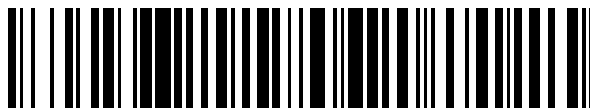


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 852**

21 Número de solicitud: 201330283

51 Int. Cl.:

**G01N 33/58** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**29.03.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**04.11.2013**

62 Número y fecha presentación solicitud principal:

**P 201230475 29.03.2012**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070206**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)  
Ctt-Otri - Casa del Estudiante, C/ Real de Burgos,  
s/n  
47001 Valladolid ES**

72 Inventor/es:

**ALONSO ALONSO, M<sup>a</sup> Teresa y  
GARCÍA-SANCHO MARTÍN, Javier**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **Sensores de calcio y métodos para la detección de calcio libre intracelular**

57 Resumen:

Sensores de calcio y métodos para la detección de calcio libre intracelular.

La invención proporciona un sensor de calcio basado en una proteína de fusión que comprende (i) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$ , (ii) un segundo dominio polipeptídico de la secuencia SEQ ID NO: 1 (GFPuv) o una variante de la misma que mantenga dos máximos en su espectro de excitación y al menos un máximo en su espectro de emisión, y (iii) un péptido flexible que une el primer dominio y el segundo dominio de manera covalente. También proporciona un animal no humano transgénico que comprende la proteína de fusión. Asimismo, la invención proporciona métodos para detectar la concentración de calcio  $Ca^{2+}$  intracelular.

ES 2 427 852 A1

**DESCRIPCIÓN****SENSORES DE CALCIO Y MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE CALCIO LIBRE INTRACELULAR****5 CAMPO DE LA TÉCNICA**

La presente invención se relaciona con sensores de calcio libre intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) codificados genéticamente y, en particular, con proteínas de fusión que comprenden un dominio de unión a calcio y una proteína fluorescente. También se relaciona con métodos para la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el uso de sensores de calcio.

10

**ANTECEDENTES**

El calcio libre intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) está implicado en una gran variedad de procesos intracelulares, tanto citosólicos como subcelulares. El retículo endoplásmico (RE) es el principal reservorio celular de  $\text{Ca}^{2+}$  y su capacidad para captar y liberar  $\text{Ca}^{2+}$  hace que este orgánulo tenga un papel fundamental en la homeostasis celular del calcio. Por otra parte, resultados recientes de los últimos años han demostrado interacciones entre la señal del  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente del RE con la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular, así como con la captación del calcio mitocondrial. Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  del RE regula una serie de enzimas residentes en el RE implicadas en la síntesis y el procesamiento de proteínas, y la alteración de la homeostasis del RE provoca estrés reticular.

20

Habitualmente, se utilizan indicadores convencionales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico para inferir el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE pero para poder discriminar entre la señal citosólica y la procedente de los orgánulos es indispensable disponer de una medida directa y fiable del  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ . Bajo ciertas condiciones experimentales, los indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  sintéticos se pueden introducir en el RE, aunque la señal no es específica y previamente debe eliminarse el indicador atrapado en otros compartimentos como el citosol (Hofer and Machen, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2598-2602). La principal ventaja de los indicadores de calcio codificados genéticamente (GECIs) es que se pueden diseñar para que sean dirigidos a localizaciones subcelulares específicas, como el RE, y, así evitar el problema de la localización errónea. Tanto proteínas fluorescentes como bioluminiscentes se han utilizado con éxito para medir la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ . Desde que Kendall *et al.* describieran por vez primera la posibilidad de determinar la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ , mediante el uso de acuorina modificada para ser dirigida al RE, este tipo de señales han demostrado ser una excelente herramienta para medir  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  y durante los últimos 20 años han generado una gran cantidad de valiosos resultados en el campo de la señalización por calcio en el RE. Su principal limitación es la baja emisión de luz que dificulta los ensayos de imagen en célula única así como la necesidad de reconstituir la acuorina mediante el uso del cofactor celenteracina.

35

Esto se ha visto compensado con el uso de los GECIs, también denominados proteínas fluorescentes indicadoras de calcio (FCIPs). Estas están compuestas de una o dos proteínas fluorescentes fusionadas a un dominio de unión al calcio. Los primeros se construyeron originalmente insertando calmodulina (Miyawaki *et al.*, 1997, Nature 388: 882-887), troponina (Heim and Griesbeck, 2004, J. Biol. Chem., 279:14280-14286) o incluso sólo un único motivo de mano EF en un sitio sensible dentro de la proteína fluorescente (Zou *et al.*, 2007, Biochemistry, 46:12275-12288). El avance más reciente está basado en el diseño de un sitio de unión a calcio en la proteína EGFP (*enhanced GFP*) en la proximidad del fluoróforo (Tang *et al.*, 2011, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108: 16265-70). La proteína resultante es capaz de detectar calcio en altas concentraciones en el RE. En estos ejemplos, los cambios en la fluorescencia sensible al calcio se basan en los efectos producidos por el cambio conformacional provocado por la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el estado de protonación del cromóforo.

40

45

El gran progreso que se ha realizado en los últimos años en el diseño de nuevos GECIs no se corresponde con su funcionamiento *in vivo*, siendo casi todos los resultados publicados hasta la fecha insatisfactorios debido a los bajos niveles de expresión del transgén, que resulta en la inactivación del sensor o en un rango dinámico menor que el obtenido *in vitro* (Kotlikoff, 2007, J. Physiol. 578:55-67 y Whitaker, 2010, Methods Cell Biol 99:153-182). De hecho, hasta la fecha sólo se ha publicado un único artículo sobre un modelo de ratón transgénico para el sensor  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, el camaleón YC (Hara *et al.*, 2004, "Imaging endoplasmic reticulum calcium with a fluorescent biosensor in transgenic mice." Am J Physiol Cell Physiol 287:C932-938).

50

55

Por tanto, existe una gran necesidad en la técnica de proporcionar desarrollar biosensores que permitan la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  en compartimentos con alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y que permitan su uso tanto *in vivo* como en animales transgénicos.

**COMPENDIO DE LA INVENCION**

60

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para la determinación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra que comprende

- (i) poner en contacto dicha muestra con una proteína de fusión que comprende
  - (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,
  - (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y

65

- 5 (ii) en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico y detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo dominio polipeptídico en respuesta a la excitación de la muestra a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico y
- (iii) determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de la variación en la intensidad de la fluorescencia con respecto a la intensidad de la fluorescencia en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- 10 En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende
- (i) poner en contacto una célula o población celular que comprende una proteína de fusión que comprende
- 15 (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,  
 (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente
- (ii) en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico y detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo dominio polipeptídico en respuesta a la excitación de la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico
- 20 en donde una variación en la intensidad de la fluorescencia emitida por la célula o población celular con respecto a un valor de referencia es indicativo de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.
- 25 En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un Método para la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular a lo largo del tiempo que comprende
- (i) proporcionar una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden una proteína de fusión que comprende
- 30 (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,  
 (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y
- (ii) en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico, determinar a un primer tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico,
- 35 y
- (iii) determinar a un segundo tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico
- 40 en donde una variación en la intensidad de la señal emitida en (iii) con respecto a la intensidad de la señal emitida en (ii) es indicativo de una variación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.
- 45 En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con un método de identificación de un compuesto con capacidad de modulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular, que comprende
- (i) poner en contacto un compuesto candidato con una célula o población celular en donde dicha célula o población celular comprende una proteína de fusión que comprende
- 50 (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,  
 (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y
- (ii) en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico, determinar la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico,
- 55 en donde una alteración en la intensidad de fluorescencia determinada en la etapa (ii) con respecto a la intensidad de fluorescencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- 60 En un quinto aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  en un animal que comprende
- (i) proporcionar un animal no humano transgénico no humano transgénico que comprende un polinucleótido que permite la expresión en dicho animal de una proteína de fusión que comprende
- 65

- (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,  
 (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y  
 en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido  
 enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en  
 una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico,  
 y  
 (ii) determinar de forma no invasiva la emisión fluorescente en dicho animal.

En un sexto aspecto, la invención se relaciona con un método de identificación de un compuesto con capacidad  
 de modulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en un animal no humano transgénico que comprende

- (i) poner en contacto un compuesto candidato con un animal no humano transgénico que  
 comprende un polinucleótido que permite la expresión en dicho animal de una proteína de  
 fusión que comprende  
 (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,  
 (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y  
 en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido  
 enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en  
 una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico,  
 (ii) determinar de forma no invasiva la fluorescencia emitida por el animal transgénico en  
 respuesta a una excitación a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda  
 de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico,

en donde una alteración en la intensidad de fluorescencia determinada en la etapa (ii) con respecto a la  
 intensidad de fluorescencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho  
 compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1. (A)** Dominios estructurales de las variantes de GuvA utilizadas para su expresión en bacterias (His-  
 GuvA) o en células de mamífero, bien en el citosol (cytGuvA) o dirigida al núcleo (nuGuvA). His6 indica la cola de  
 poli-histidinas. El péptido espaciador se ha insertado entre la GFP y la acuorina (AEQ); kz, secuencia consenso  
 Kozak (GCCACCATG) que facilita la expresión óptima en células de mamífero. **(B)** Espectro de excitación de  
 GuvA (emisión a 520 nm) en presencia de 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (trazo discontinuo) o 1 mM EGTA (trazo continuo). **(C)**  
 Transitorios representativos de  $\text{Ca}^{2+}$  (media de 5 células) registrados por el sensor cytGuvA en células HEK293T  
 estimuladas con 100  $\mu\text{M}$  ATP y 100  $\mu\text{M}$  carbacol. Se representa tanto las fluorescencias individuales a 470 y a  
 403 nm (debajo) como el cociente entre ellas (arriba). **(D)** Curva de titulación de GuvA para calcio. La  
 concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en cada muestra se midió usando el indicador fluorescente X-Rhod-5F. En cada  
 muestra se añadieron 3  $\mu\text{g}$  de la proteína GuvA en tampón MOPS 20 mM, 140 mM KCl y 1mM  $\text{MgCl}_2$  a pH 7.2.  
 La fluorescencia se registró en un lector de placas de 96 pocillos con las excitaciones a 390 y 485, manteniendo  
 la emisión a 535. Los puntos de 4 experimentos independientes se ajustaron a una curva sigmoidea.

**Figura 2 (A)** Mutaciones en las manos EF de la porción de la acuorina en la quimera GuvA. **(B)** Representación  
 esquemática de las dos construcciones GuvA dirigidas al RE. kz, secuencia Kozak (GCCACCATG); CR,  
 calreticulina. **(C)** Titulación *in situ* para el  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE. Células HeLa que expresan CRmutGuvA se  
 permeabilizaron con digitonina (DIG, 60  $\mu\text{M}$ ) y se trataron con tampones de HEDTA que permiten obtener  $[\text{Ca}^{2+}]$   
 desde 0.05 hasta 1000  $\mu\text{M}$  o con soluciones tampones sin  $\text{Ca}^{2+}$  previamente sometidos a una columna de Ca  
 esponja. **(D)** Curva de titulación para  $\text{Ca}^{2+}$  de CRmutGuvA a pH 7.2 obtenida a partir de los datos en C. **(E)** Curva  
 de titulación para  $\text{Sr}^{2+}$  de CRmutGuvA.

**Figura 3. (A)** Transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  representativos (n= 30) en el RE de células HeLa que expresan CRmutGuvA  
 estimuladas con ATP (100  $\mu\text{M}$ ) + Carbacol (100  $\mu\text{M}$ ) (ATP, en la figura) en 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  o en 0.5 mM EGTA con 10  
 $\mu\text{M}$  tert-butilhidroquinona (TBH). **(B)** Transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE de células HeLa tratadas con BAPTA (10  $\mu\text{M}$ ).  
**(C)** Transitorios de  $\text{Sr}^{2+}$  en el RE de células HeLa. La sustitución del  $\text{Ca}^{2+}$  por el  $\text{Sr}^{2+}$  en el RE se describió en el  
 apartado de Métodos. **(D)** Comparación de los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol y en el RE, medidos  
 simultáneamente con fura-2 (cociente 340/380) y con CRmutGuvA, (F470).

**Figura 4.** Dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE de neuronas DRG monitorizadas con CRmutGuvA. **(A)** Efectos de la  
 cafeína (50 mM) en 1 mM  $\text{CaCl}_2$  o en presencia de TBH. Las neuronas DRG se infectaron con un vector de tipo  
 amplicón derivado del virus herpes que expresa CRmutGuvA. El trazado es la media de 7 células en el campo.  
**(B)** Dosis-respuesta de cafeína en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ . **(C)** Respuestas de liberación de estroncio inducida por estroncio  
 (SISR) estimulada por KCl (70 mM) en células pre-tratadas con 2 mM de cafeína medidas con CRmutGuvA.  
 También se muestran las fluorescencias individuales (F403 y F470 nm). La sustitución del  $\text{Ca}^{2+}$  por el  $\text{Sr}^{2+}$  en el  
 RE se describió en el apartado de Métodos.

**Figura 5. (A)** Expresión de CRmutGuvA en secciones fijadas de hipocampo de ratón transgénico de la línea L30.  
**(B)** Detalle a mayores aumentos de la expresión de CRmutGuvA en las neuronas piramidales de la región CA1.

(C) Expresión de CRmutGuvA en neuronas de Purkinje del cerebelo de ratones de la línea L30. (D) Efecto de cafeína (20 y 50 mM) en la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  en neuronas DRG dissociadas de ratones neonatos (4 a 6 días) de la línea L11 y mantenidas 6 días *in vitro* y. La línea 11 expresa altos niveles de CRmutGuvA en la espina dorsal. (E) Efecto de la cafeína en secciones frescas de hipocampo (350  $\mu$ m) preparadas de ratones transgénicos de la línea L30 de 2 a 3 semanas. El cociente entre las fluorescencias a 405 y a 470 nm refleja la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ . Se muestra la respuesta a dos estímulos de cafeína 50 mM.

**Figura 6:** Representación esquemática de las distintas construcciones. Las construcciones procariotas se han realizado en el vector de expresión bacteriano pET28a, que contiene 6 histidinas (His) en el extremo N-terminal de la secuencia de GFP-ACU (GuvA). En todos los casos la secuencia de la GFPuv (Guv; SEQ ID NO: 1) se ha separado de la secuencia de la acuorina (ACU; SEQ ID NO: 2) por un péptido enlazante de 16 aminoácidos (TATPATTPTTAPTAGT; SEQ ID NO: 3). mutGuvA denota las mutaciones D117A/D119A/D163A introducidas en la secuencia aminoacídica de la acuorina (SEQ ID NO: 4). Las construcciones eucariotas se realizaron en el plásmido pcDNA3 o bien en el pHSV. En todos los casos se incluyó la secuencia Kozac (kz). Las secuencias de direccionalidad fusionadas al extremo N-terminal de la GFP-ACU incluyen: la secuencia completa de la luciferasa para su retención en el citosol (SEQ ID NO: 34); la secuencia completa de la nucleoplasmina de *Xenopus laevis* para su direccionamiento al núcleo (SEQ ID NO: 32); la secuencia de la cadena pesada de Igy2b humana (SEQ ID NO: 46) o el péptido señal de la calreticulina (CR) (SEQ ID NO: 45), ambos para su retención en el retículo endoplásmico; 81 primeros residuos de la galactosiltransferasa humana (GT) para su importe en el aparato de Golgi (SEQ ID NO: 33); y 25 primeros residuos de la subunidad VIII de la citocromo c oxidasa humana para su importe en la matriz mitocondrial (SEQ ID NO: 42).

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**Método para la detección intracelular de  $Ca^{2+}$  en una muestra

5 Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que la fusión de un dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$  a un dominio polipeptídico fluorescente da lugar a una proteína de fusión en la que propiedades fluorescentes de dicho dominio polipeptídico fluorescente se modifican en respuesta a la unión de calcio a dicho dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$ . Esta modificación de las propiedades fluorescentes del dominio polipeptídico fluorescente en respuesta a la unión de  $Ca^{2+}$  se manifiesta cuando la proteína fluorescente es excitada con una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicha proteína. Esto permite la detección de  $Ca^{2+}$  en una muestra o en el interior de una célula mediante el uso de proteínas de fusión formadas por un dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$  y un dominio polipeptídico fluorescente que son excitadas a la longitud de onda de excitación del dominio polipeptídico fluorescente sin necesidad de introducir en la misma molécula una segunda molécula fluorescente o luminiscente que permita la aparición de fenómenos de CRET o FRET.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un método, en adelante primer método de la invención, para la detección de  $Ca^{2+}$  en una muestra que comprende

- 20 (i) poner en contacto dicha muestra con una proteína de fusión que comprende
- (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$ ,
  - (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y
- en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $Ca^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico y
- 25 (ii) detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo dominio polipeptídico en respuesta a la excitación de la muestra a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico
- en donde la presencia de  $Ca^{2+}$  en la muestra resulta en una variación en la intensidad de la fluorescencia con respecto a la intensidad de la fluorescencia en ausencia de  $Ca^{2+}$ .

30 El término "muestra", según se usa en la presente invención, se refiere a una pequeña parte de un sujeto, representante de la totalidad de un órgano o tejido, y puede estar constituida por una biopsia o cultivo celular de las células que componen la misma. Por tanto, en otra realización particular, la célula o población celular comprende una biopsia o un cultivo celular de las células que componen la misma. Las biopsias son pequeñas piezas de tejido y pueden ser frescas, congeladas o fijadas, como, por ejemplo, en formalina y embebidas en parafina (FFPE). Las biopsias, por ejemplo, se pueden extirpar quirúrgicamente la extracción por hipodérmicas o de otros tipos de agujas, por microdissección o por captura con láser. La muestra debe comprender la proteína de fusión para detectar  $Ca^{2+}$  según el método de la invención.

40 En una primera etapa, el primer método de la invención comprende poner en contacto dicha muestra con una proteína de fusión que comprende

- (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$ ,
- (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y

en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $Ca^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico.

El término "proteína de fusión" o "proteína quimérica", según se usa en la presente invención, se refiere a polipéptidos que comprenden dos o más dominios polipeptídicos que proceden de proteínas distintas o heterólogas.

El término "dominio polipeptídico", "dominio proteico" o "dominio", según se usa en la presente invención, se refiere a una región de la secuencia y estructura de una proteína que es activa funcionalmente y que puede existir independientemente del resto de la cadena proteica. Cada dominio polipeptídico forma una estructura tridimensional compacta y, a menudo, puede adquirir su conformación estable de manera independiente. Debido a que son estables de manera independiente, los dominios pueden ser intercambiados o combinados mediante ingeniería genética para generar proteínas quiméricas. De esta manera, en una proteína de fusión que comprende dos proteínas independientes, dichas proteínas independientes pasan a ser dominios polipeptídicos de la misma.

60 La proteína de fusión de la invención comprende un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$ . Prácticamente cualquier proteína o dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$  puede emplearse. Ejemplos no limitativos de dominios y proteínas de unión a calcio incluyen la mano EF, el pseudodominio de mano EF, los dominios con similitud a la mano EF, y el dominio dockerina, y las proteínas calmodulina, troponina C, calcineurina, proteína homóloga a calcineurina (CHP), albúmina, parvalbúmina, integrin, cadena ligera reguladora de miosina, proteínas S-100, calbindina, calretinina, anexinas, sorcina, calpaína, grancalcina,

calsecuestrina, osteocalcina, osteonectina, sinaptotagmina, proteína de unión a calcio dependiente de vitamina D, espectrina, recoverina, hipocalcina, caltractina, esquidulina, tricohialina, hornerina, la proteína de unión a D-galactosa (GBP), acuorina y apoacuorina, obelina y apo-obelina, mitrocomina, berovina, clitina, y endoglucanasa.

5 El término “apoacuorina”, según se usa en la presente invención, se refiere a una proteína que aparece en la naturaleza en medusas luminiscentes del género *Aequorea* (por ejemplo, *Aequorea victoria*) y de una variedad de otros organismos marinos. La apoacuorina comprende tres dominios funcionales del tipo de mano EF que funcionan como sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . La apoacuorina forma acuorina mediante su unión a una molécula de celenterazina, que es una luciferina que actúa de grupo prostético. Los dos componentes de la acuorina se reconstituyen de manera espontánea, formando la proteína funcional. Mientras que la apoacuorina en ausencia de celenterazina no tiene actividad fluorescente, la unión a iones de  $\text{Ca}^{2+}$  resulta en un cambio conformacional de la proteína que resulta a su vez en la oxidación del grupo prostético celenterazina en celenteramida excitada y  $\text{CO}_2$ . A medida que el celenteramida excitada se relaja a su estado basal, se emite luz azul ( $\lambda = 469 \text{ nm}$ ). En una forma preferida, la apoacuorina comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2. En el contexto de la presente invención, se utilizan los términos apoacuorina y acuorina de manera indistinta.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “variante funcionalmente activa” a toda aquella proteína que resulta de la inserción, delección o sustitución de uno o varios aminoácidos de la secuencia de la apoacuorina y que mantiene sustancialmente la capacidad de unir iones de  $\text{Ca}^{2+}$  de la misma. Variantes funcionalmente activas de apoacuorina según la invención incluyen polipéptidos que muestran una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. Asimismo, las variantes funcionalmente activas según la invención tendrán preferiblemente un capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$  de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de la actividad de la apoacuorina de SEQ ID NO: 2.

Como entenderá el experto en la materia, la localización de la proteína de fusión en el retículo endoplásmico permitirá la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  en el mismo. Debido a que el retículo endoplásmico es el principal reservorio celular de  $\text{Ca}^{2+}$ , será evidente para el experto en la materia la necesidad de utilizar un primer dominio con baja afinidad para  $\text{Ca}^{2+}$  de manera que no interfiera en la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ . Por lo tanto, en una realización preferida, el primer dominio polipeptídico es una variante o fragmento de apoacuorina con baja afinidad para  $\text{Ca}^{2+}$ .

En el contexto de la presente invención, las variantes y que mantienen sustancialmente su actividad tendrán preferiblemente una afinidad relativa a la afinidad de la acuorina de al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. Métodos para determinar la afinidad de dichas variantes o fragmentos de acuorina son bien conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, experimentos de competición utilizando ligandos marcados radiactivamente, resonancia de superficie de plasmón, termoforesis a microescala, calorimetría de titulación isotermal. Asimismo, las variantes o fragmentos de apoacuorina con baja afinidad para  $\text{Ca}^{2+}$  y funcionalmente activas según la invención tendrán preferiblemente una actividad de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de la actividad de la apoacuorina de SEQ ID NO: 2.

