

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 501 545**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2009 E 09702668 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 2245455**

54 Título: **Método para distinguir gránulos secretores de distintas edades**

30 Prioridad:

17.01.2008 EP 08000875

25.02.2008 EP 08003393

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.10.2014

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN
MEDIZINISCHE FAKULTÄT CARL GUSTAV
CARUS (100.0%)
Fiedlerstrasse 42
01307 Dresden, DE**

72 Inventor/es:

**SOLIMENA, MICHELE y
IVANOVA, ANNA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 501 545 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para distinguir gránulos secretores de distintas edades

5 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para detectar gránulos secretores (GS) de diferente edad en una célula marcando diferencialmente dichos GS según su edad, como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, que comprende (a) poner en contacto una célula que puede formar GS y que expresa una proteína de fusión que comprende (i) un (poli) péptido específico para GS y (ii) un (poli) péptido que tiene un sitio de unión común para al menos tres sustancias diferentes A, B y C que se unen covalentemente al mismo, en donde dichas
10 sustancias son capaces de penetrar la membrana celular y en donde al menos las sustancias A y C son detectables por medios diferentes con una sustancia A que se dirige a dicho sitio de unión, (b) saturar dichos sitios de unión poniendo en contacto la célula con una sustancia B que bloquea los sitios de unión que no estaban unidos a la sustancia A, (c) permitir que la sustancia B sin unir se elimine de la célula o eliminar la sustancia B sin unir de la célula, (d) poner en contacto la células con una sustancia C que se dirige al dicho sitio de unión en la proteína de fusión que se vuelve disponible para la unión después del paso (b) y (e) detectar la presencia de ambas sustancia
15 detectables A y C, en donde la detección simultánea de ambas sustancias A y C es indicativa de la presencia de poblaciones de GS que tienen una edad diferente. Además, la presente invención se refiere a un método *in vitro* de investigar en una célula el efecto de un estímulo sobre gránulos secretores (GS) marcados diferencialmente según su edad.

20 En esta especificación, se citan un número de documentos incluyendo solicitudes de patente y manuales de fabricantes. La divulgación de estos documentos, mientras que no se considera relevante para la patentabilidad de esta invención, se incorpora al presente documento mediante referencia en su totalidad. Más específicamente, todos los documentos referenciados se incorporan mediante referencia al mismo grado que si cada documento individual se indicara específica e individualmente que se incorpora mediante referencia.

25 Los gránulos secretores (GS) son los orgánulos dedicados al almacenamiento de hormonas peptídicas en células endocrinas secretoras de péptidos. Los estímulos químicos indican la fusión de los GS con la membrana plasmática y la liberación de su contenido en el espacio extracelular. Como la mayoría de las proteínas secretoras, las hormonas peptídicas se translocan cotraduccionalmente a la luz del retículo endoplásmico rugoso, después se transportan al complejo de Golgi y por último se separan en GS nacientes. A lo largo de esta ruta las hormonas peptídicas pueden sufrir múltiples modificaciones postraduccionales, incluyendo corte proteolítico y glicosilación. Por tanto, la generación de GS es un proceso lento, que requiere más de 30 minutos. Como la estimulación sostenida produce una disminución progresiva de GS, las células deben activar rápidamente los mecanismos traduccionales y postraduccionales para renovar su conjunto de estos orgánulos.

30 Desde su descubrimiento por microscopía electrónica hace más de cincuenta años los gránulos secretores (GS, también conocidos como vesículas de núcleo denso grande) de las células neuroendocrinas han atraído la atención de los biólogos celulares. Esto es debido a que son los orgánulos neuroendocrinos predominantes, tienen un contenido denso a los electrones, y son responsables de la liberación regulada de hormonas peptídicas y neuropéptidos. Los GS son orgánulos esféricos encerrados por membrana con el diámetro de varios cientos de nm. Cuando los gránulos se originan en la red del trans-Golgi (TGN) aún son inmaduros. El procesamiento y empaquetamiento progresivo de cargas de péptidos produce la condensación creciente de su núcleo electrodenso y su conversión de GS maduros (Glombik y Gerdes, 2000). Los GS típicamente se distinguen en base a su aspecto
35 morfológico y alta inmunorreactividad para hormonas peptídicas específicas de tipo celular y otras cargas más amplias, incluyendo cromogranina A (CgA), B (CgB) y secretograninas II-IV (Taupenot et al., 2003), así como enzimas de procesamiento de prohormonas, incluyendo prohormona convertasas 1/3 (PC 1/3) y 2 (PC2) y carboxipeptidasa E/H (CPE) (Steiner, 1998). Como se ha propuesto recientemente (Meldolesi et al., 2004), los criterios adicionales mínimos para reconocer SG maduros auténticos también deben comprender su almacenamiento prolongado en células en reposo; la inclusión de proteínas v-SNARE específicas que son esenciales para la fusión regulada de GS con la membrana plasmática, y la falta de marcadores endosómicos o lisosómicos. A pesar de sus propiedades distintivas de otros orgánulos, los GS son una población vesicular heterogénea incluso en un tipo de células individual. Por ejemplo, se pueden diferenciar en tamaño y cinética de liberación de contenido (Perrais et al., 2004; Grabner et al., 2005; Michael et al., 2006). Algunas de estas diferencias
40 pueden depender del envejecimiento de los GS, ya que la condensación del contenido puede reducir progresivamente el tamaño del gránulo y la velocidad con la que las cargas se disuelven en el espacio extracelular. El envejecimiento también puede afectar la probabilidad de que los GS secretores experimenten exocitosis, siendo los GS recién generados preferentemente liberados (Duncan et al., 2003; Solimena y Gerdes, 2003). Un vez que un GS maduro se forma, retiene su identidad a lo largo del ciclo exoendocítico. Después de la exocitosis, en particular, las membranas de los GS se recapturan principalmente intactas (Taraska et al., 2003), aunque algunas proteínas transmembrana como sinaptotagmina-1 y la V-SNARE VAMP2/sinaptobrevina2 pueden difundir de sitios de exocitosis (Tsuboi et al., 2004), mientras que la cola citosólica de ICA512/IA-2 se puede salvar (Borgonovo et al., 2006).

65 Duncan et al. (2003) encontraron que los gránulos están espacial y funcionalmente segregados según su edad. Sin embargo, hasta ahora, no se conoce método viable, fiable y rápido para distinguir GS de diferentes edades. Tal

método sería muy ventajoso, por ejemplo, para examinar adicionalmente la función de los GS y para proporcionar métodos para cribar compuestos potencialmente útiles para tratar enfermedades asociadas con defectos en la síntesis y/o secreción de GS.

5 Roberti *et al.* 2007 (Nature Methods, 4:345-351) describe imagenología fluorescente de los procesos dinámicos que producen depósitos amiloides en células vivas empleando una proteína de fusión de α -sinucleína y una etiqueta de tetracisteína como diana para compuestos biarsénicos fluorogénicos.

10 Adams *et al.* 2002 (Am. Chem. Soc., 124:6063-6076) describe ligando biarsénicos y motivos tetracisteína para el marcaje de proteínas *in vitro* e *in vivo* así como un huésped, es decir, células HeLa, que expresa una proteína de fusión de sinaptobrevina y una etiqueta de tetracisteína.

La solución a este problema técnico se logra proporcionando las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones.

15 Según esto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* de detectar gránulos secretores (GS) de diferentes edades en una célula marcando diferencialmente dichos GS según su edad, como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, que comprende (a) poner en contacto una célula que puede formar GS y que expresa una proteína de fusión que comprende (i) un (poli)péptido específico para GS y (ii) un (poli)péptido que tiene un sitio de unión común para al menos tres sustancias diferentes A, B y C que se unen covalentemente al mismo, en donde dichas sustancias son capaces de penetrar la membrana celular y en donde al menos las sustancias A y C son detectables por medios diferentes con una sustancia A que se dirige a dicho sitio de unión, (b) saturar dichos sitios de unión poniendo en contacto la célula con una sustancia B que bloquea los sitios de unión que no estaban unidos a la sustancia A, (c) permitir que la sustancia B sin unir se elimine de la célula o eliminar la sustancia B sin unir de la célula, (d) poner en contacto la células con una sustancia C que se dirige al dicho sitio de unión en la proteína de fusión que se vuelve disponible para la unión después del paso (b) y (e) detectar la presencia de ambas sustancia detectables A y C, en donde la detección simultánea de ambas sustancias A y C es indicativa de la presencia de poblaciones de GS que tienen una edad diferente.

30 El término “marcar diferencialmente dichos GS según su edad” como se usa en la presente invención significa que las poblaciones de GS que tienen una edad diferente se pueden marcar dependiendo de su edad. El principio del método de la invención es marcar los GS presentes en una célula y, después de un cierto tiempo, marcar los GS recién formados de modo distinto.

35 El término “poner en contacto” según la presente invención indica la aplicación de sustancias a la célula. “Poner en contacto” comprende poner en contacto directamente la célula con la sustancia así como transfectar o transformar una célula con un ácido nucleico que codifica una sustancia, en este caso un (poli)péptido.

40 Las células capaces de formar GS son células neuroendocrinas tales como células beta de los islotes pancreáticos, otros tipos de células de los islotes pancreáticos, células cromafines de la médula suprarrenal, células de la hipófisis, células neuroendocrinas del aparato digestivo y neuronas del sistema nervioso central y periférico. Las células neuroendocrinas son un grupo especializado de células que producen hormonas peptídicas y neuropéptidos. Empaquetan las hormonas en vesículas, algunas veces junto con aminas y mediante otras moléculas de señalización especializadas derivadas de aminoácidos, y secretan estas hormonas mediante exocitosis en el torrente sanguíneo o en los alrededores neuronales tras la estimulación por varios agentes, por ejemplo, nutrientes, hormonas y neurotransmisores. Las hormonas viajan después a sus células diana y pueden estimular, inhibir o mantener al menos una función de estas células. Las células diana pueden retroalimentar información a estas células neuroendocrinas que regulan la secreción adicional.

50 El término “específico para GS” caracteriza (poli)péptidos o proteínas que específicamente se producen en GS o están específicamente enriquecidos en o sobre los GS.

El término “que expresa una proteína de fusión” se refiere a la transcripción y traducción de proteínas de fusión usando elementos de control apropiados que funcionan en la célula elegida. Para este fin, la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión según la invención que no es natural en la célula examinada se puede clonar en un vector de expresión adecuado, cuya composición, generalmente, depende del sistema de expresión. Para la presente invención, el sistema de expresión es eucariota, preferiblemente mamífero. Un vector de expresión en mamíferos típico contiene un elemento promotor, que media el inicio de la transcripción del ARNm, la secuencia que codifica la proteína, y señales requeridas para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcrito. Los elementos adicionales pueden incluir potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donantes y aceptores para ajuste de ARN. Se puede lograr transcripción muy eficaz con los promotores temprano y tardío de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, por ejemplo, RSV, HTLV1, HIV1, y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también se pueden usar elementos celulares (por ejemplo, el promotor de actina humana).

65

Alternativamente, las proteínas de fusión se pueden expresar en líneas celulares estables que contienen la construcción génica integrada en un cromosoma. La cotransfección con un marcador seleccionable tal como dhfr, gpt, neomicina, higromicina, permite la identificación y aislamiento de las células transfectadas. El ácido nucleico transfectado también se puede amplificar en la célula para expresar grandes cantidades del (poli)péptido codificado.

5 El marcador dhfr (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que tienen varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy et al.1991, *Biochem J.* 227:277-279; Bebbington et al. 1992, *Bio/Technology* 10:169-175). Usando estos marcadores, las células de mamífero se hacen crecer en medio selectivo y se seleccionan las células con la mayor resistencia. Los medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huésped descritas anteriormente se conocen en la técnica.

El término "(poli)péptido" como se usa en el presente documento describe un grupo de moléculas que comprende el grupo de péptidos, que consisten en hasta 30 aminoácidos, así como el grupo de polipéptidos, que consisten en más de 30 aminoácidos. En el último caso, el término "polipéptido" se usa intercambiamente con "proteína". También

15 en línea con la definición del término "(poli)péptido" se pueden describir fragmentos de proteína. Los (poli)péptidos pueden formar además dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en más de una molécula de (poli)péptido. Las moléculas de (poli)péptido que forman tales dímeros, trímeros etc., pueden ser idénticas o no idénticas. Las estructuras de orden superior correspondientes se denomina, consecuentemente, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros, etc. Los términos "polipéptido" y "proteína" también se refieren a

20 polipéptidos/proteínas naturalmente modificados en donde la modificación se efectúa, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Tales modificaciones se conocen bien en la técnica.

El término "sitio de unión común para al menos tres sustancias diferentes A, B y C que se unen covalentemente al mismo" caracteriza un área localizada en un (poli)péptido al que se unen al menos tres sustancias diferentes

25 específica y covalentemente. A este respecto los sitios de unión pueden ser idénticos o solapantes al grado de que tan pronto como una sustancia A, B o C se une, ninguna de las sustancias restantes se puede unir ya. En contexto con la presente invención, la unión tiene que ser covalente para evitar la competición de las sustancias A, B o C entre sí para el sitio de unión común en la proteína de fusión. Si estuviera presente la competición, el resultado del método de la invención dependería en parte de las afinidades de unión de cada sustancia y por tanto no sería fiable.

30 Además, la unión de las tres sustancias específicamente se produce en dicho (poli)péptido y no en cualquier otro (poli)péptido u otra estructura no proteinacea presente en la célula en la se lleva a cabo el método.

Una sustancia que se une específica y covalentemente a un (poli)péptido es útil en la presente invención si es posible modificar dicha sustancia por acoplamiento alternativo de uno de un repertorio de al menos dos compuestos detectables, preferiblemente fluorescentes a la misma al tiempo que retiene su especificidad de unión al

35 (poli)péptido. Esto produce al menos dos sustancias detectables diferentes. La tercera sustancia necesaria para el método de la presente invención sería entonces la sustancia inicial antes de las modificaciones efectuadas. A este respecto, los sitios de unión diana adecuados en la presente invención pueden ser cualquier sitio de unión para una sustancia en un (poli)péptido. Los ejemplos para tales (poli)péptidos comprenden los que tienen un sitio de unión

40 para una sustancia que no se une a cualquier otra estructura proteinacea o no proteinacea en la células examinada. La unión puede tener lugar mediante reacciones catalíticas, es decir, una sustancia también se puede unir enzimáticamente al (poli)péptido usando una enzima que específicamente modifica solo dicho (poli)péptido. Los ejemplos de tales enzimas son quinasas, fosfatasa o ligasas específicas. Un ejemplo de una enzima que se sabe que se asocia específicamente con los GS es la peptidilglicina alfa-amidante monooxigenasa (PAM), que actúa tanto

45 como una monooxigenasa y una liasa y que es necesaria para amidar el extremo carboxi de muchas hormonas neuropeptídicas, tales como vasopresina, oxitocina, sustancia P o gastrina. La solicitud de patente internacional WO 2004/104588 divulga un método para marcar covalentemente proteínas de fusión de proteína transportadora de acilo (ACP) con una amplia variedad de marcadores diferentes. El método se basa en la transferencia de un marcador desde un sustrato tipo coenzima A a una proteína de fusión de ACP usando una proteína transportadora de holoacilo sintasa (ACPS) o un homólogo de la misma. El método permite detectar la proteína de fusión, tanto in vitro

50 como in vivo, uniendo moléculas a las proteínas de fusión que introducen una propiedad física o química nueva a la proteína de fusión.

El (poli)péptido al que se unen específica y covalentemente al menos tres sustancias diferentes es preferiblemente una enzima que experimenta un proceso de inactivación cuando actúa sobre un sustrato (inactivación suicida) producido por el sustrato o un producto de degradación del mismo que se une covalentemente a la enzima. Hasta

55 ahora, se conocen varios (poli)péptidos que ejercen las propiedades anteriores. Los ejemplos notables son SNAP-tag (descrito en las solicitudes de patente internacionales WO 02/083937 y WO2006/021553) y HaloTag, ambos también descritos en detalle más adelante. El SNAP-tag, por ejemplo, comprende una enzima que forma un enlace covalente con un grupo alquilo en su sustrato, un derivado de la base guanina. Se pueden generar un número de

60 diferentes sustratos para el SNAP-tag uniendo un compuesto deseado, por ejemplo, un fluoróforo, al derivado de la base guanina. Los ejemplos adicionales de enzimas naturales que experimentan una inactivación suicida son xantina oxidorreductasa, quinoproteína alcohol deshidrogenasas y ADN metiltransferasas.

En una alternativa adicional, el (poli)péptido al que se unen específica y covalentemente al menos tres sustancias diferentes comprende un sitio de unión reactivo a ciertos compuestos químicos. Un ejemplo notable es el motivo

tetracisteína In-Cell Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys donde Cys equivale a cisteína y Xaa equivale a cualquier aminoácido diferentes de cisteína (descrito adicionalmente posteriormente) comprendido en (poli)péptidos. Este motivo se ve raramente en proteínas naturales lo que permite el marcaje fluorescente específico de proteínas recombinantes fusionadas a TC-tag por unión covalente de compuestos biarsénicos marcados fluorescentemente.

