner en contacto células beta pancreáticas con uno o más compuestos de prueba; y

285: 1569-1572, 1999; J Biol Chem 276: 3254-3261, 2001; y Cancer Res 61: 474-477, 2001)

- (b) determinar el nivel de expresión de la quinasa IP6K1 y/o los niveles de InsP7;
- donde un aumento en la expresión de la quinasa IP6K1 y/o un incremento en el InsP7 indica que el compuesto es 30 adecuado para tratar la diabetes de tipo II.

Tal y como se ha comentado anteriormente, los productos terapéuticos capaces de aumentar la expresión de la quinasa IP6K1 pueden utilizarse para tratar la diabetes de tipo II mediante la generación de InsP7, lo cual desemboca en un aumento de la capacidad exocitótica en las células beta pancreáticas. De esta forma, los compuestos que pueden utilizarse para aumentar la expresión de la quinasa IP6K1 y/o del InsP7 en las células beta pancreáticas pueden utilizarse para tratar la diabetes de tipo II.

La determinación de los niveles de expresión de la quinasa IP6K1 y/o un incremento en el InsP7 en las células beta pancreáticas puede efectuarse mediante cualquier técnica conocida en la materia, incluyendo, a título enunciativo, las que se recogen en los ejemplos posteriores.

Tal y como se emplea aquí, «condiciones basales de glucosa» hace referencia a una concentración de entre 1 y 6 mM de glucosa; en una modalidad, se utilizan 3 mM de glucosa. Tal y como se entiende por los expertos en la materia, la concentración basal de glucosa puede variar entre especies. La concentración basal de glucosa puede determinarse para cualquier tipo de célula o tejido concreto, a través de las condiciones que no provocan cambios, por ejemplo, en la concentración citoplasmática de Ca2+ libre o en la liberación de la insulina.

Tal y como se emplea aquí, las «células β pancreáticas» son cualquier población de células que contenga células de los islotes β pancreáticos. Las células pueden obtenerse a partir de cualquier especie de mamífero, o pueden estar presentes en las especies de dichos mamíferos cuando los ensayos se lleven a cabo en vivo. Estas poblaciones de células de los islotes β pancreáticos incluyen el páncreas, islotes pancreáticos de Langerhans aislados («islotes pancreáticos»), células de los islotes β pancreáticos aislados y líneas celulares secretoras de insulina. Los métodos para el aislamiento pancreático son bien conocidos en el sector, y los métodos para aislar islotes pancreáticos pueden encontrarse, por ejemplo, en Cejvan et al., Diabetes 52: 1176-1181 (2003); Zambre et al., Biochem. Pharmacol. 57: 1159-1164 (1999), y Fagan et al., Surgery 124: 254-259 (1998), así como en referencias citadas en dichas publicaciones. Las líneas celulares secretoras de insulina están disponibles a través de la *American Tissue Culture*

Collection («ATCC») (Rockville, Md.). En una modalidad adicional en la que se utilizan células β pancreáticas, se obtienen a partir de ratones ob/ob, que cuentan con más del 95% de células β en sus islotes.

- Con el fin de suministrar una información óptima acerca de la capacidad del único o de los diversos compuestos de prueba de cara al incremento en la expresión de la quinasa IP6K1 y/o un incremento en el InsP7 de las células beta pancreáticas, se prefiere comparar los niveles de quinasa IP6K1 y/o InsP7 en células experimentales con los niveles en células de control. Estas células de control pueden incluir uno o más de los siguientes elementos:
- Las mismas células huésped, tratadas de la misma manera, excepto que no entran en contacto con el único o los diversos compuestos de prueba;

2. Las mismas células huésped, tratadas de la misma manera, excepto que entran en contacto con el único o los diversos compuestos de prueba en diferentes momentos temporales (para analizar los efectos dependientes del tiempo); y

15

3. Las mismas células huésped, tratadas de la misma manera, excepto que entran en contacto con diferentes concentraciones del único o de los diversos compuestos de prueba (para analizar los efectos dependientes de la concentración)

- 20 Cuando los compuestos de prueba constan de secuencias de polipéptidos, estos polipéptidos pueden sintetizarse químicamente o expresarse de forma recombinante. La expresión recombinante puede lograrse mediante métodos estándar en la técnica, tal y como se comenta anteriormente. Estos vectores de expresión puede constar de vectores de expresión bacterianos o virales, y dichas células huésped pueden ser procarióticas o eucarióticas. Los polipéptidos sintéticos, que se elaboran mediante las bien conocidas técnicas de fase sólida, fase líquida o condensación de
- 25 péptidos, o cualquier combinación de éstos, pueden incluir aminoácidos naturales y no naturales. Los aminoácidos utilizados para la síntesis de péptidos pueden ser la resina de aminoácido Boc habitual (Nα-tbutiloxicarbonil protegida con Nα-amino) con los protocolos de desprotección, neutralización, acoplamiento y lavado habituales, o bien aminoácidos 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) protegidos con Nα-amino hidrolizables en condiciones alcalinas. Los aminoácidos Fmoc y Boc protegidos con Nα-amino pueden obtenerse a través de Sigma, Cambridge Research
- 30 Biochemical u otras empresas químicas conocidas por los expertos en la materia. Además, los polipéptidos pueden sintetizarse con otros grupos con protección Nα que sean conocidas por los expertos en la materia. La síntesis de péptidos en fase sólida puede lograrse mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia y que están disponibles, como por ejemplo mediante el uso de sintetizadores automatizados.
- 35 Cuando los compuestos de prueba constan de anticuerpos, éstos pueden ser policionales o monocionales. Los anticuerpos pueden ser humanizados, totalmente humanos o formas múridas de éstos. Estos anticuerpos pueden generarse mediante métodos bien conocidos, como los que se describen en Harlow y Lane, Antibodies; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988).
- 40 Cuando los compuestos de prueba constan de secuencias de ácidos nucleicos, estos ácidos nucleicos pueden sintetizarse químicamente o también expresarse de forma recombinante. Las técnicas de expresión recombinante son bien conocidas por los expertos en la materia (consulte, por ejemplo, Sambrook, et al., 1989, más arriba). Los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Asimismo, estos ácidos nucleicos pueden sintetizarse química o enzimáticamente mediante reacciones manuales o automatizadas, a través de técnicas estándar en la materia. Si se sintetiza químicamente o mediante síntesis enzimática in vitro, el ácido nucleico puede purificarse antes de introducirse en la célula. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden purificarse a partir de una mezcla por extracción con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía o una combinación de estos procesos. Como alternativa, los ácidos nucleicos pueden utilizarse sin purificación o con un mínimo de ésta para evitar pérdidas debido al procesamiento de muestras.

50

Cuando los compuestos de prueba constan de componentes diferentes a los polipéptidos, anticuerpos o ácidos nucleicos, dichos componentes pueden elaborarse mediante uno de los diferentes métodos existentes en la técnica para llevar a cabo la síntesis química orgánica.