En una forma preferida de realización, la variante de apoacuorina que muestra una afinidad para  $\text{Ca}^{2+}$  reducida con respecto a la apoacuorina tiene al menos una mutación seleccionada del grupo de D117A, D119A y D163A. En una forma preferida de realización, la variante de apoacuorina que muestra una afinidad para  $\text{Ca}^{2+}$  reducida contiene las mutaciones D117A, D119A y D163A (SEQ ID NO: 4).

Métodos adecuados para determinar la capacidad de una proteína de unir  $\text{Ca}^{2+}$  incluyen, por ejemplo, el método descrito en el ejemplo 2 de la presente invención, en donde se expresa en una célula una proteína que comprende una variante de apoacuorina y GFPuv y en donde la disminución en la capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$  se detecta mediante una disminución en la razón de fluorescencias 470:403 en respuesta al estímulo de ATP en presencia de 1 mM de calcio externo en relación al descenso de la misma señal obtenido en presencia de EGTA+ TBH.

La proteína de fusión de la invención comprende un segundo dominio polipeptídico fluorescente. El término “dominio polipeptídico fluorescente”, según se usa en la presente invención, se refiere a un polipéptido con capacidad de emitir luz en respuesta a una absorción de luz o de otra radiación electromagnética. Prácticamente cualquier proteína o dominio polipeptídico fluorescente puede emplearse. Ejemplos no limitativos de dominios y proteínas fluorescentes son la proteína verde fluorescente (GFP o wtGFP), variantes de GFP para diferentes longitudes de onda de emisión, intensidad de emisión y/o estabilidad de la proteína tales como la Superfolder

GFP, variantes de EGFP para distintas longitudes de onda de emisión (colores) como la proteína fluorescente azul (EBFP), cyan (ECFP), y amarilla (YFP), GFPuv (caracterizado por presentar las mutaciones F99S, M153T y V163A en la secuencia de GFP; SEQ ID NO: 1), Emerald, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, , mOrange, mKO, YFP, EYFP, mCitrine, Venus, YPet, CyPet, CFP, ECFP, mCFPm, Cerulean, y T-Sapphire. Otros polipéptidos fluorescentes incluyen la proteína roja fluorescente (RFP), DsRed y sus variantes DsRed2, DsRed-Express, RedStar, HcRed1, Kaede, EosFP, y la proteína fluorescente Kindling (KFP).

En una forma particular de realización, el dominio polipeptídico fluorescente es cualquier dominio polipeptídico fluorescente con excepción de EGFP.

En una forma preferida de realización, el dominio polipeptídico fluorescente es GFPuv, que se corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 1, o una variante funcionalmente equivalente del mismo que mantenga dos máximos en su espectro de excitación y al menos un máximo en su espectro de emisión.

El término "GFPuv" (SEQ ID NO: 1), según se usa en la presente invención, se refiere a una variante de la proteína verde fluorescente (GFP) caracterizada por presentar las mutaciones F99S, M153T y V163A con respecto a la secuencia de GFP de *A. victoria* (Número de acceso en GenBank P42212.1 en la versión de 17 de diciembre de 2011). Esta proteína se caracteriza por mostrar una expresión más rápida, por ser 18 veces más brillante que la GFP y por presentar dos máximos de excitación (403 nm y 470 nm) y uno de emisión (510 nm).

El término "GFP", según se usa en la presente invención, se refiere a una proteína compuesta de 238 aminoácidos, con un peso molecular de 26.9 kDa y que presenta fluorescencia verde brillante cuando se expone a la luz azul ultravioleta. A pesar de muchos otros organismos marinos tienen proteínas verdes fluorescentes similares, GFP tradicionalmente se refiere a la primera proteína aislada de la medusa *A. victoria*. La GFP de *A. victoria* tiene un máximo de excitación principal a una longitud de onda de 395 nm y uno menor a 475 nm. Su máximo de emisión es a 509 nm. El rendimiento de fluorescencia cuántica de la GFP es de 0,79. En *A. victoria*, la GFP transduce la quimioluminiscencia azul de la acuorina a luz verde fluorescente mediante una transferencia de energía.

En el contexto de la presente invención, el término "variante de SEQ ID NO: 1 (GFPuv)" o "variante funcionalmente activa de SEQ ID NO: 1 (GFPuv)", se refiere a (i) una variante de SEQ ID NO: 1 (GFPuv) en la que uno o más aminoácidos se han sustituido por aminoácidos conservados o no conservados, y codificados por el código genético o no, o (ii) variantes que comprenden una inserción o una delección de uno o más aminoácidos, en donde dichas variantes (i) y (ii) mantienen dos máximos en su espectro de excitación y al menos un máximo en su espectro de emisión. Por tanto, para identificar variantes funcionalmente activas de GFPuv será evidente para el experto en la materia la necesidad de determinar el espectro de emisión y el espectro de excitación de las mismas. En un experimento típico, el máximo de la longitud de onda de emisión se determina excitando el dominio fluorescente a la longitud de onda correspondiente al máximo de excitación. Se utiliza un monocromador (dispositivo que permite el paso de bandas estrechas de longitud de onda de luz) para analizar la intensidad de emisión de fluorescencia en toda la serie de longitudes de onda de emisión. La intensidad relativa de la fluorescencia se mide a diferentes longitudes de onda para trazar el espectro de emisión. El espectro de excitación se determina de manera similar mediante el control de emisión de fluorescencia a la longitud de onda de máxima intensidad, mientras que el fluoróforo se excita a través de un grupo de longitudes de onda consecutivos. Se escoge la longitud de onda de emisión máxima y sólo se permite el paso de luz emitida en esa longitud de onda hacia el detector. La excitación es inducida (generalmente por medio de un monocromador) a longitudes de onda de excitación diferentes y la intensidad de la fluorescencia emitida se mide en función de la longitud de onda. Como resultado se obtiene un gráfico o curva que representa la intensidad relativa de fluorescencia producida por la excitación de todo el espectro de longitudes de onda de excitación. Ejemplos no limitativos de instrumentos adecuados para la detección de fluorescencia incluyen espectrofluorómetros y lectores de microplacas, microscopios de fluorescencia, escáneres de fluorescencia, incluyendo lectores de microarrays y citómetros de flujo.

En el contexto de la presente invención, se entiende por "actividad de GFPuv" o "actividad de cualquiera de las variantes de GFPuv" a la capacidad de excitarse a al menos dos longitudes de onda correspondientes a aproximadamente los máximos de longitudes de onda de excitación de dichas proteínas, y a la capacidad de emitir luz a una longitud de onda correspondiente a aproximadamente el máximo de longitud de onda de emisión de dichas proteínas. Las variantes funcionalmente activas de GFPuv según la invención tendrán preferiblemente una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. Asimismo, las variantes funcionalmente activas según la invención tendrán preferiblemente una actividad de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de la actividad de la GFPuv de SEQ ID NO: 1.



La proteína de fusión comprende además un péptido flexible que une el primer dominio y el segundo dominio de la misma de manera covalente. El término “péptido flexible”, “péptido espaciador”, “péptido linker” o “péptido conector”, según se usa en la presente invención, se refiere a un péptido que une de manera covalente dichos primer y segundo dominios, que no forma parte ni del primer ni del segundo dominios, permitiendo el movimiento de un dominio con respecto del otro, sin causar sustancialmente un detrimento en la función de uno de los dominios unidos y permitiendo que la proteína de fusión sufra un cambio conformacional que modifique las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico en respuesta a la unión de  $Ca^{2+}$  al primer dominio polipeptídico. En una realización preferida, dicho péptido flexible une los dominios sin causar sustancialmente un detrimento en la función de ninguno de los dos dominios unidos. No es necesario que el primer y segundo dominios estén dispuestos en ese orden y, en este caso, la invención contempla proteínas de fusión en las que el primer dominio está situado en posición amino-terminal con respecto al segundo, y en donde el primer dominio está situado en posición carboxilo-terminal con respecto al segundo.

El péptido flexible comprende al menos un aminoácido, al menos dos aminoácidos, al menos tres aminoácidos, al menos cuatro aminoácidos, al menos cinco aminoácidos, al menos seis aminoácidos, al menos siete aminoácidos, al menos ocho aminoácidos, al menos nueve aminoácidos, al menos 10 aminoácidos, al menos 12 aminoácidos, al menos 14 aminoácidos, al menos 16 aminoácidos, al menos 18 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 25 aminoácidos, al menos 30 aminoácidos, al menos 35 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos, al menos 45 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos.

Péptidos flexibles adecuados para su uso en la presente invención son todos aquellos que han sido descritos con anterioridad como adecuados para unir dos dominios polipeptídicos y que permiten que dichos dominios polipeptídicos conserven sustancialmente su estructura nativa y actividad, tales como los descritos en el documento WO2009150284. En una forma preferida de realización, el péptido enlazador está formado mayoritariamente por restos de glicina, serina y/o prolina. Péptidos enlazadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen péptidos que comprenden las secuencias  $(Gly-Ser)_n$ ,  $(Gly_mSer)_n$  o  $(Ser_mGly)_n$ , en donde  $m$  es 1 a 6, en particular 1 a 4 y típicamente 2 a 4 y  $n$  es 1 a 30 o 1 a 10 y típicamente, 1 a 4 y que, opcionalmente, comprenden algunos restos de glutámico (Glu) o lisina (Lys) repartidos a lo largo de la secuencia para mejorar la solubilidad (véase, por ejemplo, WO 96/06641). Péptidos enlazadores ejemplares incluyen, sin limitación, péptidos que comprenden la secuencia GGSSRSSSSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 5), GSGRSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6), EGSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 7), EGKSSGSGSESKSTQ (SEQ ID NO: 8), EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 9), GSTSGSGKSSEKKG (SEQ ID NO: 10), KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 11) y ESGSVSSEELAFRSLD (SEQ ID NO: 12).

Otros ejemplos no limitativos de péptidos flexibles incluyen los siguientes:

- el péptido de secuencia TATPATTPTTAPTAGT (SEQ ID NO: 3);
- el péptido de secuencia TATPATTPTTAPTAGTTATPATTPTTAPTAGT (SEQ ID NO: 13);
- el péptido de secuencia GTKVHMK (SEQ ID NO: 14) formado por los residuos 53-56 y 57-59 de tetranectina (Nielsen et al., 1997, “Crystal structure of tetranectin, a trimeric plasminogen-binding protein with an alpha-helical coiled coil.” FEBS Lett 412:388-396);
- la hebra conectora 3 de la fibronectina humana (SEQ ID NO: 15), correspondiente a los aminoácidos 1992-2102 (numeración SWISSPROT, entrada P02751);
- la subsecuencia PGTSGQQPSVGQQ (SEQ ID NO: 16) correspondiente al número de aminoácidos 2037-2049 de la fibronectina, y dentro de esa subsecuencia el fragmento GTSGQ (SEQ ID NO: 17) correspondiente a los aminoácidos 2038-2042;
- la secuencia de 10 aminoácidos de la región de la bisagra superior de la IgG3 murina (PKPSTPPGSS, SEQ ID NO: 18);
- el péptido de secuencia APAETKAEPMT (SEQ ID NO: 19);
- el péptido de secuencia GAP;
- el péptido de secuencia SGGSGSGGQ (SEQ ID NO: 20); y
- el péptido de secuencia GGSSRSSS (SEQ ID NO: 21).

En una realización preferida, el péptido flexible es un péptido con secuencia SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 21, o variantes o fragmentos del mismo que mantienen sustancialmente su actividad.

En una realización aún más preferida, el péptido flexible es un péptido con secuencia SEQ ID NO: 3 o variantes o fragmentos del mismo que mantienen sustancialmente su actividad.

En el contexto de esta invención, se entiende por “actividad del péptido flexible” la capacidad de unir covalentemente al primer y segundo dominios de la proteína de fusión, permitiendo el movimiento de un dominio con respecto del otro, sin causar sustancialmente un detrimento en la función de uno o ninguno de los dominios y permitiendo que la proteína de fusión sufra un cambio conformacional que modifique las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico en respuesta a la unión de  $Ca^{2+}$  al primer dominio polipeptídico.

En el contexto de la presente invención, el término “variante del péptido flexible” o “variante del péptido de secuencia SEQ ID NO: 3” se refiere a (i) una variante del péptido de SEQ ID NO: 3 en la que uno o más aminoácidos se han sustituido por aminoácidos conservados o no conservados, y codificados por el código genético o no, o (ii) variantes que comprenden una inserción o una deleción de uno o más aminoácidos, en donde dichas variantes (i) y (ii) mantienen sustancialmente su actividad. Las variantes funcionalmente activas del péptido flexible tendrán preferiblemente una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%.

En el contexto de la presente invención, el término “fragmento del péptido flexible” o “fragmento del péptido de secuencia SEQ ID NO: 3” se refiere a un péptido de secuencia SEQ ID NO: 3 con una deleción de al menos 1 aminoácido, al menos 2 aminoácidos, al menos 3 aminoácidos, al menos 4 aminoácidos, al menos 5 aminoácidos, al menos 6 aminoácidos, al menos 7 aminoácidos, al menos 8 aminoácidos, al menos 9 aminoácidos, al menos 10 aminoácidos, al menos 12 aminoácidos, al menos 14 aminoácidos, al menos 16 aminoácidos del extremo N-terminal o de al menos 1 aminoácido, al menos 2 aminoácidos, al menos 3 aminoácidos, al menos 4 aminoácidos, al menos 5 aminoácidos, al menos 6 aminoácidos, al menos 7 aminoácidos, al menos 8 aminoácidos, al menos 9 aminoácidos, al menos 10 aminoácidos, al menos 12 aminoácidos, al menos 14 aminoácidos, al menos 16 aminoácidos del extremo C-terminal.

El experto en la materia apreciará que la disposición relativa del primer y segundo dominio polipeptídico puede variar siempre que la proteína de fusión mantenga la propiedad de sufrir un cambio en las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico en respuesta a la unión de  $Ca^{2+}$  al primer dominio polipeptídico. Así, en una forma preferida de realización, el extremo C-terminal del primer dominio polipeptídico se encuentra asociado al péptido enlazador que a su vez se encuentra unido al segundo dominio polipeptídico a través del extremo N-terminal de éste. En otra forma preferida de realización, el extremo C-terminal del segundo dominio polipeptídico se encuentra asociado al péptido enlazador que a su vez se encuentra unido al primer dominio polipeptídico a través del extremo N-terminal de éste.

El término “propiedades fluorescentes”, según se usa en la presente invención, se refiere a las características del espectro de excitación y el espectro de emisión del segundo dominio polipeptídico. La fluorescencia es una forma de luminiscencia en la que la emisión de luz por una sustancia que ha absorbido luz o radiación electromagnética de otro tipo. En la mayoría de los casos, la luz emitida tiene una longitud de onda más larga, y por lo tanto, la energía más baja, de la radiación absorbida. Sin embargo, cuando la radiación electromagnética absorbida es intensa, es posible que un electrón pueda absorber dos fotones; esta absorción de dos fotones puede conducir a la emisión de radiación de longitud de onda más corta que la radiación absorbida. La radiación emitida puede ser también de la misma longitud de onda que la radiación absorbida, denominada fluorescencia de resonancia.

Una sustancia, elemento o dominio fluorescente se caracteriza por sus espectros de excitación y de emisión. El término “espectro de emisión” se refiere al rango de longitudes de onda específicas necesarias para excitar una molécula fluorescente para emitir luz. Comúnmente se suele representar en un gráfico la excitancia de fotones del espectro frente a la longitud de onda de la excitación. El término “espectro de emisión” se refiere al rango de longitudes de onda de la radiación electromagnética emitida por los átomos del elemento o las moléculas del compuesto cuando se devuelven a un estado energético más bajo o de reposo. Comúnmente se suele representar en un gráfico de la emisión espectral de potencia radiante (excitancia radiante espectral) o de la irradiancia espectral de fotones emitidos (excitancia fotones del espectro) frente a la longitud de onda.

Métodos para determinar el espectro de emisión y el espectro de excitación de un dominio fluorescente son bien conocidos en el estado de la técnica. En un experimento típico, la longitud de onda de máxima absorción (por lo general el mismo que el máximo de excitación) se determina mediante la excitación usando un monocromador (dispositivo que permite el paso de bandas estrechas de longitud de onda de luz) en toda la serie de longitudes de onda. La intensidad relativa de la fluorescencia se mide a diferentes longitudes de onda para trazar el espectro de emisión. El espectro de excitación se determina de manera similar mediante el control de emisión de fluorescencia a la longitud de onda de máxima intensidad, mientras que el fluoróforo se excita a través de un grupo de longitudes de onda consecutivos. Se escoge la longitud de onda de emisión máxima y sólo se permite el paso de luz emitida en esa longitud de onda hacia el detector. La excitación es inducida (generalmente por medio de un monocromador) a longitudes de onda de excitación diferentes y la intensidad de la fluorescencia emitida se mide en función de la longitud de onda. Como resultado se obtiene un gráfico o curva que representa la intensidad relativa de fluorescencia producida por la excitación de todo el espectro de longitudes de onda de excitación.

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión de acuerdo a la presente invención comprende al menos un péptido de localización que permite dirigir la proteína de fusión a diferentes localizaciones celulares. Esto es potencialmente beneficioso para la detección de  $Ca^{2+}$  en distintos lugares subcelulares de manera específica. Por tanto, en otra realización particular, la proteína de fusión de la invención comprende además un péptido de localización en posición amino-terminal y un péptido de localización en posición carboxilo-terminal.

- El término "péptido de localización", "péptido señal de localización" o "péptido señal", según se usa en la presente invención, se refiere a un péptido corto (3-60 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte de una proteína a un determinado compartimento intracelular. El término "péptido de localización", según se usa en la
- 5 presente invención, se refiere tanto a secuencias que promueven activamente el transporte de una proteína fusionada a dicha secuencia a un determinado compartimento intracelular (en cuyo caso se conocen como péptido señal de localización o "péptido señal) como a una secuencia que impide que una proteína fusionada a ella escape de un determinado compartimento intracelular una vez que dicha proteína se encuentra en dicho compartimento, en cuyo caso se conocen como péptido o señal de retención.
- 10 Los péptidos de localización se pueden encontrar en posición amino o carboxilo-terminal o en el interior de la secuencia de la proteína. En una realización preferida, el péptido de localización está en posición amino-terminal. En otra realización preferida, el péptido de localización está en posición carboxilo-terminal.
- 15 Péptidos de localización adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, péptidos de localización capaces de dirigir una proteína a la membrana de la célula, al núcleo, a la membrana nuclear, a la matriz mitocondrial, a la membrana mitocondrial, al retículo endoplásmico o sarcoplásmico, al citoplasma, al complejo de Golgi, al cloroplasto, al apoplasto o al peroxisoma.
- 20 En una forma preferida de realización, el péptido de localización es un péptido de localización nuclear. Ejemplos ilustrativos de péptido de localización nuclear incluyen PKKKRKV (SEQ ID NO: 22), PQKKIKS (SEQ ID NO: 23), PPKKKRKV (SEQ ID NO: 24), QPKKP (SEQ ID NO: 25), RKKR (SEQ ID NO: 26), RKKRRQRRRAHQ (SEQ ID NO: 27), RQARRNRWRERQR (SEQ ID NO: 28), MPLTRRRPAASQALAPPTP (SEQ ID NO: 29), GAALTILV (SEQ ID NO: 30) y GAALLLG (SEQ ID NO: 31). En una forma de realización aún más preferida, la secuencia de localización nuclear comprende la secuencia de de nucleoplasmina de *Xenopus laevis* (SEQ ID NO: 32).
- 25 En una forma preferida de realización, la secuencia de localización es una secuencia de localización al complejo de Golgi. En una forma de realización más preferida, la secuencia de localización al complejo de Golgi comprende la secuencia de localización en el complejo de Golgi de galactosiltransferasa (SEQ ID NO: 33).
- 30 En una forma preferida de realización, la secuencia de localización es una secuencia de localización al citoplasma. En una forma de realización más preferida, la secuencia de localización al citoplasma es la secuencia de la luciferasa (SEQ ID NO: 34).
- 35 En una forma preferida de realización, el péptido de localización es un péptido que dirige la proteína a la matriz mitocondrial. Secuencias capaces de dirigir una proteína a la mitocondria incluyen, sin limitación, la secuencia RRIVVLHGYGAVKEVLLNHK (SEQ ID NO: 35), la secuencia que comprende los aminoácidos 74-95 del citocromo P450 2E1 (CYP2E1) de rata (SRRIVVLHGYKAVKEVLLNHKN; SEQ ID NO: 36) (Neve and Ingelman-Sundberg, *J. Biol. Chem.* 2001, 276:11317-22), la secuencia del precursor de la citocromo c oxidasa IV de levadura (MLSLRQDIRFFKPATRLC SSR; SEQ ID NO: 37) (Maarse et al., *EMBO J.* 1984, 3:2831-37 y Hurt et al., *FEBS* 1984, 178:306-310); la secuencia de transporte mitocondrial de la proteína PB2 protein de los virus de la gripe (Carr et al., *Virology* 2006, 344:492-508); la secuencia de transporte mitocondrial presente en las hemo
- 40 liasas (Diekert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96:11752-57); la secuencia señal de la enzima de la matriz mitocondrial ornitina transcarbamilasa (OTC) (Horwich et al., *EMBO J.* 1985, 4:1129-35; Hay et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1984, 779:65-87; Fujiwara et al., *Genome Inform. Ser. Workshop, Genome Inform.* 1997, 8:53-60) y el péptido de direccionamiento mitocondrial de la proteína Noxa humana (KLLNLISKLF; SEQ ID NO: 38). En una forma más preferida de realización, la secuencia de localización es una secuencia de localización a la mitocondria comprende la secuencia de localización mitocondrial de la citocromo c oxidasa VIII humana. En otra forma preferida de realización, el péptido de localización mitocondrial comprende la secuencia
- 45 MLFNLRXXLNNAAFRHGHNFVVRNFRCGQPLX (SEQ ID NO: 39).
- 50 En una realización preferida, la proteína de fusión comprende una primera secuencia señal de direccionamiento a la ruta secretora y una segunda señal de retención en el retículo endoplásmico.
- 55 Ejemplos no limitantes de secuencias de direccionamiento a la ruta secretora incluyen las secuencias señal que aparecen en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, secuencias señal de citoquinas o inmunoglobulinas, secuencias señal de la cadena invariante o de las proteínas Lampl, Tapasin, Erp57, Calreticulin, Calnexin. Preferiblemente, la secuencia de direccionamiento a la ruta secretora se selecciona del grupo consistente en:
- 60 -la secuencia MMSFVSLLLVGILFWATEAEQLTKCEVFQ (SEQ ID NO: 40);  
 -el péptido señal de PTH1R humana (H<sub>2</sub>N-MGTARIAPGLALLCCPVLSSAYAL-, SEQ ID NO: 41);  
 -secuencia de localización mitocondrial de la citocromo c oxidasa VIII humana (H<sub>2</sub>N-MSVLTPLLLRLTGSARRLPVPRAK- SEQ ID NO: 42)  
 -el péptido señal de mGluR5 humana (H<sub>2</sub>N-MVLLLILSVLLLKEDVRGSA-, SEQ ID NO: 43);  
 65 -el péptido señal de GABA<sub>B2</sub>R humana (H<sub>2</sub>N- MASPRSSGQPGPPPPPPPPARLLLLLLLPLLLPLAPG-, SEQ ID NO: 44);

-el péptido señal de la calreticulina humana (H<sub>2</sub>N-MLLSVPLLLGLLGLAVA-, SEQ ID NO: 45);  
 -el péptido señal de la cadena pesada de Igy2b humana, (H<sub>2</sub>N-MGWSCILFLVATATGKGLTVAGLRSGHIYG-, SEQ ID NO: 47); y  
 en donde dichas secuencias se encuentran en posición N-terminal en la proteína de fusión.