5 El término “proteína de fusión” se refiere a proteínas quiméricas que consisten en secuencias derivadas de al menos dos moléculas diferentes. Según la presente invención, en proteínas de fusión ejemplares, un (poli)péptido específico para GS se fusiona a un (poli)péptido que tiene un sitio de unión común para al menos tres sustancias diferentes A, B y C que se unen covalentemente a dicho sitio de unión común. La fusión se puede realizar por cualquier técnica que conoce el experto en la materia, siempre que produzca la fusión en el mismo marco de lectura de las moléculas de ácido nucleico que codifican los componentes de las proteínas de fusión de la invención. La fusión de los componentes se puede efectuar en cualquier orden. Convencionalmente, la generación de una proteína de fusión de dos o más (poli)péptidos o dominios separados se basa en el “ajuste bilateral por extensión de la superposición” descrito en Horton R., et al., 1989, Gene 77:61-68. Los fragmentos que codifican los (poli)péptidos se generan en dos reacciones de PCR primarias separadas. Los cebadores internos para las reacciones de PCR primarias contienen una región complementaria significativa, aproximadamente 20 pb, lo que permite la fusión de los dos fragmentos de los dominios en la segunda PCR. Alternativamente, las regiones codificantes se pueden fusionar haciendo uso de sitios de restricción, que pueden ser naturales o introducidos por tecnología de ADN recombinante.

20 La fusión de un (poli)péptido que tiene un sitio de unión común para al menos tres sustancias diferentes con un (poli)péptido específico para GS se hace para no afectar o alterar la función biológica de cualquiera de los (poli)péptidos componentes, especialmente el específico para GS. De otra manera, la función biológica alterada puede conducir a un comportamiento alterado de los GS y por tanto a resultados no fiables tras practicar el método de la presente invención. El experto en la materia conoce métodos para probar la actividad biológica de una proteína de fusión y compararla con la de cada componente separado.

30 El término “capaz de penetrar la membrana celular” indica la capacidad de sustancias de translocarse a través de la membrana celular para poder unirse a su estructura diana en la célula. Varias sustancias son capaces de penetrar la membrana celular por sí, por ejemplo, sustancias o (poli)péptidos lipofílicos tales como la proteína TAT de VIH-1, la proteína de unión a ADN VP22 del virus del herpes simple (HSV-1), y el factor de transcripción homeótico antenapedia (Antp) de Drosophila, cuyas secuencias de aminoácidos y estructuras tienen características que permiten su absorción en la célula.

35 Las sustancias pueden ser “detectables” por diferentes medios. Las sustancias ejemplares emiten cualquier tipo de radiación detectable tal como luz (por ejemplo, luz fluorescente o quimioluminiscente). “Detectable por diferentes medios” indica diferentes principios de detección, por ejemplo, luz visible frente a luz UV o, por ejemplo, en el caso de diferentes sustancias fluorescentes, básicamente propiedades de detección similares pero aún distinguibles.

40 El término “saturar” se refiere al suministro de una cantidad suficiente de una sustancia de modo que todos los sitios de unión en el (poli)péptido que tiene un sitio común de unión para al menos tres sustancias A, B y C estén ocupados. En otras palabras, con un exceso de cualquiera de las sustancias A, B o C, la unión a dicho (poli)péptido es cuantitativa.

45 El término “permitir que la sustancia B sin unir se elimine de la célula o eliminar la sustancia B sin unir de la célula” indica un proceso en donde la célula se incubaba y la sustancia bien es eliminada activamente por la célula mediante procesos de transporte o la sustancia difunde fuera de la célula debido a diferencias de concentración. Alternativamente, el experimentador puede realizar activamente el proceso cambiando el medio de cultivo una vez o con más frecuencia, o lavando la célula.

50 El término “volverse disponible para la unión después del paso (b)” indica el proceso de expresar y formar nuevos GS después de que la sustancia B se haya unido a los GS expresados hasta entonces. Por tanto, los nuevos GS se pueden formar durante o después de eliminar la sustancia B sin unir.

55 Los inventores presentes han encontrado sorprendentemente que los GS se pueden marcar diferencialmente de forma fiable según su edad aplicando una técnica basada en la detectabilidad de las sustancias que tienen un sitio de unión común en o sobre los GS. El método de la presente invención se basa en el hecho de que varias sustancias se pueden unir al mismo o al menos sitios de unión solapantes en un (poli)péptido. Esta propiedad de (poli)péptidos, sean (poli)péptidos tales como SNAP-tag que forman parte de una proteína de fusión que comprende además un (poli)péptido específico para GS, se usó por primera vez en relación con el marcaje diferencial de GS. Al poner en contacto los GS con sustancias que se unen específica y covalentemente a proteínas de fusión que comprenden (poli)péptidos específicos para GS, se puede marcar esencialmente la población entera de GS que se ha formado hasta la aplicación de la sustancia de marcaje. Después de ello los sitios de unión potencialmente restantes se saturan y la sustancia sin unir se elimina bien pasivamente (por difusión y/o dilución) o activamente de la célula. Durante y después del tiempo asignado para que se elimine la sustancia, la célula puede expresar y formar nuevos GS que comprenden una proteína de fusión que comprende un (poli)péptido específico para GS y un (poli)péptido que tiene un sitio de unión común para al menos tres sustancias A, B y C que se unen covalentemente

al mismo. Puesto que estos GS aún no se han puesto en contacto con una sustancia detectable aún no se han marcado. En un segundo paso de marcaje, los GS recién formados se marcan según la primera población marcada pero con un sustrato detectable por diferentes medios. Por ejemplo, si la sustancia A comprende una fracción fluorescente detectable tras excitación con una cierta longitud de onda, la sustancia C podría comprender bien una fracción detectable fluorescente a una longitud de onda diferente de la sustancia A o una fluorescencia emisora a una longitud de onda diferente que la sustancia A tras la excitación con la misma o diferente longitud de onda.

Duncan et al. (2003) han analizado la distribución de los GS dependiente de la edad en células cromafines. Esto se realizó conjugando la proteína específica de GS ANF a la proteína cronómetro dsRed-E5 (el cronómetro de GFP) que cambia progresivamente su emisión de fluorescencia de verde a amarillo y por último a rojo en 16 horas de media en contexto con el proceso de maduración de la proteína. Durante la maduración, un fluoróforo de la línea GFP se modifica para producir un fluoróforo rojo (Terskikh et al., 2000). La separación espaciotemporal de los gránulos recién sintetizados era aparente de las vesículas de menos de 3 días de edad que eran amarillas; las vesículas más viejas aparecían rojas y las más jóvenes verdes. Una desventaja principal de dicho método es que las moléculas cronómetro de GFP no envejecen en el mismo intervalo de tiempo o al mismo nivel. Por tanto, mientras algunas moléculas cronómetro de GFP cambian su longitud de onda de emisión con una cierta velocidad, algunas otras moléculas cronómetro de GFP igualmente viejas, cambian su longitud de onda de emisión con una velocidad diferente o incluso no la cambian. Como consecuencia, las moléculas cronómetro de GFP presentes en los GS de la misma edad no emplean necesariamente la misma longitud de onda de emisión, limitando de esta manera la precisión con la que la edad de los GS se puede evaluar. Además, de media, el cronómetro de GFP cambia su longitud de onda de emisión durante un cierto tiempo. Según esto, para detectar el envejecimiento de los GS, las longitudes de onda de emisión tienen que tener una cierta distancia en el espectro para poder distinguirlas. Esto produce la imposibilidad de examinar el comportamiento de los GS cuyas edades se diferencian en menos del tiempo necesario para que el cronómetro de GFP cambie su longitud de emisión a una distinguible de la longitud de onda inicial. Por otra parte, si se prevé para los experimentos un intervalo de tiempo mayor que el tiempo máximo necesario para un cambio de verde a rojo, todas las moléculas cronómetro de GFP en cualquier GS emitirán luz roja de modo que no es posible ya ninguna distinción de poblaciones de GS diferencialmente envejecidas. Según esto, el intervalo de tiempo a disposición para los experimentos o cribados es comparablemente estrecho mientras que el método de a presente invención no solo proporciona experimentos controlados sino que también un intervalo de tiempo flexible. El experimentador puede decidir cuantas poblaciones de GS marcar y en que periodo de tiempo. Además, siempre que estén disponibles un número suficiente de sustancias que se unen a dicho sitio de unión común y sean detectables por medios diferentes, se pueden marcar más de dos poblaciones de GS envejecidos de diferente modo.

La presente invención se puso en práctica en el ejemplo de insulina fusionada a SNAP-tag (véanse los ejemplos adjuntos). Se llevó a cabo marcaje de fluorescencia aplicando sustratos fluorescentes de SNAP-tag a la célula que se unieron covalentemente. El estado de la técnica tiene dificultades con el marcaje de gránulos secretores con insulina etiquetada. Como se indica por Tsuboi et al., 2006, el direccionamiento de quimeras insulina-GFP a gránulos secretores se ha demostrado problemático.

Además, respecto al sistema de unión covalente enzimática usado en la presente invención, la tecnología SNAP usada como un ejemplo se basa en la reactividad de una cisteína reducida en el polipéptido SNAP con el sustrato. Sin embargo, las cisteínas de las proteínas secretoras están típicamente oxidadas. Por tanto, el experto en la materia habría esperado que el plegamiento apropiado de hINS-SNAP se podría haber alterado por la cisteína reactiva única en SNAP-tag y producir una de las siguientes posibilidades; 1) hINS-SNAP sin plegar se podría haber degradado en el retículo endoplásmico; 2) hINS-SNAP plegada incorrectamente se podría haber dirigido mal a orgánulos diferentes de los GS; 3) la cisteína reactiva en hINS-SNAP podría haber dirigido la formación de puentes disulfuro con cisteínas libres en otras moléculas. La formación de tales dímeros, además de fomentar la degradación y mal direccionamiento de hINS-SNAP, también podría haber imposibilitado su reactividad con el sustrato. En resumen, el experto en la materia no habría estado motivado para intentar marcar insulina con una sustancia fluorescente no digamos usar las propiedades de enzimas covalentemente modificadas para marcar con una esperanza razonable de éxito.

Es notable que, en contexto con la presente invención, los (poli) péptidos específicos para ciertos tipos de GS no se deben elegir para que coincidan con el tipo de GS expresado en la célula de interés examinada. Tras la transfección con la proteína de fusión de la invención que comprende un (poli) péptido específico para GS, dicha proteína de fusión no se expresará y dirigirá a GS incluso si la célula particular normalmente no produce dicho (poli) péptido en sus GS específicos para diferentes sustancias. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende insulina se puede transfectar en una célula cromafín con la esperanza de que la proteína de fusión se exprese y se dirija a los GS que normalmente contienen epinefrina o norepinefrina.

El método de la presente invención permite estudiar el comportamiento de los GS en la célula durante procesos celulares así como tras la estimulación con radiación o sustancias tales como hormonas, citoquinas, sustancia de bajo peso molecular tales como azúcares, iones, etc.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método in vitro de investigar el efecto de un estímulo en gránulos secretores (GS) diferencialmente marcados según su edad, como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, que comprende (a) poner en contacto una célula que puede formar GS y que expresa una proteína de fusión que comprende (i) un (poli)péptido específico para GS y (ii) un (poli)péptido que tiene un sitio de unión común para al menos tres sustancias diferentes A, B y C que se unen covalentemente al mismo, en donde dichas sustancias son capaces de penetrar la membrana celular y en donde al menos las sustancias A y C son detectables por medios diferentes con a. una sustancia A que se dirige a dicho sitio de unión; y saturar los sitios de unión restantes poniendo en contacto la célula con una sustancia B que bloquea los sitios de unión que no estaban unidos a la sustancia A, o b. una sustancia B que bloquea dichos sitios de unión en una cantidad suficiente para saturar dichos sitios de unión, (b) permitir que la sustancia B sin unir se elimine de la célula o eliminar la sustancia B sin unir de la célula, (c1) aplicar un estímulo a la célula, (d1) poner en contacto la célula con una sustancia C que se dirige a dicho sitio de unión en la proteína de fusión expresada durante y/o después del paso (c), y (e1) detectar la presencia de la sustancia A y/o la sustancia C y/o monitorizar el número, tamaño, motilidad, localización en la célula y/o secreción de los GS diferencialmente marcados obtenidos en el paso (a) y (d1), o (c2) poner en contacto la célula con una sustancia C que se dirige al sitio de unión en la proteína de fusión expresada durante y/o después del paso (c), (d2) aplicar un estímulo a la célula; y (e2) detectar la presencia de la sustancia C y/o monitorizar el número, tamaño, motilidad, localización en la célula y/o secreción de los GS diferencialmente marcados obtenidos en el paso (a) y (c2).

El término “un estímulo” describe el resultado de poner en contacto o el tratamiento de una célula con radiación, tal como luz, calor, radiación radiactiva, o sustancias tales como hormonas, citoquinas, sustancias de bajo peso molecular tales como azúcares, iones o proteínas.

El término “monitorizar el número, tamaño, motilidad, localización en la célula y/o secreción” se refiere a seguir el comportamiento de los GS para monitorizar el desarrollo del número, tamaño, localización, motilidad y/o secreción de los GS. Se prevé que ciertos estímulos sean capaces de inducir o inhibir la expresión, crecimiento, motilidad y/o secreción de GS, que serían detectables en una alteración de cualquiera de las propiedades anteriores. La detección de dichas propiedades está facilitada por la fracción detectable comprendida en las sustancias usadas para el marcaje.

En una forma de realización preferida del segundo aspecto, el estímulo es un agente de prueba y el efecto que se va a investigar es la capacidad del agente de prueba de inducir la formación de gránulos secretores (GS) o su secreción o ambos en una célula, en donde el método comprende además el paso (f) comparar los resultados obtenidos en el paso (e), es decir, (e1) o (e2), con los obtenidos para una célula de referencia que no se ha puesto en contacto con el agente de prueba pero tratada en cualquier caso igualmente, en donde la cantidad de sustancia A y/o C detectada en la célula que es diferente de esa en la célula de referencia es indicativa de la capacidad del agente de prueba para afectar la formación y/o la secreción de GS en la célula.

Un “agente de prueba” puede ser cualquier sustancia química incluyendo una sustancia definida como se define en “estímulo”.

En una forma de realización preferida de la invención, el GS es un gránulo de insulina y el (poli)péptido en el paso (a) 1. es específico para gránulos de insulina.

Las células β de los islotes pancreáticos son las células endocrinas que producen insulina, la hormona más importante para el control de la homeostasis de glucosa en vertebrados. La insulina se almacena en y se secreta de los GS de células β pancreáticas. La glucosa estimula tanto la exocitosis dependiente de Ca^{2+} de gránulos de GS de insulina como la biosíntesis de insulina y otros componentes de los GS (Guest et al., 1989; Guest et al., 1991), incluyendo cromogranina A y las prohormonas convertasas 1/3 (PC1/3) (Alarcon et al., 1993; Martin et al., 1994) y 2 (PC2) (Martin et al., 1994). Cada célula β almacena $\sim 10^4$ gránulos secretores de insulina (Bratanova-Tochkova et al., 2002; Rorsman y Renstrom, 2003). Menos del 5% de ellos son fácilmente liberables, es decir, experimentan exocitosis durante la primera fase de la secreción de insulina, que dura hasta 10 minutos después de la elevación de la glucosa en sangre >5 mM. El restante $>95\%$ de los gránulos pertenece al conjunto de reserva.

Otros gránulos secretores son, por ejemplo, los de las células α de los islotes pancreáticos que secretan la hormona peptídica glucagón o los de las células hipofisarias que secretan hormona de crecimiento o prolactina.

Según la invención, el (poli)péptido de (ii) es un SNAP-tagTM, un HaloTag® o una etiqueta de tetracisteína In-Cell.

Se puede usar SNAP-tagTM (Covalys) para la unión covalente y específica de casi cualquier sustancia química a una proteína de interés tanto in vitro como en células vivas (Keppler et al., 2003). La tecnología SNAP-tag se basa en la forma humana de la proteína de reparación de ADN O6-alquilguanina-ADN alquiltransferasa (AGT). La función fisiológica de AGT es la eliminación de grupos alquilo de las bases de guanina del ADN para evitar mutaciones durante la división celular. La AGT experimenta una reacción suicida clásica ya que el residuo de cisteína en su sitio activo forma un enlace tioéter covalente y estable con el grupo alquilo, lo que permite la liberación de la base guanina desalquilada, original (Keppler et al., 2003; Daniels et al., 2000). Se encontró que AGT puede aceptar

5 cualquier compuesto químico cuando está unida a la base guanina a través del grupo bencilo. Mediante experimentos de evolución directa e ingeniería de proteínas con hAGT se diseñó una enzima más pequeña que tiene una cinética de reacción mucho más rápida y desprovista de interacción con otras biomoléculas tales como ADN bicatenario (Juillerat et al., 2003). Los mecanismos de reacción del sistema SNAP-tag permiten la unión covalente y específica de proteínas diana a cualquier compuesto deseado o superficie sólida y es útil, entre otros, para el marcaje in vitro e in vivo en el método de la presente invención.

10 La tecnología HaloTag® intercambiable (Promega) permite el marcaje rápido, específico de sitio e irreversible de proteínas en células vivas o in vitro. La tecnología está compuesta de la proteína HaloTag, una deshidrolasa genéticamente modificada, que se fusiona a una proteína de interés, y ligandos sintéticos de HaloTag. Las proteínas de fusión se pueden expresar en el extremo C o N de la proteína HaloTag®. La formación de un enlace covalente entre la proteína HaloTag y los ligandos sintéticos puede impartir una variedad de funcionalidades, incluyendo fluorescencia, etiquetas de afinidad y unión directa a una superficie sólida.

15 Los reactivos de marcaje disponibles para marcar usando el motivo tetracisteína In-Cell se unen a un motivo de tetracisteína que consiste en Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys donde Cys equivale a cisteína y Xaa equivale a cualquier aminoácido diferente de cisteína. Este motivo se ve raramente en proteínas naturales lo que permite el marcaje fluorescente específico de proteínas recombinantes fusionadas a TC-Tag. En los kits de detección TC-FIAsH™ TC-ReAsH™ II In-Cell Tretracysteine Tag (todos de Invitrogen), se usa el motivo de tetracisteína optimizado Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys ya que se ha mostrado que este motivo tiene una mayor afinidad por y una unión más rápida a compuestos bismarceánicos así como estabilidad aumentada comparado con otros motivos caracterizados.