55 Los compuestos de prueba identificados como responsables de provocar un aumento de la expresión de la quinasa IP6K1 y/o un aumento en el InsP7 en las células beta pancreáticas puede valorarse además para utilizarse como

compuesto candidato a tratar la diabetes de tipo II mediante cualquier técnica adicional, incluyendo, a título enunciativo, el contacto de las células beta pancreáticas con los compuestos de prueba y la medición de la liberación de insulina inducida por los compuestos de prueba, y/o midiendo la capacidad de las células beta pancreática resultante inducida por los compuestos de prueba; aquellos compuestos que aumentan la liberación de insulina y/o la capacidad (que es una medida de las exercisas de la insulina compuestos que aumentan la liberación de insulina y/o la capacidad (que es por los compuestos de prueba; aquellos compuestos que aumentan la liberación de insulina y/o la capacidad (que es por los compuestos de la supervisa de la insulina compuestos que aumentan la liberación de insulina y/o la capacidad (que es por los compuestos de la supervisa de la insulina compuestos que aumentan la liberación de insulina y/o la capacidad (que es por los compuestos de la supervisa de la insulina compuestos que aumentan la liberación de insulina y/o la capacidad (que es por los compuestos de las capacidad de las capacidad (que es por los compuestos de prueba; aquellos compuestos que aumentan la liberación de insulina y/o la capacidad (que es por los compuestos de las capacidad es las capacidad (que es por los compuestos de las capacidad es las capacidad es por los compuestos de las capacidad es por los compuestos des

- 5 una medida de la exocitosis de la insulina, como se describe más abajo) en comparación con el control pueden tener un valor especial como compuestos candidatos a tratar la diabetes de tipo II. En una modalidad adicional, la medición de la capacidad se lleva a cabo tal y como se describe más abajo, y los compuestos de prueba que provocan una respuesta exocitótica en la primera despolarización son considerados buenos compuestos candidatos para tratar la diabetes de tipo II.
- 10

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Reactivos y constructos. El 5-difosfoinositol pentaquisfosfato (InsP7) se sintetizó tal y como se ha descrito anteriormente (25). Los ORF para la IP6K1, la IP6K2 y la IP6K3 se obtuvieron mediante digestión, utilizando pCMV-IP6K1 y pCMVIP6K2 (26) tratados con Sall-Notl, y por digestión utilizando pGST-IP6K3 tratado con Sall (27). Los ORF purificados fueron subclonados en el vector de expresión eucariótica pCMV-Myc (Clontech). Las versiones de quinasa desactivada se elaboraron tal y como sigue. Algunos estudios anteriores han identificado una lisina en la InsP3KA que es fundamental para la actividad catalítica (28). En la IP6K1 de ratones, la IP6K2 humana y la IP6K3 humana, esta lisina aparece en la posición 226, 222 y 217 respectivamente. Para la IP6K1, procedimos a mutar la lisina 226 a alanina

- 20 utilizando el siguiente oligonucleótido: K26A, 5'-GTGTGCTGGACTTGGCCATGGGTACCCG-3' (SEQ ID n.º: 4) y complemento. Para la IP6K2, procedimos a mutar la lisina 222 a alanina utilizando el siguiente oligonucleótido: K222A, 5'-GTCCTTGACCTCGCGATGGGCACACGA-3' (SEQ ID n.º: 5) y complemento. Para la IP6K3, procedimos a mutar la lisina 217 a alanina utilizando el siguiente oligonucleótido: K217A, 5'-CCCTGTGTCCTGGATCTGGCCATGGGGACCCGGCAGCAC-3' (SEQ ID n.º: 6) y complemento.
- 25 Los constructos se comprobaron en células INS-1E para determinar su eficacia. La IP6K1-3 y sus respectivas formas catalíticamente inactivas se transfectaron en células INS-1E (protocolo más abajo). Todos los constructos se expresaron a un nivel similar, a juzgar por las pruebas de inmunotransferencia (Western blotting). Además, la IP6K1-3 de tipo salvaje, pero no sus formas catalíticamente inactivas (K/A), aumentaban el InsP7 celular hasta en 6 veces.
- 30 Los ARNi fueron obtenidos a partir de Ambion Inc (Austin, Tex.), y se utilizaron las siguientes ID de ARNi para silenciar las IP6K. ARNi contra la IP6K1 (1, ID ARNi-si=188560) y (4, ID ARNi-si=71758). ARNi contra la IP6K2 (3, ID ARNsi=87702) y (5, ID ARNsi=292211). Los controles no dirigidos (1, ID ARNsi=4611) y (2, ID ARNsi=4613) se utilizaron como controles negativos. Estos ARNsi también fueron suministrados por Ambion con marcadores fluorescentes Cy3, y se utilizaron en los experimentos con células beta primarias de ratón.
- 35

Extracción de ARN y PCR en tiempo real

La totalidad de los ARN se extrajo a partir de células utilizando el equipo reactivo Micro Kit RNeasy™ (Qiagen Inc, Valencia, Calif.). Los ARN fueron digeridos con DNasa I durante 1 hora a 37° C. (Fermentas, St. Leon Rot, Alemania) y posteriormente repurificados con el equipo reactivo Micro Kit RNeasy™ (Qiagen Inc). El equipo reactivo de transcriptasa inversa MultiScribe™ de Applied Biosystem se utilizó para transcribir inversamente 1 µg de ARN purificado con arreglo a las instrucciones del fabricante. 3,94 µl de los ADNc resultantes de la reacción de la transcriptasa inversa se diluyeron en 10,06 µl de agua estéril, y alícuotas de 1,25 µl de cada muestra se analizaron por triplicado para cada reacción PCR cuantitativa diferente. La expresión relativa del ARN mensajero fue medida mediante RT-PCR cuantitativa (con los productos para ensayos de expresión génica de TaqMan en un sistema de detección de secuencias ABI PRISM™ 7700, Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Para el análisis se utilizaron los siguientes ensayos TaqMan™ (Applied Biosystems): para IP6K1: inositol hexafosfato quinasa 1, para IP6K2: inositol hexafosfato quinasa 2, y para IP6K3: inositol hexafosfato quinasa 3. Los cebadores y las sondas para el ARNr 18S (reactivos de control del ARN ribosómico de TaqMan™, Applied Biosystems) se utilizaron como control endógeno.

Cultivo y transfección de células

Las células HIT T15 y los islotes de ratón se mantuvieron en un medio RPMI-1640, tal y como se ha descrito previamente (29). El marcado se llevó a cabo con [3H] mio-inositol (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) de 10 ó 50 µCi/ml para las células HIT T15 secretoras de insulina e islotes, respectivamente, en un medio especial RPMI-1640, descrito previamente (29). Las células se marcaron durante 72 h, y el marcado entre 16 y 168 h no varió la proporción de InsP6 con respecto a InsP7. Para los experimentos, los islotes o las células se transfirieron mediante lavado a un medio de Krebs amortiguado y se incubaron durante 30 minutos en condiciones basales de la

⁵⁰

glucosa (0,1 mM para las líneas celulares y 3 mM para los islotes). Los pirofosfatos de inositol fueron extraídos y separados por HPLC, tal y como se ha descrito anteriormente (29). Las células INS-1E se cultivaron tal y como se describe en otros lugares (30). Los islotes pancreáticos de ratón fueron aislados a partir de ratones NMRI hembras (Bomholtgaard, Ry, Dinamarca) o ratones normoglicémicos ob/ob, tal y como se ha descrito previamente (31,32). Las

- 5 células fueron incubadas en medio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif.) enriquecido con suero fetal bovino termoinactivado al 10% (v/v), 100 UI/mI de penicilina y 100 µg/mI de estreptomicina. Las células de islotes de ratón individuales fueron transfectadas de forma adherente el día posterior a la distribución en placas con pIRES2-EGFP (simulado) o una combinación de pIRES2-EGFP y un constructo de interés a 2 µg/ml en el medio de cultivo celular RPMI 1640 anterior utilizando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif.) según las
- 10 instrucciones del fabricante. Lipofectamine™ se utilizó con arreglo a una proporción de 4:1 con respecto al ADN. Las células se utilizaron 48 h después de la transfección. A partir de la fluorescencia de la GFP, la eficacia de la transfección en células de islotes de ratón llegó a 8+/-1% (n=124 células; 4 preparados de células y transfecciones diferentes). Los ARNsi fueron transfectados en células MIN6m9 y células primarias de los islotes utilizando medios de Lipofectamine™ 2000 y Opti.MEM™. Al día siguiente, el medio se cambió por un medio de cultivo diferente para células MIN6m9 o 15

células primarias de los islotes, y dichas células fueron cultivadas durante 4 días más.