5 Ejemplos no limitantes de secuencias de retención en el retículo endoplásmico incluyen un péptido de retención en el retículo endoplásmico en posición carboxilo terminal y una secuencia de interacción con BiP.

10 En una realización más preferida, el péptido de retención en el retículo endoplásmico incluyen las secuencias KDEL (SEQ ID NO: 48), DDEL (SEQ ID NO: 49), DEEL (SEQ ID NO: 50), QEDL (SEQ ID NO: 51), RDEL (SEQ ID NO: 52), and GQNLSTSN (SEQ ID NO: 53), en donde dichas secuencias se localizan en posición C-terminal.

15 En una realización más preferida, el péptido de retención en el retículo endoplásmico es una secuencia de interacción con BiP. En una forma de realización aún más preferida, la secuencia de interacción con BiP comprende los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b.

20 En una forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, apoacuorina o una variante de la misma con baja afinidad por Ca<sup>2+</sup>, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3, GFPuv (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 48). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser trasladada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, apoacuorina o una variante de la misma con baja afinidad por Ca<sup>2+</sup>, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3, GFPuv (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 48).

25 En otra forma de preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, apoacuorina o una variante de la misma con baja afinidad por Ca<sup>2+</sup>, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3 y GFPuv (SEQ ID NO: 1). En otra forma de  
 30 realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser trasladada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, apoacuorina o una variante de la misma con baja afinidad por Ca<sup>2+</sup>, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3 y GFPuv (SEQ ID NO: 1).

35 Las proteínas de fusión del primer método de invención pueden contener una o más etiquetas que permitan su detección o purificación. Etiquetas de detección/purificación adecuadas incluyen hexahistidinas (resto de quelato metálico), etiquetas que muestran afinidad por glutatión (glutatión S-transferasa), péptido de unión a calmodulina (CBP), etiqueta de estreptomicina, dominio de unión a celulosa, proteína de unión a maltosa, etiqueta de S-péptido, etiqueta de unión a quitina, epítomos inmunorreactivos, etiquetas de epítopo, E2tag, etiqueta de epítopo HA, epítopo Myc, epítopo FLAG, epítomos AU1 y AU5, epítopo Glu-Glu, epítopo KT3, epítopo IRS, epítopo Btag,  
 40 epítopo de proteína quinasa-C, epítopo de VSV o cualquier otra etiqueta siempre que la etiqueta no afecte a la estabilidad de la proteína. En una forma preferida de realización la etiqueta es una etiqueta de hexahistidina.

45 En una segunda etapa, el primer método de la invención comprende detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo dominio polipeptídico en respuesta a la excitación de la muestra a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico.

50 El experto apreciará que tanto la longitud de onda de excitación que se tiene que usar en la etapa (ii) para excitar la proteína de fusión como la longitud de onda a la que se debe efectuar la detección dependerá de las propiedades del dominio fluorescente que forme parte de la proteína de fusión. Dado que la proteína de fusión se excita a la longitud de onda adecuada para la excitación del dominio fluorescente y que no es necesario que tenga lugar fenómenos de CRET o FRET para detectar el efecto de la unión de Ca<sup>2+</sup> sobre las propiedades fluorescentes del dominio fluorescente, la longitud de onda de excitación que se usa en la etapa (ii) corresponde a una longitud de onda próxima al máximo de excitación del dominio fluorescente. Ejemplos de proteínas fluorescentes que pueden que se pueden usar en el método de la invención y de las longitudes de onda de  
 55 excitación y emisión adecuadas para cada una de ellas se encuentran recogidas en la Tabla 1.

Proteína	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)
GFP	488	507
GFPuv	403/470	509
BFP	383	445
CFP	439	476
YFP	514	527
EBFP2	383	448
mCerulean	334	475

Proteína	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)
mCerulean3	433	475
mVenus	515	528
mTurquoise	435	477
T-Sapphire	399	511
citrine	516	529
amFP486	458	486
zFP506	492	506
zFP538	528	538
drFP	558	583
DsRed	558	583
mCherry	587	610
dTomato	554	581
mTFP1	462	492
TagRFP-T	555	584
mKO2	551	565
mRuby	558	605
mKate	588	635
mAmetrine	406	526
REAcH	515	528

Tabla 1: Proteínas fluorescentes y valores longitud de onda máximos de excitación y emisión.

5 Aunque es preferible usar una longitud de onda correspondiente al máximo de excitación de la proteína fluorescente, la invención contempla la posibilidad de que la etapa (ii) se lleva a cabo usando longitudes de onda distintas a las máximas de excitación de la proteína fluorescente siempre que se consiga suficiente excitación de la proteína fluorescente. Así, la etapa (ii) se lleva a cabo usando una longitud de onda que se encuentra en un intervalo de  $\pm 50$  nm,  $\pm 40$  nm,  $\pm 30$  nm,  $\pm 25$  nm,  $\pm 20$  nm,  $\pm 15$  nm,  $\pm 10$  nm,  $\pm 8$  nm,  $\pm 6$  nm,  $\pm 4$  nm,  $\pm 2$  nm,  $\pm 1$  nm,  $\pm 0,5$  nm,  $\pm 0,1$  nm ó  $\pm 0,01$  nm con respecto al valor máximo de longitud de onda de excitación.

10 Aunque es preferible que la detección en la etapa (ii) se lleve a cabo a una longitud de onda correspondiente al máximo de emisión de la proteína fluorescente, la invención contempla la posibilidad de que la etapa (ii) se lleve a cabo usando longitudes de onda distintas a las máximas de emisión de la proteína fluorescente siempre que se consiga suficiente detección de la emisión fluorescente. Así, la etapa (ii) se lleva a cabo usando una longitud de onda que se encuentra en un intervalo de  $\pm 50$  nm,  $\pm 40$  nm,  $\pm 30$  nm,  $\pm 25$  nm,  $\pm 20$  nm,  $\pm 15$  nm,  $\pm 10$  nm,  $\pm 8$  nm,  $\pm 6$  nm,  $\pm 4$  nm,  $\pm 2$  nm,  $\pm 1$  nm,  $\pm 0,5$  nm,  $\pm 0,1$  nm ó  $\pm 0,01$  nm con respecto al valor máximo de longitud de onda de emisión.

15 En el caso particular de que la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión tenga varios máximos de excitación, la etapa (ii) puede llevarse a cabo usando cualquiera de las longitudes de onda de excitación. En el caso particular de que la proteína fluorescente comprende la secuencia de GFPuv (SEQ ID NO: 1), la longitud o longitudes de onda de excitación se encuentran en el rango entre 373 nm y 433 nm y/o el rango entre 440 nm y 500 nm, y preferiblemente la longitud de onda o longitudes de excitación son aproximadamente de 403 nm y/o 470 nm. Asimismo, la etapa (ii) se lleva a cabo mediante detección a una longitud de onda de emisión que se encuentra en el rango entre 480 nm y 540 nm, y preferiblemente, la longitud de onda de emisión es aproximadamente de 510 nm.

20 La medida de la fluorescencia se puede efectuar por métodos bien conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de instrumentos adecuados para la detección de fluorescencia incluyen espectrofluorómetros y lectores de microplacas, microscopios de fluorescencia, escáneres de fluorescencia, incluyendo lectores de microarrays y citómetros de flujo.

25 Una vez que se ha detectado la fluorescencia emitida por la proteína de fusión en la célula, se puede determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la muestra mediante la detección de una variación en la intensidad de la fluorescencia con respecto a la intensidad de la fluorescencia en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

30 En una forma preferida de realización, cuando la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión tenga varios máximos de excitación, el método de la invención contempla la posibilidad de excitar la muestra a una longitud de onda correspondiente a otro máximo de excitación. La excitación a varias longitudes de onda permite la detección de un número correspondiente de picos de emisión, lo que permite determinar la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra en base al cociente de intensidades emitidas en respuesta a cada una de las longitudes de onda de excitación.

Así, en el caso particular de que la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión sea GFPuv, la etapa (ii) se lleva a cabo mediante excitación de la célula o población celular a una primera longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm y a una segunda longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm. Alternativamente, la primera longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm y la segunda longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm. Preferiblemente, la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm, o bien la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm.

Como entenderá el experto en la materia, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la muestra puede medirse cuantitativamente utilizando este método. Para ello, se realiza una calibración de la señal de emisión obtenida en la etapa (ii) a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Método para la detección intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular

En otro aspecto la presente invención se relaciona con un método, en adelante segundo método de la invención, para la detección intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende

- (i) poner en contacto una célula o población celular que comprende una proteína de fusión que comprende
  - (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,
  - (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente
 en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico y
- (ii) detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo dominio polipeptídico en respuesta a la excitación de la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico

en donde una variación en la intensidad de la fluorescencia emitida por la célula o población celular con respecto a un valor de referencia es indicativo de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.

En una primera etapa, el segundo método de la invención comprende una primera etapa en la que se proporciona una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden una proteína de fusión que comprende

- (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,
- (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y

en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico.

Células adecuadas para llevar a cabo el primer método de la invención, incluyen, sin limitación, células de mamíferos, plantas, insectos, de hongos y de bacterias. Células bacterianas incluyen, sin estar limitado, células de bacterias Gram positivas tales como especies del género *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* y células de bacterias Gram negativas tales como células del género *Escherichia* y *Pseudomonas*. Células de hongos incluyen, preferiblemente, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. Células de insectos incluyen, sin limitación, células de *Drosophila* y células Sf9. Células de plantas incluyen, entre otros, células de plantas de cultivos tales como cereales, plantas medicinales, ornamentales o de bulbos. Células de mamíferos adecuadas para en la presente invención incluyen líneas celulares epiteliales (porcinas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.), células CHO (Chinese Hamster Ovary), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, células ECCs humana NTERA-2, células D3 de la línea de mESCs, células troncales embrionarias humanas tales como HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y HS181, células NIH3T3, 293T, REH y MCF-7 y células hMSCs.

Estas células se han modificado de forma que expresen la proteína de fusión. Para ello, las células se pueden haber modificado genéticamente mediante la introducción de un ácido nucleico que codifique la proteína de fusión. Métodos adecuados para la introducción de material genético en la célula o células incluyen, sin limitación, precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación, sistemas de dispersión coloidal (es decir, complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas a base de lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas). Estos métodos se entienden en la técnica y se describen en la bibliografía publicada de manera que permita a un experto en la técnica realizar estos métodos.

Alternativamente, la célula se puede haber obtenido mediante la introducción directa de la proteína de fusión bien mediante microinyección o bien mediante modificación de la proteína de fusión con una región polipeptídica que

permite la translocación de dicho polipéptido a través de membranas biológicas. Estas secuencias son conocidas de forma genérica como dominios de transducción de proteína (Protein-transducing domains o PTDs). PTDs adecuados para su uso en la presente incluyen, sin limitación, polipéptidos que comprenden la región mínima de la proteína TAT de HIV formada por la secuencia de aminoácidos RKKRRQRR (residuos 49-57 de TAT) (SEQ ID NO: 54), variantes sintéticas de dicha secuencia tales como YARKARRQARR (SEQ ID NO: 55); YARAARRAARR (SEQ ID NO: 56); YARAARRAARA (SEQ ID NO: 57); YARAAARQARA (SEQ ID NO: 58), la proteína VP22 de HSV-1, polipéptidos que comprenden la secuencia RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 59), derivada de la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia, homeodominios derivados de las proteínas Fushi tarazu (Ftz) y Engrailed (En), polilisina, poliarginina (por ejemplo, Arg9), secuencias formadas por lisina y arginina, Transportan, MAP, MTS, o PEP-1.

Las expresiones “dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ”, “péptido enlazador flexible” y “dominio polipeptídico fluorescente” se han descrito en detalle en el contexto del primer método de la invención y se usan de la misma manera en el segundo método de la invención.

En una forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, apoacurina o una variante de la misma con baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3, GFPuv (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 48). En otra forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, apoacurina o una variante de la misma con baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3 y GFPuv (SEQ ID NO: 1).

En una segunda etapa, el segundo método de la invención comprende detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo dominio polipeptídico en respuesta a la excitación de la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico.

El experto apreciará que tanto la longitud de onda de excitación que se tiene que usar en la etapa (ii) para excitar la proteína de fusión como la longitud de onda a la que se debe efectuar la detección dependerá de las propiedades del dominio fluorescente que forme parte de la proteína de fusión. Dado que la proteína de fusión se excita a la longitud de onda adecuada para la excitación del dominio fluorescente y que no es necesario que tenga lugar fenómenos de CRET o FRET para detectar el efecto de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las propiedades fluorescentes del dominio fluorescente, la longitud de onda de excitación que se usa en la etapa (ii) corresponde a una longitud de onda próxima al máximo de excitación del dominio fluorescente. Ejemplos de proteínas fluorescentes que pueden que se pueden usar en el método de la invención y de las longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas para cada una de ellas se encuentran recogidas en la Tabla 1.

Aunque es preferible usar una longitud de onda correspondiente al máximo de excitación de la proteína fluorescente, la invención contempla la posibilidad de que la etapa (ii) se lleva a cabo usando longitudes de onda distintas a las máximas de excitación de la proteína fluorescente siempre que se consiga suficiente excitación de la proteína fluorescente. Así, la etapa (ii) se lleva a cabo usando una longitud de onda que se encuentra en un intervalo de  $\pm 50$  nm,  $\pm 40$  nm,  $\pm 30$  nm,  $\pm 25$  nm,  $\pm 20$  nm,  $\pm 15$  nm,  $\pm 10$  nm,  $\pm 8$  nm,  $\pm 6$  nm,  $\pm 4$  nm,  $\pm 2$  nm,  $\pm 1$  nm,  $\pm 0,5$  nm,  $\pm 0,1$  nm ó  $\pm 0,01$  nm con respecto al valor máximo de longitud de onda de excitación.

Aunque es preferible que la detección en la etapa (ii) se lleve a cabo a una longitud de onda correspondiente al máximo de emisión de la proteína fluorescente, la invención contempla la posibilidad de que la etapa (ii) se lleve a cabo usando longitudes de onda distintas a las máximas de emisión de la proteína fluorescente siempre que se consiga suficiente detección de la emisión fluorescente. Así, la etapa (iii) se lleva a cabo usando una longitud de onda que se encuentra en un intervalo de  $\pm 50$  nm,  $\pm 40$  nm,  $\pm 30$  nm,  $\pm 25$  nm,  $\pm 20$  nm,  $\pm 15$  nm,  $\pm 10$  nm,  $\pm 8$  nm,  $\pm 6$  nm,  $\pm 4$  nm,  $\pm 2$  nm,  $\pm 1$  nm,  $\pm 0,5$  nm,  $\pm 0,1$  nm ó  $\pm 0,01$  nm con respecto al valor máximo de longitud de onda de emisión.

En el caso particular de que la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión tenga varios máximos de excitación, la etapa (ii) puede llevarse a cabo usando cualquiera de las longitudes de onda de excitación. En el caso particular de que la proteína fluorescente comprende la secuencia de GFPuv (SEQ ID NO: 1), la longitud o longitudes de onda de excitación se encuentran en el rango entre 373 nm y 433 nm y/o el rango entre 440 nm y 500 nm, y preferiblemente la longitud de onda o longitudes de excitación son aproximadamente de 403 nm y/o 470 nm. Asimismo, la etapa (ii) se lleva a cabo mediante detección a una longitud de onda de emisión que se encuentra en el rango entre 480 nm y 540 nm, y preferiblemente, la longitud de onda de emisión es aproximadamente de 510 nm.

La medida de la fluorescencia se puede efectuar por métodos bien conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de instrumentos adecuados para la detección de fluorescencia incluyen espectrofluorómetros y lectores de microplacas, microscopios de fluorescencia, escáneres de fluorescencia, incluyendo lectores de microarrays y citómetros de flujo.

Una vez que se ha detectado la fluorescencia emitida por la proteína de fusión en la célula, se puede determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular mediante comparación con una señal de referencia.

En una forma preferida de realización, cuando la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión tenga varios máximos de excitación, el método de la invención contempla la posibilidad de excitar la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a otro máximo de excitación. La excitación a varias longitudes de onda permite la detección de un número correspondiente de picos de emisión, lo que permite determinar la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra en base al cociente de intensidades emitidas en respuesta a cada una de las longitudes de onda de excitación.

Así, en el caso particular de que la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión sea GFPuv, la etapa (ii) se lleva a cabo mediante excitación de la célula o población celular a una primera longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm y a una segunda longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm. Alternativamente, la primera longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm y la segunda longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm. Preferiblemente, la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm, o bien la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm.

Como entenderá el experto en la materia, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende la proteína de fusión puede medirse cuantitativamente utilizando este método. Para ello, se realiza una calibración de la señal de emisión obtenida en la etapa (iii) a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ejemplo, se puede calibrar una célula o población celular que comprenda la proteína de fusión permeabilizando primero la membrana celular e incubando a continuación la célula o población celular en un medio externo que contiene diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Las diferentes señales de emisión de fluorescencia obtenidas se corresponden con las diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. La permeabilización de la membrana se puede llevar a cabo mediante incubación en medios de cultivo de permeabilización bien conocidos en la técnica. Un ejemplo no limitativo de medios de cultivo de permeabilización celular es un medio del cual hayan sido previamente eliminados los cationes divalentes contaminantes, que contiene 60  $\mu\text{M}$  digitonina, 10  $\mu\text{M}$  nigericina, 20  $\mu\text{M}$  monensina, 10  $\mu\text{M}$  4-BrA23187, 1  $\mu\text{M}$  gramicidina y 2  $\mu\text{M}$  CCCP. Los medios de cultivo que contienen diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la adición de diferentes combinaciones de 0.43 M HEEDTA y 0.1M  $\text{CaCl}_2$ , de manera que las concentraciones finales de  $\text{Ca}^{2+}$  libre estén entre 1 y 100  $\mu\text{M}$ . Una vez calibrada la célula o población celular que comprende la proteína de fusión, la aplicación del primer método de la invención permitirá correlacionar la señal de emisión obtenida en la etapa (ii) con una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre.

Como entenderá el experto en la materia, la célula o población celular del método puede ser una muestra tomada de un animal, preferiblemente un mamífero. El término "muestra", según se usa en la presente invención, se refiere a una pequeña parte de un sujeto, representante de la totalidad de un órgano o tejido, y puede estar constituida por una biopsia o cultivo celular de las células que componen la misma. Por tanto, en otra realización particular, la célula o población celular comprende una biopsia o un cultivo celular de las células que componen la misma. Las biopsias son pequeñas piezas de tejido y pueden ser frescas, congeladas o fijadas, como, por ejemplo, en formalina y embebidas en parafina (FFPE). Las biopsias, por ejemplo, se pueden extirpar quirúrgicamente la extracción por hipodérmicas o de otros tipos de agujas, por microdissección o por captura con láser. La muestra debe comprender la proteína de fusión para detectar  $\text{Ca}^{2+}$  según el método de la invención.

En otra realización particular, la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza *in vitro* o *ex vivo*.

En otra realización particular, las células o población celular expresan la proteína de fusión en un compartimento intracelular u orgánulo específico y la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza en dicho compartimento intracelular u orgánulo específico. Las particularidades del péptido de localización han sido analizadas previamente en relación con la proteína de fusión de la invención. En una realización preferida, la proteína de fusión se localiza en un compartimento seleccionado del grupo formado por el retículo endoplásmico o sarcoplásmico, el núcleo, el aparato de Golgi y la mitocondria.

El experto en la materia entenderá que el primer método de la invención posibilita la detección simultánea de  $\text{Ca}^{2+}$  en dos o más localizaciones intracelulares diferentes. Para ello, se pueden utilizar células o poblaciones celulares que además comprendan un segundo sensor de calcio. Dicho segundo sensor de calcio debe estar dirigido, mediante un péptido señal de localización, a un compartimento intracelular u orgánulo diferente al cual está dirigida la proteína de fusión. Ejemplos no limitativos de sensores de calcio apropiados incluyen Fura-2 y sensores del tipo camaleón y derivados del mismo. De manera preferida, el segundo sensor de calcio es Fura-2.

La "señal de referencia" o "valor de referencia" se refiere a la señal de emisión obtenida en la etapa (ii) tras la aplicación del primer método de la invención sobre una célula o población celular que comprende la proteína de fusión y que se encuentra en estado basal o en un medio sustancialmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . Una vez que se ha



establecido el valor o señal de referencia, el valor de la señal de emisión obtenido en la etapa (ii) puede compararse con este valor de referencia, permitiendo, por tanto, la detección de alteraciones en los niveles respecto al valor de referencia. Dependiendo de la combinación del primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$  y del segundo dominio polipeptídico fluorescente, la unión de calcio al dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$  puede resultar en un aumento o en una disminución de la intensidad de fluorescencia emitida por el segundo dominio polipeptídico fluorescente.