En una forma de realización más preferida de la invención, la sustancia B que se une a SNAP-tag es BTP.

25 En una forma de realización preferida adicional de la invención, la sustancia A que se une a SNAP-tag es TMR-Star, BG-505, BG-430 o BG-DAF.

30 En otra forma de realización preferida de esta invención, la sustancia C que se une a SNAP-tag es TMR-Star, BG-505, BG-430 o BG-DAF. La sustancia aplicada en un experimento como sustancia C es diferente de la sustancia aplicada como sustancia A.

Las sustancias disponibles para SNAP-tag se enumeran en la tabla 1 a continuación. Se enumeran sustratos adicionales en la solicitud internacional de patente WO2006/114409.

Sustancia	Máximo de excitación/emisión	fluoróforo	observaciones
SNAP-cell 360	357 nm/437 nm	aminometilcumarina	basado en CP-360 penetrante en células, adecuado para su uso con conjuntos de filtros DAPI
SNAP-cell 430	421 nm/444 nm y 484 nm	fluoróforo fotoestable azul intenso	basado en BG-430 penetrante en células
SNAP-cell 505	504 nm/532 nm	fluoróforo verde fotoestable en la ventana del filtro de fluoresceína	basado en BG-505 penetrante en células
SNAP-cell DAF	500 nm/532 nm	fluoresceína	basado en BG-diacetil fluoresceína (DAF) penetrante en células. DAF se convierte a fluoresceína una vez que ha entrado en la célula
SNAP-cell TMR-Star	554 nm/580 nm	tetrametilrodamina fotoestable	basado en TMR-Star penetrante en células
SNAP-block Cell	basado en bromoteniilpteridina (BTP). BTP es muy penetrante en células y reacciona irreversiblemente con SNAP-tag, bloqueándolo y previniendo que reaccione además con sustratos SNAP-cell. Es útil para generar controles inactivos en experimentos de marcaje celular y también como un bloqueante de proteínas de fusión SNAP-tag nacientes en aplicaciones de pulso y caza.		
SNAP-biotina	permite la biotilización de las proteínas de fusión de SNAP-tag en solución o en células vivas. Las aplicaciones incluyen la captura de proteína de fusión en superficies recubiertas de estreptavidina para ensayos de interacción, detección de proteínas en células fijadas usando conjugados de fluoróforos y estreptavidina.		

35 Tabla 1: sustratos para SNAP-tag y sus propiedades

En una forma de realización preferida adicional del segundo aspecto, el estímulo es una sustancia química, por ejemplo, glucosa, acetilcolina, péptido similar a glucagón 1, exenatida, sulfonilureas, endosulfina, meglitinida, potasio, catecolaminas, glucagón, somatostatina, grelina, diazóxido.

5 En otra forma preferida de la invención, la detección o monitorización se efectúa detectando emisión de fluorescencia después de la excitación a una longitud de onda apropiada, quimioluminiscencia o absorbancia de luz.

En relación con esta forma de realización de la presente invención, la emisión de fluorescencia se detecta usando un microscopio de fluorescencia.

10 Un microscopio de fluorescencia es un microscopio óptico usado para estudiar propiedades de sustancias orgánicas o inorgánicas usando los fenómenos de la fluorescencia y fosforescencia en lugar de, o además de, reflexión y absorción. La muestra se ilumina con luz de una longitud de onda (o longitudes de onda) específica que es absorbida por los fluoróforos, produciendo que emitan longitudes de onda más largas de luz (de un color diferente que la luz absorbida). La luz de iluminación se separa de la fluorescencia emitida mucho más débil mediante el uso de un filtro de emisión. Los componentes típicos de un microscopio de fluorescencia son la fuente de luz (lámpara de descarga de arco de xenón o mercurio), el filtro de excitación, el espejo dicróico (o separador de haz dicromático), y el filtro de emisión (véase la figura posteriormente). Los filtros y el espejo dicróico se eligen para ajustarse a las características de excitación y emisión espectrales del fluoróforo usado para marcar la muestra. La mayoría de los microscopios fluorescentes en uso son microscopios de epifluorescencia (es decir: la excitación y la observación de la fluorescencia don desde encima (epi) de la muestra). Estos microscopios se han convertido en una parte importante en el campo de la biología, abriendo las puertas a diseños de microscopios más avanzados, tal como el microscopio de barrido laser confocal y el microscopio de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF).

25 En una forma de realización más preferida de esta forma de realización, la detección para la presencia de sustancia A y/o sustancia C es cuantitativa.

La detección cuantitativa se puede efectuar con software especializado, por ejemplo, ImageJ, Metamorph, Motiontracking, IPLab y otros.

30 En una forma de realización preferida adicional de la invención, la proteína de fusión se expresa después de introducir un ácido nucleico que codifica dicha proteína de fusión en la célula. La introducción de moléculas de ácido nucleico en células se puede efectuar transfectando los ácidos nucleicos. Los métodos comúnmente usados para la transfección comprenden, pero no están restringidos a, transfección usando lipofección, cloruro de calcio, derivados de polietilenimina, DEAE-dextrano, cañones génicos, electroporación, nucleoporación, magnetofección, microinyección y vectores víricos.

35 En otra forma de realización preferida del primer aspecto de la invención, el método comprende además lavar la célula después del paso (a), (b), (c) y/o (d). En una forma de realización preferida adicional del segundo aspecto, el método comprende además lavar la célula después del paso (a), (b), (c1), (d1), (c2) y/o (d2).

40 El lavado se puede realizar bien con medio de cultivo o con PBS o cualquier tampón adecuado para lavar células tal como solución de Ringer y tampón HEPEs. La duración de los lavados puede variar desde un enjuague rápido hasta varios minutos (por ejemplo, de 2 a 10 minutos). Cada paso único de los anteriores pasos del método o cualquier combinación de pasos del método puede estar seguido por un paso de lavado. Después de cada paso, se puede efectuar uno o más pasos de lavado.

45 En una forma de realización más preferida de la invención, el (poli)péptido específico para GS es insulina, fgrina, ICA512, carboxipeptidasa E/H, cromogranina A, cromogranina B, secretogranina II, proteína convertasa 1 o 2, amilina u otra hormona endocrina neuropéptido específico para GS tal como la hormona de crecimiento, prolactina, ANP y NYP.

50 En una forma de realización preferida adicional de la invención, los diferentes medios de detección de las sustancias A y C son diferentes longitudes de onda de excitación y/o emisión.

55 En otra forma de realización preferida de la invención, la sustancia A o C o ambas comprenden 1. una fracción que se une específicamente al sitio de unión de la proteína de fusión y 2. una fracción detectable. Ambas propiedades, es decir, un sitio de unión específico en la proteína de fusión y la propiedad que confiere detectabilidad, pueden estar presentes en una fracción.

60 En una forma de realización preferida diferente del primer aspecto, el método comprende además poner en contacto la célula con una sustancia D que se dirige a dicho sitio de unión en la proteína de fusión que se vuelve disponible para la unión después del paso (d) y después de dejar que la sustancia C sin unir se elimine de la célula o después de eliminar la sustancia C sin unir de la célula.

65

Con esta forma de realización de la presente invención, es posible marcar tres poblaciones diferentes de GS de diferentes edades.

5 Como se ha descrito anteriormente, tras la disponibilidad de un número suficiente de sustancias detectables por medios diferentes y la unión a un sitio común de unión en dicha proteína de fusión, se pueden marcar más de tres, por ejemplo, cuatro, cinco o seis, poblaciones diferentes de GS según su edad repitiendo los pasos (c) y (d) y opcionalmente (b) con la sustancias respectivas. Según esto, para cuatro sustancias diferentes, el paso según el paso (c) comprende dejar que la sustancia D sin unir (u opcionalmente B si el paso (b) se aplica antes del equivalente del paso (c)) se elimine de la célula o eliminar la sustancia D sin unir (u opcionalmente B si el paso (b) se aplica antes del equivalente del paso (c)) de la célula; y el paso según el paso (d) comprende poner en contacto la célula con una sustancia E que se dirige a dicho sitio de unión en la proteína de fusión que se vuelve disponible para la unión después del paso anterior.

15 En una forma de realización diferente, la presente invención se refiere a un método para detectar una sustancia secretada de GS marcados uniforme o diferencialmente según su edad, como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, que comprende: (a) separar una célula capaz de formar GS y que expresa una proteína de fusión que comprende (i) un (poli) péptido específico para GS y (ii) un (poli) péptido que tiene un sitio de unión común para al menos tres sustancias diferentes A, B y C que se unen covalentemente al mismo, en donde dichas sustancias son capaces de penetrar la membrana celular y en donde al menos las sustancias A y C son detectables por medios diferentes y (l) tratadas según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, de su medio de cultivo; (b) detectar en el medio la presencia de cualquier sustancia detectable aplicada para marcar los GS, si hay alguna; en donde la detección de una o más sustancias en el medio indica que la secreción de los GS ha tenido lugar.

25 En contraste con los métodos descritos anteriormente, donde se detectan GS diferencialmente marcados en la célula, el método presente investiga qué GS se secretan al medio. El método presente es por tanto capaz de detectar la secreción de GS de diferentes edades así como la secreción de GS producida por un estímulo.

30 La presente invención se refiere además a un huésped transgénico no humano como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende (i) un (poli) péptido específico para GS y (ii) un (poli) péptido que tiene un sitio de unión común para al menos tres sustancias diferentes A, B y C que se unen covalentemente al mismo.

En una forma de realización preferida, el huésped transgénico no humano es un animal.

35 El animal transgénico no humano puede ser, por ejemplo, un pez cebra, ratón, rata, hámster, perro, mono, conejo, cerdo o vaca transgénicos. Preferiblemente, dicho animal transgénico no humano es un ratón.

40 Un método para la producción de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, comprende la introducción de un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención o vector dirigido en una célula reproductora, una célula embrionaria, una célula madre o un huevo o una célula derivada de las mismas (véase la figura 18 para una estrategia ejemplar). El animal no humano, en particular, células beta primarias o islotes aislados de dicho animal, opcionalmente colocados en un entorno diferente del suyo natural (por ejemplo, el páncreas para los islotes), se pueden usar en los métodos de la invención descritos anteriormente. Por ejemplo, se puede crear un medio fisiológico para el desarrollo de los islotes mediante trasplante de islotes aislados en los ojos de ratones (Speier et al., 2008).

45 La producción de embriones transgénicos y cribado de esos se puede realizar, por ejemplo, como se describe por A. L. Joyner Ed., Gene Targeting, A Practical Approach (1993), Oxford University Press. El ADN de las membranas embrionarias de los embriones se puede analizar usando, por ejemplo, transferencia Southern con una sonda apropiada; véase anteriormente. Un método general para hacer animales transgénicos no humanos está descrito en la técnica, véase por ejemplo, el documento WO 94/24274. Para hacer organismos transgénicos no humanos (que incluyen animales no humanos homogéneamente dirigidos), se prefieren células madre embrionarias (células ES). Las células ES murinas, tal como la línea AB-1 crecida en capas de células nutrientes SNL76/7 mitóticamente inactivas (McMahon y Bradley, Cell 62:1073-1085 (1990)) esencialmente como se describe (Robertson, E. J. (1987) en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), p. 71-112) se puede usar para inserción génica dirigida homóloga. Otras líneas adecuadas de ES incluyen, pero no están limitadas a, la línea E14 (Hooper et al., Nature 326:292-295 (1987)), la línea D3 (Doetschman et al., J. Embryol. Exp. Morph. 87:27-45 (1985)), la línea CCE (Robertson et al., Nature 323:445-448 (1986)), la línea AK-7 (Zhuang et al., Cell 77:875-884 (1994)). El éxito de generar una línea e ratón a partir de células ES que tienen una mutación específica dirigida depende de la pluripotencia de las células ES (es decir, su capacidad, una vez inyectadas en un embrión huésped en desarrollo, tal como un blatocisto o mórula, para participar en la embriogénesis y contribuir a las células reproductoras del animal resultante). Los blastocistos que contienen las células ES inyectadas se dejan desarrollar en el útero de hembras no humanas pseudopreñadas y nacen, por ejemplo, como ratones quiméricos. Los ratones transgénicos resultantes son quiméricos para células que tienen bien la recombinasa o el locus indicador y se retrocruzan y criban para la presencia del/de los transgén(es) correctamente

insertados por análisis de PCR o transferencia Southern en ADN de biopsia de la cola de la descendencia para identificar ratones transgénicos heterocigotos para bien la recombinasa o el locus/loci indicador(es).

5 El huésped transgénico también puede ser una célula, es decir, una célula procariota o eucariota. En relación con la presente invención, una célula transgénica es una célula establemente transfectada (células eucariotas) o transformadas (células procariotas) con un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención. Las técnicas de transfección, tal como lipofección o transfección usando CaCl_2 , y las técnicas de transformación, por ejemplo usando electroporación o choque térmico, las conoce bien el experto en la materia.

10 En una forma de realización preferida, el GS es un gránulo de insulina y el (poli)péptido de punto (i) es específico para gránulos de insulina.

Según la presente invención, el (poli)péptido del punto (ii) es un SNAP-tag, un HaloTag o una etiqueta de tetracisteína In-Cell.

15 En una forma de realización más preferida de la invención, la sustancia B que se une a SNAP-tag es BTP.

En una forma de realización preferida adicional de la invención, la sustancia A que se une a SNAP-tag es TMR-Star, BG-505, BG-430 o BG-DAF.

20 En otra forma de realización preferida, la sustancia C que se une a SNAP-tag es TMR-Star, BG-505, BG-430 o BG-DAF. La sustancia aplicada en un experimento como sustancia C es diferente de la sustancia aplicada como sustancia A.

25 En una forma de realización preferida de la invención, el (poli)péptido específico para GS es insulina, fgrina, ICA512, carboxipeptidasa E/H, cromogranina A, cromogranina B, secretogranina II, proteína convertasa 1 o 2, amilina u otra hormona endocrina neuropéptido específica para GS tal como la hormona de crecimiento, prolactina, ANP y NPY.

30 En otra forma de realización preferida, los medios diferentes de detección de las sustancias A y C son diferentes longitudes de onda de excitación y/o emisión.

En otra forma de realización preferida de la invención, la sustancia A o C o ambas comprenden 1. una fracción que se une específicamente al sitio de unión en la proteína de fusión y 2. una fracción detectable.

35 En una forma de realización preferida de los métodos de la presente invención, la célula capaz de formar GS en una célula β primaria de los islotes aislada de un animal transgénico, preferiblemente el ratón transgénico de la invención.

40 En otra forma de realización preferida de los métodos según la primera y segunda forma de realización de la presente invención, el método comprende además poner en contacto la célula que se va a someter al paso (a) con una sustancia B que bloquea los sitios de unión en dicho (poli)péptido ya existente (expresado) en la célula y dejar que la sustancia B sin unir se elimine de la célula o eliminar la sustancia B sin unir de la célula.

45 Los inventores presentes encontraron que un primer paso de bloquear los sitios de unión en la proteína de fusión marcada según la invención permite una determinación más precisa de la edad de los GS marcados posteriormente. Por tanto, no solo es posible una distinción de las edades de GS diferencialmente marcados sino también una determinación exacta de la edad del GS marcado primero.

50 Después de poner en contacto la célula con la sustancia B, se necesita eliminar el exceso de sustancia B para evitar que los sitios de unión en los GS formados después de la aplicación de la sustancia B también se bloqueen y por tanto no estén disponibles más para la unión a la sustancia A. Los GS recién formados se pueden marcar y el intervalo de tiempo elegido para dejar que los nuevos GS se formen determina una edad sustancialmente uniforme de los GS posteriormente marcados con la sustancia A.

55 Las figuras muestran:

Figura 1: Diagrama de flujo de la estrategia de clonación.

60 El ADNc de la insulina humana (número de acceso al Genbank del NCBI: NM 000207), incluyendo la secuencia del péptido señal (S) y las secuencias codificantes para las cadenas B y A junto con el péptido C se clonaron en el mismo marco de lectura con SNAP-tag. La construcción resultante se clonó en el vector pEGFP-N1 (número de acceso al Genbank del NCBI: U55762), generando el vector de expresión pEG-Ins-SNAP. S - secuencia del péptido señal, B - secuencia de la cadena B, C - secuencia del péptido C, A - secuencia de la cadena A, CMV - promotor del citomegalovirus, SANP - SNAP-tag, EGFP - GFP aumentada.

65 **Figura 2:**

(a) Colocalización de hINS-SNAP e ICA-512-GFP en células de insulinoma INS-1. Las células INS-1 se cotransfectaron con plásmidos que tienen hIns-SNAP e ICA-512-GFP (Trajkovski et al., 2004). Se marcó hIns-SNAP con TMR-Star y la localización de ambas proteínas se observó con microscopia confocal.

5 (b) Píxeles colocalizados (en blanco, panel izquierdo) para los canales de fluorescencia tanto roja como verde en la misma célula mostrada en la figura 2a y el diagrama de dispersión derivado (panel derecho). El diagrama de dispersión se generó con el programa de software de análisis de imagen ImageJ y muestra el agrupamiento de los píxeles de ambos canales, consistente con la colocalización de hINS-SNAP con el marcador de GS ICA-512-GFP.

10 **Figura 3: Marcaje in vivo de GS en células INS-1 transfectadas con hINS-SNAP**

El marcaje de células INS-1 vivas que expresan hINS-SNAP con TMR-Star durante 15 minutos fue seguido por incubación de las células con BTP durante 20 minutos para bloquear los sitios de unión restantes en SNAP-tag. Después de 4 horas adicionales de incubación en medio, las células se incubaron luego con BG505 durante 15 minutos para marcar hINS-SNAP recién generada. Los GS viejos y recién generados se pudieron distinguir claramente basándose en su marcaje diferencial con TMR-Star (en rojo) y BG505 (en verde), respectivamente.