Mediciones de capacidad

Las células que expresaban EGFP fueron seleccionadas para efectuar las mediciones de capacidad. La exocitosis fue 20 controlada en forma de cambios en la capacidad celular, utilizando el parche perforado o la configuración estándar de célula completa de la técnica pinzamiento zonal (patch-clamp) y un amplificador de pinzamiento zonal EPC9 (Heka Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Alemania). La solución de la pipeta para la configuración de parche perforado constaba de (en mM) 76 Cs2SO4, 10 NaCl, 10 KCl, 1 MgCl2, 5 HEPES (pH 7,35 con CsOH) y 0,24 mg/ml de anfotericina B. La perforación requirió unos minutos, y la fijación del voltaje se consideró satisfactoria cuando la serie G (conductancia de 25 la serie) pasó a ser estable y >35 nS. La solución de la pipeta utilizada para los registros estándar de célula completa contenía (en mM) 125 glutamato de Cs, 10 CsCl, 10 NaCl, 1 MgCl2, 5 HEPES, 0,05 EGTA, 0,01 GTP y 3 MgATP (pH 7,15 utilizando CsOH). Los isómeros de InsP7 fueron disueltos en la solución que llenaba la pipeta hasta las concentraciones finales que se indican en el texto, y conservados en hielo hasta utilizarse. El medio extracelular estaba compuesto de (en mM) 118 NaCl, 20 tetraetilamonio-Cl, 5,6 KCl, 1,2 MgCl2, 2,6 CaCl2, 5 HEPES (pH 7,40 utilizando 30 NaOH) y 3 glucosa. El protocolo de estimulación consistía en series de cuatro despolarizaciones de 500 ms aplicadas a 1 Hz, que oscilaban entre -70 mV y cero mV. Las mediciones de capacidad se llevaron a cabo a 33 °C, y la cámara de registro fue perfundida con arreglo con un caudal de 1,5 ml/min.

Medición de la actividad del canal único de Ca2+ de tipo L

35

40

Los registros del parche unido a la célula se llevaron a cabo en células MIN6m9 de control y en aquellas tratadas con IP6K1-ARNsi, tal y como se ha descrito anteriormente (32). Brevemente, la resistencia habitual del electrodo fue de 2-4 MΩ. Los registros de canal único adheridos a la célula se efectuaron con Ba2+ como el portador de carga (en mM): 110 BaCl2, 10 TEA-Cl, 5 HEPES-Ba(OH)2 y pH 7,4 y una solución despolarizadora de registro externo, con un contenido de (en mM) 125 KCl, 30 KOH, 10 EGTA, 2 CaCl2, 1 MgCl2, 5 HEPES-KOH y pH 7,15, se utilizan para llevar el potencial intracelular a ~0 mV. Los registros se llevan a cabo con un amplificador Axopatch™ 200 (Axon Instruments, Foster City, Calif.). Los impulsos de tensión (200 ms) se aplican con arreglo a una frecuencia de 0,5 Hz para despolarizar las células desde un potencial basal de -70 mV hasta un potencial de membrana de 0 mV. Las corrientes resultantes son filtradas a 1 kHz, digitalizadas a 5 kHz y analizadas con el programa de software pCLAMP™ 6 (Axon Instruments, Foster City,

45 Calif., EE.UU.).

Ensayo de liberación de la hormona del crecimiento humana (hGH).

- Tras la transfección con pCMV5-hGH y bien un vector vacío pcDNA3 o bien un plásmido de interés, las células INS-1E 50 se sembraron en placas de 48 pocillos (2×105 células por pocillo), y se cultivaron durante 48 h. Los experimentos de incubación y secreción fueron llevados a cabo tal y como se ha descrito (33), utilizando el mismo medio extracelular que se describe anteriormente y con adición de 3 mM de glucosa. Los niveles de hGH en las diversas muestras se midieron utilizando la técnica ELISA (Roche, Mannheim, Alemania).
- 55 Análisis estadístico. Los resultados se presentan como valores medios ± error estándar de la media para una serie determinada de experimentos. Las significaciones estadísticas se evaluaron utilizando la prueba de Dunett para múltiples comparaciones con respecto a un control y la prueba de Tukey cuando eran necesarias comparaciones múltiples entre grupos.

Resultados

Mediante protocolos de marcado con [3H] mio-inositol, procedimos a examinar las células secretoras de insulina y los islotes pancreáticos para comprobar la presencia de especies de pirofosfato de inositol. El InsP7 fue identificado por su 5 coelución con un patrón de InsP7 fiable, generado con la InsP6-guinasa (datos no mostrados). Se detectó muy poca cantidad de InsP8. La FIG. 1A muestra los niveles de InsP7 expresados como porcentaje de los niveles de InsP6 celular para una línea celular secretora de insulina o para células β primarias. En islotes pancreáticos de ratones normales (60% de células β), el nivel relativo de InsP7 es de alrededor del 5% del nivel de InsP6. Por el contrario, el porcentaje de InsP7 en islotes de ratones ob/ob, que tienen aproximadamente más del 90% de células β , es del 8%. Esto sugiere que 10 los elevados niveles de InsP7 están limitados a las células β. La normalización de los datos primarios del ratón con respecto al 100% de células β (FIG. 1B) sugiere que éstas mantienen los niveles de InsP7 en alrededor de un 9% de la concentración de InsP6. En el caso de las líneas celulares secretoras de insulina, sólo las células HIT-T15 presentan un nivel similar de InsP7 (10% de InsP6). Mediante la utilización de las técnicas de marcado de equilibrio (13), que sólo pueden aplicarse de forma fiable a las células cultivadas y en crecimiento, fuimos capaces de calcular la concentración 15 basal de InsP7 en células HIT-T15, la cual alcanzó un valor de 5,8+/-0,14 µM (± error estándar de la media, n=3), lo que indica una concentración en el límite superior del intervalo calculado en otras células de mamíferos o en levaduras (1-5 µM) (4). Debido a que el InsP7 se encuentra en una situación de intercambio rápido con la mezcla de InsP6 celular en células β (datos no mostrados), como es el caso en otras células de mamíferos (4), y a que la concentración celular de InsP6 en células β también es alta (13), quizá no resulte sorprendente el hecho de que en estas células haya altos 20 niveles de InsP7.

Cabe hacer hincapié en que el alto nivel de InsP7 es una media de toda la célula, que no toma en consideración los compartimentos celulares independientes. Esto resulta especialmente importante, puesto que una de las principales isoformas de la InsP6-quinasa, IP6K2, puede ser nuclear (9) y, así, el InsP7 que produce puede no influir sobre los fenómenos en el citosol o en la membrana plasmática, como por ejemplo el tráfico vesicular o la exocitosis, respectivamente. Por ende, procedimos a analizar lisados de los islotes y de células β mediante PCR cuantitativa en tiempo real de Taqman[™] para comprobar la presencia de isoformas de IP6K. La FIG. 1C pone de manifiesto la expresión de la IP6K1 y la IP6K2, pero no de la IP6K3. Los niveles de expresión para las dos quinasas eran similares en un tipo de célula determinado; no obstante, la expresión de la IP6K1 y 2 era inferior en las células primarias en comparación con la línea celular MIN6, lo cual quizá refleja el hecho de que el metabolismo del InsP7 está regulado al alza durante el ciclo celular (10,11). Así pues, no es probable que los altos niveles de InsP7 reflejen un conjunto nuclear exclusivo, sino que es posible que sean elevados de forma sistemática en toda la célula y, por tanto, podrían tener influencia sobre la secreción de la insulina.