Método para la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método, en adelante “tercer método de la invención”, para la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular a lo largo del tiempo, que comprende

- (i) proporcionar una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden una proteína de fusión que comprende
  - (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,
  - (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y
 en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico,
- (ii) determinar a un primer tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico y
- (iii) determinar a un segundo tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico en donde una variación en la intensidad de la señal emitida en (iii) con respecto a la intensidad de la señal emitida en (ii) es indicativo de una variación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular entre dicho primer tiempo y dicho segundo tiempo.

En una primera etapa, el tercer método de la invención comprende proporcionar una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden una proteína de fusión que comprende
 

- (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,
- (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y

 en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico,

Las expresiones “dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ”, “péptido enlazador flexible”, “dominio polipeptídico fluorescente”, “longitud de onda de excitación”, “longitud de onda de emisión” se han descrito en detalle en el contexto del primer método de la invención y se usan de la misma manera en el tercer método de la invención.

En una forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, apoacurina o una variante de la misma con baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3, GFPuv (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 48). En otra forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, apoacurina o una variante de la misma con baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3 y GFPuv (SEQ ID NO: 1).

En una segunda etapa, el tercer método de la invención comprende determinar a un primer tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico.

En una tercera etapa, el tercer método de la invención comprende determinar a un segundo tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico.

Una vez determinada la intensidad de fluorescencia a dichos primer y segundo tiempo, se determina la existencia de una variación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular entre dicho primer tiempo y dicho segundo tiempo cuando se observa una variación detectable en la intensidad de la señal emitida en la etapa (iii) con respecto a la intensidad de la señal emitida en la etapa (ii).

El término “alteración en la intensidad de la señal emitida”, según se usa en la presente invención, se refiere a una variación en la intensidad de la fluorescencia emitida por el segundo dominio fluorescente de la proteína de fusión. Dicha variación en la intensidad se detecta como una variación en las unidades de fluorescencia a un segundo tiempo con respecto del primer tiempo. Puesto que la intensidad de fluorescencia emitida está relacionada con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, resultará evidente para el experto en la materia que las variaciones en la intensidad de fluorescencia se correlacionan con variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Se entiende por variación en la intensidad de la señal un cambio de al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 100% o más en la intensidad de emisión en el segundo tiempo con respecto al primer tiempo. Dependiendo de la combinación de dominio de unión a calcio y de dominio fluorescente que se use en la proteína de fusión, el cambio en la concentración de calcio intracelular puede dar lugar a una variación en la fluorescencia en el mismo sentido (un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resulta en un aumento en la fluorescencia y una disminución en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resulta en una disminución en la fluorescencia) o en sentido opuesto (un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resulta en una disminución en la fluorescencia y una disminución en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resulta en un aumento en la fluorescencia).

La detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular en diferentes tiempos consecutivos permitirá la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a tiempo real.

El experto apreciará que tanto longitud de onda de excitación que se tiene que usar en las etapas (ii) y (iii) para excitar la proteína de fusión como la longitud de onda a la que se debe efectuar la detección de la fluorescencia en ambas etapas dependerá de las propiedades del dominio fluorescente que forme parte de la proteína de fusión. Dado que la proteína de fusión se excita a la longitud de onda adecuada para la excitación del dominio fluorescente y que no es necesario que tenga lugar fenómenos de CRET o FRET para detectar el efecto de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las propiedades fluorescentes del dominio fluorescente, la longitud de onda de excitación que se usa en la etapa (ii) corresponde a una longitud de onda próxima al máximo de excitación del dominio fluorescente. Ejemplos de proteínas fluorescentes que pueden que se pueden usar en el método de la invención y de las longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas para cada una de ellas se encuentran recogidas en la Tabla 1.

En el caso particular de que la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión tenga varios máximos de excitación, las etapas (ii) y (iii) pueden llevarse a cabo usando cualquiera de las longitudes de onda de excitación. En el caso particular de que la proteína fluorescente comprende la secuencia de GFPuv, la longitud o longitudes de onda de excitación se encuentran en el rango entre 373 nm y 433 nm y/o el rango entre 440 nm y 500 nm, y preferiblemente la longitud de onda o longitudes de excitación son aproximadamente de 403 nm y/o 470 nm. Asimismo, las etapas (ii) y (iii) se llevan a cabo mediante detección a una longitud de onda de emisión que se encuentra en el rango entre 480 nm y 540 nm, y preferiblemente, la longitud de onda de emisión es aproximadamente de 510 nm.

La medida de la fluorescencia se puede efectuar por métodos bien conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de instrumentos adecuados para la detección de fluorescencia incluyen espectrofluorómetros y lectores de microplacas, microscopios de fluorescencia, escáneres de fluorescencia, incluyendo lectores de microarrays y citómetros de flujo.

En una forma preferida de realización, cuando la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión tenga varios máximos de excitación, el método de la invención contempla la posibilidad de excitar la célula o población celular en las etapas (ii) y (iii) a varias longitudes de onda correspondientes a los máximos de excitación. La excitación a varias longitudes de onda permite la detección de un número correspondiente de picos de emisión, lo que permite determinar la variación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en célula o población celular en base al cociente de intensidades emitidas en respuesta a cada una de las longitudes de onda de excitación. Así, se considera que existe un cambio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en célula o población celular cuando se observa una variación en el cociente de intensidades de fluorescencia en respuesta a la excitación a la primera longitud de onda y la segunda longitud de onda de al menos un 10%, un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 80%, un 90%, un 100%, o de al menos 2 veces, 4 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o más.

Así, en el caso particular de que la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión sea GFPuv, la etapa (ii) se lleva a cabo mediante excitación de la célula o población celular a una primera longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm y a una segunda longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm. Alternativamente, la primera longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm y la segunda longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm. Preferiblemente, la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm, o bien la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm. Se considera que existe un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$

cuando el cociente entre la intensidad de emisión a 470 nm y la intensidad de emisión a 403 nm aumenta significativamente, dado los cambios recíprocos que muestra la fluorescencia de GFPuv a 403 nm y 407 en respuesta a cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el rango de concentraciones fisiológicas. La expresión aumenta significativamente, según se usa en la presente invención, se refiere a aumentos de al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más.

#### 10 Método de identificación de un compuesto con capacidad de modulación de la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ en una célula o población celular

La posibilidad de determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular usando el sensor de la invención permite llevar a cabo determinaciones dinámicas de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula en presencia de compuestos cuyo efecto sobre la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  se desea estudiar. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método de identificación de compuestos con capacidad de modulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular, en adelante "cuarto método de la invención", que comprende

- 20 (i) poner en contacto un compuesto candidato con una célula o población celular en donde dicha célula o población celular comprende una proteína de fusión que comprende
- 25 i. un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,
  - ii. un segundo dominio polipeptídico fluorescente y en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico
- 30 y
- (ii) determinar la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico, en donde una alteración en la intensidad de fluorescencia determinada en la etapa (ii) con respecto a la intensidad de fluorescencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

35 En una primera etapa, se pone en contacto un compuesto candidato con una célula o población celular que comprende

- (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,
- (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y

40 en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico. Esta célula o población celular se pone en contacto con un compuesto cuya capacidad de modulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se quiere determinar.

45 Las expresiones "dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ", "péptido enlazador flexible", "dominio polipeptídico fluorescente", "longitud de onda de excitación", "longitud de onda de emisión" se han descrito en detalle en el contexto del primer método de la invención y se usan de la misma manera en el cuarto método de la invención.

50 En una realización preferida, el primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$  es apoacurina (SEQ ID NO: 2) o una variante funcionalmente activa de la misma. La expresión "variante funcionalmente de apoacurina" se ha descrito en detalle en el contexto de las proteínas de fusión de la invención y se usan de la misma manera en los métodos de la invención. En una forma preferida de realización, variante de apoacurina muestra una afinidad para  $\text{Ca}^{2+}$  reducida con respecto a la apoacurina. En una forma de realización aún más preferida, la apoacurina tiene al menos una mutación seleccionada del grupo de D117A, D119A y D163A.

55 En una forma preferida de realización, el dominio polipeptídico fluorescente es GFPuv o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

60 En una forma preferida de realización, el péptido flexible comprende la secuencia TATPATTPTTAGT (SEQ ID NO: 3).

65 En una forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, apoacurina o una variante de la misma con baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3, GFPuv (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 48). En otra forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1

de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, apoacurina o una variante de la misma con baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3 y GFPuv (SEQ ID NO: 1).

5 Por "poner en contacto" una célula con el compuesto candidato se incluye, según la presente invención, cualquier posible forma de llevar el compuesto candidato hasta el interior de la célula que expresa la construcción de ADN. Así, en caso de que el compuesto candidato sea una molécula de bajo peso molecular, es suficiente con añadir dicha molécula al medio de cultivo. En caso de que el compuesto candidato sea una molécula de alto peso molecular (por ejemplo, polímeros biológicos tales como un ácido nucleico o una proteína), es necesario aportar los medios para que esa molécula pueda acceder al interior celular. En caso de que la molécula candidata sea un ácido nucleico, pueden usarse métodos convencionales para transfección, según se ha descrito anteriormente para la introducción de la construcción de ADN. En caso de que el compuesto candidato sea una proteína, la célula puede ponerse en contacto tanto con la proteína directamente como con el ácido nucleico que la codifica acoplado a elementos que permitan su transcripción /traducción una vez que se encuentren en el interior celular. Para ello, se pueden usar cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para permitir su entrada al interior celular. Alternativamente, es posible poner en contacto la célula con una variante de la proteína que se desea estudiar que ha sido modificada con un péptido que sea capaz de promover la translocación de la proteína al interior celular, tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex y oligómeros de arginina (Lindgren, A. et al., 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:99-103, Schwarze, S.R. et al., 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, *Mol. Therapy* 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, *Pharm. Res.* 21:389-393).

25 Compuestos adecuados para ser ensayados de acuerdo al tercer método de la invención incluyen, sin limitación, a cualquier biblioteca de fármacos (*small molecules*) derivados de fuentes naturales y sintéticas, molécula orgánica pequeña (excluyendo péptidos y ácidos nucleicos), molécula inorgánica pequeña, péptido, peptoide, peptidomimético, polipéptido (por ejemplo, neurotransmisor, receptor), oligonucleótido (por ejemplo, siARN, ARN antisentido, aptámero), gas y similares.

30 El compuesto que va someterse a ensayo preferiblemente no está aislado sino que forma parte de una mezcla más o menos compleja derivada de una fuente natural o que forma parte de una biblioteca de compuestos. Ejemplos de bibliotecas de compuestos que pueden someterse a ensayo según el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos que incluyen tanto péptidos como análogos de péptidos que comprenden D-aminoácidos o péptidos que comprenden enlaces no peptídicos, bibliotecas de ácidos nucleicos que incluyen ácidos nucleicos con enlaces de tipo fosfotioato no fosfodiéster o ácidos peptidonucleicos, bibliotecas de anticuerpos, de hidratos de carbono, de compuestos con un bajo peso molecular, preferiblemente moléculas orgánicas, de peptidomiméticos y similares. En el caso de que se use una biblioteca de compuestos orgánicos con un bajo peso molecular, la biblioteca puede haberse preseleccionado de modo que contenga compuestos que pueden administrarse fácilmente en la proximidad de las áreas que experimentan degeneración. Los compuestos pueden seleccionarse así basándose en ciertos parámetros tales como el tamaño, la lipofiliidad, la hidrofiliidad o la capacidad para formar enlaces de hidrógeno. Los compuestos que van a someterse a ensayo pueden formar parte alternativamente de un extracto obtenido de una fuente natural. La fuente natural puede ser una fuente animal, vegetal obtenida de cualquier medio, incluyendo, pero sin limitarse a extractos de organismos de tierra, de aire, marinos y similares.

45 La puesta en contacto se lleva a cabo de forma que el compuesto pueda acceder al interior celular. En el caso de que se desee identificar compuestos que sean capaces de modular de forma específica la de  $\text{Ca}^{2+}$  en un determinado compartimento intracelular, la etapa (i) de puesta en contacto del compuesto candidato con la célula o población celular se lleva a cabo usando células o una población celular en la que la proteína de fusión se exprese en dicho compartimento intracelular y en condiciones adecuadas para que dicho compuesto pueda acceder a dicho compartimento.

55 En una segunda etapa, se determina la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico, en donde una alteración en la intensidad de fluorescencia con respecto a la intensidad de fluorescencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### Método para la detección de $\text{Ca}^{2+}$ en un animal no humano transgénico

60 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  en un animal (en adelante, quinto método de la invención) que comprende

- (i) proporcionar un animal no humano transgénico no humano transgénico que comprende un polinucleótido que permite la expresión en dicho animal de una proteína de fusión que comprende
- 65 (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,  
(b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y

en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico,

y

- 5 (ii) determinar de forma no invasiva la emisión fluorescente en dicho animal.

En una primera etapa, el quinto método de la invención comprende proporcionar un animal no humano transgénico que comprende un polinucleótido que permite la expresión en dicho animal de una proteína de fusión que comprende

- 10 (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,  
 (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y

en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico.

15 Las expresiones “dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ”, “péptido enlazador flexible”, “dominio polipeptídico fluorescente”, “longitud de onda de excitación”, “longitud de onda de emisión” se han descrito en detalle en el contexto del primer método de la invención y se usan de la misma manera en el quinto método de la invención.

20 En una realización preferida, el primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$  es apoacurina (SEQ ID NO: 2) o una variante funcionalmente activa de la misma. La expresión “variante funcionalmente activa de apoacurina” se ha descrito en detalle en el contexto de las proteínas de fusión de la invención y se usan de la misma manera en los métodos de la invención. En una forma preferida de realización, variante de apoacurina muestra una afinidad para  $\text{Ca}^{2+}$  reducida con respecto a la apoacurina. En una forma de realización aún más preferida, la apoacurina tiene al menos una mutación seleccionada del grupo de D117A, D119A y D163A.

25 En una forma preferida de realización, el dominio polipeptídico fluorescente es GFPuv o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

30 En una forma preferida de realización, el péptido flexible comprende la secuencia TATPATTPTTAPTAGT (SEQ ID NO: 3).

35 Adicionalmente, el polinucleótido que permite la expresión en dicho animal de la proteína de fusión comprende secuencias de localización que permitan la localización del péptido en un compartimento subcelular de interés. Secuencias de localización adecuadas para su uso en el presente método han sido descritas en detalle en el contexto de las proteínas de fusión de la invención. Así, péptidos de localización adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, péptidos de localización capaces de dirigir una proteína a la membrana de la célula, al núcleo, a la membrana nuclear, a la matriz mitocondrial, a la membrana mitocondrial, al retículo endoplásmico o sarcoplásmico, al citoplasma, al complejo de Golgi, al cloroplasto, al apoplasto o al peroxisoma. En una forma preferida de realización,

40 Péptidos de localización adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, péptidos de localización capaces de dirigir una proteína a la membrana de la célula, al núcleo, a la membrana nuclear, a la matriz mitocondrial, a la membrana mitocondrial, al retículo endoplásmico o sarcoplásmico, al citoplasma, al complejo de Golgi, al cloroplasto, al apoplasto o al peroxisoma.

45 En una forma preferida de realización, el animal transgénico contiene un polinucleótido que permite la expresión en dicho animal de una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, apoacurina o una variante de la misma con baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3, GFPuv (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 48). En otra forma preferida de realización, el animal transgénico contiene un polinucleótido que permite la expresión en dicho animal de una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, apoacurina o una variante de la misma con baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3 y GFPuv (SEQ ID NO: 1).

50 Preferiblemente, el polinucleótido que permite la expresión en dicho animal de la proteína de fusión se encuentra bajo el control operativo de secuencias reguladoras de la expresión que permiten la expresión de la proteína de fusión en un órgano de interés. Este tipo de secuencias reguladoras incluyen promotores constitutivos que permiten la expresión de forma ubicua en el animal transgénico, tales como el promotor de citomegalovirus humano (hCMV), el promotor de SV40, el promotor para EF1-alfa, el promotor de  $\beta$ -actina y el promotor de ubiquitina C. Alternativamente, la invención contempla el uso de elementos reguladores de la expresión que permiten la expresión de forma específica en un tipo celular o tejido tales como el promotor de albúmina, que es específico de hígado [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], promotores linfoides específicos [Calame et al.; (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]; en particular promotores de los receptores de células T [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji et al. (1983) Cell 33729-740], promotores específicos de

neuronas tal como el promotor de neurofilamentos [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477], promotores específicos de páncreas [Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916] o promotores específicos de glándula mamaria tal como el promotor de suero de leche (patente de EE UU No. 4.873.316 y publicación de solicitud europea No. 264.166). En una realización aún más preferida, el promotor es el promotor de actina. En una forma más preferida de realización, el promotor comprende el aumentador transcripcional de CMV y el promotor de actina. En una forma de realización aún más preferida, el promotor comprende el aumentador transcripcional de CMV, el promotor de actina y el intrón del gen de globina (promotor CAG-GS).

En otra realización particular, el promotor permite la expresión de la proteína de fusión en un tejido seleccionado de grupo que comprende tejido muscular liso, tejido muscular estriado o esquelético, tejido muscular cardíaco, tejido nervioso (incluyendo neuronas y neuroglía), tejido epitelial (incluyendo epitelio de revestimiento, glandular y sensorial), tejido adiposo, tejido cartilaginoso, tejido óseo, tejido hematopoyético, tejido sanguíneo, y tejido conjuntivo. En una realización preferida, el tejido es tejido nervioso.

En una segunda etapa, el quinto método de la invención comprende determinar de forma no invasiva la emisión fluorescente en dicho animal.

#### Método de identificación de compuestos con capacidad de modulación de la concentración de $Ca^{2+}$ en un animal no humano.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para de identificación de compuestos con capacidad de modulación de la concentración de  $Ca^{2+}$  en un animal no humano (en adelante sexto método de la invención) que comprende las etapas de

(i) poner en contacto un compuesto candidato con un animal no humano transgénico que comprende in polinucleótido que permite la expresión en dicho animal de una proteína de fusión que comprende

i. un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$ ,

ii. un segundo dominio polipeptídico fluorescente y

en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $Ca^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico,

(ii) determinar de forma no invasiva la fluorescencia emitida por el animal transgénico en respuesta a una excitación a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico,

en donde una alteración en la intensidad de fluorescencia determinada en la etapa (ii) con respecto a la intensidad de fluorescencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $Ca^{2+}$ .

En una primera etapa, el sexto método de la invención comprende poner en contacto un compuesto candidato con un animal no humano transgénico que comprende in polinucleótido que permite la expresión en dicho animal de una proteína de fusión que comprende

i. un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$ ,

ii. un segundo dominio polipeptídico fluorescente y

en donde dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible y en donde la unión de  $Ca^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico.

Las expresiones “dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$ ”, “péptido enlazador flexible” y “dominio polipeptídico fluorescente” se han descrito en detalle en el contexto del primer método de la invención y se usan de la misma manera en el sexto método de la invención.

En una forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, apoacurina o una variante de la misma con baja afinidad por  $Ca^{2+}$ , el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3, GFPuv (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 48). En otra forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, apoacurina o una variante de la misma con baja afinidad por  $Ca^{2+}$ , el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 3 y GFPuv (SEQ ID NO: 1).

En una segunda etapa, el sexto método de la invención comprende determinar de forma no invasiva la fluorescencia emitida por el animal transgénico en respuesta a una excitación a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico.

En una forma preferida de realización, el animal no humano transgénico es un mamífero. En una forma de realización más preferida, el animal no humano transgénico es un roedor. En una forma de realización aún más preferida, el roedor es un ratón.

5 En una forma preferida de realización, cuando la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión tenga varios máximos de excitación, el método de la invención contempla la posibilidad de excitar la célula o población celular en la etapa (ii) a varias longitudes de onda correspondientes a los máximos de excitación. La excitación a varias longitudes de onda permite la detección de un número correspondiente de picos de emisión, lo que permite determinar la variación en la concentración de  $Ca^{2+}$  en célula o población celular en base al cociente de intensidades emitidas en respuesta a cada una de las longitudes de onda de excitación. Así, se considera que existe un cambio en la concentración de  $Ca^{2+}$  en célula o población celular cuando se observa una variación en el cociente de intensidades de fluorescencia en respuesta a la excitación a la primera longitud de onda y la segunda longitud de onda de al menos un 10%, un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 80%, un 90%, un 100%, o de al menos 2 veces, 4 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o más.

Así, en el caso particular de que la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión sea GFPuv, la etapa (ii) se lleva a cabo mediante excitación de la célula o población celular a una primera longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm y a una segunda longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm. Alternativamente, la primera longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm y la segunda longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm. Preferiblemente, la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm, o bien la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm. Se considera que existe un aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  cuando el cociente entre la intensidad de emisión a 470 nm y la intensidad de emisión a 403 nm aumenta significativamente, dado los cambios recíprocos que muestra la fluorescencia de GFPuv a 403 nm y 407 en respuesta a cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  en el rango de concentraciones fisiológicas. La expresión aumenta significativamente, según se usa en la presente invención, se refiere a aumentos de al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más.

35

\*\*\*

La invención se describe en detalle a continuación por medio de los siguientes ejemplos, que han de interpretarse como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

## 40 EJEMPLOS

### Métodos

#### Construcción génica

45 La apoacurina tipo salvaje se amplificó por PCR usando los siguientes oligonucleótidos: sentido 5'-TTGGTACCGGTAACTTACATCAGACTTC-3' (el sitio KpnI está subrayado) (SEQ ID NO: 60) elimina la primera Met; antisentido 5'-CCGAATTCTTAGGGACAGCTCCACCG-3' (el sitio EcoRI está subrayado) (SEQ ID NO: 61) que incluye un sitio EcoRI tras el codón Stop. El producto se digirió con KpnI y EcoRI, y posteriormente se clonó unidireccionalmente en un vector pcDNA3 previamente cortado con los mismos enzimas. A continuación el fragmento GFPuv se amplificó por PCR a partir del vector pBAD-GFPuv usando los siguientes cebadores: 50 sentido 5'-CCAAAGCTTGCCACCATGGCTAGCAAAGGA-3' (el sitio HindIII está subrayado) (SEQ ID NO: 62) y antisentido 5'-TTGGTACCGGTTTGTAGAGCTCAT-3' (el sitio KpnI está subrayado) (SEQ ID NO: 63) en el que se eliminó el codón final Stop y se fusionó en fase con la apoacurina en el sitio KpnI. Por último, en el sitio KpnI situado entre la GFP y la acurina, se insertó el fragmento bicatenario formado por hibridación de los oligonucleótidos siguientes: 55 5'-AGCGACCCAGCAACCACGCCGACCACTGCACCGACCGGGTAC-3' (SEQ ID NO: 64) y 5'-CCGCGGTGCGGTGCAGTGGTTCGGCGTGGTTGCTGGGGTTCGCTGTAC-3' (SEQ ID NO: 65) que codifican para el linker TATPATTPTTAPTAGT (SEQ ID NO: 3). Todas las mutaciones se introdujeron en GuvA por mutagénesis dirigida usando el kit QuickChange Site-directed mutagenesis kit (Stratagene).