15 **Figura 4: Marcaje in vivo de gránulos secretores.**

Marcaje de células INS-1 vivas que expresan hINS-SNAP con TMR-Star durante 15 minutos. Después su incubación durante 4 horas adicionales en medio, las células se incubaron luego con BG505 durante 15 minutos para marcar hINS-SNAP recién generada. En este caso la omisión del paso de bloqueo con BTP previno el marcaje diferencial de GS viejos y recién generados con TMR-Star y BG505, respectivamente.

20 **Figura 5:**

(a) Píxeles colocalizados de las imágenes mostradas en la figura 3 (panel fusión) y la figura 4 (panel fusión) usando el mismo procedimiento descrito en la leyenda de la figura 2b. No se detectó colocalización (píxeles blancos) cuando el paso de bloqueo con BTP se interpuso entre los marcajes secuenciales con TMR-Star y BG505. A la inversa, se detectaron muchos píxeles colocalizados cuando el paso de bloqueo con BTP se omitió.

30 (b) Diagramas de dispersión de los píxeles colocalizados derivados de las imágenes mostradas en la figura 3 (panel fusión) y la figura 4 (panel fusión). En el caso de falta de colocalización entre los píxeles rojos y verdes, se forman dos nubes divergentes, cada una paralela al eje respectivo.

35 **Figura 6:**

Medidas de insulina humana en el medio (barras blancas) y en los extractos celulares (barras negras) de células INS-1 en reposos (R) y estimuladas (S) transfectadas con hINS-SNAP. El tampón de reposo contiene glucosa 0 M y KCl 5 mM, mientras que el tampón de estimulación contenía glucosa 25 mM y KCl 55 mM. Las cantidades de insulina humana se evaluaron específicamente usando el kit LINCO RIA que incluye un anticuerpo que reacciona con insulina humana, pero no de rata. La señal muy baja detectada en el medio y los extractos celulares de células INS-1 de tipo salvaje y transfectadas con SNAP se justifica por la reactividad parcial (62%) de esta anticuerpo anti-insulina humana con insulina bovina, que se encuentra en el suero bovino fetal usado para el cultivo de las células INS-1.

40 **Figura 7.**

Índice de estimulación de insulina (SI) o células INS-1 en reposo (R) y estimuladas (S) transfectadas con hINS-SNAP. Este SI se calculó como sigue: $(\text{Insulina}_{\text{medio}}/\text{Insulina}_{\text{total}})_{\text{estimulación}}/(\text{Insulina}_{\text{medio}}/\text{Insulina}_{\text{total}})_{\text{reposo}}$. El valor correspondiente a $(\text{Insulina}_{\text{medio}}/\text{Insulina}_{\text{total}})_{\text{reposo}}$ se igualó al 100%. La fracción aumentada de hINS-SNAP liberada de las células estimuladas es consistente con su direccionamiento apropiado a GS y su secreción regulada.

45 **Figura 8**

Marcaje fluorescente con TMR-Star (rojo) en varias células de un clon de células INS-1 (panel izquierdo) transfectadas establemente con hINS-SNAP. El marcaje fluorescente de las células INS-1 de tipo salvaje con TMR-Star es negativo (panel derecho).

50 **Figuras 9 y 10**

Cuantificación por radioinmunoensayo (RIA) de insulina humana (figura 9) y péptido C humano (figura 10) en el medio y extractos celulares de células INS-1. Las células INS-1 o no se transfectaron (no tr) o se transfectaron con plásmidos que codifican SNAP o hINS-SNAP. Las células se incubaron después con tampón salino isotónico que contenía bien glucosa 2,8 mM y KCl 5 mM (tampón de reposo) o glucosa 25 mM y KCl 55 mM (tampón de estimulación) durante 2 horas.

55 **Figuras 11 y 12**

Detección fluorimétrica de hINS-SNAP en el medio de células INS-1 transfectadas, que se habían estimulado con el mismo protocolo descrito en la leyenda de las figuras 9 y 10. Se marcó hINS-SNAP bien con BG505 o TMR-Star. La figura 11 y la figura 12 muestran las señales de fluorescencia detectadas en los canales verde (filtro de emisión: 535/25 nm) y en el rojo (filtro de emisión: 590/20 nm), respectivamente. A) Se marcaron hINS-SNP vieja y recién generada, es decir, gránulos secretores (GS) viejos y recién generados con TMR-Star (hINS-SNAP roja) y BG505

(hINS-SNAP verde), respectivamente, siguiendo el mismo protocolo descrito en la leyenda de la figura 3. B) y C). Solo los GS viejos se marcaron con BG505 (hINS-SNAP verde; B) o TMR-Star (hINS-SNAP roja; C), omitiendo la incubación con el segundo fluoróforo después del paso de bloqueo con BTP. D) y E). Fluorescencia de fondo detectada en agua (D) o en el medio de las células INS-1 transfectadas, que expresan hINS-SNAP, pero no marcado con BG505 o TMR-Star (E).

Figuras 13 a 16

Marcajes de doble fluorescencia para insulina y marcadores del ER (proteína disulfuro isomerasa, PDI), cisternas tempranas del complejo de Golgi (proteína de matriz de Golgi de 130 kDa, GM130), red trans-Golgi (TGN38) y endosoma temprano (antígeno de endosoma temprano 1, EEA-1). La distribución de hINS-SNAP en células INS-1 transfectadas se visualizó por marcaje con TMR-Star, mientras que la distribución de la insulina endógena en células INS-1 no transfectadas y de todas las otras proteínas se detectó usando anticuerpos primarios específicos seguidos por anticuerpos secundarios conjugados con Alexa.

Figura 17

Inmunotransferencias de fracciones subcelulares de células INS-1 transfectadas con hIns-SNAP. Los sobrenadantes posnucleares de células INS-1 transfectadas con hIns-SNAP se separaron en gradientes de densidad de sacarosa continuos de 0,6-2,0 M. Se recogieron alícuotas de volumen igual de los gradientes, se calculó la molaridad de la sacarosa de cada fracción basado en el índice de refracción, las proteínas de cada fracción se precipitaron con solventes orgánicos, y después se separaron por SDS-PAGE antes de transferir e inmunodetección con anticuerpos dirigidos contra la cadena A de la insulina y los marcadores de GS de insulina carboxipeptidasa E (CPE) y autoantígeno de células de islotes 512 (ICA512) y de las cisternas tempranas del complejo de Golgi (GM130).

Figura 18

Se representa una estrategia de ejemplo para la generación de ratón knock-in mIns-SNAP. El esquema incluye todos los pasos hasta la generación de un casete dirigido para el gen Ins2 de ratón.

Los ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1. Estrategia de clonación

Un método ejemplar para el marcaje diferencial de gránulos secretores (GS) de insulina según su edad se basa en la expresión y direccionamiento correcto de una insulina humana quimérica (hINS-SNAP) a los GS de células INS-1 de insulinoma de rata, un sistema modelo de células beta pancreáticas. Esta proteína quimérica, denominada hINS-SNAP, se creó por clonación del ADNc que codifica la preproinsulina en el mismo marco de lectura con una proteína de 20 kDa - SNAP-tag™.

SNAP-tag™ es una versión comercialmente disponible (Covalys), muy manipulada de una alquil guanina ADN alquil transferasa (proteína de reparación del ADN). Reacciona con sustratos de bencilguanina formando un enlace tioéter, estable con el sustrato. Esta reacción es muy específica (*Tirat et al., Int J Biol Macromol, 2006*).

La estrategia de clonación implicaba la generación de un casete hIns-SNAP clonado en el vector pEGFP-N1 usando los sitios de restricción EcoRI y NotI (véase la figura 1 para una visión de conjunto). La parte de pEGFP-N1 que codifica EGFP se cortó del vector de antemano. La razón para elegir pEGFP-N1 es que en experimentos previos mostró expresión muy fuerte y estable en células transfectadas.

Ejemplo 2. Resultados de colocalización I

La localización correcta de hINS-SNAP a los GS se ensayó en células transfectadas con dos plásmidos, uno que lleva hINS-SNAP y el otro ICA512, siendo la última una proteína de membrana intrínseca de los GS que contienen insulina (*Solimena et al., EMBO J., 1996; Ort et al., EMBO J., 2001; Trajkovski et al., J. Cell Biol., 2004*). ICA512 se clonó en un plásmido que lleva EGFP y se ha mostrado que ICA512-EGFP se dirige a los GS. La figura 2a muestra que tanto hINS-SNAP como ICA512-EGFP se dirigen a los mismos orgánulos, es decir, los GS.

Se marcó hINS-SNAP en células INS-1 vivas con el sustrato fluorescente de SNAP que penetra en la célula TMR-Star (rojo) (Covalys), que tiene las siguientes características: longitud de onda de excitación 554 nm, longitud de onda de emisión 580 nm.

El protocolo de marcaje optimizado en nuestro laboratorio es como sigue. Las células se marcaron el cuarto día después de la transfección. El marcaje se llevó a cabo durante 15 minutos con TMR (rojo) 2 µM en medio normal (1 ml por pocillo) (RPMI 1640, 1x con L-glutamina (PAA), HEPES 10 mM pH 7,4, SBF al 10% (Gibco), piruvato de Na 1 mM (PAA), L-glutamina 2 mM (PAA), β2-mercaptoetanol 50, Pen 100 U/ml, Estrep 100 µg/ml (Penstrep, PAA)), seguido por lavado dos veces con PBS. El periodo después del final del marcaje de TMR y la fijación fue 4 horas. Durante este tiempo, las células se incubaron en medio sin sustratos de SNAP y se realizaron dos lavados adicionales: dos veces con PBS y dos veces con medio. Este periodo era necesario para permitir que el TMR-Star sin unir se depurara fuera de las células disminuyendo de esta manera la señal de fondo durante la imagenología.

Antes de la fijación las células se lavaron dos veces con PBS, después se fijaron (PFA al 4%, pH: 7,4 durante 10 minutos a 4°C) e incluyeron (reactivo antiapagamiento ProLong Gold con DAPI P36931, Molecular Probes).

- 5 Las imágenes se adquirieron usando un microscopio confocal Zeiss Axiovert 200M y software Zeiss LSM 510 AIM versión 4.0 (Zeiss Plan-Apochromat 63x/1.4 aceite, Zeiss LSM 510 cabezal de barrido con tubos fotomultiplicadores, canal rojo: LP575, canal verde: BP 505-550).

Ejemplo 3. Resultados de colocalización II

10 Las imágenes recogidas se procesaron usando el software de análisis de imágenes (ImageJ, NIH). Este programa permite la generación de imágenes que muestran pixeles colocalizados de los canales verde (longitud de onda pico de emisión: 509 nm) y rojo (longitud de onda pico de emisión: 580 nm) de las imágenes adquiridas.

15 Otra posibilidad para presentar la colocalización es la generación del “diagrama de dispersión” de una imagen. En este caso los pixeles de cada canal se representan en relación a su intensidad. Cuando se produce la colocalización, el diagrama de dispersión, como en este caso, tiene una forma específica que se parece a una nube alrededor del eje medio (*Bolte et al., Journal of Microscopy, Dic. 2006*) (véase la figura 2b).

20 Ejemplo 4. Marcaje de células INS-1 vivas

Habiendo determinado el direccionamiento correcto de hIns-SNAP a los gránulos secretores de insulina en células INS-1 fijadas, se marcaron células INS-1 vivas el cuarto día después de la transfección con phIns-SNAP. El marcaje de color dual se hizo según el siguiente esquema:

25 El primer marcaje llevó a cabo durante 15 minutos con TMR (rojo) 2 µM en medio normal (1 ml por pocillo), seguido por lavado 2xPBS e incubación de 30 minutos en medio sin el sustrato de SNAP. El marcaje con BTP 10 µM duró 20 minutos seguido por dos lavados con PBS e incubación de 30 minutos en medio sin BTP. El periodo entre la administración de BTP y la administración de BG505 (verde) fue de 4 horas de duración, de modo que cualquier BTP sin unir tuviera tiempo suficiente para ser depurado fuera de las células, permitiendo de esta manera el marcaje de hIns-SNAP recién sintetizada. Durante este periodo se realizaron dos lavados adicionales: dos veces con PBS y dos veces con medio.

35 Las células se incubaron después con BG505 10 µM durante 30 minutos, seguido por dos lavados con PBS, incubación de 30 minutos en medio y otro lavado con PBS. Después del último lavado, las células se fijaron (PFA al 4%, pH: 7,4 durante 10 minutos a 4°C) e incluyeron (reactivo antiapagamiento ProLong Gold con DAPI P36931, Molecular Probes).

40 Se compararon experimentos con diferentes concentraciones que variaban desde 1 a 10 µM del bloqueador con reacciones de marcaje control sin BTP (véanse las figuras 4 y 5). Los resultados muestran claramente que la aplicación del BTP antes de la exposición de las células al segundo sustrato de SNAP (BG505) permite la detección de dos poblaciones de edad distinta de gránulos (rojo=gránulos viejos; y verde= gránulos nuevos; véase la figura 3). Cuando se omite el bloqueador BTP los gránulos en cambio están dualmente marcados con TMR y BG505, lo que imposibilita su distinción por edad (véase la figura 4).

45 Ejemplo 5. Resultados de colocalización III, IV

50 El análisis por software de las imágenes adquiridas permitió la generación de imágenes que representan los pixeles colocalizados de ambos canales y también los diagramas de dispersión característicos. La distribución de pixeles en el diagrama de dispersión obtenido del marcaje de células expuestas secuencialmente a TMR, BTP 10 µM y BG505 tiene la forma de dos nubes independientes cerca de cada eje, lo que indica la ausencia de colocalización entre orgánulos marcados con TMR y BG505 (véase la figura 5b, panel izquierdo). En contraste, el diagrama de dispersión de las imágenes adquiridas de las célula expuestas secuencialmente a los fluoróforos TMR y BG505, sin la interposición de bloqueador de SNAP BTP, retuvo la forma de una nube alrededor del eje medio (véase la figura 5b, panel derecho). Los coeficientes de Pearson calculados (BTP 10 µM: 0,515; BTP 0 µM: 0,829) calculados según Bolte y col., están de acuerdo con esta interpretación.

Ejemplo 6. Microscopía de disco giratorio

60 Se realizó imagenología en células INS-1 vivas que expresan hIns-SNAP y se procesaron según el protocolo de marcaje de color dual descrito en el ejemplo 4. Después del último lavado con PBS las células se incubaron en medio y se observaron por microscopía. Se recogieron imágenes a la velocidad de 20 fotogramas por segundo -1 con un tiempo de exposición de 142,7 ms, para un total de 250 fotogramas. Se eligió un fotograma óptico ejemplar de ~500 nm en la dimensión Z y se adquirió por microscopía confocal de disco giratorio (proyección de intensidad máxima) (Dual Spinning Disk Confocal Microscope-Revolution, Andor Technologies). En este caso el foco del microscopio estaba localizado en correspondencia del centro de una célula INS-1 marcada. Los análisis

concernientes al número de gránulos, densidad, velocidad, desplazamiento cuadrado medio, etc., de los distintos GS que contienen hINS-SNAP están en curso.

Ejemplo 7. Microscopía TIRF

Se realizó imagenología en células INS-1 vivas que expresan hIns-SNAP y se procesaron según el protocolo de marcaje de color dual descrito en el ejemplo 4. Se recogieron imágenes a la velocidad de 20 fotogramas por segundo -1 con un tiempo de exposición de 100 ms, para un total de 1000 fotogramas. La diapositiva 10 muestra un fotograma de ~100 nm en la dimensión Z adquirido por microscopía de reflexión interna total (Olympus IX 71, Andor iXon+ DU 897E, Olympus PLAPO 100x/1.45 TIRFM, Andor IQ versión 1.7) en correspondencia de la región de la membrana plasmática de una célula INS-1 marcada.

Los análisis concernientes al número de gránulos, densidad, velocidad, desplazamiento cuadrado medio, etc., de los distintos GS que contienen hINS-SNAP están en curso.

Ejemplo 8. RIA específico de insulina humana

Para determinar si hINS-SNAP, de forma similar a la insulina endógena, se secreta de una manera regulada, se midió la liberación de hINS-SNAP de células INS-1 usando un radioinmunoensayo específico para insulina humana (Linco, HI-14K). Las células se transfectaron con pEG-Ins-SNAP y se incubaron con el tampón de reposo durante 1 hora antes de la estimulación. A continuación se aplicó el tampón de estimulación durante 1,5 o 2 horas y el medio se recogió y congeló. El contenido de insulina se extrajo de las células usando un protocolo establecido. Las medidas de RIA mostraron que la insulina humana se secreta de las células tras la estimulación (véanse las figuras 6 y 7 y 9).

Estos resultados corroboran la liberación estimulada por glucosa de hINS-SNAP de células transfectadas. Notablemente, el RIA que se empleó para medir la insulina humana (figura 9) solo reacciona con insulina madura, mientras que no da reacción cruzada con proinsulina humana, ni con insulina de rata, que se expresa endógenamente en las células INS-1. Según esto, estos datos confirman que las células INS-1 convierten adecuadamente la proinsulina-SNAP humana en insulina-SNAP y que la última se pliega correctamente. Estas conclusiones están apoyadas además por evidencia de que la insulina (figura 9) se libera en una proporción de 1:1 relativa al péptido C humano (figura 10).