- 35 Para analizar si las altas concentraciones de InsP7 son responsables de mantener las células β en un estado con capacidad de respuesta, procedimos a sobreexpresar las 3 IP6K identificadas en mamíferos en células β primarias en condiciones basales, y analizamos si la exocitosis estimulada mejoraba posteriormente. Utilizamos aumentos en la capacidad celular como una medida de la exocitosis. Esta técnica detecta el aumento en el área superficial de la célula β que tiene lugar cuando los gránulos que contienen insulina se fusionan con la membrana plasmática (17). Se utilizó la 40 técnica de célula completa con parche perforado para permitir mediciones en células metabólicamente intactas, y la exocitosis fue provocada por series de cuatro pulsos de despolarización de 500 ms desde -70 mV hasta 0 mV. En las células transfectadas de manera simulada, el aumento de la capacidad provocado por la serie aumentó hasta 79+/-11 fF (n=8; FIGS. 2A, B). En células con sobreexpresión de IP6K1, la amplitud del aumento de la capacidad se estimuló un 153%, y alcanzó una media de 198+/-12 fF (P<0,05; n=10), mientras que no se observó efecto alguno sobre la 45 exocitosis en células con sobreexpresión de una versión de IP6K1 con la quinasa desactivada (FIGS. 2A, B). Cada destacar que el aumento de la capacidad provocado por la primera despolarización aumentó en un 239% en las células que sobreexpresaban IP6K1 del tipo salvaje Se cree que la exocitosis que tiene lugar durante la primera despolarización representa en su mayor parte el contenido del conjunto rápidamente liberable (RRP) (18). Las dimensiones del RRP (en fF) pueden calcularse utilizando la ecuación: RRP=S/(1-R2), donde S es la suma de la 50 respuesta al primer (Δ C1) y al segundo (Δ C2) pulso, y R es la proporción Δ C2/ Δ C1 (18). Calculamos que el RRP alcanzó una media de 96+/-9 fF (n=8) y 225+/-21 fF (n=10) en células transfectadas de manera simulada y con IP6K1 de tipo salvaje, respectivamente; así pues, la IP6K1 aumentó el tamaño del RRP en un 134%. Utilizando un factor de conversión de 3 fF por gránulo (19), puede calcularse que el RRP contiene 30 y 75 gránulos en células transfectadas de forma simulada y con IP6K1 de tipo salvaje, respectivamente. La acción estimuladora de la IP6K1 está limitada a la
- 55 primera despolarización, y durante los tres pulsos finales se observa un aumento escaso (FIG. 2B). Es poco probable que el agotamiento de la respuesta exocitótica durante la serie refleje la inactivación de la corriente de Ca2+, con la correspondiente supresión de la exocitosis inducida por Ca2+ (FIG. 2C).
- La FIG. 2D muestra que la capacidad de la IP6K1 de tipo salvaje de estimular la exocitosis es compartida por la IP6K2 y 60 la IP6K3. La sobreexpresión de una versión de IP6K2 e IP6K3 con quinasa desactivada no afectó a la capacidad exocitótica en comparación con las células transfectadas de forma simulada (FIG. 2D). Para confirmar un papel de las IP6K en el control de la exocitosis, comprobamos el efecto de su sobreexpresión en células INS-1E utilizando el ensayo

de contransfección estable de hGH, en el que la hGH actúa como marcador de la exocitosis sólo de las células transfectadas. Las células INS-1E representan un sistema celular adecuado, puesto que los aumentos totales en la capacidad célular con sobreexpresión de IP6K1 eran comparables a los observados en células β primarias de ratón (datos no mostrados). La sobreexpresión de la IP6K1-3 estimulaba la secreción de hGH un 150% por encima del nivel basal (P<0,05; n=9-12), un efecto no compartido por sus mutantes con quinasas desactivadas. (FIG. 2E). A partir del hecho de que sólo la IP6K1 y 2 están presentes en células β , son éstas, y no la IP6K3, las probables moduladoras de la

- Un aspecto importante es que las IP6K también pueden utilizar InsP5 como sustrato, generando así un subconjunto diferente de pirofosfatos de inositol (4). Por ende, fue necesario verificar que el Ins InsP7 es capaz de promover directamente la exocitosis. El InsP7 de los mamíferos es el 5-isómero, y fue éste el que se utilizó en experimentos detallados (FIG. 3A-D). También evaluamos otros isómeros teóricos del InsP7 (FIG. 3E). Para medir los efectos del 5-InsP5 sobre la exocitosis, procedimos a aplicar series de despolarizaciones en experimentos estándar de célula completa, donde la célula β fue sometida a diálisis con una solución con un contenido de 3 μM de InsP7. Tras el
- 15 establecimiento de la configuración de célula completa, dicha célula dispuso de un período de equilibrio de dos minutos. A continuación, se aplicó una serie consistente en cuatro despolarizaciones de 500 ms desde -70 mV hasta 0 mV para así provocar la exocitosis. En una serie de seis experimentos, el aumento total en la capacidad celular registró un valor de 231+/-12 fF (P<0,01) en presencia de 3 µM de InsP7 en la solución que llenaba la pipeta, y de 77+/-11 fF en condiciones de control, respectivamente (FIG. 3A). Tal y como sucedió con las células que sobreespresaban IP6K1-3, el
- 20 aumento de capacidad provocado por la primera despolarización en presencia de 5-InsP7 se vio fuertemente estimulado, con un pequeño efecto sobre la exocitosis, en respuesta a las siguientes 3 despolarizaciones (FIG. 3B). La capacidad del 5-InsP7 para estimular la exocitosis no se asoció a un cambio en la corriente de Ca2+ de la célula completa (FIG. 3C). La acción estimuladora del 5-InsP7 sobre la exocitosis dependía de la concentración (FIG. 3D). No se observó estimulación alguna sobre la exocitosis a concentraciones ≦0,1 M de InsP7. Con concentraciones mayores,
- 25 el 5-InsP7 estimulaba la exocitosis en un 90-410%. El ajuste de los valores a la ecuación de Hill puso de manifiesto un efecto estimulador semimáximo de 1,02 µM y un factor de cooperación de 1,5. La estimulación máxima de la exocitosis se observó en concentraciones de InsP7 ≧10 µM, que generaron una estimulación >380% (FIG. 4D). Así pues, el 5-InsP7 aumenta, de forma dependiente de la dosis, la exocitosis dentro del intervalo fisiológico de concentraciones de InsP7 (1-10 µM). Otros isómeros del InsP7 también fueron capaces de estimular la exocitosis a 10 µM; no obstante, el
- 30 CH-PP, un pirofosfato simple basado en el ciclohexano, resultó ineficaz (FIG. 4E). En las condiciones utilizadas para analizar el efecto del InsP7 sobre la exocitosis, el efecto neto del InsP6 fue promover la endocitosis, y no la exocitosis (consulte FIG. 5). Esto se debe a que el efecto del InsP6 sobre la exocitosis sólo puede percibirse en condiciones en las que se inhibe la endocitosis (15); este no es el caso del InsP7. Además, el efecto del InsP6 sobre la exocitosis, cuando la endocitosis queda inhibida, no fomenta la secreción desde el RRP de forma selectiva (datos no mostrados). Nuestros
- 35 datos ilustran que el InsP7 y el InsP6 presentan efectos distintos sobre la exocitosis. Estos experimentos y aquellos que utilizan la sobreexpresión de las quinasas no descartan una función para un pirofosfato más fosforilado, es decir, el InsP8; no obstante, debido a que este pirofosfato se encuentra en una concentración muy baja o indetectable en células β (datos no mostrados), es poco probable que desempeñe un papel fisiológico.
- 40 Hasta este punto, todos nuestros datos indican una función del InsP7 en la exocitosis regulada; no obstante, nuestros resultados están basados en la adición exógena de enzimas o de InsP7. Para comprobar si el InsP7 endógeno contribuye a la capacidad exocitótica de una manera fisiológicamente relevante, procedimos a silenciar la IP6K1 y la IP6K2 en células β utilizando ARNsi. Los ARNsi específicos de ratón se comprobaron utilizando la línea de células β de ratón, MIN6 y el ensayo de expresión génica con PCR en tiempo real de Taqman™ (consulte FIG. 6). La eliminación de
- 45 la IP6K1 o la IP6K2 redujo significativamente los niveles de InsP7 celular (consulte FIG. 7). Los candidatos de ARNsi adecuados fueron marcados de forma fluorescente y transfectados en células β primarias. Se llevaron a cabo las mediciones de la capacidad celular en células fluorescentes, mediante el uso de la técnica del parche perforado descrita anteriormente. Cabe destacar que sólo el silenciamiento de la IP6K1, y no de la IP6K2 (FIG. 4C), provocó la inhibición de la capacidad exocitótica, y el efecto del silenciamiento, una vez más, fue más pronunciado en el primer pulso,
- 50 reflejando así el agotamiento del RRP de los gránulos (FIGS. 4 A,B). Además, la adición de 5-InsP7 en el modo de célula completa cuando la IP6K1 había sido silenciada fue capaz de restablecer la respuesta exocitótica normal (FIG. 4D). Así pues, el InsP7 endógeno generado por la IP6K1, pero no por la IP6K2, es el responsable del aumento de la capacidad exocitótica en células β pancreáticas. La discrepancia entre nuestros sistemas exógenos y endógenos puede reflejar una distribución diferencial o asociaciones celulares de las 2 quinasas en vivo; de hecho, la IP6K1 puede
- 55 asociarse con proteínas implicadas en la exocitosis, lo que no sucede en el caso de la IP6K2 (20). Cabe destacar que otros estudios que analizan el papel de la IP6K2 en la apoptosis indican un patrón similar (21), es decir: una sobreexpresión sustancial de la IP6K1-3 genera un incremento en la apoptosis; no obstante, este incremento sólo puede evitarse mediante el silenciamiento de la IP6K2. En ambos casos, el aumento suprafisiológico de InsP7 supera claramente cierto índice de compartimentalización mostrada por las diferentes quinasas.
- 60