60 La expresión de GuvA bacteriana (tanto la versión tipo salvaje como las mutadas) se llevó a cabo a partir del vector de expresión bacteriano pET28A, en cuyo sitio EcoRI se clonó en fase la GuvA amplificada por PCR. Para su direccionamiento al núcleo y al citosol, los fragmentos HindIII-HindIII de la nucleoplasmína de *Xenopus* y de la luciferasa se aislaron a partir de los plásmidos pHSVnuGA o pHSVcytGA, respectivamente, y se fusionaron en fase en el extremo 5' de la GuvA (Chamero, Manjarres et al. 2008). El direccionamiento al RE se consiguió con dos plásmidos: 1) fusión de GuvA al gen de la cadena pesada de la Igy2b (Montero, Brini et al. 1995); y 2) añadiendo el péptido señal de la calreticulina al extremo 5', así como la secuencia KDEL (SEQ ID NO: 48) de

65

retención en el RE al extremo 3' (Kendall, Dormer et al. 1992). La integridad de todas las construcciones se verificó por secuenciación.

#### Purificación proteica

5 El plásmido pET28A GuvA se transformó en la cepa bacteriana *Escherichia coli* BL21 (Stratagene). Para la expresión proteica se crecieron las bacterias en LB con 40 mg/litro kanamicina a 37° hasta que la absorbancia a 600 nm alcanzó un valor superior a 0.6. En ese momento se indujo la expresión génica mediante la adición de 0.5 mM isopropil-β-D-tiogalactósido durante 6h a 25°. Las bacterias se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en 50 mM Tris pH 8.8, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 2 mM DTT, y seguidamente se soncó durante 2 minutos. El lisado bacteriano se centrifugó a 30,000 x g durante 15 minutos. La mayor parte de la proteína se encuentra en forma insoluble en los cuerpos bacterianos de inclusión y debe solubilizarse en 50 mM Tris, pH 8.8, 8M urea, 5 mM DTT por agitación por balanceo a 4° durante la noche. La proteína remanente insoluble se eliminó por centrifugación a 30,000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se sometió a diálisis durante 8h frente a un tampón de 50mM Tris, pH 8.8 con 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Por último, se añadieron 10 mM EDTA y 5 mM DTT. La proteína se purificó en una resina de NiNTA.

#### Titulación de la proteína in vitro

Se prepararon una serie de tampones con pH desde 6 a 8.5 mezclando 1M MOPS ácido con 1 M Tris-base. Las trazas de calcio contaminante se eliminaron pasando los tampones a través de una columna de tipo Chelex. Las titulaciones de pH se llevaron a cabo en una solución de tampón de 20 mM MOPS, 70 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Las titulaciones de calcio se realizaron en un volumen total de 200 µl con 0.1 mM EGTA, calcio nominalmente libre de Ca, 3, 10, 30, 100 y 1000 µM CaCl<sub>2</sub>. El calcio libre se midió a cada pH con el colorante Rhod FF (Kd=17 µM) 1:1000 (v/v) añadido a la solución de proteína a razón de 1:200 (v/v). La fluorescencia de la GFPuv se registro en un lector de placas de fluorescencia de 96 pocillos, a 390 y 485 nm de excitación, y 530 nm de emisión. Las curvas de titulación se obtuvieron representando los datos individuales obtenidos por triplicado a partir de 3 experimentos independientes y ajustándolos a una curva sigmoidea.

#### Cultivos celulares y expresión en células de mamífero

30 La células HeLa (CCL-2) se mantuvieron en DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM L-glutamina, 100 µg/ml estreptomycin, 100 U/ml penicilina. Para realizar los experimentos de imagen se sembraron 3x10<sup>4</sup> células en placas de 4 pocillos tratadas con poli-L-lisina y transfectadas con 0.1µg de las construcciones pcDNA3-GuvA mediante el uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). La línea estable de HeLa que expresaba CRmutGuvA se obtuvo por electroporación con el plásmido pcDNA3-CRGuvA (que contenía las mutaciones D117A, D119A, D163A) y los clones resistentes se seleccionaron con 0.8 mg/ml G-418. Los clones estables se obtuvieron por dilución limitada y se mantuvieron en 0.1 mg/ml G-418.

#### Cultivos neuronales de hipocampo y del ganglio de raíz dorsal

40 Las neuronas de ganglio de raíz dorsal (DRG) se aislaron a partir de ratones o ratas neonatas (P0-P5) según el método previamente descrito (Gilbert and McNaughton 1997). Brevemente, los ganglios se aislaron en una solución salina de Hanks libre de Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (HBSS) a 4 °C y se digirieron con tripsina-EGTA (0.25%, Gibco) y DNasa (0.1 mg/ml) durante 20 min a 37 °C. Las neuronas se disociaron mediante trituración manual de los ganglios digeridos y se resuspendieron en un medio Neurobasal-A (Invitrogen) suplementado con 1% B-27 (Invitrogen), 0.5 mM glutamax, 50 ng/ml NGF, 100 µg/ml estreptomycin y 100 U/ml penicilina. Seguidamente se sembraron en placas con portaobjetos tratados con laminina (10 µg/ml) y poli-D-lisina (100 µg/ml) a una densidad final de 30,000 células/cubreobjetos. Los experimentos se llevaron a cabo tras 6-8 días in vitro.

50 Las neuronas de hipocampo se aislaron a partir de 1-2 ratones neonatos (P0-4). Los cerebros se extrajeron inmediatamente tras la decapitación, los hipocampos se diseccionaron en HBSS frío y se digirieron con papaína (0.5 mg/ml) y DNasa (0.04 mg/ml) disuelta en una solución de HBSS libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y conteniendo 1 mg/ml BSA y 10 mM glucosa a 37 °C durante 30 min. La solución de papaína se reemplazó por 1 ml de medio Neurobasal A (GIBCO- Invitrogen) suplementado con 2% B-27, 2 mM glutamax, 100 µg/ml estreptomycin y 100 U/ml penicilina, y 10% suero bovino fetal (FBS). El tejido digerido se trituró suavemente y se sembró en gota sobre cubreobjetos de vidrio tratados con poli-DL-lisina a una densidad final de 1000 células/mm<sup>2</sup> (30,000 células/cubreobjeto). Tras 3-4 horas, se reemplazó el medio por otro suplementado con 2.5% FBS. Las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C y los experimentos se realizaron habitualmente entre 8 y 14 días en cultivo.

#### Generación de vectores virales

60 Los dos plásmidos pcDNA3erGuvA y pcDNA3CRGuvA se digirieron con HindIII/EcoRI para aislar los fragmentos y se clonaron en el plásmido viral pHSVpUC. El empaquetamiento y la titulación de los amplicones basados en el virus del herpes simplex tipo 1 (HSV-1) se llevaron a cabo como se ha descrito previamente (Alonso, Barrero et al. 1998; Chamero, Manjarres et al. 2008). Se sembraron 3-5 x10<sup>4</sup> neuronas DRG en los cubreobjetos y se infectaron con un MOI (multiplicity of infection) entre 0.01 y 0.1. Los experimentos de calcio se realizaron 24 horas tras la infección.

#### Imagen de Ca<sup>2+</sup> en célula única



La fluorescencia se registró en un microscopio invertido Nikon Diaphot con un objetivo 20X (Olimpus). Las soluciones se aplicaron por perfusión continua a 2-3 ml/min. La fluorescencia de GuvA se monitorizó a dos longitudes de onda usando los filtros 403DF y 485DF controlados por una rueda de filtros y un espejo dicroico. La luz emitida a partir de 520 nm se recogió usando una cámara ISIS-M (Photonic Science). Las 4 imágenes se analizaron usando el procesador Applied Imaging Magical (Sunderland, Tyne and Wear, UK). El tratamiento de las imágenes consistió en la substracción del fondo (background) y el cociente entre las dos fluorescencias pixel a pixel usando el programa Image J. En los experimentos en los que se combinó GuvA con Fura-2, los filtros utilizados fueron 340, 380 (para Fura-2) y 485 (para GuvA).

La calibración *in vitro* se realizó en el clon estable de HeLa que expresaba CRmutGuvA permeabilizado con 60  $\mu\text{M}$  digitonina, 10  $\mu\text{M}$  nigericina, 20  $\mu\text{M}$  monensina, 10  $\mu\text{M}$  4-BrA23187, 1  $\mu\text{M}$  gramicidina, and 2  $\mu\text{M}$  CCCP en un medio interno. El tampón que contenía 140 mM KCl y 20 mM MOPS-Na, pH 7.2 se pasó previamente por una columna de Chelex y después por una columna Sponge para eliminar los cationes divalentes contaminantes. El medio final contenía 1mM  $\text{MgCl}_2$  y, bien 0.1 mM EGTA, bien medio nominalmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$  o soluciones con concentraciones de calcio crecientes. Las soluciones finales de calcio con  $\text{Ca}^{2+}$  libre entre 1 y 100  $\mu\text{M}$  se realizaron mezclando soluciones valoradas de 0.43 M HEEDTA y 0.1M  $\text{CaCl}_2$  usando el programa MaxChelator.

#### Generación de ratones transgénicos

El fragmento CRmutGuvA con las mutaciones D117A, D119A y D163A se clonó en el vector pCAGGS que contenía el CMV enhancer, el promotor de  $\beta$ -actin y elementos reguladores del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), cedido por el Dr. L. Looger (USA). El casete de 5 Kb se aisló con Sspl/BsaBI, se purificó en un gel y se inyectó en oocitos B6CBAF2 mediante las técnicas al uso. Los animales fundadores se genotiparon para GFPuv mediante PCR usando los cebadores #50 (5'- GATGGATCCGTTCAACTAGCAGACC-3') y #201 (5'-GTACCCGCGGTTCGGTGCAGTGGTC-3'). De las 12 líneas generadas, la mayor parte de los resultados se obtuvieron en las líneas 30, 20, 11 y 8, debido a los mayores niveles de expresión del transgén en los tejidos neuronales detectados por PCR cuantitativa.

#### Histología

Los animales se anestesiaron y se fijaron por perfusión vía aorta con 4% de paraformaldehído a 4 °C. Los tejidos se crioprotegieron con sacarosa antes de realizar las secciones de 30  $\mu\text{m}$  con un microtomo (Leica, Bensheim, Alemania). Las imágenes se tomaron con un microscopio Nikon de epifluorescencia.

#### Imagen de calcio en secciones de hipocampo

Las secciones de hipocampo se prepararon a partir de ratones de 2-3 semanas de edad de la línea L30. El hipocampo se diseccionó junto a la corteza y se cortó en secciones de 400  $\mu\text{m}$  de grosor con un Tissue Chopper Mcllwain. Las secciones se transfirieron rápidamente a un filtro de membrana de poro fino manteniéndolas durante 1 hora en fluido cerebrospinal artificial frío con burbujeo continuo con una mezcla de gases 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$  a 25°C.

### **EJEMPLO 1**

#### Diseño de la proteína GuvA y calibración *in vitro*

El sensor fluorescente de calcio GuvA se diseñó fusionando dos proteínas de la medusa *Aequorea victoria*, la GFP y la acuorina. La apoacuorina aporta la sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  debido a sus tres manos EF funcionales. La variante de GFP usada es la GFPuv (SEQ ID NO: 1) (Cramer, Whitehorn et al. 1996), que porta las mutaciones Q80R, F99S, M153T, V163A. El extremo C-terminal de uvGFP se conectó al extremo N-terminal de la apoacuorina mediante un linker de 16 residuos, TATPATTPTTAPTAGT (SEQ ID NO: 3).

Presumiblemente, cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se liga a la acuorina, el cambio conformacional que esta sufre induce, a su vez, otro cambio conformacional en la proteína GFP, de tal forma que la emisión de fluorescencia cambia. Se han realizado diferentes construcciones variando la longitud del linker al doble y también cambiando su composición. Se han utilizando las siguientes variantes de enlazadores: SGGSGSGGQ (9 residuos; SEQ ID NO: 21), TATPATTPTTAPTAGT (16 residuos; SEQ ID NO: 3), y TATPATTPTTAPTAGTTATPATTPTTAPTAGT (32 residuos; SEQ ID NO: 13). De todas las variantes, la mejor opción se muestra en la Fig.1a.

La proteína de fusión se expresó eficazmente en bacterias. El espectro de fluorescencia de la proteína GuvA purificada era similar al de la proteína GFPuv, con 2 máximos de excitación, uno a 403 y otro a 470 nm, y un único máximo de emisión a 510 nm (Fig. 1b). La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  saturante (1 mM) aumentó 3 veces la razón de fluorescencias 470:403. La curva de titulación para  $\text{Ca}^{2+}$ , medida simultáneamente con el indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$  Rhod 5FF, se ajustó a una curva monofásica rindiendo una  $K_d$  aparente de 0.2  $\mu\text{M}$  (Fig. 1d). La sensibilidad al pH se comprobó con soluciones a distintos pH, cada uno a 4 concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  diferentes. Los resultados indicaron que GuvA apenas es sensible a pH, al menos en el rango de pH desde 6 a 8.

A continuación se comprobó cómo se comportaba el sensor GuvA en células de mamífero. Para ello se diseñaron dos construcciones de GuvA, una fusión con la luciferasa, que se retiene en el citosol (cytGuvA) y la segunda con la nucleoplasmina, cuyo destino final será el núcleo (nuGuvA) (Fig. 1a). Cuando cytGuvA se

transfectó en células HEK293T, la fluorescencia mostró una distribución citosólica excluida del núcleo, mientras que la distribución de nuGuvA era exclusivamente nuclear. En la Fig. 1c se muestra el curso temporal de la media de 5 células que expresan GuvA en el citosol. La aplicación de tres pulsos consecutivos con una dosis máxima de ATP (100  $\mu$ M) con carbacol (100  $\mu$ M) produjo 3 transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  perfectamente reproducibles con una razón de fluorescencias de 2 veces respecto al valor basal. Esto resulta de los cambios recíprocos en las intensidades de las fluorescencias a 403 y a 470 nm asociados con los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  fisiológicos. Resultados similares se obtuvieron con la proteína GuvA nuclear (resultados no mostrados). Estos datos se corresponden muy bien con los obtenidos en la calibración *in vitro* e indican que el sensor de calcio GuvA funciona correctamente en el contexto intracelular.

## EJEMPLO 2

### Generación de variantes del sensor de calcio localizadas en el retículo endoplásmico y con afinidad reducida por $\text{Ca}^{2+}$

Se ensayó a continuación la posibilidad de dirigir GuvA al RE. Las medidas del  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE requieren, en primer lugar, disminuir la afinidad de la proteína GuvA por el  $\text{Ca}^{2+}$ . Comenzamos con la sustitución D119A (la nomenclatura corresponde a la secuencia primaria de la acurina), una mutación bien caracterizada que reduce la afinidad de la acurina por el  $\text{Ca}^{2+}$  unas 20 veces en los ensayos de bioluminiscencia (Kendall, Sala-Newby et al. 1992; Montero, Brini et al. 1995). Se generó por mutagénesis dirigida una pequeña librería de mutantes formada por mutaciones individuales en cada residuo ácido de los 3 motivos de manos EF de la acurina, todos ellos mutados a alanina, o bien combinaciones de 2 a 4 mutaciones, que siempre incluían la D119A (Fig. 2a). Se diseñaron dos formas de direccionamiento al RE alternativas (Fig. 2b): en una de ellas se fusionó el extremo N-terminal del GuvA al gen de la cadena pesada Igy2b (ermutGuvA) (Montero, Brini et al. 1995). En otra se fusionó el péptido señal de la calreticulina al extremo N-terminal de GuvA y la secuencia KDEL (SEQ ID NO: 48) de retención en el RE, al extremo C-terminal (CRmutGuvA) (Kendall, Dormer et al. 1992). En ambos casos la localización de la proteína ermutGuvA y CRmutGuvA en las células transfectadas tenían un patrón característico del RE y la fluorescencia verde colocalizaba perfectamente con un marcador típico del RE como es la ATPasa del RE, SERCA.

Las mutaciones se realizaron en la construcción IgG-GuvA; esto permitía poder analizar el efecto de la mutación directamente en el RE de las células. La razón para esto es que, a menudo, las propiedades de los sensores de calcio (rango dinámico e intensidad de fluorescencia) en el contexto del orgánulo no refleja su comportamiento *in vitro* (Pologruto, Yasuda et al. 2004; Kotlikoff 2007; Hendel, Mank et al. 2008). El ensayo consistió en comparar la caída en la razón de fluorescencias 470:403 en respuesta al estímulo de ATP en presencia de 1 mM de calcio externo con el descenso de la misma señal obtenido en presencia de EGTA+ TBH. Este protocolo se detalla en la Fig.3a. De todos los mutantes, el que tuvo un mejor comportamiento en este ensayo fue el mutante D117A+D119A+D163A, o sea que en adelante el resto del trabajo se centró en este mutante.

La calibración *in situ* se llevó a cabo con la construcción CRmutGuvA, de la que se obtuvo un clon estable de células HeLa que tenía unos niveles de expresión óptimos para medir fluorescencia (Fig. 2b). El registro muestra la media de 7 células permeabilizadas con digitonina. La eliminación del Ca externo provocó una caída inmediata de la señal de fluorescencias que se incrementó paulatinamente a medida que se iban añadiendo soluciones crecientes de  $[\text{Ca}^{2+}]$  hasta un máximo de 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Los incrementos en la fluorescencia fueron muy reproducibles tanto usando el sistema de  $\text{Ca}^{2+}$ /HEDTA o las soluciones no tamponadas de  $\text{Ca}^{2+}$  previamente pasadas por una columna de tipo Sponge. La Kd aparente para  $\text{Ca}^{2+}$  fue de 12  $\mu$ M y el rango dinámico varió 4 veces, en buena concordancia con los resultados *in vitro* (Fig.2c y 2d). Con el fin de reducir todavía más la afinidad de la acurina es posible usar el catión  $\text{Sr}^{2+}$ , un sustituto del  $\text{Ca}^{2+}$  que también se liga a la acurina, aunque con una menor afinidad, permea a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y es transportada por las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fleschner and Kraus-Friedmann 1986; Holguin 1986; Horiuti 1986). Las curvas de calibración dieron como resultado un valor de Kd para el  $\text{Sr}^{2+}$  de 130  $\mu$ M (Fig.2e).

La intensidad de fluorescencia era mayor para la fusión CRmutGuvA que para la ermutGuvA, por lo que en adelante nos centramos en un clon estable de HeLa para la primera. En la Fig. 3a se muestra la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  registrada por el sensor CRmutGuvA. El ATP produjo una respuesta cercana a un tercio de la obtenida cuando la SERCA está inhibida con TBH en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo. La  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  disminuyó al mínimo en presencia de TBH y se recuperó completamente a los niveles de rellenado de reposo tras el lavado del TBH y su sustitución por  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha demostrado previamente que el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico inhibe la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE a través de la inhibición del receptor de IP3 (IP3R) por el  $\text{Ca}^{2+}$ . En efecto, la incubación con el quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA, que fija la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{C}}$ , aumentó dramáticamente la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por el ATP (Fig. 3b), vaciando casi completamente el RE.

A continuación se puso en marcha un protocolo similar al de la Fig. 3a, pero con  $\text{Sr}^{2+}$ . Para ello las células se sometieron a un protocolo previo de vaciamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE tratándolas con THB en presencia de EGTA, y un posterior rellenado con 1mM de una solución de  $\text{Sr}^{2+}$ . En este abordaje, una dosis máxima de ATP provocó una disminución de la señal de la razón de fluorescencias mucho mayor que la obtenida previamente con  $\text{Ca}^{2+}$  que rápidamente regresó al nivel basal (Fig. 3c). La adición de TBH produjo dos tipos de respuestas en las células: en algunas TBH indujo una reducción progresiva de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que en otras células hubo

una caída rápida inicial seguida de un segundo componente lento. En ambos casos una segunda adición de ATP provocó una liberación rápida adicional de  $Sr^{2+}$  desde el RE que redujo la señal casi hasta el mínimo. GuvA puede también usarse en combinación con el indicador citosólico fura-2 para monitorizar simultáneamente  $[Ca^{2+}]_{RE}$  y  $[Ca^{2+}]_C$ . En este caso la señal de GuvA se recoge únicamente a 403 nm, la longitud de onda más sensible a  $Ca^{2+}$ , y la señal del fura-2 a 340 y 380 nm. Como se muestra en la Fig. 3d, las células HeLa estimuladas con 2 pulsos consecutivos de ATP (100 $\mu$ M) y carbacol (100 $\mu$ M) provocaron sendos transitorios de  $[Ca^{2+}]_C$  que se correlacionaron inversamente con las liberaciones del  $Ca^{2+}$  desde el RE.

### EJEMPLO 3

#### Expresión del sensor de calcio en ganglios de raíz dorsal

Con objeto de demostrar que el sensor GuvA era un buen indicador también en una célula primaria, se generó un vector vírico basado en el virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), utilizando para ello el promotor del plásmido pHSV es el IE4/5 (Immediate Early 4/5) originario del virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1). El objetivo último era transducir la CRmutGuvA al RE de neuronas del ganglio de raíz dorsal (DRG) (Fig.4a-d).

El sistema de los amplicones ha demostrado ser especialmente apropiado para expresar genes en cultivos de neuronas primarias (Fraefel, Song et al. 1996; Lim and Neve 2001). Las neuronas infectadas tenían una correcta localización de la proteína CRmutGuvA en el RE, con altos niveles de expresión (resultados no mostrados). CRmutGuvA era funcional en las neuronas DRG puesto que la aplicación de una dosis máxima de cafeína (50 mM) resultó en una disminución dramática del  $[Ca^{2+}]_{RE}$  unas 2.5 veces, recuperándose rápidamente el nivel del pre-estímulo tras el lavado de la cafeína (Fig.4a). Además cuando la cafeína se añadió junto al TBH, se produjo un máximo vaciamiento en el RE, aproximándose a 4, un valor similar al valor máximo obtenido en la calibración *in vitro*.