Ejemplo 9. Medida de hIns-SNAP fluorescentemente marcada

Se marco hINS-SNAP bien con BG505 o TMR-Star. La figura 11 y la figura 12 muestran las señales de fluorescencia detectadas en los canales verde (filtro de emisión: 535/25 nm) y el rojo (filtro de emisión: 590/20 nm), respectivamente. A) Se marcaron hINS-SNAP vieja y recién generada, es decir, gránulos secretores (GS) viejos y recién generados con TMR-Star (hINS-SNAP roja) y BG505 (hINS-SNAP verde), respectivamente, siguiendo el mismo protocolo descrito en la leyenda de la figura 3. B) y C). Solo se marcaron los GS viejos con BG505 (hINS-SNAP verde; B) o TMR-Star (hINS-SANP roja; C), omitiendo la incubación con el segundo fluoróforo después del paso de bloqueo con BTP. D) y E). Fluorescencia de fondo detectada en agua (D) o en el medio de las células INS-1 transfectadas, que expresan hINS-SNAP, pero no marcado con un fluoróforo (E). Estos nuevos resultados demuestran que hIns-SNAP fluorescentemente marcada se puede medir de forma fiable y conveniente por fluorimetría sin recurrir al uso de ensayos basados en anticuerpos más laboriosos, que requieren mucho tiempo y caros, tales como RIA y ELISA. Además, estos datos señalan a la liberación preferente de hINS-SNAP recién sintetizada relativa a la hINS-SNAP vieja (compárense los niveles de señal en A y B en la figura 11).

Ejemplo 10. Localización de hIns-SNAP

Marcajes de doble fluorescencia para insulina y marcadores del ER (proteína disulfuro isomerasa, PDI), cisternas tempranas del complejo de Golgi (proteína de matriz de Golgi de 130 kDa, GM130), red trans-Golgi (TGN38) y endosoma temprano (antígeno de endosoma temprano 1, EEA-1). La distribución de hINS-SNAP en células INS-1 transfectadas se visualizó por marcaje con TMR-Star, mientras que la distribución de la insulina endógena en células INS-1 no transfectadas y de todas las otras proteínas se detectó usando anticuerpos primarios específicos seguidos por anticuerpos secundarios conjugados con Alexa. Estos resultados indican que hINS-SNAP, similar a la insulina endógena de rata, no está enriquecida en el ER (figura 13) ni en los endosomas tempranos (figura 16), mientras que es detectable en el compartimento del Golgi (figuras 14 y 15).

Las imágenes se adquirieron usando un microscopio confocal Zeiss Axiovert 200M y software Zeiss LSM 510 AIM versión 4.0 (Zeiss Plan-Apochromat 63x/1.4 aceite, Zeiss LSM 510 cabezal de barrido con tubos fotomultiplicadores, canal rojo: LP575, canal verde: BP 505-550, para las combinaciones de fluoróforos, donde se detectó el traspaso del rojo en el canal verde, se uso el filtro más estrecho BP 505-530).

Ejemplo 11. Comigración de los marcadores de GS CPE e ICA512 junto con hINS-SNAP en fracciones que contienen GS aislados y comparación con el marcador de cisternas tempranas del Golgi GM130

Se realizaron inmunotransferencias de fracciones subcelulares de células INS-1 transfectadas con hIns-SNAP. Los sobrenadantes posnucleares de células INS-1 transfectadas con hIns-SNAP se separaron en gradientes de densidad de sacarosa continuos de 0,6-2,0 M. Se detectaron tanto pro-hINS-SNAP como cadena A SNAP en el peso molecular esperado de ~30,7 kDa y ~23,8 kDa y estaban enriquecidas en las fracciones con sacarosa 1,3-1,7 M, donde se encuentran los GS de insulina madura, como se indica por el enriquecimiento de las especies más rápidas (procesadas) de CPE (figura 17A) e ICA512 (figura 17B). Un segundo pico de pro-hINS-SNAP se detectó en fracciones más ligeras (figura 17A), donde se encuentran las cisternas del Golgi, como se indica por el enriquecimiento para GM130 (figura 17C).

Referencias

- Alarcón, C., Lincoln, B., Rhodes, C.J.: The biosynthesis of the subtilisin-related proprotein convertase PC3, but not that of the PC2 convertase, is regulated by glucose in parallel to proinsulin biosynthesis in rat pancreatic islets. *J Biol Chem.* 1993, **268**(6):4276-80.
- Borgonovo, B., Ouwendijk, J., Solimena, M.: Biogenesis of secretory granules. *Curr Opin Cell Biol.* 2006, **18**(4):365-70.
- Bebbington, C.R., Renner, G., Thomson, S., King, D., Abrams, D., Yarranton, G.T.: High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Biotechnology (N Y)* 1992, **10**:169-75.
- Bratanova-Tochkova, T.K., Cheng, H., Daniel, S., Gunawardana, S., Liu, Y.J., Mulvaney-Musa, J., Schermerhorn, T., Straub, S.G., Yajima, H., Sharp, G.W.: Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* 2002, **51** Supl 1:S83-90.
- Daniels, D.S., Mol, C.D., Arvai, A.S., Kanugula, S., Pegg, A.E., Tainer, J.A.: Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *EMBO J.* 2000, **19**(7):1719-30.
- Duncan, R.R., Greaves, J., Wiegand, U.K., Matskevich, I., Bodammer, G., Apps, D.K., Shipston, M.J., Chow, R.H.: Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature* 2003, **422**:176-180.
- Glombik M.M., Gerdes H.H.: Signal-mediated sorting of neuropeptides and prohormones: secretory granule biogenesis revisited. *Biochemie* 2000, **82**:315-326.
- Grabner, C.P., Price, S.D., Lysakowski, A., Fox, A.P.: Mouse chromaffin cells have two populations of dense core vesicles. *J. Neurophysiol.* 2005, **94**:2093-2104.
- Guest, P.C., Rhodes, C.J., Hutton, J.C.: Regulation of the biosynthesis of insulin-secretory-granule proteins. Co-ordinate translational control is exerted on some, but not all, granule matrix constituents. *Biochem J.* 1989, **257**(2):431-7.
- Guest, P.C., Bailyes, E.M., Rutherford, N.G., Hutton, J.C.: Insulin secretory granule biogenesis. Co-ordinate regulation of the biosynthesis of the majority of constituent proteins. *Biochem J.* 1991, **274** (Pt 1):73-8.
- Juillerat, A., Gronemeyer, T., Keppler, A., Gendreizig, S., Pick, H., Vogel, H., Johnsson, K.: Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for efficient labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Chem Biol.* 2003, **10**(4):313-7.
- Horton, R.M., H.D. Hunt, S.N. Ho, J.K. Pullen, Pease, L.R.: Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 1989, **77**:61-8.
- Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H., Johnsson, K.: A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol.* 2003, **21**(1):86-9.
- Martin, S.K., Carroll, R., Benig, M., Steiner, D.F.: Regulation by glucose of the biosynthesis of PC2, PC3 and proinsulin in (ob/ob) mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett.* 1994, **356**(2-3):279-82.
- Meldolesi, J., Chierigatti, E., Luisa Malosio, M.: Requirements for the identification of dense-core granules. *Trends Cell Biol.* 2004, **14**:13-19.
- Michael, D.J., Ritzel, R.A., Haataja, L., Chow, R.H.: Pancreatic beta-cells secrete insulin in fast- and slow-release forms. *Diabetes* 2006, **55**:600-607.
- Murphy, G., Cockett, M.I., Ward, R.V., Docherty, A.J.: Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J.* 1991, **277** (Pt 1):277-9.
- Perrais, D., Kleppe, I.C., Taraska, J.W., Almers, W.: Recapture after exocytosis causes differential retention of protein in granules of bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 2004, **560**:413-428.
- Rorsman, P., Renström, E.: Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2003, **46**(8):1029-45.
- Speier, S., Nyqvist, D., Kohler, M., Caicedo, A., Leibiger, I.B. y Berggren, P.-O.: Noninvasive high-resolution *in vivo* imaging of cell biology in the anterior chamber of the mouse eye. *Nature Protocols* 2008, **3**: 1278-1286.
- Solimena, M., Gerdes, H.H.: Secretory granules: and the last shall be first. *Trends Cell Biol.* 2003, **13**:399-402.
- Steiner, D.F.: The proprotein convertases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1998, **2**:31-39.
- Taraska, J.W., Perrais, D., Ohara-Imaizumi, M., Nagamatsu, S., Almers, W.: Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, **100**:2070-2075.
- Taupenot, L., Harper, K.L., O'Connor, D.T.: The chromogranin-secretogranin family. *N. Engl. J. Med.* 2003, **348**:1134-1149.

Terskikh, A., Fradkov, A., Ermakova, G., Zaraisky, A., Tan, P., Kajava, A.V., Zhao, X., Lukyanov, S., Matz, M., Kim, S., Weissman, I., Siebert, P.: "Fluorescent timer": protein that changes color with time. *Science* 2000, **290(5496)**:1585-8.

5 Tsuboi, T., McMahon, H.T., Rutter, G.A.: Mechanisms of dense core vesicle recapture following "kiss and run" ("cavcapture") exocytosis in insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* 2004, **279**:47115-24.

Tsuboi, T., Ravier, M. A., Parton, L. E., Rutter, G. A.: Sustained Exposure to High Glucose Concentrations Modifies Glucose Signaling and the Mechanics of Secretory Vesicle Fusion in Primary Rat Pancreatic β -Cells. *Diabetes* 2006, **55**:1057-1065.

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro de detectar gránulos secretores (GS) de diferentes edades en una célula marcando diferencialmente dichos GS según su edad que comprende:
- 5
- (a) poner en contacto una célula que puede formar GS y que expresa una proteína de fusión que comprende
- (i) un (poli)péptido específico para GS y
- 10 (ii) un (poli)péptido que tiene un sitio de unión común para al menos tres sustancias diferentes A, B y C que se unen covalentemente al mismo, en donde el (poli)péptido es un SANP-tag, un HaloTag o una etiqueta de tetracisteína In-Cell;
- en donde dichas sustancias son capaces de penetrar la membrana celular y en donde al menos las sustancias A y C son detectables por medios diferentes;
- con la sustancia A dirigiéndose a dicho sitio de unión;
- 15 (b) saturar dichos sitios de unión poniendo en contacto la célula con una sustancia B que bloquea los sitios de unión que no se unieron a la sustancia A;
- (c) permitir que la sustancia B sin unir se elimine de la célula o eliminar la sustancia B sin unir de la célula;
- (d) poner en contacto la célula con una sustancia C que se dirige a dicho sitio de unión en la proteína de fusión que se vuelve disponible para la unión después del paso (b); y
- 20 (e) detectar la presencia de ambas sustancias detectables A y C;
- en donde la detección simultánea de ambas sustancias A y C es indicativa de la presencia de dos poblaciones de GS que tienen diferente edad.
- 25 2. Un método in vitro de investigar en una célula el efecto de un estímulo en gránulos secretores (GS) diferencialmente marcados según su edad que comprende:
- (a) poner en contacto una célula que puede formar GS y que expresa una proteína de fusión que comprende
- 30 (i) un (poli)péptido específico para GS y
- (ii) un (poli)péptido que tiene un sitio de unión común para al menos tres sustancias diferentes A, B y C que se unen covalentemente al mismo, en donde el (poli)péptido es un SANP-tag, un HaloTag o una etiqueta de tetracisteína In-Cell;
- en donde dichas sustancias son capaces de penetrar la membrana celular y en donde al menos las sustancias A y C son detectables por medios diferentes; con
- 35 a. una sustancia A que se dirige a dicho sitio de unión; y saturar los sitios de unión restantes poniendo en contacto la célula con una sustancia B que bloquea los sitios de unión que no se unieron a la sustancia A; o
- b. una sustancia B que bloquea dicho sitio de unión en una cantidad suficiente para saturar dichos sitios de unión
- 40 (b) permitir que la sustancia B sin unir se elimine de la célula o eliminar la sustancia B sin unir de la célula;
- (c1) aplicar un estímulo a la célula;
- (d1) poner en contacto la célula con una sustancia C que se dirige a dicho sitio de unión en la proteína de fusión expresada durante y/o después del paso (c); y
- 45 (e1) detectar la presencia de la sustancia A y/o C y/o monitorizar el número, tamaño, motilidad, localización en la célula, y/o secreción de los GS diferencialmente marcados obtenidos en el paso (a) y/o (d1); o
- (c2) poner en contacto la célula con una sustancia C que se dirige a dicho sitio de unión en la proteína de fusión expresada durante y/o después del paso (c);
- (d2) aplicar un estímulo a la célula; y
- 50 (e2) detectar la presencia de la sustancia C y/o monitorizar el número, tamaño, motilidad, localización en la célula, y/o secreción de los GS diferencialmente marcados obtenidos en el paso (a) y/o (c2).
3. Un huésped transgénico no humano que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende
- 55 (i) un (poli)péptido específico para GS, en donde el (poli)péptido específico para GS es insulina, flogrina, ICA512, carboxipeptidasa E/H, cromogranina A, cromogranina B, secretogranina II, proteína convertasa 1 o 2, amilina, hormona de crecimiento, prolactina, ANP o NPY y
- 60 (ii) un (poli)péptido que tiene un sitio de unión común para al menos tres sustancias diferentes A, B y C que se unen covalentemente al mismo, en donde el (poli)péptido es un SANP-tag, un HaloTag o una etiqueta de tetracisteína In-Cell.
4. El método de la reivindicación 2, en donde el estímulo es un agente de prueba y el efecto que se va a investigar es la capacidad del agente de prueba de inducir la formación de gránulos secretores o su secreción o ambos (GS) en una célula;
- 65

en donde el método comprende además el paso (f) comparar los resultados obtenidos en el paso (e1) o (e2) con los obtenidos para una célula de referencia que no se ha puesto en contacto con el agente de prueba pero se ha tratado de otra manera igualmente;

en donde una cantidad de sustancia A y/o sustancia C detectada en la célula que es diferente de esa en la célula de referencia es indicativa de la capacidad del agente de prueba de afectar la formación y/o la secreción de GS en la célula.

- 5 5. El método o el huésped transgénico no humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el GS es un gránulo de insulina y el (poli)péptido del paso (a) (i) es específico para gránulos de insulina.
- 10 6. El método o el huésped transgénico no humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sustancia B que se une a SANP-tag es BTP.
- 15 7. El método o el huésped transgénico no humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la sustancia A que se une a SANP-tag es TMR-Star, BG-505, BG-430 o BG-DAF.
- 20 8. El método o el huésped transgénico no humano de la reivindicación 7, en donde la sustancia C que se une a SANP-tag es TMR-Star, BG-505, BG-430 o BG-DAF.
- 25 9. El método de cualquiera de la reivindicaciones 2 y 4 a 8, en donde el estímulo es una sustancia química o radiación.
- 30 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4 a 9, en donde la detección o monitorización se efectúa detectando emisión de fluorescencia después de la excitación a una longitud de onda apropiada, quimioluminiscencia o absorbancia de luz.
- 35 11. El método o el huésped transgénico no humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la proteína de fusión se expresa después de introducir un ácido nucleico que codifica dicha proteína de fusión en la célula.
- 40 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en donde el (poli)péptido es insulina, flogrina, ICA512, carboxipeptidasa E/H, cromogranina A, cromogranina B, secretogranina II, proteína convertasa 1 o 2, amilina, u otra hormona endocrina neuropéptido específico para GS tal como hormona de crecimiento, prolactina, ANP y NPY.
- 45 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4 a 12, en donde la sustancia A o C o ambas comprenden 1. una fracción que se une específicamente al sitio de unión en la proteína de fusión y 2. una fracción detectable.
- 50 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5 a 13, que comprende además poner en contacto la célula con una sustancia D que se dirige a dicho sitio de unión en la proteína de fusión que se vuelve disponible para unión después del paso (d) y después de permitir que la sustancia C sin unir se elimine de la célula o después de eliminar la sustancia C sin unir de la célula.
- 55 15. Un método para detectar una sustancia secretada de GS marcados uniforme o diferencialmente según su edad que comprende
 - (a) separar una célula capaz de formar GS, que expresa una proteína de fusión que comprende
 - (i) un (poli)péptido específico para GS; y
 - (ii) un (poli)péptido que tiene un sitio de unión común para al menos tres sustancias diferentes A, B y C que se unen covalentemente al mismo, en donde el (poli)péptido es un SANP-tag, un HaloTag o una etiqueta de tetracisteína In-Cell y en donde dichas sustancias son capaces de penetrar la membrana celular y en donde al menos las sustancias A y C son detectables por medios diferentes
 y
 - (l) tratada según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 5 a 14; de su medio de cultivo; y
 - (b) detectar en el medio la presencia de cualquier sustancia detectable aplicada para el marcaje de GS, si hay alguna;
 en donde la detección de una o más sustancias en el medio indica que la secreción desde los GS ha tenido lugar.
- 60 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 14, que comprende además poner en contacto la célula que se va a someter al paso (a) con una sustancia B que bloquea los sitios de unión en dicho (poli)péptido ya expresado en la célula y permitir que la sustancia B sin unir se elimine de la célula o eliminar la sustancia B sin unir de la célula.
- 65