5

exocitosis

Una posible explicación mecanicista del efecto del 5-InsP7 en la exocitosis puede ser la estimulación directa de la actividad de canal de Ca2+ de tipo L dependiente del voltaje, tal y como se ha mostrado previamente para el InsP6 (13).

Aunque los datos del canal de Ca2+ en célula completa contradicen esta afirmación (FIGS. 2C y 3C), se llevó a cabo un análisis detallado aplicando la configuración de parche adherido a la célula, con un entorno intracelular intacto, en células MIN6m9 tratadas con ARNsi contra la IP6K1, el cual reduce notablemente el InsP7 (FIG. 7). Tal y como se muestra en la FIG. 8, el ARNsi contra la IP6K1 no alteró ostensiblemente el número de canales por parche, la probabilidad de apertura, el tiempo medio de cerrado, ni el tiempo medio de apertura (P>0,05). Así pues, el InsP7 no afecta a la actividad del canal de Ca2+ de tipo L, lo cual supone un llamativo contraste con respecto al InsP6 (13).

En resumen, la célula β pancreática mantiene altos niveles de InsP7. Posteriormente, este pirofosfato actúa como protagonista esencial en el proceso secretor de la insulina regulando el conjunto rápidamente liberable (RRP) de los gránulos que contienen insulina, manteniendo así la capacidad exocitótica inmediata de la célula β. Una cuestión importante de cara al futuro es determinar si la alteración del metabolismo del InsP7 desempeña algún papel en la patogénesis de la diabetes de tipo 2, una enfermedad caracterizada por un defecto en la secreción de la célula β pancreática (22). En este sentido apuntan la posible alteración del gen de la IP6K1 en una familia japonesa con diabetes de tipo 2 (23) y la reducción tanto de los niveles de insulina plasmática como de la tolerancia a la glucosa en ratones en los que se ha suprimido el gen IP6K1 (24).

Bibliografía

- 1. M. J. Berridge, Ann N Y Acad Sci. 766, 31 (1995).
- 2. B. Vanhaesebroeck et al., Annu Rev Biochem. 70, 535 (2001).
 - 3. T. Takenawa, T. Itoh, Biochim Biophys Acta. 1533, 190 (2001).
 - 4. M. Bennett, S. M. Onnebo, C. Azevedo, A. Saiardi, Cell Mol Life Sci. 63, 552 (2006).
 - 5. R. F. Irvine, M. J. Schell, Nat Rev Mol Cell Biol. 2, 327 (2001).
 - 6. S. B. Shears, Biochem J. 377, 265 (2004).
- 7. A. Saiardi, R. Bhandari, A. C. Resnick, A. M. Snowman, S. H. Snyder, Science. 306, 2101 (2004).
 - 8. X. Pesesse, K. Choi, T. Zhang, S. B. Shears, J Biol Chem. 279, 43378 (2004).
 - 9. A. Saiardi, E. Nagata, H. R. Luo, A. M. Snowman, S. H. Snyder, J Biol Chem. 276, 39179 (2001).
 - 10. C. J. Barker, J. Wright, P. J. Hughes, C. J. Kirk, R. H. Michell, Biochem J. 380, 465 (2004).
 - 11. Y. S. Lee, S. Mulugu, J. D. York, E. K. O'Shea, Science 316 109 (2007).
- 12. C. J. Barker, I. B. Leibiger, B. Leibiger, P.-O. Berggren, Am J Physiol Endocrinol Metab. 283, E1113 (2002).
 - 13. O Larsson et al., Science. 278, 471 (1997).
 - 14. A. M. Efanov, S. V. Zaitsev, P.-O. Berggren, Proc Natl Acad Sci USA. 94, 4435 (1997).
 - 15. M. Høy, P.-O. Berggren, J. Gromada, J Biol Chem. 278, 35168 (2003).
 - 16. M. Høy. et al., Proc Natl Acad Sci USA. 99, 6773 (2002).
- 35 17. P. Rorsman P, E. Renstrom Diabetologia. 46, 1029 (2003).
 - 18. K. D. Gillis, R. Mossner, E. Neher, Neuron 16, 1209 (1996).
 - 19. C. S. Olofsson. et al., Pflügers Archiv 444, 43 (2002).
 - 20. H. R. Luo et al., Neuron. 31, 439 (2001).
 - 21. E. Nagata et al. J Biol Chem. 280, 1634-40 (2005)
- 40 22. P. Marchetti, S. Del Prato, R. Lupi, S. Del Guerra, Nutr Metab Cardiovasc Dis. 16 Suppl 1:S3 (2006).
 - 23. J. Kamimura et al., J Hum Genet. 49, 360 (2004).
 - 24. J. T. Lexicon Knockout Mouse NIH-0750, Mouse Genome Database (MGD), Mouse Genome Informatics Web Site, informatics.jax.org/external/ko/lexicon/1223.html (18 Jul. 2006).
 - 25. K. M. Reddy, K. K. Reddy, J. R. Falck, Tetrahedron Letters 38, 4951 (1997)
 - 26. A. Saiardi, H. Erdjument-Bromage, A. M. Snowman, P. Tempst, S. H. Snyder, Curr. Biol. 9, 1323 (1999).
 - 27. A. Saiardi, E. Nagata, H. R. Luo, A. M. Snowman, S. H. Snyder, J Biol Chem. 276, 39179 (2001).
 - 28. S. Togashi, K. Takazawa, T. Endo, C. Erneux, T. Onaya, Biochem. J. 326, 221 (1997).

25

20

5

30

- 29. O. Larsson et al., Science. 278, 471 (1997).
- 30. A. Merglen et al., Endocrinology 145, 667 (2004).
- 31. M. Høy et al., Proc Natl Acad Sci USA. 99, 6773 (2002).
- 32. J. Yu et al., J. Biol. Chem. 278, 46210 (2003).
- 33. L. Lilja et al., J. Biol. Chem. 279, 29534 (2004).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BIOCRINE AB BERGGREN; Per-Olof 5 BARKER, Christopher J.