La fina detección de los cambios de  $Ca^{2+}$  en el RE por el sensor CRmutGuvA se hizo más palpable estudiando el efecto cuantitativo de la cafeína sobre la liberación del  $Ca^{2+}$  (Fig. 4b). CRmutGuvA fue suficientemente sensible para detectar las pequeñas pero reproducibles liberaciones de  $Ca^{2+}$  evocadas por una dosis mínima de cafeína (2 mM). Concentraciones de cafeína intermedias (10 mM) provocaron vaciamientos del RE mayores hasta una dosis máxima (50 mM) que indujo una respuesta máxima. El mecanismo denominado Calcium Induced Calcium Release (CICR) descrito en este tipo de neuronas (Verkhatsky and Shmigol 1996) también puede evidenciarse siguiendo la salida del  $Sr^{2+}$  desde el RE, tras la sustitución del  $Ca^{2+}$  intraluminal por el  $Sr^{2+}$  (Fig. 4c).

La aplicación de 2 mM de cafeína evocó una liberación modesta y lenta de  $Sr^{2+}$  que potenció el efecto del pulso despolarizante con alto  $K^+$ . Adiciones sucesivas de alto  $K^+$  resultaron en las correspondientes salidas del  $Sr^{2+}$  desde el RE. Para una mayor claridad, en la Fig. 4c se muestran también los registros de las fluorescencias individuales.

### EJEMPLO 4

#### Expresión del sensor de calcio en animales transgénicos

Por último se abordó la cuestión de si el sensor de calcio GuvA podría ser funcional en organismos vivos. Para ello se generaron ratones transgénicos que expresaban CRmutGuvA. La expresión de CRmutGuvA estaba controlada por el promotor ubicuo CAG-GS. De las 12 líneas generadas se eligieron 3 por la alta expresión del transgén en la mayoría de los tejidos nerviosos. La expresión proteica se detectó ya en el estadio E12-13 de desarrollo y permaneció estable al menos durante 4 meses, la edad más avanzada que se ha analizado. CRmutGuvA se detectó con una señal intensa en la mayoría de las regiones del hipocampo, principalmente en las células dendríticas del área CA1 (Fig. 5a & 5b). En el cerebelo se detectó expresión tanto en los granos como en las células de Purkinje (Fig. 5c). La localización subcelular muestra un patrón característico del RE, con el núcleo excluido y no existen signos de agregación del indicador fluorescente. También se ha detectado expresión aislada en otros tejidos fuera del sistema nervioso como en páncreas y en músculo (resultados no mostrados). La expresión encontrada en las neuronas de DRG fue especialmente intensa y el comportamiento del sensor es completamente funcional, como se demuestra en la Fig.5d. Se muestran los dos tipos de respuestas representativas al estimular las neuronas con dosis crecientes de cafeína en ausencia y presencia de TBH. Mientras en un grupo de neuronas, 20 mM de cafeína produjo una pequeña liberación de  $Ca^{2+}$ , y TBH apenas tuvo efecto (línea discontinua), en el otro grupo, esta misma dosis produjo un efecto semimáximo, y TBH vació lentamente el RE (línea continua). Tras la estimulación con 50 mM de cafeína en presencia de TBH, el vaciamiento del RE fue máximo, de unas 7 veces en el cociente de fluorescencias 470/403.

Por último, se examinó la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  del CRmutGuvA en secciones de hipocampo aisladas del ratón transgénico que expresa el nuevo sensor de calcio. En la Fig. 5e se muestra la respuesta media a cafeína de 17 neuronas piramidales de la región CA1 perteneciente a una sección de hipocampo de unos 400  $\mu$ m. Como se muestra, la cafeína provocó una liberación del contenido del calcio del RE. Esto demuestra que las propiedades dinámicas del sensor demostradas *in vitro* y en células disociadas, se mantienen en el animal completo y esto hace posible realizar mediciones de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  *in vivo*.

Además del RE, también hemos dirigido este nuevo sensor de calcio GuvA a otros orgánulos como la mitocondria y el aparato de Golgi. En la Fig.6 están representadas las construcciones que se han realizado, tanto bacterianas como eucarióticas, y cuya funcionalidad se ha demostrado, tanto en ensayos *in vitro* como en células disociadas o en tejidos intactos.

5

**REIVINDICACIONES**

1. Método para la determinación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra que comprende
- (i) poner en contacto dicha muestra con una proteína de fusión que comprende
- 5 (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,
- (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y
- en donde
- dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible,
  - 10 - la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico,
  - el primer dominio polipeptídico se selecciona del grupo formado por una mano EF, el pseudodominio de mano EF, los dominios con similitud a la mano EF, el dominio dockerina, o una proteína seleccionada del grupo formado por calmodulina, troponina C, calcineurina, proteína homóloga a calcineurina (CHP), albúmina, parvalbúmina, integrinas, cadena ligera reguladora de miosina, proteínas S-100, calbindina, calretinina, anexinas, sorcina, calpaína, grancalcina, calsecuestrina, osteocalcina, osteonectina, sinaptotagmina, proteína de unión a calcio dependiente de vitamina D, espectrina, recoverina, hipocalcina, caltractina, esquidulina, trichialina, hornerina, la proteína de unión a D-galactosa (GBP), acuorina y apoacuorina, obelina y apo-obelina, mitrocomina, berovina, clitina, y endoglucanasa, y
  - 20 - el segundo dominio polipeptídico fluorescente se selecciona del grupo formado por proteína verde fluorescente (GFP o wtGFP), Superfolder GFP, proteína fluorescente azul (EBFP), cyan (ECFP), y amarilla (YFP), GFPuv, Emerald, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, mOrange, mKO, YFP, EYFP, mCitrine, Venus, YPet, CyPet, CFP, ECFP, mCFPm, Cerulean, T-Sapphire, proteína roja fluorescente (RFP), DsRed, DsRed2, DsRed-Express, RedStar, HcRed1, Kaede, EosFP y proteína fluorescente Kindling (KFP);
- (ii) detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo dominio polipeptídico en respuesta a la excitación de la muestra a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico; y
- (iii) determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de la variación en la intensidad de la fluorescencia con respecto a la intensidad de la fluorescencia en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- 35 2. Método para la detección intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende
- (i) poner en contacto una célula o población celular que comprende una proteína de fusión que comprende
- (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,
- 40 (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente
- en donde
- dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible,
  - la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico,
  - 45 - el primer dominio polipeptídico se selecciona del grupo formado por una mano EF, el pseudodominio de mano EF, los dominios con similitud a la mano EF, el dominio dockerina, o una proteína seleccionada del grupo formado por calmodulina, troponina C, calcineurina, proteína homóloga a calcineurina (CHP), albúmina, parvalbúmina, integrinas, cadena ligera reguladora de miosina, proteínas S-100, calbindina, calretinina, anexinas, sorcina, calpaína, grancalcina, calsecuestrina, osteocalcina, osteonectina, sinaptotagmina, proteína de unión a calcio dependiente de vitamina D, espectrina, recoverina, hipocalcina, caltractina, esquidulina, trichialina, hornerina, la proteína de unión a D-galactosa (GBP), acuorina y apoacuorina, obelina y apo-obelina, mitrocomina, berovina, clitina, y endoglucanasa, y
  - 50 - el segundo dominio polipeptídico fluorescente se selecciona del grupo formado por proteína verde fluorescente (GFP o wtGFP), Superfolder GFP, proteína fluorescente azul (EBFP), cyan (ECFP), y amarilla (YFP), GFPuv, Emerald, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, mOrange, mKO, YFP, EYFP, mCitrine, Venus, YPet, CyPet, CFP, ECFP, mCFPm, Cerulean, T-Sapphire, proteína roja fluorescente (RFP), DsRed, DsRed2, DsRed-Express, RedStar, HcRed1, Kaede, EosFP y proteína fluorescente Kindling (KFP);
- 60 y

- (ii) detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo dominio polipeptídico en respuesta a la excitación de la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico  
 en donde una variación en la intensidad de la fluorescencia emitida por la célula o población celular con respecto a un valor de referencia es indicativo de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.
- 5
3. Método la reivindicación 2 en donde la proteína de fusión se localiza en un compartimento intracelular u orgánulo específico.
- 10 4. Método según la reivindicación 3 en donde dicho compartimento intracelular u orgánulo específico se selecciona del grupo formado por retículo endoplásmico o sarcoplásmico, núcleo, aparato de Golgi y mitocondria.
- 15 5. Método según la reivindicación 4 en donde dicha proteína de fusión comprende una primera secuencia señal de direccionamiento a la ruta secretora y una segunda señal de retención en el retículo endoplásmico.
- 20 6. Método según la reivindicación 5 en donde la señal de retención en el retículo endoplásmico se selecciona del grupo consistente en un péptido de retención en el retículo endoplásmico en posición carboxilo terminal y una secuencia de interacción con BiP.
- 25 7. Método según la reivindicación 6 en donde la secuencia señal de direccionamiento a la ruta secretora se selecciona del grupo consistente en la secuencia señal de la calreticulina y la secuencia señal de la inmunoglobulina Igy2b, en donde el péptido de retención en el retículo endoplásmico es el péptido KDEL (SEQ ID NO: 48) y/o en donde la secuencia interacción con BiP comprende los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b.
- 30 8. Método según la reivindicación 4 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización nuclear que comprende la secuencia de localización nuclear de nucleoplasmina.
- 35 9. Método según la reivindicación 4 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización al complejo de Golgi que comprende la secuencia de localización en el complejo de Golgi de galactosil transferasa.
10. Método según la reivindicación 4 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización a la mitocondria que comprende la secuencia de localización mitocondrial de la citocromo oxidasa VIII.
11. Método para la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular a lo largo del tiempo que comprende
- 40 (i) proporcionar una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden una proteína de fusión que comprende
- (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$ ,
- (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y
- en donde
- 45 - dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible,
- la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico,
- el primer dominio polipeptídico se selecciona del grupo formado por una mano EF, el pseudodominio de mano EF, los dominios con similitud a la mano EF, el dominio dockerina, o una proteína seleccionada del grupo formado por calmodulina, troponina C, calcineurina, proteína homóloga a calcineurina (CHP), albúmina, parvalbúmina, integrinas, cadena ligera reguladora de miosina, proteínas S-100, calbindina, calretinina, anexinas, sorcina, calpaína, grancalcina, calsecuestrina, osteocalcina, osteonectina, sinaptotagmina, proteína de unión a calcio dependiente de vitamina D, espectrina, recoverina, hipocalcina, caltractina, esquidulina, trichialina, hornerina, la proteína de unión a D-galactosa (GBP), acuorina y apoacuorina, obelina y apo-obelina, mitrocomina, berovina, clitina, y endoglucanasa, y
- 50 - el segundo dominio polipeptídico fluorescente se selecciona del grupo formado por proteína verde fluorescente (GFP o wtGFP), Superfolder GFP, proteína fluorescente azul (EBFP), cyan (ECFP), y amarilla (YFP), GFPuv, Emerald, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, mOrange, mKO, YFP, EYFP, mCitrine, Venus, YPet, CyPet, CFP, ECFP, mCFPm, Cerulean, T-Sapphire, proteína roja fluorescente (RFP), DsRed, DsRed2, DsRed-Express, RedStar, HcRed1, Kaede, EosFP y proteína fluorescente Kindling (KFP),
- 55
- 60

- (ii) determinar a un primer tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico y
- 5 (iii) determinar a un segundo tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico
- 10 en donde una variación en la intensidad de la señal emitida en (iii) con respecto a la intensidad de la señal emitida en (ii) es indicativo de una variación en la concentración de  $Ca^{2+}$  en la célula o población celular.
12. Método la reivindicación 11 en donde la proteína de fusión se localiza en un compartimento intracelular u orgánulo específico.
- 15 13. Método según la reivindicación 12 en donde dicho compartimento intracelular u orgánulo específico se selecciona del grupo formado por retículo endoplásmico o sarcoplásmico, núcleo, aparato de Golgi y mitocondria.
- 20 14. Método según la reivindicación 13 en donde dicha proteína de fusión comprende una primera secuencia señal de direccionamiento a la ruta secretora y una segunda señal de retención en el retículo endoplásmico.
- 25 15. Método según la reivindicación 14 en donde la señal de retención en el retículo endoplásmico se selecciona del grupo consistente en un péptido de retención en el retículo endoplásmico en posición carboxilo terminal y una secuencia de interacción con BiP.
- 30 16. Método según la reivindicación 15 en donde la secuencia señal de direccionamiento a la ruta secretora se selecciona del grupo consistente en la secuencia señal de la calreticulina y la secuencia señal de la inmunoglobulina Igy2b, en donde el péptido de retención en el retículo endoplásmico es el péptido KDEL (SEQ ID NO: 48) y/o en donde la secuencia interacción con BiP comprende los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b.
- 35 17. Método según la reivindicación 13 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización nuclear que comprende la secuencia de localización nuclear de nucleoplasmina.
- 40 18. Método según la reivindicación 13 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización al complejo de Golgi que comprende la secuencia de localización en el complejo de Golgi de galactosil transferasa.
- 45 19. Método según la reivindicación 13 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización a la mitocondria que comprende la secuencia de localización mitocondrial de la citocromo oxidasa VIII.
- 50 20. Método de identificación de un compuesto con capacidad de modulación de la concentración de  $Ca^{2+}$  en una célula o población celular, que comprende
- (i) poner en contacto un compuesto candidato con una célula o población celular en donde dicha célula o población celular comprende una proteína de fusión que comprende
- (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$ ,
- (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y
- en donde
- dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible,
  - la unión de  $Ca^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico, ,
  - el primer dominio polipeptídico se selecciona del grupo formado por una mano EF, el pseudodominio de mano EF, los dominios con similitud a la mano EF, el dominio dockerina, o una proteína seleccionada del grupo formado por calmodulina, troponina C, calcineurina, proteína homóloga a calcineurina (CHP), albúmina, parvalbúmina, integrin, cadena ligera reguladora de miosina, proteínas S-100, calbindina, calretinina, anexinas, sorcina, calpaína, grancalcina, calsecustrina, osteocalcina, osteonectina, sinaptotagmina, proteína de unión a calcio dependiente de vitamina D, espectrina, recoverina, hipocalcina, caltractina, esquidulina, trichialina, hornerina, la proteína de unión a D-galactosa (GBP), acurina y apoacurina, obelina y apoobelina, mitrocomina, berovina, clitina, y endogluconasa, y
  - el segundo dominio polipeptídico fluorescente se selecciona del grupo formado por proteína verde fluorescente (GFP o wtGFP), Superfolder GFP, proteína fluorescente azul (EBFP), cyan (ECFP), y amarilla (YFP), GFPuv, Emerald, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, mOrange, mKO, YFP, EYFP, mCitrine, Venus, YPet,
- 55
- 60
- 65

CyPet, CFP, ECFP, mCFPm, Cerulean, T-Sapphire, proteína roja fluorescente (RFP), DsRed, DsRed2, DsRed-Express, RedStar, HcRed1, Kaede, EosFP y proteína fluorescente Kindling (KFP),

- (ii) determinar la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico,

en donde una alteración en la intensidad de fluorescencia determinada en la etapa (ii) con respecto a la intensidad de fluorescencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $Ca^{2+}$ .

21. Método según la reivindicación 20 en donde la proteína de fusión se localiza en un compartimento intracelular u orgánulo específico.
22. Método según la reivindicación 21 en donde dicho compartimento intracelular u orgánulo específico se selecciona del grupo formado por retículo endoplásmico o sarcoplásmico, núcleo, aparato de Golgi y mitocondria.
23. Método según la reivindicación 22 en donde dicha proteína de fusión comprende una primera secuencia señal de direccionamiento a la ruta secretora y una segunda señal de retención en el retículo endoplásmico.
24. Método según la reivindicación 23 en donde la señal de retención en el retículo endoplásmico se selecciona del grupo consistente en un péptido de retención en el retículo endoplásmico en posición carboxilo terminal y una secuencia de interacción con BiP.
25. Método según la reivindicación 24 en donde la secuencia señal de direccionamiento a la ruta secretora se selecciona del grupo consistente en la secuencia señal de la calreticulina y la secuencia señal de la inmunoglobulina Ig $\gamma$ 2b, en donde el péptido de retención en el retículo endoplásmico es el péptido KDEL (SEQ ID NO: 48) y/o en donde la secuencia interacción con BiP comprende los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Ig $\gamma$ 2b.
26. Método según la reivindicación 22 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización nuclear que comprende la secuencia de localización nuclear de nucleoplasmina.
27. Método según la reivindicación 22 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización al complejo de Golgi que comprende la secuencia de localización en el complejo de Golgi de galactosil transferasa.
28. Método según la reivindicación 22 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización a la mitocondria que comprende la secuencia de localización mitocondrial de la citocromo oxidasa VIII.
29. Método para la detección de  $Ca^{2+}$  en un animal que comprende
- (i) proporcionar un animal no humano transgénico no humano transgénico que comprende un polinucleótido que permite la expresión en dicho animal de una proteína de fusión que comprende
- (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$ ,
- (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y
- en donde
- dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible,
  - la unión de  $Ca^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico, ,
  - el primer dominio polipeptídico se selecciona del grupo formado por una mano EF, el pseudodominio de mano EF, los dominios con similitud a la mano EF, el dominio dockerina, o una proteína seleccionada del grupo formado por calmodulina, troponina C, calcineurina, proteína homóloga a calcineurina (CHP), albúmina, parvalbúmina, integrinas, cadena ligera reguladora de miosina, proteínas S-100, calbindina, calretinina, anexinas, sorcina, calpaína, grancalcina, calsecuestrina, osteocalcina, osteonectina, sinaptotagmina, proteína de unión a calcio dependiente de vitamina D, espectrina, recoverina, hipocalcina, caltractina, esquidulina, trichialina, hornerina, la proteína de unión a D-galactosa (GBP), acuorina y apoacuorina, obelina y apoobelina, mitrocomina, berovina, clitina, y endoglucanasa, y
  - el segundo dominio polipeptídico fluorescente se selecciona del grupo formado por proteína verde fluorescente (GFP o wtGFP), Superfolder GFP, proteína fluorescente azul (EBFP), cyan (ECFP), y amarilla (YFP), GFPuv, Emerald, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, mOrange, mKO, YFP, EYFP, mCitrine, Venus, YPet, CyPet, CFP, ECFP, mCFPm, Cerulean, T-Sapphire, proteína roja fluorescente (RFP),



DsRed, DsRed2, DsRed-Express, RedStar, HcRed1, Kaede, EosFP y proteína fluorescente Kindling (KFP)

(ii) y determinar de forma no invasiva la emisión fluorescente en dicho animal.

- 5
30. Método la reivindicación 29 en donde la proteína de fusión se localiza en un compartimento intracelular u orgánulo específico.
- 10
31. Método según la reivindicación 30 en donde dicho compartimento intracelular u orgánulo específico se selecciona del grupo formado por retículo endoplásmico o sarcoplásmico, núcleo, aparato de Golgi y mitocondria.
- 15
32. Método según la reivindicación 31 en donde dicha proteína de fusión comprende una primera secuencia señal de direccionamiento a la ruta secretora y una segunda señal de retención en el retículo endoplásmico.
- 20
33. Método según la reivindicación 32 en donde la señal de retención en el retículo endoplásmico se selecciona del grupo consistente en un péptido de retención en el retículo endoplásmico en posición carboxilo terminal y una secuencia de interacción con BiP.
- 25
34. Método según la reivindicación 33 en donde la secuencia señal de direccionamiento a la ruta secretora se selecciona del grupo consistente en la secuencia señal de la calreticulina y la secuencia señal de la inmunoglobulina Igy2b, en donde el péptido de retención en el retículo endoplásmico es el péptido KDEL (SEQ ID NO: 48) y/o en donde la secuencia interacción con BiP comprende los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b.
- 30
35. Método según la reivindicación 31 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización nuclear que comprende la secuencia de localización nuclear de nucleoplasmina.
- 35
36. Método según la reivindicación 31 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización al complejo de Golgi que comprende la secuencia de localización en el complejo de Golgi de galactosil transferasa.
37. Método según la reivindicación 31 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización a la mitocondria que comprende la secuencia de localización mitocondrial de la citocromo oxidasa VIII.
38. Método de identificación de un compuesto con capacidad de modulación de la concentración de  $Ca^{2+}$  en un animal no humano transgénico que comprende
- (i) poner en contacto un compuesto candidato con un animal no humano transgénico que comprende in polinucleótido que permite la expresión en dicho animal de una proteína de fusión que comprende
- (a) un primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $Ca^{2+}$ ,
- (b) un segundo dominio polipeptídico fluorescente y
- en donde
- dicho primer y segundo dominio se encuentran unidos mediante un péptido enlazador flexible,
  - la unión de  $Ca^{2+}$  al primer dominio polipeptídico resulta en una modificación de las propiedades fluorescentes del segundo dominio polipeptídico, ,
  - el primer dominio polipeptídico se selecciona del grupo formado por una mano EF, el pseudodominio de mano EF, los dominios con similitud a la mano EF, el dominio dockerina, o una proteína seleccionada del grupo formado por calmodulina, troponina C, calcineurina, proteína homóloga a calcineurina (CHP), albúmina, parvalbúmina, integrinas, cadena ligera reguladora de miosina, proteínas S-100, calbindina, calretinina, anexinas, sorcina, calpaína, grancalcina, calsecuestrina, osteocalcina, osteonectina, sinaptotagmina, proteína de unión a calcio dependiente de vitamina D, espectrina, recoverina, hipocalcina, caltractina, esquidulina, trichialina, hornerina, la proteína de unión a D-galactosa (GBP), acuorina y apoacuorina, obelina y apoobelina, mitrocomina, berovina, clitina, y endoglucanasa, y
  - el segundo dominio polipeptídico fluorescente se selecciona del grupo formado por proteína verde fluorescente (GFP o wtGFP), Superfolder GFP, proteína fluorescente azul (EBFP), cyan (ECFP), y amarilla (YFP), GFPuv, Emerald, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, mOrange, mKO, YFP, EYFP, mCitrine, Venus, YPet, CyPet, CFP, ECFP, mCFPm, Cerulean, T-Sapphire, proteína roja fluorescente (RFP), DsRed, DsRed2, DsRed-Express, RedStar, HcRed1, Kaede, EosFP y proteína fluorescente Kindling (KFP),
- 60

- (ii) determinar de forma no invasiva la fluorescencia emitida por el animal transgénico en respuesta a una excitación a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo dominio polipeptídico,  
 en donde una alteración en la intensidad de fluorescencia determinada en la etapa (ii) con respecto a la intensidad de fluorescencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- 5
39. Método la reivindicación 38 en donde la proteína de fusión se localiza en un compartimento intracelular u orgánulo específico.
- 10
40. Método según la reivindicación 39 en donde dicho compartimento intracelular u orgánulo específico se selecciona del grupo formado por retículo endoplásmico o sarcoplásmico, núcleo, aparato de Golgi y mitocondria.
- 15
41. Método según la reivindicación 40 en donde dicha proteína de fusión comprende una primera secuencia señal de direccionamiento a la ruta secretora y una segunda señal de retención en el retículo endoplásmico.
- 20
42. Método según la reivindicación 41 en donde la señal de retención en el retículo endoplásmico se selecciona del grupo consistente en un péptido de retención en el retículo endoplásmico en posición carboxilo terminal y una secuencia de interacción con BiP.
- 25
43. Método según la reivindicación 42 en donde la secuencia señal de direccionamiento a la ruta secretora se selecciona del grupo consistente en la secuencia señal de la calreticulina y la secuencia señal de la inmunoglobulina Igy2b, en donde el péptido de retención en el retículo endoplásmico es el péptido KDEL (SEQ ID NO: 48) y/o en donde la secuencia interacción con BiP comprende los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b.
- 30
44. Método según la reivindicación 40 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización nuclear que comprende la secuencia de localización nuclear de nucleoplasmina.
- 35
45. Método según la reivindicación 40 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización al complejo de Golgi que comprende la secuencia de localización en el complejo de Golgi de galactosil transferasa.
- 40
46. Método según la reivindicación 40 en donde la secuencia de localización es una secuencia de localización a la mitocondria que comprende la secuencia de localización mitocondrial de la citocromo oxidasa VIII.
- 45
47. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46, en donde el primer dominio polipeptídico con capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$  de dicha proteína de fusión es apoacurina (SEQ ID NO: 2) o una variante funcionalmente activa de la misma.
- 50
48. Método según la reivindicación 47 en donde la variante funcionalmente equivalente de la apoacurina muestra una afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  reducida con respecto a la apoacurina.
- 55
49. Método según la reivindicación 48 en donde la variante de apoacurina que muestra una afinidad para  $\text{Ca}^{2+}$  reducida con respecto a la apoacurina tiene al menos una mutación seleccionada del grupo de D117A, D119A y D163A.
- 60
50. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49, en donde el segundo dominio polipeptídico comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 (GFPuv) o una variante funcionalmente equivalente de dicha secuencia.
51. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 50 en donde el péptido enlazador es un péptido con secuencia SEQ ID NO: 3, o variantes o fragmentos del mismo.
52. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51, en donde el segundo dominio polipeptídico comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 (GFPuv) o una variante funcionalmente equivalente de dicha secuencia y en donde la longitud de onda de excitación se encuentra en un rango de entre aproximadamente 373 nm y aproximadamente 433 nm o en un rango de entre aproximadamente 440 nm y aproximadamente 500 nm.
53. Método según la reivindicación 52 en donde la longitud de onda de excitación se selecciona del grupo de 403 y 470 nm.

54. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53 en donde el segundo dominio polipeptídico comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 (GFPuv) y en donde la longitud de onda de emisión se encuentra en un rango de entre aproximadamente 480 nm y aproximadamente 540 nm.
- 5 55. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 54, que comprende además
- (i) determinar la fluorescencia a una segunda longitud de onda correspondiente a una segunda longitud de onda de excitación del segundo dominio polipeptídico fluorescente de dicha proteína de fusión, y que es diferente de la primera longitud de onda de excitación del mismo y
- 10 (ii) comparar la señal con una señal de referencia, en donde una intensidad de la señal emitida alterada con respecto a una señal de referencia es indicativo de la presencia de  $Ca^{2+}$  en dicha célula o población celular.
56. Método según la reivindicación 55, en donde se determina la relación de la intensidad de la señal emitida en respuesta a excitación a la primera y la segunda longitudes de onda correspondientes a la primera y la segunda longitudes de onda de excitación del al menos un segundo dominio polipeptídico fluorescente.
- 15 57. Método según cualquiera la reivindicación 55 o 56, en donde el segundo dominio polipeptídico comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 (GFPuv) o una variante funcionalmente equivalente de dicha secuencia y en donde la primera longitud de onda de excitación se encuentra en un rango de entre aproximadamente 373 nm y aproximadamente 433 nm y la segunda longitud de onda de excitación se encuentra en un rango de entre aproximadamente 440 nm y aproximadamente 500 nm, o en donde la primera longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre aproximadamente 440 nm y 500 aproximadamente nm y la segunda longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre aproximadamente 373 nm y
- 20 25 aproximadamente 433 nm.
58. Método según la reivindicación 57, en donde la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm, o en donde la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm.
- 30 59. Método según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 58, en donde el segundo dominio polipeptídico comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 (GFPuv) y en donde la longitud de onda de emisión se encuentra en un rango de entre aproximadamente 480 nm y aproximadamente 540 nm.
- 35 60. Método según la reivindicación 59, en donde la longitud de onda de emisión es aproximadamente de 510 nm.