Figura 1

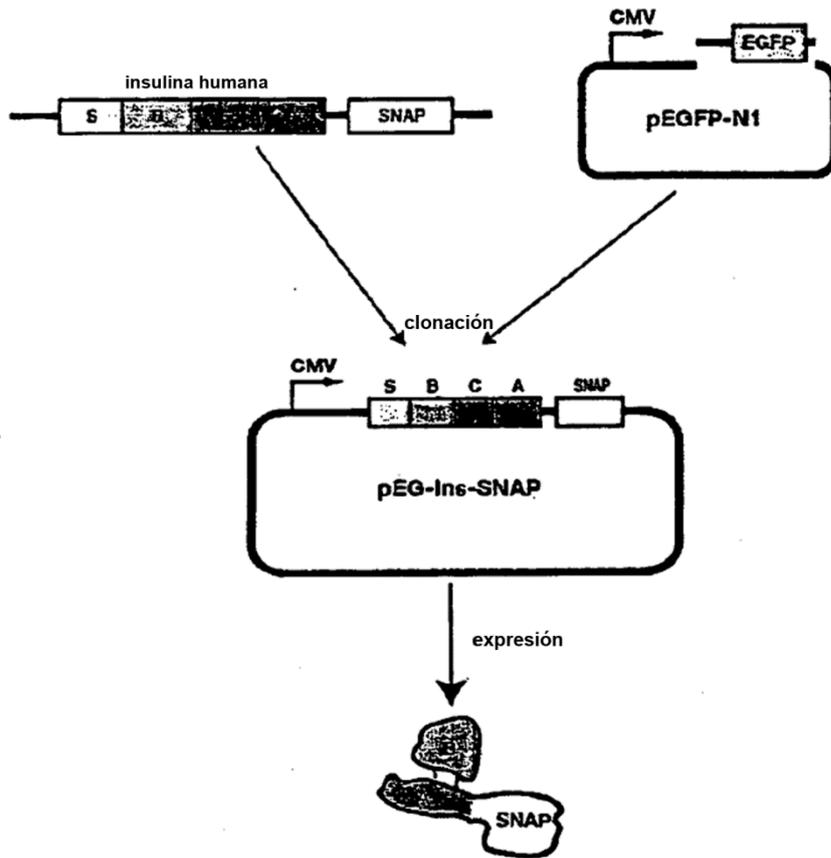


Figura 2a

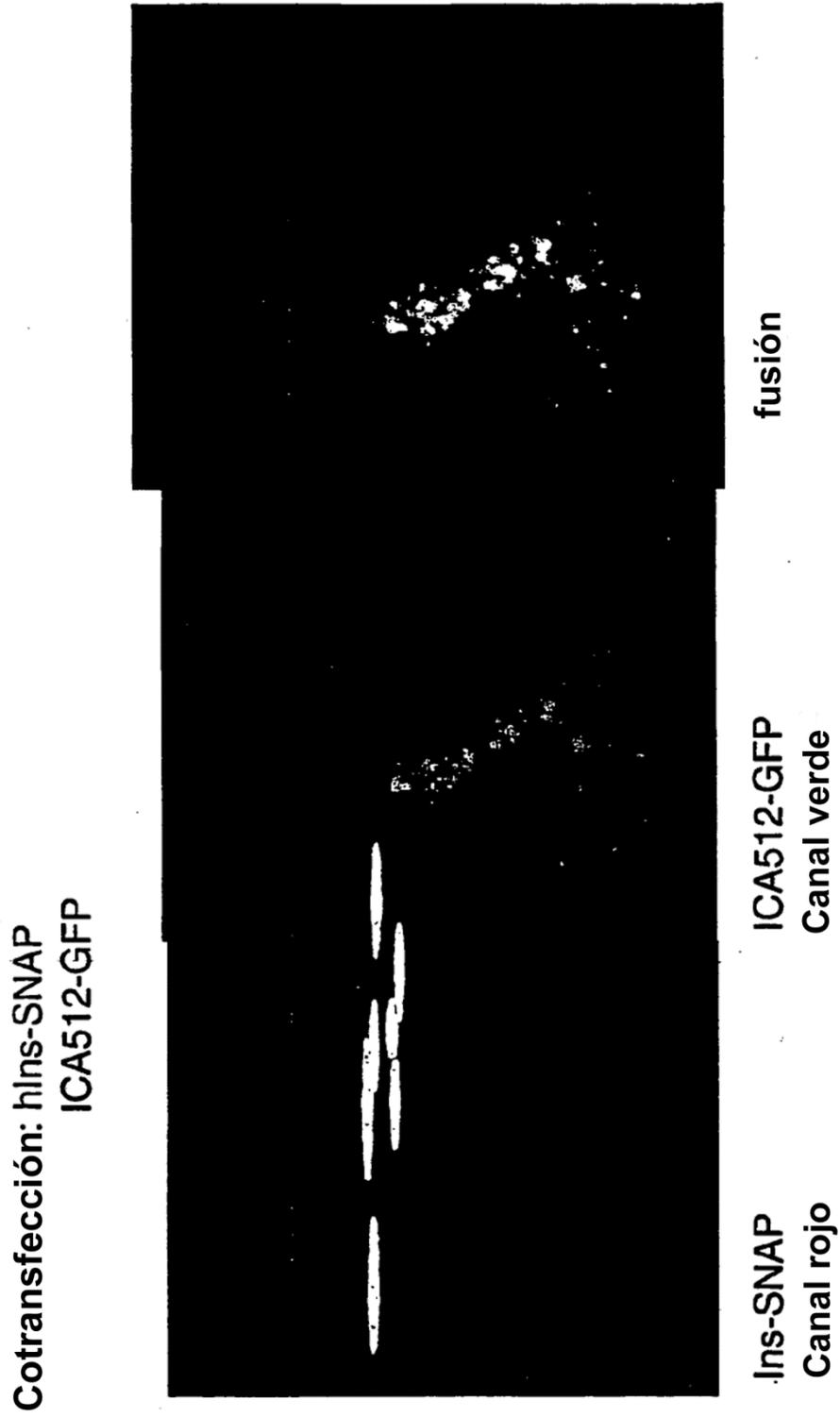
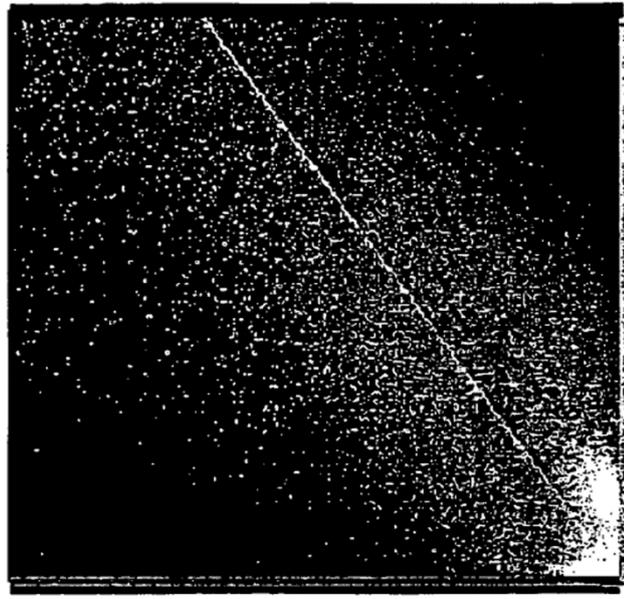


Figura 2b

Diagrama de dispersión



Pixeles verdes

Pixeles rojos

Pixeles colocalizados

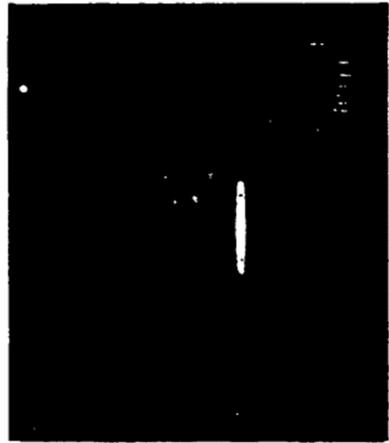


Transfección: Ins-SNAP
Evolución temporal: TMR ⇒ BTP (bloqueador de SNAP) ⇒ 4h en medio de incubación ⇒ BG505

Figura 3



fusión



BG505



TMR

Transfección: Ins-SNAP
Evolución temporal: TMR⇒Sin bloqueador⇒4h en medio de incubación⇒ BG505

Figura 4

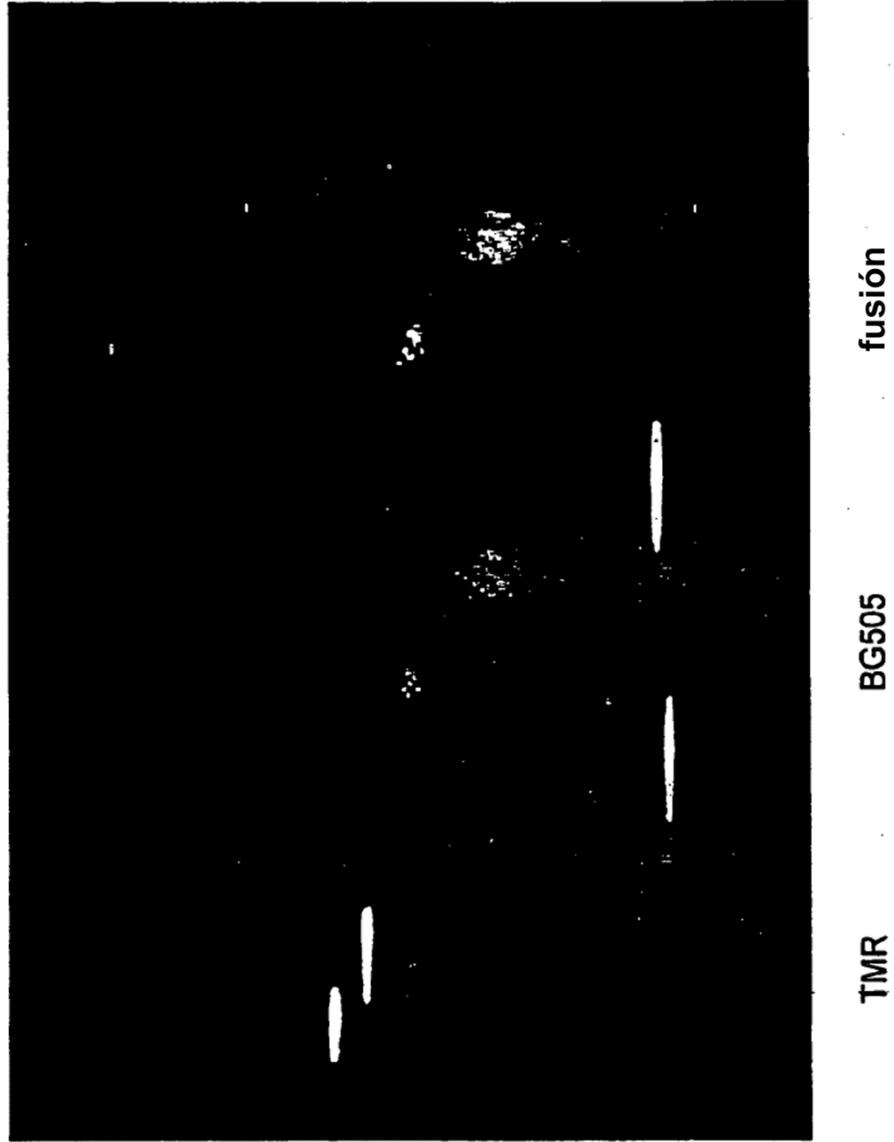


Figura 5a

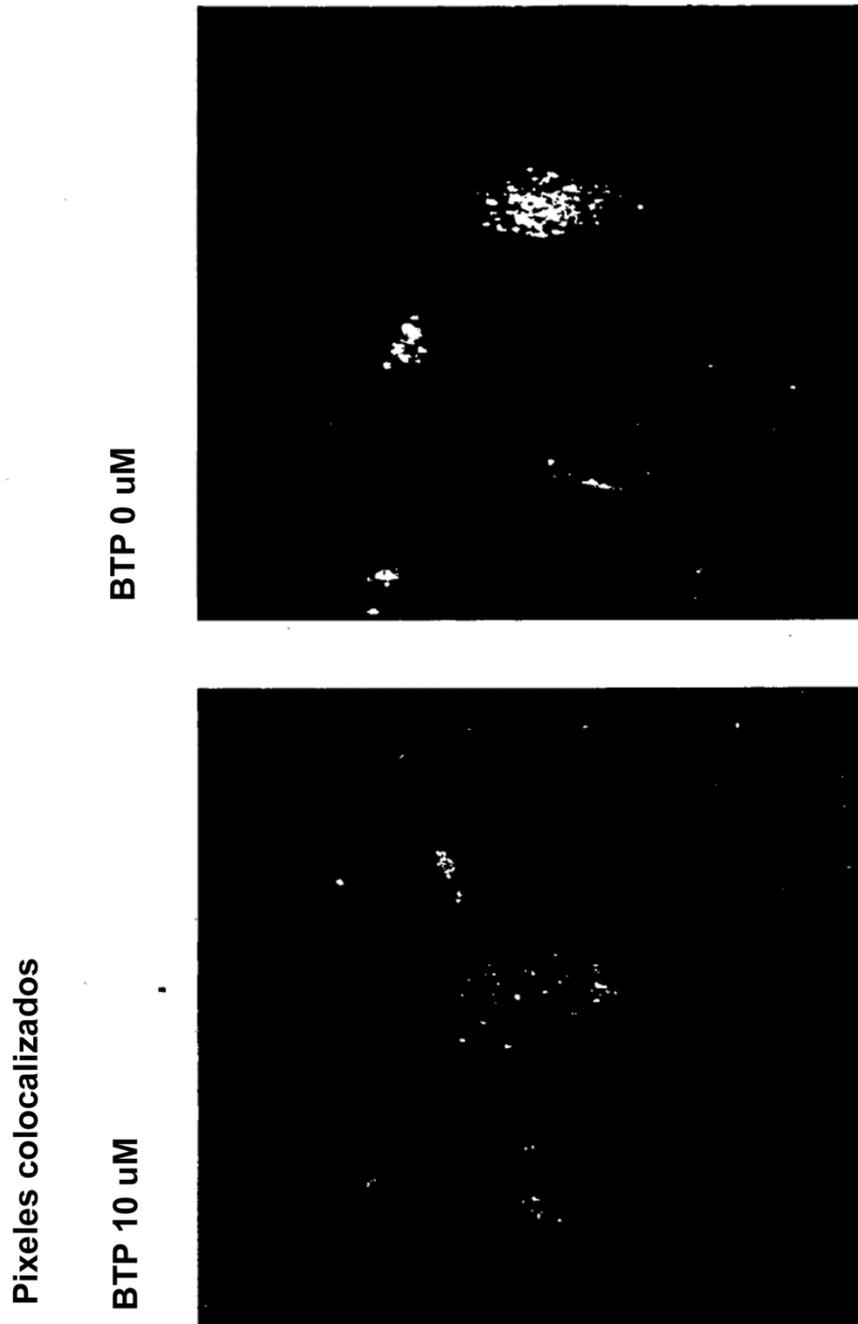


Figura 5b

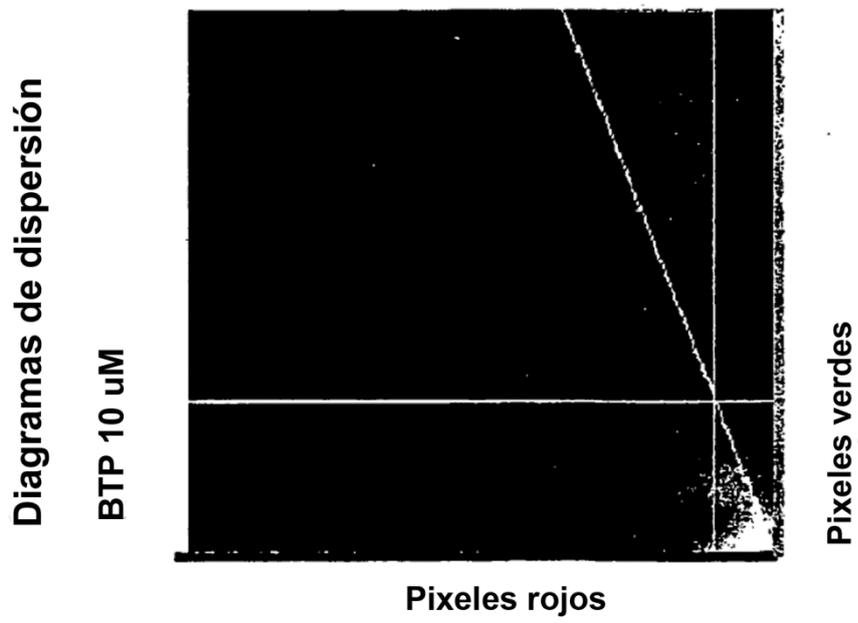
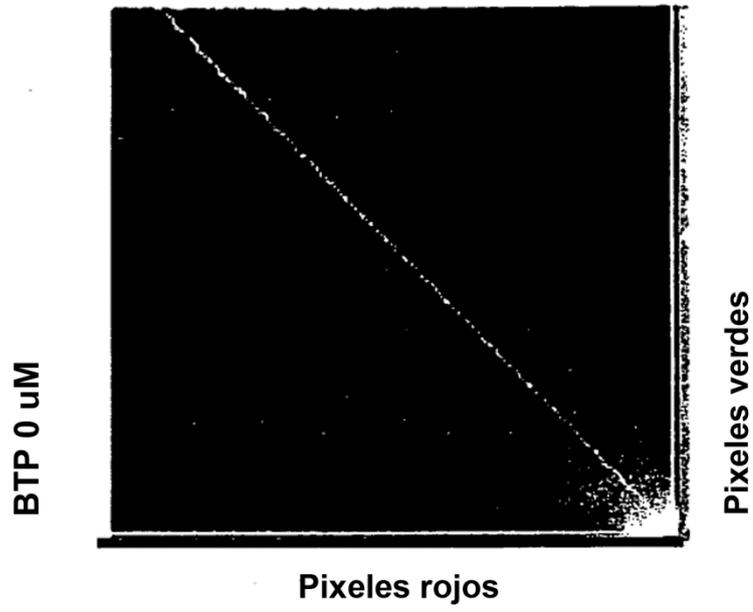