- <120> Los pirofosfatos de inositol determinan la capacidad exocitótica
- 10 <130> 150-262

<150> 60/969, 443 <151> 31/08/2007

15 **<160> 6**

<170> Patentln version 3.4

<210> 1
20 <211> 441
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met 1	cys	; val	Cys	Gln 5	Thr	Het	Glu	Va]	Gly 10	Gla	Туг	Gly	Lys	Asn 15	Ala
Ser	Arg	A la	Gly 20	Asp	Arg	Gly	val	Leu 25	Leu	ຣໃນ	Pro	Phe	Ile 30	His	Gln
val	Gly	G1y 35	His	Ser	Ser	Het	Met 40	Arg	туr	Asp	Asp	ніs 45	Thr	Val	Cys
Lys	Pro SO	Leu	Ile	Ser	Arg	Glu SS	Gln	Arg	Phe	Tyr	G1u 60	Ser	Leu	Pro	Pro
G1u 65	Met	Lys	Glu	Phe	Thr 70	Pro	GJu	Туг	Lys	G1y 75	val	Val	Ser	Val	Cys 80
Phe	Glu	Gly	Asp	Ser 85	Asp	Gly	Туг	Ile	Asn 90	Leu	Val	Ala	Tyr	Pro 95	Tyr
Val	Glu	Ser	Glu 100	Thr	val	Glu	Gln	Asp 105	Asp	Thr	Thr	Glu	Arg 110	Glu	Gln
Pro	Arg	Arg 115	Lys	His	Ser	Arg	Arg 120	Ser	Leu	ਮਾਂs	Arg	Ser 125	Gly	Ser	GJY
Ser	Asp 130	нis	Lys	Gไม	Gไม	Lys 135	Ala	Ser	Leu	Ser	Leu 140	Glu	Thr	Ser	Gไม่
Ser 145	Ser	Gln	Glu	Ala	Lys 150	Ser	Pro	Lys	va}	G]u 155	Leu	His	Ser	His	Ser 160
Glu	Val	Pro	Phe	6]n 165	Met	Leu	Asp	Gly	Asn 170	Ser	Gly	Leu	Ser	Ser 175	Gไม

150-262 Seq Listing_ST25.txt Lys Ile Ser His Asn Pro Trp Ser Leu Arg Cys His Lys Gln Gln Leu 180 185 190 Ser Arg Met Arg Ser Glu Ser Lys Asp Arg Lys Leu Tyr Lys Phe Leu 195 200 205 Leu Leu Glu Asn Val Val His His Phe Lys Tyr Pro Cys Val Leu Asp 210 215 220 Leu Lys Met Gly Thr Arg Gln His Gly Asp Asp Ala Ser Ala Glu Lys 225 230 235 235 Ala Ala Arg Gln Met Arg Lys Cys Glu Gln Ser Thr Ser Ala Thr Leu 245 250 250 255 Gly Val Arg Val Cys Gly Met Gln Val Tyr Gln Leu Asp Thr Gly His 260 265 270 Tyr Leu Cys Arg Asn Lys Tyr Tyr Gly Arg Gly Leu Ser Ile Glu Gly 275 280 285 Phe Arg Asn Ala Leu Tyr Gln Tyr Leu His Asn Gly Leu Asp Leu Arg 290 295 300 Arg Asp Leu Phe Glu Pro Ile Leu Ser Lys Leu Arg Gly Leu Lys Ala 305 310 315 320 Val Leu Glu Arg Gln Ala Ser Tyr Arg Phe Tyr Ser Ser Ser Leu Leu 325 330 335 Val Ile Tyr Asp Gly Lys Glu Cys Arg Ala Glu Ser Cys Leu Asp Arg 340 345 350 Arg Ser Glu Met Arg Leu Lys His Leu Asp Met Val Leu Pro Glu Val 355 360 365 Ala Ser Ser Cys Gly Pro Ser Thr Ser Pro Ser Asn Thr Ser Pro Glu 370 375 380 Ala Gly Pro Ser Ser Gln Pro Lys Val Asp Val Arg Met Ile Asp Phe 385 390 395 400 400 Ala His Ser Thr Phe Lys Gly Phe Arg Asp Asp Pro Thr Val His Asp 405 410 415 Gly Pro Asp Arg Gly Tyr Val Phe Gly Leu Glu Asn Leu Ile Ser Ile 420 425 430 Met Glu Gln Met Arg Asp Glu Asn Gln 435 440

150-262 Seg Listing_ST25.txt 2 <210> 4117 <212> DHA Homo sapiens <213> <400> 2 ccgccatctt gttgttgatc cgtacccagt gggcagcgcc gggagctgga ccaagcggcc 60 ggtgagaggc cgctgtagcg gtgctcagcc acctgtgctg cctgccaggg ggcgggccga 120 aacctggagg cccggggggc ccagctcccg tagggagccg tgggcgctcg gtgcccgggc 180 coogcaggcg togtatcigt cigititigag goggacagig atggttacat caacitagig 240 occtateett atgtggaaag tgagaetgtg gaacaggatg acaeaacaga acoogageaa 300 cctcggcgca aacactcccg ccggagcctg caccggtcag gcagtggcag tgaccacaag 360 gaggagaaag ccagcctgtc ccttgagacc tctgagagct cacaggaggc aaagagtccg 420 aaggtggagc tgcacagcca ctcagaggtc cctttccaga tgctagatgg caacagtggc 480 ttgagttctg agaagatcag ccacaacccc tggagcctgc gttgtcacaa gcagcagctg 540 agcogcatgo gotcogagto caaggacoga aagototaca agttoctoot gottgagaac 600 gtggtgcacc acttcaagta cccctgcgtg ttggacctga agatgggcac gcggcagcat 660 ggcgatgacg cgtcagctga gaaggcagcc cggcagatgc ggaaatgcga gcagagcaca 720 tcagccacgc tgggcgtcag ggtctgcggc atgcaggtgt accagctgga cacagogcat 780 tacctctgca ggaacaagta ctatggccgt gggctctcca ttgaaggctt ccgcaatgcc 840 ctctatcaat atctgcacaa tggcctggac ctgcgacgtg acctgtttga gcctatcctg 900 agcaaactgc gggggcctgaa agctgtgctg gagcggcagg cctcttaccg cttctactcc 960 agttccctgc tigicatcta tgatggcaag gagtgccggg ctgagtcctg cctggaccgc 1020 cggtctgaga tgcgtctcaa gcacctggac atggtgctcc ctgaggtggc gtcatcctgt 1080 ggccccagca ccagccccag caacaccagc cccgaggcgg gtccctcctc tcagcccaag 1140 gtggatgtcc gcatgattga ctttgcacac agcacattca agggcttccg ggatgacccc 1200 accolocate ategogoccaga cagagoctac gtgtttggcc tggagaacct catcagcate 1260 atggaacaga tocoogacga gaaccagtag occtpttct opoccccag aaccccttcc 1320 totocactoc aggragggac cattottotg aacttocot gaggacacac agacttoctt 1380 ttaaagggtt atatttctct ttggtgtaaa ctaaaagaaa tgtttttagc tgtagcctog 1440 aatccatata tataaagtga aggagggcag accacacgcc ctctcagcca ggctcctcag 1500 ctttgiggct ctgactggtg tgtccaggct gccttaggaa ggaagaggtg cccctggtgg 1560 gcttggcagc agggacaggg tgcccttgga cattggtttc tcttgtctag atctttgaga 1620 tctgtggctg cagggccctg ctgattgtaa ggtaaagccc tgggctggtg cagggcccct 1680 ccacgcccac tcttcccltg ttccccagaa gtagagggct ctgggtgccc atttcttogg 1740 ggCtttccag tcttatgctg tgggtgtcag ctagctcttt aataggtgcc ctcagggcac 1800 cacagggetg actgcacaaa getggaceca teetteggte tgacettage atggggetag 1860