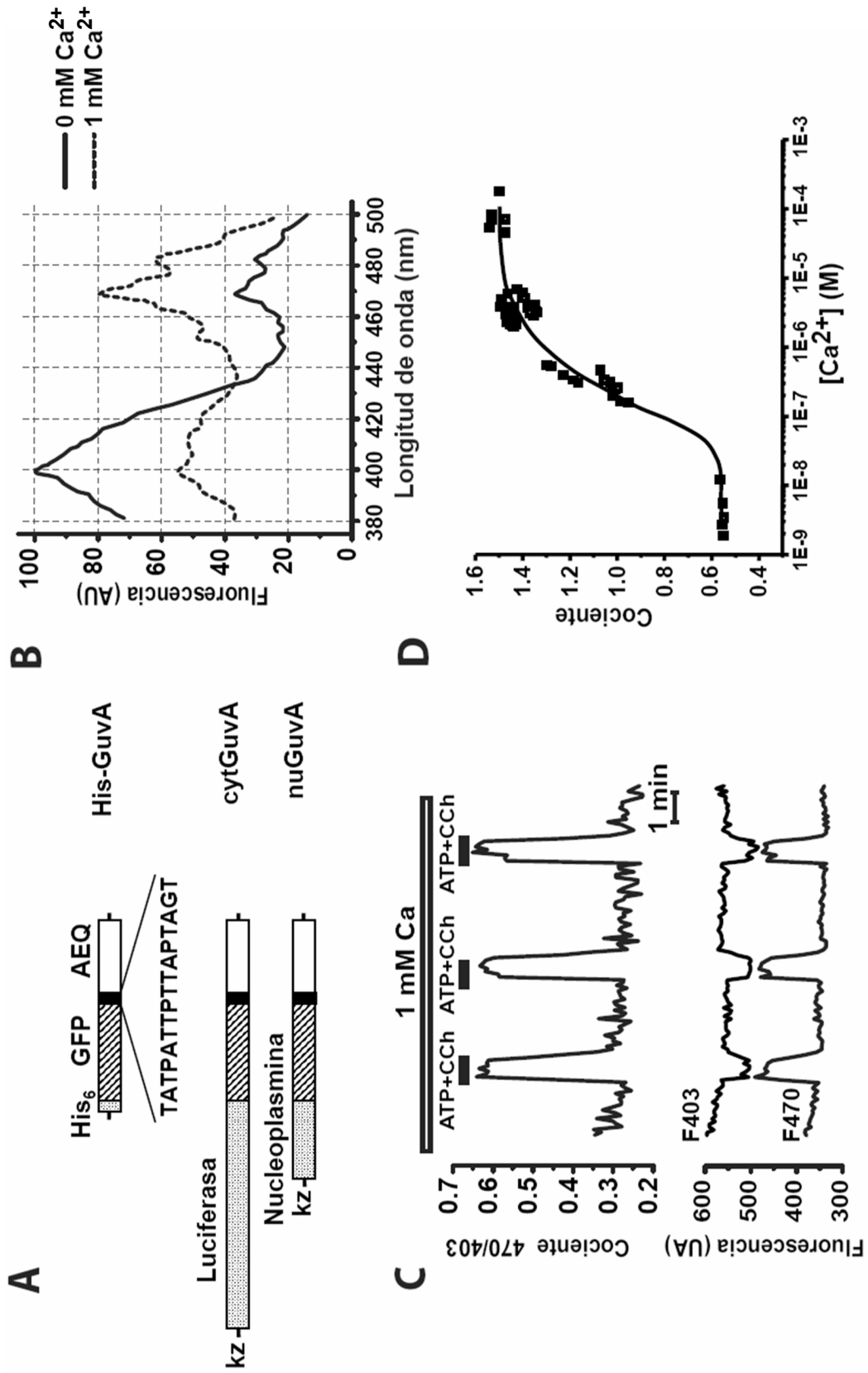


Fig. 1

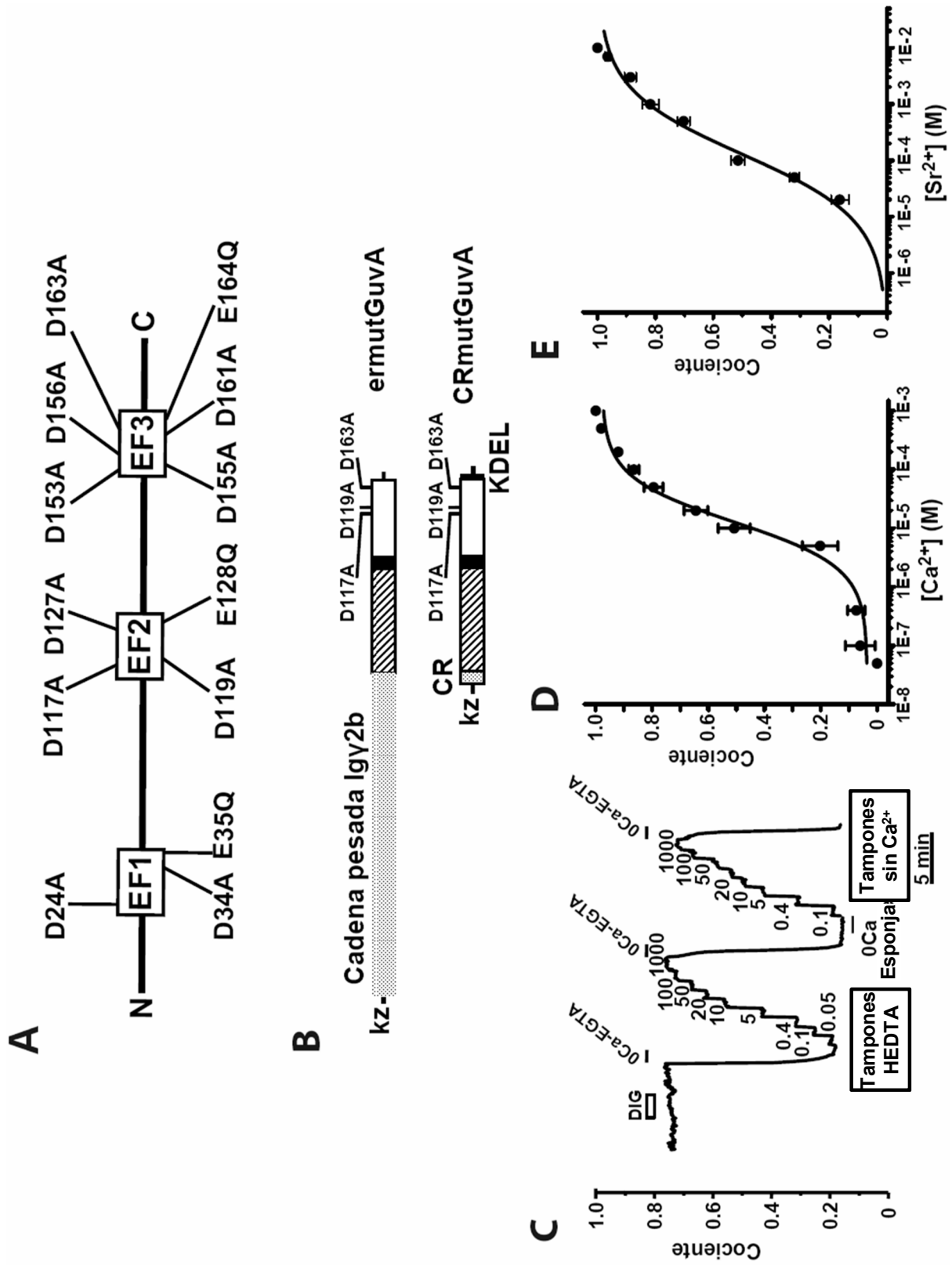


Fig. 2

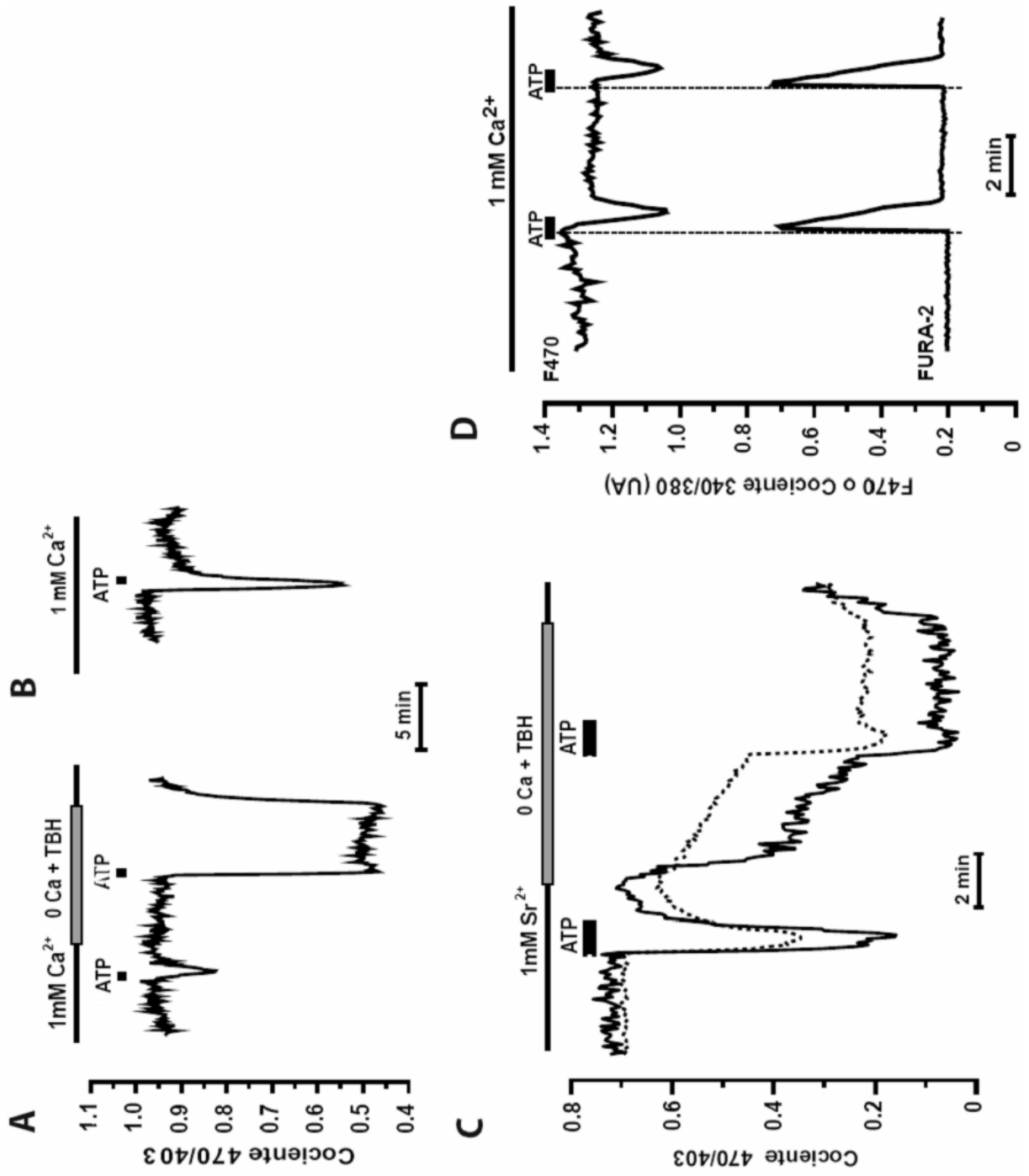


Fig. 3

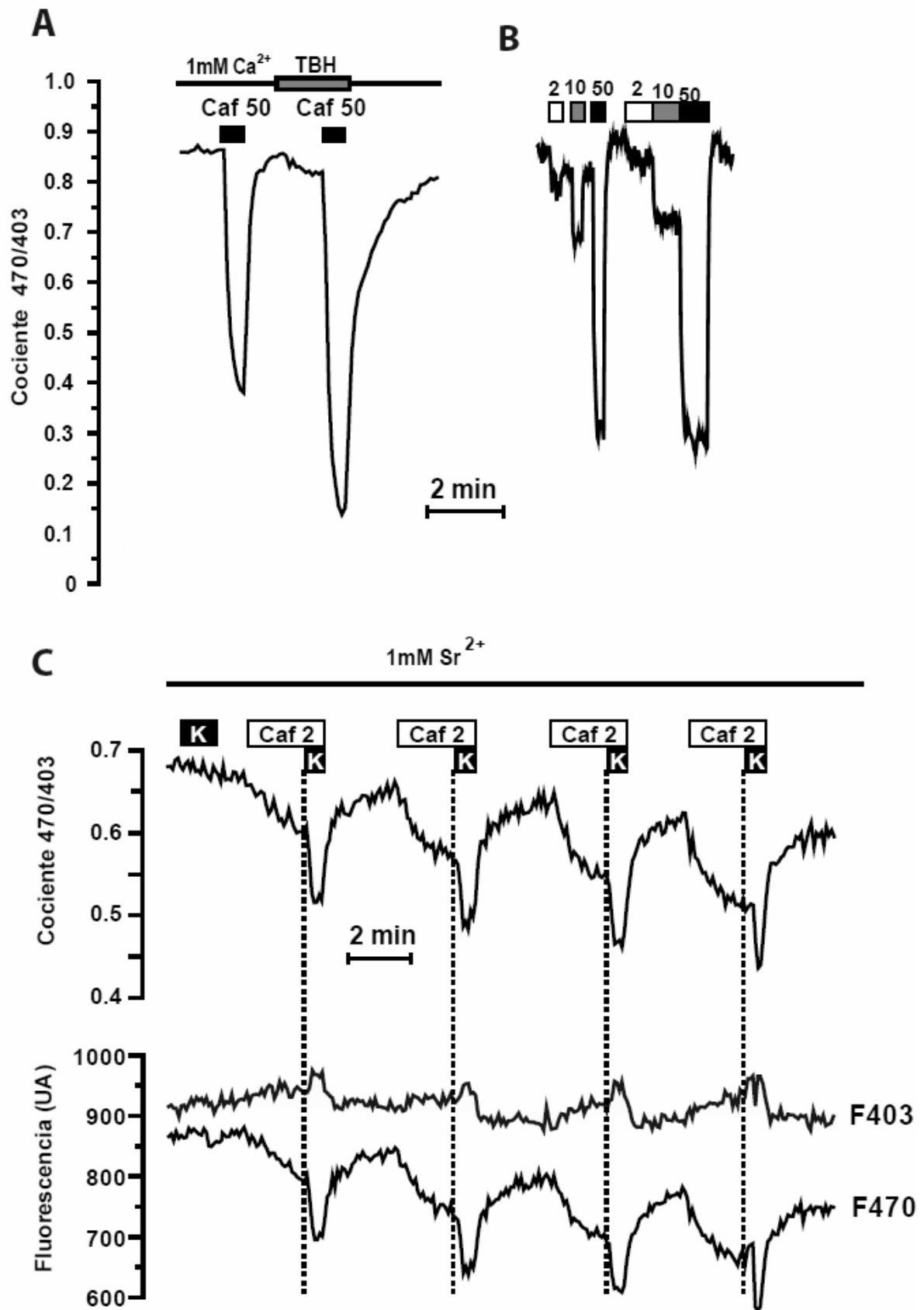


Fig. 4

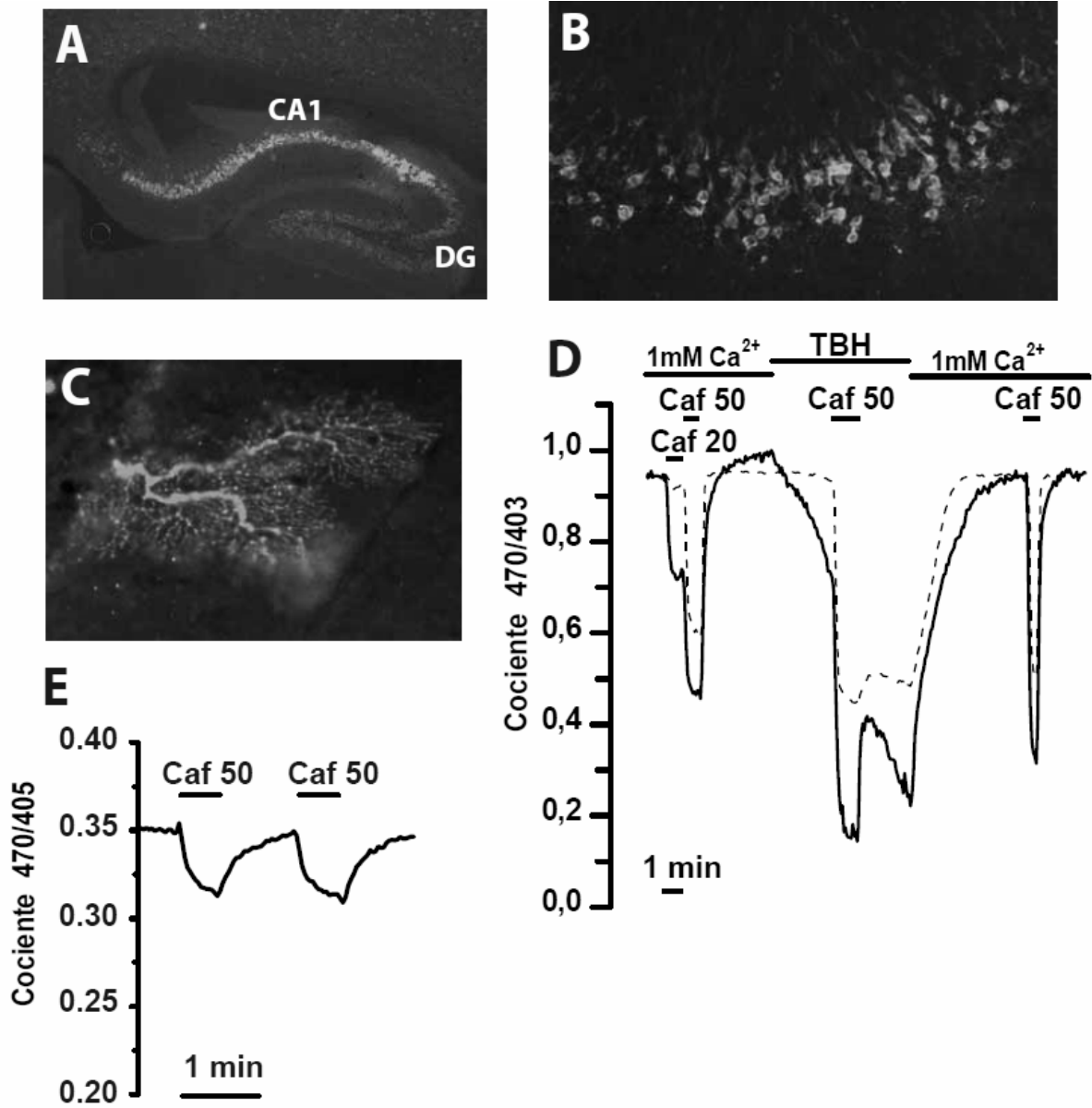


Fig. 5



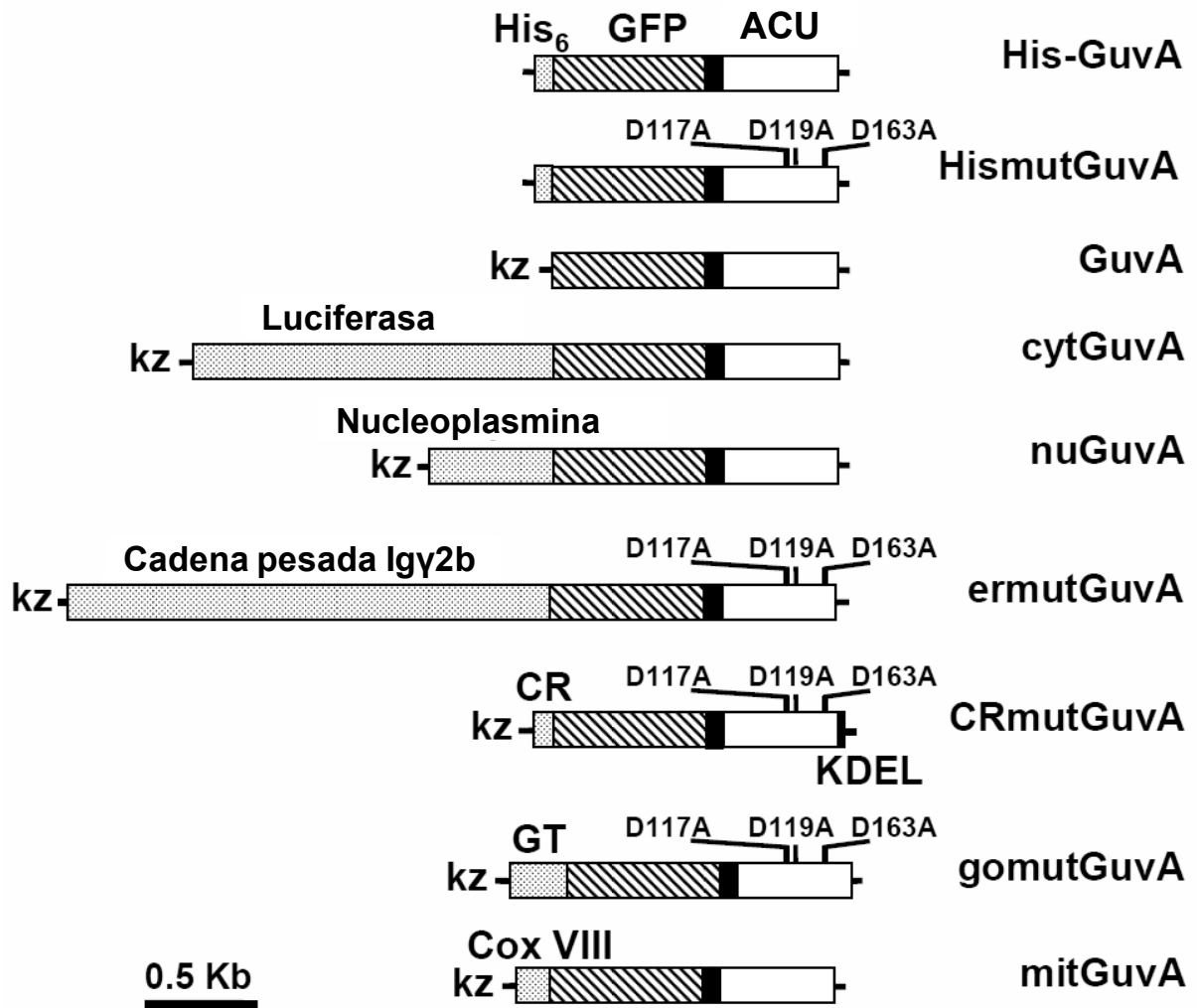


Fig. 6

# ES 2 427 852 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> UNIVERSIDAD DE VALLADOLID  
<120> SENSORES DE CALCIO Y MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE CALCIO LIBRE INTRACELULAR  
<130> P7826ES01  
<160> 65  
<170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
<211> 238  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* que presenta las mutaciones F99S, M153T y V163A  
<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 427 852 A1

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

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

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

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

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

Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
 225 230 235

<210> 2  
 <211> 189  
 <212> PRT  
 <213> *Aequorea victoria*

<400> 2

Gly Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His  
 1 5 10 15

Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser  
 20 25 30

Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu  
 35 40 45

Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala  
 50 55 60

Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro  
 65 70 75 80

Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu Leu Glu Lys  
 85 90 95

Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu  
 100 105 110

# ES 2 427 852 A1

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

Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp  
130 135 140

Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu  
145 150 155 160

Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Met  
165 170 175

Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro  
180 185

<210> 3  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido enlazante

<400> 3

Thr Ala Thr Pro Ala Thr Thr Pro Thr Thr Ala Pro Thr Ala Gly Thr  
1 5 10 15

<210> 4  
<211> 189  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia de apoacucorina que contiene la mutaciones D117A, D119A  
y D163A

<400> 4

Gly Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile Gly Arg His  
1 5 10 15

Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser  
20 25 30

Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu  
35 40 45

Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala



# ES 2 427 852 A1

<223> Péptido enlazador

<400> 6

Gly Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido enlazador

<400> 7

Glu Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr  
1 5 10

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido enlazador

<400> 8

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gln  
1 5 10 15

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido enlazador

<400> 9

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp  
1 5 10

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido enlazador

<400> 10

# ES 2 427 852 A1

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly  
1 5 10

<210> 11  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido enlazador

<400> 11

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser  
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 12  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido enlazador

<400> 12

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

<210> 13  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido enlazador

<400> 13

Thr Ala Thr Pro Ala Thr Thr Pro Thr Thr Ala Pro Thr Ala Gly Thr  
1 5 10 15

Thr Ala Thr Pro Ala Thr Thr Pro Thr Thr Ala Pro Thr Ala Gly Thr  
20 25 30

<210> 14  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

# ES 2 427 852 A1

<220>

<223> Residuos 53-56 y 57-59 de tetranectina

<400> 14

Gly Thr Lys Val His Met Lys  
1 5

<210> 15

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Aminoácidos 1992-2102 de la fibronectina humana

<400> 15

Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly  
1 5 10 15

Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr Val Gln Lys Thr Pro Phe Val  
20 25 30

Thr His Pro Gly Tyr Asp Thr Gly Asn Gly Ile Gln Leu Pro Gly Thr  
35 40 45

Ser Gly Gln Gln Pro Ser Val Gly Gln Gln Met Ile Phe Glu Glu His  
50 55 60

Gly Phe Arg Arg Thr Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Pro Ile Arg His  
65 70 75 80

Arg Pro Arg Pro Tyr Pro Pro Asn Val Gly Glu Glu Ile Gln Ile Gly  
85 90 95

His Ile Pro Arg Glu Asp Val Asp Tyr His Leu Tyr Pro His Gly  
100 105 110

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Aminoácidos 2037-2049 de la fibronectina humana

<400> 16

Pro Gly Thr Ser Gly Gln Gln Pro Ser Val Gly Gln Gln



ES 2 427 852 A1

1                    5                    10

<210> 17  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Aminoácidos 2038-2042 de la fibronectina humana

<400> 17

Gly Thr Ser Gly Gln  
1                    5

<210> 18  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia de 10 aminoácidos de la región de la bisagra superior  
de la IgG3 murina

<400> 18

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser  
1                    5                    10

<210> 19  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido enlazador

<400> 19

Ala Pro Ala Glu Thr Lys Ala Glu Pro Met Thr  
1                    5                    10

<210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido enlazador

<400> 20

Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gln  
1                    5

## ES 2 427 852 A1

<210> 21  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido enlazador

<400> 21

Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ser  
1 5

<210> 22  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido de localización nuclear

<400> 22

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
1 5

<210> 23  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido de localización nuclear

<400> 23

Pro Gln Lys Lys Ile Lys Ser  
1 5

<210> 24  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido de localización nuclear

<400> 24

Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
1 5

<210> 25  
<211> 5

# ES 2 427 852 A1

<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido de localización nuclear

<400> 25

Gln Pro Lys Lys Pro  
1 5

<210> 26  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido de localización nuclear

<400> 26

Arg Lys Lys Arg  
1

<210> 27  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido de localización nuclear

<400> 27

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln  
1 5 10

<210> 28  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido de localización nuclear

<400> 28

Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg Gln Arg  
1 5 10 15

<210> 29  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

# ES 2 427 852 A1

<220>

<223> Péptido de localización nuclear

<400> 29

Met Pro Leu Thr Arg Arg Arg Pro Ala Ala Ser Gln Ala Leu Ala Pro  
1 5 10 15

Pro Thr Pro

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de localización nuclear

<400> 30

Gly Ala Ala Leu Thr Ile Leu Val  
1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de localización nuclear

<400> 31

Gly Ala Ala Leu Thr Leu Leu Gly  
1 5

<210> 32

<211> 201

<212> PRT

<213> *Xenopus laevis*

<400> 32

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

Leu Ile Trp Gly Cys Glu Leu Asn Glu Gln Asn Lys Thr Phe Glu Phe  
20 25 30

Lys Val Glu Asp Asp Glu Glu Lys Cys Glu His Gln Leu Ala Leu Arg  
35 40 45

ES 2 427 852 A1

Thr Val Cys Leu Gly Asp Lys Ala Lys Asp Glu Phe His Ile Val Glu  
50 55 60

Ile Val Thr Gln Glu Glu Gly Ala Glu Lys Ser Val Pro Ile Ala Thr  
65 70 75 80

Leu Lys Pro Ser Ile Leu Pro Met Ala Thr Met Val Gly Ile Glu Leu  
85 90 95

Thr Pro Pro Val Thr Phe Arg Leu Lys Ala Gly Ser Gly Pro Leu Tyr  
100 105 110

Ile Ser Gly Gln His Val Ala Met Glu Glu Asp Tyr Ser Trp Ala Glu  
115 120 125

Glu Glu Asp Glu Gly Glu Ala Glu Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
130 135 140

Glu Asp Gln Glu Ser Pro Pro Lys Ala Val Lys Arg Pro Ala Ala Thr  
145 150 155 160

Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Leu Asp Lys Glu Asp Glu  
165 170 175

Ser Ser Glu Glu Asp Ser Pro Thr Lys Lys Gly Lys Gly Ala Gly Arg  
180 185 190

Gly Arg Lys Pro Ala Ala Lys Lys Val  
195 200

<210> 33  
<211> 81  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Residuos 1-81 de la galactosiltransferasa humana

<400> 33

Met Arg Leu Arg Glu Pro Leu Leu Ser Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly  
1 5 10 15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu  
20 25 30

ES 2 427 852 A1

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Ser  
 35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln Gly Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu Leu Arg Thr Gly  
 65 70 75 80

Gly

<210> 34  
 <211> 550  
 <212> PRT  
 <213> Photinus pyralis

<400> 34

Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro  
 1 5 10 15

Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg  
 20 25 30

Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu  
 35 40 45

Val Asn Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala  
 50 55 60

Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val  
 65 70 75 80

Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu  
 85 90 95

Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg  
 100 105 110

Glu Leu Leu Asn Ser Met Asn Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val  
 115 120 125

Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro  
 130 135 140

ES 2 427 852 A1

Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly  
145 150 155 160

Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe  
165 170 175

Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile  
180 185 190

Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val  
195 200 205

Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp  
210 215 220

Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val  
225 230 235 240

Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu  
245 250 255

Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu  
260 265 270

Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val  
275 280 285

Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr  
290 295 300

Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser  
305 310 315 320

Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile  
325 330 335

Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr  
340 345 350

Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe  
355 360 365

Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val  
370 375 380

# ES 2 427 852 A1

Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly  
 385 390 395 400

Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly  
 405 410 415

Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe  
 420 425 430

Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln  
 435 440 445

Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile  
 450 455 460

Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu  
 465 470 475 480

Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys  
 485 490 495

Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu  
 500 505 510

Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly  
 515 520 525

Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys  
 530 535 540

Gly Gly Lys Ser Lys Leu  
 545 550

<210> 35  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de localización en mitocondria

<400> 35

Arg Arg Ile Val Val Leu His Gly Tyr Gly Ala Val Lys Glu Val Leu  
 1 5 10 15



# ES 2 427 852 A1

Leu Asn His Lys  
20

<210> 36  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Aminoácidos 74-95 del citocromo P450 2E1 de rata

<400> 36

Ser Arg Arg Ile Val Val Leu His Gly Tyr Lys Ala Val Lys Glu Val  
1 5 10 15

Leu Leu Asn His Lys Asn  
20

<210> 37  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia del precursor de citocromo c oxidasa IV de levadura

<400> 37

Met Leu Ser Leu Arg Gln Asp Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg  
1 5 10 15

Thr Leu Cys Ser Ser Arg  
20

<210> 38  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 38

Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys Leu Phe  
1 5 10

<210> 39  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido de localización en mitocondria

# ES 2 427 852 A1

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (7)..(8)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (32)..(32)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 39

Met Leu Phe Asn Leu Arg Xaa Xaa Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg His  
1 5 10 15

Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Xaa  
20 25 30

<210> 40  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia de direccionamiento a la ruta secretora

<400> 40

Met Met Ser Phe Val Ser Leu Leu Leu Val Gly Ile Leu Phe Trp Ala  
1 5 10 15

Thr Glu Ala Glu Gln Leu Thr Lys Cys Glu Val Phe Gln  
20 25

<210> 41  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Gly Thr Ala Arg Ile Ala Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys  
1 5 10 15

Pro Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ala Leu  
20 25

<210> 42  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

# ES 2 427 852 A1

<400> 42

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

Arg Arg Leu Pro Val Pro Arg Ala Lys  
20 25

<210> 43

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Val Leu Leu Leu Ile Leu Ser Val Leu Leu Leu Lys Glu Asp Val  
1 5 10 15

Arg Gly Ser Ala  
20

<210> 44

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Ala Ser Pro Arg Ser Ser Gly Gln Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro  
1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Ala Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu  
20 25 30

Leu Pro Leu Ala Pro Gly  
35

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Leu Leu Ser Val Pro Leu Leu Leu Gly Leu Leu Gly Leu Ala Val  
1 5 10 15

Ala

# ES 2 427 852 A1

<210> 46  
 <211> 2288  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 46  
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtaa ggggctcaca 60  
 gtagcaggct tgaggctctgg acatatatat gggtgacaat gacatccact ttgcctttct 120  
 ctccacagggt gtccactccc aggtccaact gcagcagcct ggggctgagc ttgtgaagcc 180  
 tggggcttca gtgaagctgt cctgcaaggc ttctggctac accttcacca gctactggat 240  
 gcactgggtg aagcagaggc ctggacgagg ccttgagtgg attggaagga ttgatcctaa 300  
 tagtggtggt actaagtaca atgagaagtt caagagcaag gccacactga ctgtagacaa 360  
 accctccagc acagcctaca tgcaagctcag cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta 420  
 ttattgtgca agatacgatt actacggtag tagctacttt gactactggg gccaaaggc 480  
 cactctcaca gtctcctcag gtgagtcctt acaacctctc tcttctattc agcttaaata 540  
 gattttactg catttgttgg gggggaaatg tgtgtatctg aatttcaggt catgaaggac 600  
 tagggacacc ttgggagtca gaaaggggtca ttgggagccc tggctgatgc agacagacat 660  
 cctcagctcc cagacttcat ggccagagat ttatagggat ctctagaaga atgcagcata 720  
 cactcctatt tcaaggggta ctggcaagag aaaaggactt tccttgggac tggccacatt 780  
 aacactatta gggaggacac agaacagtgt aaagaatgag gaaggggaag gaaggtggct 840  
 gagtttaaca ggttctcatc aagaggtctg agctgtgtag aacaagtaac agatagtagc 900  
 cagctacatc aagagagaaa ggctgcccac acagggaaag catagggtag gaggttgttg 960  
 gttatcctca gaaagcaggg accaaggtcc aaggagagct aaacccatgg atagagacct 1020  
 agaaccaaga ttaggagacc agagcttgaa taagcatagt agactaaaaa ggggcttctg 1080  
 aaaggcatca tcactaaagg atcagggttc atgggactag agagatggct gagtggtgaa 1140  
 aaggaatagc tactctttca gaggaccag gttcagctaa caacaaccag atggcatctt 1200  
 acaatggact gtaagaaaca ccagtttctg ggtattcacc gtcctttct accagcacag 1260  
 ccatcgggca cacacataat acacaaattc acacatcgaa aataaaaaac atggaaaaat 1320  
 taaggtcaca gtgcaagctc tggaggtgga aatttctgac actgcttgcc tcagatcaat 1380  
 tgtagaagac acggttctaa gagcaaagct aagaacagaa tctctccaaa tatccgaggc 1440  
 cactgataag aaaaagctca cacattctcc tctcttgag ccaaaacaac accccatca 1500  
 gtctatccac tggcccctgg gtgtggagat acaactgggt cctccgtgac tctgggatgc 1560  
 ctggtcaagg gctacttccc tgagtcagtg actgtgactt ggaactctgg atccctgtcc 1620

# ES 2 427 852 A1

agcagtgtgc acaccttccc agctctcctg cagtctggac tctacactat gagcagctca 1680  
 gtgactgtcc cctccagcac ctggccaagt cagaccgtca cctgcagcgt tgctcaccca 1740  
 gccagcagca ccacggtgga caaaaaactt ggtgagagga cattcagggg aggagggatt 1800  
 caccagagtt gaggcaaagg tattagccta tctaaaccag ccaggctggg atccatcacc 1860  
 aaggaggtga ccttagccca ggggaagaggg agatactgtc tctgcctccc tcttggaac 1920  
 atctagctat gaccacctac actcaaggac atgatcctct gggataggtg tgcttgtcat 1980  
 ttccaggatc atcctggact aagcccatac cagggacaaa ctttcctctc tctggtttg 2040  
 tgcttctctc cttcaaaaac cagtaacatc cagccttctc tctgcagagc ccagcgggcc 2100  
 catttcaaca atcaaccctt gtcctccatg caaggagtgt cacaaatgcc caggtaagtc 2160  
 actaccagag ctccactccc aggagaaatgg taagtgtgtg aaaaatccct gtaatggagg 2220  
 ataagccatg taaaaatcca tttccatctc tctcatcag ctcctaacct cgacgggatc 2280  
 gataagct 2288

<210> 47  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 47

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Lys Gly Leu Thr Val Ala Gly Leu Arg Ser Gly His Ile Tyr Gly  
 20 25 30

<210> 48  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido de retención en el retículo endoplásmico

<400> 48

Lys Asp Glu Leu  
 1

<210> 49  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

## ES 2 427 852 A1

<220>

<223> Péptido de retención en el retículo endoplásmico

<400> 49

Asp Asp Glu Leu

1

<210> 50

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de retención en el retículo endoplásmico

<400> 50

Asp Glu Glu Leu

1

<210> 51

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de retención en el retículo endoplásmico

<400> 51

Gln Glu Asp Leu

1

<210> 52

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de retención en el retículo endoplásmico

<400> 52

Arg Asp Glu Leu

1

<210> 53

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de retención en el retículo endoplásmico

# ES 2 427 852 A1

<400> 53

Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn  
1 5

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Residuos 49-57 de la proteína TAT de HIV

<400> 54

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg  
1 5

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante sintética del péptido de residuos 49-57 de la proteína TAT de HIV

<400> 55

Tyr Ala Arg Lys Ala Arg Arg Gln Ala Arg Arg  
1 5 10

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante sintética del péptido de residuos 49-57 de la proteína TAT de HIV

<400> 56

Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg  
1 5 10

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante sintética del péptido de residuos 49-57 de la proteína TAT de HIV

# ES 2 427 852 A1

<400> 57

Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala  
1 5 10

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante sintética del péptido de residuos 49-57 de la proteína TAT de HIV

<400> 58

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala  
1 5 10

<210> 59

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia derivada de la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia

<400> 59

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
1 5 10 15

<210> 60

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sentido para la amplificación de apoacuorina

<400> 60

ttggtaccgg taaacttaca tcagacttc

29

<210> 61

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido para la amplificación de apoacuorina

<400> 61

ccgaattctt aggggacagc tccaccg

27



## ES 2 427 852 A1

<210> 62  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sentido para la amplificación de GFPuv

<400> 62  
ccaaagcttg ccaccatggc tagcaaagga 30

<210> 63  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido antisentido para la amplificación de GFPuv

<400> 63  
ttggtaccgc gttttagag ctcac 25

<210> 64  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido de hibridación

<400> 64  
agcgaccca gcaaccacgc cgaccactgc accgaccgcg ggtac 45

<210> 65  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido de hibridación

<400> 65  
ccgcggtcgg tgcagtggtc ggcgtggttg ctggggtcgc tgtac 45