Figura 6

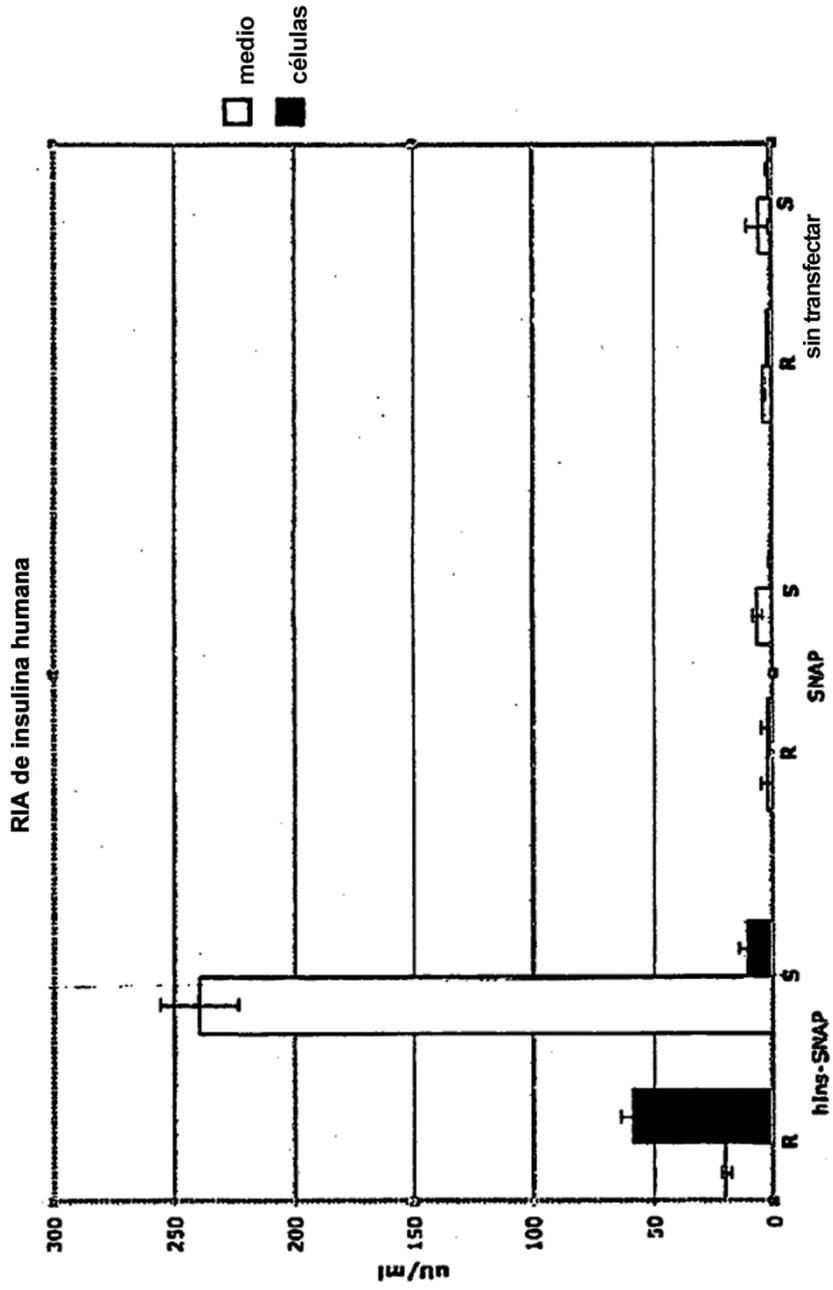


Figura 7

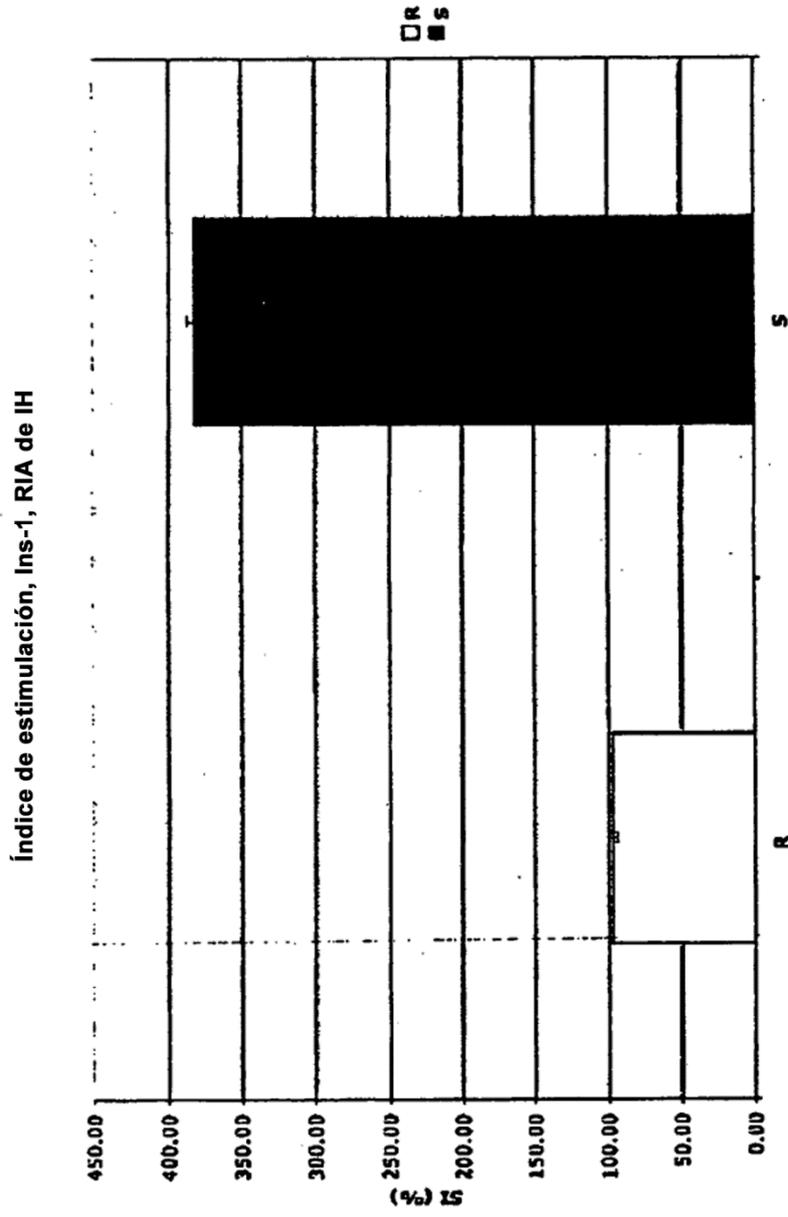


Figura 8

- 24 clones de Ins-1E; 24 clones en Ins-1
- Caracterización en curso



TMR
DAPI



TMR
DAPI

Figura 9

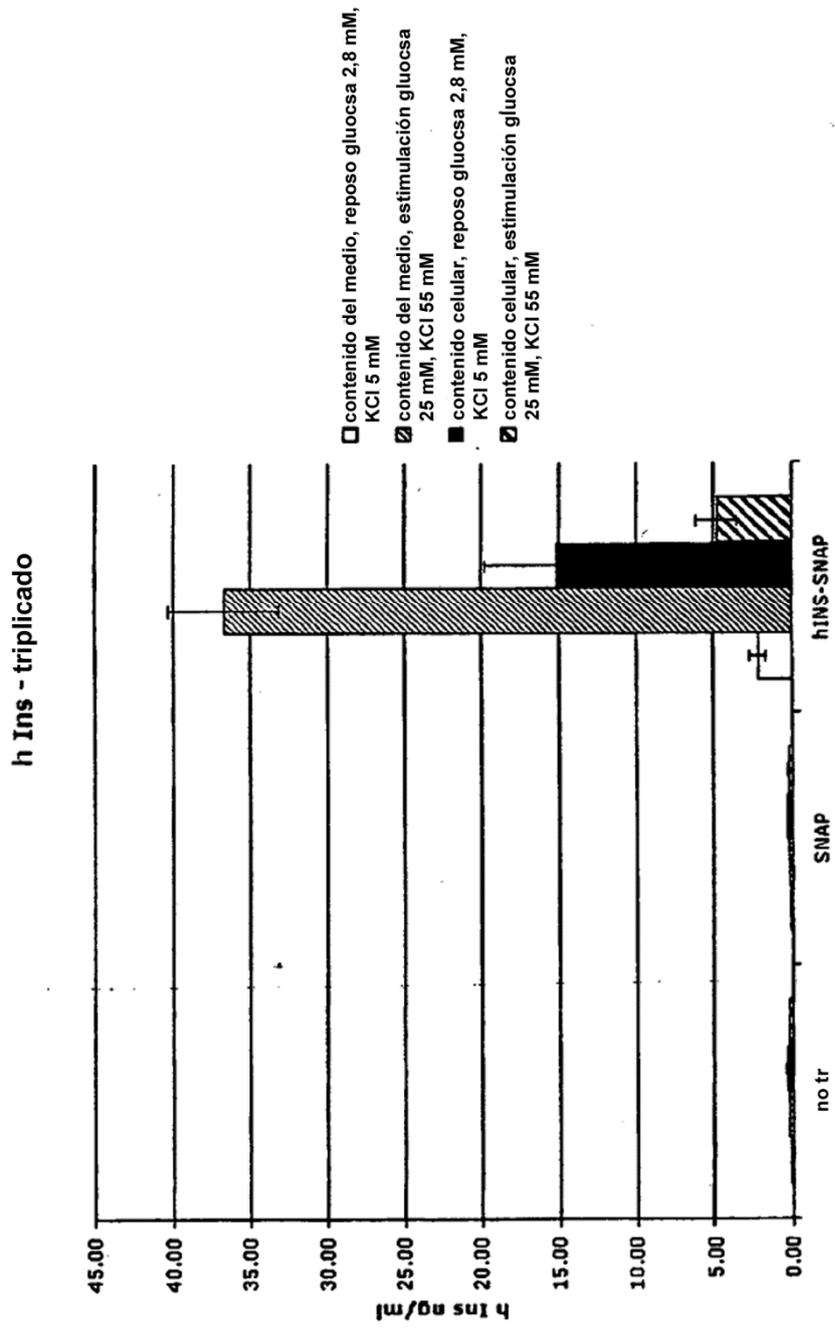


Figura 10

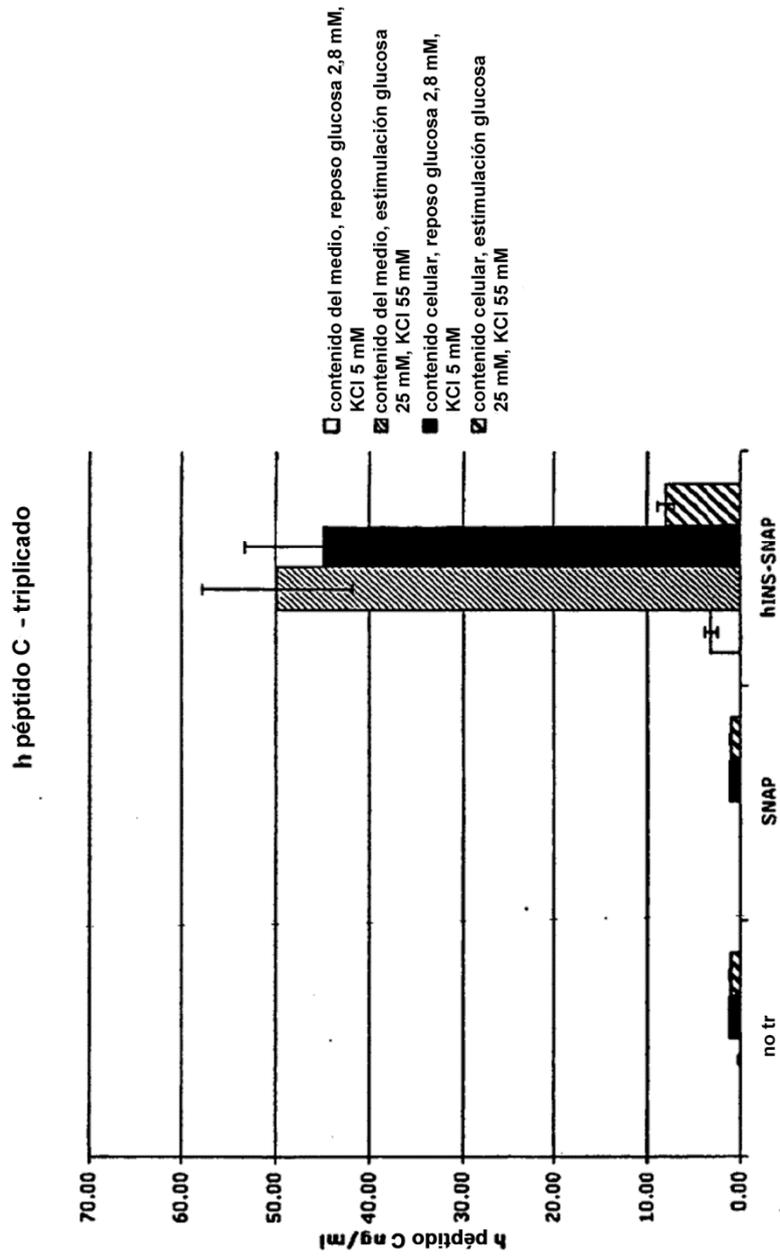


Figura 11

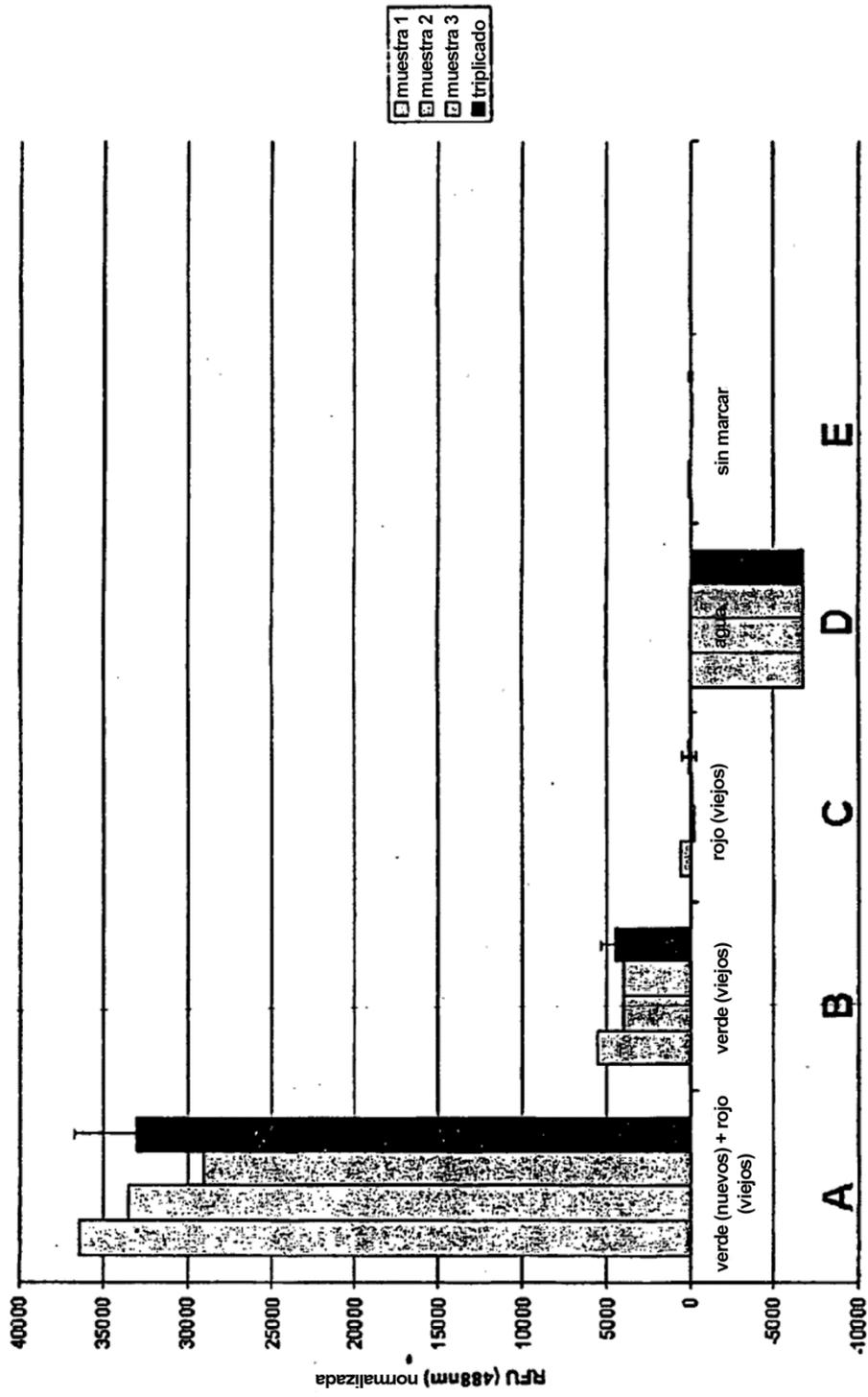