150-262 Seg Listing_ST25.txt attaatgaag ctgggctgag gccaacttat ggcagagggc ggcgcctggg ttccccaggc 1920 acctgttggc acgtgacagg ttggcacctg tcctattcct gaaacagcct ctctcaccaa 1980 gttcccttgc ctaagaaggc cactccctcc cacccactg aagtgggggga tagtcggtgt 2040 cctagcaggc ctcagggcct ctggtggctc tggcccagac agtatttgca gttcttgtgc. 2100 tatgggtggg agtottotto otcaagttto ggcagotgtg otgotgotg atgggotgot 2160 cctcccaggg ctcaagggct gtggtccgct cagggtctca tttccccagg ccaagttcaa 2220 ggcagcagcc ctttgtgagg cgctcttggc cctgggcctg gagggagaac tttaagcttt 2280 tttgctcaca gggacgtggt atgggccctg ggtgcaggtg cccacattct gctaatgaga 2340 gctttgtctg atcagtcctg ggtccatcag tttgtccatg tgtccggctg ccagccgtc 2400 ccttgggatc cttcccctgg ggtgtagcct tgttcattag tatatactca ttccttcatg 2460 ctttcctcag cagaacactt ccacttctga ggtgagcttt tgccccatgc ccttcctcca 2520 caggtgttgc ctttttataa agacctgata gcagaataaa ttggtgtttc cctgttgacc 2580 cagcaccatt tctgtgggcc tagaatatgg ccctcaaccc ttagagtggg gcagtgaggg 2640 cttgaggagt gaccetteet tteteatggt tttagteatt ttggetgeea gecettaatg 2700 gcacagatet getgetteta acagatggee aggaggtgae acegatttea gecattgeea 2760 aggttagcac cctctccttt gagcctaggg ccacactgtt cattgtcact ttaggcaagt 2820 gcctgtttgg ctttaaaggt aagcctgcca gctgtgagaa gccttggtaa ctgatggact 2880 catttcctgg tccttaaaga tgcagcctct taagggctcc ttgatggatg ccatctctcc 2940 tagcccccag ccctggtgcc actggtgggc aggttcccat tctttggggc tgggaggac 3000 agettgeetg tttetggtea caaattacag tettetete tgtaceatte tgtggettea 3060 gccatggggg cagtagccct tcattagtgt agatagtcat tccctggtag ggtggagggt 3120 aagacatagg gtctggaact gtttgggacc ttttggggat gtcctgtgcc tcccagattc 3180 ctcgattctg ggaggagagg ctgccgcatt ctgctgctcc tcacagcgag caaagctgca 3240 cccacttaca ttcagtattt tcctggcact acaaagagtg ggaaggcctg ggatttgctg 3300 ctgctccctt agagcagggc ccctcttttc agcactttgg acacctggag acccagccct 3360 gttatttaat ggtagtgggc aagtgtgtgt gcatactgtc tgccactgct ttctccctgc 3420 cccatgccag agagccctgt ccctgccagg cccagccttc ttagccccaa cttgggaaca 3480 aagtgcaaca tgggatcatg ggttggggtg ctcaggtgag ccctctctat agtgcttccc 3540 tgggccaage tgacaccage ccctgagggt ggggtgggac gggtggtget taaaagagga 3600 aggggaccag tgtagcaact tgccagggac cccaccctc cctctctggg cctgtgcagt 3660 gagcatgggg attoccatca agggggcctgg cacctgtgct agttacgtag ccgctgctca 3720 cgcgctcact cctgaccaca tgcacgttcc ctagatgcag actgctttga actttaaagc 3780 tgtacaattt ggttatgttt gtgctgactt aaaatatatt ttaatgagga aaaaataatg 3840 gagaaccctg ggaaggacct ggttcttttg cttctcgggg aactgtaagc cctcgcgttc 3900

150-262 Seq Listing_ST25.txttgggaatcgc tctctgctgc tctttcctgg aagctaagcc tgtctccacc gcccgaggcc3960tgcgccggtg gctcccgccg cagttgcgtt tgctttggac cttgcgtgcg ggggaggggg4020tgctcggtcc gagcccgctc ctttctgtac acctagcgct gcccgccccg cttgtgtctg4080aggtcgtgta tgtcaaaaat aaagccgcta gaaacgg4117

<210> 3 <211> 4468 <212> DHA <213> Homo sapiens

<400> 3 ccgccatctt gttgttgatc cgtacccagt gggcagcgcc gggagctgga ccaagcggcc 60 ogrgagagge cgetgtageg gtgeteagee acctgtgetg ectgeeaggg ggegggeega 120 aacctggagg cccggggggc ccagctcccg tagggagccg tgggcgctcg gtgcccgggc 180 coopcagoac agaataataa gctgaataga atctgaccat tggctttcac ctggccagga 240 ccttctatgt agctctcctt ttgtggccca tgtgctgcat cctctgccct cagtgtgcaa 300 ctggccccca acgcaatgtg tgtttgtcaa accatggaag tggggcagta tggcaagaat 360 420 gcaagtcoog ctopagaccg gogagtcete ctopagecet teatecacca agtaggegga cacaqcagca tgatgcgtta cgacgatcac actgtgtgca agcccctcat ctcccgggaa 480 capcoctttt acgagtccct ccctcccgaa atgaaggagt tcacccctga atacaaaggc 540 gtggtatctg tctgttttga gggggacagt gatggttaca tcaacttagt ggcctatcct 600 tatgtggaaa gtgagactgt ggaacaggat gacacaacag aacgggagca acctcggcgc 660 720 aaacactccc gccggagcct gcaccggtca ggcagtggca gtgaccacaa ggaggagaaa gccagcctgt cccttgagac ctctgagagc tcacaggagg caaagagtcc gaaggtggag 780 ctgcacagcc actcagaggt ccctttccag atgctagatg gcaacagtgg cttgagttct 840 gagaagatca gccacaaccc ctggagcctg cgttgtcaca agcagcagct gagccgcatg 900 coctcopagt ccaaggaccg aaagctctac aagttcctcc tgcttgagaa cgtggtgcac 960 cacttcaagt according attogacctg aagatgggca cgcggcagca tggcgatgac 1020 1080 ocotcaocto agaaggagc ccopcagato cggaaatgcg agcagagcac atcagccaco ctopocotca opotctocog catocaootg taccaootg acacaoogca ttacctctgc 1140 aggaacaagt actatggccg tgggctctcc attgaaggct tccgcaatgc cctctatcaa 1200 tatctgcaca atggcctgga cctgcgacgt gacctgtttg agcctatect gagcaaactg 1260 cggggcctga aagctgtgct ggagcggcag gcctcttacc gcttctactc cagttccctg 1320 cttgtcatct atgatgcaa ggagtgccgg gctgagtcct gcctggaccg ccggtctgag 1380 atgogtotea agoacctoga catgotgote cotgaggtog ogicateeto tgoceccage 1440 accageeeca geaacaceag eccegaggeg ggteeeteet etcageeeaa ggtggatgte 1500 cgcatgattg actttgcaca cagcacattc aagggcttcc gggatgaccc caccgtgcat 1560 gatgggccag acagaggta cgtgtttggc ctggagaacc tcatcagcat catggaacag 1620

150-262 Seq Listing_ST25.txt

atgcgggacg agaaccagt	a ggccctgtt	c tgggccccc	a gaacccctt	c ctctccactg	1680
caggcaggga ccattgtto	t gaacttgcc	g tgaggacac	a cagacttgc	t tttaaagggt	1740
tatatttctc tttggtgta	a actaaaagaa	a atgttttta	g ctgtagcct	g gaatccatat	1800
atataaagtg aaggagggg	a gaccacacgo	cctctcage	c aggeteete	a gctttgtggc	1860
tctgactggt gtgtccagg	c tgccttagga	a aggaagagg	t gcccctggt	g ggcttggcag	1920
cagggacagg gtgcccttg	g acattggttt	ctcttgtcta	a gatetttga	g atctgtggct	1980
gcagggccct gctgattgt	a aggtaaagco	ctgggctgg	t gcagggccc	tccacgccca	2040
ctcttccctt gttccccag	a agtagaggg	tctgggtgc	c catttcttg	gggctttcca	2100
gtcttatgct gtgggtgtc	a gctagctctt	taataggtg	cctcagggca	a ccacagggct	2160
gactgcacaa agctggacc	c atccttcggt	ctgaccttag	g catggggcta	a gattaatgaa	2220
gctgggctga ggccaactt	a tggcagaggg	cggcgcctgg	gttccccagg	cacctgttgg	2280
cacgtgacag gttggcacc	t gtcctattcc	tgaaacagco	teteteacea	agttcccttg	2340
cctaagaagg ccactccct	c ccaccccact	gaagtggggg	atagtcggtg	tcctagcagg	2400
cctcagggcc tctggtggc	t ctggcccaga	cagtatttg	agttcttgtg	ctatgggtgg	2460
gagtcttctt cctcaagtt	t cggcagctgt	gctgctgctg	gatgggctgc	tcctcccagg	2520
gctcaagggc tgtggtccg	tcagggtctc	atttccccag	gccaagttca	aggcagcagc	2580
cctttgtgag gcgctcttg	g ccctgggcct	ggagggagaa	ctttaagctt	ttttgctcac	2540
agggacgtgg tatgggccc	gggtgcaggt	gcccacatto	tgctaatgag	agctttgtct	2700
gatcagtcct gggtccatca	a gtttgtccat	gtgtccggct	gccagcccgt	cccttgggat	2760
ccttcccctg gggtgtagc	ttgttcatta	gtatatacto	attccttcat	gctttcctca	2820
gcagaacact tccacttct	aggtgagctt	ttgccccatg	cccttcctcc	acaggtgttg	2880
cctttttata aagacctgat	agcagaataa	attggtgttt	ccctgttgac	ccagcaccat	2940
ttctgtgggc ctagaatat	gccctcaacc	cttagagtgg	ggcagtgagg	gcttgaggag	3000
tgacccttcc tttctcatge	ttttagtcat	tttggctgcc	agcccttaat	ggcacagatc	3060
tgctgcttct aacagatggo	caggaggtga	caccgatttc	agccattgcc	aaggttagca	3120
ccctctcctt tgagcctagg	gccacactgt	tcattgtcac	tttaggcaag	tgcctgtttg	3180
gctttaaagg taagcctgcc	agctgtgaga	agccttggta	actgatggac	tcatttcctg	3240
gtccttaaag atgcagccto	ttaagggctc	cttgatggat	gccatctctc	ctagccccca	3300
gccctggtgc cactggtggg	caggttccca	ttctttgggg	ctgggaggga	cagettgeet	3360
gtttctggtc acaaattaca	gtcttctctc	ctgtaccatt	ctgtggcttc	agccatgggg	3420
gcagtagccc ttcattagtg	tagatagtca	ttccctggta	gggtggaggg	taagacatag	3480
ggtctggaac tgtttgggac	cttttgggga	tġtcctgtgc	ctcccagatt	cctcgatitct	3540
gggaggagag gctgccgcat	tctgctgctc	ctcacagcga	gcaaagctgc	acccacttac	3600
attcagtatt ttcctggcac	tacaaagagt	gggaaggcct	gggatttgct	gctgctccct	3660

150-262 Seq Listing_ST25.txt

tagagcaggg cccctctttt cagcactttg gacacctgga gacccagccc tgttatttaa	3720
tggtagtggg caagtgtgtg tgcatactgt ctgccactgc tttctccctg ccccatgcca	3780
gagagccctg tccctgccag gcccagcctt cttagcccca acttgggaac aaagtgcaac	3840
atgggatcat gggttggggt gctcaggtga gccctctcta tagtgcttcc ctgggccaag	3900
ctgacaccag cccctgaggg tggggtggga cgggtggtgc ttaaaagagg aaggggacca	3960
gtgtagcaac ttgccaggga ccccaccct ccctctctgg gcctgtgcag tgagcatggg	4020
gatteccate aaggggeetg geacetgtge tagttaegta geegetgete aegegeteae	4080
teetgaccae atgeacgtte ectagatgea gactgetttg aaetttaaag etgtacaatt	4140
tggttatgtt tgtgctgact taaaatatat tttaatgagg aaaaaataat ggagaaccct	4200
gggaaggacc tggttctttt gcttctcggg gaactgtaag ccctcgcgtt ctgggaatcg	4260
ctctctgctg ctctttcctg gaagctaagc ctgtctccac cgcccgaggc ctgcgccggt	4320
ggetteeget geagtigegt tigettigga eettgegtge gggggagggg gtgeteggte	4380
cgageceget connerge callagege tgecegeeee gettgtgtet gaggtegtgt	4440
atgtcaaaaa taaagccgct agaaacgg	4468
<210> 4 <211> 28 <212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Synthetic	
<400> 4 gtgtgctgga cttggccatg ggtacccg	28
210 5	
<2105 5	
<212> DNA	
<213> AFTITICIAI	•
<223> Synthetic	·
gittigate tegegatggg catacga	27
<210> 6	
<211> 39 <212> DNA <213> Artificial	
<220> <223> Synthetic	
<400> 6 ccctgtgtcc tggatctggc catggggacc cggcagcac	.39

REIVINDICACIONES

- 1. Quinasa IP6K1 o fragmentos activos de ésta, o bien un constructo de ácido nucleico capaz de expresar la quinasa IP6K1 o fragmentos activos de ésta para el uso en el tratamiento de la diabetes de tipo II.
- Quinasa IP6K1 o fragmentos activos de ésta, o bien un constructo de ácido nucleico capaz de expresar la quinasa IP6K1 o fragmentos activos de ésta para el uso según la reivindicación 1, donde la IP6K1 da lugar a un incremento de la expresión de InsP₇.
 - Quinasa IP6K1 o fragmentos activos de ésta, o bien un constructo de ácido nucleico capaz de expresar la quinasa IP6K1 o fragmentos activos de ésta para el uso según la reivindicación 1, donde la IP6K1 estimula la exocitosis de la insulina a partir de células beta pancreáticas.
- Quinasa IP6K1 o fragmentos activos de ésta, o bien un constructo de ácido nucleico capaz de expresar la quinasa IP6K1 o fragmentos activos de ésta para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la quinasa IP6K1 se administra mediante terapia génica.
 - 5. Quinasa IP6K1 o fragmentos activos de ésta para su uso según la reivindicación 1 ó 3, donde la quinasa IP6K1 se conjuga con un dominio de transducción.
- 15 6. Un método para identificar un compuesto para tratar la diabetes de tipo II, que comprende:
 - (a) poner en contacto células beta pancreáticas con uno o más compuestos de prueba; y
 - (b) determinar los niveles de InsP₇ en las células beta pancreáticas;

donde un incremento en el InsP7 indica que el compuesto de prueba es adecuado para tratar la diabetes de tipo II.

- El método de la reivindicación 6, en el que la puesta en contacto se lleva a cabo en presencia de entre 1 y 6 mM de glucosa.
 - 8. El método de la reivindicación 6 ó 7, donde las células beta pancreáticas constan de islotes pancreáticos.
 - 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que las células beta pancreáticas comprenden islotes pancreáticos de Langerhans aislados, células beta de los islotes pancreáticos aislados o líneas celulares secretoras de insulina.

5











Figura 3











Figura 6

Figura 7



Figura 8