Figura 12

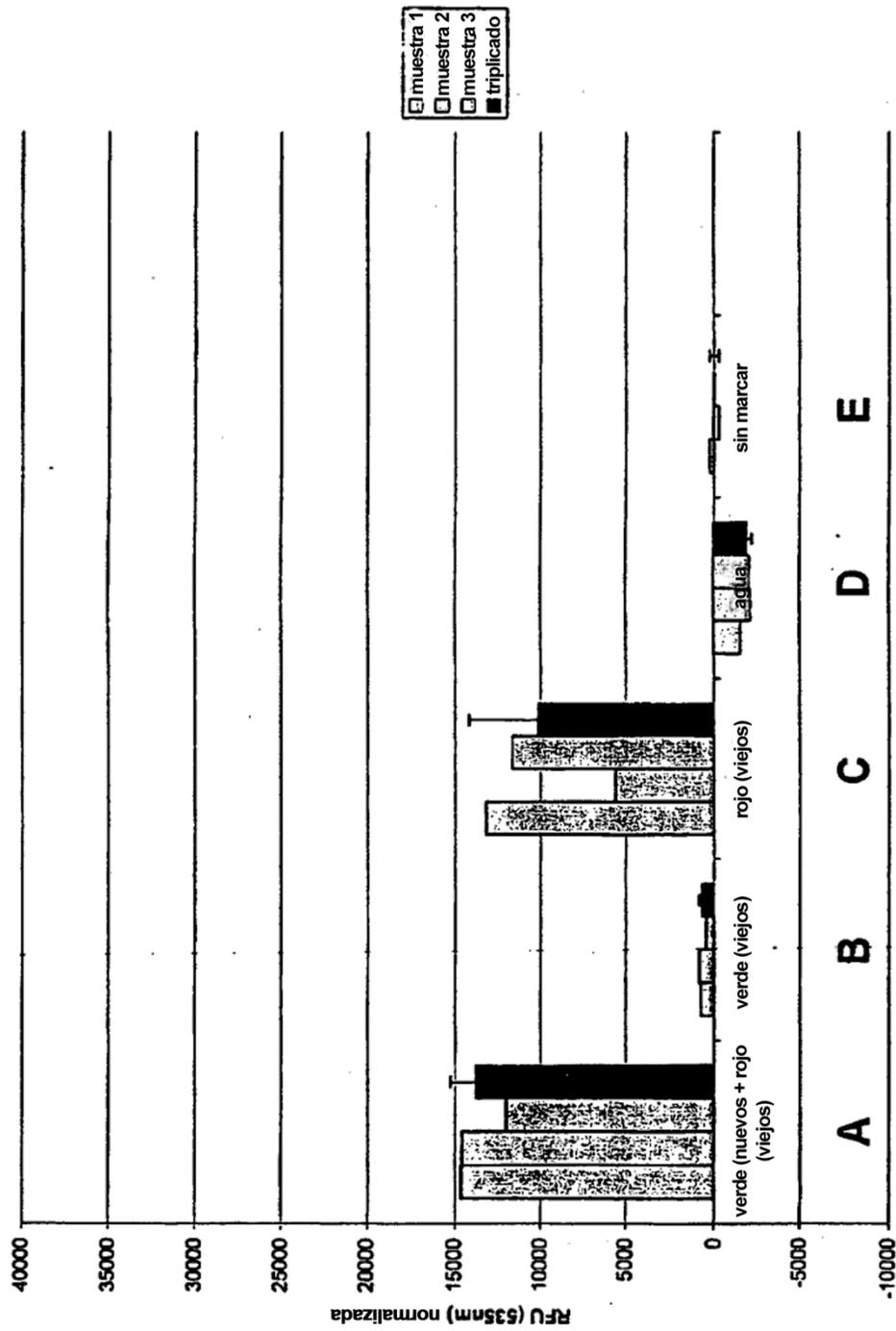


Figura 13

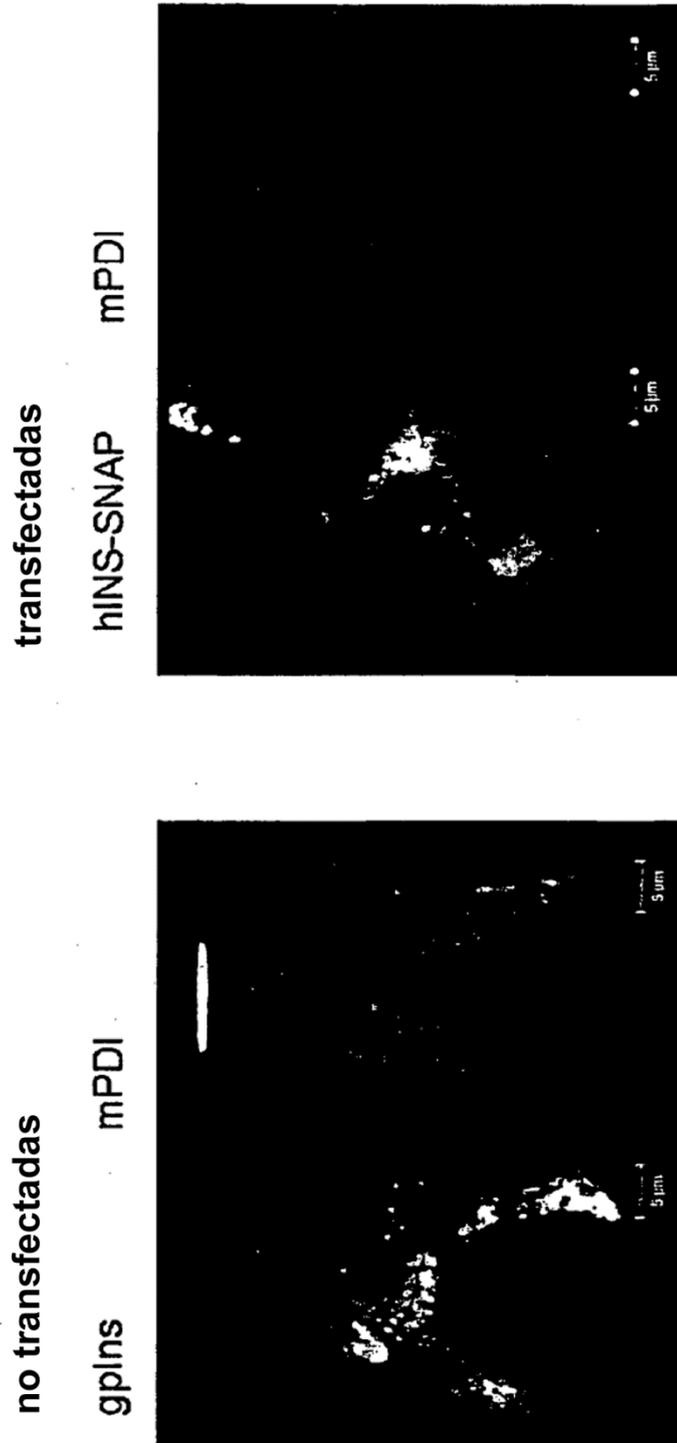


Figura 14

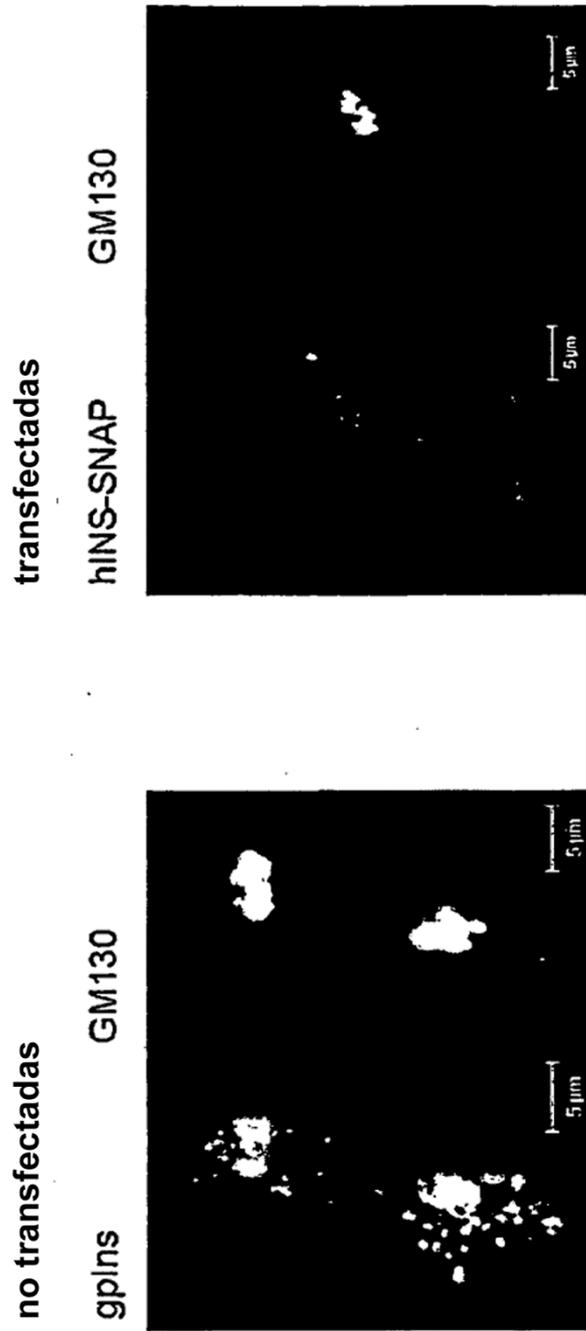


Figura 15

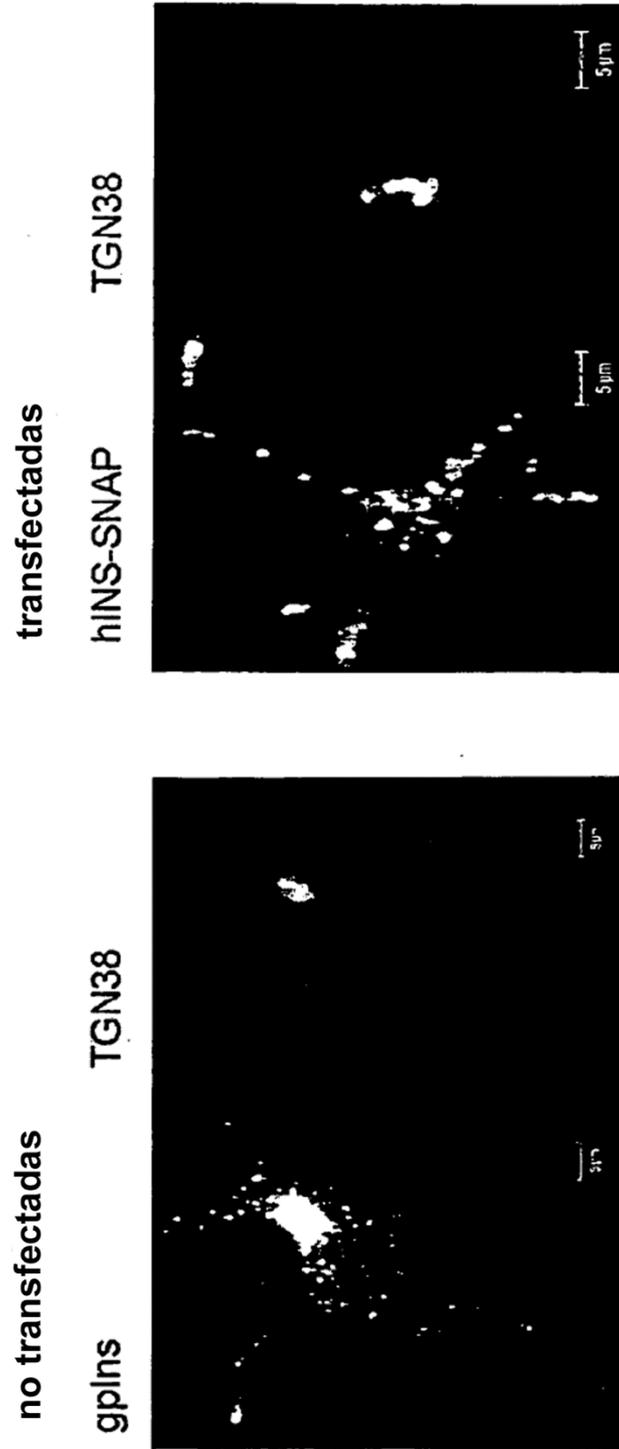


Figura 16

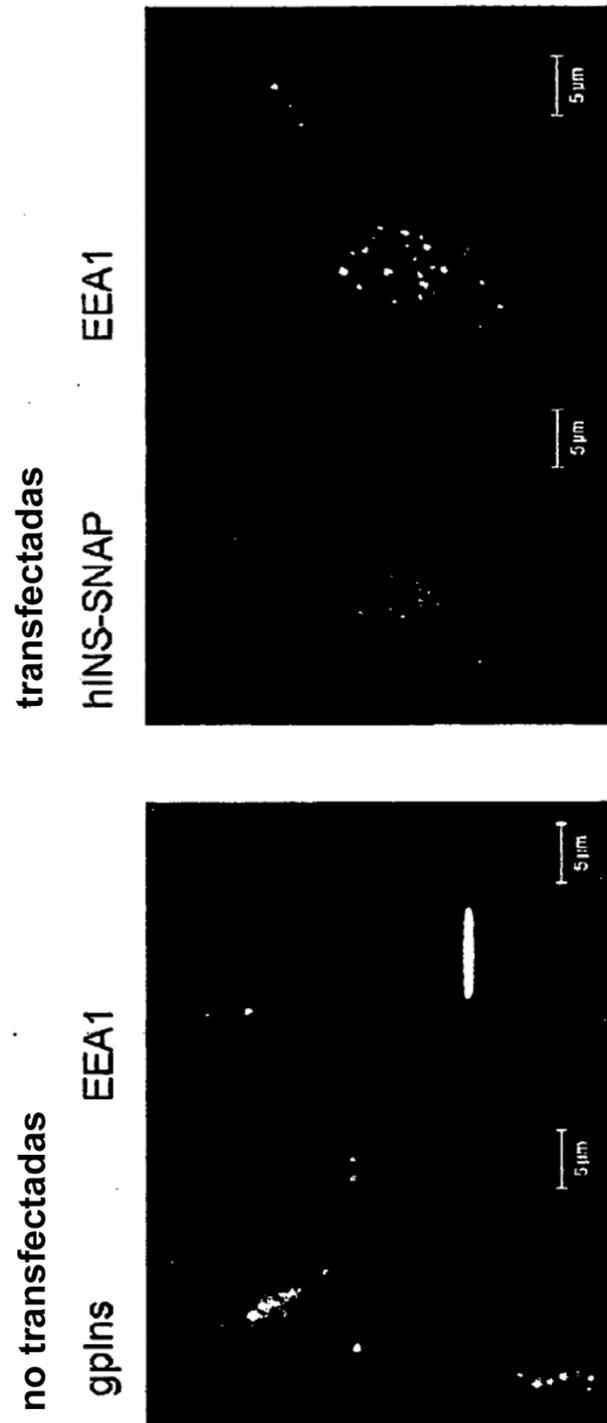


Figura 17

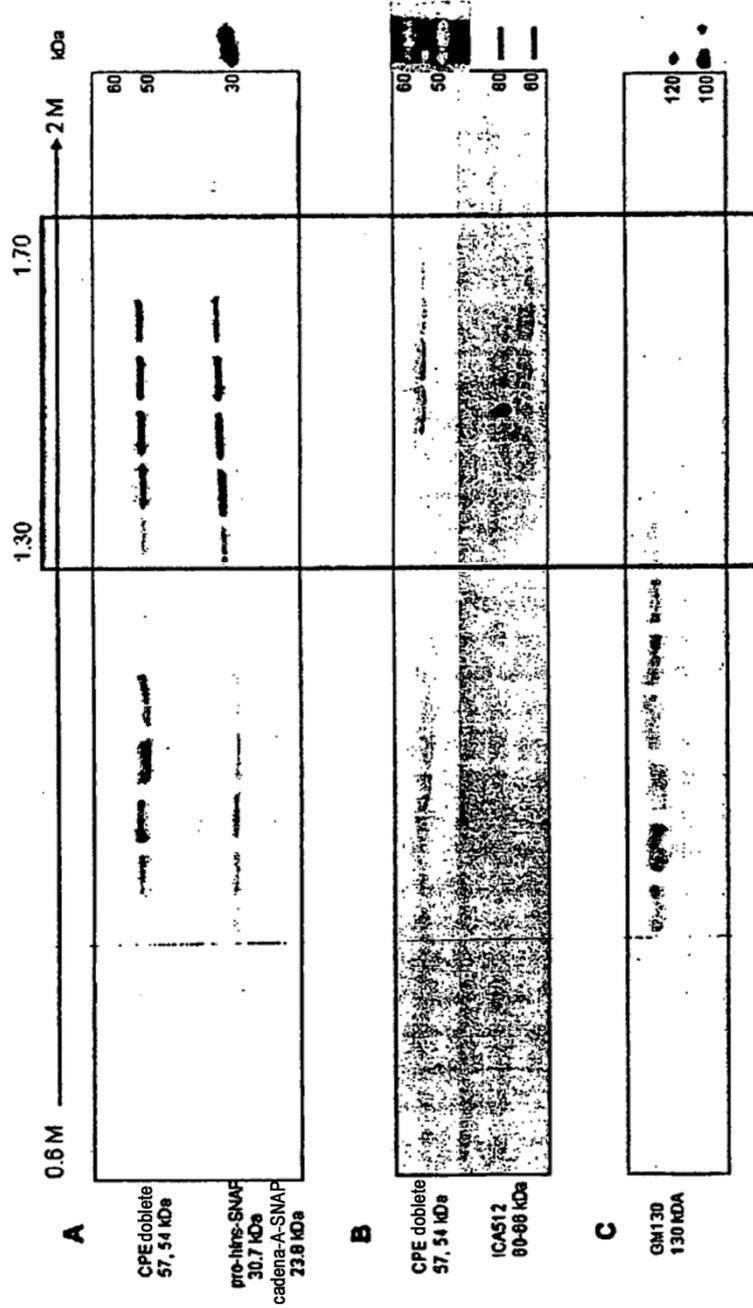


Figura 18

